



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



Estrategias para mitigar la toxicidad del arsénico inorgánico asociada a una exposición crónica a través de la dieta

Tesis doctoral presentada por:

Adrián Domene Rubio

Dirigida por:

Dra. Vicenta Devesa i Pérez

Dra. Dinoraz Vélez Pacios

Valencia, mayo de 2023

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



VNIVERSITAT
DE 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 **“Estrategias para mitigar la toxicidad del arsénico inorgánico asociada a una exposición crónica a través de la dieta”**, que presenta D. Adrián Domene Rubio 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 Doctor.

Valencia, mayo de 2018

Dra. Dinoraz Vélez Pacios

Dra. Vicenta Devesa i Pérez

*No te rindas, aún estás a tiempo
de alcanzar y comenzar de nuevo,
aceptar tus sombras,
enterrar tus miedos,
liberar el lastre,
retomar el vuelo.*

*No te rindas que la vida es eso,
continuar el viaje,
perseguir tus sueños,
destrabar el tiempo,
correr los escombros,
y destapar el cielo.*

Mario Benedetti

Agradecimientos

Quien termina una tesis no es la misma persona que la empezó. Han sido casi 4 años de continuo aprendizaje profesional y personal, que me han cambiado la vida. Empecé lleno de inseguridades, sin saber muy bien qué hacer y si iba a dar la talla, y ahora termino con la sensación de haber cumplido con una parte importante de los objetivos que esta gran etapa de mi vida me ha planteado. Y todo esto con el hándicap de haber tenido que lidiar con una pandemia casi al inicio, algo no muy común y que ha provocado grandes retrasos y algún que otro cambio de dirección. Aunque el futuro sea incierto, puedo afirmar que ha sido una gran oportunidad en mi vida y estoy muy agradecido a todas las personas que me he encontrado a lo largo de estos años y que han aportado su granito de arena para hacerme más llevadera y más fructuosa esta etapa.

Primero, me gustaría agradecer a mis supervisoras Vicenta y Deni, por ser dos ejemplos a seguir y guiarme en todo momento para que realizase un buen trabajo. Os agradezco de corazón el que pensaseis en mi para realizar esta desafiante tesis. Me lo habéis enseñado todo en estos años y siempre habéis estado ahí cuando lo he necesitado, tanto a nivel profesional como personal. Gracias por todos esos buenos momentos que me habéis hecho vivir y por todos los consejos que me habéis dado.

A mis compañeras de tesis, Pilar y Alicia, por su amistad y los buenos momentos compartidos. Sois de las mejores personas que he conocido en mi vida. Pilar, gracias por estar ahí, por ayudarme en todo lo que he necesitado y ayudarme a crecer a nivel profesional, he aprendido mucho de ti. Siempre tienes una sonrisa en el rostro y ayudas a los demás sin esperar nada a cambio, lo que te hace ser muy especial. Alicia, gracias por tu apoyo incondicional, por dar lo mejor de ti a los demás, por estar conmigo tanto en los buenos como en los malos momentos, y por sacarme una sonrisa en esos días que nada sale bien, eres una gran amiga. No olvidaré nunca los últimos meses en los que he necesitado ayuda y siempre has estado ahí. Hemos compartido muchas alegrías y angustias de nuestra etapa de

doctorandos y he crecido mucho junto a vosotras, os deseo todo lo mejor que la vida os pueda ofrecer.

A Luzmila, con su eterna sonrisa. Aunque no hayamos coincidido mucho tiempo en el laboratorio, también has aportado tu granito de arena a esta tesis. Ojalá hubiera podido trabajar más tiempo contigo para aprender juntos, gracias por todo. Te deseo mucha suerte en tu andadura predoctoral.

A Helena, por tu importante contribución a la realización de esta tesis, por todo lo que me has enseñado y ayudado, por los buenos momentos compartidos en el laboratorio. Eres un espíritu alegre que me ha hecho mucho más llevaderos los reveses experimentales que nos han surgido durante esta tesis.

Además, gracias a todas las personas que realizaron prácticas en el laboratorio de Elementos Traza a lo largo de estos años: Victoria, Natalia, Pau y Nastia. Por los momentos y almuerzos compartidos. En especial a Pilar Franco, que compartió conmigo los primeros momentos en la sala de cultivos celulares, donde tanto aprendimos.

Gracias también a Marina y Walter, con quien he tenido la suerte de colaborar y de los que también he aprendido mucho. Son dos personas estupendas, con un gran calidad humana y profesional.

A mis compañeros, colegas y amigos que pasaron por el IATA durante estos años. He tenido la oportunidad de coincidir con personas maravillosas que me han hecho vivir momentos muy especiales. De todos he aprendido algo. En especial agradezco a Celia, Ruth, Santi, Carlos, María Inés, María Castanedo, María Muñoz y Maite por los buenos momentos, comidas y viajes compartidos. Agradezco también a mis compañeros de planta (Gracia, Laura S., Raquel H., Patricia, Raquel, Andrés, Isaac y Sara) por los préstamos de equipos y reactivos y por las conversaciones matutinas en los pasillos que tanto alegran el día.

A Vicente Monedero y Manuel Zúñiga, del grupo de Bacterias Lácticas y Probióticos del IATA, por su colaboración en los estudios con bacterias lácticas,

microbiota y en los ensayos de experimentación animal, y por su valioso input en las discusiones de todos mis trabajos.

La realización de esta tesis tampoco hubiese sido posible sin la gran ayuda que he recibido por el personal técnico del IATA. Muchas gracias a Lola Abolafio por la ayuda técnica que me ha dado durante estos años. También me gustaría agradecer a Pepe Coll, por todas las horas al microscopio que ha pasado junto a mí, enseñándome para mejorar la calidad de mi estudio, compartiendo conmigo su conocimiento.

Me gustaría agradecer también a todo el personal de la Sección de Producción Animal de la Universidad de Valencia (Eli, Rafa, Ilra e Inma) por todas las risas y buenos momentos compartidos, que hicieron esa pesada etapa de trabajo, más llevadera. Agradecer en especial a Inma Noguera por toda su enseñanza y disposición.

Fuera del IATA, también he conocido muchas personas que han sido importantes para mí durante estos años. Mi eterno agradecimiento a mis compañeros y amigos César, Víctor, Marta, Alba Cotter y Alba Dereva. Han sido muchos los preciosos momentos compartidos. Sin vosotros, esta experiencia no hubiese sido lo mismo, gracias por vuestro apoyo en mis momentos más difíciles.

Agradezco también a todos mis amigos villeneros (José Miguel, Carlos, Fernando, Fran, Enrique, Javi, David y Rubén), que desde la distancia siempre han estado apoyándome en lo que fuese necesario.

Gracias también a mis amigos valencianos (Juanma, Andrés, Irene, Marta, Leila y Vicky), quienes me acogieron en mi llegada a Valencia y lo hicieron todo mucho más sencillo. Nada de esto hubiese sido igual sin vosotros.

Por último, pero no menos importante, me gustaría agradecer a mi familia: mis padres (Tere y Lorenzo), mis tíos (Enrique, Toni, Paqui, Jesús, Conchi, Vicente, Pepe, Andrés y Virtú) y primos (Abel, Isabel, Javier, Darío y Sergio). Gracias por

hacer que me sienta acompañado, aunque no os vea muy a menudo y por apoyarme en todas mis decisiones.

A todos con los que he compartido algún momento durante estos años, os transmito mis más sinceros agradecimientos. ¡Muchas gracias!

Resumen

La exposición crónica a arsénico (As) inorgánico [arsenito, As(III) y arseniato, As(V)] afecta a aproximadamente 200 millones de personas en todo el mundo. La principal vía de exposición es la dietaria, a través del consumo de agua contaminada. El tracto gastrointestinal, por lo tanto, está en constante contacto con el tóxico, sin embargo, la toxicidad intestinal del As inorgánico no ha sido investigada con detalle. El objetivo general de esta tesis ha sido la evaluación *in vivo* de la toxicidad intestinal de una exposición crónica a As inorgánico a través del agua de bebida y la búsqueda de estrategias para reducir este efecto tóxico.

Los datos obtenidos muestran que la exposición crónica (6 meses) a As(III) (15-30 mg/L) y As(V) (15-60 mg/L) de ratones Balb/c a través del agua de bebida genera un proceso prooxidante en el tejido intestinal, con un aumento de las especies reactivas (ROS/RNS), los peróxidos lipídicos y una disminución del glutatión reducido (GSH). Además, se evidencia una respuesta inflamatoria, con un aumento tisular de determinadas citoquinas proinflamatorias y una mayor infiltración de neutrófilos. Esta respuesta puede deberse a la activación de distintas rutas de señalización (p38 MAPK, JNK, NF- κ B). Las moléculas mediadoras de inflamación y estrés generadas en estas rutas son posiblemente las causantes de las alteraciones observadas en los distintos componentes de la barrera intestinal.

La exposición crónica produce una reducción de la mucina MUC2 tisular, indicativo de una alteración de la capa de mucus. Este efecto deletéreo va acompañado de una disminución de las células mucosecretoras. Los ensayos empleando organoides murinos de origen intestinal muestran que el As(III) genera una alteración de los patrones de diferenciación, con una reducción de la diferenciación de las células madre hacia el linaje secretor, lo que explicaría, en parte, el menor número de células productoras de mucus. Las proteínas de las uniones estrechas (CLDN-1, CLDN-3 y OCLN), que mantienen la integridad del epitelio, están reguladas a la baja en los animales tratados. Además, hay una disbiosis de la microbiota intestinal, aunque sólo en las exposiciones a As(V), y

una alteración del metabolismo microbiano de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) con ambas especies arsenicales. Las alteraciones de los componentes de la barrera son probablemente la causa del aumento de la permeabilidad y de la disrupción de la barrera intestinal. Esta disrupción puede favorecer la entrada de endotoxinas a la circulación sanguínea, lo que explicaría el aumento de los marcadores séricos de endotoxemia (LBP y TNF- α) en animales expuestos.

Los ensayos *in vitro* empleando cocultivos de células epiteliales del intestino y macrófagos expuestos subcrónicamente a As(III) han permitido identificar cepas de bacterias ácido-lácticas (BAL) capaces de reducir algunos de los efectos tóxicos observados *in vivo*. La administración de las cepas LE1 y BL23 no viables o sus medios condicionados (con los metabolitos secretados durante su crecimiento), reduce el estrés oxidativo y los signos de inflamación y disminuye las alteraciones de la expresión de la mucina y las relacionadas con las uniones y el volumen celular. Todo esto permite el restablecimiento de la permeabilidad paracelular. Esta reducción del paso paracelular conlleva un menor transporte de As(III) a través de la monocapa intestinal. Los resultados de los ensayos *in vitro* muestran que tanto los elementos estructurales de las bacterias como sus metabolitos pueden participar en el efecto protector frente a la toxicidad del As(III).

La eficacia de estas bacterias se ha confirmado *in vivo*, empleando ratones expuestos durante 2 meses a As(III) a través del agua de bebida y dosificados diariamente con las bacterias viables por sonda gástrica. Las cepas BAL han reducido la respuesta proinflamatoria y prooxidante observada a nivel tisular, han restaurado parcialmente los niveles de expresión de las proteínas de las uniones intercelulares CLDN-3 y OCLN y han incrementado la síntesis de MUC2, respecto a los animales tratados sólo con As(III). El metabolismo microbiano de los AGCC también ha experimentado una recuperación y los niveles de ácidos grasos existentes en el lumen han alcanzado valores similares a los de los animales no tratados. Todos estos efectos positivos han supuesto el restablecimiento de la permeabilidad de la mucosa, y una reducción de los marcadores de endotoxemia. Los datos obtenidos sugieren que este efecto protector puede deberse a una menor

internalización del As(III) en los tejidos intestinales y a una actividad antioxidante y antiinflamatoria de las bacterias al activar rutas como Nrf2 e IL-10. El tratamiento con las bacterias, además, ha tenido una repercusión directa sobre la absorción intestinal, reduciendo la acumulación de As en los órganos internos.

Palabras clave: Arsénico inorgánico, toxicidad, barrera intestinal, permeabilidad intestinal, inflamación, endotoxemia, microbiota intestinal, ácidos grasos de cadena corta

Abstract

Chronic exposure to inorganic arsenic (As) [arsenite, As(III) and arsenate, As(V)] affects approximately 200 million people worldwide. The main route of exposure is through consumption of contaminated water. Therefore, the gastrointestinal tract is in continuous contact with the contaminant, however, the intestinal toxicity of inorganic As has not been extensively investigated. The overall aim of this thesis was to evaluate *in vivo* the intestinal toxicity of a chronic exposure to inorganic As through drinking water and to search for strategies to reduce this toxic effect.

The data obtained show that chronic exposure (6 months) to As(III) (15-30 mg/L) and As(V) (15-60 mg/L) of Balb/c mice through drinking water generates a pro-oxidant process in the intestinal tissue, with an increase in reactive species (ROS/RNS), lipid peroxides and a depletion of reduced glutathione (GSH). In addition, an inflammatory response is evidenced, with an increase in tissue levels of certain pro-inflammatory cytokines and a greater infiltration of neutrophils. This response may be caused by the activation of various signaling pathways (p38 MAPK, JNK, NF- κ B). Inflammation- and stress-mediated molecules generated in these pathways are probably underlying the alterations in the components of the intestinal barrier.

Chronic exposure results in a reduction of the mucin MUC2, suggesting a disturbance of the mucus layer. This deleterious effect is accompanied by a decrease in mucosecretory cells. Assays using murine organoids of intestinal origin show that As(III) leads to altered differentiation patterns, with reduced differentiation of stem cells towards the secretory lineage, which would explain, in part, the reduced number of mucus-producing cells. Tight junction proteins (CLDN-1, CLDN-3 and OCLN), which maintain the integrity of the epithelium, are down-regulated in As-treated animals. In addition, there is a dysbiosis of the gut microbiota, although only in As(V) exposures, and an altered microbial metabolism of short-chain fatty acids (SCFA) with both arsenical species.

Alterations in barrier components are probably the cause of increased permeability and disruption of the intestinal barrier. This disruption may favor the entry of endotoxins into the bloodstream, which would explain the increase in serum markers of endotoxemia (LBP and TNF- α) in exposed animals.

In vitro assays using cocultures of intestinal epithelial cells and macrophages subchronically exposed to As(III) have identified lactic acid bacteria (LAB) capable of reducing some of the toxic effects observed *in vivo*. Administration of non-viable LE1 and BL23 strains or their conditioned media (with metabolites secreted during their growth) reduces oxidative stress and signs of inflammation and decreases alterations in mucin expression and disturbances associated with cell junctions and cell volume. All this translates into a restoration of the paracellular permeability. Reduced paracellular passage also leads to a decrease in As(III) transport across the intestinal monolayer. These results show that both bacterial structural elements and their metabolites may be involved in the protective effect against As(III) toxicity.

The efficacy of these bacteria has been confirmed *in vivo*, using mice exposed for 2 months to As(III) via drinking water and supplied daily with viable LE1 and BL23 strains by gavage. Both LAB strains reduce the pro-inflammatory and pro-oxidant response, partially restore the expression of the intercellular junction proteins CLDN-3 and OCLN, and increase the synthesis of MUC2, compared to animals treated with As(III) alone. Microbial metabolism of SCFA is also recovered and the levels of fatty acids in the lumen reach values similar to those of untreated animals. All these positive effects result in the restoration of mucosal permeability, and in a reduction of the markers of endotoxemia. The data obtained suggest that this protective effect may be due to a lower internalization of As(III) in the intestinal tissues and to an antioxidant and anti-inflammatory activity of the bacteria through the activation of pathways such as Nrf2 and IL-10. Treatment with the bacteria has also a direct impact on intestinal absorption, reducing the accumulation of As in internal organs.

Keywords: Inorganic arsenic, toxicity, intestinal barrier, intestinal permeability, inflammation, endotoxemia, intestinal microbiota, short-chain fatty acids

Resum

L'exposició crònica a arsènic (As) inorgànic [arsenito, As(III) i arseniat, As(V)] afecta a aproximadament 200 milions de persones a tot el món. La principal via d'exposició és la dietària, a través del consum d'aigua contaminada. Per tant, el tracte gastrointestinal està en contacte continu amb el tòxic, no obstant això, la toxicitat intestinal de l'As inorgànic no ha sigut investigada amb detall. L'objectiu general d'aquesta tesi ha sigut l'avaluació *in vivo* de la toxicitat intestinal d'una exposició crònica a As inorgànic a través de l'aigua de beguda i la cerca d'estratègies per a reduir aquest efecte tòxic.

Les dades obtingudes mostren que l'exposició crònica (6 mesos) a As(III) (15-30 mg/L) i As(V) (15-60 mg/L) de ratolins Balb/c a través de l'aigua de beguda genera un procés prooxidant en el teixit intestinal, amb un augment de les espècies reactives (ROS/RNS), els peròxids lipídics i una disminució del glutatió reduït (GSH). A més, s'evidencia una resposta inflamatòria, amb un augment tissular de determinades citocines pro-inflamatòries i una major infiltració de neutròfils. Aquesta resposta pot deure's a l'activació de diferents rutes de senyalització (p38 MAPK, JNK, NF- κ B). Les molècules mediadores d'inflamació i estrès generades en aquestes rutes són possiblement les causants de les alteracions dels diferents components de la barrera intestinal.

L'exposició produeix una reducció de la mucina MUC2 tissular, indicatiu d'una alteració de la capa de mucus. Aquest efecte deleteri va acompanyat d'una disminució de les cèl·lules mucosecretors. Els assajos emprant organoides murins d'origen intestinal mostren que l'As(III) genera una alteració dels patrons de diferenciació, amb una reducció de la diferenciació de les cèl·lules mare cap al llinatge secretor, la qual cosa explicaria, en part, el menor nombre de cèl·lules productores de mucus. Les proteïnes de les unions estretes (CLDN-1, CLDN-3 i OCLN), que mantenen la integritat de l'epiteli, estan regulades a la baixa en els animals tractats amb As. A més, hi ha una disbiosi de la microbiota intestinal, encara que només en les exposicions a As(V), i una alteració del metabolisme

microbià dels àcids grassos de cadena curta (AGCC) amb totes dues espècies arsenicals. Les alteracions dels components de la barrera són probablement la causa de l'augment de la permeabilitat i de la disrupció de la barrera intestinal. Aquesta disrupció pot afavorir l'entrada d'endotoxines a la circulació sanguínia, la qual cosa explicaria l'augment dels marcadors sèrics de endotoxèmia (LBP i TNF- α) en animals exposats.

Els assajos *in vitro* emprant co-cultius de cèl·lules epitelials de l'intestí i macròfags exposats subcrònicament a As(III) ha permès identificar bacteris àcid-làctics (BAL) capaços de reduir alguns dels efectes tòxics observats *in vivo*. L'administració de les soques LE1 i BL23 no viables o els seus medis condicionats (amb els metabòlits secretats durant el seu creixement) redueix l'estrès oxidatiu i els signes d'inflamació i disminueix les alteracions de l'expressió de la mucina i les alteracions relacionades amb les unions i el volum cel·lular. Tot això redunda en un restabliment de la permeabilitat. La reducció del pas paracel·lular també comporta un menor transport d'As(III) a través de la monocapa intestinal. Aquests resultats mostren que tant els elements estructurals dels bacteris com els seus metabòlits poden participar en l'efecte protector.

L'eficàcia d'aquests bacteris s'ha confirmat *in vivo*, emprant ratolins exposats durant 2 mesos a As(III) a través de l'aigua de beguda i dosats diàriament amb els bacteris viables per sonda gàstrica. Les soques BAL han reduït la resposta pro-inflamatòria i prooxidant observada a nivell tissular, han restaurat parcialment els nivells d'expressió de les proteïnes de les unions intercel·lulars CLDN-3 i OCLN, i han incrementat la síntesi de MUC2 i per tant de mucus, respecte als animals tractats només amb As(III). El metabolisme microbià dels AGCC també ha experimentat una recuperació i els nivells d'àcids grassos existents en el lumen han aconseguit valors similars als dels animals no tractats. Tots aquests efectes positius han suposat el restabliment de la permeabilitat de la mucosa i una reducció dels marcadors d'endotoxèmia. Les dades obtingudes suggereixen que aquest efecte protector pot deure's a una menor internalització de l'As(III) en els teixits intestinals i a una activitat antioxidant i antiinflamatòria dels bacteris al activar

rutes com Nrf2 i IL-10. El tractament amb els bacteris, a més, ha tingut una repercussió directa sobre l'absorció intestinal, reduint l'acumulació d'As en els òrgans interns.

Paraules clau: Arsènic inorgànic, toxicitat, barrera intestinal, permeabilitat intestinal, inflamació, endotoxèmia, microbiota intestinal, àcids grassos de cadena curta.

Índice general

<i>Índice general</i> _____	I
<i>Índice de Figuras</i> _____	V
<i>Índice de Tablas</i> _____	IX
<i>Abreviaturas</i> _____	XI
INTRODUCCIÓN _____	1
1. Arsénico y sus especies: propiedades y presencia en el medio ambiente _____	3
2. Arsénico inorgánico en la dieta: fuentes de exposición e ingestas _____	6
3. El importante papel de las biotransformaciones presistémicas y la dieta en la absorción y la toxicidad de As inorgánico _____	9
3.1. Absorción intestinal del As inorgánico y mecanismos implicados _____	10
3.2. Modulación de la absorción intestinal por las biotransformaciones presistémicas _____	12
3.3. Modulación de la absorción de As inorgánico por componentes de la dieta _____	13
4. Patologías asociadas a exposiciones a As inorgánico y mecanismos de acción _____	15
5. Toxicidad intestinal del As inorgánico y posibles implicaciones sistémicas _____	17
5.1. Efectos sobre la microbiota _____	17
5.2. Efecto del As inorgánico sobre el tejido intestinal _____	19
5.3. Importancia de la barrera intestinal en la acción sistémica del As inorgánico _____	21
6. Acción conjunta de los componentes de la barrera para mantener la homeostasis intestinal _____	23
6.1. Epitelio intestinal _____	24
6.1.1. Programa de renovación del epitelio _____	25
6.1.2. Función de las células epiteliales en la regulación de los mecanismos de defensa frente a tóxicos _____	27
6.1.3. Uniones intercelulares _____	30
6.2. Sistema inmune intestinal asociado a la mucosa _____	31
6.3. Microbiota intestinal _____	33
7. Modelos para el estudio de la toxicocinética y los desórdenes intestinales _____	34
7.1. Modelos animales _____	34
7.2. Modelos celulares basados en líneas inmortalizadas _____	35
7.3. Modelos celulares basados en células primarias _____	37
OBJETIVOS _____	41
METODOLOGÍA _____	45
1. Especies arsenicales _____	47
2. Animales y tratamientos _____	47
3. Ensayos de toxicidad <i>in vivo</i> _____	48
3.1. Evaluación de la respuesta inflamatoria causada por el As inorgánico _____	48
3.1.1. Concentración de citoquinas proinflamatorias en el tejido intestinal _____	48

3.1.2. Evaluación de los contenidos fecales de lactoferrina y la actividad MPO intestinal _____	49
3.2. Determinación de los niveles tisulares de biomarcadores de estrés _____	50
3.2.1. Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno (ROS/RNS) _____	50
3.2.2. Determinación del glutatión reducido (GSH) y la peroxidación lipídica ____	50
3.3. Estudio histológico del intestino _____	51
3.4. Análisis transcriptómico de los genes afectados por la exposición o implicados en el proceso toxicológico _____	52
3.5. Análisis proteómico mediante Western blot (WB) de los genes afectados por la exposición o implicados en el proceso toxicológico _____	55
3.6. Análisis de la composición de la microbiota intestinal _____	56
3.7. Evaluación del metabolismo de la microbiota intestinal: Perfil luminal de AGCC _____	58
3.8. Determinación de la permeabilidad intestinal y marcadores de endotoxemia ____	59
3.9. Acumulación tisular de As inorgánico _____	60
3.10. Evaluación del efecto del As inorgánico sobre la diferenciación y proliferación del nicho de células madre intestinales _____	61
4. Evaluación <i>in vitro</i> de la eficacia de cepas de bacterias ácido-lácticas para la reducción de la toxicidad intestinal de As inorgánico _____	63
4.1. Estrategias ensayadas _____	63
4.2. Modelo de mucosa intestinal empleado en los ensayos de toxicidad _____	64
4.3. Tratamiento del tricultivo con As(III) y las estrategias dietéticas _____	66
4.4. Evaluación de parámetros toxicológicos para determinar la eficacia de las estrategias _____	67
4.4.1. Respuesta proinflamatoria y prooxidante de las células intestinales y los macrófagos _____	67
4.4.2. Análisis estructural de la monocapa intestinal _____	67
4.4.3. Permeabilidad paracelular de la monocapa epitelial _____	68
4.4.4. Transporte de As a través de la monocapa celular _____	69
4.5. Evaluación de la captación de As por las bacterias lácticas. _____	69
5. Evaluación <i>in vivo</i> del papel protector de las estrategias frente a la toxicidad intestinal de As(III) _____	72
5.1. Animales y tratamientos _____	72
5.2. Evaluación del estrés oxidativo y el estado inflamatorio del tejido intestinal ____	73
5.3. Evaluación estructural y funcional de la mucosa intestinal _____	73
5.4. Metabolismo de la microbiota intestinal _____	74
5.5. Evaluación de los mecanismos de protección de las BAL frente a la toxicidad del As inorgánico _____	74
6. Análisis estadístico _____	76
CAPÍTULO 1: Evaluación <i>in vivo</i> de la toxicidad intestinal generada por una exposición crónica a arsenito _____	77

1. RESULTADOS	80
1.1. Estado general de los animales durante el tratamiento con As(III)	80
1.2. Respuesta prooxidante por la exposición crónica a As(III)	81
1.3. Respuesta inflamatoria generada por la exposición crónica a As(III)	84
1.3.1. Niveles de citoquinas proinflamatorias en el tejido intestinal	84
1.3.2. Infiltración de neutrófilos en la mucosa intestinal	86
1.4. Participación de diversas rutas de señalización en la respuesta proinflamatoria/prooxidante	89
1.5. Efecto del tratamiento con As(III) sobre la estructura epitelial y su regeneración	90
1.6. Efecto del tratamiento con As(III) sobre la microbiota intestinal	93
1.7. Efecto del tratamiento con As(III) sobre los contenidos fecales de AGCC	98
1.8. Efecto del tratamiento con As(III) sobre la permeabilidad intestinal y los marcadores de endotoxemia	99
1.9. Efecto del tratamiento con As(III) sobre la diferenciación celular en el intestino.	101
1.10. Relación entre varios de los parámetros toxicológicos evaluados	103
2. DISCUSIÓN	105
3. CONCLUSIONES	111
CAPÍTULO 2: Evaluación in vivo de la toxicidad intestinal generada por una exposición crónica a arseniato	113
1. RESULTADOS	116
1.1. Estado general de los animales durante la exposición a As(V)	116
1.2. Respuesta prooxidante generada por la exposición crónica a As(V)	118
1.3. Respuesta inflamatoria generada por la exposición crónica a As(V)	120
1.3.1. Niveles de citoquinas proinflamatorias en el tejido intestinal	120
1.3.2. Infiltración de neutrófilos en la mucosa intestinal	122
1.3.3. Activación de rutas de señalización prooxidante/proinflamatorias	124
1.4. Efecto del tratamiento con As(V) sobre proteínas constituyentes de las uniones y el mucus de la monocapa epitelial del intestino	126
1.5. Efecto del tratamiento con As(V) sobre la microbiota y su metabolismo	127
1.5.1. Composición de la microbiota intestinal	127
1.5.2. Metabolismo de los AGCC	134
1.6. Efecto del tratamiento con As(V) sobre la permeabilidad intestinal y los marcadores de endotoxemia	136
1.7. Relación entre varios de los parámetros toxicológicos evaluados	138
2. DISCUSIÓN	140
3. CONCLUSIONES	145
CAPÍTULO 3: Estudios in vitro para evaluar la protección de cepas de bacterias lácticas frente a la toxicidad del arsenito	147
1. RESULTADOS	150
1.1. Potencial de las BAL para captar/adsorber As(III)	150

1.2. Evaluación del efecto protector en un modelo celular de mucosa intestinal	153
1.2.1. Estudios preliminares para determinar las condiciones de exposición	153
1.2.2. Efecto de las estrategias sobre la respuesta prooxidante causada por As(III)	154
1.2.3. Efecto de las estrategias sobre la respuesta proinflamatoria causada por el As(III)	155
1.2.4. Efecto de las estrategias sobre componentes estructurales de la monocapa epitelial afectados por el As(III)	156
1.2.5. Efectos de las estrategias sobre las alteraciones de la permeabilidad paracelular causadas por el As(III)	159
1.2.6. Efecto de las estrategias sobre el transporte de As(III)	160
2. DISCUSIÓN	161
3. CONCLUSIONES	164
CAPÍTULO 4: Evaluación in vivo de la eficacia de cepas de bacterias lácticas para reducir la toxicidad generada por una exposición crónica a arsenito	165
1. RESULTADOS	168
1.1. Estado general de los animales durante la exposición	168
1.2. Efecto protector de las cepas BAL frente a la respuesta prooxidante causada por el As(III)	168
1.3. Efecto protector de las cepas BAL frente a la respuesta proinflamatoria causada por el As(III)	171
1.4. Efecto protector de las BAL frente a las alteraciones sobre las uniones intercelulares y el mucus causadas por el As(III)	173
1.5. Efecto protector de las cepas BAL frente a las alteraciones funcionales y los signos de endotoxemia causados por la exposición a As(III)	174
1.6. Efecto protector de las cepas BAL frente a las alteraciones del metabolismo de AGCC causadas por el As(III)	176
1.7. Mecanismos de reducción de toxicidad	177
1.7.1. Efecto sobre la acumulación tisular	177
1.7.2. Activación de rutas de señalización antiinflamatorias/antioxidantes	178
1.7.3. Diminución de la activación de rutas de señalización proinflamatorias/prooxidantes	180
1.8. Estudio de la relación entre las variables y los tratamientos	181
2. DISCUSIÓN	183
3. CONCLUSIONES	187
Conclusiones generales	189
Bibliografía	195
Anexo	217

Índice de Figuras

Figura 1. Ruta propuesta para el metabolismo de As inorgánico en humanos.....	10
Figura 2. Disrupción de la barrera, endotoxemia y disregulación del metabolismo de la glucosa.	23
Figura 3. Tipos celulares implicados en la detección de DAMPs y la inflamación	24
Figura 4. Morfología del intestino delgado (A) y del intestino grueso (B)	25
Figura 5. Zonas de proliferación y diferenciación en el proceso de renovación tisular del intestino.....	26
Figura 6. Modelo de regulación de Notch de la proliferación y diferenciación de células epiteliales intestinales.....	27
Figura 7. Esquema de uniones estrechas y adherentes del epitelio intestinal.....	31
Figura 8. Distribución anatómica de los subtipos de células T CD4+ intestinales	33
Figura 9. Cocultivo de Caco-2, HT29-MTX y células inmunes en sistemas con dos compartimentos.	36
Figura 10. Enteroide generado de criptas del intestino delgado de ratón.....	38
Figura 11. Contenidos de ROS/RNS en animales control y tratados con As(III)	82
Figura 12. Concentración de equivalentes MDA en animales control y tratados con As(III).....	83
Figura 13. Concentración GSH en animales control y tratados con As(III).....	84
Figura 14. Concentración de TNF- α e IL-1 β en colon de animales control y animales tratados con As(III).	85
Figura 15. Concentración de IL-2 e IL-6 en colon de animales control y animales tratados con As(III).....	86
Figura 16. Actividad MPO y concentración fecal de lactoferrina en animales control y animales tratados con As(III).	87
Figura 17. Cortes transversales de tejido colónico teñidos con PAS/hematoxilina de animales control y tratados con As(III)	88
Figura 18. Esquema de las rutas quinasas NF-kB y MAPK	89
Figura 19. Activación de vías de señalización en colon por exposición a As(III)	91
Figura 20. Efecto del As(III) sobre los niveles de proteína MUC2.....	93
Figura 21. Composición de la microbiota en animales control y expuestos a As(III).....	96
Figura 22. Ordenación PCoA y NMDS de la microbiota fecal de animales control y expuestos a As(III).....	97
Figura 23. Contenidos de AGCC en heces de animales control y tratados con As(III). .	98
Figura 24. Concentración albúmina fecal en animales control y tratados con As(III)..	99
Figura 25. Marcadores de endotoxemia en animales control y tratados con As(III).....	100
Figura 26. Eventos moleculares que gobiernan la diferenciación hacia los distintos tipos celulares del epitelio intestinal.	101
Figura 27. Imágenes de la evolución de las criptas aisladas de ratones control y ratones tratados con As(III).	103

Figura 28. Mapa de intensidades (<i>heat map</i>) que representa la matriz de correlaciones entre varios de los parámetros analizados en este estudio.....	104
Figura 29. Contenido de ROS/RNS en animales control y tratados con As(V).....	118
Figura 30. Equivalentes MDA en animales control y animales tratados con As(V).....	119
Figura 31. Concentración GSH en animales control y animales tratados con As(V)..	120
Figura 32. Contenidos de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-17A en el fragmento de colon proximal y distal de animales control y animales tratados con As(V)..	121
Figura 33. Secciones transversales de tejido colónico teñidas con PAS/hematoxilina de animales control y tratados con As(V).....	123
Figura 34. Contenido de lactoferrina fecal en animales control y animales tratados con As(V)..	124
Figura 35 Activación de vías de señalización en colon por exposición a As(V)	125
Figura 36. Efecto del As(V) sobre las células mucoscretoras.	127
Figura 37. Composición de la microbiota en ratones control y expuestos a As(V).	128
Figura 38. Ordenación PCoA y NMDS de la microbiota fecal de animales control y expuestos a As(V).....	130
Figura 39. Abundancia diferencial a nivel de orden.	132
Figura 40. Abundancia relativa de géneros en los distintos tratamientos.	134
Figura 41. Concentración fecal de AGCC en animales control y tratados con As(V)..	135
Figura 42. Contenido de albúmina fecal en animales control y tratados con As(V).....	136
Figura 43. Marcadores de endotoxemia en animales control y tratados con As(V)	137
Figura 44. Mapa de intensidades (<i>heat map</i>) que representa la matriz de correlaciones entre varios de los parámetros analizados en este estudio.....	138
Figura 45. Acumulación de As en bacterias viables tras incubación con As(III)	151
Figura 46. Acumulación de As en bacterias no viables.	152
Figura 47. Efecto de las bacterias no viables y sus medios condicionados sobre la respuesta proinflamatoria causada por As(III).	156
Figura 48. Inmunodetección de ZO-1 en monocapas de células Caco-2/HT29-MTX cocultivadas con monocitos y expuestas a los distintos tratamientos.	158
Figura 49. Permeabilidad aparente del LY en las monocapas Caco-2/HT29-MTX cocultivadas con macrófagos y expuestas a As(III) con o sin estrategias.	159
Figura 50. Transporte de As a través de las monocapas Caco-2/HT29-MTX cocultivadas con macrófagos y expuestas a As(III) con o sin estrategias.	160
Figura 51. Contenidos de ROS/RNS en animales control, tratados con As(III) y con As(III) y BAL.	169
Figura 52. Concentración de equivalentes MDA en animales control, tratados con As(III) y con As(III) y BAL.....	170
Figura 53. Concentración de GSH en animales control, tratados con As(III) y con As(III) y BAL.	171
Figura 54. Concentración de IL-1 β y TNF- α en colon de animales control, tratados con As(III) y con As(III) y BAL.....	172
Figura 55. Efecto de la administración de BAL sobre los niveles de MUC2.	174

Figura 56. Concentración de albúmina fecal en animales control, tratados con As(III) y tratados con As(III) y BAL.	175
Figura 57. Concentración de LBP en suero de animales control, tratados con As(III) y tratados con As(III) y BAL.	176
Figura 58. Concentraciones de AGCC en heces de animales control, tratados con As(III) y tratados con As(III) y BAL..	177
Figura 59. Concentraciones de As en el tejido de animales tratados con As(III) con o sin la administración de cepas BAL.....	178
Figura 60. Ruta Nrf2/Keap1/ARE y ruta IL-10	179
Figura 61. Efecto de las cepas BAL sobre la vía de señalización p38 MAPK activada por la exposición a As(III).....	181
Figura 62. Diagrama PCA bidimensional de las variaciones de los parámetros analizados en el presente estudio entre los diferentes tratamientos.....	182

Índice de Tablas

Tabla 1. Principales formas arsenicales en el medio ambiente y los seres vivos.	4
Tabla 2. Contenido máximo de As inorgánico [Reglamento (UE) 2023/465].	7
Tabla 3. Secuencia y eficacia de los oligonucleótidos empleados en los estudios de la toxicidad <i>in vivo</i>	53
Tabla 4. Condiciones instrumentales utilizadas en el análisis mediante ICP-MS.	61
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en el estudio <i>in vitro</i>	71
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para la evaluación <i>in vivo</i> de la eficacia de las estrategias frente a la toxicidad de As(III)	75
Tabla 7. Sangre oculta en heces de animales de control y tratados con As(III) en las semanas 20 y 24 de tratamiento.	81
Tabla 8. Expresión génica relativa en animales tratados con As(III) respecto a los animales control.	92
Tabla 9. Expresión génica relativa de genes relacionados con el proceso de diferenciación en criptas y organoides no diferenciados de animales tratados con As(III) respecto a los animales control.	102
Tabla 10. Sangre oculta en heces de animales control y tratados con As(V) en las semanas 19 y 22 de tratamiento.	117
Tabla 11. Expresión relativa de <i>Muc2</i> , <i>Cldn1</i> , <i>Cldn3</i> y <i>Ocln</i> en ratones expuestos crónicamente a As(V) respecto a animales no tratados.	126
Tabla 12. Resultados de los análisis PERMANOVA por pares de los diferentes tratamientos.	130
Tabla 13. Permeabilidad aparente del LY en Caco-2/HT29-MTX cocultivadas con macrófagos y expuestas a distintas concentraciones de As(III).	154
Tabla 14. Expresión génica de proteínas de estrés en monocitos y Caco-2/HT29MTX cocultivados y expuestos a As(III) con o sin estrategias	155
Tabla 15. Expresión génica de proteínas de las uniones estrechas y del mucus en monocapas Caco-2/HT29-MTX cocultivadas con macrófagos y expuestas a As(III) con o sin estrategias.	157
Tabla 16. Expresión relativa de <i>Cldn1</i> y <i>Ocln</i> en ratones expuestos crónicamente a As(III) y As(III) con BAL respecto a animales no tratados	173
Tabla 17. Expresión relativa de componentes de la ruta Nrf2 e IL-10 en ratones expuestos crónicamente a As(III) y BAL respecto a animales tratados sólo con As(III).	180

Abreviaturas

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AhR	Receptor de hidrocarburos de arilo
AJ	Uniones adherentes
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
As	Arsénico
As(III)	Arsenito
As(V)	Arseniato
As3MT	As(III)-metiltransferasa
ASVs	<i>Amplicon sequence variants</i>
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades
BAL	Bacterias ácido-lácticas
BSA	Albúmina de suero bovino
CLDN	Claudina
COX2	Ciclooxigenasa-2
Cys	Cisteína
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMA	Formas arsenicales dimetiladas, [DMA(III) + DMA(V)]
DMA(III)	Ácido dimetilarsinoso
DMA(V)	Ácido dimetilarsínico
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DO	Densidad óptica
ECACC	Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GPR	Receptores acoplados a proteínas G
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
GSH	Glutación reducido
H ₂ DCF-DA	2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
HACRE	Hidroarsenicismo crónico endémico
HBSS	Disolución salina equilibrada de Hanks
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HO-1	Hemoxygenasa 1

HSP	Proteínas de shock térmico
HTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
IL	Interleucinas/citoquinas
IL10r2	Subunidad 2 del receptor de IL10
IL-1RN	Antagonista del receptor de la IL-1
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
JECFA	Comité FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
Keap	Proteína asociada a ECH de tipo Kelch
LBP	Proteína de unión a lipopolisacáridos
LPS	Lipopolisacárido
LY	Lucifer Yellow
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MC	Medio condicionado
MDA	Malondialdehído
MEM	Medio esencial mínimo con sales de Earle
MMA	Formas arsenicales monometiladas [MMA(III) + MMA(V)],
MMA(III)	Ácido monometilarsonioso
MMA(V)	Ácido monometilarsonico
MPO	Actividad mieloperoxidasa
MRS	Medio Man, Rogosa y Sharpe
MT	Metalotioneínas
MT2A	Metalotioneína 2A
MUC	Mucina
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B
Nlrp3	Familia NLR conteniendo dominio pirina 3
NMDS	Escalado multidimensional no métrico
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2
OCLN	Ocludina
OGM	Medio de crecimiento de organoides
OMS	Organización Mundial de la Salud
p38 MAPK	Proteína quinasa 38 activada por mitógenos
PAF	Paraformaldehído
PAS	Tinción de ácido periódico-Schiff
PBS	Tampón fosfato salino
pc	Peso corporal
PCA	Análisis de componentes principales
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato

qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
QPS	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
REST	<i>Relative expression software tool</i>
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio de Roswell Park Memorial Institute
RT	Retrotranscripción
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
Socs3	Supresor de la señalización de citoquinas 3
TBARS	Ensayo de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
Th	Linfocitos T auxiliares
TJ	Uniones estrechas (<i>tight junctions</i>)
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
U.S. EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
UA	Unidades estándar de densitometría
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia
UFC	Unidades formadoras de colonias
WB	Western blot
ZO	Zonula occludens

Introducción

1. Arsénico y sus especies: propiedades físico-químicas y presencia en el medio ambiente

El arsénico (símbolo, As; número atómico, 33; masa atómica relativa, 74.92) tiene propiedades químicas y físicas intermedias entre un metal y un no metal, y por eso se le considera un metaloide o un semimetal. Pertenece al grupo VA de la tabla periódica y tiene un único isótopo estable (As-73). Este metaloide puede existir en cuatro estados de oxidación: -3 , 0 , $+3$ y $+5$, siendo el arsenito [As(III)] y el arseniato [As(V)] los estados predominantes (IARC 2012). El arseniato tiene tres valores de pKa (2.19, 6.94 y 11.5), por lo que en disolución neutra la principal especie química es el anión $\text{As}(\text{OH})_2\text{O}^{-1}$. El arsenito también tiene tres valores de pKa aunque mucho más elevados (9.23, 10 y 12.13), por eso la especie química predominante en disolución neutra es la forma no disociada $\text{As}(\text{OH})_3$ (Chen y Rosen 2020).

Los avances analíticos de las dos últimas décadas han permitido identificar un gran número de formas químicas de As. En la actualidad se considera que existen aproximadamente 100 especies distintas de As (Reid et al. 2020), las cuales se pueden clasificar en dos grandes grupos: inorgánicas y orgánicas. Las formas orgánicas de As son el resultado de las transformaciones, principalmente bióticas, que sufren las formas inorgánicas en el medio ambiente (Chen y Rosen 2020; Hasegawa et al. 2019). La tabla 1 muestra las especies más frecuentes en el medio ambiente y los seres vivos.

Tabla 1. Principales formas arsenicales en el medio ambiente y los seres vivos (Chiocchetti 2018a).

Especie inorgánicas	Fórmula
Arsenito, As(III)	$As(O^-)_3$
Arseniato, As(V)	$O=As(O^-)_3$
Especie orgánicas	Fórmula
Ácido monometilarsónico, MMA(V)	$CH_3AsO(O^-)_2$
Ácido monometilarsonioso, MMA(III)	$CH_3As(O^-)_2$
Ácido dimetilarsínico, DMA(V)	$(CH_3)_2AsO(O^-)$
Ácido dimetilarsinoso, DMA(III)	$(CH_3)_2AsO^-$
Óxido de trimetilarsina, TMAO	$(CH_3)_3AsO$
Ion tetrametilarsonio, TMA ⁺	$(CH_3)_4As^+$
Arsenobetaina, AB	$(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$
Trimetilarsoniopropionato, TMAP	$(CH_3)_3As^+CH_2H_2COO^-$
Arsenocolina, AC	$(CH_3)_3As^+CH_2CH_2OH$
Ácido monometilmonotioarsónico, MMMTA(V)	$[CH_3As(O)S]$
Ácido dimetilmonotioarsínico, DMMTA(V)	$[(CH_3)_2As(O)S]$
Ácido dimetilditioarsínico DMDTA(V)	$[(CH_3)_2AsS_2]$
Arsenolípidos	$(CH_3)_2AsO(CH_2)_{14}OCOH$
Arsenoazúcares dimetilados Y= -OH -OPO ₃ HCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH -SO ₃ H -OSO ₃ H	

En la naturaleza, el As se presenta principalmente en forma de sulfuro en minerales complejos que contienen plata, plomo, cobre, níquel, antimonio, cobalto y hierro. Este metaloide está presente en más de 200 tipos de minerales, siendo los más comunes la arsenopirita (FeAsS), el rejalgar (As₄S₄) y el oropimente (As₂S₃) (Gomez-Caminero et al. 2001). Cuando estos minerales primarios se exponen a la

atmósfera y las aguas superficiales y subterráneas, sufren reacciones que provocan la formación de minerales de As secundarios, como los óxidos de As o estructuras con As, oxígeno y varios metales (Drahota y Filippi 2009). Estos minerales secundarios son menos estables y por tanto en determinadas condiciones favorecen la movilización del As a suelos y aguas circundantes. La extensión de este proceso de movilización depende de varios factores como la solubilidad del propio mineral, la forma química del metaloide, el pH, el potencial redox (Eh), la cantidad de materia orgánica y la acción microbiana (Drahota y Filippi 2009; Drewniak y Sklodowska 2013).

Esta movilización del As puede ocasionar que, en zonas con una alta presencia de minerales ricos en As, la concentración del metaloide en los suelos y aguas sea muy elevada. Así, se han detectado concentraciones de hasta 4000 mg/kg de As en suelos dedicados al cultivo del cinturón de arsenopirita en Austria (Geiszinger et al. 2002). En aguas superficiales y subterráneas de zonas no contaminadas, las concentraciones de As inorgánico varían entre 1-10 µg/L; sin embargo, en zonas donde abundan los minerales que contienen As pueden alcanzar valores de 100-5000 µg/L (Gomez-Caminero et al. 2001). La contaminación de estas aguas subterráneas o superficiales supone que los suministros de agua que llegan a las poblaciones estén contaminados. Esta, como veremos más adelante, es la principal fuente de exposición en determinadas zonas del planeta, las conocidas como zonas con hidroarsenicismo crónico endémico (HACRE). Además, estas aguas contaminadas se emplean en la irrigación de cultivos, lo que genera una importante concentración de As en la parte más superficial de los suelos (Brammer y Ravenscroft 2009). En condiciones anaeróbicas de cultivo, como ocurre en los arrozales inundados, el As presente en estos suelos, principalmente en forma de As(III), se disuelve en el agua intersticial, quedando disponible para ser captado por las raíces de las plantas (Xu et al. 2008). Por ese motivo, los arrozos procedentes de estas zonas y cultivados con este tipo de técnica tienen contenidos más elevados de As inorgánico (Williams et al. 2006).

Además de la contaminación por causas naturales, el As también se introduce en el medio ambiente a través de actividades antropogénicas. Entre las que destacan la minería y la fundición de metales, la extracción de carbón y la quema de combustibles fósiles (Garelick et al. 2008). En estos casos, el As alcanza principalmente la atmósfera, donde puede transportarse grandes distancias unido a partículas, para luego depositarse en suelos, aguas y plantas. Otra fuente antropogénica que ha generado una importante contaminación ambiental durante muchos años ha sido el uso de compuestos arsenicales en la agricultura, especialmente como pesticidas y como preservantes de la madera. Esta práctica ha ido reduciéndose; sin embargo, ha dejado suelos con una contaminación persistente, que también pueden actuar como fuente antropogénica de contaminación de aguas y cultivos (Higgins et al. 2022; McBride et al. 2012).

2. Arsénico inorgánico en la dieta: fuentes de exposición e ingestas

La principal vía de exposición a As inorgánico para la mayoría de la población es la dieta. En el agua de consumo, la mayor parte del As se encuentra en forma de As inorgánico, existiendo sólo trazas de las formas mono y dimetiladas. De ahí que los valores máximos y las recomendaciones se emitan haciendo referencia al contenido total de As. Frisbie y Mitchell (2022), en una revisión reciente de las regulaciones mundiales de As para agua potable, muestran que de los 176 países investigados, sólo 136 tienen normativas que restringen el contenido a menos de 10 µg/L, valor recomendado por la Organización Mundial de la Salud para evitar la aparición de efectos adversos (OMS 1993). El número de personas que viven en países que no cumplen la directriz de la OMS constituye el 32% de la población mundial, una situación preocupante, más si tenemos en cuenta que entre estos países están aquellos que presentan zonas con arsenicismo crónico endémico. Se han reportado niveles elevados de As en las aguas de consumo de Argentina, Bangladesh, Camboya, Chile, China, Estados Unidos, India, México, Pakistán y Vietnam (Shaji et al. 2021). También se han identificado países europeos con

concentraciones elevadas de As en el agua de abastecimiento, entre ellos España (Aragonés Sanz et al. 2001).

Entre los alimentos, son los cereales, especialmente el arroz y sus derivados, los que han recibido una mayor atención por parte de la comunidad científica y los organismos oficiales. De hecho, la Comisión Europea fijó en 2015 unos límites máximos de As inorgánico para arroz y derivados (Reglamento 2015/1006), que posteriormente ha ampliado a otras matrices alimentarias (Tabla 2) (Reglamento 2023/465). Sin embargo, varios estudios muestran que los contenidos en este cereal pueden superar ampliamente los límites legislados (Potera 2007), incluso en los alimentos destinados a la alimentación infantil (0.06-0.27 mg/kg) (Signes-Pastor et al. 2016). Existen algunos productos alimentarios que presenta contenidos de As inorgánico más elevados que el arroz, pero su consumo es menor, y por tanto no contribuyen de forma relevante a la ingesta. Este es el caso de algún tipo de alga (Almela et al. 2006) y algunos productos pesqueros, especialmente bivalvos (Sloth y Julshamn 2008).

Tabla 2. Contenido máximo de As inorgánico [Reglamento (UE) 2023/465].

Productos alimenticios	Contenidos máximos (mg/kg peso fresco)	
Arroz elaborado (arroz pulido o blanco), no sancochado)	0.15	
Arroz sancochado y arroz descascarado	0.25	
Harina de arroz	0.25	
Tortitas de arroz, obleas de arroz, galletitas de arroz, pasteles de arroz, copos de arroz y arroz hinchado para desayuno	0.30	
Arroz destinado a la producción de alimentos para lactantes y niños de corta edad	0.10	
Bebidas no alcohólicas a base de arroz	0.030	
Preparados para lactantes, preparados de continuación, alimentos para usos médicos especiales destinados a los lactantes y niños de corta edad y preparados para niños de corta edad	comercializados en polvo	0.020
	comercializados líquidos	0.010
	Alimentos infantiles	0.020
Zumos de frutas, zumos de frutas concentrados reconstituidos y néctares de frutas	0.020	
Sal	0.50	

Los valores de referencia en términos de exposición dietaria han sido emitidos por el Comité FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), empleando aproximaciones similares. En 2009, el panel de contaminantes de EFSA identificó un intervalo de valores del límite inferior de confianza de la dosis de referencia (BMDL0.1, un 1% de riesgo extra) entre 0.3 y 8 µg/kg peso corporal (pc)/día para los cánceres de pulmón, piel y vejiga, así como para las lesiones cutáneas (EFSA 2021). El comité JECFA, posteriormente, estableció el intervalo del límite inferior de confianza de la dosis de referencia para un aumento del 0.5% de la incidencia de cáncer de pulmón (BMDL0.5) entre 2 y 7 µg/kg pc/día (JECFA 2011). Los estudios donde se evalúa la exposición poblacional a As inorgánico son escasos, debido en gran parte, a la complejidad de la detección de esta forma arsenical. En muchos casos se analizan contenidos totales y se realizan aproximaciones atendiendo a los porcentajes de inorgánico habituales en alimentos. Los estudios existentes muestran que en zonas donde existen problemas de contaminación por As, el agua es la principal vía de exposición, aunque los alimentos también aportan cantidades significativas a la ingesta debido a que se cocinan con el agua contaminada. Estas poblaciones están expuestas a niveles de As inorgánico muy superiores a los recomendados por los organismos oficiales. Este hecho se refleja en los contenidos de As de los biomarcadores de exposición analizados (mayoritariamente pelo y orina), los cuales superan ampliamente los encontrados en poblaciones no expuestas [pelo: < 1 mg/kg (OMS 1981), orina: 8 ± 6 µg As inorgánico y metabolitos/g creatinina (Vahter 1986)]. Calatayud et al. (2019) muestran esta situación en una población infantil del Norte de Argentina, donde las ingestas son superiores a las recomendadas por JECFA (2-40 veces), los contenidos en orina superan en todos los individuos el valor de referencia (31-4258 µg As/g creatinina) y un 83% excede los valores habituales en pelo (0.11-13.1 mg/kg, mediana: 2.1 mg/kg).

En las zonas donde no existen problemas de arsenicismo crónico endémico y, por lo tanto, las aguas de consumo no están contaminadas, la exposición dietaria

se produce principalmente a través de los alimentos. Según el último informe de EFSA (EFSA 2021), la exposición media a As inorgánico de la población infantil europea oscila entre 0.09 y 0.61 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$ y el percentil 95 entre 0.21 y 1.20 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$. La exposición de la población adulta es menor. Las estimaciones de la exposición media oscilan entre 0.03 y 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$ y las del percentil 95 entre 0.07 y 0.33 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$. Los grupos de alimentos que más contribuyen a esta ingesta son el "arroz", los "productos a base de arroz", los "cereales y productos a base de cereales (sin arroz)" y el "agua potable". Además, en la población infantil, también es importante el aporte de "alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad" (hasta un 60%) y el de "galletas, bizcochos y galletas para niños". Este último grupo de alimentos incluye, entre otros productos, los aperitivos a base de arroz, que contribuyeron hasta un 30-37% en lactantes y niños pequeños, respectivamente. La caracterización de una población donde no existen problemas de contaminación por As tan remarcables como los descritos en las zonas con HACRE muestra un panorama distinto, pero aun así también hay grupos poblacionales que podrían exceder los límites propuestos por EFSA.

Los datos presentados en esta sección muestran la necesidad de reducir la exposición a As inorgánico, principalmente en las zonas con HACRE, si bien en estas zonas es muy complicado abordar la cuestión pues la principal fuente de exposición es el agua de bebida, en muchos casos obtenida de aguas subterráneas altamente contaminadas.

3. El importante papel de las biotransformaciones presistémicas y la dieta en la absorción y la toxicidad de As inorgánico

Tras la ingesta, la acción sistémica del tóxico depende en gran medida de la extensión de su absorción. Este proceso tiene lugar principalmente en el epitelio intestinal proximal. En esta sección se evidencia la importancia que tiene, en la toxicidad final de este contaminante alimentario, el tracto gastrointestinal y los eventos que en él ocurren.

3.1. Absorción intestinal del As inorgánico y mecanismos implicados

Las formas inorgánicas de As presentan una absorción elevada tanto si se ingieren con el agua de bebida como si lo hacen formando parte de alimentos; sin embargo, las formas metiladas pentavalentes [ácido monometilarsónico, MMA(V) y ácido dimetilarsínico, DMA(V)] resultado de su metabolismo (Figura 1), presentan una absorción moderada. Juhasz et al. (2006) administraron por sonda gástrica disoluciones acuosas de MMA(V), DMA(V), As(III) y As(V) (80–100 µg As/kg) a cerdos y observaron que la biodisponibilidad oral absoluta (cantidad de As que llega a la circulación sistémica) de las formas inorgánicas era de aproximadamente el 100%; sin embargo, era muy inferior para las formas metiladas [MMA(V): 17 ± 5%; DMA(V): 33 ± 2%]. En este estudio se evidenció la misma tendencia en matrices alimentarias. Los datos mostraron diferentes biodisponibilidades para el As presente en dos tipos de arroz [Quest (33 ± 3%) y Basmati (89 ± 9%)]. En el arroz Quest, la principal especie de As era el DMA(V), mientras que en el arroz Basmati predominaba la forma inorgánica (Juhasz et al. 2006).

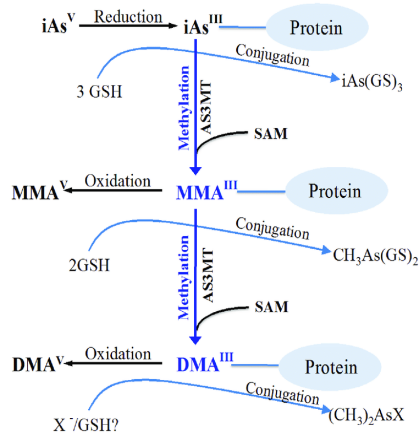


Figura 1. Ruta propuesta para el metabolismo de As inorgánico en humanos (Khairul et al. 2017). SAM: S-adenosilmetionina; As3MT: As(III)-metiltransferasa; As(III): Arsenito; As(V): Arseniato; MMA(III): Ácido monometilarsinoso; MMA(V): Ácido monometilarsónico; DMA(III): Ácido dimetilarsinoso; DMA(V): Ácido dimetilarsínico.

La caracterización del transporte intestinal de las especies inorgánicas de As mostró que ambas especies compartían una vía de transporte paracelular común, mecanismo que supone una difusión pasiva entre las uniones intercelulares (Calatayud et al. 2011b; Calatayud et al. 2010), pero que el transporte mediado por portador variaba dependiendo del estado de oxidación. Las investigaciones en animales de experimentación (González et al. 1995, 1997) y posteriormente en oocitos de *Xenopus* (Villa-Bellosta y Sorribas 2008) y células intestinales (Calatayud et al. 2010), mostraron el papel antagonista del fosfato en el transporte de As(V), sugiriendo que ambos elementos compartían el mismo mecanismo debido a su similitud estructural. Posteriormente, empleando la técnica del RNA pequeño de interferencia (siRNA), Calatayud et al. (2012a) pudieron demostrar la participación de un transportador de fosfato sodio-dependiente tipo II (NaPiIIb) en el transporte de As(V) en un modelo celular de epitelio intestinal.

Estudios empleando líneas celulares o sistemas de expresión en *Xenopus* y levaduras habían evidenciado el papel de determinadas familias de transportadores en la captación de As(III), tales como las acuaporinas (AQP), las permeasas de glucosa (GLUT) o los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP) (Liu 2010; Liu et al. 2006; Lu et al. 2006). Teniendo en cuenta estos estudios previos, Calatayud et al. (2012a) mostraron en células intestinales que el silenciamiento génico de OATPB, AQP10, y GLUT5 reducía significativamente la captación de As(III), sugiriendo la participación de estas isoformas, mayoritarias en el dominio apical de los enterocitos humanos, en el transporte intestinal de arsenito. Al igual que ocurría con el As(V), la participación de estos transportadores era debida a similitudes estructurales entre sus sustratos y el As(III), fenómeno que se conoce como mimetismo molecular.

3.2. Modulación de la absorción intestinal por las biotransformaciones presistémicas

Tras su ingesta y previo al proceso de absorción, el As inorgánico presente en el agua y los alimentos puede sufrir transformaciones durante su paso por el tracto gastrointestinal. En algunas de estas transformaciones interviene el metabolismo celular y otras son fruto de su interacción con sustancias presentes en el lumen.

El metabolismo del As inorgánico a nivel presistémico se ha relacionado principalmente con la flora microbiana, la cual genera una serie de metabolitos metilados (Figura 1). Hall et al. (1997) reportaron, tras la incubación de As(III) y As(V) con el contenido cecal de roedores en condiciones anaeróbicas, la transformación de las formas inorgánicas a formas mono y dimetiladas (Figura 1), siendo la forma monometilada la mayoritaria. Estas transformaciones se confirmaron posteriormente en ensayos *in vitro* utilizando heces aisladas de humanos. Alava et al. (2013) realizaron un estudio en el que incubaron estándares acuosos de As(V) con una suspensión microbiana obtenida del compartimento colónico del simulador del ecosistema microbiano del intestino humano (SHIME), previamente inoculado con una muestra fecal humana. Los autores reportaron la formación principalmente de metabolitos metilados trivalentes [ácido monometilarsenioso, MMA(III) y ácido dimetilarsenioso, DMA(III)] (Figura 1).

El metabolismo del As inorgánico por parte de las células del epitelio intestinal no se ha estudiado con detalle. Únicamente un estudio evalúa la capacidad de las células Caco-2, modelo humano de enterocitos, de metabolizar el As(III) a especies mono y dimetiladas, siendo nuevamente la forma monometilada el metabolito más abundante (Calatayud et al. 2012b). Este puede ser otro componente intestinal importante en el metabolismo presistémico del As inorgánico, aunque se requiere un mayor número de estudios para confirmarlo.

Algunas de estas transformaciones bióticas pueden convertir las formas inorgánicas ingeridas en especies de mayor toxicidad, las cuales pueden ejercer su efecto tanto a nivel intestinal como, tras su absorción, a nivel sistémico. Además, las transformaciones pueden afectar el propio proceso de absorción, ya que tal y

como hemos visto en el apartado 3.1, las formas metiladas, fruto del metabolismo, presentan una absorción intestinal inferior a las inorgánicas.

3.3. Modulación de la absorción de As inorgánico por componentes de la dieta

Algunos estudios han evidenciado que determinados elementos de la dieta pueden modular la toxicocinética del As. Las investigaciones al respecto se han planteado con el objetivo de encontrar estrategias encaminadas a reducir la exposición sistémica al tóxico. Debido a la dificultad de eliminar la fuente de exposición en muchos lugares del planeta, intentar reducir la entrada del tóxico a la circulación sistémica una vez ingerido es una de las alternativas más viable. La reducción de la absorción puede deberse a distintos mecanismos. Hay componentes de la dieta que compiten por los mismos mecanismos de transporte que el As inorgánico, mientras que otros pueden formar complejos o compuestos con una menor solubilidad y/o una menor tasa de transporte celular. También pueden modular el transporte paracelular del metaloide, al actuar directamente sobre la permeabilidad del epitelio intestinal.

Tal y como hemos comentado previamente, el fosfato reduce la absorción intestinal de As(V) debido a que ambos comparten un mismo mecanismo de transporte. Otro elemento que también afecta la absorción es el hierro, en este caso por la formación de sales insolubles (Farrell y Chaudhary 2013). Clemente et al. (2016) demostraron, *in vitro*, que las sales de hierro reducían la cantidad de As soluble tras la digestión gastrointestinal (bioaccesibilidad) de arroz y algas, con reducciones superiores al 60%, lo que supone una menor cantidad de As disponible para su absorción. La eficacia del Fe se ha confirmado posteriormente *in vivo*. Clemente et al. (2019) mostraron que la coadministración por sonda gástrica de Fe(III) (6 mg/kg pc) y As(III) o As(V) (1 mg/kg pc) durante 15 días, reducía principalmente la biodisponibilidad y la acumulación tisular de As(V), siendo menos eficaz para la forma trivalente.

Kenyon et al. (1997) mostraron un aumento de la absorción de As(V) (10%) en ratones alimentados con una dieta baja en fibra respecto a los que se alimentaban con una dieta normal. También se ha evidenciado una biodisponibilidad *in vivo* del As en arroces integrales menor que en arroces blancos (Islam et al. 2017), sugiriendo que la fibra dietética puede modular la absorción del metaloide. Clemente et al. (2016) analizaron el efecto de distintos tipos de fibra insoluble sobre la bioaccesibilidad de As(V), As(III) y DMA(V) y evidenciaron que la hidroxipropilcelulosa (HPC) reducía la fracción de As disponible para la absorción en agua [reducciones: As(III) 40-45%, As(V) 33-43%, DMA(V) 24-33%] y que la lignina era una estrategia más efectiva en alimentos, en concreto en algas (reducciones: 41%). Estos autores sugieren que, en el caso de las fibras insolubles, la interacción puede ser de tipo físico, debido a un atrapamiento del metaloide en la red creada por las celulosas o la lignina.

Los compuestos con grupos tiol (SH) [N-acetilcisteína (NAC), homocisteína (HCys), cisteína (Cys) y glutatión reducido (GSH)] tienen una alta afinidad por el As inorgánico. Clemente et al. (2017) mostraron una reducción significativa del transporte de As(III) y As(V) en presencia de Cys, GSH y HCys en modelos celulares de epitelio intestinal, indicativo de una reducción de la absorción intestinal. La eficacia del GSH también se ha evidenciado *in vivo*. En ratones coexpuestos a As(III) o As(V) y GSH se observó una menor biodisponibilidad (reducciones: As(V) 51%, As(III) 75%), una mayor excreción fecal y una menor acumulación tisular del metaloide (reducciones: hígado 26-88%, pulmones 47-86%, intestino 58-75%) (Clemente et al. 2019). Alonzo et al. (1984) mostraron que los complejos entre el As inorgánico trivalente y los residuos de Cys eran insolubles en el intervalo de pH de 4 a 8; esto podría explicar, al menos en parte, por qué la presencia de Cys o sus derivados provoca una reducción del paso del As inorgánico a través de la monocapa de células intestinales y de la biodisponibilidad en ratones.

En los últimos años se ha propuesto el uso de cepas de bacterias ácido-lácticas (BAL) como posible estrategia para reducir la biodisponibilidad de contaminantes alimentarios, entre ellos metales y metaloides (Chiocchetti et al. 2019a). Estudios *in vitro* han evidenciado que, a diferencia de lo que ocurre con los metales catiónicos, las cepas BAL estudiadas no tienen capacidad de quelar el As inorgánico (Clemente et al. 2020; Halttunen et al. 2007). Sin embargo, Clemente et al. (2020) mostraron que la coexposición de BAL y As(V) o As(III) reducía la permeabilidad intestinal del As inorgánico en modelos celulares de epitelio. Los autores sugirieron que la menor permeabilidad en presencia de BAL era debida a una modulación del transporte paracelular de esta forma arsenical.

Los estudios mencionados en este apartado muestran que varios compuestos dietarios o suplementos afectan la absorción, incluso reducen la acumulación tisular en animales de experimentación. Teniendo en cuenta que todos los compuestos/probióticos mencionados son sustancias aprobadas para el consumo humano, plantear su uso como estrategias para reducir la exposición sistémica a As inorgánico y la toxicidad asociada es completamente viable.

4. Patologías asociadas a exposiciones crónicas a As inorgánico y mecanismos de acción

La toxicidad del As está ampliamente documentada. Los compuestos de As están clasificados como "tóxicos" y "peligrosos para el medio ambiente" en la Unión Europea (Directiva 67/548/CEE). La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC 2012) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA 1991) han clasificado los compuestos inorgánicos de As como carcinógenos humanos del grupo 1. La Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades ha posicionado el As como el número 1 en la lista de sustancias peligrosas prioritarias del año 2022 (ATSDR 2022). Estas clasificaciones se basan en los resultados obtenidos de los estudios epidemiológicos realizados en poblaciones expuestas y de los ensayos en

animales. A la toxicidad del As inorgánico hay que añadir el elevado efecto tóxico de algunos de los compuestos derivados de su metabolismo (Figura 1). Se considera que las formas monometiladas trivalentes son más tóxicas que las formas inorgánicas (Petrick et al. 2001), y que el DMA(III) o su análogo tiolado presentan un grado de toxicidad similar o superior al As(III) (Naranmandura et al. 2011).

Los estudios epidemiológicos en las zonas con HACRE han mostrado una mayor incidencia de determinados tipos de cáncer (piel, pulmones, vejiga urinaria, hígado y riñones) (Guo et al. 2001; Smith et al. 1998). También se ha asociado la exposición crónica a As inorgánico con una mayor prevalencia de diabetes tipo II (Del Razo et al. 2011), enfermedad cardiovascular, cardiopatía coronaria, accidente cerebrovascular y arteriopatía periférica (Moon et al. 2012). Además, la exposición prenatal genera una serie de efectos negativos sobre el feto (nacimientos prematuros, bajo peso al nacer, medidas antropométricas alteradas) (Kile et al. 2016) y sobre el posterior desarrollo neuroconductual, el cual también está afectado por la exposición en edades tempranas (Tolins et al. 2014).

Las dos formas inorgánicas de As presentan mecanismos de acción propios debido a sus distintas propiedades químicas. El arsenito tiene gran afinidad por los grupos -SH, pudiendo formar enlaces covalentes por medio de puentes disulfuro con moléculas importantes para el mantenimiento de la homeostasis (Shen et al. 2013). En cuanto al arseniato, la mayoría de estudios proponen un mecanismo de toxicidad relacionado con su similitud estructural con el fosfato, al cual puede sustituir en varias rutas metabólicas, afectando entre otros procesos, al metabolismo energético (Hughes 2002; Tseng 2004). Estos mecanismos inducen finalmente una situación de estrés oxidativo e interferencias en la transducción de señales o en la expresión génica, fenómenos descritos como posible base de algunas de las patologías asociadas a la exposición crónica a As inorgánico (Huang et al. 2004; Tseng 2004). También se ha visto que las modificaciones epigenéticas inducidas por el As inorgánico tienen un papel relevante en los efectos adversos.

Se han observado repetidamente cambios en los patrones de metilación del ADN, modificaciones postraduccionales de histonas y expresiones aberrantes de determinados microARN en animales de laboratorio y poblaciones expuestas (Bailey y Fry 2014).

5. Toxicidad intestinal del As inorgánico y posibles implicaciones sistémicas

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

Aunque el tracto gastrointestinal es el primer tejido que entra en contacto con el As inorgánico tras su ingesta y además es su principal puerta de entrada a la circulación sistémica, los estudios al respecto no son tan numerosos como los realizados en los considerados órganos diana. En la última década, se ha acelerado la investigación al respecto, pero los estudios en animales se han centrado principalmente en evaluar el efecto del As(III) sobre la microbiota intestinal.

5.1. Efectos sobre la microbiota

Dheer (2011) demostraron que la exposición a As(III) a través del agua de bebida afectaba a la composición microbiana del intestino tras 2 semanas de exposición a 0.25 mg/L y 10 semanas de exposición a 0.01 mg/L, con un aumento de Bacteroidetes y una disminución de Firmicutes. Estos cambios se atribuyeron a las

clases Bacteroidia y Clostridia y a las familias Porphyromonadaceae, Lachnospiraceae y Ruminococcaceae. A nivel de género, más del 19% del aumento de Bacteroidetes se asoció a Barnesiella. Además, se evidenció un aumento de Bacilli y Lactobacillus tras el tratamiento. El autor atribuyó la ventaja selectiva de las poblaciones de Bacteroidetes a una mayor presencia en este filo de microorganismos con el operón Ars (genes de resistencia al As).

Chi et al. (2017) observaron una disminución de la diversidad alfa en animales expuestos a As(III) (0.1 mg/L, 13 semanas), indicativo de una reducción de la riqueza de la comunidad bacteriana intestinal. A nivel de filo, se puso de manifiesto nuevamente una reducción de Firmicutes, además de un aumento de la abundancia de Verrucomicrobia. La microbiota de los animales tratados también presentó una regulación a la baja de los genes implicados en el metabolismo del piruvato y la biosíntesis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Lu et al. (2014), tras exponer ratones a As(III) (10 mg/L) durante 4 semanas, mostraron nuevamente efectos sobre el metabolismo microbiano. La exposición a As(III) alteró el metabolismo del triptófano, observándose cambios en el perfil de derivados de indol, y el metabolismo de las sales biliares. Los cambios en la microbiota también se producen cuando los animales se exponen a As a través de los alimentos (Wang et al. 2020). Tras exponer durante 60 días a ratones con arroz adicionado con As(V) (7%), As(III) (73%), MMA(V) (1%) y DMA(V) (19%) a una concentración final de 30 mg/kg, los análisis microbiológicos mostraron que la diversidad de las bacterias intestinales estaba significativamente afectada, pero no la de los hongos.

Du et al. (2021) investigaron el efecto del cese de la exposición sobre la microbiota intestinal. Tras exponer los ratones a 0.05, 0.25, 1.25 y 6.25 mg/L de As(III) a través del agua de bebida durante 30 días, se cesó la exposición durante un período similar. Al igual que reportan los estudios mencionados previamente, la población de Firmicutes disminuyó, mientras que la de Proteobacteria y Bacteroidetes aumentaron significativamente en los animales tratados. Tras el

tiempo de recuperación, estos tres filos alcanzaron niveles similares a los de los animales no tratados, indicando una reversibilidad en el estatus de la microbiota.

Los escasos estudios sobre los cambios en la microbiota realizados en poblaciones expuestas a través del agua de bebida no muestran un efecto claro del metaloide. Dong et al. (2017) compararon la composición de la microbiota de niños expuestos perinatalmente a As inorgánico a través del agua de bebida (219 µg/L) y niños no expuestos en Bangladesh. El análisis de la diversidad alfa y beta del microbioma no indicó diferencias globales en las comunidades bacterianas entre los grupos de alta y baja exposición. Hoen et al. (2018) evaluaron una población infantil de EEUU con niveles de exposición relativamente bajos comparados con los presentados en el estudio de Bangladesh (<57.0 µg/L, media: 1.5 µg/L, mediana: 0.1 µg/L) y evidenciaron una asociación marginal entre el contenido de As en orina y la composición del microbioma.

Los estudios mostrados en este apartado sugieren que el As(III) puede afectar la composición de la microbiota intestinal, aunque se necesitan más estudios para confirmar este efecto y mostrar principalmente cómo esto podría modificar el metabolismo microbiano, que tal y como veremos en el apartado 6.3 de esta introducción, es de vital importancia para el mantenimiento de la barrera intestinal. Por otro lado, hay que destacar que no existen estudios sobre el efecto de una exposición crónica a As(V) sobre la microbiota intestinal.

5.2. Efecto del As inorgánico sobre el tejido intestinal

La investigación en animales de experimentación se ha limitado a evaluar el efecto del As(III). Estos estudios, aunque escasos, muestran un efecto tóxico del arsenito sobre el intestino. En macacos Rhesus expuestos subcrónicamente a As(III) (7.5 mg/kg pc/día), se observaron signos de inflamación aguda y hemorragia del intestino delgado (Heywood y Sortwell 1978). Chiocchetti et al. (2019b) expusieron ratones durante 2 meses a As(III) (20, 50 y 80 mg/L) a través del agua de bebida, observando a las concentraciones más elevadas, un aumento de

citoquinas proinflamatorias y de las especies reactivas de oxígeno en el tejido colónico y una pérdida de la función barrera intestinal. Jatko et al. (2021) han mostrado recientemente que ratones expuestos a 0.1 mg/L de As(III) a través del agua de bebida durante 5 semanas presentan una reducción del 40% en los transcritos de *Lgr5*, un marcador de células madre intestinales, y de los transcritos de los marcadores de la progenie de células secretoras. Estos datos indican que el As(III) puede afectar el nicho de células madres y las rutas de diferenciación de éstas a células secretoras y por tanto el mecanismo de regeneración tisular (apartado 6.1.1).

Los ensayos realizados *in vitro* se han llevado a cabo empleando principalmente modelos monocultivo de enterocitos. Calatayud et al. (2013a), expusieron Caco-2 diferenciadas a As(III), MMA(III), DMA(III), As(V), MMA(V) y DMA(V) y observaron que sólo las formas trivalentes eran capaces de inducir estrés oxidativo en tiempos cortos (24-72 h), siendo la forma monometilada trivalente la más tóxica. Las formas metiladas trivalentes también generaron un incremento de la liberación de las citoquinas IL-6 e IL-8 y del factor de necrosis tumoral TNF- α (Calatayud et al. 2014). Chiocchetti et al. (2019c) evidenciaron que el tratamiento de Caco-2 con As(III) (1 y 3 mg/L, 24 h) producía una redistribución de la zonula occludens 1 (ZO-1) y una reducción de la expresión de la claudina 1 (CLDN-1), ambas proteínas de las uniones estrechas (TJ, *tight junctions*) partícipes en el mantenimiento de la estructura del epitelio (apartado 6.1.3 de la introducción). Además, en las monocapas tratadas con As(III) se observó un aumento de la permeabilidad intestinal, indicativo de una pérdida de la función barrera (Chiocchetti et al. 2019c). Las exposiciones a As(V) (8 mg/L) también pueden generar una respuesta proinflamatoria y una modificación estructural de las células epiteliales del intestino *in vitro*, aunque menos acentuada y a concentraciones más elevadas (Chiocchetti et al. 2019c), menos relevantes desde el punto de vista medioambiental.

Los estudios *in vitro* de exposiciones a largo plazo son más escasos y muestran que los efectos adversos se alcanzan a concentraciones más bajas. Exposiciones a As(III) (0.025, 0.075 y 0.1 mg/L) y As(V) (0.25, 0.75 y 1.0 mg/L) durante 14 días, desde el momento de siembra, mostraron unas células intestinales con un desequilibrio redox y un proceso inflamatorio, acompañados de un retraso en la diferenciación celular y cambios estructurales, con un acortamiento de las microvellosidades (Chiocchetti et al. 2018b). Funcionalmente las células presentaban una disrupción de la barrera y una menor capacidad de regeneración celular (Chiocchetti et al. 2018b).

Jeong et al. (2017), empleando la línea celular HT29, evidenciaron que el pretratamiento con un inhibidor de la ruta p38 MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) atenuaba la regulación a la baja de las proteínas de las TJ inducida por As(III) y reducía la activación del factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B), sugiriendo que la vía p38 MAPK/NF- κ B podía estar implicada en la alteración de las uniones y la afección de la barrera intestinal.

Teniendo en cuenta los resultados derivados de estos estudios se podría inferir que el As(III) afecta la barrera intestinal a través de un efecto sobre las proteínas de las TJ debido a la activación de determinadas rutas de señalización proinflamatorias y prooxidantes. Sin embargo, la mayoría de estos datos se han obtenido mediante exposiciones agudas, condiciones que no reproducen la exposición existente en las poblaciones y empleando modelos celulares relativamente simplistas que pueden dar una información sesgada. Por otro lado, no hay estudios que caractericen la toxicidad intestinal del As(V).

5.3. Importancia de la barrera intestinal en la acción sistémica del As inorgánico

Algunas de las patologías vinculadas a la exposición crónica a As inorgánico podrían estar originadas en parte por una permeabilidad intestinal afectada o por

una disbiosis a nivel de la microbiota colónica. El aumento de la permeabilidad intestinal debido a la disfunción de la barrera provoca la translocación microbiana (endotoxemia) que puede inducir una inflamación de bajo grado a nivel sistémico. En la actualidad se apunta a esta endotoxemia como la base de determinados desórdenes metabólicos (Figura 2).

La exposición crónica a altos niveles de As inorgánico en el agua de bebida, tal y como hemos indicado en el apartado 4 de esta introducción, puede aumentar la incidencia de diabetes tipo 2 (T2D). Varios estudios muestran cambios en la microbiota (Sedighi et al. 2017) y aumentos de la permeabilidad intestinal (Cox et al. 2017) en individuos con T2D. En un estudio prospectivo de cohorte, Pussinen et al. (2011) demostraron que la endotoxemia se asociaba a un mayor riesgo de diabetes. Por lo tanto, si en las poblaciones con arsenicismo hay una disrupción de la barrera intestinal, ésta podría favorecer la instauración de un proceso de endotoxemia y finalmente este fenómeno estar relacionada con una mayor prevalencia de T2D. Este tipo de razonamiento es extensible a otro tipo de patologías vinculadas con el arsenicismo crónico endémico, como las enfermedades cardiovasculares (Moon et al. 2012). Varios estudios han mostrado que este tipo de patologías pueden ser el resultado de una endotoxemia metabólica consecuencia de una permeabilidad intestinal incrementada (Neves et al. 2013; Wiedermann et al. 1999).

Los estudios sobre la toxicidad intestinal en poblaciones expuestas pueden abrir nuevas líneas de investigación para determinar el posible origen de determinadas patologías asociadas, de forma que, entre un nuevo actor en escena, el entorno intestinal. El reconocimiento del tracto digestivo como un agente activo en el metabolismo y la toxicidad del As también puede facilitar el diseño de estrategias para modular los efectos adversos observados en las poblaciones expuestas.

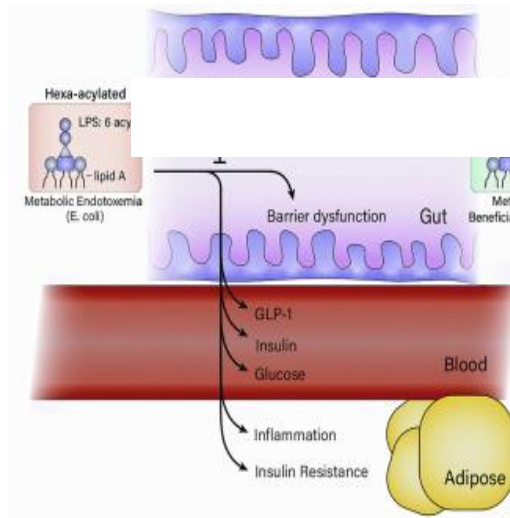


Figura 2. Disrupción de la barrera, endotoxemia y desregulación del metabolismo de la glucosa (Anhê et al. 2021).

6. Acción conjunta de los componentes de la barrera para mantener la homeostasis intestinal

Los componentes de la barrera actúan a dos niveles para mantener la homeostasis. Existe una barrera meramente física que impide que los microorganismos comensales y patógenos entren en contacto con el epitelio y el sistema inmune asociado y otra barrera con una respuesta más sofisticada que trabaja a través de toda una serie de receptores y rutas de señalización para desencadenar una respuesta inmunitaria. Además de la respuesta generada por los microorganismos patógenos, las moléculas que se liberan durante el daño tisular, conocidas como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), también inician respuestas inmunitarias a través de la activación de una serie de receptores: tipo Toll (TLRs), tipo NOD (NRLs), receptores acoplados a proteínas G (GPRs), receptores lectina tipo C, etc. (Gong et al. 2020). La activación de estos receptores transmembrana inicia múltiples vías de señalización y favorece la producción de mediadores de inflamación, la activación de las células presentadoras de antígenos (APC), la

diferenciación de células T y la producción de anticuerpos. Este tipo de estímulo, no asociado a la presencia de patógenos, genera lo que se conoce como inflamación estéril. Es la que puede darse en el caso de exposiciones a sustancias tóxicas. En la actualidad se sabe que a nivel intestinal no sólo intervienen las células del sistema inmune en esta respuesta, las células epiteliales también juegan un papel destacable (Figura 3).

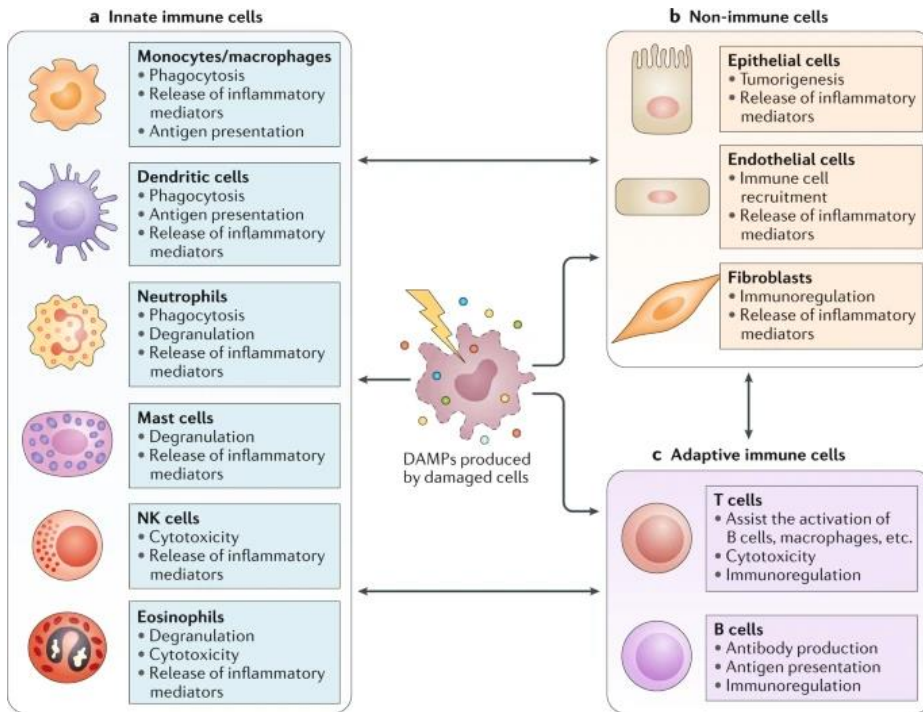


Figura 3. Tipos celulares implicados en la detección de DAMPs y la inflamación estéril (Gong et al. 2020).

6.1. Epitelio intestinal

La superficie luminal del intestino delgado consiste en una monocapa de células epiteliales plegada en vellosidades, las cuales aumentan la superficie intestinal y facilitan el proceso de absorción (Langerholm et al. 2011). Entre las vellosidades se encuentran las criptas de Lieberkühn, invaginaciones tubulares donde se sitúan

las células madre que dan lugar a los tipos celulares que componen el epitelio: células caliciformes, enterocitos, células de Paneth, enteroendocrinas, Tuft y células M (Barker 2014). El epitelio del intestino grueso presenta dos aspectos morfológicos diferenciales, es un epitelio con superficie plana, sin vellosidades, y no presenta en su composición células Paneth y células M (Barker 2014) (Figura 4).

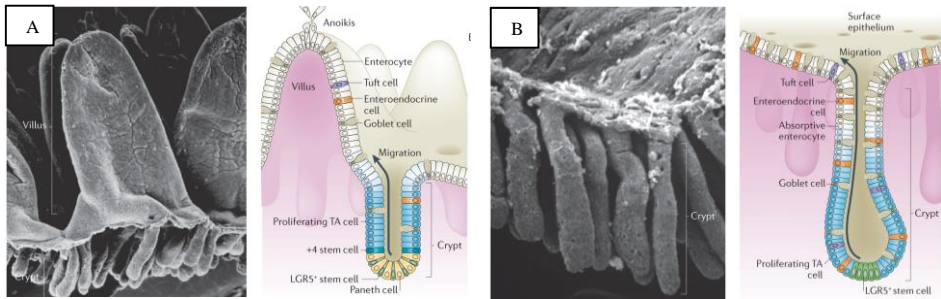


Figura 4. Morfología del intestino delgado (A) y del intestino grueso (B) (Barker 2014).

6.1.1. Programa de renovación del epitelio

El revestimiento epitelial del intestino se renueva más rápidamente que cualquier otro tejido, reemplazando a la población completa de células diferenciadas cada 4-5 días. Las células madre proliferan y dan lugar a células progenitoras que continúan multiplicándose en su movimiento por el eje cripta-vellosidad, hasta que llegan a una determinada posición donde se produce el arresto del ciclo celular y empieza el proceso de diferenciación a los distintos tipos celulares (Figura 5). Las células absortivas, caliciformes y enteroendocrinas se diferencian en su camino hacia el extremo luminal de la vellosidad, donde mueren por apoptosis y se desprenden hacia el lumen. Las células Paneth migran hacia la base de las criptas y su tiempo de permanencia es de aproximadamente 2 semanas. Este

proceso, fundamental para el mantenimiento de la homeostasis, está regulado por una serie de rutas de señalización perfectamente organizadas.

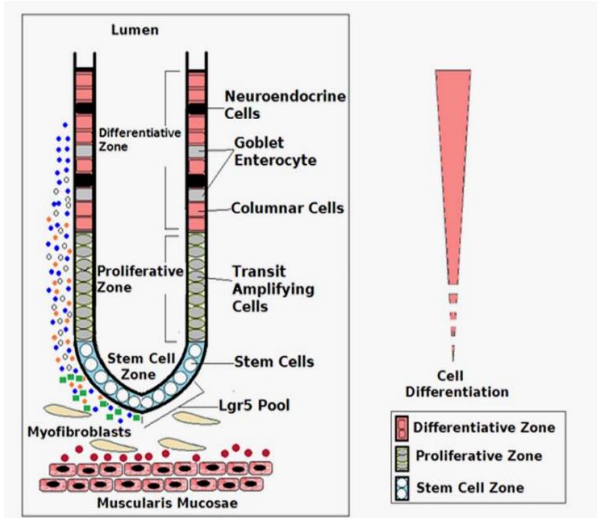


Figura 5. Zonas de proliferación y diferenciación en el proceso de renovación tisular del intestino (Vinson et al. 2016).

La principal fuerza impulsora de la proliferación de células madre en las criptas es la ruta de señalización Wnt (van der Flier y Clevers 2009). Esta ruta constituye el interruptor principal entre proliferación y diferenciación. Una disminución de la señalización Wnt supone la pérdida del compartimento proliferativo. La ruta Notch también juega un papel importante en el mantenimiento de la población de células madre. La inhibición de Notch conduce a una reducción de la proliferación y de la población de células madre LGR5⁺ (Demitrack y Samuelson 2016). Además, esta ruta regula la elección del destino celular (Figura 6). En general, la inhibición de la señalización de Notch da como resultado una mayor expresión de Atoh1 (iniciador del programa de diferenciación de células secretoras) y una pérdida de proliferación; mientras que una activación de la vía Notch produce una disminución de la expresión de Atoh1 y la expansión de la zona proliferativa con un mayor número de enterocitos (VanDussen et al. 2012).

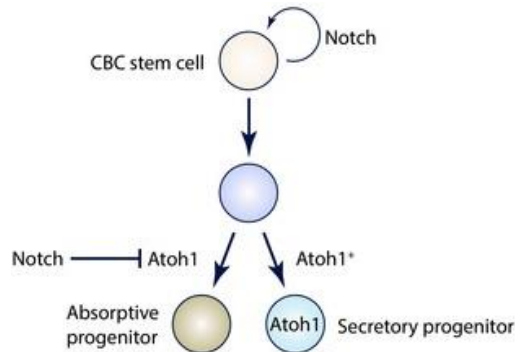


Figura 6. Modelo de regulación de Notch de la proliferación y diferenciación de células epiteliales intestinales (Demitrack y Samuelson 2016).

La señalización de BMP/SMAD es la tercera ruta en juego, reprime directamente la expresión de genes distintivos de las células madre, sin antagonizar con la ruta de señalización Wnt (Qi et al. 2017). Por tanto, las proteínas BMP, producidas principalmente por las células mesenquimales, detienen la proliferación e impulsan la diferenciación. En la parte inferior de la cripta, las BMP están bloqueadas por noggin producido por las células mesenquimales. A medida que se asciende por la cripta, coincidiendo con la zona de diferenciación, este inhibidor deja de expresarse (Medema y Vermeulen 2011). Además, la ruta BMP epitelial tiene un papel directo en el proceso de diferenciación. El silenciamiento del receptor BMPRI1A en el epitelio resulta en una diferenciación ineficiente del linaje secretor neuroendocrino, sin cambios en el número de células caliciformes y de Paneth, pero con una diferenciación alterada (Vanuytsel et al. 2013).

6.1.2. Función de las células epiteliales y su importancia en la regulación de los mecanismos de defensa frente a tóxicos

Las células epiteliales del intestino tienen funciones relacionadas con la ingesta de alimentos, pero también con la defensa frente a la acción de patógenos y sustancias

exógenas, ya que constituyen la primera barrera de contención. Los enterocitos o colonocitos son el tipo celular mayoritario en el epitelio intestinal. Estas células columnares son las responsables de los procesos digestivos y de transporte o reabsorción de nutrientes y agua. Además de estas funciones, se ha descrito que este tipo celular puede actuar como modulador de la respuesta inmunitaria frente a patógenos y sustancias antigénicas. Se ha evidenciado, en cultivos de modelos celulares de enterocitos, que determinados estímulos inducen el aumento de la expresión de los receptores TLR (Guo et al. 2013) y la secreción de citoquinas (Calatayud et al. 2014). Además de secretar mediadores de inflamación, las células epiteliales influyen en la inmunidad innata y adaptativa de la mucosa produciendo también factores que afectan directamente a las funciones de las células dendríticas y los linfocitos B y T, como el factor activador de los linfocitos B de la familia del TNF (BAFF), un ligando inductor de la proliferación (APRIL) y los interferones de tipo I (McClure y Massari 2014). Por otro lado, los enterocitos poseen moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y producen complejos MHC-II-péptidos antigénicos. Estas moléculas pueden presentar antígenos a las células T residentes en la lámina propia (Miron y Cristea 2012; Wosen et al. 2018).

El segundo tipo celular son las células mucosecretoras, cuya abundancia aumenta hacia la porción distal del intestino. Estas células son las responsables de la producción de la capa de mucus que recubre el intestino, formada mayoritariamente por mucinas (MUC). Esta capa presenta distinta morfología dependiendo de la región intestinal. El intestino delgado sólo tiene un tipo de mucus superficial, compuesto por MUC2. Esta capa de mucus no está adherida y es fácil de eliminar. Por el contrario, el colon tiene un sistema mucoso bicapa, con una capa mucosa interna densa y adherida y otra externa no adherida, ambas formadas por MUC2 (Johansson et al. 2013). Este mucus es uno de los principales componentes de la barrera física que permite mantener a raya la elevada población de microorganismos que vive en esta región distal del intestino. Recientemente se ha visto que las células caliciformes pueden formar pasajes de antígenos (GAPs)

y suministrar antígenos lumbinales a las células presentadoras de antígenos (APCs) de la lámina propia subyacente, pudiendo inducir respuestas inmunes adaptativas (Knoop y Newberry 2018).

El resto de tipos celulares diferenciados son minoritarios, aunque sus funciones también son de gran relevancia para el mantenimiento de la funcionalidad de la barrera. Las células enteroendocrinas pueden considerarse quimiorreceptores primarios, capaces de responder a los constituyentes lumbinales produciendo y secretando una serie de hormonas o moléculas de señalización (Sternini et al. 2008). Los productos secretados activan vías neuronales, células cercanas o dianas distantes a través de diferentes mecanismos, y desempeñan un papel clave en el control de la secreción y la motilidad gastrointestinal, la regulación de la ingesta de alimentos, los niveles de glucosa postprandiales y el metabolismo (Latorre et al. 2016). Al igual que ocurre con los enterocitos, se ha visto que las células enteroendocrinas secretan citoquinas tras la estimulación de sus receptores TLR 1, 2 y 4. Por lo tanto, también intervienen en la respuesta inmunitaria frente a patógenos y otras sustancias presentes en el lumen intestinal (Worthington et al. 2018).

Finalmente, las células Paneth se pueden considerar los guardianes de la función de las criptas intestinales, ya que tienen un papel fundamental en el mantenimiento del nicho de células madre tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Mei et al. 2020). Además, se consideran importantes en la defensa intestinal innata. Durante la exposición a bacterias viables o muertas o a productos microbianos, como el lipopolisacárido (LPS) o el ácido lipoteicoico, las células Paneth liberan sus gránulos, lo que da lugar a un aumento de las concentraciones de péptidos antimicrobianos (lisozima, α -defensinas, fosfolipasa A2 de secreción) en el lumen intestinal. Se cree que esto impide la invasión microbiana en el microambiente de la cripta, proporcionando protección a la zona de células madre, y también contribuye al control de la densidad microbiana en el lumen del intestino delgado (Elphick y Mahida 2005).

6.1.3. Uniones intercelulares

Las uniones entre células epiteliales adyacentes son otro factor que contribuye a blindar el sistema inmune de la mucosa frente al contenido del lumen intestinal. Existen varios tipos de uniones intercelulares: uniones estrechas (TJ), adherentes (AJ), los desmosomas y hemidesmosomas y las uniones GAP. Las TJ y AJ ubicadas cercanas al polo apical se denominan colectivamente complejo de unión apical (AJC). Este complejo es el que interviene de forma más directa en el mantenimiento de la barrera intestinal.

Las TJ están formadas por proteínas transmembrana [claudinas (CLDN), ocludinas (OCLN) y moléculas asociadas a las uniones (JAM)] conectadas al citoesqueleto por otra estructura proteica, la zonula occludens (ZO) (Figura 7). Los complejos de TJ sólo permiten el paso de moléculas pequeñas, de menos de 500 daltons (Miron y Cristea 2012). Todas las proteínas intervienen en la regulación de esta permeabilidad, pero numerosos estudios apuntan al papel relevante de las claudinas. Estas proteínas forman un canal selectivo en el espacio paracelular, por tanto, son las que regulan el paso de iones y fluidos según la carga y tamaño (Colegio et al. 2002). Las AJ también están constituidas por interacciones entre proteínas transmembrana, proteínas adaptadoras intracelulares y el citoesqueleto. Los principales AJ están formadas por interacciones cadherina-catenina, y en menor medida por interacciones nectina-afadina (Figura 7).

El sistema de transducción de señales intracelulares y una serie de estímulos extracelulares como las citoquinas, las pequeñas GTPasas y las modificaciones postraduccionales modulan dinámicamente los complejos proteicos de las uniones (Chelakkot et al. 2018). Un desequilibrio en estas regulaciones conduce a una integridad comprometida de la barrera, relacionada con diversas patologías.

Además de regular la función de barrera, las proteínas AJC juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación de las células epiteliales. Se ha visto que una menor expresión de E-cadherina, una de las proteínas de las AJ, supone una mayor tasa de proliferación de las células madre y alteraciones en el linaje celular, con una reducción del número de células mucossecretoras y un

cambio en la posición de las células Paneth, que pasan a ubicarse en el eje criptavillosidad, en lugar de disponerse en el fondo de la cripta (Lechler 2012).

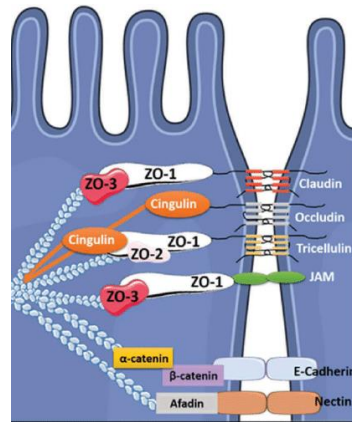


Figura 7. Esquema de las uniones estrechas (TJ) y adherentes (AJ) del epitelio intestinal (Basmaciyan et al. 2019).

6.2. Sistema inmune intestinal asociado a la mucosa

El intestino está equipado con un sistema inmunitario intestinal único, que alberga hasta el 60-70% de los linfocitos periféricos y constituye el mayor tejido inmunitario periférico del organismo. El sitio efector inmunitario es la designación colectiva de las células inmunitarias innatas como las células dendríticas (CD), los macrófagos y los linfocitos adaptativos formados por las células T efectoras y las células plasmáticas productoras de IgA, que existen de forma difusa en la lámina propia. El sitio efector también incluye una subpoblación única de células T intercaladas en la capa epitelial, denominados linfocitos intraepiteliales (IEL). Por el contrario, los sitios inductores comprenden los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y el tejido linfoide asociado al intestino (GALT). El GALT consiste en estructuras linfoides organizadas, con gran número de folículos de células B, áreas de células T entre ellos y células dendríticas. Estos folículos linfoides existen a veces en forma agregada, como las placas de Peyer (PP) en el intestino delgado,

las placas cecales y las placas colónicas (Shale et al. 2013; Silva-Sanchez y Randall 2020).

Las células M son el puente de unión del epitelio y el GALT. El GALT recibe su suministro de antígenos directamente de la superficie de la mucosa a través del epitelio intestinal que recubre los folículos linfoides del GALT, denominado epitelio asociado a folículos (FAE). Las células M presentes en el FAE están altamente especializadas para captar antígenos lumenales por fagocitosis y transcitosis y entregarlos a las CD presentes en el GALT, que realizan el procesamiento y la presentación del antígeno, iniciando de esta forma la respuesta inmunitaria de la mucosa (Ohno 2016).

Las células T CD4⁺ son también un componente clave del sistema inmunitario adaptativo. Desde el punto de vista anatómico, las células T CD4⁺ se distribuyen en los sitios inductores y efectores del sistema inmune del intestino delgado y grueso, aunque están mayoritariamente concentrados en la lámina propia (Shale et al. 2013). Tras la estimulación, las células T CD4⁺ nativas pueden diferenciarse en cuatro subtipos principales: T auxiliares 1 (Th1), Th2, Th17 o células T reguladoras (Treg) (Figura 8). Estos subtipos se distinguen por la expresión de diversos factores de transcripción y citoquinas. La regulación y el equilibrio adecuado de los subtipos de células T es un factor crucial para mantener la homeostasis intestinal y sistémica. Las respuestas Th descontroladas pueden ser patológicas (Berger 2000). Por otro lado, la disfunción de las células Treg, mediadoras clave de la tolerancia inmunitaria, puede provocar trastornos autoinmunitarios (Jacobse et al. 2021). El desarrollo de colitis en ratones inmunodeficientes transferidos con linfocitos T CD4⁺ desprovistos de Treg confirma la importancia funcional de este subtipo en la contención de los procesos inflamatorios (Powrie et al. 1993).

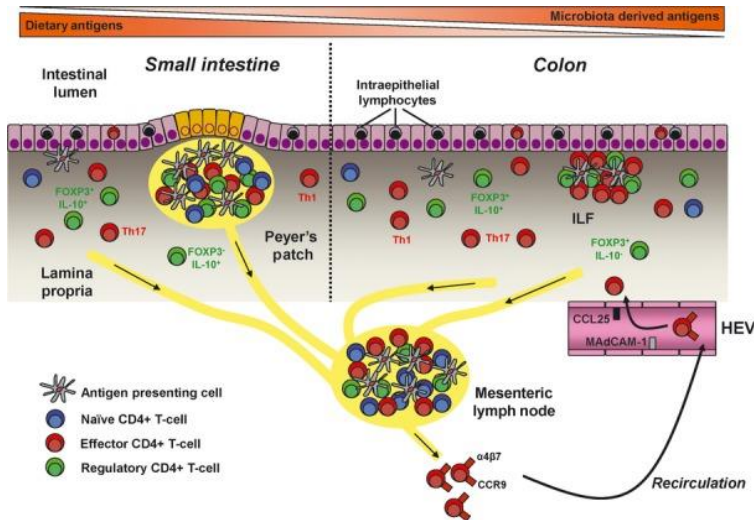


Figura 8. Distribución anatómica de los subtipos de células T CD4+ intestinales (Shale et al. 2013).

6.3. Microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal de los mamíferos alberga una enorme y compleja comunidad de bacterias comensales. La microbiota intestinal, y más concretamente sus metabolitos, influyen en la inmunidad del huésped y mantienen la homeostasis a través de una compleja interacción con el sistema inmunitario de la mucosa en la que intervienen diversas vías de señalización y redes de regulación génica altamente integradas. Las señales metabólicas de la microbiota intestinal, como los metabolitos indólicos y los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), pueden reforzar la barrera epitelial a través de varias rutas de señalización (Liu et al. 2021; Scott et al. 2020).

En los últimos años se ha asociado la modificación de la microbiota intestinal (disbiosis) con una función alterada del sistema inmune intestinal, la instauración de un proceso inflamatorio y cambios en la permeabilidad intestinal (Jiang et al. 2015). La microbiota perturbada puede desencadenar la activación aberrante de las células inmunes innatas del GALT, que a su vez pueden activar de forma anómala la respuesta adaptativa inmunitaria (desequilibrios entre células Treg

antiinflamatorias y células Th proinflamatorias) (Zhang et al. 2020). De esta forma, la disbiosis puede conducir a la regulación positiva de citoquinas proinflamatorias y a alteraciones de la barrera intestinal. Cada vez un número mayor de estudios relacionan la disbiosis intestinal con enfermedades locales inflamatorias crónicas y con patologías sistémicas como diabetes tipo I y tipo II y la obesidad (Sun et al. 2018; Zhang et al. 2020), que a su vez están relacionadas con aumentos de la permeabilidad intestinal (apartado 5.3 de la introducción).

7. Modelos para el estudio de la toxicocinética y los desórdenes intestinales

7.1. Modelos animales

Los modelos animales siempre se han considerado los más idóneos para evaluar lo que ocurre en humanos, si bien dependiendo del objetivo y del compuesto a estudiar algunos son más adecuados que otros. En el caso de los estudios toxicológicos, a la hora de elegir el modelo hay que tener en cuenta el contaminante que se estudia y especialmente su toxicocinética. Para evaluar la toxicidad del As inorgánico, las ratas y los hámsteres no son buenos modelos, ya que metabolizan esta forma arsenical hasta la forma trimetilada TMAO (óxido de trimetilarsina) (Yamauchi y Yamamura 1985; Yoshida et al. 2001), en lugar de tener como metabolito final la forma dimetilada (DMA), como ocurre en ratones y humanos. Además, el metabolismo en rata es más eficaz que en ratones y humanos, los cuales presentan una menor tasa metabólica (Drobná et al. 2010). Por otro lado, el tiempo de permanencia del As inorgánico en sangre es mucho mayor en ratas debido a la elevada afinidad de la hemoglobina de este tipo de roedor por el metaloide, motivo por el cual, la excreción urinaria es más lenta y su acumulación tisular menor (Vahter 1994).

En animales es más complicado estudiar fenómenos complejos, debido a que es imposible controlar todas las variables; sin embargo, *in vitro* el contexto se simplifica, pudiendo mantener unas condiciones controladas y reproducibles para

la evaluación de la respuesta celular. Adicionalmente, los modelos *in vitro* reducen los problemas éticos derivados del uso de animales. En la actualidad hay distintas alternativas *in vitro* para la investigación de aspectos relacionados con la mucosa o el epitelio intestinal.

7.2. Modelos celulares basados en líneas inmortalizadas

Las células Caco-2 son el modelo celular de epitelio intestinal más utilizado para el estudio de la permeabilidad entérica en humanos y los mecanismos de acción de tóxicos. Se trata de una línea celular humana inmortalizada derivada de un adenocarcinoma colorrectal, que en cultivo da lugar a un monocapa que deja de proliferar por contacto y se diferencia espontáneamente dando lugar a células con similitudes morfológicas y funcionales a los enterocitos maduros (Costa y Ahluwalia 2019). Debido a su origen colónico, la monocapa muestra una reducida permeabilidad paracelular comparada con la existente en el intestino delgado humano y una expresión elevada del transportador activo glicoproteína P (Pereira et al. 2016). A estas limitaciones se suman otras que tienen que ver con la composición de la mucosa, como la presencia de una capa de mucus externa o la existencia de un sistema inmune asociado que juegan un papel fundamental en la respuesta celular frente a patógenos y tóxicos.

La introducción de otra línea celular humana procedente de un adenocarcinoma de colon, la HT29-MTX, proporciona un cocultivo con los dos tipos celulares mayoritarios del epitelio intestinal, las células absortivas y las mucosecretoras. Así, se obtiene una monocapa celular con una capa externa bastante homogénea de mucus. Además, se resuelven parcialmente las dos desventajas del monocultivo Caco-2, hay un aumento del paso paracelular (Calatayud et al. 2012c) y una menor expresión de la glicoproteína P (Hilgendorf et al. 2000). El cultivo de estas células sobre un soporte poroso que permite la división del pocillo en un lado apical y otro basolateral permite que la monocapa crezca con una polarización cercana a la observada en el epitelio de humanos (Costa y Ahluwalia 2019). Además, el

recubrimiento de estos insertos con proteínas de la matriz extracelular (ECM) como el colágeno o la fibronectina favorece enormemente el desarrollo de una monocapa bien estructurada en un menor tiempo (Pereira et al. 2016).

En el lado basolateral de este modelo, se pueden añadir diferentes tipos de células inmunitarias (Figura 9): macrófagos o células dendríticas diferenciadas a partir de la línea monocítica humana THP-1 (Kämpfer et al. 2017); células polimorfonucleares (PBMC) procedentes de sangre periférica de voluntarios sanos (Calatayud et al. 2015); PBMCs procedentes de bazo, sangre o lámina propia de animales de laboratorio; una línea murina inmortalizada de macrófagos (RAW 264.7) (Tanoue et al. 2008). Estos modelos celulares más complejos ya integran un número importante de los componentes que intervienen en el mantenimiento de la barrera intestinal. Sin embargo, hay miembros de este complejo sistema barrera que no son fáciles de cultivar *in vitro* y que no pueden adquirirse como líneas celulares inmortalizadas. Este es el caso de las células Paneth o las células madre. Además, es difícil mantener la proporcionalidad de los distintos tipos celulares.

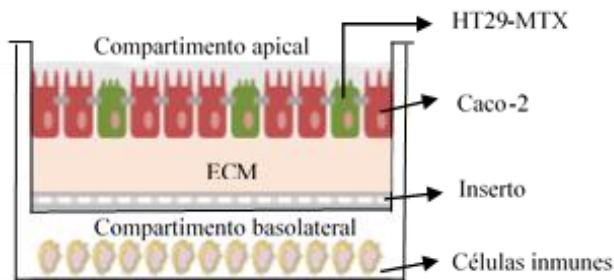


Figura 9. Cocultivo de Caco-2, HT29-MTX y células inmunes en sistemas con dos compartimentos separados por un inserto recubierto con proteínas de la matriz extracelular (ECM) (Pereira et al. 2016).

7.3. Modelos celulares basados en células primarias

Los avances en la investigación referente al desarrollo embrionario del intestino y la diferenciación celular del intestino adulto (apartado 6.1.1) han llevado al establecimiento de los métodos para generar cultivos epiteliales intestinales primarios *ex vivo* de larga duración, denominados "mini-intestinos". Los cultivos primarios desarrollados a partir de criptas intestinales aisladas o células madre adultas (enteroides/colonoides) se están aplicando para estudiar la fisiología y la fisiopatología intestinal humana y ha generado grandes expectativas en lo que a su aplicación en medicina regenerativa se refiere.

Las células madre adultas se extraen de tejidos adultos, donde normalmente residen para regenerar el tejido, por tanto, ya están programadas con especificidad de tejido. En este caso, las condiciones de cultivo sólo necesitan imitar el entorno molecular del tejido adulto (Bartfeld y Clevers 2017). En el caso del intestino, cuatro rutas convergen para crear el ambiente que permite el mantenimiento y proliferación de las células madre (apartado 6.1.1): EGF, Wnt y Notch favorecen esta proliferación, mientras que BMP la inhibe. Para imitar este entorno, Sato et al. (2009), tras extraer células madre de las criptas del intestino delgado de ratones, las sembraron sobre una matriz extracelular y agregaron tres factores: un agonista de la vía Wnt (R-spondin 1), un inhibidor de la ruta BMP (Noggin) y EGF.

En estas condiciones, las células madre intestinales proliferan y forman esferas con un cuerpo quístico y pequeñas protuberancias que sobresalen hacia la matriz (Figura 10). Los estudios inmunocitoquímicos muestran que estos modelos 3D contienen todos los tipos celulares del epitelio intestinal en su adecuada proporción. Estructuralmente son esferas con un lumen central rodeado por una monocapa epitelial con los distintos tipos celulares y cuyas protuberancias corresponden a los dominios de las criptas, donde residen las células madre y las Paneth.

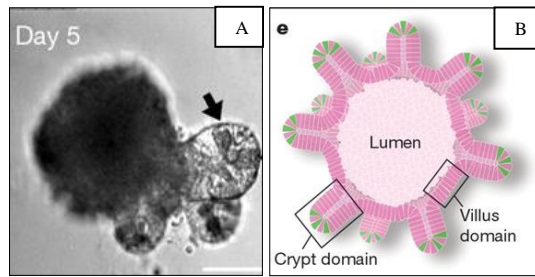


Figura 10. (A) Enteroide generado de la siembra de criptas aisladas del intestino delgado de ratón (5 días postsiembra). (B) Esquema del enteroide con un espacio interno correspondiente al lumen rodeado de una capa epitelial con criptas y vellosidades (Sato et al. 2009).

También se han desarrollado colonoides del intestino grueso de ratones. Sin embargo, este cultivo produce cantidades insuficientes de ligandos Wnt para mantener las células madre, ya que carecen de células Paneth. En esta parte del intestino, son las células mesenquimáticas las que proporcionan estos ligandos y en estos modelos 3D se carece por lo general de estos tipos celulares. Para solventar este problema, Sato et al. (2011) agregaron Wnt3A recombinante o medio acondicionado con Wnt3A al medio de cultivo, obteniendo buenos resultados. Este mismo problema se produce en enteroides humanos, aunque en las células aisladas del intestino delgado humano hay células Paneth, la cantidad secretada de Wnt3A no es suficiente para el mantenimiento y proliferación de las células madre. Además, el crecimiento de estos modelos 3D procedentes de humanos son más complejos y requieren suplementos adicionales como un inhibidor de p38 (SB202190) y un inhibidor de TGF- β (A83-01 o SB431542) (Sato et al. 2011).

Además de las ventajas de tener un modelo con los tipos mayoritarios del intestino y una estructura semejante, estos sistemas presentan la ventaja de tener una elevada capacidad de expansión debido a la presencia de las células madre.

Los organoides pueden pasarse en una proporción de 1: 5 durante al menos un año y medio, con un fenotipo y cariotipo sin cambios (Sato y Clevers 2013). Así que, a diferencia de otros cultivos primarios, pueden emplearse durante bastantes pases.

La investigación con estos modelos intestinales se ha incrementado en los últimos años. En el campo de la toxicología, el modelo 3D, tal y como se ideó inicialmente, no es de fácil aplicación. La interiorización del lumen dificulta la exposición al agente tóxico. Hay que tener en cuenta que para determinar la toxicidad sobre el epitelio o la mucosa de un contaminante o patógeno ingerido por vía oral es necesario la exposición de éste por el lado luminal. Varios estudios, especialmente con patógenos, han empleado la técnica de la microinyección (Yin et al. 2015) para solventar este hándicap, pero se trata de una técnica compleja, cuya reproducibilidad depende en gran medida del operador. En la actualidad se están desarrollando modelos 2D, a modo de monocapa, partiendo de los enteroides/colonoides 3D o incluso de las propias criptas aisladas (Scott et al. 2016; Thorne et al. 2018). Estas monocapas se generan sobre sistemas bicamerales con insertos porosos (Figura 9), por tanto, existe la posibilidad de introducir células del sistema inmune en el lado basolateral, incluso microbiota en el lado apical.

Objetivos

Los contenidos de As inorgánico en el agua de bebida de algunas zonas del planeta exceden significativamente los niveles legislados. Además, este agua se emplea para cocinar y en la irrigación de los cultivos, por lo tanto, las ingestas de As inorgánico en estas zonas son superiores a los valores recomendados para evitar la aparición de efectos adversos. De hecho, estas poblaciones presentan numerosas patologías asociadas entre las que destacan distintos tipos de cánceres, diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares. Algunas de estas patologías se han relacionado en los últimos años con desórdenes a nivel intestinal, en concreto, con disbiosis y aumentos de la permeabilidad intestinal. Sin embargo, los estudios sobre toxicidad intestinal del As inorgánico son escasos, especialmente para el As(V).

La hipótesis de partida planteada en esta tesis es la siguiente: el As inorgánico ingerido continuamente con el agua de bebida y los alimentos podría causar efectos en el entorno intestinal, los cuales podrían afectar a nivel sistémico. El As inorgánico podría generar un aumento de la permeabilidad intestinal, lo que conllevaría una endotoxemia por la entrada de antígenos a la circulación sanguínea. El empleo de compuestos que permitieran reducir esta toxicidad podría aliviar el daño producido por una exposición crónica al metaloide tanto a nivel intestinal como sistémico. Por otro lado, teniendo en cuenta que una parte importante del transporte del As inorgánico a través del epitelio tiene lugar por vía paracelular, la reducción del efecto sobre la permeabilidad también podría conllevar una menor biodisponibilidad del tóxico y una menor acumulación tisular.

Teniendo en cuenta esta hipótesis de partida, el objetivo general de esta tesis ha sido **la evaluación de la toxicidad intestinal de una exposición crónica a arsénico inorgánico a través del agua de bebida y la búsqueda de estrategias para reducir este efecto tóxico**. Los objetivos específicos planteados han sido los siguientes:

- La evaluación de la toxicidad intestinal *in vivo* del As(III) y As(V) y su posible conexión con un proceso de endotoxemia metabólica.
- La búsqueda *in vitro*, empleando un modelo celular de mucosa intestinal, de estrategias dietéticas capaces de reducir la toxicidad intestinal/sistémica.
- La evaluación *in vivo* de la eficacia de las estrategias seleccionadas en la reducción de la toxicidad intestinal/sistémica y la posible acumulación interna del metaloide.

Metodología

1. Especies arsenicales

El patrón primario de As(III) se preparó 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% p/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 primario de As(V) (1000 mg/L) disuelto en NO_3H al 2% fue adquirido a Merck. A partir de estos patrones primarios se prepararon en el momento de la exposición, las disoluciones empleadas en el tratamiento, las cuales en ocasiones tuvieron que neutralizarse a pH 7 con NaOH (Panreac).

2. Animales y tratamientos

Los protocolos de experimentación 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. En los estudios se emplearon ratones hembras BALB/c procedentes de Envigo RMS, con una edad de 6 semanas y con un peso, en el momento de la adquisición, que osciló 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%) y se alimentaron *ad libitum* con pienso de mantenimiento estándar para roedores con un contenido de As inorgánico de 2 ng/g.

Los estudios *in vivo* de toxicidad de As(III) y As(V) se realizaron en dos ensayos independientes. Para el ensayo de As(III), los ratones se dividieron al azar en tres grupos de nueve animales. El primer grupo se utilizó como control y a los otros dos grupos se les administró As(III) a través del agua de bebida (15 y 30 mg/L, equivalente aproximadamente a 2.25 y 4.5 mg/kg pc/día) durante 6 meses. Para el ensayo de As(V), los ratones se dividieron al azar en cuatro grupos de nueve animales. El primer grupo se utilizó como control y a los otros tres se les administró As(V) a través del agua de bebida (15, 30 y 60 mg/L, equivalente aproximadamente a 2.25, 4.5 y 9 mg/kg pc/día) durante 5 meses y 2 semanas. Las

dosis se eligieron atendiendo a los datos toxicológicos reportados para ratones expuestos crónicamente a As inorgánico a través del agua de bebida (ATSDR 2007). A lo largo del experimento, se monitorizó el peso corporal, la cantidad de agua y alimentos ingeridos, el aspecto físico, el comportamiento de los ratones y la sangre oculta en heces (Hemmocult kit, Beckman Coulter).

Al final de la exposición, los ratones fueron sacrificados por inhalación de isofluorano y dislocación cervical. Inmediatamente se recuperó el intestino, el hígado y los riñones y se lavaron abundantemente con NaCl al 0.9% (p/v) (Sigma). Los órganos se separaron en varios fragmentos y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis. Algunos fragmentos requirieron de técnicas específicas de almacenamiento o preparación, que se detallan en cada sección. Las muestras de sangre se recogieron en tubos, que se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 60 min para permitir la coagulación. Posteriormente se centrifugaron (2000 × g, 10 min) y se recuperó el suero que se almacenó a -80°C hasta el momento de análisis.

3. Ensayos de toxicidad *in vivo*

3.1. Evaluación de la respuesta inflamatoria causada por el As inorgánico

Para determinar la posible generación de un proceso inflamatorio intestinal, se determinaron varios mediadores de inflamación en el tejido mediante kits específicos de ELISA y la infiltración de neutrófilos a nivel de mucosa mediante pruebas bioquímicas [contenido fecal de lactoferrina y actividad mieloperoxidasa (MPO) tisular] y mediante el estudio histológico del intestino (apartado 3.3).

3.1.1. Concentración de citoquinas proinflamatorias en el tejido intestinal

Las muestras de intestino delgado y grueso (50 mg) 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 (ácido etilendiaminotetracético, Sigma), Tritón X-100 1% v/v (Merck), sodio desoxicolato 0.5% p/v (Sigma), inhibidor de proteasa 10% p/v (Roche)] a una proporción 1:20. Tras la centrifugación ($8000 \times g$, 5 min, $4^\circ C$), se determinaron los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-6 (Sigma), IL-2 (Sigma), IL-1 β (eBioscience), TNF- α (eBioscience) e IL-17A (MyBioSource) en el sobrenadante mediante kits de ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante, y los valores se normalizaron por mg de tejido.

3.1.2. Evaluación de los contenidos fecales de lactoferrina y la actividad MPO intestinal

Las heces (50 mg) se homogenizaron en tampón RIPA modificado en una proporción 1:10. La homogenización se realizó empleando un homogenizador tipo *bead beater* (FastPrep-24TM 5G Instrument, MP Biomedical) con bolas de vidrio (0.1 mm diámetro) con tres ciclos de 40 s y velocidad de 6 m/s. Los homogeneizados se centrifugaron ($9500 \times g$, 20 min, $4^\circ C$) y la concentración de lactoferrina en el sobrenadante se determinó mediante el kit de mouse lactoferrin ELISA (MyBioSource), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se normalizaron por mg de heces.

Para evaluar la actividad MPO, se prepararon homogenizados de intestino delgado y grueso (10 mg) en tampón fosfato 50 mM con bromuro de hexadeciltrimetilamonio 0.5% (HTAB, Sigma) en una proporción 1:30. Tras la centrifugación ($8000 \times g$, 5 min, $4^\circ C$), el sobrenadante obtenido se empleó para determinar la actividad. La mezcla de la reacción consistió en 50 μL del sobrenadante y 200 μL de o-dianidina 0.5 mM (Sigma) y H₂O₂ (Prolabo) 0.0012% v/v en tampón fosfato 50 mM. Se realizaron medidas cada 40 s durante 25 min a 460 nm y $37^\circ C$ en un lector de placas CLARIOstar (BMG-Labtech). La actividad MPO se expresó en unidades de MPO/mg de tejido, donde una unidad de MPO se define como la cantidad necesaria para degradar un μmol de H₂O₂ por minuto a temperatura ambiente. Los valores se normalizaron por mg de tejido.

3.2. Determinación de los niveles tisulares de biomarcadores de estrés

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

Las muestras de intestino delgado y grueso (50 mg) se homogenizaron tal y como se describe en el apartado 3.1.1. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación ($8000 \times g$, 5 min, 4 °C) se utilizó para la determinación de ROS/RNS empleando la técnica de oxidación de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA, Sigma). El sobrenadante (100 µL) se incubó (30 min, 37 °C) con 6 µL de una disolución de H₂DCF-DA 10 µM en tampón fosfato salino (PBS). Transcurrido este tiempo, la fluorescencia se determinó utilizando un lector de microplacas CLARIOstar (λ excitación = 488 nm; λ emisión = 530 nm). Los valores de fluorescencia obtenidos se normalizaron por mg de tejido.

3.2.2. Determinación del glutatión reducido (GSH) y la peroxidación lipídica

Para la medida del GSH, el tejido procedente del intestino delgado y grueso (10 mg) se homogenizó a una proporción 1:50 en 400 µL de tampón fosfato amónico 0.1 M a pH 8 con EDTA 10 mM (Sigma) y 100 µL de ácido ortofosfórico al 25% v/v (Fluka). Tras centrifugar ($8000 \times g$, 20 min, 4 °C), el sobrenadante se empleó para la determinación del GSH. La concentración de GSH se midió en un lector de placas CLARIOstar (λ excitación = 340 nm; λ emisión = 420 nm) empleando 10 µL de sobrenadante, 10 µL de o-phtalaldehído 0.07 M (Fluka) y 180 µL de tampón fosfato 0.1 M con EDTA 10 mM pH 8. Los datos se obtuvieron por interpolación frente a una curva de calibrado de GSH (6.5-65 µM, Merck).

La determinación de la peroxidación lipídica se realizó mediante el ensayo de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), el cual permite el análisis del compuesto mayoritario del proceso de oxidación de los ácidos grasos polinsaturados celulares, el malondialdehído (MDA). El sobrenadante empleado en el análisis se obtuvo tras homogenizar porciones del intestino delgado y grueso

(40 mg) con RIPA modificado tal y como se describe en el apartado 3.1.1. Para realizar la medida, 20 μL del sobrenadante se mezclaron con 20 μL de dodecilsulfato sódico (SDS, GE Healthcare) al 8.1% p/v, 150 μL de ácido acético al 20% v/v (Janssen), 150 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma) al 0.8% p/v y 60 μL de H_2O desionizada. La mezcla se incubó en un baño a 95°C durante 60 min. Tras enfriar las muestras, se les adicionó 200 μL de 1-butanol (Panreac), se centrifugó a $1300 \times g$ durante 4 min y la fase orgánica se recuperó para su posterior medida en un lector de placas CLARIOstar (λ excitación = 532; λ emisión = 553). Los datos fueron expresados como equivalentes MDA/mg de tejido calculados a partir de una curva de calibración de MDA (0.5-10 nM, Sigma).

3.3. Estudio histológico del intestino

Una fracción del intestino grueso (≈ 1 cm) se fijó con paraformaldehído (PAF) 4% en PBS (Sigma) y se almacenó a 4°C hasta el momento de la preparación. Posteriormente, las porciones intestinales se embebieron en parafina (Merck) y se realizaron cortes con un grosor de 5 μm con un microtomo LEICA RM2125 RTS (Leica Biosystems). Las secciones de tejido se desparafinaron y posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina (Abcam) para medir el grado de infiltración de neutrófilos.

Para evaluar la población de células mucosecretoras, se utilizó una tinción de ácido periódico-Schiff (PAS). Las secciones deparafinadas y rehidratadas fueron tratadas con ácido periódico (Panreac) durante 5 min. Las muestras se lavaron con agua destilada y se tiñeron con el reactivo Schiff (Sigma) durante 15 min. Finalmente, las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina (Abcam) durante 5 min. Las secciones de tejido se deshidrataron con etanol (70° , 96° , 100°) y xileno, y se montaron con medio de montaje EUKITT[®] (Panreac). Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 90i.

3.4. Análisis transcriptómico de los genes afectados por la exposición o implicados en el proceso toxicológico

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 reactivo estabilizante de ARN, se almacenó a -80 °C hasta el momento del análisis. La extracción de ARN se realizó empleando el kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del 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) y electroforesis en gel de agarosa D1 bajo EEO (1% p/v, Pronadisa), comprobándose la presencia de las bandas de ARN ribosómico 18S y 28S.

La transcripción reversa (RT) se llevó a cabo utilizando el kit SuperScript VILO™ cDNA Synthesis (Invitrogen) o el kit Reverse Transcriptase Core kit (Eurogentec Headquarters), siguiendo las especificaciones de los fabricantes. A partir del ADNc obtenido, se amplificaron los genes de interés mediante qPCR empleando el equipo LightCycler® 480 Real-Time qPCR System (Roche Diagnostics). Las reacciones se realizaron empleando los siguientes volúmenes: 5 µL de LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (2×, Roche), 2.5 µL de ADNc (20 ng/mL), 0.5 µL de cada oligonucleótido (10 µM) (Biolegio), 1.5 µL de agua libre de ARNasa. La reacción de 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).

La eficiencia para cada gen se calculó a partir de una curva obtenida de 4 diluciones seriadas de ADNc procedente de una mezcla de muestras de animales tratados. Los oligonucleótidos empleados para los ensayos *in vivo* se muestran en la tabla 3. Los datos obtenidos se normalizaron empleando los genes de referencia *Rn18s* o *Hprt1* y se analizaron mediante el software REST384.

Tabla 3. Secuencia y eficacia de los oligonucleótidos empleados en los estudios de la toxicidad *in vivo*.

Gen	GenBank ID	Secuencia 5'-3'	Amplicón (bp)	Eficacia	Referencia
<i>Rn18s</i>	NM_023566.3	F: CGGACAGGATTGACAGATTG R: CAAATCGCTCCACCAACTAA	98	1.83	Cieslik et al. (2015)
<i>Hprt1</i>	NM_013556.2	F: GTTAAGCAGTACAGCCCCAAA R: AGGGCATATCCAACAACAACTT	131	1.98	Saint-Geniez et al. (2013)
<i>Nlrp3</i>	NM_145827.4	F: ATCAACAGGCGAGACCTCTG R: GTCCTCCTGGCATAACCATAGA	96	2.13	Boro yBalaji (2017)
<i>Reg3b</i>	NM_011036.1	F: TCCAGGCTTATGGCTCCTA R: GCAGGCCAGTTCTGCATCA	75	1.71	Hogan et al. (2006)
<i>Reg3g</i>	NM_011260.2	F: GCTCCTATTGCTATGCCTTGTTTAG R: CATGGAGGACAGGAAGGAAGC	131	1.73	Ratsimandresy et al. (2017)
<i>Cldn1</i>	NM_016674.4	F: AGGTCCTGGCGACATTAGTGG R: CGTGGTGTTGGGTAAGAGGT	204	2.05	Acharya et al. (2004)
<i>Ocln</i>	NM_008756.2	F: ATGTCCGGCCGATGCTCTC R: TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT	308	1.97	Hul et al. (2018)
<i>Cldn3</i>	NM_009902.4	F: TCATCGGCAGCAGCATCATCAC R: ACGATGGTGATCTTGGCCTTGG	256	1.74	Hul et al. (2018)

Continuación **tabla 3**

<i>Gen</i>	GenBank ID	Secuencia 5'-3'	Amplicón	Eficacia	Referencia
<i>Muc2</i>	NM_023566.4	F: GCTGACGAGTTGGTGAATG R: GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC	122	1.98	Michael et al. (2015)
<i>Lgr5</i>	NM_010195.2	F: CCTACTCGAAGACTTACCCAGT R: GCATTGGGGTGAATGATAGCA	165	2.05	Hou et al. (2018)
<i>Hes1</i>	NM_008235.2	F: TCCAAGCTAGAGAAGGCAGAC R: GTCACCTCGTTCATGCACTC	149	1.98	Batissoco et al. (2021)
<i>Atoh1</i>	NM_007500.5	F: TTTCCCAACTGCTTGAGAC R: TGCATTGGCAGTTGAGTTTC	197	2.07	Yoon et al. (2011)
<i>Ki67</i>	NM_001081117.2	F: TGCCCGACCCTACAAAATG R: GAGCCTGTATCACTCATCTG	135	2.01	Al-Dwairi et al. (2012)

3.5. Análisis proteómico mediante Western blot (WB) de los genes afectados por la exposición o implicados en el proceso toxicológico

Las muestras de intestino grueso para el análisis por WB se homogeneizaron en tampón RIPA en una proporción de 1:20 (p/v) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1.1 y el contenido de proteínas se midió en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. Se cargaron alícuotas de los homogeneizados (30 µg de proteína) en geles de SDS-acrilamida al 10 %, excepto para la MUC2, donde se emplearon geles en gradiente (Mini-PROTEAN® Precast Gels, Bio-Rad). Los geles se sometieron a una electroforesis a 80 V durante 30 min seguido de 120 V durante 1 h en un tampón de migración formado por una disolución de Tris 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM (Merck) y SDS al 0.1 %. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon®) en un sistema de transferencia de proteínas semiseco (Bio-Rad) durante 1 h a 100 mA.

Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con una disolución de albúmina de suero bovino (BSA) al 5 % p/v (Sigma) en tampón Tris (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) con Tween-20 al 0.1 % v/v (TBST) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes según las recomendaciones del fabricante. Los anticuerpos primarios empleados fueron los siguientes: anti-MUC2 (ABK1-A6853, 1:1000, Abyntek), anti-fosfo-p38 MAPK (D3F9, 1:1000, Cell Signaling Technology), anti-fosfo-SAPK/JNK (81E11, 1:1000, Cell Signaling Technology) y anti-fosfo- $\text{IKK } \alpha/\beta$ (2697, 1:1000, Cell Signaling Technology). Después de varios lavados con TBST, las membranas se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario anticonejo conjugado con peroxidasa (1:10000, Amersham) diluido en tampón de bloqueo. Posteriormente, las membranas se lavaron y se incubaron con Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) y se expusieron en un aparato ImageQuant 800 (Cytiva). Todas las medidas se normalizaron mediante

hibridación con las proteínas de referencia β -actina (1:10000, Sigma) o HPRT1 (1:10000, Cohesion Bioscience). Las bandas se cuantificaron utilizando el programa de densitometría ImageJ V1.8.0 (National Institutes of Health).

3.6. Análisis de la composición de la microbiota intestinal

El ADN bacteriano de las heces de los ratones se aisló empleando el kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen) a partir de aproximadamente 100 mg de heces individuales y cuantificado por fluorescencia con el kit dsDNA HS assay (ThermoFisher) en un equipo Qubit (ThermoFisher). La región variable V3-V4 del ADNr 16S bacteriano de cada muestra fue amplificada siguiendo el protocolo *16S rDNA gene Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina* (Cod. 15044223 Rev. A). Se utilizaron cebadores específicos (PCR1_f: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'; PCR1_r: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3') que contienen colas con el adaptador para Illumina seleccionados según (Klindworth et al. 2013). Tras la amplificación, la multiplexación se llevó a cabo usando el kit Nextera XT Index. Se verificó el tamaño de los fragmentos amplificados en un Bioanalyzer DNA 1000 chip (Agilent). Las librerías obtenidas se secuenciaron usando *2x300 paired-end run* (MiSeq Reagent kit v3) en un secuenciador MiSeq siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación y secuenciación de librerías se efectuó en el Servicio de Genómica de la Universidad de Valencia.

Las secuencias se analizaron posteriormente en el programa informático R v4.1.1 (Team 2021). Las secuencias crudas 16S V3-V4 directas y reversas fueron procesadas con el paquete informático DADA2 (Callahan et al. 2016). Las lecturas se recortaron a 260 bases y se filtraron con maxEE ajustado a 5.

Posteriormente las lecturas fueron dereplicadas, se estimaron los errores y las secuencias se unieron usando funciones implementadas en el paquete DADA2. Las secuencias quiméricas se eliminaron con la función *removeBimeraDenovo* de DADA2 usando el método *consensus*. La taxonomía se asignó a ASVs (*Amplicon Sequence Variants*) utilizando la versión 138 de SILVA (Quast et al. 2012). El preprocesado inicial y la exploración de datos se llevaron a cabo mediante funciones implementadas en el paquete phyloseq v1.38.0 (McMurdie y Holmes 2013). Los resultados gráficos se obtuvieron con el programa ggplot2 (Wickham 2016). Las secuencias ASVs no asignadas a ningún filo, además de las secuencias ASVs con 10 o menos lecturas se eliminaron de los datos. Las secuencias potencialmente contaminantes se identificaron con el paquete decontam (Davis et al. 2018), con el método ajustado a frecuencia y umbral de 0.3. Para la reconstrucción filogenética, las secuencias ASV se alinearon con herramientas implementadas en el paquete DECIPHER v2.22.0 (Wright 2016) y la inferencia de la filogenia se realizó usando un árbol filogenético de máxima probabilidad GTR+G+I (*generalized time-reversible with gamma rate variation and invariants*) construido con el paquete phangorn v2.7.1 (Schliep 2010).

El análisis de la diversidad alfa se llevó a cabo con el paquete Breakaway versión 4.7.6 (Willis y Bunge 2015) para estimar la riqueza, y el paquete DivNet versión 0.4.0 para la diversidad (Willis y Martin 2020). Para los análisis de diversidad beta, los valores de lectura cero se reemplazaron con valores imputados usando el método *square root Bayesian multiplicative* implementado en zCompositions v1.4 (Palarea-Albaladejo y Martín-Fernández 2015). Las distancias euclidianas se calcularon (dist, base R 4.1.1) llevando a cabo primero la transformación de los datos mediante *phylogenetic isometric log ratio transformation* implementada en el paquete philr (Silverman et al. 2017). Las distancias calculadas fueron utilizadas para realizar los análisis PCA o NMDS utilizando las herramientas implementadas en el paquete phyloseq. Las

diferencias significativas entre los distintos grupos de tratamiento se estimaron mediante PERMANOVA por parejas utilizando la función `adonis.pair` incluida en el paquete `EcolUtils` (<https://github.com/GuillemSalazar/EcolUtils>), que utiliza la función `adonis` del paquete `VEGAN` (Dixon 2003). La homogeneidad de las varianzas se estimó mediante las funciones `betadisper` y `permutest` implementadas en el paquete `VEGAN`. Las abundancias diferenciales de taxones bacterianos entre los grupos se estimaron mediante funciones implementadas en el paquete `corncob` (Martin et al. 2020), o en el paquete `ANCOM-BC` (Lin y Peddada 2020).

3.7. Evaluación del metabolismo de la microbiota intestinal: Perfil luminal de AGCC

Para la determinación de los AGCC se empleó la metodología descrita por Furuhashi et al. (2018) con ciertas modificaciones. Las heces (50 mg) se homogenizaron en 1 mL de isobutanol 10% v/v (Fluka) empleando bolas de vidrio, tal y como se describe en el apartado 3.1.2. Al sobrenadante obtenido tras el homogenizado (630 μ L), se le adicionaron 125 μ L de NaOH 20 mM (Panreac) y 23 μ L de ácido hexanoico (Merck, 50 mg/L), empleado como patrón interno. Parte de esta mezcla (400 μ L) se empleó para la derivatización mediante la adición de 80 μ L de isobutanol, 100 μ L de piridina (Sigma), 70 μ L de agua destilada y 50 μ L de cloroformiato de isobutilo (Sigma). Los ésteres derivados de los AGCC se extrajeron añadiendo 150 μ L de n-hexano (Supelco). La fase orgánica se separó por centrifugación a $12000 \times g$ durante 3 min y se recuperó para su posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, Agilent modelo 5977B GC/MSD) usando una columna capilar Ultra Inert HP/5 MS (30 m \times 0.25 mm de diámetro interno, 0.25 μ m) (Agilent).

El volumen de inyección del derivado fue de 1.3 μL con un split 1:50, y se utilizó helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min. Las temperaturas del inyector y la línea de transferencia se establecieron en 250°C. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: 5 min a 40 °C, rampa de 4°C/min hasta 90 °C y un incremento de 3°C/min hasta alcanzar los 290°C. Los compuestos se identificaron a partir de los datos completos de escaneo (m/z 35-500). Las estructuras químicas se determinaron según la biblioteca de espectros de masas NIST 17 (versión 2011, Agilent) y la cuantificación se realizó empleando disoluciones patrón de los siguientes AGCC: ácido acético (Janssen Chimica), propiónico (Fluka), isobutírico (Sigma), butírico (Fluka), valérico (Fluka) e isovalérico (Fluka). Los patrones se derivatizaron empleando las mismas condiciones que las utilizadas en las muestras de heces.

Las pruebas de recuperación se realizaron adicionando una cantidad conocida de cada AGCC (50 mg/L, 23 μL) a alícuotas de 630 μL del homogeneizado fecal y tras añadir 125 μL de NaOH 20 mM y 23 μL de ácido hexanoico (50 mg/L), la derivatización se realizó como se ha descrito previamente. La recuperación osciló entre 72 y 106%. La precisión se evaluó analizando cuatro réplicas independientes de 3 muestras distintas de heces. La desviación estándar relativa (RSD) para la repetibilidad fue la siguiente: ácido acético, $9.7 \pm 2.1\%$; ácido propiónico, $5.7 \pm 3.7\%$; ácido isobutírico, $12.3 \pm 3.3\%$; ácido butírico, $10.7 \pm 2.5\%$; ácido hexanoico, $11.7 \pm 2.9\%$.

3.8. Determinación de la permeabilidad intestinal y de los marcadores de endotoxemia

La permeabilidad intestinal se evaluó mediante la determinación de la concentración de albúmina en heces. El homogeneizado se realizó como se indica en el apartado 3.1.2 y la concentración 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.

Para evaluar posibles señales de endotoxemia, se evaluaron las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α y la proteína de unión al lipopolisacárido (LBP) en el suero usando kits específicos de ELISA [LBP (Cloud-Clone Corporation), IL-1 β (Sigma), TNF- α (Sigma)].

3.9. Acumulación tisular de As inorgánico

Las muestras de tejido se sometieron a un proceso de digestión ácida en horno de microondas. Para ello, una cantidad determinada de cada órgano (50 mg) se colocó en un reactor de teflón y se adicionó 4 mL de HNO₃ 14 mol/L (Merck) y 1 mL de H₂O₂ (30% v/v, Prolabo). Los reactores se irradiaron en un horno de microondas (MARS) de CEM (Vertex) a 800 W de potencia durante 15 min (180 °C). Tras la digestión, las muestras se llevaron a volumen final con agua bidestilada. La cuantificación de As se llevó a cabo empleando un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS, Modelo iCAP RQ, Thermo), en las condiciones que se describen en la tabla 3. El control de calidad se realizó mediante el análisis del material de referencia (EnviroMAT Drinking water, high, EP-H, SCP Science).

Tabla 4. Condiciones instrumentales utilizadas en el análisis mediante ICP-MS.

Isotopo/Estándar interno	⁷⁵ As/ ⁷² Ge
Condiciones instrumentales	
Flujo de gas de plasma Ar (L/min)	15
Flujo de Gas Auxiliar (L/min)	1.0
Potencia de RF (W)	1550
Acoplamiento de RF (V)	1.80
Profundidad de muestreo (mm)	8.0
Bomba nebulizadora (rps)	0.30
Parámetros de la celda	
Flujo de He (mL/min)	5.0
Flujo de H ₂ (mL/min)	6.0
Tiempo de estabilización (s)	15
Parámetros de integración	
Modo de adquisición	Espectro
Barrido/réplicas	100
Tiempo de integración (s)	0.30

3.10. Evaluación del efecto del As inorgánico sobre la diferenciación y proliferación del nicho de células madre intestinales

En este apartado se evaluó únicamente el efecto de la exposición crónica a As(III). Se aislaron criptas de animales control y animales tratados con As(III) 30 mg/L. La extracción y el cultivo de las criptas se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Sato et al. (2009) con algunas modificaciones. Tras el sacrificio, se aisló inmediatamente una porción intestinal, se lavó con PBS frío, se abrió longitudinalmente y se cortó en segmentos de 2-4 mm. Los segmentos se lavaron de 15 a 20 veces con PBS frío y se incubaron a 4 °C con 25 mL de tampón de quelación (2 mM de EDTA en PBS) con agitación suave durante 30 min. Tras la incubación, se retiró la disolución de EDTA y se sustituyó por 10 mL de BSA 0.1% p/v en PBS. Las criptas se obtuvieron pipeteando las disoluciones de BSA varias veces y pasándolas por un filtro celular de 70 µm

(Biologix). Las criptas filtradas se centrifugaron a 4° C, 200 × g durante 5 min y se resuspendieron en DMEM/F12 avanzado (ADF, Gibco) suplementado con GlutaMAX 1× (Gibco), 10 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico, Hyclone), 100 U/mL de penicilina (Hyclone), 0.1 mg/mL de estreptomicina (Hyclone) y 0.0025 mg/L de anfotericina B (Hyclone) (ADF suplementado). El proceso de aislamiento se repitió 4-5 veces. Las dos últimas fracciones enriquecidas en criptas se utilizaron para los siguientes ensayos.

Una porción de las criptas se empleó directamente para evaluar la expresión relativa de genes relacionados con el proceso de proliferación y marcadores tempranos de diferenciación, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.4 y empleando los oligonucleótidos de la tabla 3. El resto de criptas se sembraron para generar un modelo 3D (organoides). Se diluyeron aproximadamente 1000 criptas en 50 µL de Cultrex factor de crecimiento reducido tipo 2 (R&D Systems, utilizado como ECM) preparado en una proporción 1:2 en medio de crecimiento de organoides de ratón IntestiCult™ (OGM, STEMCELL Technologies) y se sembraron en forma de gotas en una placa de fondo plano de 12 pocillos previamente precalentada. Las gotas (2 por pocillo) se incubaron a 37°C durante 25 min para permitir la polimerización de la ECM y posteriormente se añadió 1 mL de OGM suplementado con 100 U/mL de penicilina, 0.01 mg/mL de estreptomicina, 0.0025 mg/L de anfotericina B y 0.5 mg/mL de gentamicina (Sigma) (OGM suplementado) a cada pocillo. Las criptas se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 95% de oxígeno y 5% de CO₂. El medio de crecimiento se suplementó con 10 µM del inhibidor de ROCK Y-27632 (Sigma) y 3 µM del inhibidor de GSK3 CHIR99021 (STEMCELL Technologies) durante los 2 primeros días tras el pase. Desde el momento de siembra se evaluó el desarrollo de los organoides empleando un microscopio invertido OPTIKA, para determinar el grado de proliferación y el tamaño del dominio de las criptas. Los organoides se recuperaron tras 6 días de crecimiento mediante pipeteo con PBS y posterior

centrifugación ($200 \times g$, 5 min). A continuación, se resuspendieron en TrypLE™ Express 1× (Gibco) y se incubaron durante 10 min a 37°C para obtener una suspensión de células individualizadas. Posteriormente, estas células se emplearon para evaluar la expresión génica de los marcadores de proliferación y diferenciación (Tabla 3), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.4.

4. Evaluación *in vitro* de la eficacia de cepas de bacterias ácido-lácticas para la reducción de la toxicidad intestinal de As inorgánico

Los ensayos se realizaron sólo con As(III) por tratarse de la especie arsenical que presentó mayor toxicidad en los ensayos *in vivo*.

4.1. Estrategias ensayadas

En este estudio se ensayaron dos cepas de BAL [LE1, *Lactobacillus intestinalis*, cepa de intestino murino, y BL23, *Lactobacillus casei*, cepa de laboratorio (Mazé et al. 2010)] como posibles estrategias dietéticas para reducir la toxicidad intestinal de As(III). La cepa LE1 se seleccionó por su capacidad antioxidante y antiinflamatoria previamente evidenciada *in vivo* por Rodríguez-Viso (2023) y la cepa BL23 por su capacidad para reducir la toxicidad del As(III), puesta de manifiesto en estudios *in vitro* empleando un monocultivo de células Caco-2 (Chiocchetti et al. 2020).

Se ensayaron dos tipos de tratamiento, las cepas no viables tratadas térmicamente y el secretoma con los metabolitos liberados durante el crecimiento en medio esencial mínimo (MEM) con sales de Earle. Las bacterias se crecieron en medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (BD Difco) a 37 °C en condiciones estáticas. Tras 24 h, se recogieron por centrifugación ($4500 \times g$, 10 min, 4 °C), se eliminó el sobrenadante, y el sedimento bacteriano se lavó y se resuspendió en

NaCl 0.9%. Parte de las cepas se inactivaron mediante calor a 85 °C durante 30 min, produciendo una pérdida de la viabilidad mayor a 7 unidades logarítmicas, ensayada mediante recuento en placa. Tras medir la densidad óptica (DO) a una λ de 600 nm, las cepas se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

El resto de suspensión bacteriana se empleó para la obtención del medio condicionado. Las cepas se incubaron a 37° C durante 24 h en MEM con 3g/L de glucosa (Sigma). Posteriormente se centrifugaron (4500 \times g, 10 min, 4 °C), el medio condicionado obtenido se esterilizó a través de filtros de 0.2 μ m y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Para los ensayos de exposición, el medio condicionado se suplementó con suero fetal bovino (SFB) a una concentración final de 7.5% v/v, glucosa (1 g/L) y HEPES 10 mM.

4.2. Modelo de mucosa intestinal empleado en los ensayos de toxicidad

Para llevar a cabo los estudios *in vitro* se emplearon tres líneas celulares humanas, dos de ellas modelos de células epiteliales del intestino (Caco-2 y HT29-MTX) y una línea monocítica THP-1 diferenciada a macrófagos. Tal y como hemos indicado en el apartado 7.2 de la introducción, la línea celular Caco-2 es un modelo de enterocito, mientras que las HT29-MTX son un modelo de células caliciformes o mucosecretoras.

Las células Caco-2 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC® HTB-37™). El mantenimiento se llevó a cabo en frascos de 75 cm² a los que se adicionaron 10 mL de MEM con sales de Earle y L-glutamina (0.6 g/L). El MEM se suplementó con SFB 10% v/v, aminoácidos no esenciales 1% v/v, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 0.01 mg/mL, anfotericina B 0.0025 mg/mL, piruvato de sodio 1 mM y HEPES 10 mM.

Las células HT29-MTX se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECACC, número 12040401). El mantenimiento se llevó a cabo en frascos de 75 cm² a los que se adicionaron 10 mL de medio Eagle modificado de Dubelcco (DMEM) con L-glutamina (0.6 g/L) y un alto contenido de glucosa (4.5 g/L). El DMEM se suplementó con SFB 10% v/v, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 0.1 mg/mL, anfotericina B 0.0025 mg/mL, piruvato de sodio 1 mM y HEPES 10 mM.

Las células THP-1 se obtuvieron de la ECACC (número 88081201). El mantenimiento se llevó a cabo en frascos de 75 cm² a los que se adicionaron 10 mL de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640. El RPMI fue suplementado con SFB 10% v/v, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 0.1 mg/mL, anfotericina B 0.0025 mg/mL y HEPES 10 mM.

Las células se incubaron a 37 °C con una humedad relativa del 95% y una concentración de CO₂ del 5%. Cuando alcanzaron el 80-90% de confluencia, las células Caco-2 y HT29-MTX se recuperaron por incubación con una disolución de tripsina (1.5 mg/L) y EDTA (0.66 g/L) durante 10 min a 37 °C y se sembraron en frascos de 75 cm² a una densidad de 1.5×10^4 células/cm². Las células no adherentes THP-1 se recuperaron por centrifugación (450 × g, 5 min) y se sembraron en frascos de 75 cm² a una densidad de 2.6×10^4 células/cm².

El sistema *in vitro* para los ensayos de toxicidad consistió en un pocillo dividido en dos compartimentos por un inserto con un tamaño de poro de 0.4 μm (Transwell®, Corning): un compartimento apical o superior y uno basolateral o inferior (Introducción, Figura 9). Sobre el inserto se sembraron las células Caco-2 cocultivadas con las HT29-MTX a una densidad de siembra de 4.4×10^4 células/cm² y en una proporción 90:10. En la parte basolateral se dispusieron las células THP-1 previamente diferenciadas a macrófagos, emulando la posición subepitelial del sistema inmune intestinal.

Para su diferenciación, las células THP-1 se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 1.5×10^5 células/cm² y se incubaron durante 48 h con 200 nM de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma) diluido en medio RPMI 1640 suplementado. Tras la diferenciación, las células se recuperaron durante 4 h con RPMI suplementado sin PMA. Tras el periodo de reposo, los macrófagos se pusieron en contacto con las células Caco-2/HT29-MTX recién sembradas sobre insertos.

Todos los ensayos descritos en esta tesis se realizaron con células Caco-2 entre los pases 8 y 15, con células HT29-MTX entre los pases 18 y 25, y con células THP-1 entre los pases 4 y 11. Los reactivos empleados para el mantenimiento celular se adquirieron a Hyclone, Biowest, Gibco y Capricorn.

4.3. Tratamiento del tricultivo con As(III) y las estrategias dietéticas

La exposición a As(III) con o sin las estrategias dietéticas a ensayar se realizó dos días después de la siembra. Los tratamientos subcrónicos (8 días), añadidos al compartimento apical (0.5 mL), fueron los siguientes:

- Control negativo: MEM-7.5% SFB.
- Control positivo: As(III) 2.5 mg/L preparado en MEM-7.5% SFB.
- Tratamiento con BAL tratadas térmicamente y As(III): Disolución de bacterias no viables (0.15 DO₆₀₀) y As(III) (2.5 mg/L) preparada en MEM-7.5% SFB.
- Tratamiento con medio condicionado y As(III): Disolución de As(III) (2.5 mg/L) preparada en el medio condicionado de las bacterias lácticas (apartado 4.1).

En el lado basolateral se adicionaron 1.5 mL de MEM-7.5% SFB. Los medios de tratamiento se cambiaron cada dos días para evitar la oxidación del As(III).

Debido a la limitada viabilidad de los monocitos diferenciados, durante el tiempo que duró el tratamiento, los cultivos de macrófagos tuvieron que renovarse 2 veces (cada 4 días). Para tal fin, los insertos con los cocultivos Caco-2/HT29-MTX se pasaron a nuevas placas multipocillo con macrófagos recién diferenciados en el lado basolateral.

4.4. Evaluación de parámetros toxicológicos para determinar la eficacia de las estrategias

4.4.1. Respuesta proinflamatoria y prooxidante de las células intestinales y los macrófagos

Trascurrido el tiempo de tratamiento con As(III) con o sin las estrategias dietéticas, el medio apical y basolateral fueron recuperados y empleados para la determinación de los contenidos de la citoquina proinflamatoria IL-8 mediante el kit de ELISA específico human IL-8/CXCL8 ELISA Kit (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La respuesta prooxidante se evaluó en las monocapas epiteliales y en los macrófagos mediante el análisis de la expresión génica relativa de proteínas de estrés (proteína de choque térmico *HSP70* y la metalotioneína *MT2A*) empleando el protocolo descrito en el apartado 3.4 y los oligonucleótidos que se detallan en la tabla 5.

4.4.2. Análisis estructural de la monocapa intestinal

Para determinar el efecto de los distintos tratamientos sobre la estructura de la monocapa epitelial se evaluó la morfología de las uniones estrechas mediante inmunodetección de la proteína de anclaje ZO-1 y la expresión relativa de algunas de las proteínas transmembrana de estas uniones (*OCLN* y *CLDN1*) y de la

mucina mayoritaria de la capa de mucus generada por las células HT29-MTX (*MUC5AC*). Para evaluar la expresión se emplearon el protocolo y los oligonucleótidos descritos en el apartado 3.4 y la tabla 5 respectivamente.

Para la inmunolocalización de ZO-1, las monocapas Caco-2/HT29-MTX se fijaron con PAF al 4% durante 10 min y posteriormente se permeabilizaron con Tritón X-100 1% (v/v en PBS) durante 15 min. Tras un bloqueo con suero de cabra al 10% (v/v en PBS) (Abcam), las monocapas se incubaron 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. Para la detección, se empleó un anticuerpo anti-conejo conjugado con Alexa 488 (R37116, Invitrogen) diluido 1:200 en 2% de suero de cabra durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se llevó a cabo la incubación 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 epifluorescencia Nikon eclipse 90i (Alexa 488: λ excitación = 488 nm, λ emisión = 519 nm; DAPI: λ excitación = 340 nm, λ emisión = 485 nm).

4.4.3. Permeabilidad paracelular de la monocapa epitelial

La permeabilidad de la monocapa se monitorizó mediante la medida del transporte de Lucifer Yellow (LY, Sigma). Este marcador se transporta a través del espacio intercelular, por lo tanto, es un indicador de la magnitud de la permeabilidad paracelular. Tras el tratamiento, se eliminaron los medios y los pocillos con las monocapas Caco-2/HT29-MTX se transfirieron a placas multipocillo sin macrófagos en el lado basolateral. El marcador paracelular LY (100 μ M) se adicionó al lado apical diluido en una disolución salina equilibrada de Hanks (HBSS) suplementada con HEPES 10 mM (0.5 mL). En el

compartimento basolateral se adicionaron 1.5 mL de HBSS. Durante el ensayo, se extrajeron alícuotas (100 μ L) del compartimento basolateral cada 30 min durante 2 horas, restituyendo en cada tiempo el volumen extraído por un volumen igual de HBSS. Los contenidos de LY en las alícuotas se determinaron en un lector de microplacas CLARIOstar (λ excitación = 488 nm; λ emisión = 530 nm) frente a una curva patrón de LY diluida en HBSS (0.05-5 μ g/mL). La permeabilidad aparente del LY se calculó empleando la ecuación 1.

$$P_{app} = (dC/dt) (V_r/AC_o) \text{ (Eq.1)}$$

donde, dC/dt es el flujo (μ g/s) determinado por la pendiente lineal de la ecuación que gobierna la variación de las concentraciones de LY, corregidas por la dilución, frente al tiempo.

V_r es el volumen del compartimento basolateral (1.5 mL).

A es la superficie ocupada por la monocapa celular (1.12 cm^2).

C_o es la concentración inicial de LY en el compartimento apical (50 μ g/mL).

4.4.4. Transporte de As a través de la monocapa celular

Tras la exposición, parte del medio recogido del lado basolateral se empleó para determinar el contenido total de As y evaluar la cantidad del metaloide transportada a través de la monocapa epitelial en los distintos tratamientos. Los protocolos empleados en la digestión ácida de los medios y la detección del As por ICP-MS se describen en el apartado 3.9.

4.5. Evaluación de la captación de As por las bacterias lácticas.

Para determinar el posible papel de la captación de As por parte de las bacterias en la protección frente al As(III), se llevó a cabo una incubación a 37°C de las

cepas de BAL viables y no viables (4 DO₆₀₀) con distintas concentraciones de As(III) (0.1, 0.5 y 1 mg/L) a distintos tiempos (2, 6 y 24 h) en medio PBS suplementado con glucosa (3 g/L). Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a $4500 \times g$ durante 5 min. El contenido de As en el sobrenadante y en el pellet celular se analizó según el protocolo descrito en el apartado 3.9.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en el estudio *in vitro*.

Gen	GenBank ID	Secuencia 5'-3'	Amplicón	Eficacia	Referencia
<i>RN18S</i>	NM_003286.2	F: CCATCCAATCGGTAGTAGCG R: GTAACCCGTTGAACCCATT	151	2.00	Wang et al. (2012)
<i>HSP70</i>	NM_005345.5	F: GGAAQGGACCGAGCTCTTCTCGC R: CAGGAGTAGGTGGTGCCAGGTC	138	2.01	Alard et al. (2009)
<i>MT2A</i>	NM_005953.3	F: AAAGGGGCGTCGGACAAGT R: TAGCAAACGGTCACGGTCAG	126	1.88	Song yFreedman (2005)
<i>CLDN1</i>	NM_021101.4	F: CCGGCGACAACATCGTGAC R: CGGGTTGCTTGCAATGTGC	136	2.07	Kaarteenaho et al. (2010)
<i>OCN</i>	NM_002538.2	F: AAGAGTTGACAGTCCCATGGCATAAC R: ATCCACAGGCGAAGTTAATGGAAG	133	1.93	Cui et al. (2010)
<i>MUC5AC</i>	NM_001304359.2	F: CCTTCGACGGACAGAGCTAC R: TCTCGGTGACAACACGAAAG	111	1.97	Ohuchida et al. (2006)

5. Evaluación *in vivo* del papel protector de las estrategias frente a la toxicidad intestinal de As(III)

Se seleccionaron las cepas BAL viables para los estudios *in vivo*, y sólo se llevaron a cabo dosificaciones con la forma trivalente de As, por ser la que había presentado más toxicidad en los ensayos con animales.

5.1. Animales y tratamientos

Los estudios *in vivo* para determinar la eficacia de las estrategias se realizaron empleando ratones hembra Balb/c de 6 semanas con un peso en el momento de la adquisición entre 15 y 19 g. Los protocolos de experimentación siguieron los mismos procedimientos de redacción y aprobación que los descritos en el apartado 2.

Los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de ocho animales. Un grupo de ratones no recibió ningún tratamiento (control negativo), otro recibió únicamente As(III) (30 mg/L) a través del agua de bebida (control positivo) y los dos grupos restantes recibieron As(III) a través del agua y una dosis diaria (100 µL) de LE1 o BL23 viables (10^9 UFC, unidades formadoras de colonias) disuelta en NaCl 0.9% por sonda gástrica. Los animales pertenecientes a los controles negativo y positivo fueron también dosificados por sonda con 100 µL de NaCl 0.9%. El agua de bebida se cambió cada 3 o 4 días por disoluciones de As(III) recién preparadas. Durante todo el experimento se controló el peso, el consumo de agua y alimentos, el aspecto físico y el comportamiento de los animales. Después de dos meses de exposición, los ratones fueron sacrificados por inhalación de isoflurano y dislocación cervical. Inmediatamente se recuperó el intestino, hígado y riñones, que se lavaron abundantemente con NaCl al 0.9%, se separaron en varios fragmentos y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis. También se obtuvo el suero tal y como se describe en el apartado 2.

5.2. Evaluación del estrés oxidativo y del estado inflamatorio del tejido intestinal

El estrés oxidativo a nivel intestinal se evaluó mediante la determinación de los contenidos de ROS/RNS, el nivel de peroxidación lipídica y las concentraciones de GSH en los homogeneizados de tejido del intestino delgado y grueso siguiendo los protocolos descritos en el apartado 3.2.

El estado inflamatorio se analizó determinando el contenido tisular de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β utilizando kits de ELISA específicos según se describe en el apartado 3.1.1 y la lactoferrina fecal evaluada según el protocolo detallado en el apartado 3.1.2. Además, se analizó la activación de la ruta de señalización p38 MAPK en los homogeneizados de tejido colónico, tal y como se describe en la sección 3.5.

5.3. Evaluación estructural y funcional de la mucosa intestinal

La evaluación estructural de la mucosa se realizó mediante examen histológico (apartado 3.6) y analizando la expresión génica de las proteínas de las uniones intercelulares (*Cldn3* y *Ocln*) por RT-qPCR utilizando los oligonucleótidos detallados en la tabla 3 y aplicando los protocolos descritos en el apartado 3.4. Además, se analizó el contenido proteico de MUC2 en el tejido colónico empleando un kit de ELISA específico (Cusabio).

La funcionalidad de la mucosa intestinal se evaluó analizando la permeabilidad paracelular a través de la medida del contenido fecal de albúmina (apartado 3.8). Asimismo, se determinó el efecto de las estrategias sobre el marcador de endotoxemia LBP (apartado 3.8).

5.4. Metabolismo de la microbiota intestinal

Para determinar el efecto del As(III) y la coadministración con ambas cepas de BAL sobre la microbiota intestinal se evaluó el contenido de AGCC, en concreto, de ácido acético, propiónico y butírico, en las heces de animales control y animales tratados con As(III), con o sin la coadministración de BAL. Los protocolos de extracción, derivatización y detección de AGCC se han descrito previamente en el apartado 3.7.

5.5. Evaluación de los mecanismos de protección de las BAL frente a la toxicidad del As inorgánico

Dentro de los posibles mecanismos implicados en la protección frente al tóxico en este estudio se evaluaron dos posibilidades: a) la reducción de la acumulación tisular y b) la activación de las rutas antiinflamatorias y antioxidantes Nrf2 (factor nuclear eritroide 2) e IL-10.

La acumulación del As en el intestino delgado y grueso, en el hígado y los riñones se analizó tal y como se detalla en el apartado 3.9. Para determinar la activación de Nrf2, se evaluó la expresión génica de varias proteínas implicadas en esta ruta [*Nrf2* y *Ho1*(hemo oxigenasa 1)] y también de algunos componentes de la ruta de señalización de IL-10, que puede activarse por Nrf2 [*Il10*, *Il10r2* (subunidad 2 del receptor de IL10) y *Socs3* (supresor de la señalización de citoquinas 3)]. Los protocolos para la extracción de ARN, síntesis de ADNc y qPCR se han descrito previamente en la sección 3.4. Los oligonucleótidos empleados se detallan en la tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para la evaluación *in vivo* de la eficacia de las estrategias frente a la toxicidad de As(III).

Gen	GenBank ID	Secuencia 5'-3'	Tamaño amplicón (bp)	Eficacia	Referencia
<i>Socs3</i>	NM_021283.2	F: TCCAGTAGAATCCGCTCTCTCT R: ATGGTCACCCACAGCAAGTTT	145	1.92	Fukuta et al. (2021)
<i>Il10</i>	NM_010548.2	F: GCTCTTACTGACTGGCATGAG R: CGCAGCTCTAGGAGCATGTG	105	1.96	Souza et al. (2007)
<i>Il10r2</i>	NM_001405058.1	F: GGACGTCTCTTCCACAGCAC R: CTGCTTGCTGCCTTCAGACT	146	2.04	Spandidos et al. (2009)
<i>Nrf2</i>	NM_010902.5	F: CAGCATAGAGCAGGACATGGAG R: GAACAGCGGTAGTATCAGCCAG	107	2.10	Zhang yGao (2022)
<i>Ho1</i>	NM_010442.2	F: AGGTACACATCCAAGCCGAGA R: CATCACCAGCTTAAAGCCTTCT	86	2.02	Ngo et al. (2017)

6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se empleó el test t-student o el análisis de la varianza (ANOVA) de un solo factor con comparaciones múltiples post hoc mediante la prueba Fisher HSD, cuando se cumplían los requisitos de normalidad (test Shapiro-Wilk) y de homogeneidad de varianzas entre todos los grupos (test de Brown-Forsyth). Si no se cumplía alguno de los requisitos anteriores, los datos se analizaron empleando la prueba U de Mann-Whitney o la de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples post hoc mediante el test Dunn. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$. La variabilidad global de los parámetros toxicológicos en el capítulo 4 se evaluó mediante el análisis de componentes principales (PCA). El análisis estadístico se realizó empleando el software SigmaPlot 14.5 (Systat Software Inc) o el XLSTAT (AddinSoft). Los mapas de intensidad de las correlaciones entre variables se realizaron con el software R (versión 4.1.1), utilizando varios paquetes: Hmisc, ggplot2 y purrr.

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

Capítulo 1

Evaluación *in vivo* de la toxicidad intestinal generada por una exposición crónica a arsenito

La presencia del As(III) en el agua y los alimentos no ha sido ampliamente documentada debido a la dificultad de la extracción de esta forma arsenical sin modificar su estado de oxidación. Los escasos estudios al respecto muestran, que dependiendo de las condiciones fisicoquímicas, puede representar un porcentaje mayor o menor del As inorgánico presente en el agua de bebida (Sorg et al. 2014) y que se encuentra en algunos tipos de alimentos (Huang et al. 2012). Estos datos sugieren que su presencia en la dieta es menor que la del As(V), pero su grado de toxicidad es mayor, de ahí que la mayoría de estudios de toxicidad del As inorgánico hagan referencia a esta forma arsenical.

Los estudios *in vivo* sobre el efecto del As(III) a nivel intestinal se han incrementado en los últimos años; sin embargo, se han centrado principalmente en evaluar los cambios en la microbiota intestinal (introducción, apartado 5.1). Únicamente el trabajo de Chiocchetti et al. (2019b) muestra que exposiciones subcrónicas (2 meses) a concentraciones ≥ 50 mg/L en el agua de bebida pueden afectar la estructura del epitelio intestinal y reducir su función barrera. Asimismo, se desconocen los mecanismos implicados en estos desórdenes intestinales y si estos pueden asociarse con afecciones a nivel sistémico.

En el presente trabajo se han evaluado los efectos adversos generados por exposiciones crónicas (6 meses) a concentraciones de 15 y 30 mg/L de As(III) a través del agua de bebida sobre el intestino de ratones, teniendo en cuenta los diferentes componentes que intervienen en el mantenimiento de la barrera intestinal (microbiota y sus metabolitos, células epiteliales y su secretoma y uniones intercelulares). Adicionalmente se han dilucidado algunos de los mecanismos de toxicidad implicados en estos efectos adversos y se ha analizado su posible relación con marcadores de toxicidad sistémica. Los resultados han evidenciado un efecto tóxico a distintos niveles con alteraciones estructurales y funcionales de la barrera intestinal debidas a la instauración de un proceso inflamatorio y de estrés. Esta respuesta está propiciada por la activación de una serie de rutas de señalización que posiblemente amplifican el fenómeno debido a que el estímulo, la exposición oral a As inorgánico, no cesa en el tiempo.

Asimismo, se ha observado una relación de esta disrupción con ciertos marcadores de endotoxemia.

1. RESULTADOS

1.1. Estado general de los animales durante el tratamiento con As(III)

Tres animales, uno de cada grupo, fueron prematuramente sacrificados debido a la formación de abscesos y/o a una pérdida de peso corporal superior al 20%. El tratamiento con As(III) no influyó en la ganancia de peso o en el consumo de pienso. Sin embargo, se observó un menor consumo de agua en los ratones tratados con la concentración más alta de As(III) (reducciones del 6-27% en relación a los animales no tratados). Estudios previos ya habían reportado esta reducción en el consumo de agua en ratones expuestos al metaloide (Ahlborn et al. 2009).

Tampoco se observaron cambios en el estado de salud ni en el comportamiento de los ratones durante el experimento. Las heces de los animales fueron similares en frecuencia y consistencia en todos los grupos; sin embargo, se observó un mayor número de positivos en los análisis de sangre oculta de los animales tratados con As(III). En la semana 20, se detectó un ratón positivo en el grupo control y 3 animales en cada uno de los grupos tratados con As(III) (Tabla 7). En la semana 24, ningún animal dio positivo en el grupo control, mientras que 4 y 7 animales fueron positivos en los grupos de 15 mg/L y 30 mg/L respectivamente (Tabla 7). Estos datos constituyen un primer indicio de un efecto adverso del As(III) sobre el epitelio intestinal.

Tabla 7. Sangre oculta en heces de animales de control y tratados con As(III) en las semanas 20 y 24 de tratamiento.

Tratamiento	Animal	Semana 20	Semana 24
Control	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
	5	+	-
	6	-	-
	7	-	-
	8	-	-
15 mg/L	1	-	-
	2	+	-
	3	-	+
	4	-	-
	5	+	+
	6	+	+
	7	-	+
	8	-	-
30 mg/L	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+
	4	-	+
	5	-	-
	6	+	+
	7	+	+
	8	+	+

1.2. Respuesta prooxidante causada por la exposición crónica a As(III)

Los datos de oxidación de la H₂DCF-DA (Figura 11) mostraron un aumento estadísticamente significativo de los niveles de ROS/RNS en ambas porciones del intestino, siendo mayores los incrementos observados en el intestino delgado (15 mg/L, 76%; 30 mg/L, 50%) que en el grueso (15 mg/L, 41%; 30 mg/L, 43%).

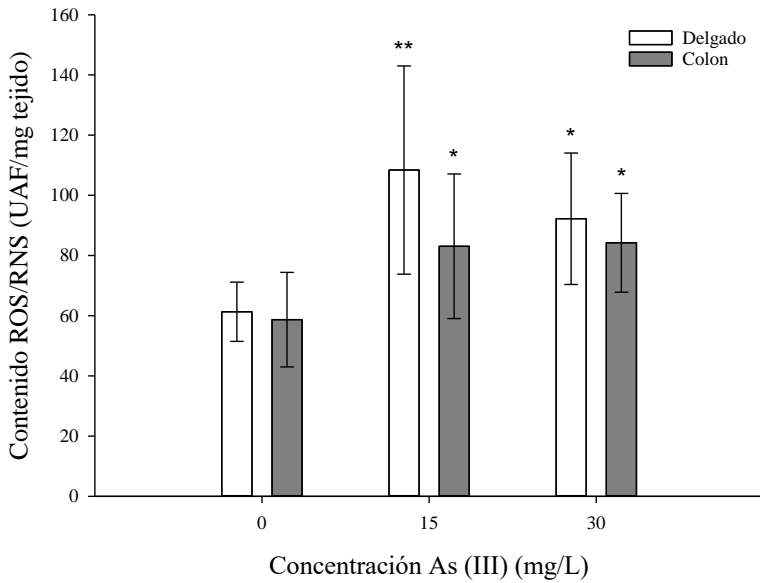


Figura 11. Contenidos de ROS/RNS medidos por oxidación de la H₂DCF-DA en animales control y animales tratados con As(III). Valores expresados como AUF (unidades arbitrarias de fluorescencia)/mg de tejido (media ± SD, n=8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales no tratados (**, $p < 0.001$; *, $0.001 \leq p < 0.05$).

El establecimiento de una situación de estrés oxidativo se confirmó con los datos de peroxidación lipídica obtenidos con el TBARS (Figura 12). En ambas porciones de tejido se evidenció un aumento de los peróxidos lipídicos en comparación con los animales no tratados, aunque las diferencias fueron estadísticamente significativas sólo en el intestino grueso (15 mg/L, 51%; 30 mg/L, 49%).

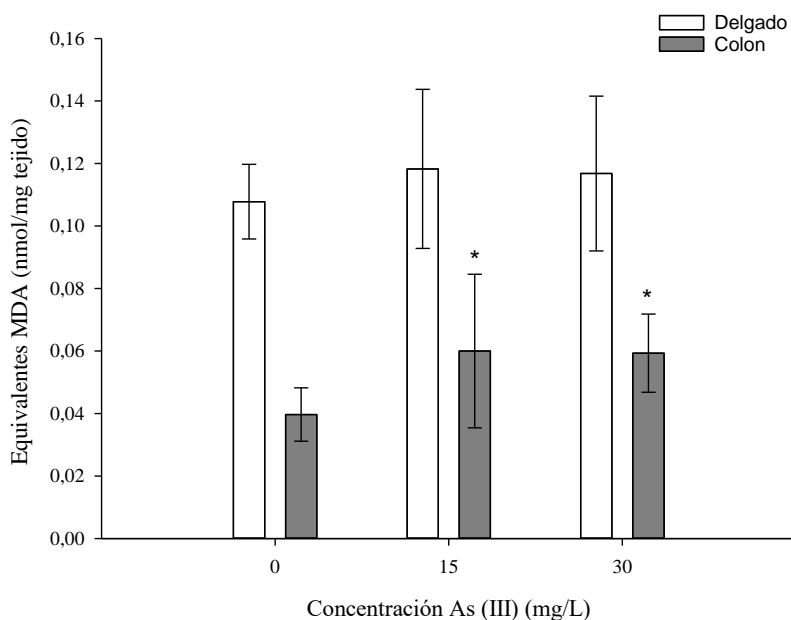


Figura 12. Concentración de equivalentes MDA (malondialdehído) en animales control y animales tratados con As(III). Valores expresados como nmol/mg tejido (media \pm SD, n=8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales no tratados ($p < 0.05$).

La medición de los niveles de GSH también evidenció una respuesta prooxidante como consecuencia de la exposición crónica a As(III) (Figura 13). La concentración de este antioxidante endógeno se redujo en ambas secciones intestinales siendo los efectos observados nuevamente mayores en el intestino delgado (15 mg/L, 24%; 30 mg/L, 34%) que en el intestino grueso (15 mg/L, 19%; 30 mg/L, 13%).

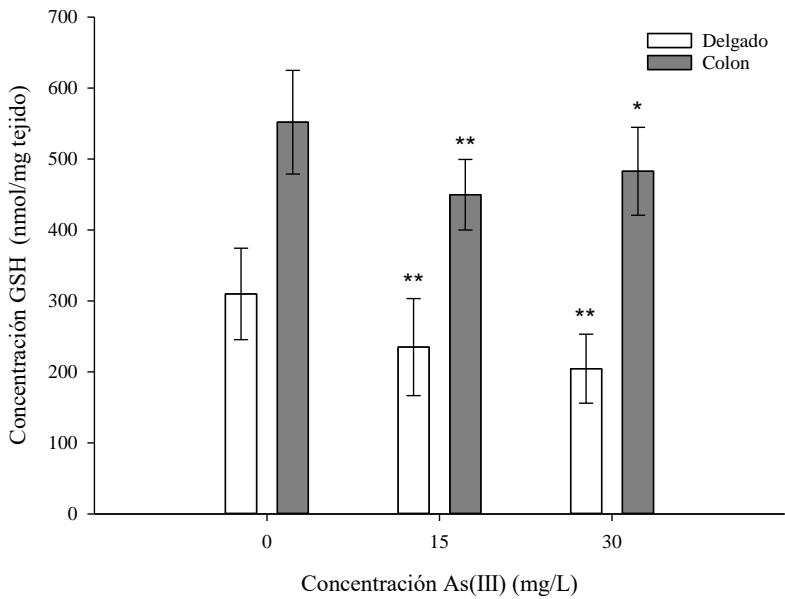


Figura 13. Concentración de GSH en animales control y animales tratados con As(III). Valores expresados como nmol/mg tejido (media \pm SD, n=8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales no tratados (**, $p < 0.001$; *, $0.001 \leq p < 0.05$).

1.3. Respuesta inflamatoria generada por la exposición crónica a As(III)

1.3.1. Niveles de citoquinas proinflamatorias en el tejido intestinal

Los niveles de citoquinas en muestras de intestino delgado no mostraron diferencias entre tratamientos (datos no mostrados). Las figuras 14 y 15 muestran la concentración de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-2 en el intestino grueso de animales al final de la exposición a As(III). Se observó un aumento general de la respuesta inflamatoria, con incrementos estadísticamente significativos de las 4 citoquinas analizadas. La citoquina IL-1 β fue la que experimentó un mayor incremento (15 mg/L, 201%; 30 mg/L, 101%; Figura 14), seguida de la IL-2 (15 mg/L, 166%; 30 mg/L, 97%; Figura 15) y la IL-6 (15 mg/L,

95 %; 30 mg/L, 67 %; Figura 15). Los incrementos en los niveles de TNF- α fueron solo significativos a la concentración de 15 mg/L (74%, Figura 14). En todos los casos se observó un efecto hormético, un fenómeno dosis-respuesta bifásico caracterizado por una estimulación a dosis bajas y una inhibición a dosis altas. Este tipo de respuesta ya se ha observado previamente en exposiciones a As inorgánico (Chiocchetti et al. 2019b).

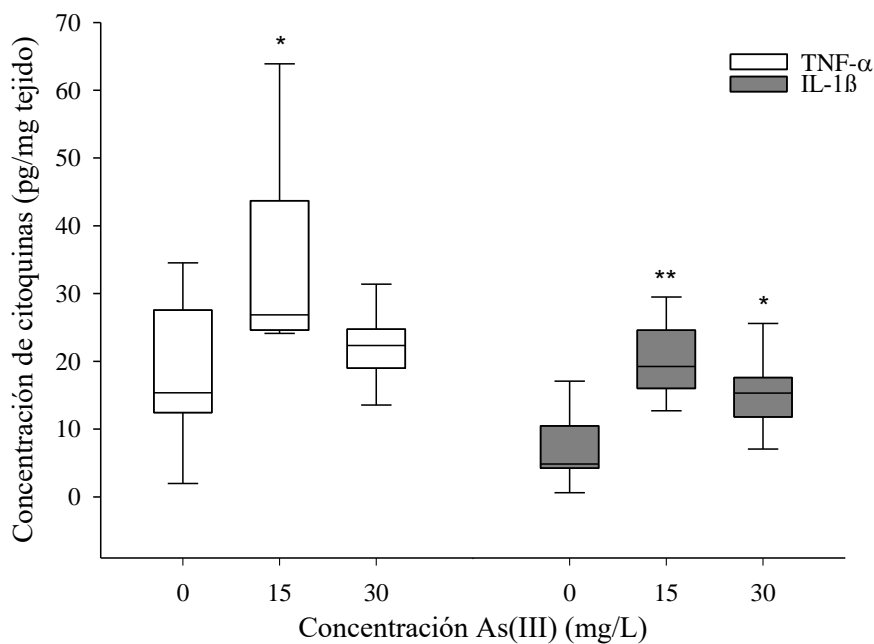


Figura 14. Concentración de TNF- α e IL-1 β en colon de animales control y animales tratados con As(III). Valores expresados como pg/mg tejido (media \pm SD, n=8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales no tratados (**, $p < 0.001$; *, $0.001 \leq p < 0.05$).

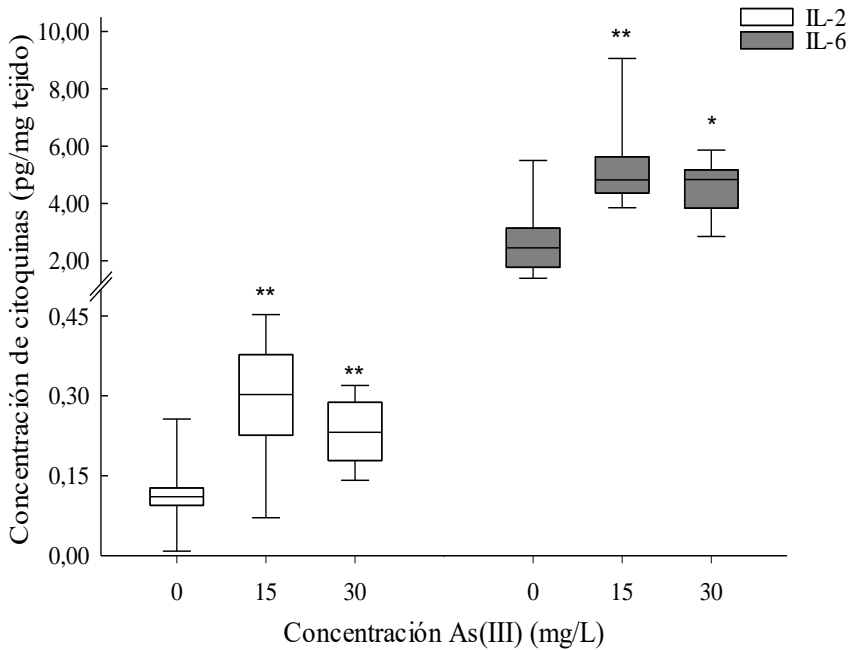


Figura 15. Concentración de IL-2 e IL-6 en colon de animales control y animales tratados con As(III). Valores expresados como pg/mg tejido (media \pm SD, n=8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales no tratados (**, $p < 0.001$; *, $0.001 \leq p < 0.05$).

1.3.2. Infiltración de neutrófilos en la mucosa intestinal

Estudios previos han mostrado que el reclutamiento de neutrófilos activados en los sitios de inflamación dirige la progresión de los procesos inflamatorios crónicos a nivel intestinal (Fournier y Parkos 2012). En este estudio, se ha evaluado esta posible migración analizando la actividad MPO intestinal y la concentración de lactoferrina fecal.

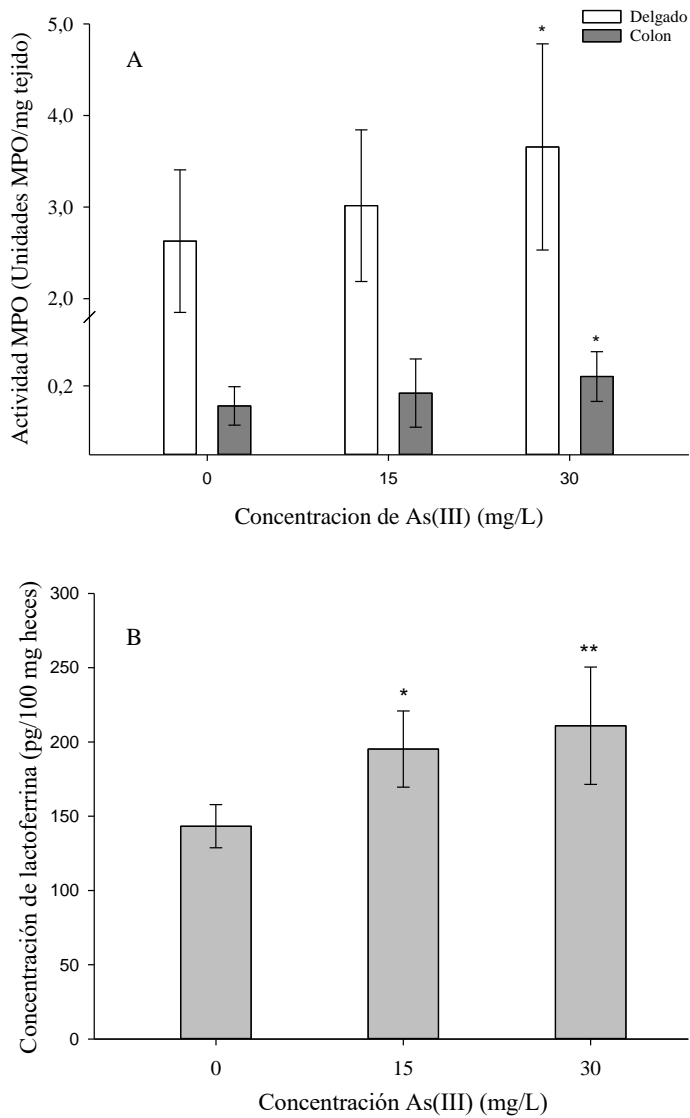


Figura 16. (A) Actividad MPO (unidades MPO/mg tejido) y (B) concentración fecal de lactoferrina (pg/100 mg de heces) en animales control y animales tratados con As(III). Valores expresados como media \pm SD (n = 8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales no tratados ($p < 0.05$).

La actividad MPO, enzima sintetizada y secretada por los neutrófilos, se utiliza a menudo como marcador de leucocitosis polimorfonuclear en condiciones de inflamación (Faith et al. 2008). Los datos obtenidos muestran un aumento de esta actividad en los animales tratados con 30 mg/L de As(III) (delgado: 39%; grueso: 56%, Figura 16A). Adicionalmente, se analizó la concentración de lactoferrina fecal, una proteína que aparece en las heces cuando los neutrófilos activados se infiltran en la mucosa (Derikx et al. 2010; Lundberg et al. 2005). Los datos obtenidos (Figura 16B) muestran un aumento de esta proteína en los ratones expuestos a ambas concentraciones de As(III) (15 mg/: 23%; 30 mg/L: 29%).

Además, el examen histológico de secciones transversales del intestino grueso, realizado en 3 animales de cada grupo, evidenció infiltrados de linfocitos, algunos de ellos de gran tamaño, en ratones tratados con ambas concentraciones de As(III) (Figuras 17B y 17C), sin que se evidenciara ningún infiltrado en los animales control (Figura 17A), lo que corroboró el proceso de inflamación intestinal.

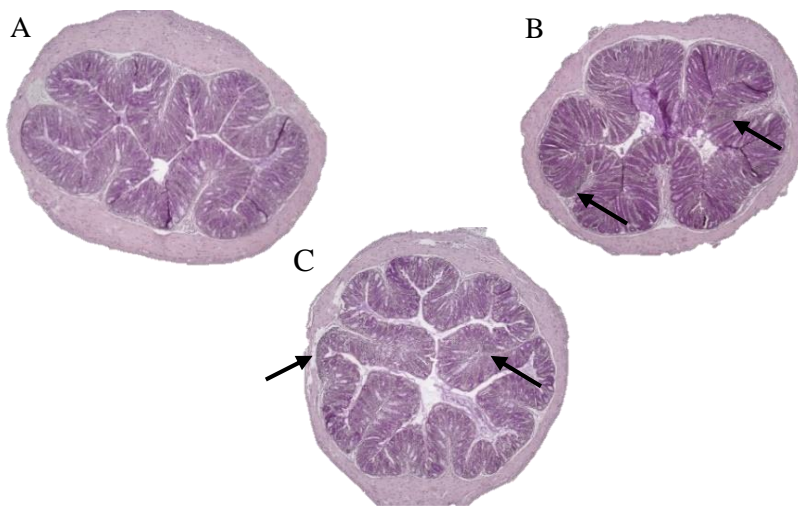


Figura 17. Cortes transversales de tejido colónico teñidos con PAS/hematoxilina, obtenidos de un animal control (A) y de animales tratados con 15 mg/L (B) y 30 mg/L (C) de As(III). La infiltración de neutrófilos se indica mediante flechas. Ampliación original $\times 4$.

1.4. Participación de diversas rutas de señalización en la respuesta proinflamatoria/prooxidante

En este estudio se evaluaron diferentes rutas de señalización para determinar su papel en la respuesta intestinal al tóxico. En concreto, se analizó la activación de las rutas p38 MAPK, JNK (quinasa c-Jun N-terminal) y NF- κ B, está última mediante la evaluación de la fosforilación de la quinasa IKK α/β , proceso necesario para su translocación al núcleo. Asimismo, se examinó la posible activación del nucleosoma Nrlp3 (familia NLR conteniendo dominio pirina 3) como consecuencia de la activación de la ruta NF- κ B (Figura 18).

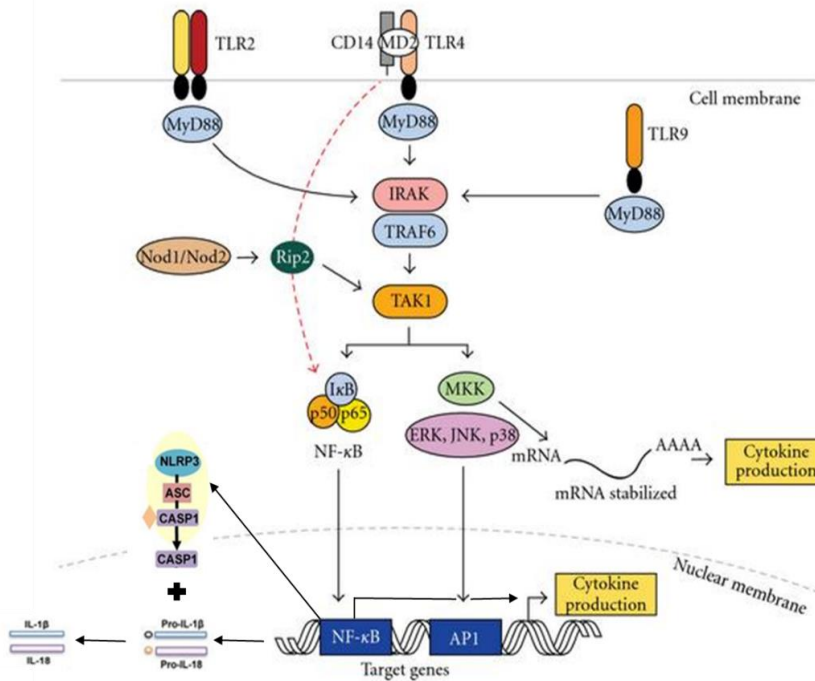


Figura 18. Translocación de las quinasas NF- κ B y MAPK activadas al núcleo y su unión a sus motivos (NF- κ B, AP-1) en el promotor de los genes diana, con el consiguiente aumento de la respuesta inflamatoria (Li et al. 2012).

La figura 19 muestra los datos de abundancia de las formas activadas de estas proteínas en tejido colónico. El tratamiento con ambas concentraciones de As(III) generó un aumento de las formas fosforiladas de estas quinasas (fosfo-p38 MAPK: 63-74%, fosfo-SAPK/JNK: 87-178%, fosfo-IKK α/β : 62%) indicando su activación por tratamientos con As(III).

Además, se evaluó la expresión relativa del gen *Nlrp3* para evaluar si el inflammasoma NLRP3, activado por la ruta NF- κ B (Figura 18), que promueve la escisión proteolítica, la maduración y la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-1 β (Bauernfeind et al. 2009), también estaba involucrado en la respuesta al metaloide. Los datos obtenidos (Tabla 8) mostraron un aumento significativo de la expresión de *Nlrp3* en muestras de colon de ratones expuestos a 30 mg/L de As(III).

1.5. Efecto del tratamiento con As(III) sobre la estructura epitelial

En la tabla 8 se muestra la expresión relativa de algunos genes relacionados con la estructura y regeneración intestinal en animales tratados con As(III) respecto al grupo no tratado en intestino delgado y grueso. Estos datos constataron el deterioro de la barrera intestinal, especialmente en el colon. Cabe destacar la regulación a la baja de la principal mucina de la capa mucosa colónica *Muc2* y de los genes que codifican las proteínas de las uniones intercelulares *Cldn1*, *Cldn3* y *Ocln*. También fue notable la regulación a la baja de los genes que codifican las proteínas *Reg3b* y *Reg3g* derivadas de los islotes regeneradores, que participan en el proceso regenerativo del epitelio intestinal (Qu et al. 2021).

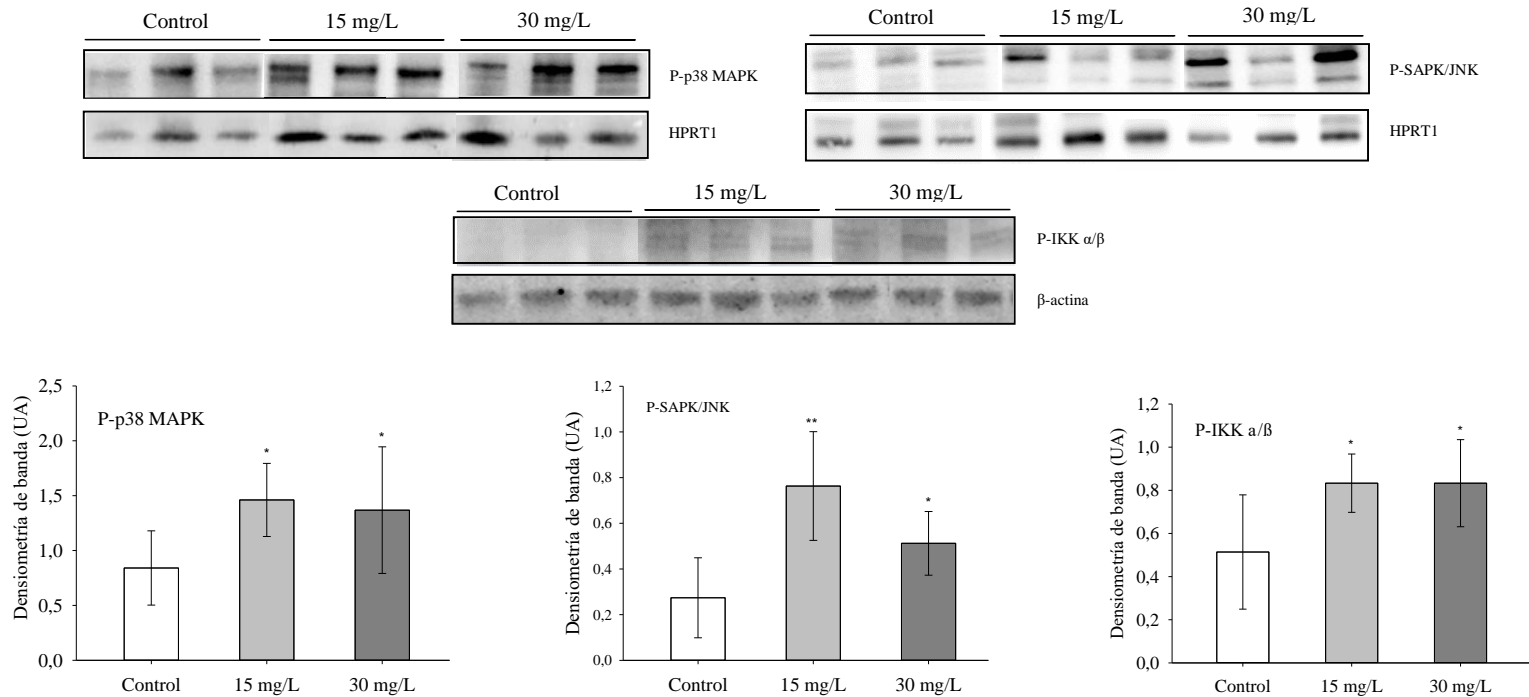


Figura 19. Activación de vías de señalización en colon por exposición a As(III). (A) Western blot de fosfo-p38, fosfo-SAPK/JNK y fosfo-IKK α/β . (B) Niveles de formas fosforiladas cuantificados por densitometría, normalizados y expresados como unidades estándar de densitometría (UA, media \pm SD, n=8). Los asteriscos indican aumentos estadísticamente significativos con respecto a los controles (**, $p < 0.001$; *, $0.001 \leq p < 0.05$).

Tabla 8. Expresión génica relativa en animales tratados con As(III) respecto a los animales control. Valores expresados como cambios de expresión (media \pm SE, n=8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$). En color azul aparecen las regulaciones a la baja estadísticamente significativas y en rojo las sobreexpresiones. nd: no detectado.

Porción intestinal	Gen	15 mg/L As(III)	30 mg/L As(III)
Intestino delgado	<i>Nlrp3</i>	nd	nd
	<i>Reg3b</i>	nd	nd
	<i>Reg3g</i>	0.58 \pm 0.26	0.46 \pm 0.17*
	<i>Muc2</i>	0.68 \pm 0.28	0.66 \pm 0.25
	<i>Cldn3</i>	0.47 \pm 0.20*	0.94 \pm 0.28
	<i>Ocln</i>	0.19 \pm 0.09*	0.33 \pm 0.16*
Intestino grueso	<i>Nlrp3</i>	1.38 \pm 0.16	1.85 \pm 0.33*
	<i>Reg3b</i>	0.32 \pm 0.16*	0.006 \pm 0.002*
	<i>Reg3g</i>	0.26 \pm 0.10*	0.18 \pm 0.06*
	<i>Muc2</i>	0.33 \pm 0.10*	0.49 \pm 0.17*
	<i>Cldn1</i>	0.89 \pm 0.26	0.56 \pm 0.17*
	<i>Ocln</i>	0.62 \pm 0.17*	0.22 \pm 0.05*

Para determinar el efecto del As(III) sobre la capa de mucus también se evaluó el contenido proteico de MUC2 en el colon y el número de células mucossecretoras mediante tinción PAS. Los datos de la cuantificación de los niveles de proteína por WB (Figuras 20A y 20B) mostraron una disminución significativa de contenidos de MUC2 en ambas concentraciones (15 mg/L: 63 \pm 24%; 30 mg/L: 89 \pm 12%). El tratamiento con As(III) también produjo una reducción significativa ($p < 0.05$) del número de células caliciformes en las criptas colónicas [células PAS⁺/cripta: control (23 \pm 2); 15 mg/l (18 \pm 3); 30 mg/L (19 \pm 3)] (Figura 20C).

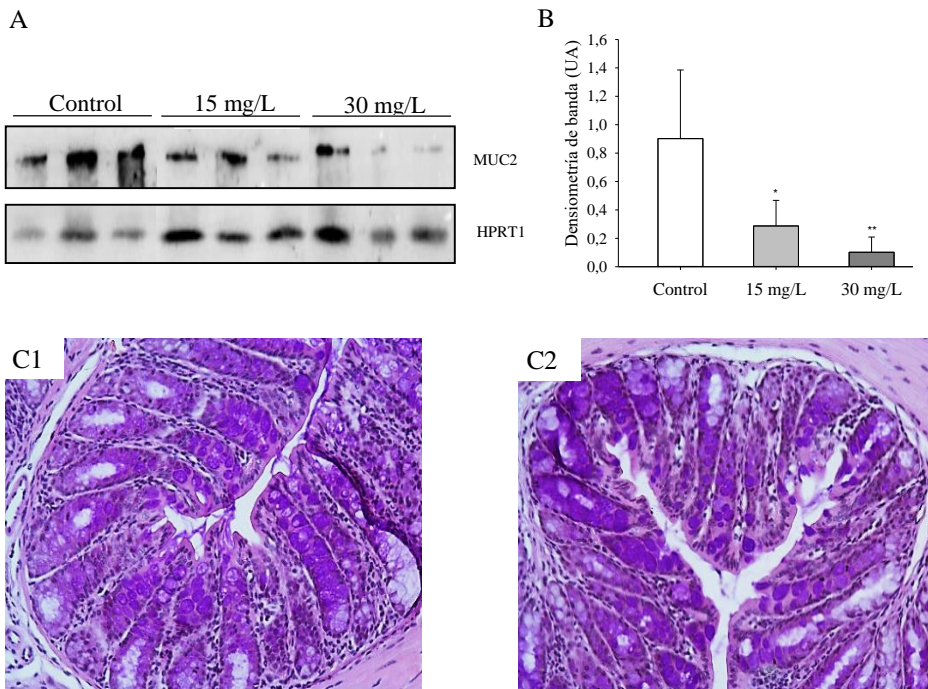


Figura 20. Efecto del As(III) sobre los niveles de proteína MUC2. (A) Western blot de MUC2 en animales control y tratados con As(III). Se utilizó HPRT1 como control de carga para la normalización. Se presentan muestras representativas de tres ratones por grupo. (B) Niveles de MUC2 cuantificados por densitometría, normalizados y expresados como unidades estándar de densitometría (UA, media \pm SD, n = 6). (C) Cortes transversales teñidos con PAS/hematoxilina del intestino grueso de un ratón control (C1) y de un ratón tratado con 30 mg/L de As(III) (C2). Los asteriscos indican aumentos estadísticamente significativos con respecto al control ($p < 0.05$). Ampliación original 16 \times .

1.6. Efecto del tratamiento con As(III) sobre la microbiota intestinal

El efecto de la exposición de As(III) sobre la microbiota intestinal de los ratones fue analizada mediante la secuenciación del gen 16S de muestras fecales recolectadas al final del experimento. El análisis de la composición de la

microbiota a nivel de Phyla mostró que Firmicutes y Bacteroidetes eran los taxones más prevalentes (Figura 21A) como se observa habitualmente en ratones de laboratorio (Yang y Chun 2021). El análisis de la diversidad alfa no arrojó diferencias significativas en la riqueza de especies (Figura 21B). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en los índices de Shannon y Simpson entre los ratones control y los expuestos a ambas concentraciones de As(III) (Figura 21C y 21D). Ambos índices de diversidad tienen en cuenta la riqueza y la uniformidad, lo que sugiere que la exposición a As(III) alteró la abundancia relativa de algunos taxones.

Las estimaciones de diversidad beta indicaron que la exposición a As(III) no alteraba significativamente la composición de la microbiota de los ratones en nuestras condiciones experimentales. Las ordenaciones PCoA y NMDS no mostraron un claro agrupamiento de las muestras en relación con la exposición a As(III) (Figura 22A y 22B). Los análisis PERMANOVA por parejas confirmaron este punto, ya que no se detectaron diferencias significativas entre las muestras de los ratones no tratados y los expuestos a 15 mg/L o 30 mg/L de As(III) (datos no mostrados). El análisis de la homogeneidad de las varianzas no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos, apoyando así la fiabilidad de los análisis de PERMANOVA.

Dado que los análisis de diversidad alfa mostraron diferencias significativas entre las muestras de ratones no tratados y los expuestos a As(III), se llevó a cabo un análisis de abundancia diferencial para identificar los taxones afectados por la exposición a As(III). Usando corncob, se detectaron cuatro ASV con abundancias diferenciales: ASV227 (*Alistipes* sp.) se detectó significativamente menos abundante (estimación -4.587, fdr-p 0.009) en muestras tratadas con 15 mg/L de As(III). En muestras tratadas con 30 mg/L de As(III), ASV84 (*Lactobacillus* sp.) se detectó significativamente menos abundante (estimación -1.943, fdr-p 0.0227), mientras que ASV59 (*Parabacteroides* sp.) y ASV297 (familia Muribaculaceae) se detectaron significativamente más abundantes (estimación 2.297, fdr-p 0.0227 y estimación 2.002, fdr-p 0.0496, respectivamente). Utilizando ANCOM-BC

excluyendo taxones con una proporción de ceros superior a 0.9 y considerando ceros estructurales, se detectaron 188 ASV con diferencias significativas en muestras tratadas con 15 mg/L As(III) y 160 ASV con 30 mg/L As(III) (resultados no mostrados).

Para obtener una visión más sencilla de las tendencias de cambio en la abundancia de taxones, los ASV se agruparon a nivel de orden y se analizaron nuevamente con ANCOM-BC. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la abundancia de Clostridia UCG-14 y Flavobacteriales y una disminución de Mycoplasmatales en ambas concentraciones de As(III) (Figura 22C). Además, también se detectó una pequeña disminución de Micrococcales a 15 mg/L y de Izemoplasmatales a 30 mg/L As(III) además de un aumento de Corynebacteriales (Figura 23D).

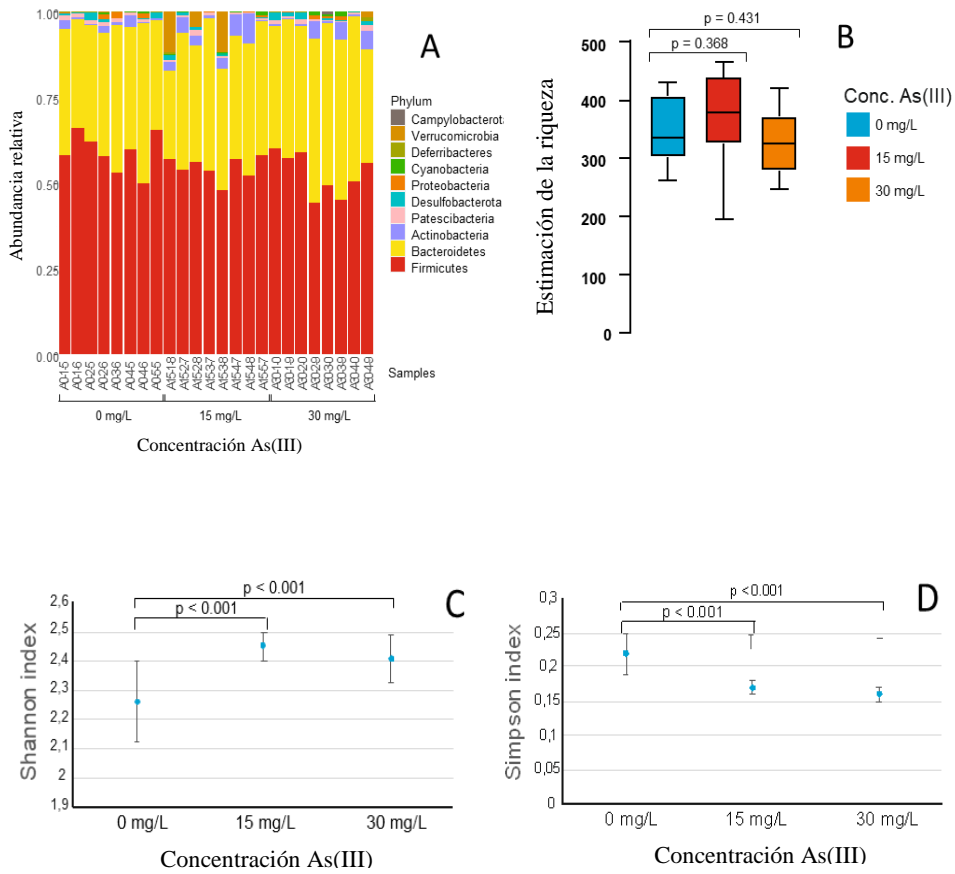


Figura 21. Análisis de la composición de la microbiota en ratones control y expuestos a As(III). (A) Diagrama de barras apiladas mostrando la abundancia relativa de los filos presentes en muestras fecales de ratones control y expuestos a As(III). (B) Estimaciones de la riqueza taxonómica de muestras fecales de ratones. Estimaciones de los índices de Shannon (C) y Simpson (D). Las horquillas indican grupos comparados con valores de p significativos (<0.05).

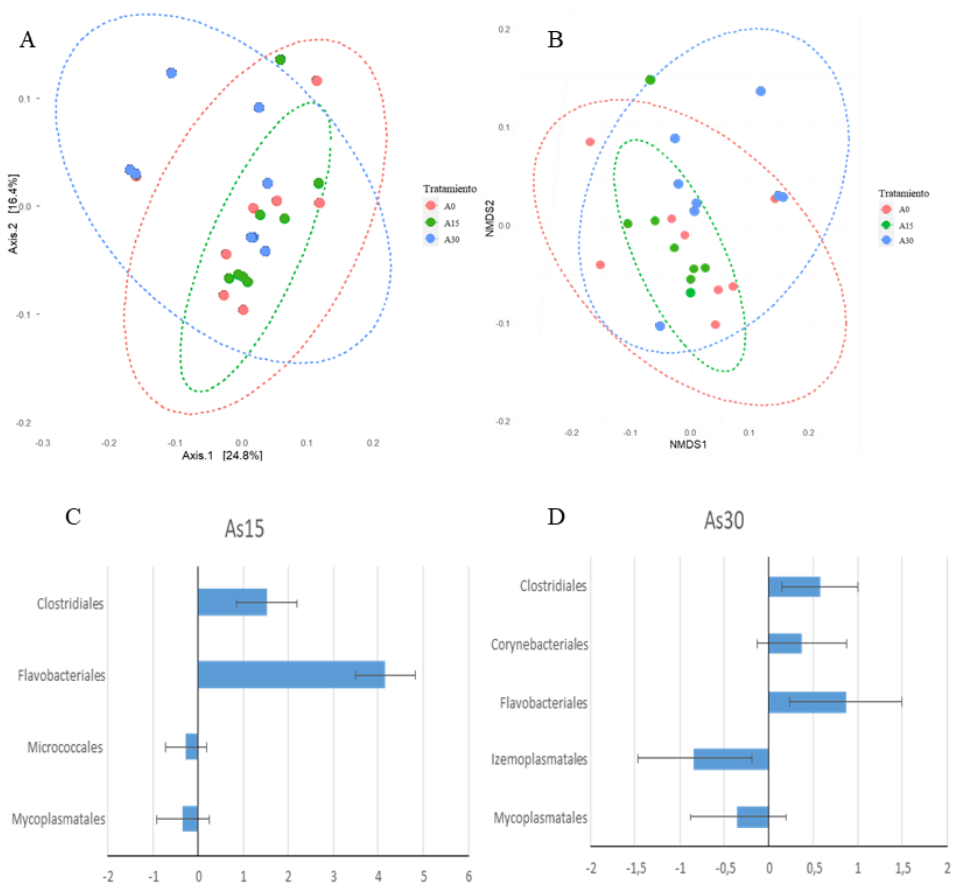


Figura 22. (A) Gráfico de análisis de coordenadas principales (PCoA). Ordenación PCoA de las muestras de microbiota fecal basada en la distancia euclidiana de los recuentos de ASV transformados en relación logarítmica isométrica. (B) Gráfico NMDS. Ordenación por escalado multidimensional no métrico (NMDS) de la microbiota fecal basada en la distancia euclidiana calculada a partir de los recuentos de ASV transformados por la relación logarítmica isométrica. (C y D) Abundancia diferencial a nivel de orden representada por el tamaño del efecto (log fold change) derivado de ANCOM-BC. Las barras de error representan errores estándar. Sólo se representan los órdenes con un valor fdr-p significativo inferior a 0.05.

1.7. Efecto del tratamiento con As(III) sobre los contenidos fecales de AGCC

La figura 23 muestra las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico en animales control y tratados con As(III). En general, los tratamientos con As(III) redujeron los contenidos de estos AGCC, sin cambiar el perfil, ya que en todos los casos el ácido acético fue el ácido más abundante (control: 60%; 15 mg/L, 70%; 30 mg/L, 65%), seguido del ácido butírico (control: 20%; 15 mg/L, 15%; 30 mg/L, 19%) y el propiónico (control: 19%; 15 mg/L, 15%; 30 mg/L, 16%). El ácido butírico fue el AGCC que experimentó una mayor reducción tras los tratamientos con As(III) (15 mg/L, 76%; 30 mg/L, 75%), seguido del ácido propiónico (15 mg/L, 63%; 30 mg/L, 52%) y del ácido acético (15 mg/L, 29%; 30 mg/L, 38%).

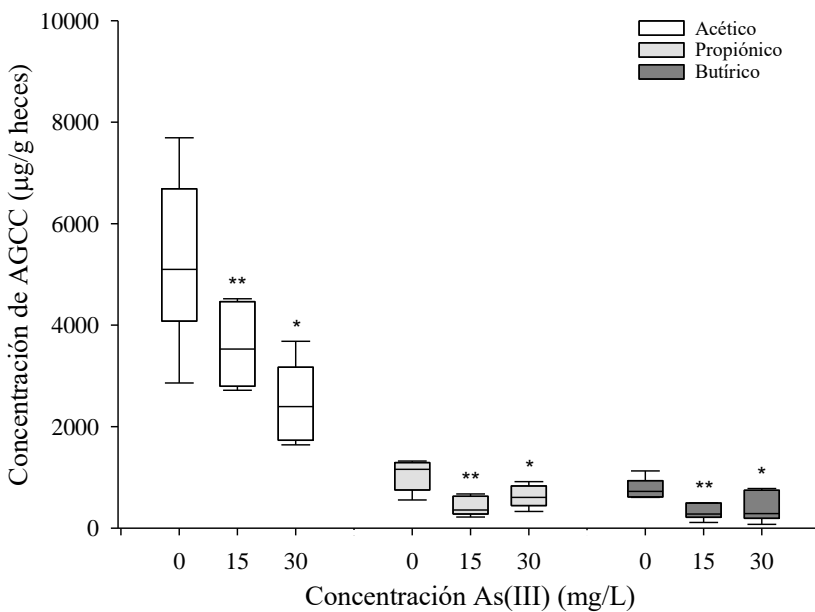


Figura 23. Concentraciones de AGCC en heces de animales control y animales tratados con As(III). Valores expresados como µg de AGCC/g de heces (media ± SD, n=8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales no tratados (**, $p < 0.001$; *, $0.001 \leq p < 0.05$).

1.8. Efecto del tratamiento con As(III) sobre la permeabilidad intestinal y los marcadores de endotoxemia

La cuantificación de albúmina fecal se emplea como marcador de la permeabilidad intestinal (Wang et al. 2015). La albúmina, producida por los hepatocitos, representa aproximadamente el 50% del total de proteínas en la sangre humana. Aproximadamente un 30-40% de esta albúmina permanece en el torrente sanguíneo mientras que el resto se distribuye por el espacio intersticial, donde la concentración es baja. Un aumento de la permeabilidad intestinal aumenta la concentración de albúmina en el espacio intersticial y, por tanto, en las heces (Peters 1985). La figura 24 muestra las concentraciones de albúmina fecal en los tres grupos de animales después de 6 meses de tratamiento. Los datos mostraron incrementos estadísticamente significativos en los animales tratados con As(III) respecto a los no tratados (15 mg/L, 48%; 30 mg/L, 66%).

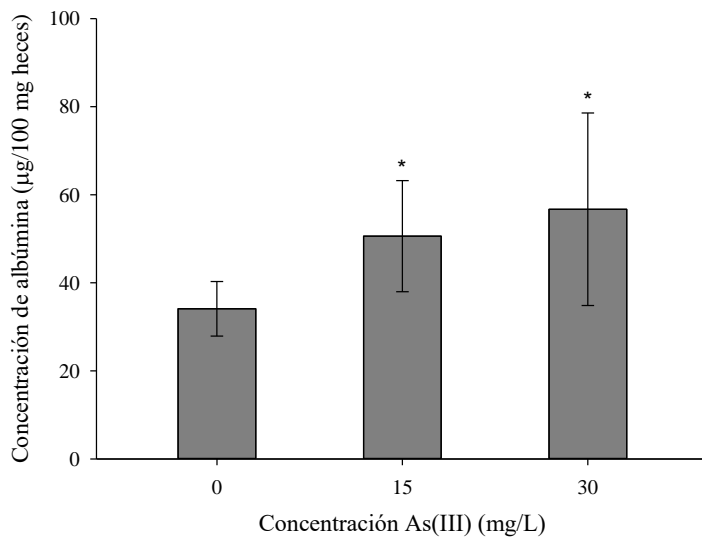


Figura 24. Concentración de albúmina fecal en animales control y tratados con As(III). Valores expresados como $\mu\text{g}/100 \text{ mg heces}$ (media \pm SD, $n=8$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales control ($p<0.05$).

La endotoxemia se evaluó mediante la medición de LBP, IL-1 β y TNF- α en suero. La figura 25A muestra la concentración de LBP en animales control y tratados con As(III). La exposición a arsenito provocó un aumento significativo de los niveles séricos de LBP con respecto a los animales control a la concentración más alta (13-23%). El aumento de la concentración de la LBP plasmática está relacionado con un mayor transporte del lipopolisacárido (LPS) a la circulación sistémica debido a una alteración de la barrera intestinal (Ghosh et al. 2020). Además, el tratamiento con 30 mg/L de As(III) también aumentó el contenido de TNF- α sérico ($77 \pm 38\%$, Figura 25B), lo que podría estar correlacionado por una mayor presencia de LPS circulante. Los niveles séricos de IL-1 β no experimentaron cambios entre tratamientos (datos no mostrados).

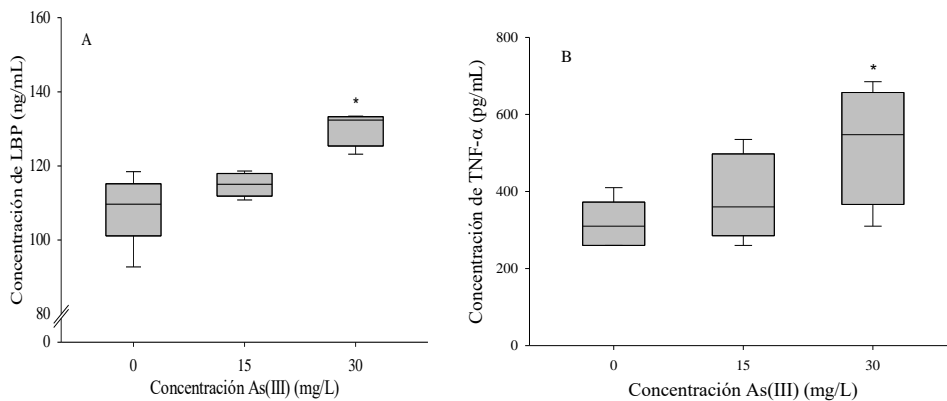


Figura 25. Marcadores séricos de endotoxemia en animales control y animales tratados con As(III). (A) Concentración de LBP (ng/mL) y (B) concentración de TNF- α (pg/mL). Valores expresados como media \pm SD (n=8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales control ($p < 0.05$).

1.9. Efecto del tratamiento con As(III) sobre la diferenciación celular en el intestino.

La figura 26 muestra los eventos moleculares que determinan la diferenciación y la adquisición de un determinado linaje en el intestino. El marcador LGR5 de células madre se reduce a medida que aumenta la diferenciación. La ruta Notch favorece la diferenciación hacia un linaje absortivo, cuyo marcador temprano es el gen HES1. Al mismo tiempo HES1 actúa como represor de MATH1 o ATOH1, que es el marcador temprano del linaje secretor, constituido por las células mucossecretoras (marcadores: MUC2, SPDEF, GFI1), enteroendocrinas (NGN3, NEUROD) y Paneth (GFI1, SPDEF, SOX9).

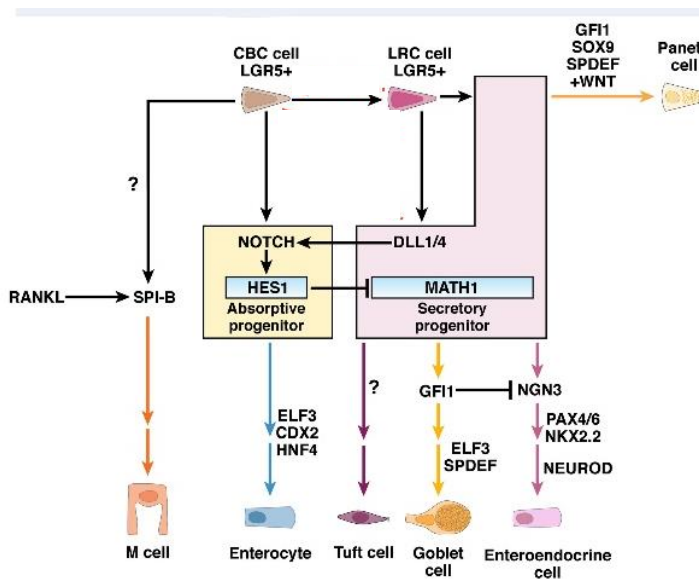


Figura 26. Eventos moleculares que gobiernan la diferenciación hacia los distintos tipos celulares del epitelio intestinal.

La tabla 9 muestra la expresión relativa de genes relacionados con la proliferación y diferenciación de las células madre intestinales en las criptas aisladas de los animales tratados con As(III) y los animales control, y en los organoides procedentes de estas criptas. Los datos mostraron que en el tratamiento

con As(III), la expresión de los marcadores de células madre (*Lgr5*) y proliferación (*Ki67*) estaban aumentados respecto al control. Esto es un indicativo de que hay una cierta hiperproliferación de las células madre. Este fenómeno ya se ha descrito previamente para el As(III) (Tokar et al. 2010). Hay que tener en cuenta que el As(III) está considerado un elemento cancerígeno. Por otro lado, se observó una reducción significativa de *Atoh1*, marcador de linaje secretor. Esto podría explicar el hecho de que los animales expuestos presenten un menor número de células mucosecretoras (Figura 20C).

Tabla 9. Expresión génica relativa de genes relacionados con el proceso de diferenciación en criptas y organoides no diferenciados de animales tratados con As(III) respecto a los animales control. Valores expresados como cambios de expresión (media \pm SE, n=8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$). En color azul aparecen las regulaciones a la baja estadísticamente significativas y en rojo las sobreexpresiones.

Gen	Marcador	Criptas	Organoides
<i>Lgr5</i>	Células madre	2.71 \pm 1.51*	2.05 \pm 0.22*
<i>Ki67</i>	Células en proliferación	2.03 \pm 0.76*	1.89 \pm 0.33*
<i>Hes1</i>	Diferenciación temprana a linaje absortivo	2.28 \pm 1.35*	0.93 \pm 0.14
<i>Atoh1</i>	Diferenciación temprana a linaje secretor	0.36 \pm 0.18*	0.74 \pm 0.13*

La figura 27 muestra los organoides obtenidos de las criptas de los animales control y los tratados con As(III). La aparición de protuberancias (dominio de criptas) se produjo a partir del día 2 en todos los casos. A partir del día 5, ya se evidenció un mayor tamaño de los organoides y un mayor número de dominios de criptas en los animales tratados con As(III). Esto también es un indicativo de que

hay una mayor proliferación de las células madre y las células amplificadoras de tránsito (población indiferenciada en transición entre las células madre y las diferenciadas), en los animales tratados con As(III).

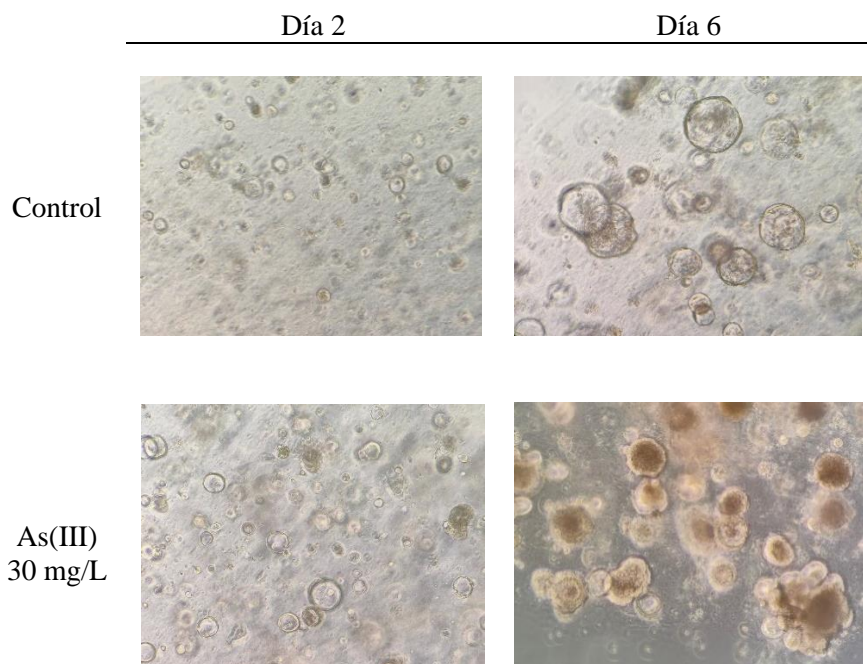


Figura 27. Imágenes de la evolución de las criptas aisladas de ratones control y ratones tratados con As(III). Ampliación $\times 4$.

1.10. Relación entre varios de los parámetros toxicológicos evaluados

La figura 28 muestra un mapa de intensidades de la matriz de correlaciones entre algunos de los marcadores toxicológicos evaluados en este estudio. En general, se evidenció una correlación positiva entre las variables relacionadas con el estrés oxidativo y los marcadores del estado inflamatorio del intestino. Estas variables, a su vez, mostraron una correlación negativa con los niveles de AGCC fecales y los niveles tisulares de GSH, correlacionados positivamente entre ellos. La permeabilidad intestinal (albúmina) y los marcadores de endotoxemia (TNF- α y LBP séricos) mostraron un aumento a medida que aumentaban algunos

marcadores de estrés e inflamación y disminúan los niveles de GSH y AGCC fecales. Todas estas correlaciones muestran en cierta medida el efecto tóxico del As(III) en el entorno intestinal y los posibles mecanismos implicados.

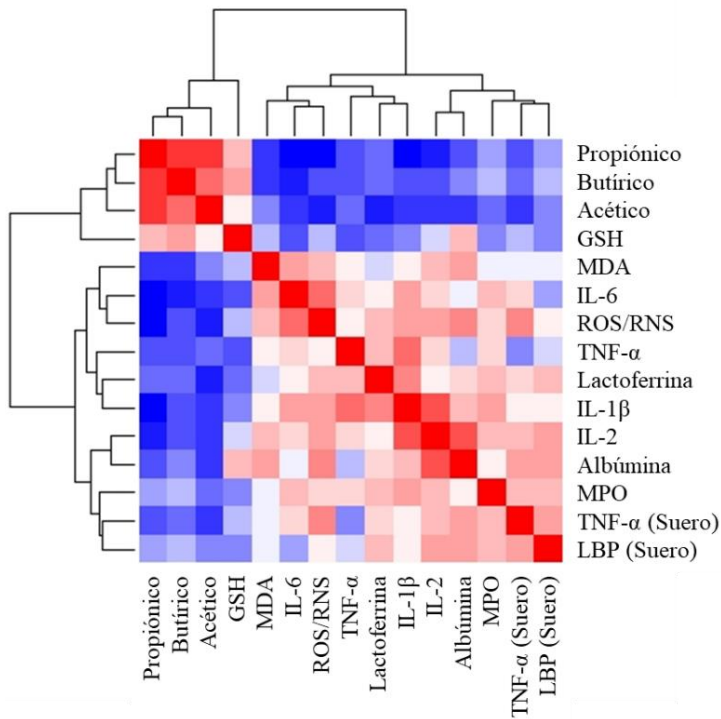


Figura 28. Mapa de intensidades (*heat map*) que representa la matriz de correlaciones entre varios de los parámetros analizados en este estudio. Los cuadrados rojos indican una relación positiva entre dos variables, mientras que los azules indican una relación negativa.

2. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en el presente capítulo muestran que la exposición crónica a As(III) a través del agua de bebida genera una pérdida de la función barrera, lo que implica un aumento de la permeabilidad intestinal (Figura 23), situación que podría favorecer la translocación de microorganismos y sustancias nocivas (antígenos, toxinas o compuestos tóxicos) a través de un epitelio que ha perdido su selectividad de paso. Este aumento de la permeabilidad, si se mantiene en el tiempo, puede generar una respuesta exacerbada del sistema inmunitario de la mucosa, lo que puede conducir a un trastorno crónico a nivel intestinal y contribuir a la aparición de patologías a nivel sistémico.

El aumento de la cantidad de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-2, TNF- α e IL-1 β , Figuras 14 y 15) observado en el colon de los animales tratados con As(III), junto con la presencia de infiltrados leucocitarios en la mucosa colónica (Figura 17), el aumento de la lactoferrina fecal (Figura 16B) y de la actividad MPO tisular (Figura 16A) evidencian un proceso inflamatorio a nivel intestinal. Varios estudios indican que la exposición prolongada al As inorgánico puede evocar una respuesta inflamatoria (Xu et al. 2020), incluso a nivel intestinal (Chiocchetti et al. 2019b). La forma trivalente del As promueve la activación de varias rutas de inflamación, las cuales inducen directamente la expresión de mediadores proinflamatorios. Estudios previos en distintos tipos celulares han demostrado que la exposición al As(III) puede activar las rutas JNK (Liu et al. 2012; Porter et al. 1999), NF- κ B (Felix et al. 2005; Fry et al. 2007), y las isoformas α y β de la p38 MAPK (Giafis et al. 2006; Verma et al. 2002). En el presente estudio también se ha evidenciado la activación de todas estas vías de señalización (Figura 19). El papel de estas vías de señalización en las patologías inflamatorias a nivel intestinal se ha puesto de manifiesto en estudios *in vitro* e *in vivo*. Así, se ha visto que JNK regula la maduración y actividad de las células T y la síntesis de citoquinas proinflamatorias como la IL-2, IL-6 y el TNF- α . Mitsuyama et al. (2006) observaron que la fosforilación de JNK era mayor en los focos de inflamación activa en comparación con el intestino normal de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

De hecho, algunos inhibidores específicos de JNK mostraron un marcado efecto protector en modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal (Roy et al. 2008). La ruta de señalización p38 MAPK también media la inducción de IL-6 y TNF- α (Li et al. 2019). Docena et al. (2010) hallaron niveles más elevados de fosfo-p38 α en la mucosa inflamada de pacientes con EII en comparación con los controles y observaron que algunos fármacos inhibidores selectivos de p38 α reducían significativamente la activación de esta vía y la secreción de citoquinas proinflamatorias. Por lo tanto, la activación de estas dos vías de señalización MAPK está asociada a procesos inflamatorios intestinales crónicos.

La activación de la vía de señalización NF- κ B también está relacionada con patologías intestinales (Neurath et al. 1998). Esta vía puede inducir directamente la síntesis de las citoquinas proinflamatorias IL-2, IL-6 y TNF- α (Blackwell y Christman 1997) o la producción de IL-1 β a través de la regulación del inflamasoma (Figura 18). Estudios recientes han demostrado el papel funcional del inflamasoma NLRP3 en la defensa inmunitaria de las mucosas, la inflamación y la tumorigénesis (Zmora et al. 2017). El proceso de activación del inflamasoma en células en reposo consta de dos etapas bien diferenciadas. La señal 1 o de cebado converge en la activación de NF- κ B y la inducción transcripcional de NLRP3 y pro-IL-1 β y la señal 2 o de activación que finaliza con la secreción de la forma activa de IL-1 β (Latz et al. 2013). Nuestro estudio revela que la exposición crónica a As(III) a través del agua de bebida provoca la activación de NF- κ B (Figura 19), la sobreexpresión de Nlrp3 (Tabla 8) y un aumento significativo de la concentración tisular de IL-1 β (Figura 14) a nivel colónico. Por tanto, el proceso inflamatorio evidenciado en el presente estudio podría ser en parte consecuencia de la activación de la vía NF- κ B que actúa directamente o a través de la inducción del inflamasoma. La participación de NLRP3 en la toxicidad del As(III) se ha puesto de manifiesto previamente (Jia et al. 2020).

Todas las vías de señalización mencionadas previamente se activan a través de la IL-1 β (Kulawik et al. 2017) o TNF- α (Hayden y Ghosh 2014; Sabio y Davis 2014), o a través de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), señales

producidas y liberadas por células o tejidos dañados. En situaciones de daño tisular, como el causado por la exposición crónica al As(III), los DAMPs pueden actuar como una de las principales fuentes activadoras de estas vías de señalización proinflamatorias/prooxidantes. El modo de acción de algunas de estas señales se ha caracterizado con detalle, este es el caso de las ROS (Abais et al. 2015). La generación de ROS, que es un factor crítico en la inmunidad de la mucosa, puede ser un evento esencial para la activación de NF- κ B (Gloire et al. 2006), el cebado transcripcional del inflammasoma NLRP3 (Bauernfeind et al. 2011; Liu et al. 2017) o la activación de las rutas MAPK (Son et al. 2011). En el presente estudio, los animales tratados crónicamente con As(III) presentan una alteración del equilibrio redox en ambas porciones del intestino. Se produce una disminución significativa del contenido tisular de GSH (Figura 13), acompañada de un aumento de ROS/RNS (Figura 11) y de peróxidos lipídicos (Figura 12). Por tanto, la exposición a As(III) produce una serie de señales intracelulares y/o extracelulares que podrían producir la activación de estas vías de señalización, amplificadas a su vez por la producción constante de IL-1 β y TNF- α .

El proceso inflamatorio y prooxidante establecido puede ser responsable de las alteraciones observadas en los distintos componentes de la barrera intestinal en animales tratados con As(III). El análisis de la microbiota fecal no revela diferencias significativas en la riqueza de taxones ni en la composición global de la población microbiana tras la exposición a As(III). Sin embargo, observamos diferencias significativas en la diversidad alfa estimada mediante los índices de Shannon o de Simpson (Figuras 21C y 21D). Ambos índices integran la riqueza y la uniformidad de la diversidad. Nuestro análisis de la abundancia diferencial de taxones a nivel de orden detecta un aumento significativo de los niveles de Clostridia UCG-14 y Flavobacteriales y una disminución de Mycoplasmatales en ambas concentraciones de As(III). Todos los órdenes identificados se encuentran en una proporción baja en el total de lecturas (Clostridia UCG-14 2.25%, Flavobacteriales 0.04%, Mycoplasmatales 0.0008%). Esto explicaría por qué no se detectan diferencias significativas en el análisis de diversidad beta.

Aunque la composición de la microbiota no se modifica significativamente con la exposición crónica a As(III), se observan cambios en el contenido fecal de AGCC, metabolitos de la microbiota intestinal (Figura 23). Esto puede indicar que el metaloide está afectando directamente al metabolismo bacteriano o que hay una mayor asimilación de AGCC por el epitelio. Hay que recordar que los AGCC son una de las principales fuentes de energía para las células epiteliales (Parada Venegas et al. 2019), por tanto, en situaciones de estrés, donde hay un mayor requerimiento energético, la demanda de AGCC puede ser mayor.

Estudios previos demuestran la relación entre estos AGCC y la homeostasis intestinal. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que los AGCC promueven la función de la barrera epitelial mediante la inducción de genes que codifican componentes de las uniones intercelulares. Peng et al. (2009), utilizando monocapas celulares Caco-2 privadas de suero, evidencian que el tratamiento con butirato (2 mmol/L; 24-72 h) mejora la función barrera mediante la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) que regula el ensamblaje de las uniones estrechas. Por tanto, el efecto del As(III) sobre la microbiota y especialmente sobre su metabolismo, puede ser una de las causas de la alteración de la barrera observada en los animales expuestos.

Los datos obtenidos en el presente estudio sugieren que la capa de mucus que constituye la segunda línea de defensa de la barrera intestinal también se ve alterada en animales expuestos a As(III). El tratamiento con el metaloide conduce a una reducción de la expresión génica y proteica de la principal mucina colónica, MUC2 (Figuras 20A y 20B; Tabla 8). Además, el estudio histológico del colon muestra una reducción del número de células productoras de mucus por cripta (Figura 20C). Las células caliciformes se forman a partir de células madre localizadas en las criptas, al igual que el resto de células diferenciadas del intestino. En este estudio se ha evidenciado que la exposición a la forma trivalente del As inorgánico puede afectar a este proceso de diferenciación, ya que se observa sistemáticamente una reducción de las células progenitoras del linaje secretor (Tabla 9). Este resultado adverso de la exposición al As(III) podría explicar en

parte la reducción del contenido de MUC2, aunque también es posible que el As(III) afecte directamente a la síntesis de esta glicoproteína. Burger-van Paassen et al. (2009), mostraron que los AGCC, específicamente el butirato, regulan la expresión de MUC2, y en el presente estudio hemos demostrado que el contenido luminal de AGCC se reduce en animales tratados con As(III).

La reducción de la síntesis de mucina puede conducir a la generación de una capa de mucus defectuosa, cuyos efectos adversos han sido ampliamente descritos e implican la reducción de la interface entre los microorganismos luminales y el epitelio y la lámina propia, y la reducción de la producción de una serie de compuestos inmunomoduladores (Knoop y Newberry 2018). De hecho, algunas enfermedades inflamatorias intestinales cursan con una reducción de la capa de mucus, especialmente en las fases agudas de la enfermedad (Dorofeyev et al. 2013; Gersemann et al. 2009).

La exposición al As(III) también afecta a la propia estructura epitelial. Se observan cambios significativos en la expresión de las proteínas de las uniones estrechas *Cldn1*, *Cldn3* y *Ocln* en ambas porciones del intestino (Tabla 8), lo que era de esperar ya que la mayoría de factores que causan alteraciones de las uniones estrechas están alterados o activados por el tratamiento con As(III) (microbiota y metabolismo, inflamación y estrés oxidativo, defectos de la capa de mucus). Las propiedades de la barrera intestinal dependen en gran medida de las claudinas que se autoensamblan y forman poros paracelulares restrictivos en tamaño y selectivos en carga. En concreto, la CLDN-1 y la CLDN-3 son claudinas de sellado que aumentan la resistencia eléctrica transepitelial, estrechando la barrera paracelular (Lechuga y Ivanov 2017). De hecho, las principales enfermedades inflamatorias intestinales con disfunción de la barrera se asocian con una disminución de la expresión de estas claudinas de sellado (Barmeyer et al. 2015). Todos los factores que se han activado o alterado en la mucosa y la microbiota asociada como consecuencia de la exposición crónica al As(III) han contribuido a la alteración de la barrera y al aumento de su permeabilidad.

Investigaciones recientes han demostrado que la alteración de la barrera intestinal tiene un claro reflejo a nivel sistémico. Los cambios estructurales en el epitelio intestinal permiten la entrada de LPS en el torrente sanguíneo, lo que provoca una endotoxemia metabólica. El LPS activa el receptor TLR4, lo que conduce a la producción de numerosas citoquinas proinflamatorias y, por tanto, a una inflamación sistémica de bajo grado. Esta inflamación es una característica patológica de una serie de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus de tipo 2, la enfermedad del hígado graso no alcohólico, la enfermedad renal crónica y la aterosclerosis (Minihane et al. 2015; Mohammad y Thiemermann 2020). En el presente estudio, hemos evidenciado que los niveles séricos de la proteína de unión al LPS (LBP), un marcador de endotoxemia, están elevados en los animales expuestos a 30 mg/L de As(III) con respecto a los animales no tratados (Figura 25A), así como la concentración sérica de la citoquina proinflamatoria TNF- α (Figura 25B). Estos datos sugieren que el tratamiento crónico con As(III) podría generar una inflamación sistémica de bajo grado debido a la perturbación del entorno intestinal. De hecho, en individuos expuestos a niveles elevados del metaloide a través del agua de bebida se ha observado una cantidad elevada de las citoquinas IL-8 y MCP-1 en la circulación sistémica (Das et al. 2012). Se necesitan estudios más detallados para evaluar la posible relación entre la exposición oral a As(III), los cambios en la permeabilidad intestinal y algunas de las patologías características de las zonas endémicas.

Por último, cabe señalar que la mucosa intestinal de los animales tratados con As(III) muestra una regulación a la baja muy marcada de los genes *Reg3* en ambas porciones del intestino (Tabla 8). Estudios recientes reportan que tanto *Reg3 β* como *Reg3 γ* influyen en la regeneración de las criptas y la protección de las células madre intestinales y las células de Paneth frente a la apoptosis tras un daño tisular (Hanash et al. 2012; Pickert et al. 2009). Por lo tanto, la reducción de la expresión de estos genes con la exposición al As(III) puede comprometer la regeneración del tejido dañado por el metaloide, un fenómeno observado previamente *in vitro* (Chiocchetti et al. 2018b).

3. CONCLUSIONES

En base a los datos obtenidos en el presente estudio, podemos concluir que la exposición crónica a As(III) a través del agua de bebida puede generar un proceso inflamatorio y oxidante que afectaría a varios componentes de la barrera intestinal, desencadenando un aumento de la permeabilidad. Este aumento de la permeabilidad mantenido en el tiempo podría favorecer el desarrollo de algunas de las patologías asociadas al arsenicismo crónico endémico, debido a la generación de una inflamación crónica sistémica de bajo grado. Sería de interés determinar si en zonas endémicas, las poblaciones presentan una mayor incidencia de procesos inflamatorios intestinales, alteraciones de la permeabilidad intestinal o disbiosis, e incluso si presentan niveles elevados de marcadores de endotoxemia en sangre.

El conocimiento de los mecanismos de toxicidad del As inorgánico a nivel intestinal puede facilitar la identificación de estrategias para reducir los efectos tóxicos. Además, si existe una conexión entre los efectos adversos intestinales y sistémicos, el tratamiento de los procesos intestinales (por ejemplo, mediante intervenciones dietéticas dirigidas a restaurar la barrera intestinal) podría ser una estrategia para reducir el impacto del As a otros niveles. Este va a ser el objetivo de los capítulos 3 y 4 de la presente tesis.

Por otro lado, no hay que olvidar que el término As inorgánico engloba el As(III) pero también el As(V). Por tanto, para caracterizar la toxicidad intestinal del As inorgánico es necesario determinar el efecto a nivel intestinal de esta otra especie inorgánica de As, que además es la forma mayoritaria en la dieta. Este será el objetivo del capítulo 2 de esta tesis.

Capítulo 2

Evaluación *in vivo* de la toxicidad intestinal generada por una exposición crónica a arseniato

Los estudios de especiación muestran que la forma prevalente de As inorgánico en la dieta es el As(V). Sin embargo, debido a la mayor toxicidad del As(III), la evaluación toxicológica se ha centrado principalmente en esta forma arsenical. Los estudios *in vivo* sobre la toxicidad intestinal de As(V) se limitan a un trabajo realizado por Wang et al. (2019), en el que se evidencia que la exposición a la forma pentavalente inorgánica altera la microbiota intestinal de las lombrices de tierra. Los estudios realizados *in vitro*, empleando modelos celulares de epitelio intestinal, muestran que ambas formas arsenicales generan una respuesta prooxidante y proinflamatoria, incluso que ambas pueden afectar la permeabilidad, si bien la toxicidad del As(V) se produce a concentraciones más altas y menos relevantes desde el punto de vista de la seguridad alimentaria (introducción, apartado 5.2). Esto muestra la necesidad de realizar más estudios, especialmente en modelos animales, para determinar la toxicidad intestinal del As(V).

El objetivo del presente capítulo ha sido evaluar en modelos animales el efecto de una exposición crónica a As(V) a través del agua de bebida sobre los distintos componentes que forman parte de la barrera intestinal y determinar los posibles mecanismos implicados en la toxicidad intestinal. Los datos han mostrado que la exposición crónica a esta forma arsenical también genera una respuesta prooxidante y que aparecen varios signos de inflamación. Se evidencia asimismo una alteración de la expresión de proteínas constituyentes de las uniones intercelulares y el mucus, y cambios en la composición y el metabolismo de la microbiota intestinal. Todo esto afecta finalmente a la barrera intestinal que muestra un aumento de la permeabilidad e incluso se observan signos de endotoxemia. Por lo tanto, aunque a concentraciones más altas que el As(III), el As(V) también produce una disrupción de la barrera intestinal.

1. RESULTADOS

1.1. Estado general de los animales durante la exposición a As(V)

El tratamiento crónico con As(V) no influyó en el estado físico general ni el comportamiento de los animales respecto a los no tratados, de hecho, en este estudio no fue necesario el sacrificio prematuro de ningún animal. Tampoco afectó al aumento de peso y el consumo de alimento. Sin embargo, supuso una reducción significativa del consumo de agua (30 mg/L: 15-57 % de reducción; 60 mg/L: 30-70 % de reducción), tal y como se había puesto de manifiesto previamente en los animales tratados con As(III) (capítulo 1, apartado 1.1). Las heces de los ratones fueron similares en frecuencia y consistencia en todos los grupos, pero se observaron diferencias en los valores de sangre oculta en heces (Tabla 10). En la semana 19 no se detectó sangre oculta en las heces del grupo control, sin embargo, los animales tratados con As(V) presentaron 15 positivos (15 mg/L: 4, 30 mg/L: 4, 60 mg/L: 7). En la semana 22, sólo un animal presentó sangre oculta en heces en el grupo control, mientras que 4, 6 y 7 animales fueron positivos en los grupos de 15, 30 y 60 mg/L, respectivamente. Estos datos constituyeron el primer indicio de un posible efecto adverso del As(V) a nivel intestinal.

Tabla 10. Sangre oculta en heces de animales control y tratados con As(V) en las semanas 19 y 22 de tratamiento.

Tratamiento	Animal	Semana 19	Semana 22
Control	1	-	-
	2	-	-
	3	-	+
	4	-	-
	5	-	-
	6	-	-
	7	-	-
	8	-	-
	9	-	-
15 mg/L	1	-	-
	2	-	-
	3	-	+
	4	-	-
	5	+	+
	6	+	-
	7	+	+
	8	-	-
	9	+	+
30 mg/L	1	-	-
	2	+	+
	3	-	-
	4	-	+
	5	+	+
	6	-	+
	7	-	-
	8	+	+
	9	+	+
60 mg/L	1	+	+
	2	-	+
	3	+	-
	4	+	+
	5	+	+
	6	+	+
	7	-	+
	8	+	+
	9	+	-

1.2. Respuesta prooxidante generada por la exposición crónica a As(V)

La figura 29 muestra los datos obtenidos en el ensayo de oxidación de la H₂DCF-DA. Los resultados mostraron un aumento estadísticamente significativo de los niveles de ROS/RNS en el intestino delgado en todos los tratamientos con As(V) (15 mg/L, 14%; 30 mg/L, 14%; 60 mg/L, 11%). En el intestino grueso, sin embargo, este aumento sólo se evidenció a las concentraciones más elevadas (30 mg/L, 17%; 60 mg/L, 21%).

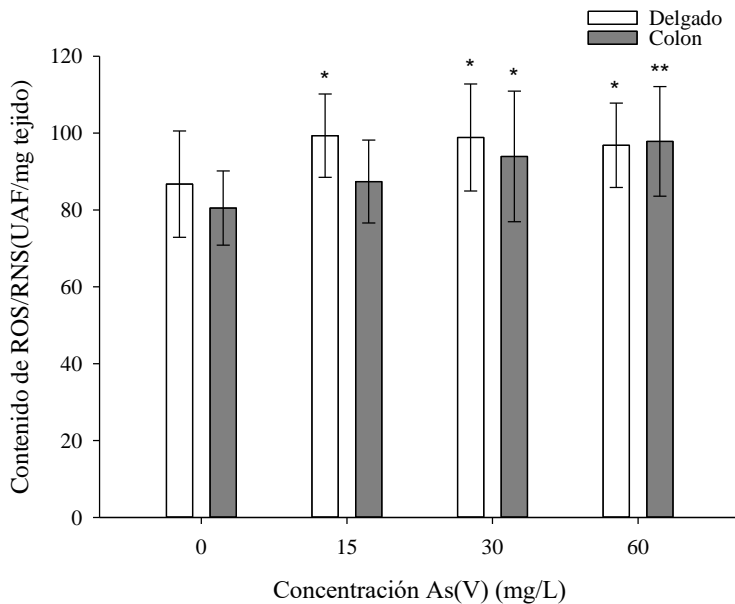


Figura 29. Contenido de ROS/RNS medido por oxidación de la H₂DCF-DA en animales control y animales tratados con As(V). Valores expresados como UAF/mg de tejido (media \pm SD, n=9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales no tratados (**, $p < 0.001$; *, $0.001 \leq p < 0.05$).

Los datos de peroxidación lipídica, obtenidos con el ensayo TBARS (Figura 30), también mostraron un tejido intestinal con estrés oxidativo. El aumento de los peróxidos lipídicos en los animales expuestos a As(V) fue mayor en el intestino

delgado (15 mg/L, 110%; 30 mg/L, 108%; 60 mg/L, 147%) que en el intestino grueso (30 mg/L, 21%).

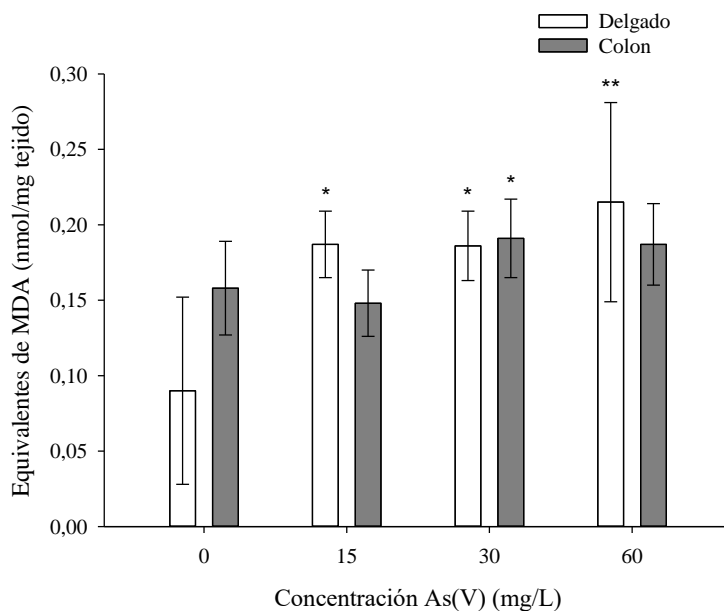


Figura 30. Equivalentes de MDA en animales control y animales tratados con As(V). Valores expresados como nmol/mg de tejido (media \pm SD, n=9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales no tratados (**, $p < 0.001$; *, $0.001 \leq p < 0.05$).

Además, se puso de manifiesto una disminución del GSH tisular como consecuencia de la exposición crónica a As(V) (Figura 31), confirmando la existencia de un desbalance redox. La concentración de GSH en el intestino grueso se redujo en todas las concentraciones (15 mg/L, 24%; 30 mg/L, 40%; 60 mg/L, 29%), mientras que en el intestino delgado solo se observaron reducciones estadísticamente significativas a la concentración de 30 mg/L (31%).

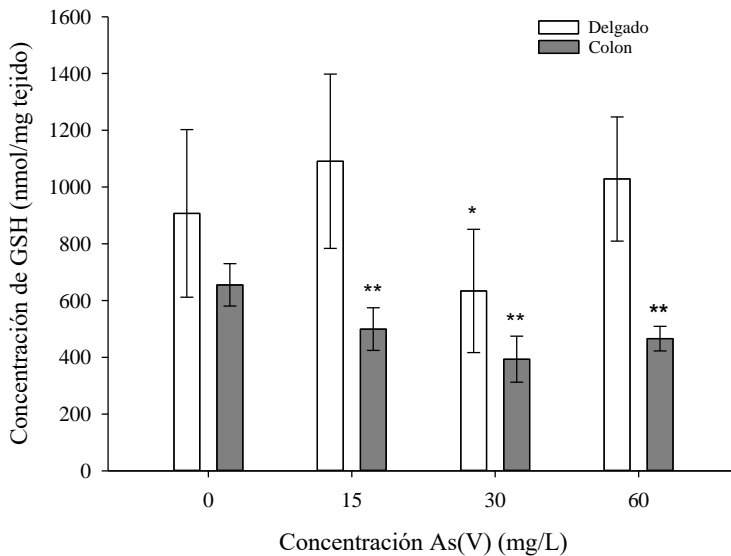


Figura 31. Concentración de GSH en animales control y animales tratados con As(V). Valores expresados como nmol/mg tejido (media \pm SD, n=9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales no tratados (**, $p < 0.001$; *, $0.001 \leq p < 0.05$).

1.3. Respuesta inflamatoria generada por la exposición crónica a As(V)

1.3.1. Niveles de citoquinas proinflamatorias en el tejido intestinal

Las concentraciones de las citoquinas proinflamatorias en el tejido procedente del intestino delgado no experimentaron cambios en los animales tratados con As(V) respecto a los animales control en ninguno de los tramos ensayados (datos no mostrados). Los resultados obtenidos para el intestino grueso tampoco mostraron cambios en los niveles de citoquinas entre los animales tratados y no tratados en uno de los fragmentos ensayados, el dispuesto más proximalmente (Figura 32A); sin embargo, se evidenciaron diferencias significativas en un tramo más distal del colon (Figura 32B). En este segundo tramo, sólo se analizaron los animales control y los expuestos a 30 mg/L. La citoquina que experimentó un aumento más elevado

fue la IL-17A (99%), seguida del TNF- α (54 %) y la IL-1 β (46%). Las variaciones observadas para la IL-6 (aumento respecto al control: 30%) no fueron estadísticamente significativas. Estos datos muestran que existe un proceso inflamatorio que no afecta a todos los tramos intestinales por igual.

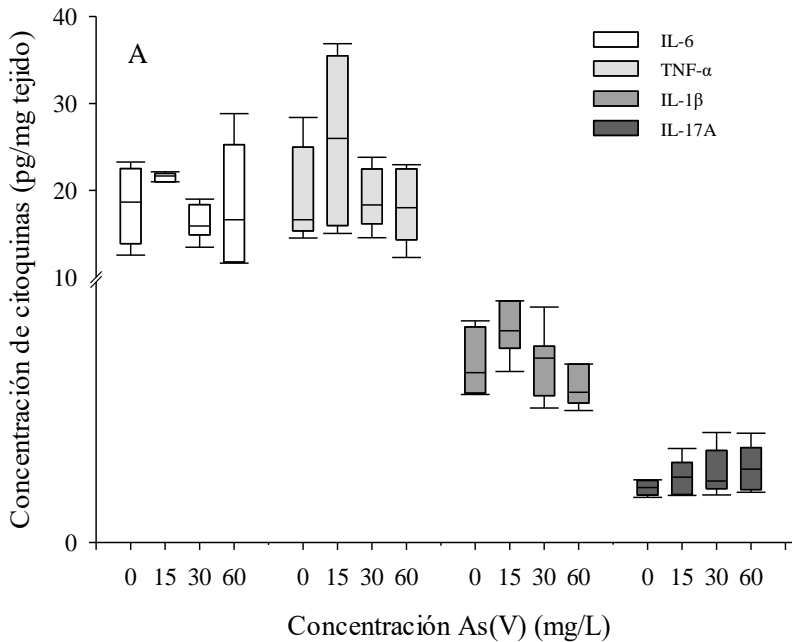


Figura 32. Contenidos de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-17A en el fragmento de colon proximal (A) y distal (B) de animales control y animales tratados con As(V). Valores expresados como pg/mg tejido (media \pm SD, n=9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales no tratados ($p < 0.05$).

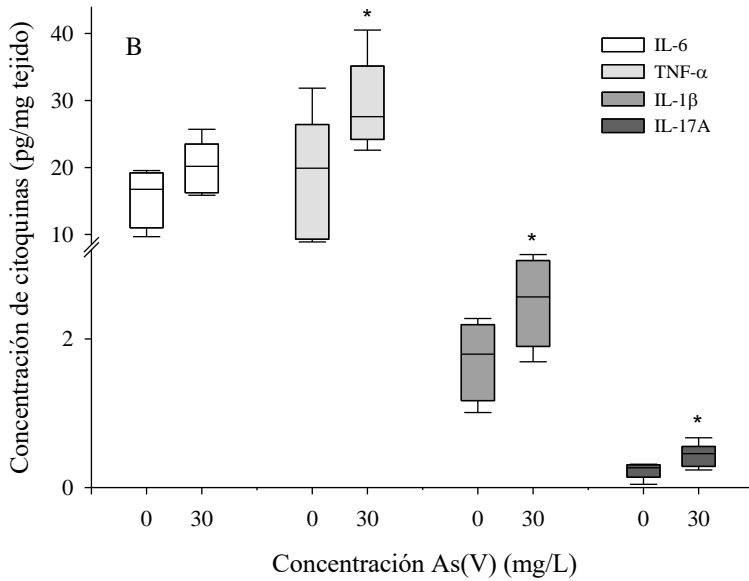


Figura 32. Continuación.

1.3.2. Infiltración de neutrófilos en la mucosa intestinal

Dentro de los estudios destinados a determinar la respuesta proinflamatoria provocada por As(V), también se evaluó la migración de neutrófilos mediante el examen histológico y el análisis de la concentración de lactoferrina fecal. La figura 33 muestra secciones del intestino grueso de animales control (33A) y animales tratados con 15 mg/L (33B) y 30 mg/L (33C) de As(V). Se detectaron infiltraciones en todos los casos, aunque estas fueron más numerosas en los animales tratados con As(V). De los 9 animales analizados en el grupo control, sólo 3 presentaron infiltrados en las secciones colónicas. En los grupos tratados con las concentraciones de As(V) más elevadas (30 y 60 mg/L), todos los animales evaluados (n=9) presentaron infiltraciones, mientras que, a la concentración más baja (15 mg/L), de los 5 animales analizados, 4 mostraron infiltrados.

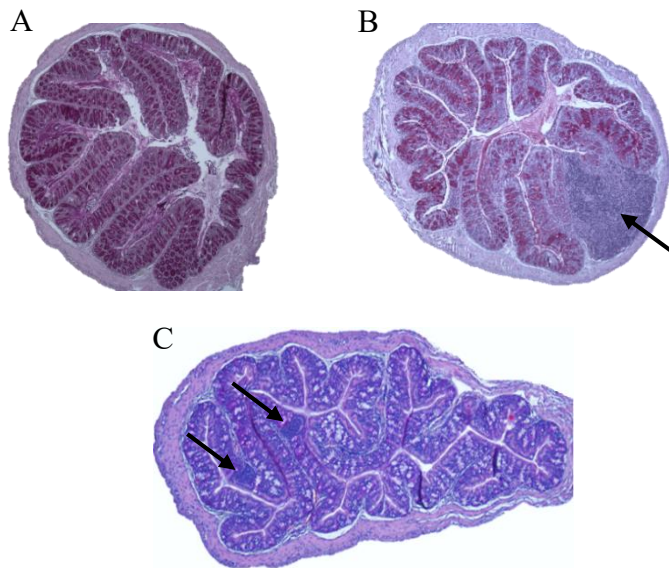


Figura 33. Secciones transversales de tejido colónico teñidas con PAS/hematoxilina de un animal control (A) y de un animal tratado con 15 mg/L (B) o 30 mg/L (C) de As(V). Las flechas indican las zonas de infiltración linfocitaria. Ampliación $\times 4$.

Los datos de lactoferrina fecal respaldaron este mayor proceso de infiltración en los tratamientos con As(V) (Figura 34). El contenido fecal de los ratones expuestos fue mayor que el de los ratones control (15 mg/L, 13%; 30 mg/L, 34%; 60 mg/L, 27%), lo que sugiere la instauración de un proceso proinflamatorio.

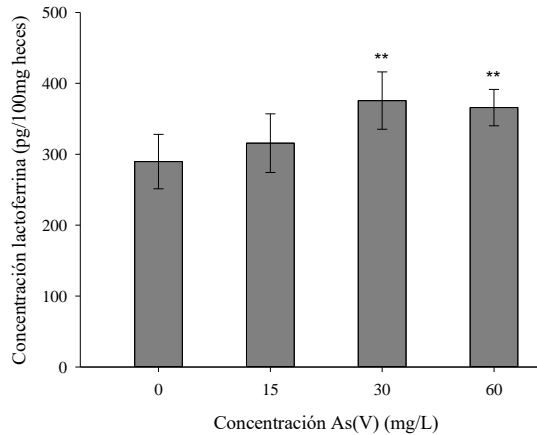


Figura 34. Contenido de lactoferrina en animales control y animales tratados con As(V). Valores expresados pg/100 mg heces (media \pm SD, n=9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales no tratados (**, $p < 0.001$; *, $0.001 \leq p < 0.05$).

1.3.3. Activación de rutas de señalización prooxidante/proinflamatorias

La figura 35 muestra los niveles de las formas fosforiladas de p38, IKK y JNK en la porción colónica, analizados por WB. Los datos apuntan a una activación de las rutas p38 (59-73%), SAPK/JNK (44-196%) y NF- κ B (48-150%), al igual que ocurría con el As(III) (capítulo 1, apartado 1.4). A diferencia de lo evidenciado para As(III) (capítulo 1, apartado 1.4), en este caso no se observó un aumento de la expresión de *Nlrp3* (datos no mostrados). La activación de rutas específicas de transducción de señales implicadas en procesos inflamatorios es una prueba más de que existe una respuesta proinflamatoria/prooxidante a nivel intestinal en los animales tratados con As(V).

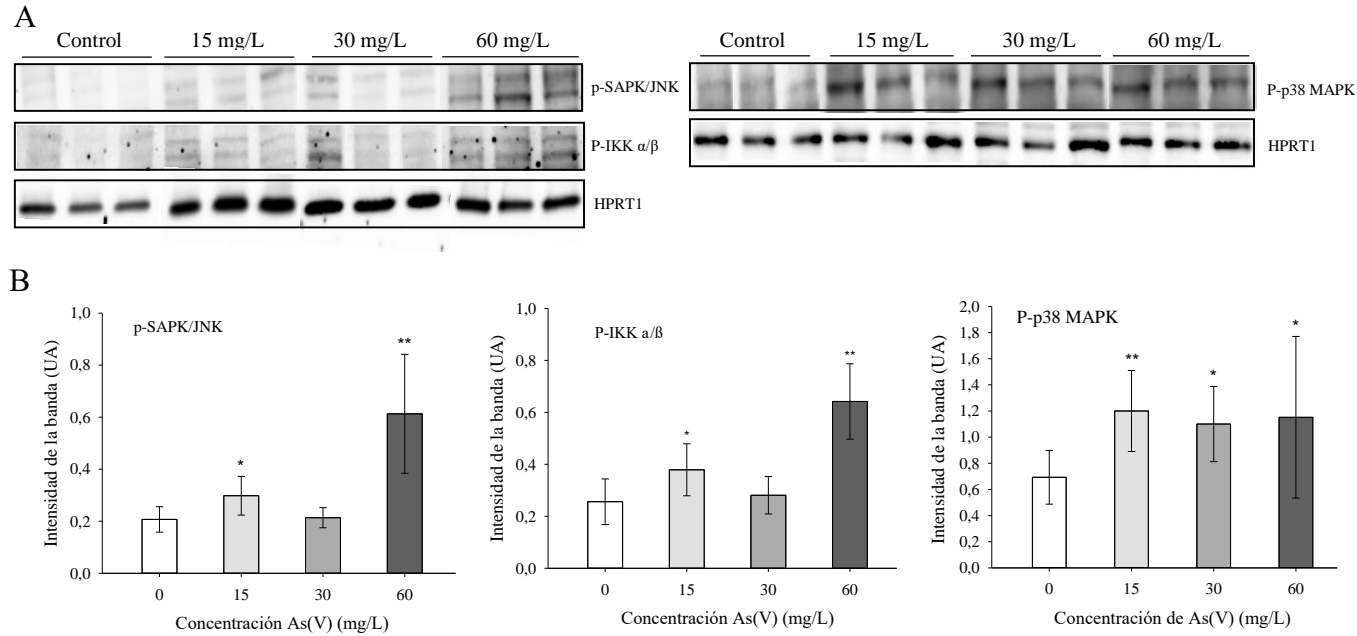


Figura 35 Activación de vías de señalización en colon por exposición a As(V). (A) Western blot de fosfo-p38, fosfo-SAPK/JNK y fosfo-IKK α/β . Se muestran sólo tres muestras representativas de cada tratamiento. El control de carga fue HPRT1. (B) Niveles de formas fosforiladas cuantificados por densitometría, normalizados y expresados como unidades estándar (UA, media \pm SD, n=9). Los asteriscos indican aumentos estadísticamente significativos con respecto a los controles (**, $p < 0.001$; *, $0.001 \leq p < 0.05$).

1.4. Efecto del tratamiento con As(V) sobre proteínas constituyentes de las uniones y el mucus de la monocapa epitelial del intestino

La tabla 11 muestra la expresión génica relativa de las proteínas de las uniones *Cldn1*, *Cldn3* y *Ocln* y de la mucina *Muc2* del colon de animales tratados con As(V) respecto a los animales no tratados. El tratamiento con As(V) genera una regulación a la baja de *Muc2* en todos los tratamientos. Las proteínas de las uniones *Cldn1*, *Cldn3* y *Ocln* también presentan regulaciones negativas estadísticamente significativas. Con excepción de los datos de *Cldn3*, para el resto de genes se observa una respuesta hormética con reducciones más importantes a las concentraciones más bajas.

Tabla 11. Expresión relativa de *Muc2*, *Cldn1*, *Cldn3* y *Ocln* en ratones expuestos crónicamente a As(V) respecto a animales no tratados. Valores expresados como cambios de expresión (media \pm SE, n=9). Los asteriscos indican una regulación a la baja estadísticamente significativa respecto a los animales control ($p < 0.05$).

Gen	15 mg/L	30 mg/L	60 mg/L
<i>Muc2</i>	0.33 \pm 0.10*	0.41 \pm 0.11*	0.51 \pm 0.18*
<i>Cldn1</i>	0.44 \pm 0.13*	0.67 \pm 0.14*	0.85 \pm 0.33
<i>Ocln</i>	0.51 \pm 0.16*	0.57 \pm 0.15*	0.71 \pm 0.28
<i>Cldn3</i>	0.62 \pm 0.19*	0.68 \pm 0.18*	0.26 \pm 0.12*

Además, se observó una disminución estadísticamente significativa en el número de células mucosecretoras por cripta en el tejido colónico de los ratones tratados con As(V) [células PAS⁺/cripta: control (16 \pm 3); 15 mg/l (13 \pm 1); 30 mg/L (13 \pm 2)] (Figura 36). Este hecho podría explicar en parte la menor expresión de *Muc2*.

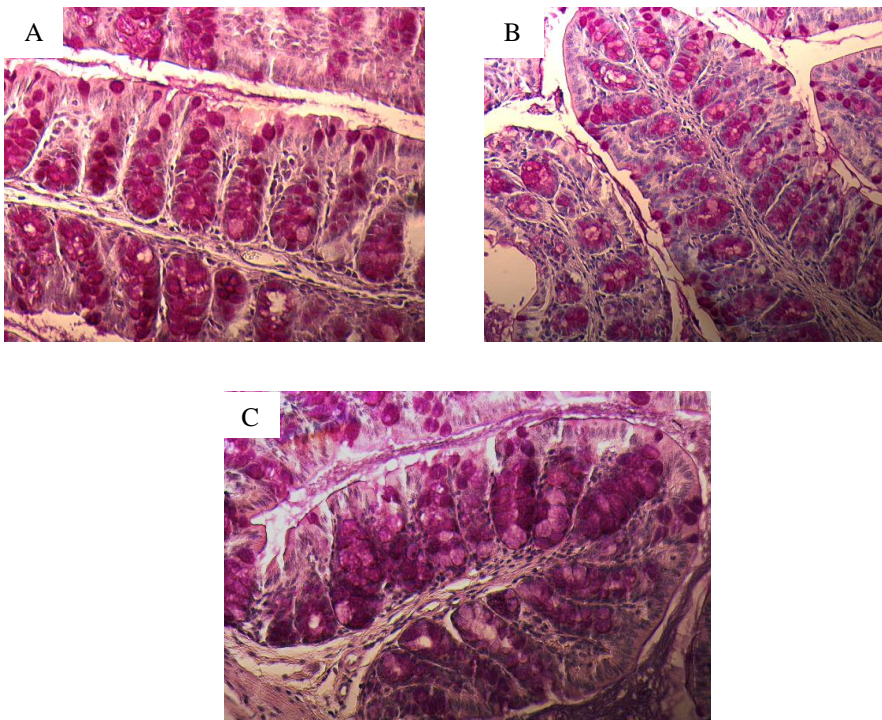


Figura 36. Efecto del As(V) sobre las células mucosecretoras. Cortes transversales teñidos con PAS/hematoxilina del colon de un animal control (A) y un animal tratado con 15 mg/L (B) o 30 mg/L (C) de As(V). Ampliación 16 \times .

1.5. Efecto del tratamiento con As(V) sobre la microbiota intestinal y su metabolismo

1.5.1. Composición de la microbiota intestinal

El análisis de la composición de la microbiota a nivel de Phyla mostró que Firmicutes y Bacteroidota son los taxones predominantes (Figura 37A), al igual que lo observado para los ratones expuestos a As(III) (capítulo 1, apartado 1.6). El análisis de la diversidad alfa mostró disminuciones significativas en la riqueza de especies en todas las concentraciones de As(V) (Figura 37B). Además, se observaron diferencias significativas en los índices de Shannon (Figura 37C) y Simpson (Figura 37D) entre los ratones control y los expuestos a 30 y 60 mg/L de

As(V). Las tendencias en ambos índices concuerdan con la disminución de la riqueza estimada. Ambos índices de diversidad tienen en cuenta la riqueza y la uniformidad, lo que sugiere que la exposición a As(V) alteró la abundancia relativa de algunos taxones.

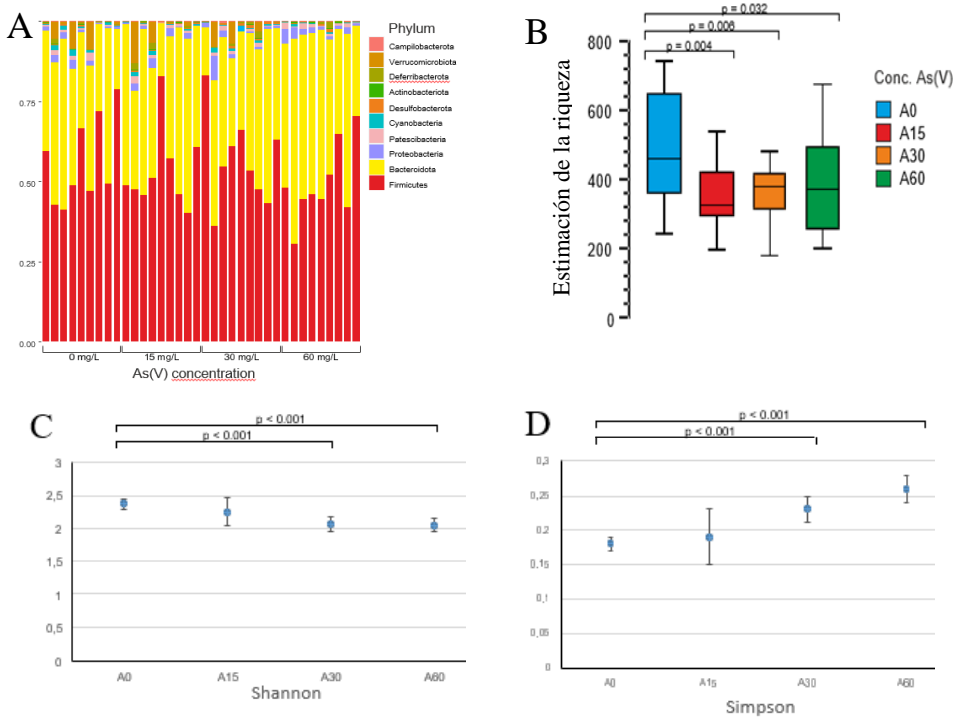
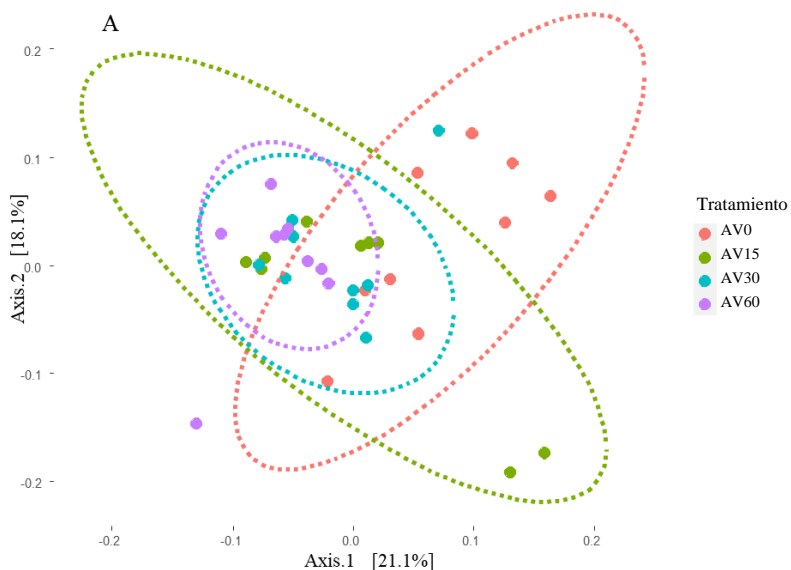


Figura 37. Análisis de la composición de la microbiota en ratones control y expuestos a As(V). (A) Diagrama de barras apiladas mostrando la abundancia relativa de los filos presentes en muestras fecales de ratones control y expuestos a As(V). (B) Estimaciones de la riqueza taxonómica de muestras fecales de ratones. (C) y (D) Estimaciones de los índices de Shannon y Simpson respectivamente. Las horquillas indican grupos comparados con valores de p significativos (<0.05).

Las estimaciones de diversidad beta indicaron una diferencia significativa en la composición de la microbiota entre el grupo control y los ratones expuestos a As(V). Las ordenaciones de PCoA y NMDS no mostraron una agrupación clara de muestras según la exposición a As(V) (Figura 38), pero el análisis PERMANOVA realizado teniendo en cuenta la jaula como factor de confusión indicó una diferencia significativa entre los distintos tratamientos (R^2 0.186, valor de p corregido: 0.001). Los análisis PERMANOVA por pares solo detectaron diferencias no significativas para los grupos expuestos a 15 y 30 mg/L de As(V) (Tabla 12). El análisis de homogeneidad de varianzas no mostró diferencias significativas entre los tres grupos de muestras, lo que respalda la fiabilidad de los análisis PERMANOVA (datos no mostrados).



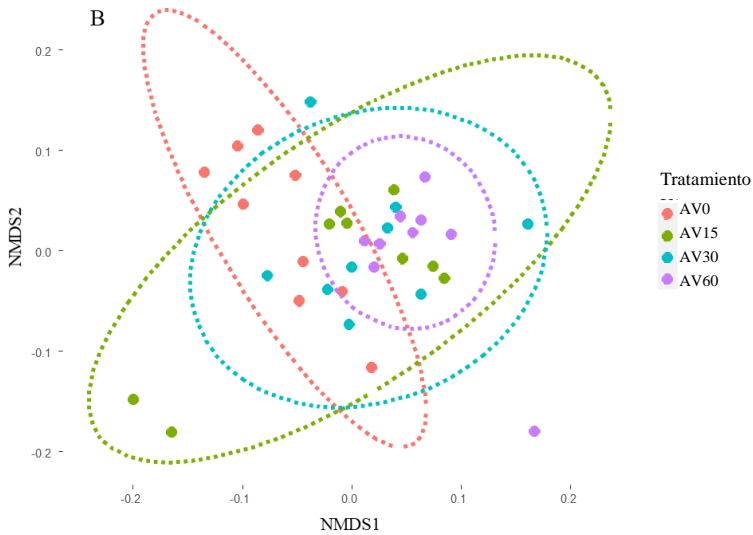


Figura 38. (A) Gráfico de análisis de coordenadas principales (PCoA). Ordenación PCoA de las muestras de microbiota fecal basada en la distancia euclidiana de los recuentos de ASV transformados en relación logarítmica isométrica. (B) Gráfico NMDS. Ordenación por escalado multidimensional no métrico (NMDS) de la microbiota fecal basada en la distancia euclidiana calculada a partir de los recuentos de ASV transformados por la relación logarítmica isométrica.

Tabla 12. Resultados de los análisis PERMANOVA por pares de los diferentes tratamientos (Ctrl: grupo control).

Pares	Suma cuadrados	Media cuadrados	Modelo F	R ²	Valor p	P corregida
Ctrl-15 mg/L	0.062	0.062	2.325	0.127	0.026	0.031
Ctrl-30 mg/L	0.066	0.066	2.683	0.144	0.008	0.018
Ctrl-60 mg/L	0.111	0.111	4.977	0.237	0.001	0.006
15-30 mg/L	0.031	0.031	1.117	0.065	0.359	0.359
15-60 mg/L	0.052	0.052	2.053	0.114	0.026	0.031
30-60 mg/L	0.043	0.043	1.867	0.104	0.009	0.018

Utilizando ANCOM-BC excluyendo taxones con una proporción de ceros superior a 0,9 y considerando ceros estructurales, se detectaron 224 ASV con diferencias significativas en muestras tratadas con 15 mg/L As(V), 215 ASV con 30 mg/L As(V) y 251 ASV con 60 mg/L de As(V) (resultados no mostrados). Sin embargo, al analizar los datos a nivel de familia, solo se detectaron 5 familias que presentaban diferencias con 15 mg/L de As(V), 4 con 30 mg/L de As(V) y 10 con 60 mg/L de As(V) (Figura 39). Solo se detectó la familia *Enterococcaceae* en más de un grupo de tratamiento. El análisis a nivel de género detectó 15 géneros con diferencias a 15 mg/L de As(V), 20 a 30 mg/L de As(V) y 22 a 60 mg/L de As(V). A este nivel, se detectaron 16 géneros en más de un grupo de tratamiento (datos no mostrados). Este resultado sugiere que los cambios en la abundancia de taxones, ya sean directos o indirectos, como resultado de la exposición a As(V) fueron específicos de la especie o cepa. Dado que la identificación precisa a nivel de especie con nuestro conjunto de datos se limitó a un número relativamente bajo de ASV, se discutirán los resultados del análisis a nivel de género.

La mayoría de los géneros detectados como diferencialmente abundantes pertenecían al filo Firmicutes. Por el contrario, entre Bacteroidota, solo el género *Paraprevotella* se detectó significativamente más abundante en ratones tratados con 15 mg/L de As(V) y el género *Prevotellaceae* NK3B31 como significativamente menos abundante con 30 mg/L de As(V). En general, aparentemente los organismos del filo Bacteroidota se vieron poco afectados por As(V). Para algunos géneros, se observó una tendencia general en todos los grupos de tratamiento. Los géneros *Oscillospira* y *Oscillospiraceae* UCG-007 se detectaron consistentemente como significativamente menos abundantes en los tres grupos expuestos a As(V) (Figura 39). Los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus* (orden *Lactobacillales*) también se detectaron como significativamente menos abundantes en los tres grupos, mientras que el género estrechamente relacionado *Lactococcus* fue significativamente menos abundante en los grupos tratados con 30 o 60 mg/L de As(V).

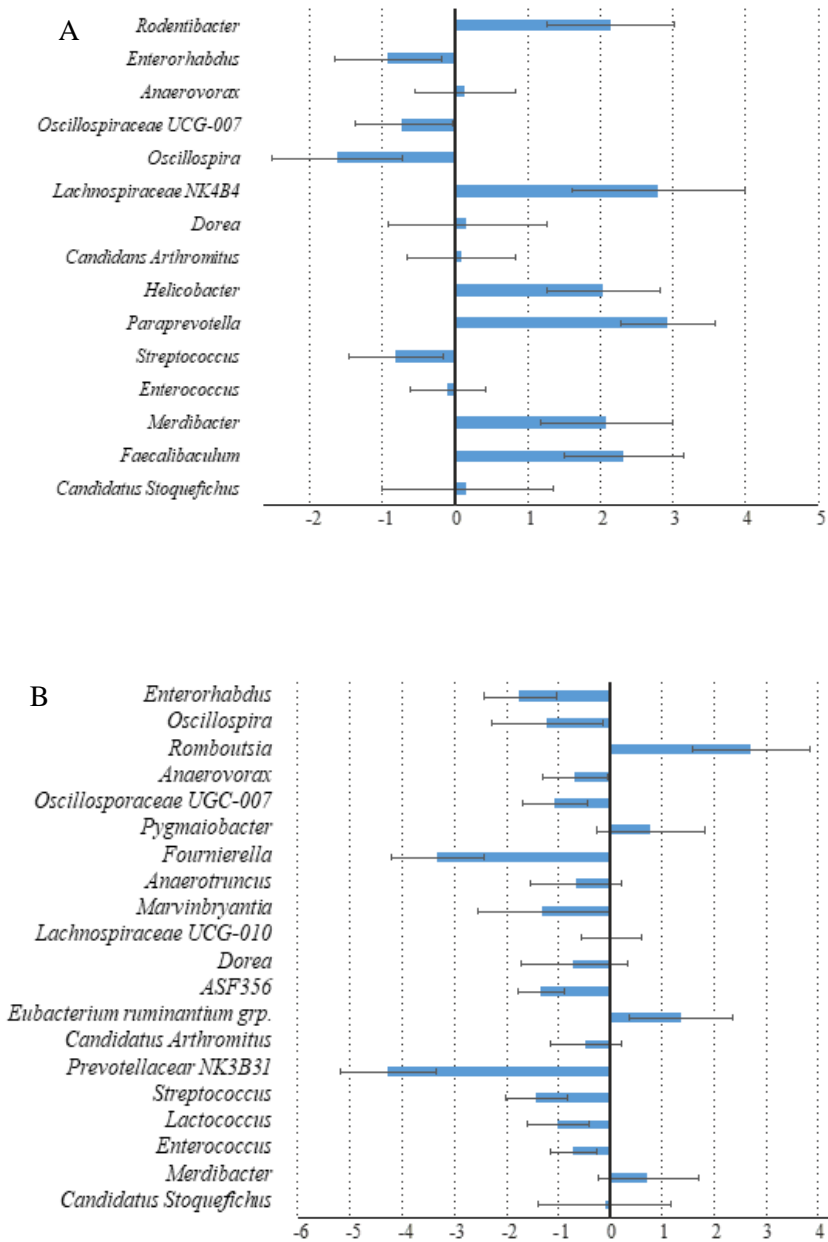


Figura 39. Abundancia diferencial a nivel de orden representada por el tamaño del efecto (log fold change) derivado de ANCOM-BC en animales expuestos a 15 mg/L (A), 30 mg/L (B) y 60 mg/L(C) de As(V).

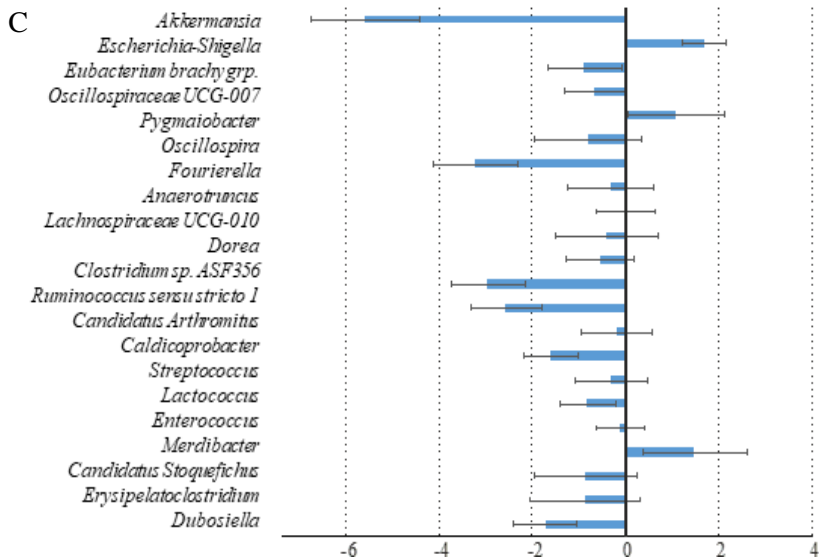


Figura 39. Continuación.

El grupo de *Akkermansia*, *Fournierella* y *Ruminococcus torques* también mostró una tendencia general a disminuir la abundancia a medida que aumentaba la concentración de As(V), aunque se detectaron como significativamente menos abundantes solo en los grupos expuestos a 30 o 60 mg/L de As(V) (Figura 40). En general, se detectaron menos géneros significativamente más abundantes, excepto en el grupo expuesto a 15 mg/L de As(V) (Figura 40). Cabe destacar que el grupo *Escherichia-Shigella* mostró una tendencia a una mayor abundancia, aunque solo se detectó como significativamente más abundante en el grupo expuesto a 60 mg/L de As(V) (Figura 40).

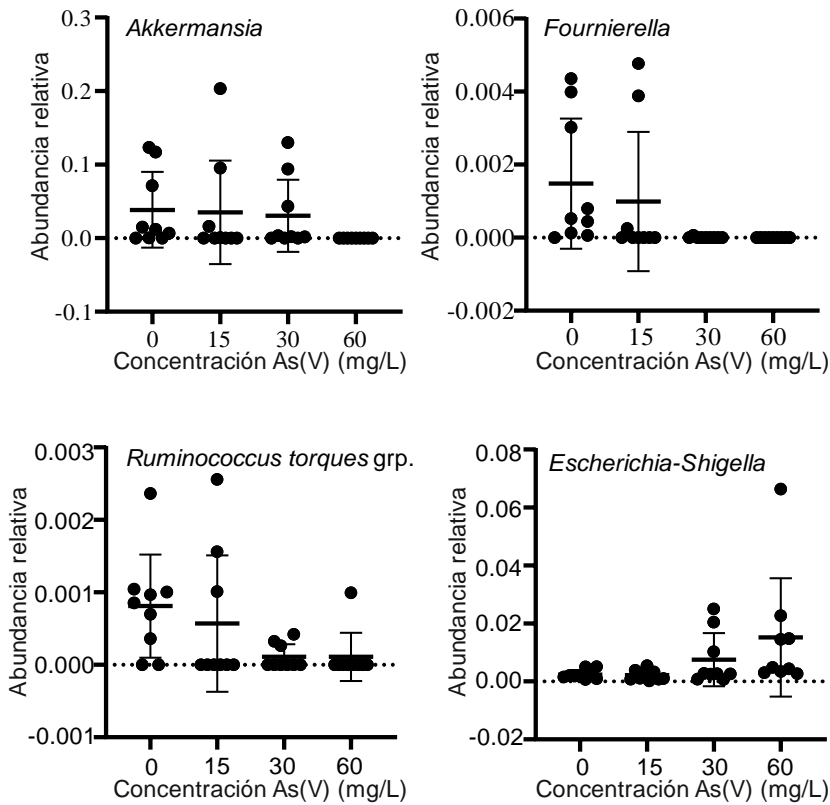


Figura 40. Abundancia relativa de géneros seleccionados en los distintos tratamientos.

1.5.2. Metabolismo de los AGCC

La figura 41 muestra las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico en animales control y tratados con As(V). Los tratamientos con As(V) redujeron los contenidos totales de AGCC, siendo el ácido butírico el ácido graso con mayores reducciones (15 mg/L, 98%; 30 mg/L, 97%; 60 mg/L, 98%, Figura 41B), seguido del ácido propiónico (15 mg/L, 78%; 30 mg/L, 78 ; 60 mg/L, 86 , Figura 41B) y el ácido acético (15 mg/L, 62%; 30 mg /L, 62%, 60 mg/L, 63%, Figura 41A). Las reducciones fueron similares en todas las concentraciones, no existiendo una relación dosis-respuesta.

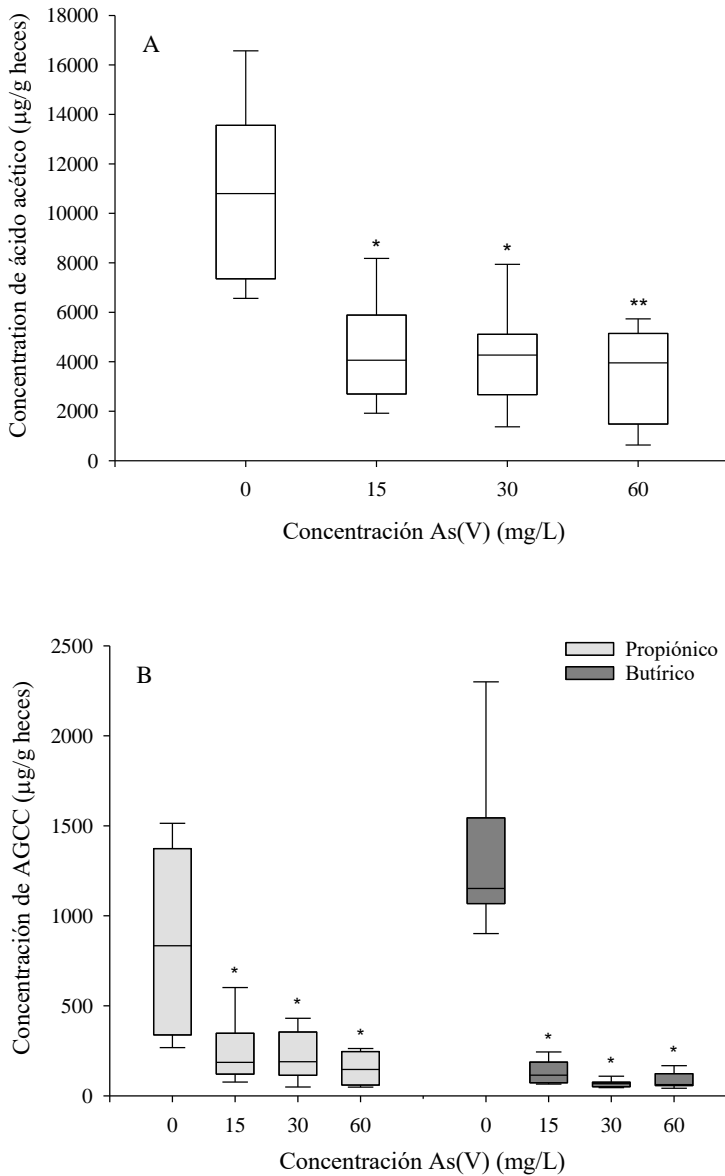


Figura 41. Concentración fecal de AGCC en animales control y animales tratados con As(V) (A: ácido acético; B: ácido propiónico y butírico). Valores expresados como µg/g de heces (media ± SD, n=9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales no tratados (**, $p < 0.001$; *, $0.001 \leq p < 0.05$).

1.6. Efecto del tratamiento con As(V) sobre la permeabilidad intestinal y los marcadores de endotoxemia

La Figura 42 muestra las concentraciones de albúmina fecal tras los tratamientos. Los datos pusieron de manifiesto aumentos significativos de la permeabilidad en los animales tratados a las concentraciones más altas de As(V) en comparación con los ratones no tratados (30 mg/L: 94%; 60 mg/L: 74%).

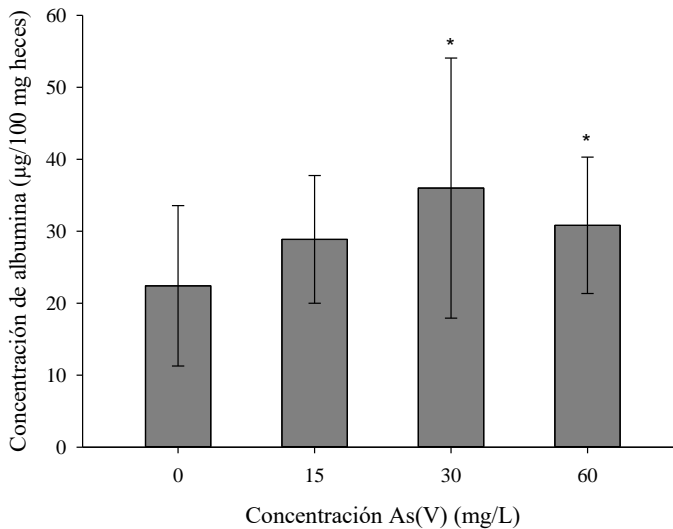


Figura 42. Contenido de albúmina fecal en animales control y animales tratados con As(V). Valores expresados como µg/100 mg heces (media ± SD, n=9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales control ($p < 0.001$).

La endotoxemia se evaluó mediante la medición de LBP y la citoquina proinflamatoria IL-1 β en suero. La figura 43A muestra la concentración de LBP en animales control y tratados con As(V). La exposición a arseniato provocó un aumento significativo de los niveles séricos de LBP en los animales tratados con 15 y 30 mg/L respecto a los animales control (35-36%). Además, se observó un

aumento estadísticamente significativo del contenido sérico de IL-1 β , aunque solo en la concentración más elevada (10%, Figura 43B).

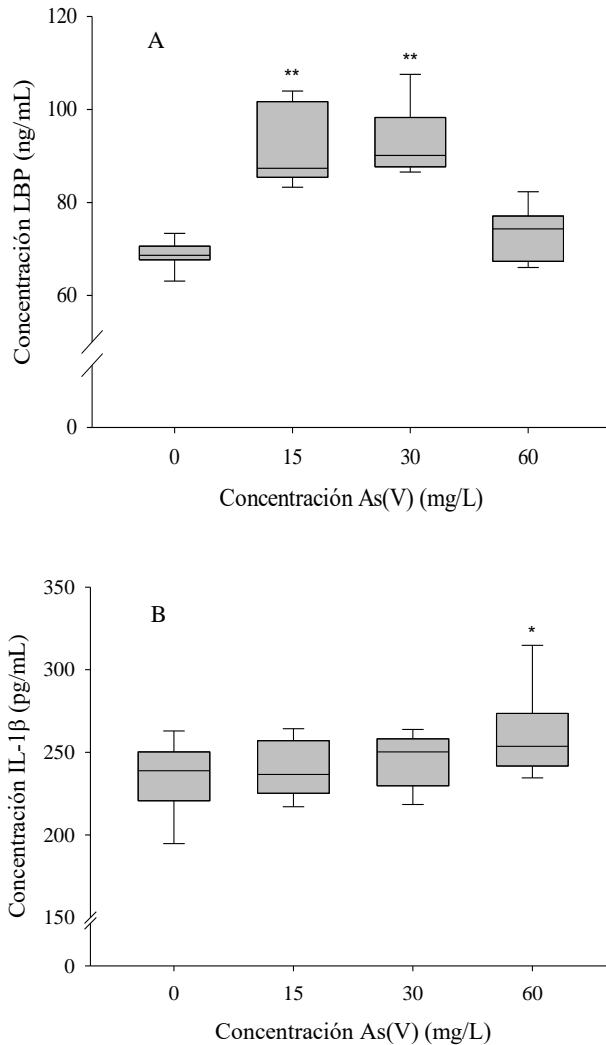


Figura 43. Marcadores séricos de endotoxemia en animales control y animales tratados con As(V). (A) Concentración de LBP (ng/mL) y (B) concentración de IL-1 β (pg/mL). Valores expresados como media \pm SD (n=9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales control (**, $p < 0.001$; *, $0.001 \leq p < 0.05$).

1.7. Relación entre varios de los parámetros toxicológicos evaluados

La figura 44A y 44B muestra un mapa de intensidades de la matriz de correlaciones entre algunos de los marcadores toxicológicos evaluados en este estudio. En la gráfica 44A se ha realizado el estudio de correlaciones eliminando el grupo de animales tratados con 60 mg/L de As(V); mientras que en la gráfica 44B se muestra las correlaciones teniendo en cuenta todos los grupos.

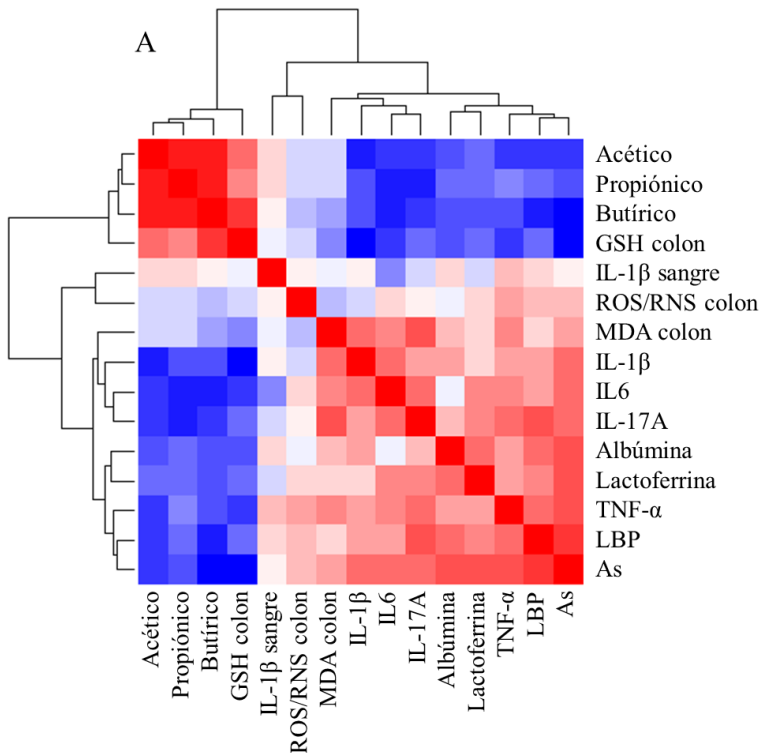


Figura 44. Mapa de intensidades (*heat map*) que representa la matriz de correlaciones entre varios de los parámetros analizados en este estudio. (A) Mapa obtenido analizando el grupo control y los animales tratados con 15 y 30 mg/L de As(V), (B) Mapa obtenido analizando todos los grupos. Los cuadrados rojos indican una relación positiva entre dos variables, mientras que los azules indican una relación negativa.

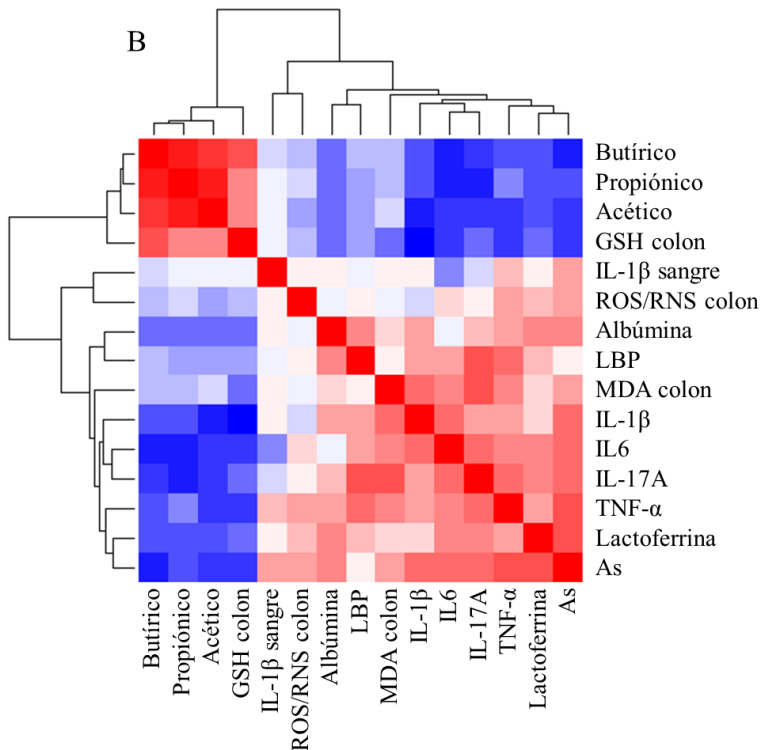


Figura 44. Continuación.

En general, se evidenció una correlación positiva entre las concentraciones de As(V) en el agua de bebida y las variables relacionadas con el estrés oxidativo y los marcadores de inflamación intestinal. Estas variables, a su vez, mostraron una correlación negativa con los niveles de AGCC fecales y los niveles tisulares de GSH, correlacionados positivamente entre ellos. La permeabilidad intestinal (albúmina fecal) y el marcador de endotoxemia LBP mostraron un aumento a medida que aumentaban las concentraciones de As(V) en el agua y los niveles de algunos marcadores de estrés e inflamación y a medida que disminuían los niveles de GSH y AGCC fecales.

Todas estas correlaciones son más robustas cuando se elimina el grupo de animales expuestos a 60 mg/L del análisis. Esto era de esperar ya que para muchas

de las variables existe un efecto hormético, es decir la respuesta al tóxico sigue una tendencia al alza o a la disminución que no es lineal en este grupo de animales, donde se observa una respuesta menor. Estos datos muestran en cierta medida el efecto tóxico del As(V) en el entorno intestinal y los posibles mecanismos implicados.

2. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en este capítulo indican que la exposición crónica a As(V) afecta el entorno de la mucosa intestinal, alterando su funcionalidad. Los animales tratados con 30 y 60 mg/L de As(V) a través del agua de bebida presentan un aumento significativo de la permeabilidad intestinal respecto a los animales no tratados (Figura 42). Por el contrario, aunque el tratamiento con 15 mg/L de As(V) produce un aumento del estrés oxidativo (Figuras 29-31), cierto grado de infiltración leucocitaria (Figuras 33 y 34) y una regulación a la baja de proteínas constituyentes de las uniones y el mucus (Tabla 11), no afecta significativamente la permeabilidad intestinal (Figura 42). Estudios previos *in vitro* han mostrado que la forma pentavalente del As no ejerce un efecto de toxicidad relevante en modelos celulares de epitelio intestinal (Chiocchetti et al. 2018b), y aunque no existen datos sobre efectos tóxicos en la mucosa de animales expuestos, si se ha evidenciado que el tratamiento con As(V) genera disbiosis de la microbiota intestinal en lombrices de tierra (Wang et al. 2019). Las diferencias entre los ensayos *in vitro* e *in vivo* podrían deberse en parte a las transformaciones que experimenta el As(V) a su paso por el tracto digestivo. El As(V) ingerido puede reducirse en el lumen debido a la presencia de sustancias reductoras procedentes del alimento (Calatayud et al. 2013b; Clemente et al. 2021), por el propio metabolismo de las células epiteliales (Calatayud et al. 2013b) o por acción de la microbiota intestinal (Van de Wiele et al. 2010). Todos estos factores abióticos o bióticos transforman el As(V) en As(III) y otras formas trivalentes metiladas de mayor toxicidad (Figura 1, introducción). Estas especies, más tóxicas que el As(V) ingerido,

pueden ser finalmente las causantes del daño sobre el entorno intestinal. Alternativamente, las diferencias observadas *in vitro* e *in vivo* pueden residir sencillamente en la simplicidad de los modelos *in vitro*, que en la mayoría de los casos solo incluyen células intestinales absortivas, frente a la compleja situación *in vivo*, donde existen otros factores y otros tipos celulares que pueden afectar a la respuesta final al tóxico.

Un efecto tóxico diferencial de la exposición a ambas formas arsenicales es el observado a nivel de la microbiota. El tratamiento de los ratones con As(III) afecta a la abundancia de algunos taxones, aunque la composición de la población no muestra alteraciones (capítulo 1, apartado 1.6). En el análisis de la diversidad alfa, se observan diferencias en el efecto de la exposición a cada una de las formas arsenicales. Así, mientras la exposición a As(III) muestra una tendencia a aumentar la diversidad, la exposición a As(V) tiene el efecto contrario (Figuras 37C y 37D). Asimismo, ambas formas arsenicales tienen efectos distintos sobre la composición de la población (diversidad beta). La exposición a As(V) provoca cambios significativos en la composición de la microbiota que no se observan en la exposición a As(III). El análisis de abundancia diferencial por su parte muestra que los efectos del As(V) son posiblemente específicos de género o cepa, ya que no se evidencian tendencias claras a niveles taxonómicos superiores.

La exposición crónica a As(V) afecta también al metabolismo microbiano de los AGCC, observándose una reducción significativa de los tres ácidos grasos analizados (Figura 41). Todas las concentraciones de As(V) producen una reducción similar de estos metabolitos, siendo el ácido butírico, el AGCC más afectado. La magnitud de la reducción es superior a la observada en los animales tratados con As(III) (capítulo 1, apartado 1.7). La modificación de la composición de la microbiota y los cambios observados en algunos taxones podrían explicar en parte esta mayor alteración del perfil, ya que esto no se pone de manifiesto en los animales tratados con As(III) (capítulo 1, apartado 1.6). De hecho, *Ruminococcus torques*, uno de los grupos que presentan reducciones en los tratamientos con As(V) se considera uno de los principales productores de butirato (Takahashi et

al. 2016) y algunas especies del género *Akkermansia*, también reducido por la exposición a la forma pentavalente del metaloide, son importantes productoras de propionato (Louis y Flint 2017).

Adicionalmente, la reducción de la cantidad luminal de AGCC también puede ser resultado del efecto del As(V) sobre el metabolismo energético de las propias bacterias. El arseniato es un análogo químico del fosfato que puede alterar algunos aspectos del metabolismo dependientes del fosfato (Finnegan y Chen 2012). La formación y rápida hidrólisis del AsV-ADP produce cierto desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, disminuyendo la capacidad de las células para producir ATP (Kulshrestha et al. 2014). Las implicaciones de la reducción de la disponibilidad de los AGCC para su empleo por las células de la mucosa intestinal y para que puedan llegar a la circulación sistémica donde intervienen en el metabolismo y fisiología del huésped, ya se han valorado en la discusión del capítulo 1, donde se ha mostrado su vital importancia. Hay que mencionar nuevamente el papel determinante de estos metabolitos en el mantenimiento de la barrera intestinal, Por lo tanto, el efecto del As(V) sobre el metabolismo microbiano es un posible mecanismo de toxicidad de esta forma arsenical

Además de la microbiota y su metabolismo, lo que podríamos considerar un primer componente, el más externo, de la barrera intestinal, el As(V) también afecta a los otros componentes que separan el lumen intestinal del sistema inmune. Los datos de expresión génica muestran una reducción de los transcritos de la mucina mayoritaria de la capa de mucus colónica. Al igual que lo observado en los animales tratados con As(III) (capítulo 1, apartado 1.5), esta reducción está asociada con una disminución del número de células secretoras de mucus (Figura 36). En este estudio, no se ha determinado si el As(V) podría afectar la diferenciación de las células madre al linaje secretor como se ha visto con el As(III) (capítulo 1, apartado 1.9), hecho muy probable si se observa un menor número de células mucosecretoras. Por otro lado, es posible que la exposición a As(V) ejerza un efecto tóxico directo sobre las células mucosecretoras ya adultas,

que afecte la síntesis de mucinas esenciales para el mantenimiento del mucus intestinal.

Independientemente del mecanismo por el cual el tratamiento crónico con As(V) genera una menor expresión de *Muc2*, este efecto tóxico supone, como ya hemos indicado previamente (introducción, apartado 6.1.2), una dificultad añadida para lograr el mantenimiento de la homeostasis intestinal y puede ser un mecanismo más de toxicidad del As(V). Es interesante indicar que una menor producción de mucus podría estar afectando a los microorganismos denominados degradadores de mucus. Estas bacterias poseen una gran variedad de enzimas (glicosidasas, sulfatasas, sialidasas, etc.) que degradan los glicanos del mucus y, de esta forma emplean los oligosacáridos para su propio metabolismo. Hasta la fecha se han descrito numerosas bacterias mucolíticas, entre ellas *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis*, *Ruminococcus gnavus* y *Ruminococcus torques* (Gillois et al. 2018). Tal y como hemos visto en este estudio, algunos grupos relacionados con estas especies presentan una abundancia relativa menor en los animales tratados con As(V) (Figuras 39 y 40). A esta posible reducción de la abundancia de mucus, hay que sumar las reducciones de las expresiones de las proteínas de las uniones intercelulares en la mayoría de los animales tratados (Tabla 11), las dos claudinas y la ocludina, las cuales forman parte de los complejos moleculares que mantienen el epitelio sellado y limitan el transporte paracelular. Por tanto, podemos concluir que el otro gran elemento (el epitelio y su secretoma) que ayuda a mantener una separación física y química entre el contenido luminal y el sistema inmune intestinal también está afectado.

La forma en la que se produce esta toxicidad intestinal es similar a la descrita para el As(III). El arseniato, o tal vez sus metabolitos, activan rutas de señalización específicas a nivel de mucosa, todas ellas relacionadas con procesos inflamatorios crónicos (p38, JNK, NF- κ B). Esta activación puede ser consecuencia del daño producido a nivel tisular, lo que genera una serie de DAMPs (ROS/RNS, citoquinas, proteínas de choque térmico, etc.) que activan y retroalimentan esta

situación. Las rutas dependientes de quinasas mencionadas son las responsables de la síntesis de las citoquinas proinflamatorias que se han visto aumentadas en los tejidos de los animales expuestos a As(V) (Figura 32). Además de las citoquinas Th1 (IL-1 β y TNF- α), hay que señalar que en este estudio se ha constatado que también existe una respuesta Th17, ya que los animales tratados con As(V) presentan un aumento significativo de la citoquina IL17A. Es decir, las células efectoras Th17 se inducen en paralelo a las Th1 en exposición crónicas a As(V).

Los datos obtenidos de los estudios de inflamación sugieren que no necesariamente existe una inflamación continua a lo largo del colon, si no que posiblemente está inflamación esté localizadas en zonas. Este tipo de parcheado inflamatorio se ha descrito en varios desórdenes inflamatorios intestinales (Jain et al. 2013). El proceso proinflamatorio y prooxidante crónico descrito posiblemente tienda a agravarse con el tiempo ya que no desaparece el estímulo que lo origina, lo que genera más DAMPs y moléculas proinflamatorias, algunas de las cuales, además pueden autoregularse como es el caso del TNF- α (Kast 2000) y además el efecto sobre la permeabilidad hace que el sistema inmune subepitelial quede más expuesto a cualquier sustancia que pueda activarlo.

En los animales tratados con As(V) también se observa un aumento de algún marcador de endotoxemia. Esto nuevamente puede indicar que la exposición oral a As inorgánico puede generar un estado de inflamación constante a bajos niveles en la circulación sistémica. Esta situación es más evidente con As(III), pero, en cualquier caso, sugiere que podrían existir ciertas conexiones entre los desórdenes intestinales y los efectos que este tóxico puede producir a otros niveles.

3. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha evidenciado que la exposición a As(V) a través del agua de bebida produce un efecto tóxico sobre la barrera intestinal similar al del As(III), con un aumento importante de la permeabilidad, pero a concentraciones más elevadas. Los efectos también se observan a nivel del epitelio (menor expresión de las proteínas de las uniones y de la mucina MUC2 y posiblemente una menor secreción de mucus). Al igual que ocurre con el As(III), el modo de acción puede estar ligado a una respuesta prooxidante y proinflamatoria debida a la participación de una serie de rutas de señalización que se activan por el daño tisular, lo que se conoce como un proceso de inflamación estéril. El único aspecto diferencial es el efecto que el As(V) ejerce sobre la composición de la microbiota, donde podemos hablar de una disbiosis, que no se observó con el As(III). Se evidencia también un efecto sobre el metabolismo microbiano de los AGCC, algo mayor que en los tratamientos con As(III), que podría deberse, en parte, al efecto del As(V) sobre la abundancia de determinados taxones. Teniendo en cuenta que *in vitro*, en un modelo celular de epitelio intestinal, apenas se evidencia toxicidad del As(V) podríamos pensar que la generación de la toxicidad *in vivo* se debe, en parte, a la transformación de la forma pentavalente en metabolitos más tóxicos. Sería interesante comprobar, si este efecto tóxico del As(V) se mantiene en animales donde el enzima responsable del metabolismo del As inorgánico está parcial o totalmente silenciado.

Los resultados obtenidos en el capítulo 1 y 2 muestran un efecto de As inorgánico en el tracto intestinal, que podría incluso estar influyendo sobre la toxicidad sistémica, aunque para realizar esta última afirmación serían necesarios más estudios. El conocimiento del modo de acción a nivel intestinal permite buscar estrategias de reducción del daño, que podrían incluso tener una repercusión sistémica. Este será el objetivo de los dos siguientes capítulos de esta tesis doctoral.

Capítulo 3

Estudios *in vitro* para evaluar la protección de cepas de bacterias lácticas frente a la toxicidad del arsenito

La reducción de la exposición a As inorgánico es una recomendación que han emitido varias agencias internacionales relacionadas con la salud y la seguridad alimentaria (EFSA 2009; Mayne 2023). Debido a su origen geológico, la presencia de As inorgánico en los acuíferos es inevitable. El empleo de agua contaminada para beber y cocinar, especialmente en poblaciones que se abastecen de pozos artesianos o en lugares donde no existen plantas de tratamiento, es un problema de salud que afecta a millones de personas. En los últimos años se han propuesto diferentes aproximaciones para reducir la absorción del tóxico o para aminorar los efectos generados a nivel sistémico.

El uso de cepas de BAL se ha investigado como posible estrategia para reducir la biodisponibilidad de contaminantes alimentarios, entre ellos elementos traza tóxicos (Chiocchetti et al. 2019a). Clemente et al. (2020) mostraron que la coexposición de BAL y As(V) o As(III) reducía la permeabilidad intestinal del As inorgánico en modelos celulares de epitelio. A diferencia de lo que ocurre con otros elementos traza tóxicos (Jadán Piedra et al. 2019; Zhai et al. 2016), no se han llevado a cabo estudios en animales de laboratorio que muestren si esta reducción se produce también *in vivo*.

En el presente estudio se ha evaluado *in vitro* la capacidad de dos cepas de bacterias lácticas, *Lactobacillus intestinalis* LE1 y *L. casei* BL23, para reducir la toxicidad intestinal de As(III) empleando modelos celulares de mucosa intestinal. Los datos han mostrado que las cepas ensayadas pueden ejercer un efecto protector, restaurando parcialmente la permeabilidad paracelular dañada por el As(III). Asimismo, se ha observado que esta protección la ejercen tanto las bacterias tratadas térmicamente como los medios condicionados (MC) obtenidos durante su crecimiento y que, por lo tanto, en esta reducción de la toxicidad pueden intervenir elementos estructurales y metabolitos u otro tipo de sustancias secretados por las bacterias.

1. RESULTADOS

1.1. Potencial de las BAL para captar/adsorber As(III)

La figura 45 muestra la cantidad de As retenido en las bacterias tras 2, 6 y 24 h de incubación a 37°C en medio salino con glucosa (3 g/L). Tal y como ya se había evidenciado previamente (Clemente et al. 2020), la cantidad de As(III) captado o adsorbido por las cepas de BAL es bajo; en estas condiciones no superó el 5% del total añadido inicialmente. El comportamiento de ambas cepas fue ligeramente distinto, siendo la BL23 (retención tras 24 h: 0.1 mg/L, 4.4%; 0.5 mg/L, 1.6%; 1 mg/L, 1.5%) más eficaz que la LE1 (retención tras 24 h: 0.1 mg/L, 1.5%; 0.5 mg/L, 0.5%; 1 mg/L, 0.5%). Además, esta captación fue dependiente de la concentración de As(III), siendo mayor el porcentaje de captación a la concentración más baja. El tiempo de tratamiento favoreció únicamente el proceso de captación de la cepa BL23 (aumento del porcentaje de retención entre las 2 h y las 24 h: 0.1 mg/L, 101%; 0.5 mg/L, 140%; 1 mg/L, 143%). La dependencia de la concentración puede indicar la presencia de algún proceso saturable, tal vez una incorporación al interior de la bacteria mediado por un transportador.

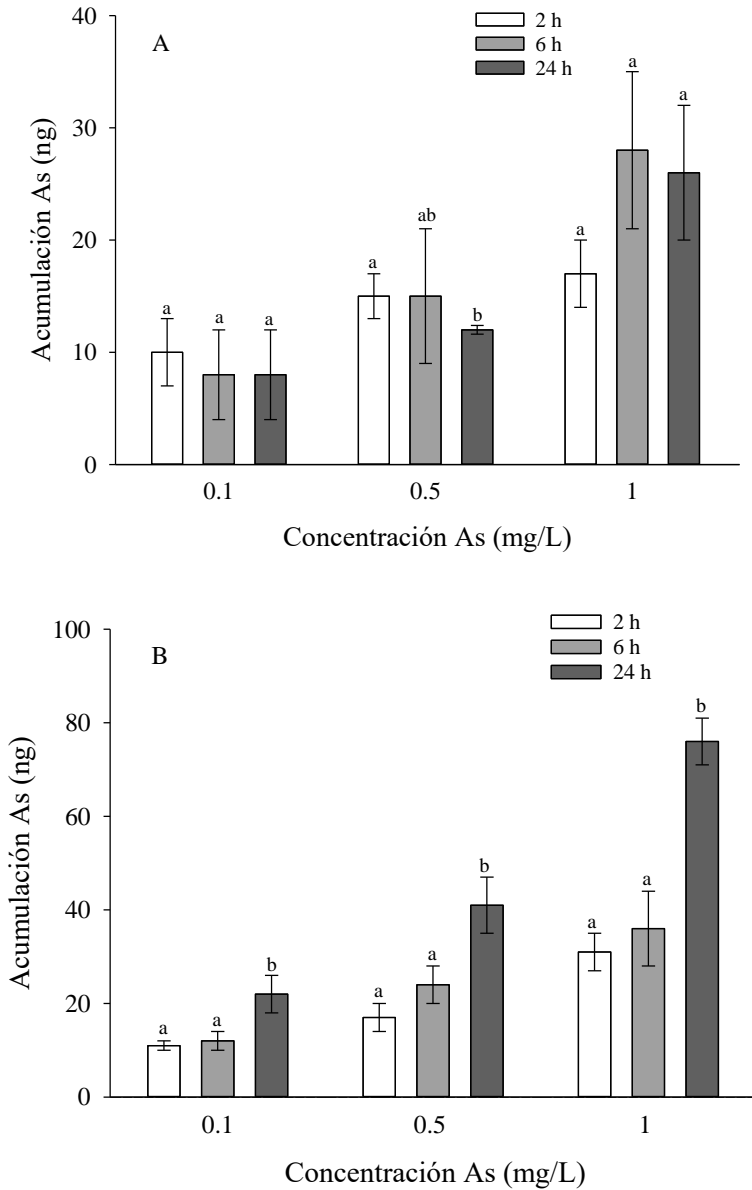


Figura 45. Acumulación de As en bacterias viables [(A) cepa LE1; (B) cepa BL23] tras incubación con As(III) en medio salino con glucosa. Valores expresados como ng As (media \pm SD, n=3-4). Las letras distintas muestran diferencias estadísticamente significativas entre tiempos de incubación para una misma concentración de As(III) ($p < 0.001$).

Para confirmar que las células bacterianas empleaban un mecanismo de internalización en lugar de una adsorción superficial para captar el As(III) del medio, se evaluó la acumulación en células no viables (Figura 46). Los resultados mostraron una acumulación en las bacterias BL23 no viables (retención tras 24 h: 0.1 mg/L, 0.76%; 0.5 mg/L, 0.95%; 1 mg/L, 1.19%) inferior a la acumulación observada para las BL23 viables. Sin embargo, la acumulación de las bacterias LE1 no viables (retención tras 24 h: 0.1 mg/L, 1.94%; 0.5 mg/L, 1.03%; 1 mg/L, 1.76%) no presentó diferencias significativas respecto a la observada para bacterias LE1 viables. Estos datos sugieren que la captación de As(III) por la cepa BL23 podría deberse en parte a un proceso de internalización celular que por el contrario no se evidencia para la LE1. En general, la adsorción/absorción de As(III) por parte de las cepas ensayadas es baja, aunque hay que señalar que las condiciones empleadas en la incubación no son las más adecuadas para mantener un metabolismo bacteriano normal.

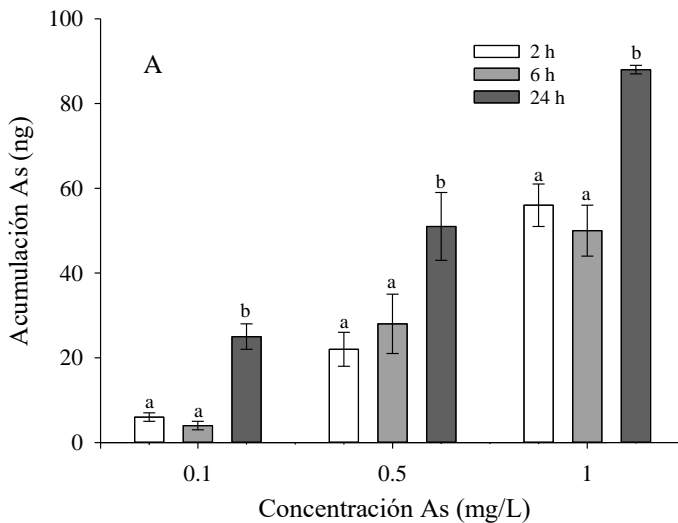


Figura 46. Acumulación de As en bacterias no viables [(A) cepa LE1; (B) cepa BL23] tras incubación con As(III) en medio salino con glucosa. Valores expresados como ng As (media \pm SD, n=3-4). Las letras distintas muestran diferencias estadísticamente significativas entre tiempos de incubación para una misma concentración de As(III) ($p < 0.001$).

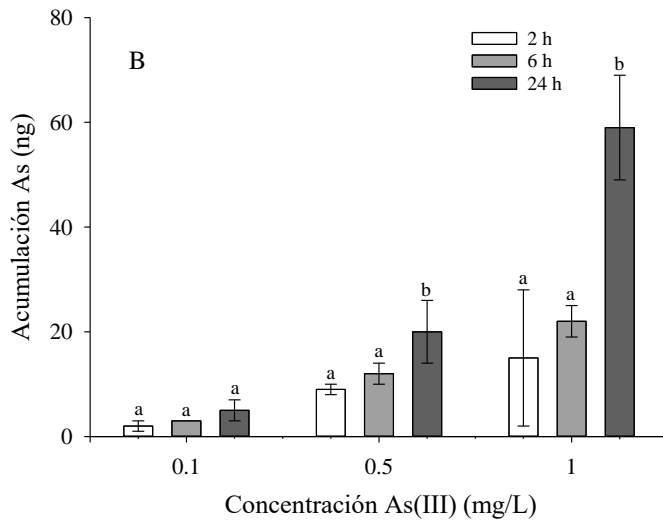


Figura 46. Continuación.

1.2. Evaluación del efecto protector empleando un modelo celular de mucosa intestinal

1.2.1. Estudios preliminares para determinar las condiciones de exposición

Se llevó a cabo un estudio previo para determinar la concentración de As(III) que debía emplearse en los ensayos subcrónicos. Para tal fin, el tricultivo se expuso apicalmente a un rango de concentraciones de As similar al reportado en alimentos o agua de bebida (0.75-2.5 mg/L) y se evaluó el transporte de LY a través de la monocapa Caco-2/HT29-MTX. Los datos de permeabilidad del marcador paracelular sólo mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control a la concentración más elevada de As(III) (Tabla 13), indicando que solo en esta condición se producía una disrupción de la barrera epitelial. Por este motivo, el resto de estudios *in vitro* se realizó exponiendo el modelo de mucosa intestinal a la concentración de 2.5 mg/L de As(III).

Tabla 13. Permeabilidad aparente del LY en las monocapas Caco-2/HT29-MTX cocultivadas con macrófagos y expuestas a distintas concentraciones de As(III). Valores expresados como cm/s (media \pm SD; n = 4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas de las células expuestas a As(III) respecto a las células control para un mismo experimento (p<0.001).

Concentraciones As(III)	Control	As(III)
0.75 mg/L	$2.21 \pm 0.09 \times 10^{-7}$	$2.28 \pm 0.10 \times 10^{-7}$
1.25 mg/L ^a	$1.99 \pm 0.02 \times 10^{-6}$	$1.26 \pm 0.06 \times 10^{-6}$
2.5 mg/L	$1.76 \pm 0.33 \times 10^{-7}$	$1.14 \pm 0.26 \times 10^{-6*}$

^a Este ensayo se realizó con insertos con una mayor densidad de poros, por ese motivo presenta unas permeabilidades muy superiores a los valores habituales.

1.2.2. Efecto de las estrategias sobre la respuesta prooxidante causada por el As(III)

La exposición subcrónica a As(III) aumentó significativamente la expresión de las proteínas de estrés *HSP70* y *MT2A* en macrófagos y en las monocapas de células intestinales, siendo en estas últimas la inducción mayor. Todas las estrategias ensayadas redujeron significativamente la sobreexpresión generada por el As(III), aunque, en la mayoría de los casos no se alcanzaron los niveles de expresión observados en las células control. Estos datos apuntan a una disminución de la respuesta prooxidante tras el tratamiento con las bacterias no viables o sus medios condicionados.

Tabla 14. Expresión génica de proteínas de estrés en macrófagos y Caco-2/HT29MTX cocultivados y expuestos a As(III) con o sin estrategias. Valores expresados como unidades de cambio de expresión respecto a las células no tratadas (media \pm SE, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células no tratadas.

Tipo celular	Gen	As(III)	LE1	BL23	MCLE1	MCBL23
THP-1	<i>HSP70</i>	4.3 \pm 1.1*	3.3 \pm 1.0*	3.6 \pm 1.0*	3.6 \pm 0.9*	3.4 \pm 1.0*
	<i>MT2A</i>	4.8 \pm 0.8*	2.6 \pm 0.6*	2.6 \pm 0.4*	1.8 \pm 0.4*	2.0 \pm 0.4*
Caco-2 HT29MTX	<i>HSP70</i>	6.2 \pm 2.9*	1.0 \pm 0.3	1.3 \pm 0.4	3.4 \pm 1.0*	2.4 \pm 0.8
	<i>MT2A</i>	15.6 \pm 5.7*	7.6 \pm 1.9*	9.3 \pm 2.4*	9.8 \pm 2.4*	6.1 \pm 1.8*

1.2.3. Efecto de las estrategias sobre la respuesta proinflamatoria causada por el As(III)

La figura 47 muestra la liberación de la citoquina proinflamatoria IL-8 al lado basolateral del tricultivo tras 8 días de exposición. Los datos muestran que las monocapas tratadas con As(III) presentaron un mayor contenido de IL-8 en el medio que las monocapas no tratadas (138%). Las estrategias redujeron la liberación de este mediador de inflamación, siendo las bacterias no viables [disminuciones respecto al As(III): LE1, 39%; BL23, 25%] más efectivas que los medios condicionados (MCLE1, 14%; MCBL23, 15%). Estos datos apuntan a una reducción de la respuesta proinflamatoria tras el tratamiento con las bacterias no viables o sus medios condicionados.

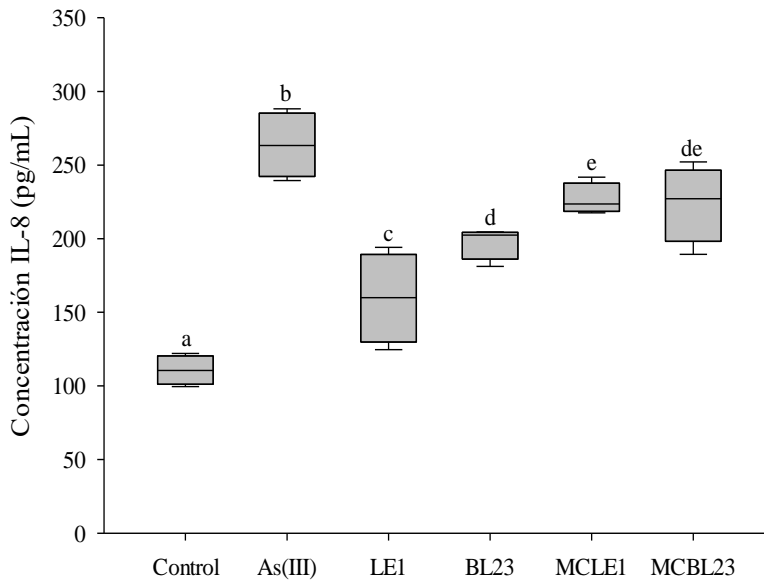


Figura 47. Efecto de las bacterias no viables y sus medios condicionados sobre la respuesta proinflamatoria causada por As(III). Valores expresados como pg/mL en el medio basolateral (media \pm SD, n=4). Las letras distintas muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

1.2.4. Efecto de las estrategias sobre componentes estructurales de la monocapa epitelial afectados por el As(III)

La tabla 15 muestra la expresión relativa de las proteínas de las uniones estrechas *CLDN-1* y *OCN* y de la mucina *MUC5AC* en monocapas intestinales tratadas con As(III) con o sin estrategias respecto a las no tratadas. Los tratamientos con As(III) afectaron la expresión de *CLDN-1* y *MUC5AC*, produciendo una regulación a la baja. Los tratamientos con bacterias y sus medios no revirtieron el efecto sobre la proteína de las uniones estrechas. Sin embargo, si disminuyeron las alteraciones transcriptómicas de la *MUC5AC*. Así, los tratamientos con ambos medios condicionados y con la bacteria BL23 inactivada térmicamente dieron lugar a expresiones de *MUC5AC* similares a las de las células control.

Tabla 15. Expresión génica de proteínas de las uniones y del mucus en monocapas Caco-2/HT29-MTX cocultivadas con macrófagos y expuestas a As(III) con o sin estrategias. Valores expresados como unidades de cambio de expresión respecto a las células no tratadas (media \pm SE, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células no tratadas.

Gen	As(III)	LE1	BL23	MCLE1	MCBL23
<i>CLDN-1</i>	0.51 \pm 0.21*	0.46 \pm 0.12*	0.61 \pm 0.16	0.28 \pm 0.07*	0.49 \pm 0.14
<i>OCLN</i>	0.68 \pm 0.26	0.73 \pm 0.19	0.62 \pm 0.18	0.52 \pm 0.13*	0.64 \pm 0.27
<i>MUC5AC</i>	0.27 \pm 0.10*	0.39 \pm 0.11*	0.70 \pm 0.17	0.68 \pm 0.17	0.73 \pm 0.23

La figura 48 muestra imágenes de la inmunodetección de ZO-1 en las monocapas Caco-2/HT29-MTX cocultivadas con macrófagos y expuestas a As(III) con o sin estrategias. Las células control (Figura 48A) presentaron una estructura típica de empedrado, con las líneas intercelulares bien definidas y con un tamaño celular bastante uniforme. Por el contrario, las células tratadas con As(III) (Figura 48B) mostraron un aumento del volumen celular con una distribución no uniforme de tamaños, con uniones menos lineales en algunos puntos. Los tratamientos con las distintas estrategias (Figuras 48C-48F) produjeron una reducción apreciable del volumen celular. Las líneas intercelulares se mostraron nuevamente definidas en algunos tratamientos con bacterias o sus medios condicionados (Figuras 48C y 48F).

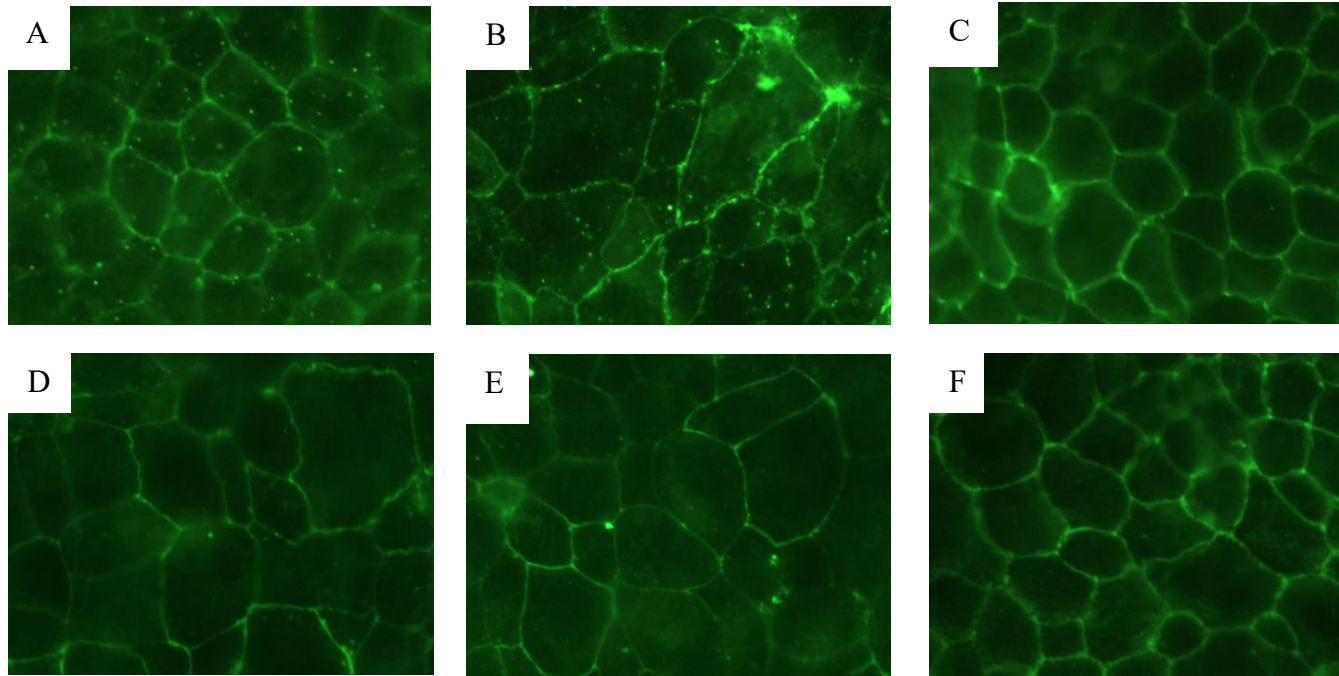


Figura 48. Inmunodetección de ZO-1 en monocapas de células Caco-2/HT29-MTX cocultivadas con macrófagos y expuestas a distintos tratamientos (A: control; B: 2.5 mg/L As(III); C: As(III) + LE1; D: As(III) + BL23; E: As(III) + MCLE1; F: As(III) + MCBL23).

1.2.5. Efectos de las estrategias sobre las alteraciones de la permeabilidad paracelular causadas por el As(III)

Los datos de permeabilidad aparente del LY (Figura 49) muestran un aumento en las monocapas tratadas con As(III) (361%) respecto a las monocapas no tratadas. Todas las estrategias ensayadas disminuyen significativamente la permeabilidad respecto a las monocapas tratadas únicamente con As(III), siendo en la mayoría de los casos la restauración casi completa. Las reducciones producidas por las bacterias no viables (LE1, 79%; BL23, 77%) son estadísticamente superiores a las producidas por los medios condicionados (MCLE1: 41%; MCBL23: 63 %).

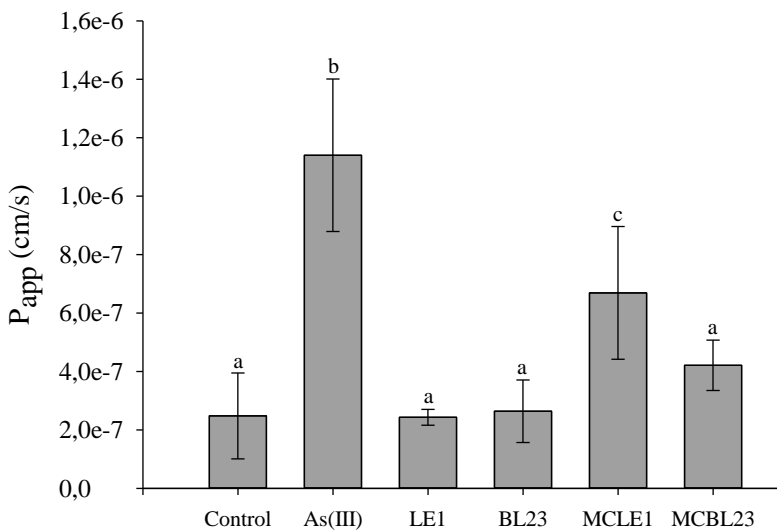


Figura 49. Permeabilidad aparente del LY en las monocapas Caco-2/HT29-MTX cocultivadas con macrófagos y expuestas a As(III) con o sin estrategias. Valores expresados como cm/s (media \pm SD; n=4). Las distintas letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

1.2.6. Efecto de las estrategias sobre el transporte apical-basolateral de As(III)

El transporte en sentido apical-basolateral de la especie arsenical también se ve afectado en presencia de las distintas estrategias (Figura 50). Todas ellas reducen de forma significativa el paso de As(III) a través de la monocapa epitelial (61-72%), sugiriendo que estas estrategias pueden ser eficaces reduciendo la absorción intestinal del metaloide.

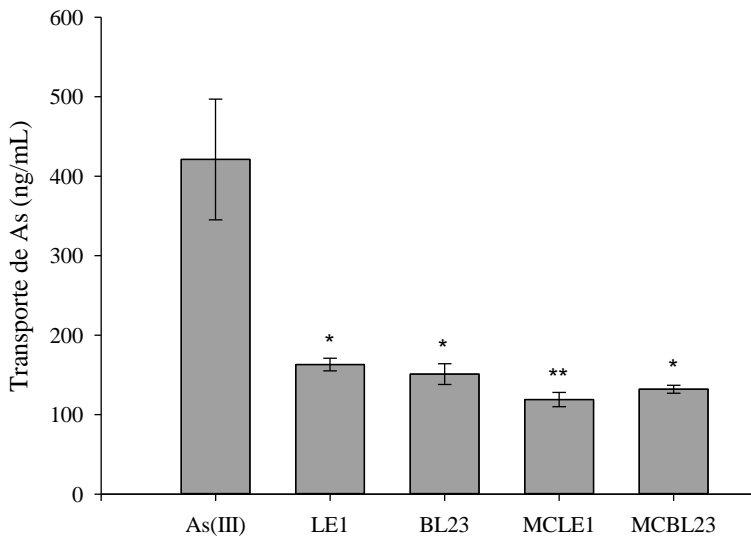


Figura 50. Transporte de As a través de las monocapas Caco-2/HT29-MTX cocultivadas con macrófagos y expuestas a As(III) con o sin estrategias. Valores expresados como ng As/mL (media \pm SD; n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a las monocapas tratadas únicamente con As(III) (**, $p < 0.001$; *, $0.001 \leq p < 0.05$).

2. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en el presente capítulo muestran que el tratamiento de los modelos celulares de mucosa intestinal con las bacterias no viables o sus medios condicionados protege frente a la acción tóxica del As(III). La funcionalidad de la monocapa intestinal, formada por las células absortivas y mucosecretoras, se restablece con ambos tipos de tratamiento, alcanzando en la mayoría de los casos los valores de permeabilidad existentes en las células no tratadas (Figura 49). El restablecimiento de la permeabilidad produce un efecto directo sobre el transporte de As(III), reduciendo su paso a través de la monocapa intestinal (Figura 50).

La reducción de la permeabilidad se debe al estrechamiento del paso paracelular que existe entre las uniones intercelulares, por lo tanto, afecta principalmente al transporte de aquellas sustancias que se transportan por esa vía. Estudios *in vitro*, realizados empleando monocapas Caco-2, han mostrado que el tratamiento con EDTA, un quelante de iones Ca^{+2} , que conlleva a la apertura de las uniones estrechas, favorece el paso de As(III), indicando que en el paso apical-basolateral de esta especie arsenical interviene un componente paracelular (Calatayud et al. 2011a). Si la reducción del transporte apical-basolateral del As(III) en los tratamientos con BAL o sus metabolitos se reproduce *in vivo*, supondría la reducción de la absorción intestinal y del paso del metaloide a la circulación sanguínea donde puede acumularse en los órganos diana y ejercer su efecto tóxico sistémico.

El efecto protector de las bacterias no se debe a un proceso de quelación del As(III). Estudios previos han mostrado que las cepas de BAL no tienen una elevada afinidad por este elemento traza (Clemente et al. 2020; Halttunen et al. 2007), lo mismo ocurre con las bacterias ensayadas en este capítulo (Figuras 45 y 46). El arsenito en estado ionizado es un oxoanión y, por tanto, no presenta una elevada afinidad por la superficie de las cepas de BAL, formada mayoritariamente por moléculas cargadas negativamente (Chiocchetti et al. 2019a). El arsenito podría unirse a las proteínas superficiales, especialmente a los residuos tiol, hecho

que explicaría la retención en las bacterias no viables. Pero, probablemente, la mayoría del As retenido se internalice a través de transportadores como las acuagliceroporinas (Garbinski et al. 2019), por ese motivo la retención es reducida y en las bacterias viables aumenta con el tiempo y con la reducción de la concentración. Al no haber una adsorción a superficie como ocurre con otros elementos traza (Alcántara et al. 2017; Daisley et al. 2019), la retención por parte de las bacterias es baja. Por tanto, aunque la reducción de la disponibilidad del metaloide para generar toxicidad pudiera contribuir ligeramente al efecto protector de las bacterias, se trata de un mecanismo minoritario.

La reducción de la respuesta prooxidante (Tabla 14) y proinflamatoria (Figura 47) observada en este estudio es posiblemente el principal mecanismo de restauración de la permeabilidad celular. El efecto antioxidante y antiinflamatorio de las cepas de bacterias lácticas ha sido descrito en estudios previos (Feng y Wang 2020; Kim et al. 2021; Lin et al. 2018). Estudios *in vitro*, empleando células del epitelio intestinal expuestas a estímulos proinflamatorios, han mostrado que los medios condicionados de ciertas cepas de BAL, y por lo tanto los metabolitos secretados, reducen la activación de rutas proinflamatorias/prooxidantes (Ménard et al. 2004). Los AGCC, especialmente el butirato, modulan la expresión y liberación de IL-8, MCP-1 y CXCL-1 por parte de las células epiteliales del intestino en respuesta a citoquinas y moléculas derivadas de microorganismos como el LPS (Vinolo et al. 2011). A los catabolitos bacterianos del triptófano también se les otorgan actividades antioxidantes y antiinflamatorias (Roager y Licht 2018). Se ha sugerido que estos metabolitos contribuyen a la homeostasis intestinal en gran medida a través de la activación del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), el cual modula e integra vías inmunológicas a múltiples niveles. Por lo tanto, las reducciones en la liberación de IL-8 y en la expresión de las proteínas de estrés observado en los macrófagos y las monocapas intestinales en presencia de los medios condicionados podría deberse a la acción conjunta de estos u otros metabolitos.

El efecto protector de bacterias inactivadas también se ha puesto de manifiesto en varios estudios *in vitro*. El uso de *Lactobacillus casei* ATCC393 inactivado mostró un efecto protector sobre la disrupción de las proteínas de las uniones estrechas en células Caco-2 sometidas a estrés osmótico (Samak et al. 2021). El efecto antioxidante y antiinflamatorio de las bacterias no viables puede ser en parte consecuencia de los elementos estructurales de su superficie. Entre los componentes de la pared celular se encuentran los mucopéptidos derivados de los peptidoglicanos, los exopolisacáridos (EPS), los ácidos teicoicos o lipoteicoicos y las moléculas que sobresalen de la superficie, como las fimbrias o los flagelos (Bourebaba et al. 2022). Wu et al. (2013) evidenciaron la capacidad antiinflamatoria de la fracción de peptidoglicanos aislada de *L. acidophilus*, la cual reducía los niveles de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en macrófagos activados con LPS. Kim et al. (2012) mostraron que la respuesta inflamatoria de HT-29 a la estimulación con TNF- α era inhibida por el tratamiento con el ácido lipoteicoico procedente de *L. plantarum*. Este efecto protector era debido a la inhibición del NF- κ B y de las MAPKs.

La reducción del estrés y del proceso inflamatorio producida por estos componentes o metabolitos bacterianos redundando finalmente en una menor afección estructural de la monocapa intestinal. Se observa un aumento de la expresión de la mucina mayoritaria del mucus secretado por las HT29-MTX (Tabla 15). Además, morfológicamente, las monocapas tratadas con las estrategias presentan volúmenes celulares similares a las células control y unas líneas intercelulares más definidas (Figura 48). La restauración de estos componentes de la barrera debido a la activación de los mecanismos de protección por parte de las sustancias bacterianas permite finalmente el restablecimiento de la integridad de la barrera y la disminución del transporte a través de la monocapa intestinal del As(III).

3. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente estudio muestran que las bacterias LE1 y BL23 son buenas candidatas para reducir la exposición interna y la toxicidad intestinal del As(III). La acción protectora podría ser el resultado de la acción antioxidante y antiinflamatoria de componentes de la pared o de metabolitos secretados por estas bacterias, ya que no presentan una elevada capacidad de quelar este elemento traza tóxico. Se ha evidenciado que tanto el uso de bacterias no viables como el tratamiento con el secretoma obtenido durante su crecimiento son alternativas igualmente eficaces. Este hecho es positivo ya que estas aproximaciones postbióticas presentan menos problemas a la hora de emplearse en poblaciones expuestas.

El resultado observado *in vitro* podría no reproducirse *in vivo*, ya que existen muchas variables que no pueden introducirse en un modelo celular (algunos tipos celulares epiteliales y del sistema inmune con sus respectivos secretomas y con sus interacciones, sustancias presentes en el lumen procedentes de la dieta, la gran riqueza de microorganismos que constituyen la microbiota colónica). Es, por tanto, necesario evaluar la eficacia de las estrategias dietéticas en modelos animales, antes de proponer su aplicación en poblaciones expuestas. Este va a ser el objetivo del capítulo 4.

Capítulo 4

Evaluación *in vivo* de la eficacia de cepas de bacterias lácticas para reducir la toxicidad generada por una exposición crónica a arsenito

Los datos del capítulo 3 muestran *in vitro* que es posible reducir el transporte y la toxicidad del As(III) empleando cepas de BAL no viables o su medio condicionado. El hecho de que ambos tipos de tratamiento generen este efecto protector indica que tanto los elementos estructurales como los metabolitos de las BAL pueden activar los mecanismos responsables de esta protección. Por ese motivo en el presente capítulo se ha evaluado la eficacia de las cepas BAL empleando bacterias viables, estrategia que aúna elementos estructurales y metabolitos.

En el modelo animal entran en juego algunos tipos celulares que no se habían contemplado en el modelo *in vitro*. Teniendo en cuenta que las BAL se consideran importantes inmunomoduladores, posiblemente sea el sistema inmune asociado al intestino el que más peso tenga en las posibles diferencias respecto a los estudios *in vitro*. Por otro lado, los ratones tienen una microbiota propia con sus metabolitos que seguramente también influya en el efecto de los probióticos. Finalmente, los procesos que acontecen en el tracto gastrointestinal también pueden afectar la eficacia de las estrategias. No hay que olvidar que los procesos digestivos pueden reducir la viabilidad de los probióticos ingeridos vía oral o pueden afectar la estructura de alguno de sus metabolitos. De ahí, la necesidad de confirmar la eficiencia de las estrategias en este sistema dinámico de mayor complejidad.

El objetivo del presente estudio, por lo tanto, ha sido confirmar en modelos animales el efecto protector de las cepas LE1 y BL23 frente a la toxicidad intestinal del As(III) y su posible papel en la reducción de la absorción intestinal del metaloide. Los datos han mostrado que las dos cepas ensayadas reducen la acumulación tisular del metaloide, y, por lo tanto, todo apunta a que pueden reducir su absorción a través de la mucosa del intestino. Además, también se observa una disminución de la respuesta prooxidante y proinflamatoria en el tejido intestinal en relación a los animales tratados sólo con As(III). Este hecho conlleva una normalización de la permeabilidad en los animales tratados con las bacterias. Los resultados obtenidos en animales corroboran los datos obtenidos *in vitro* en relación a los posibles mecanismos de protección de ambas cepas.

1. RESULTADOS

1.1. Estado general de los animales durante la exposición

El tratamiento subcrónico con As(III) o con As(III) y bacterias no influyó en el estado físico general ni el comportamiento de los animales respecto a los no tratados (grupo control). Durante la exposición hubo que sacrificar un ratón del grupo coadministrado con As(III) y la cepa LE1 debido a la aparición de un absceso. Los tratamientos tampoco afectaron al aumento de peso y el consumo de alimento. Sin embargo, supusieron una reducción significativa del consumo de agua respecto al grupo no expuesto [As(III): 34%; As(III) + LE1: 41%; As(III) + BL23: 38%], tal y como se había puesto de manifiesto previamente en los animales tratados con As(III) y As(V) (capítulo 1 y 2, apartado 1.1). Las heces de los ratones fueron similares en frecuencia y consistencia en todos los grupos.

1.2. Efecto protector de las cepas BAL frente a la respuesta prooxidante causada por el As(III)

Los datos de la oxidación de la H₂DCF (Figura 51) mostraron aumentos estadísticamente significativos en los niveles de ROS/RNS en los animales tratados subcrónicamente con As(III), siendo mayores los incrementos en intestino grueso (124%) que en intestino delgado (16%). El tratamiento con BAL mostró un efecto protector, disminuyendo significativamente las concentraciones de ROS/RNS en intestino grueso (LE1: 35%; BL23: 41%) e intestino delgado (LE1: 13%; BL23: 8%) en relación con los animales tratados sólo con As(III).

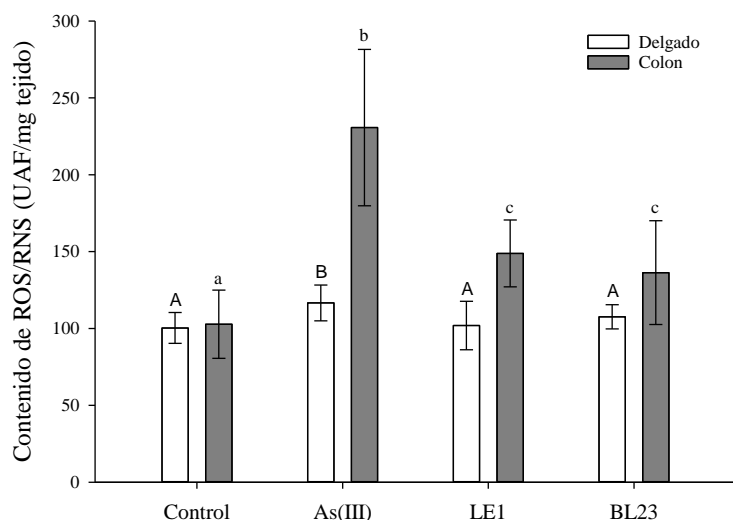


Figura 51. Contenidos de ROS/RNS medidos por oxidación de la H_2DCF en animales control, tratados con As(III) y con As(III) y BAL. Valores expresados como UAF/mg de tejido (media \pm SD, n=7-8). Las distintas letras (mayúsculas para intestino delgado y minúsculas para intestino grueso) muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

El establecimiento de una situación de estrés oxidativo se confirmó a través de los datos obtenidos con la evaluación de la peroxidación lipídica (Figura 52). El tratamiento con As(III) produjo un aumento estadísticamente significativo en ambas porciones del intestino, siendo mayor en intestino grueso (51%) que en intestino delgado (15%). El tratamiento con la cepa BL23 redujo la concentración de peróxidos lipídicos respecto a los tratamientos sólo con As(III) en intestino delgado (BL23: 17%), mientras que en intestino grueso se observaron reducciones en presencia de las dos cepas (LE1: 36%; BL23: 39%).

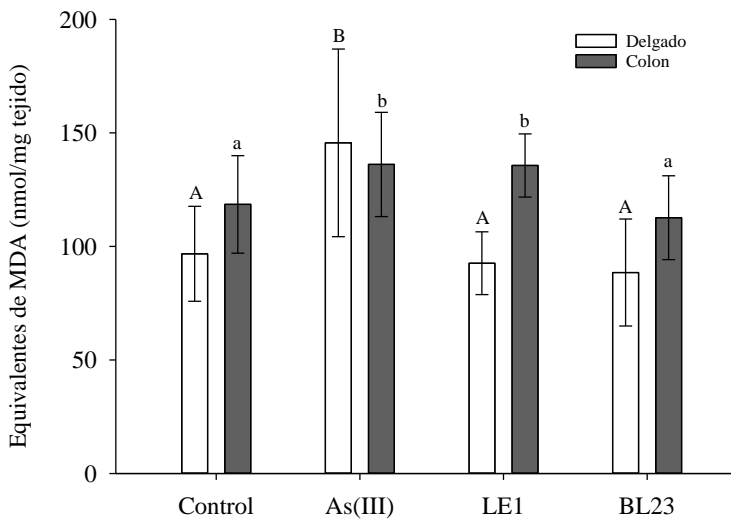


Figura 52. Concentración de equivalentes MDA en animales control, tratados con As(III) y con As(III) y BAL. Valores expresados como nmol/mg tejido (media \pm SD, n = 7-8). Las distintas letras (mayúsculas para intestino delgado y minúsculas para intestino grueso) muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

La medida de los niveles de GSH también evidenció una respuesta prooxidante como consecuencia de la exposición subcrónica a As(III) (Figura 53). La concentración de GSH redujo significativamente en ambas porciones de intestino, con una mayor reducción en intestino delgado (22%) que en intestino grueso (18%). El tratamiento con la LE1 aumentó el contenido de GSH intracelular con respecto a los animales tratados con As(III) en intestino delgado (18%) y en intestino grueso (12%). Sin embargo, la cepa BL23 no modificó los niveles de GSH respecto a los animales tratados sólo con As(III).

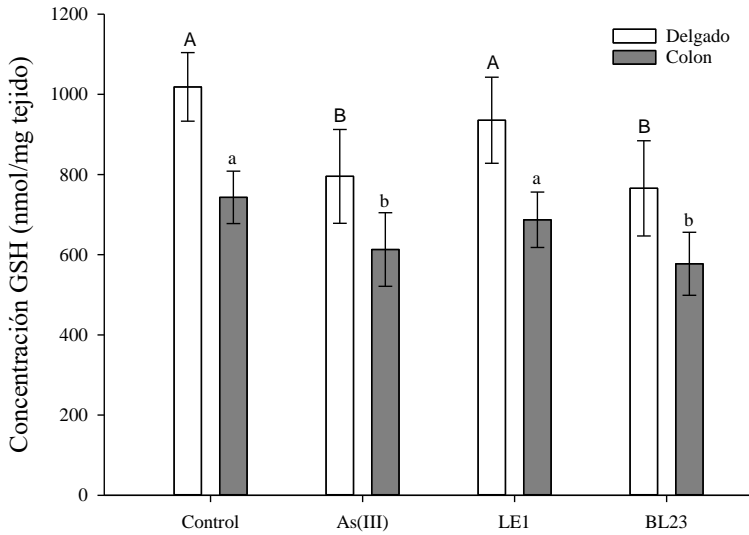


Figura 53. Concentración de GSH en animales control, tratados con As(III) y con As(III) y BAL. Valores expresados como nmol/mg tejido (media \pm SD, n=7-8). Las distintas letras (mayúsculas para intestino delgado y minúsculas para grueso) muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

1.3. Efecto protector de las cepas BAL frente a la respuesta proinflamatoria causada por el As(III)

Tras dos meses de exposición, no se observó un aumento de las citoquinas proinflamatorias en el intestino delgado de los animales tratados con As(III) (datos no mostrados); sin embargo, si se puso de manifiesto un aumento de los contenidos en el tejido colónico de los animales expuestos al metaloide (IL-1 β : 139%, TNF- α : 170%) (Figura 54). El tratamiento con BAL produjo una disminución estadísticamente significativa de la concentración de la citoquina IL-1 β respecto a los animales tratados únicamente con As(III) (reducciones: LE1, 33%; BL23, 45%). La liberación de la citoquina TNF- α , aunque mostró una tendencia a la reducción con las dos cepas de BAL (reducciones: LE1, 42%; BL23, 42%), estas no fueron estadísticamente significativas respecto a los animales tratados únicamente con As(III).

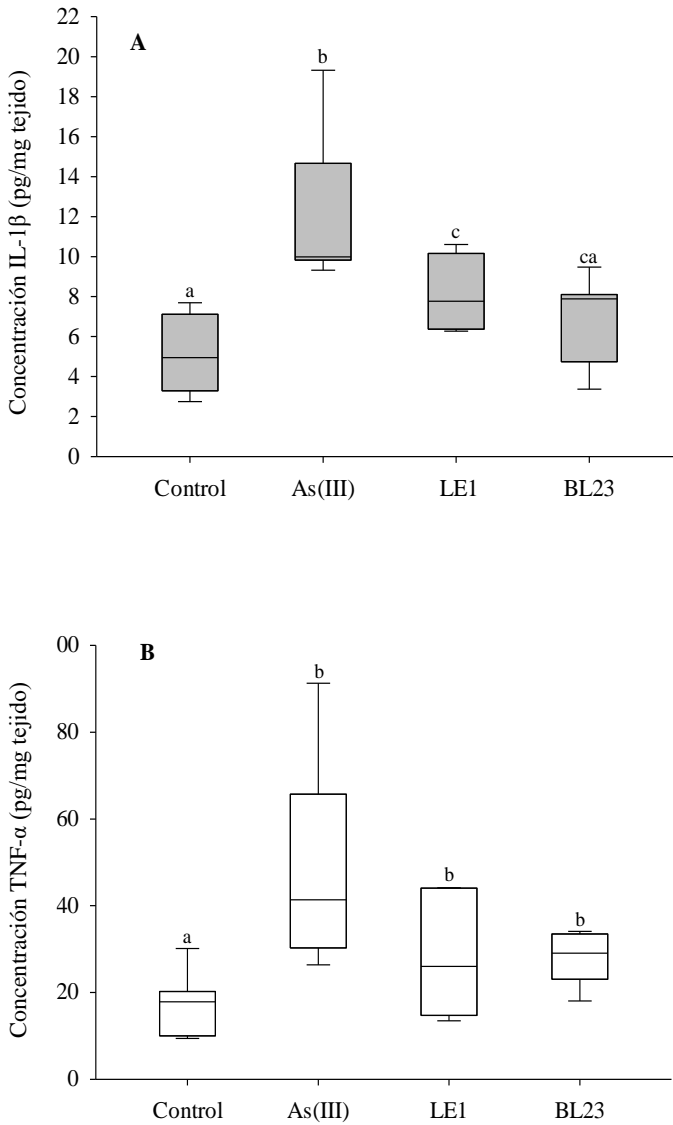


Figura 54. Concentración de IL-1 β (A) y TNF- α (B) en colon de animales control, tratados con As(III) y con As(III) y BAL. Valores expresados como pg/mg tejido (media \pm SD, n = 7-8). Las distintas letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

1.4. Efecto protector de las BAL frente a las alteraciones de las uniones intercelulares y el mucus causadas por el As(III)

La tabla 16 muestra las expresiones relativas de las proteínas de las uniones estrechas en los distintos tratamientos con As y bacterias respecto a los animales no tratados. Los datos mostraron una reducción de la expresión de *Cldn3* y *Ocln* en los animales tratados únicamente con As(III). Los tratamientos con las cepas aumentaron los niveles de expresión de ambas proteínas, obteniéndose expresiones similares a las halladas en los animales del grupo control.

Tabla 16. Expresión relativa de *Cldn1* y *Ocln* en ratones expuestos crónicamente a As(III) y As(III) con BAL respecto a animales no tratados. Valores expresados como cambios de expresión respecto a los animales control (media \pm SE, n=7-8). Los asteriscos indican una regulación a la baja estadísticamente significativa respecto a los animales control ($p < 0.05$).

Gen	As(III)	As(III) + LE1	As(III) + BL23
<i>Cldn3</i>	0.36 \pm 0.23*	0.61 \pm 0.37	0.61 \pm 0.32
<i>Ocln</i>	0.46 \pm 0.34*	0.80 \pm 0.59	0.65 \pm 0.45

La figura 55 muestra los contenidos de MUC2 en el tejido colónico analizados mediante ELISA. Al igual que habíamos observado previamente en los animales tratados con As(III) durante 6 meses (capítulo 1, apartado 1.5), el tratamiento subcrónico disminuyó significativamente el contenido proteico de MUC2 en el colon de los animales expuestos al metaloide respecto a los animales no tratados (27%). La administración de ambas cepas de BAL revertió la situación, observándose en estos animales contenidos de MUC2 similares a los de los animales no tratados.

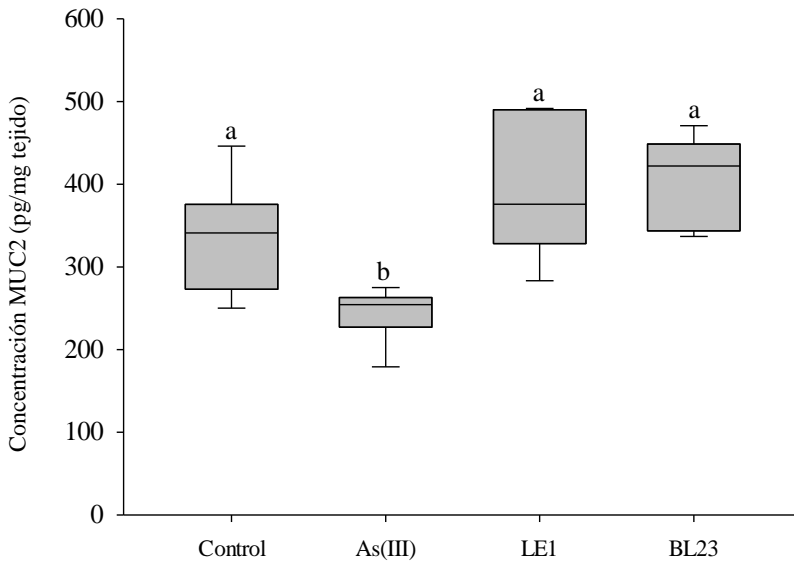


Figura 55. Efecto de la administración de BAL sobre los niveles de MUC2. Valores expresados como pg de MUC2/mg de tejido (media \pm SD, n=7-8). Las distintas letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

1.5. Efecto protector de las cepas BAL frente a las alteraciones funcionales y los signos de endotoxemia causados por la exposición a As(III)

La figura 56 muestra la concentración de albúmina fecal en los ratones tratados con As(III) o coexpuestos con las cepas BAL tras 2 meses de tratamiento. Los datos mostraron un aumento estadísticamente significativo en la concentración de albúmina en las heces de los animales tratados con As(III) (258%). El tratamiento con ambas BAL redujo la concentración fecal de este marcador de permeabilidad intestinal respecto a los animales tratados sólo con As(III) (reducciones: LE1, 35%; BL23, 35%).

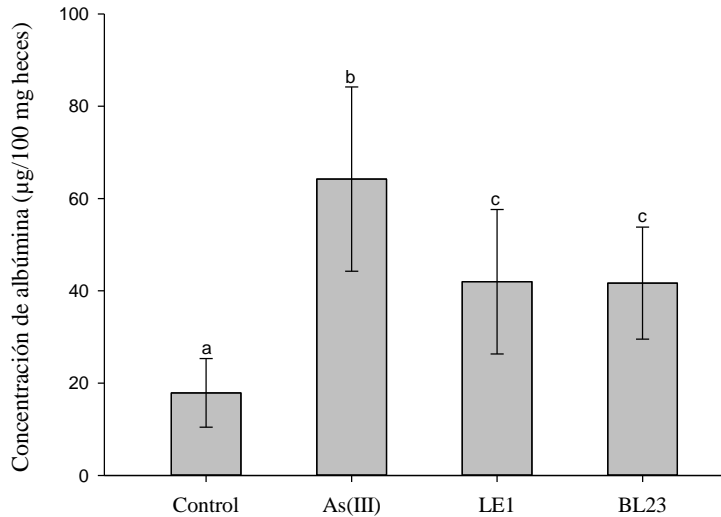


Figura 56. Concentración de albúmina fecal en animales control, tratados con As(III) y tratados con As(III) y BAL. Valores expresados como $\mu\text{g}/100$ mg heces (media \pm SD, $n=7-8$). Las distintas letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p<0.05$).

Los datos de LBP (Figura 57) también mostraron un aumento estadísticamente significativo en los animales tratados sólo con As(III) respecto a los animales control (14%). Nuevamente la administración de ambas cepas redujo significativamente este parámetro respecto a los animales tratados únicamente con el metaloide (reducciones: LE1, 7%; BL23, 14%).

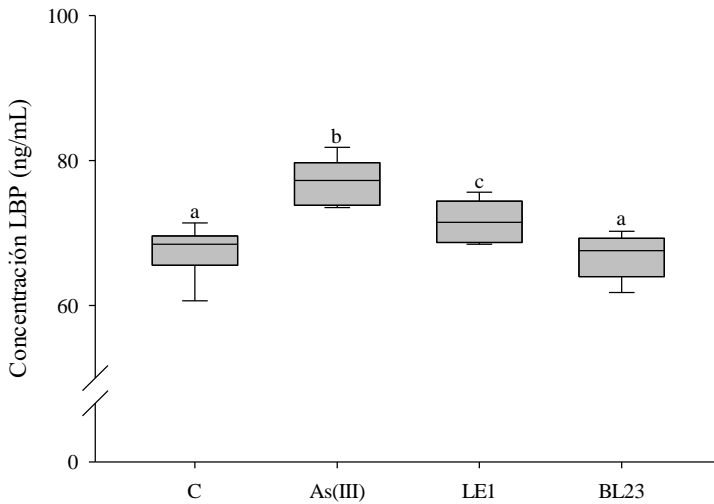


Figura 57. Concentración de LBP en suero de animales control, tratados con As(III) y tratados con As(III) y BAL. Valores expresados como ng/mL (media \pm SD, n=7-8). Las distintas letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

1.6. Efecto protector de las cepas BAL frente a las alteraciones del metabolismo de AGCC causadas por el As(III)

La figura 58 muestra la concentración de ácido acético, propiónico y butírico en las heces de los animales control y los tratados con As(III) o As(III) y BAL. En general, el tratamiento con As(III) produjo una disminución en la concentración de todos los AGCC analizados (acético: 54%, propiónico: 43%, butírico: 60%). El tratamiento con BAL revirtió la situación parcialmente, generando un aumento estadísticamente significativo en la concentración de ácido acético (BL23: 40%), ácido propiónico (LE1: 29%; BL23: 39%) y ácido butírico (LE1: 41%) respecto a los animales tratados únicamente con As(III).

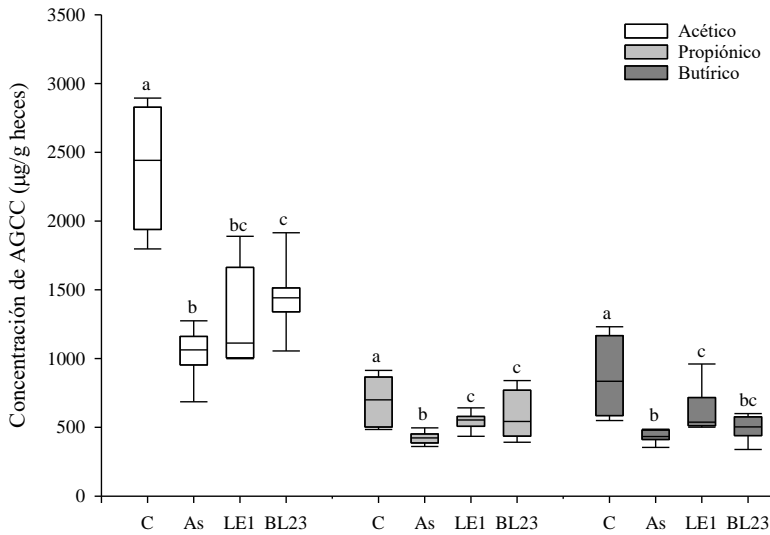


Figura 58. Concentraciones de AGCC en heces de animales control, tratados con As(III) y tratados con As(III) y BAL. Valores expresados como μg de AGCC/g de heces (media \pm SD, $n=7-8$). Las distintas letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para cada ácido graso ($p < 0.05$).

1.7. Mecanismos de reducción de toxicidad

1.7.1. Efecto sobre la acumulación tisular

La figura 59 muestra las concentraciones de As total en distintos tejidos de los animales tratados con As(III) o con As(III) y las cepas BAL. Los datos muestran reducciones significativas del contenido en todos los tejidos en presencia de alguna de las cepas BAL estudiadas. En el colon y en el riñón, ambas cepas redujeron la acumulación siendo similares las reducciones observadas en el tejido colónico (LE1: 47%; BL23: 42%) y en el renal (LE1: 47%; BL23: 36%), En el hígado, sólo el tratamiento con LE1 disminuyó la acumulación (29%); mientras que, en el intestino delgado, fue el tratamiento con BL23, el que generó la reducción (46%). Por lo tanto, el tratamiento con BAL reduce la cantidad de As

presente en el tejido intestinal, hecho que podría explicar, en parte, la reducción de la respuesta al tóxico observada. Por otro lado, disminuye la acumulación en órganos internos, lo que sugiere que las cepas de alguna forma están modulando la entrada del tóxico a la circulación sistémica.

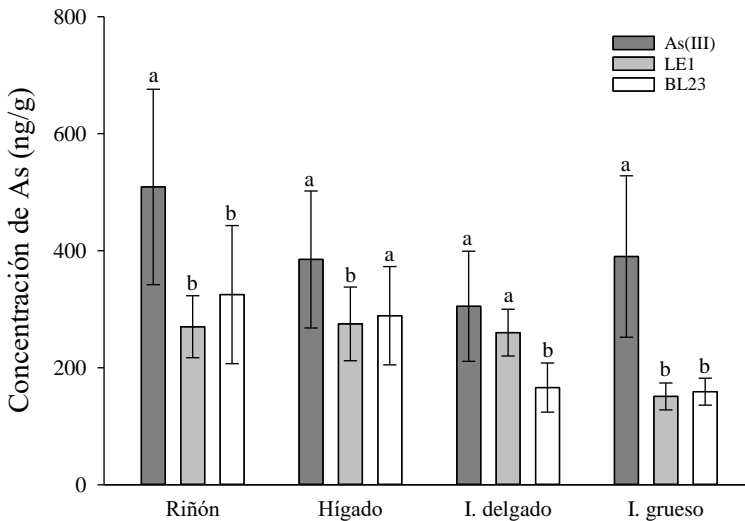


Figura 59. Concentraciones de As en el tejido de animales tratados con As(III) con o sin la administración de cepas BAL. Valores expresados como ng/g (media \pm SD, n=7-8). Las distintas letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para cada órgano ($p < 0.05$).

1.7.2. Activación de rutas de señalización antiinflamatorias/antioxidantes

La figura 60 muestra un esquema de la ruta Nrf2 (factor nuclear *eritroide 2*)/Keap1 (proteína asociada a ECH de tipo Kelch 1)/ARE (elemento de respuesta antioxidante), la cual permite la síntesis de una serie de moléculas, entre ellas la hemooxigenasa 1 (HO-1). Este enzima puede ejercer su función antioxidante a distintos niveles, entre ellos, favoreciendo la síntesis de la citoquina antiinflamatoria IL-10 y, por tanto, la activación de la ruta de señalización IL-10.

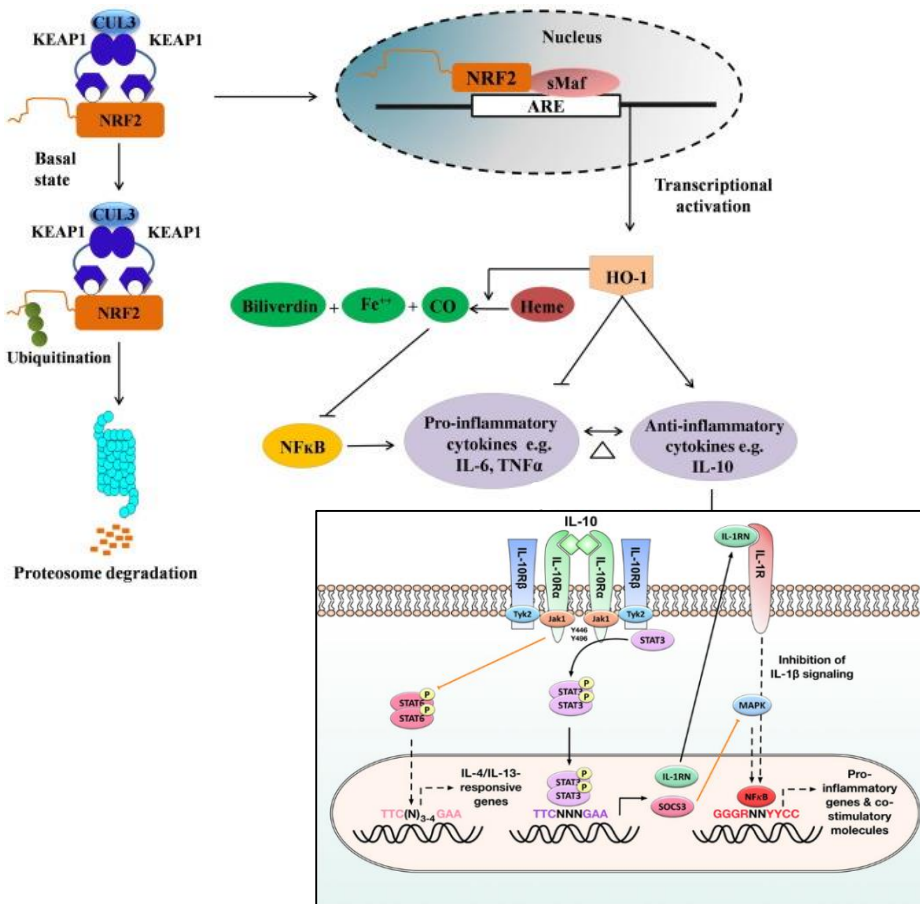


Figura 60. Ruta Nrf2/Keap1/ARE (Ahmed et al. 2017) y ruta IL-10 (Schülke 2018).

Los datos de expresión génica relativa de algunos componentes de estas rutas se muestran en la tabla 17. Los animales coadministrados con las dos cepas bacterianas presentan regulaciones al alza de algunos de estos componentes respecto a los animales tratados únicamente con As(III), sugiriendo que podría haber una activación de estas rutas en presencia de las cepas bacterianas.

Tabla 17. Expresión relativa de componentes de la ruta NRF2 e IL-10 en ratones expuestos crónicamente a As(III) y BAL respecto a animales tratados sólo con As(III). Valores expresados como cambios de expresión (media \pm SE, n = 7-8). Los asteriscos indican una sobreexpresión estadísticamente significativa respecto a los animales tratados únicamente con As(III) ($p < 0.05$).

Gen	LE1	BL23
<i>Il10</i>	1.75 \pm 0.46*	1.57 \pm 0.26*
<i>Nrf2</i>	1.47 \pm 0.18*	1.60 \pm 0.26*
<i>Ho1</i>	1.27 \pm 0.15	1.52 \pm 0.24*
<i>Il-10r2</i>	0.74 \pm 0.17	0.82 \pm 0.27
<i>Socs-3</i>	1.46 \pm 0.65	1.52 \pm 0.58

1.7.3. Diminución de la activación de rutas de señalización proinflamatorias/prooxidantes

La figura 61 muestra la expresión proteica de la forma activada de la ruta proinflamatoria/prooxidante p38 MAPK. Al igual que ocurría en la exposición crónica a As(III) (capítulo 1, apartado 1.5), los ratones expuestos durante 2 meses presentaron un aumento de la forma fosforilada de esta quinasa, indicando una activación de la ruta (aumento: p38 MAPK, 82%). La administración de las cepas redujo significativamente los contenidos de esta forma fosforilada respecto a los animales tratados únicamente con As(III) (reducciones: LE1, 38%; BL23, 33%).

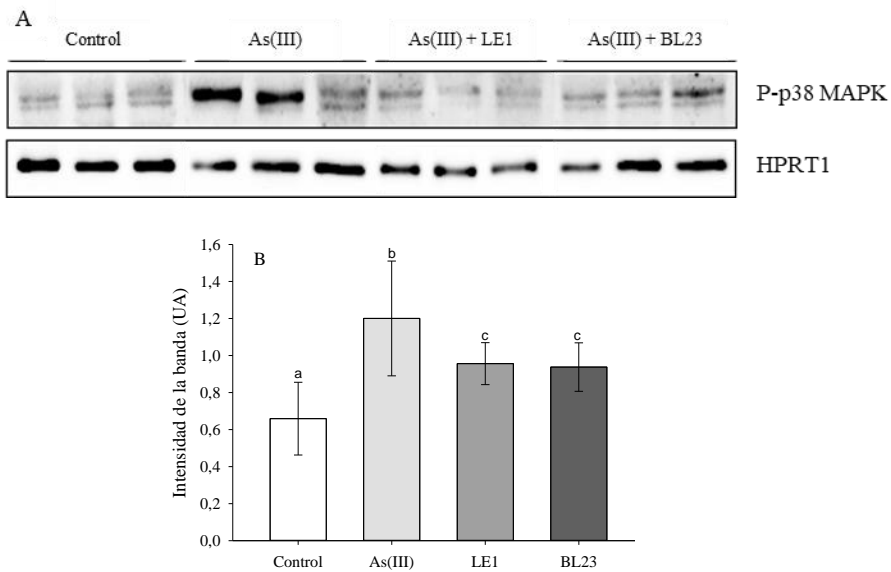


Figura 61. Efecto de las cepas BAL sobre la vía de señalización p38 MAPK activada por la exposición a As(III). (A) Western blot de fosfo-p38. Se muestran sólo tres muestras representativas de cada tratamiento. Se utilizó HPRT1 como control de carga para la normalización. (B) Niveles proteicos cuantificados por densitometría, normalizados y expresados como unidades estándar (UA, media \pm SD, n = 6). Los asteriscos indican aumentos estadísticamente significativos con respecto al control ($p < 0.05$).

1.8. Estudio de la relación entre las variables y los tratamientos

La variabilidad global de los parámetros de toxicidad intestinal se analizó mediante el análisis de componentes principales (PCA). Un gráfico bidimensional explicó el 97.5 % de la varianza total (Figura 62). La primera dimensión (78.3 % de la variabilidad) se relacionó positivamente con los mediadores de inflamación (TNF- α , IL-1 β) y de estrés (ROS/RNS, MDA), con la acumulación de As a nivel colónico y con los marcadores de permeabilidad (albúmina) y endotoxemia (LBP) y negativamente con la concentración de los AGCC y el contenido de GSH colónico. Esta dimensión permitió la división de los tratamientos en dos bloques,

uno formado por los animales tratados con As(III) y otro donde se incluían los animales control y los tratados con As(III) y las cepas BAL. Este análisis muestra el efecto protector de las bacterias ensayadas y los factores que influyen en este efecto.

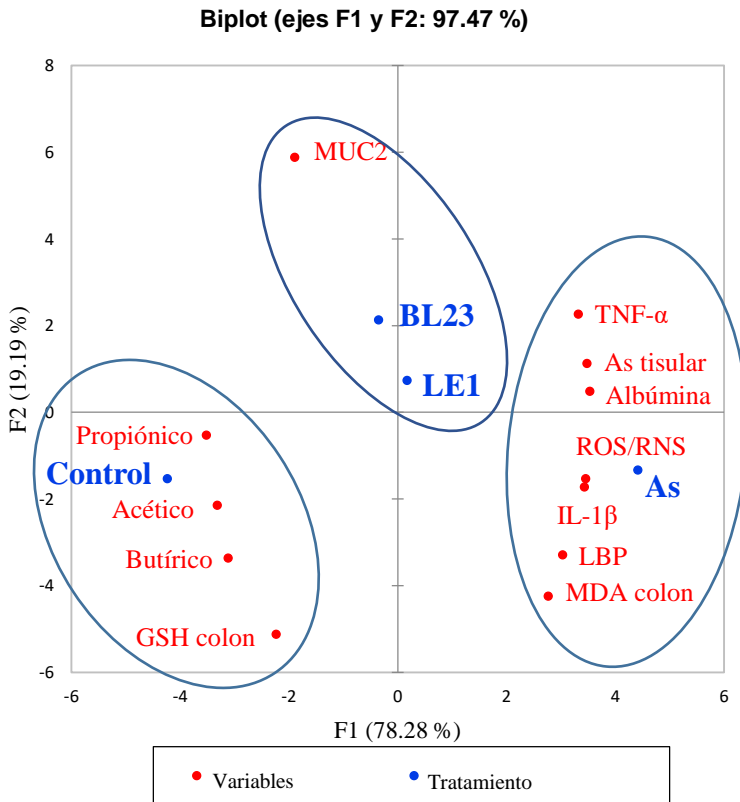


Figura 62. Diagrama PCA bidimensional de las variaciones de algunos de los parámetros analizados en el presente estudio entre los diferentes tratamientos [Control, As(III), As(III) + LE1 y As(III) + BL23].

2. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en este capítulo corroboran la toxicidad de As inorgánico a nivel intestinal observada en los capítulos anteriores. La exposición subcrónica (2 meses) a As(III) a través del agua de bebida genera una respuesta similar a la observada en la exposición crónica (6 meses, capítulo 1). La protección evidenciada *in vivo* tras la administración de las cepas de BAL es un resultado prometedor, ya que demuestra que puede reducirse la toxicidad intestinal de una exposición crónica a As(III) a través del agua de bebida mediante una intervención dietaria. El tratamiento también produce una disminución de los niveles séricos del marcador de endotoxemia LBP (Figura 57), además de producir una reducción relevante de los niveles del metaloide en órganos diana internos (Figura 59), lo que apunta a la posibilidad de que también haya un efecto protector a nivel sistémico.

El uso de bacterias lácticas como elementos funcionales dentro de una dieta está ampliamente extendido. Numerosos miembros de la familia Lactobacillaceae están reconocidos como microorganismos GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) y QPS (*Qualified Presumption of Safety*) por EFSA. Hay que destacar, además, que una de las cepas empleadas en este estudio, la cepa *L. casei* BL23, es de origen humano. Cepas de esta especie se emplean en la fabricación de productos alimentarios y suplementos dietéticos (Sánchez et al. 2019); de hecho, algunas de estas cepas se consideran probióticos (Hill et al. 2018). Esto hace más viable su aplicación como estrategia de intervención poblacional.

Los mecanismos de protección que inducen estas bacterias pueden ser variados, pero en ambos casos convergen hacia una reducción significativa de la permeabilidad intestinal (Figura 56), modo de acción evidenciado previamente en el modelo celular (capítulo 3, apartado 1.2.5). Esta restauración de la barrera puede ser el resultado de la reducción de los niveles de mediadores de inflamación (Figura 54) y de estrés oxidativo (Figuras 53) en los animales administrados con

las cepas BAL respecto a los animales tratados sólo con As(III), hecho ya puesto de manifiesto *in vitro* (capítulo 3, apartado 1.2.2 y 1.2.3). En esta reducción pueden intervenir dos mecanismos de acción que no pueden considerarse independientes: a) una menor internalización del As inorgánico en los tejidos intestinales, tal y como se ha evidenciado en este estudio (Figura 59) y/o, b) una actividad antioxidante y antiinflamatoria propia de las cepas bacterianas generada a través de la activación de determinadas rutas de señalización (Tabla 17). Todo ello conlleva a una restauración de los distintos componentes que influyen en la integridad de la barrera (mucus, uniones intercelulares del epitelio, metabolismo bacteriano), hecho que permite el restablecimiento de una barrera intestinal dañada por la exposición subcrónica a As(III).

Se ha demostrado en el capítulo 3 que las cepas bacterianas ensayadas son capaces de retener un porcentaje de As(III) de alrededor del 5% en unas condiciones de ensayo que posiblemente no son las más favorables para el metabolismo bacteriano (medios de incubación con una reducción importante de nutrientes básicos, condiciones de aerobiosis) (capítulo 3, apartado 1.1). Es posible que esta captación de As por parte de las bacterias se produzca en el lumen y que esto contribuya, aunque sea de forma minoritaria, a una menor acumulación en el tejido intestinal.

Por otro lado, el restablecimiento de algunos componentes de la barrera también puede favorecer la reducción de la acumulación intestinal del metaloide. En este estudio, se ha puesto de manifiesto que la administración de las cepas BAL aumenta significativamente el contenido tisular de MUC2 (Figura 55), componente mayoritario de la capa de mucus intestinal. La normalización de la expresión de la mucina por las BAL ya se había puesto de manifiesto en el modelo *in vitro* (capítulo 3, apartado 1.2.4). Estudios previos han mostrado que la forma trivalente inorgánica tiende a acumularse en la capa de mucus (Calatayud et al. 2012c), lo que impide que se internalice en la monocapa de células epiteliales. La mayoría de mucinas formadoras de gel, como la MUC2, tienen varios dominios ricos en Cys, aminoácido que presenta una alta afinidad por el As(III) (Shen et al.

2013). Por tanto, una capa de mucus más densa podría evitar o reducir la llegada de As(III) a la mucosa.

La regeneración del mucus puede ser consecuencia del aumento de los AGCC en el lumen, observado en los animales administrados con las bacterias (Figura 58). Varios estudios muestran que hay una conexión entre la producción de mucus y los contenidos de AGCC. Shimotoyodome et al. (2000) pusieron de manifiesto que la perfusión de una mezcla de AGCC (75 mM acetato, 35 mM propionato y 20 mM butirato) o de los AGCC individuales (130 mM) a nivel colónico aumentaba la liberación de mucus en ratones. Burger-van Paassen et al. (2009) investigaron los mecanismos por los cuales el butirato podía regular la expresión de MUC2 empleando el modelo de células caliciformes LS174T, y concluyeron que el efecto del butirato estaba mediado por el factor de transcripción AP-1 y la acetilación/metilación de histonas en el promotor de MUC2. Así pues, la captación del As(III) por las bacterias en el espacio luminal y su unión a las mucinas del mucus podría disminuir la llegada del metaloide al epitelio y al sistema inmune reduciendo en parte la respuesta al tóxico.

Por otro lado, la sobreexpresión de algunos componentes de las rutas Nrf2/Keap1/ARE e IL10 en animales tratados con LE1 y BL23 (Tabla 17) muestra que tal vez, las cepas puedan directamente tener una actividad antioxidante/antiinflamatoria. Una mayor producción de IL-10 supone la supresión de la secreción de numerosas citoquinas proinflamatorias. La citoquina IL-10 activa una ruta de señalización que conlleva la fosforilación del factor de transcripción STAT3, que a su vez, induce la expresión del supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS-3) y el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1RN) (Schülke 2018). SOCS-3 inhibe la activación de las MAPKs, la translocación del factor NF- κ B al núcleo y la subsiguiente inducción de la expresión de genes proinflamatorios (Hovsepian et al. 2013), mientras que la proteína IL-1RN suprime la señalización proinflamatoria iniciada por la unión de IL-1 β a su receptor (Arend 1991). En el presente estudio se observan parte de estos efectos, ya que los niveles tisulares de las citoquinas están reducidos (Figura 54)

y hay una menor activación de la ruta p38 MAPK (Figura 61) en los animales tratados con las cepas BAL, por lo tanto, esta ruta podría ser un mecanismo de defensa activado en presencia de estas bacterias.

La mayor producción de IL-10 observada tras la administración de las cepas podría tener su origen en la activación de la ruta de señalización Nrf2. La participación de Nrf2 en la activación de las defensas celulares antioxidantes por los probióticos se ha demostrado en modelos celulares y animales (Feng y Wang 2020). En el presente estudio se observa en los tejidos de los animales tratados con las cepas, un aumento de la expresión génica de este factor y de la proteínas HO-1, regulada por el factor Nrf2 como respuesta a distintos tipos de estímulos (Ahmed et al. 2017). Varios estudios han demostrado que HO-1 tienen efectos antiinflamatorios significativos. La elevación de la expresión de HO-1 conduce a la inhibición de la señalización de NF- κ B y a un aumento de la producción de IL-10 (Ahmed et al. 2017).

A la vista de los resultados, podríamos decir que una serie de mecanismos activados por las cepas de BAL ensayadas, podrían contribuir a la restauración de las uniones intercelulares, tal y como se pone de manifiesto en este estudio (Tabla 16) y por tanto a una recuperación del paso selectivo del intestino. La recuperación de la integridad de la barrera, además de reducir la entrada de toxinas y antígenos no deseados al torrente sanguíneo, lo que podría suponer una menor probabilidad de la instauración de una endotoxemia (Figura 57), también podría ser la responsable de la reducción de los contenidos tisulares de As en los órganos internos (Figura 59). En el estudio *in vitro* ya se había evidenciado como la reducción de la permeabilidad paracelular debido a la coexposición con las BAL o su medio condicionado, suponía un menor transporte del As al lado basolateral (capítulo 3, apartado 1.2.6). Por lo tanto, la restauración de la funcionalidad de la barrera intestinal tiene en este caso una ventaja adicional, una menor entrada del metaloide al torrente sanguíneo y consiguientemente, una menor acumulación tisular.

3. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente capítulo muestran que las cepas BAL ensayadas podrían reducir los efectos de una exposición crónica a As inorgánico a través del agua de bebida. Es interesante volver a recalcar que la cepa de *Lactobacillus casei* ensayada es un aislado procedente de heces humanas y que esta especie está considerada un probiótico, cuyo uso en poblaciones expuestas es más viable. El hecho de que las cepas reduzcan la disrupción de la barrera intestinal es posiblemente la causa de que exista una menor acumulación del metaloide en los órganos internos. Esto, junto con la reducción del marcador de endotoxemia, apunta a un posible efecto protector de las bacterias no sólo a nivel intestinal, sino también a nivel sistémico.

Esta tesis ha permitido identificar estrategias dietéticas para reducir los efectos deletéreos de la exposición a As inorgánico a través del agua de bebida, situación que tal y como hemos comentado previamente afecta a millones de personas, las cuales desarrollan a lo largo de su vida una serie de enfermedades con un alto índice de mortalidad. Son necesarios más estudios para confirmar estos resultados y para determinar si esta protección se extiende también cuando el As inorgánico se vehicula a través de los alimentos, ya que en las poblaciones expuestas los alimentos cocinados con agua contaminada también contribuyen a la exposición crónica.

Además, hay que señalar que la eficacia de estas bacterias observada en los modelos murinos coincide con lo evidenciado *in vitro* en el capítulo 3, lo que apunta a que el modelo celular empleado puede ser una buena herramienta para continuar identificando estrategias de reducción del daño causado por el As inorgánico en exposiciones crónicas.

Conclusiones generales

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

1. Evaluación *in vivo* de la toxicidad del As(III) en la mucosa intestinal

- La exposición crónica a través del agua de bebida genera un proceso prooxidante en el tejido intestinal con un aumento de las especies reactivas ROS/RNS, los peróxidos lipídicos y una reducción del antioxidante GSH.
- La respuesta prooxidante va acompañada de una respuesta proinflamatoria, evidenciada por un aumento tisular de determinadas citoquinas Th1 y una mayor infiltración de neutrófilos según indican los análisis histológicos y los niveles de lactoferrina fecal y MPO tisular.
- Esta respuesta puede deberse a la activación de distintas rutas de señalización como la p38 MAPK, JNK, NF- κ B y el inflammasoma NRLP3.
- Las moléculas mediadoras de inflamación y estrés generadas en estas rutas son posiblemente las causantes de las alteraciones de los distintos componentes que forman la barrera intestinal.
- Se observa una reducción de la MUC2 tisular, indicativo de una alteración de la capa de mucus. Este efecto deletéreo va acompañado de una disminución de las células mucosecretoras. Los ensayos empleando organoides murinos de origen intestinal muestran que la exposición a As(III) genera una alteración de los patrones de diferenciación, con un aumento de la proliferación y una reducción de la diferenciación hacia el linaje secretor, lo que explicaría, al menos en parte, la reducción de las células productoras de mucus.
- Las proteínas de las uniones estrechas (CLDN-1, CLDN-3 y OCLN) que mantienen la integridad del epitelio están reguladas a la baja en los animales tratados con As(III).
- Aunque no se observan cambios significativos en la composición global de la microbiota, si existen alteraciones del metabolismo microbiano de los

AGCC, con reducciones de los niveles lumbales de ácido acético, butírico y propiónico.

- Las alteraciones de todos estos componentes de la barrera son posiblemente la causa del aumento de la permeabilidad. La exposición crónica a As(III) a concentraciones iguales o superiores a 15 mg/L a través del agua de bebida supone, por lo tanto, una disrupción de la barrera intestinal.
- Esta disrupción puede ser la responsable del aumento de los marcadores séricos de endotoxemia (LBP y TNF- α) en animales expuestos; hecho que sugiere el establecimiento de una inflamación crónica a niveles bajos en la circulación sistémica.

2. Evaluación *in vivo* de la toxicidad del As(V) en la mucosa intestinal

- La exposición crónica a As(V) a través del agua de bebida genera una respuesta similar a la de As(III). Se establece una respuesta prooxidante y proinflamatoria, si bien en este caso se observa que el proceso inflamatorio no afecta por igual a todo el tejido colónico, si no que existe una especie de parcheado inflamatorio. Además, para el As(V) también se evidencia la inducción de una respuesta inflamatoria tipo Th17.
- Las alteraciones de los componentes son similares, a excepción de los efectos sobre la composición de la microbiota. El As(V) induce una menor expresión de MUC2 y de las proteínas que forman las uniones y una alteración del metabolismo microbiano de los AGCC, pero, además, en los animales expuestos se produce una disbiosis de la microbiota intestinal.
- La disrupción de la barrera también se produce, aunque a concentraciones más elevadas que para As(III) (≥ 30 mg/L), acompañada de signos de endotoxemia.

3. Análisis *in vitro* de la capacidad de bacterias ácido-lácticas para reducir la toxicidad generada por el As(III) en el epitelio intestinal

- El modelo celular empleado refleja con bastante exactitud lo observado en las exposiciones *in vivo* (respuesta prooxidante y proinflamatoria, alteraciones de la estructura intercelular, reducciones de la mucina constituyente de la capa de mucus y aumento de la permeabilidad).
- La administración de las bacterias LE1 y BL23 tratadas térmicamente o sus medios condicionados (con los metabolitos secretados durante su crecimiento) reduce significativamente el estrés oxidativo y los signos de inflamación y disminuye las alteraciones de expresión de la proteína constituyente del mucus y las alteraciones relacionadas con las uniones y el volumen celular. Todo esto redundando en el restablecimiento de la permeabilidad paracelular.
- La reducción del paso paracelular también conlleva un menor transporte de As(III) a través de la monocapa intestinal.
- Los resultados muestran que tanto los elementos estructurales de las bacterias como sus metabolitos pueden participar en este efecto protector, en el cual interviene de forma minoritaria la capacidad de quelación de As por las bacterias.

4. Análisis *in vivo* del efecto protector de bacterias ácido-lácticas a nivel intestinal y sistémico

- La administración de las cepas LE1 y BL23 viables a los animales tratados con As(III) supone una reducción de los efectos tóxicos causados por este metaloide a nivel intestinal.
- Se observa una menor respuesta proinflamatoria y prooxidante, con una reducción tisular de los mediadores de estrés (ROS/RNS y peróxidos lipídicos) y de inflamación (citoquinas proinflamatorias), que puede deberse en parte a una menor activación de rutas como la p38 MAPK.

- Se restauran parcialmente los niveles de expresión de las proteínas de las uniones intercelulares CLDN-3 y OCLN, y se observa una mayor producción de MUC2 y por tanto de mucus, respecto a los animales tratados sólo con As(III).
- El metabolismo microbiano de los AGCC también experimenta una recuperación, aunque no se alcanzan los niveles de ácidos grasos existentes en el lumen de los animales no tratados
- Todos estos efectos positivos conllevan a un restablecimiento de la permeabilidad de la mucosa, y una reducción de los marcadores de endotoxemia.
- Los datos apuntan a que este efecto protector puede deberse a una menor internalización del As(III) en los tejidos intestinales y a una actividad antioxidante y antiinflamatoria de las bacterias. El análisis transcriptómico de los tejidos de los animales tratados con ambas cepas sugieren la activación de las rutas Nrf2 e IL-10.
- El tratamiento con las bacterias además tiene una repercusión directa sobre la absorción intestinal debida posiblemente a la reducción de la permeabilidad paracelular. Esto conlleva a que se reduzca la acumulación de As en los órganos internos.
- Los datos obtenidos en este estudio *in vivo* coinciden con lo observado *in vitro*, lo que apunta a que el modelo celular empleado puede ser una buena herramienta para continuar identificando estrategias de reducción del daño causado por el As inorgánico en exposiciones crónicas.

Bibliografía

- Abais, J.M., Xia, M., Zhang, Y., Boini, K.M., Li, P.L., 2015. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? *Antioxid. Redox Signal.* 22, 1111-1129.
- 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, F305-318.
- Ahlborn, G.J., Nelson, G.M., Grindstaff, R.D., Waalkes, M.P., Diwan, B.A., Allen, J.W., Kitchin, K.T., Preston, R.J., Hernandez-Zavala, A., Adair, B., Thomas, D.J., Delker, D.A., 2009. Impact of life stage and duration of exposure on arsenic-induced proliferative lesions and neoplasia in C3H mice. *Toxicology* 262, 106-113.
- Ahmed, S.M.U., Luo, L., Namani, A., Wang, X.J., Tang, X., 2017. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1863, 585-597.
- Al-Dwairi, A., Pabona, J.M.P., Simmen, R.C.M., Simmen, F.A., 2012. Cytosolic Malic Enzyme 1 (ME1) Mediates High Fat Diet-Induced Adiposity, Endocrine Profile, and Gastrointestinal Tract Proliferation-Associated Biomarkers in Male Mice. *PLoS One* 7, e46716.
- 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, 2772-2779.
- Alava, P., Tack, F., Laing, G.D., Van de Wiele, T., 2013. Arsenic undergoes significant speciation changes upon incubation of contaminated rice with human colon microbiota. *J. Hazard. Mater.* 262, 1237-1244.
- Alcántara, C., Jadán-Piedra, C., Vélez, D., Devesa, V., Zúñiga, M., Monedero, V., 2017. Characterization of the binding capacity of mercurial species in *Lactobacillus* strains. *J. Sci. Food Agric.* 97, 5107-5113.
- Almela, C., Clemente, M.J., Vélez, D., Montoro, R., 2006. Total arsenic, inorganic arsenic, lead and cadmium contents in edible seaweed sold in Spain. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1901-1908.
- Alonzo, G., Bertazzi, N., Consiglio, M., 1984. Arsenic, antimony and bismuth complexation by L-cysteine in water. *Inorganica Chim. Acta* 85.
- Anhê, F.F., Barra, N.G., Cavallari, J.F., Henriksbo, B.D., Schertzer, J.D., 2021. Metabolic endotoxemia is dictated by the type of lipopolysaccharide. *Cell Rep.* 36, 109691.
- Aragonés Sanz, N., Palacios Diez, M., Avello de Miguel, A., Gómez Rodríguez, P., Martínez Cortés, M., Rodríguez Bernabeu, M.J., 2001. Nivel de arsénico en abastecimientos de agua de consumo de origen subterráneo en la comunidad de Madrid. *Rev. Esp. Salud Publica* 75, 421-432.
- Arend, W.P., 1991. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J. Clin. Invest.* 88, 1445-1451.
- ATSDR, 2007. Toxicological profile for arsenic (update). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA. Disponible en <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2-p.pdf>

ATSDR, 2022. ATSDR's Substance Priority List. Disponible en <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2022spl>.

Bailey, K.A., Fry, R.C., 2014. Arsenic-Associated Changes to the Epigenome: What Are the Functional Consequences? *Curr. Environ. Health Rep.* 1, 22-34.

Barker, N., 2014. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 19-33.

Barmeyer, C., Schulzke, J.D., Fromm, M., 2015. Claudin-related intestinal diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 42, 30-38.

Bartfeld, S., Clevers, H., 2017. Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *J. Mol. Med. (Berl.)* 95, 729-738.

Basmacıyan, L., Bon, F., Paradis, T., Lapaquette, P., Dalle, F., 2019. "Candida Albicans Interactions With The Host: Crossing The Intestinal Epithelial Barrier". *Tissue Barriers* 7, 1612661.

Batissoco, A.C., Lezirovitz, K., Zanatta, D.B., Hemza, C.R.M.L., Vasques, L.R., Strauss, B.E., Mingroni-Netto, R.C., Haddad, L.A., Bento, R.F., Oiticica, J., 2021. Cochlea cell-specific marker expression upon *in vitro* Hes1 knockdown. *Braz. J. Med. Biol.* 54.

Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., Hornung, V., Latz, E., 2009. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* 183, 787-791.

Bauernfeind, F., Bartok, E., Rieger, A., Franchi, L., Nunez, G., Hornung, V., 2011. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J. Immunol.* 187, 613-617.

Berger, A., 2000. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ* 321, 424.

Blackwell, T.S., Christman, J.W., 1997. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17, 3-9.

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.

Boro, M., Balaji, K.N., 2017. CXCL1 and CXCL2 Regulate NLRP3 Inflammasome Activation via G-Protein-Coupled Receptor CXCR2. *J. Immunol.* 199, 1660-1671.

Bourebaba, Y., Marycz, K., Mularczyk, M., Bourebaba, L., 2022. Postbiotics as potential new therapeutic agents for metabolic disorders management. *Biomed. Pharmacother.* 153, 113138.

Brammer, H., Ravenscroft, P., 2009. Arsenic in groundwater: A threat to sustainable agriculture in South and South-east Asia. *Environ. Int.* 35, 647-654.

Burger-van Paassen, N., Vincent, A., Puiman, P.J., van der Sluis, M., Bouma, J., Boehm, G., van Goudoever, J.B., van Seuning, I., Renes, I.B., 2009. The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem. J.* 420, 211-219.

- 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, 547-556.
- Calatayud, M., Devesa, V., Montoro, R., Vélez, D., 2011. In vitro study of intestinal transport of arsenite, monomethylarsonous acid, and dimethylarsinous acid by Caco-2 cell line. *Toxicol. Lett.* 204, 127-133.
- Calatayud, M., Barrios, J.A., Vélez, D., Devesa, V., 2012a. In vitro study of transporters involved in intestinal absorption of inorganic arsenic. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 446-453.
- Calatayud, M., Vélez, D., Devesa, V., 2012b. Metabolism of inorganic arsenic in intestinal epithelial cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 2402-2411.
- Calatayud, M., Vázquez, M., Devesa, V., Vélez, D., 2012c. In Vitro Study of Intestinal Transport of Inorganic and Methylated Arsenic Species by Caco-2/HT29-MTX Cocultures. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 2654-2662.
- Calatayud, M., Devesa, V., Vélez, D., 2013a. Differential toxicity and gene expression in Caco-2 cells exposed to arsenic species. *Toxicol. Lett.* 218, 70-80.
- Calatayud, M., Bralatei, E., Feldmann, J., Devesa, V., Vélez, D., 2013b. Transformation of Arsenic Species during in Vitro Gastrointestinal Digestion of Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 61, 12164-12170.
- Calatayud, M., Gimeno-Alcañiz, J.V., Vélez, D., Devesa, V., 2014. Trivalent arsenic species induce changes in expression and levels of proinflammatory cytokines in intestinal epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 224, 40-46.
- Calatayud, M., Gimeno-Alcañiz, J.V., Devesa, V., Vélez, D., 2015. Proinflammatory effect of trivalent arsenical species in a co-culture of Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells. *Arch. Toxicol.* 89, 555-564.
- Calatayud, M., Farias, S.S., de Paredes, G.S., Olivera, M., Carreras, N.Á., Giménez, M.C., Devesa, V., Vélez, D., 2019. Arsenic exposure of child populations in Northern Argentina. *Sci. Total Environ.* 669, 1-6.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581-583.
- Chelakkot, C., Ghim, J., Ryu, S.H., 2018. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp. Mol. Med.* 50, 1-9.
- 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, 5895-5899.
- Chen, J., Rosen, B.P., 2020. The Arsenic Methylation Cycle: How Microbial Communities Adapted Methylarsenicals for Use as Weapons in the Continuing War for Dominance. *Front. Environ. Sci.* 8.
- Chi, L., Bian, X., Gao, B., Tu, P., Ru, H., Lu, K., 2017. The Effects of an Environmentally Relevant Level of Arsenic on the Gut Microbiome and Its Functional Metagenome. *Toxicol. Sci.* 160, 193-204.

- Chiocchetti, G.M. 2018a. Efecto del arsénico inorgánico presente en los alimentos sobre el epitelio intestinal (Tesis doctoral). Universitat de València, pp. 220.
- Chiocchetti, G.M., Vélez, D., Devesa, V., 2018b. Effect of subchronic exposure to inorganic arsenic on the structure and function of the intestinal epithelium. *Toxicol. Lett.* 286, 80-88.
- Chiocchetti, G.M., Jadán-Piedra, C., Monedero, V., Zúñiga, M., Vélez, D., Devesa, V., 2019a. Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce exposure to chemical food contaminants and toxicity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, 1534-1545.
- Chiocchetti, G.M., Domene, A., Kühn, A.A., Zúñiga, M., Vélez, D., Devesa, V., Monedero, V., 2019b. In vivo evaluation of the effect of arsenite on the intestinal epithelium and associated microbiota in mice. *Arch. Toxicol.* 93, 2127-2139.
- Chiocchetti, G.M., Vélez, D., Devesa, V., 2019c. Inorganic arsenic causes intestinal barrier disruption. *Metallomics* 11, 1411-1418.
- Chiocchetti, G.M., Monedero, V., Zúñiga, M., Vélez, D., Devesa, V., 2020. In Vitro Evaluation of the Protective Role of Lactobacillus Strains Against Inorganic Arsenic Toxicity. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 12, 1484-1491.
- 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, 3160-3170.
- Clemente, M.J., Devesa, V., Vélez, D., 2016. Dietary Strategies To Reduce the Bioaccessibility of Arsenic from Food Matrices. *J. Agric. Food Chem.* 64, 923-931.
- Clemente, M.J., Devesa, V., Vélez, D., 2017. In Vitro Reduction of Arsenic Bioavailability Using Dietary Strategies. *J. Agric. Food Chem.* 65, 3956-3964.
- Clemente, M.J., Cimbalo, A., Chiocchetti, G., Devesa, V., Vélez, D., 2019. Dietary Compounds To Reduce In Vivo Inorganic Arsenic Bioavailability. *J. Agric. Food Chem.* 67, 9032-9038.
- Clemente, M.J., Vivó, M.d.I.Á., Puig, S., Zúñiga, M., Monedero, V., Devesa, V., Vélez, D., 2020. In vitro evaluation of the efficacy of lactobacilli and yeasts in reducing bioavailability of inorganic arsenic. *LWT* 126, 109272.
- Clemente, M.J., Serrano, S., Devesa, V., Vélez, D., 2021. Arsenic speciation in cooked food and its bioaccessible fraction using X-ray absorption spectroscopy. *Food Chem.* 336, 127587.
- Colegio, O.R., Van Itallie, C.M., McCrea, H.J., Rahner, C., Anderson, J.M., 2002. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C142-147.
- Costa, J., Ahluwalia, A., 2019. Advances and Current Challenges in Intestinal in vitro Model Engineering: A Digest. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 144.
- 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.* 43, 163-166.

- 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, 330-337.
- Daisley, B.A., Monachese, M., Trinder, M., Bisanz, J.E., Chmiel, J.A., Burton, J.P., Reid, G., 2019. Immobilization of cadmium and lead by *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 mitigates apical-to-basolateral heavy metal translocation in a Caco-2 model of the intestinal epithelium. *Gut Microbes* 10, 321-333.
- Das, N., Paul, S., Chatterjee, D., Banerjee, N., Majumder, N.S., Sarma, N., Sau, T.J., Basu, S., Banerjee, S., Majumder, P., Bandyopadhyay, A.K., States, J.C., Giri, A.K., 2012. Arsenic exposure through drinking water increases the risk of liver and cardiovascular diseases in the population of West Bengal, India. *BMC Public Health* 12, 639.
- Davis, N.M., Proctor, D.M., Holmes, S.P., Relman, D.A., Callahan, B.J., 2018. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *bioRxiv*, 221499.
- Del Razo, L.M., García-Vargas, G.G., Valenzuela, O.L., Castellanos, E.H., Sánchez-Peña, L.C., Currier, J.M., Drobná, Z., Loomis, D., Stýblo, M., 2011. Exposure to arsenic in drinking water is associated with increased prevalence of diabetes: a cross-sectional study in the Zimapán and Lagunera regions in Mexico. *Environ. Health* 10, 73.
- Demitrack, E.S., Samuelson, L.C., 2016. Notch regulation of gastrointestinal stem cells. *J. Physiol.* 594, 4791-4803.
- Derikx, J.P.M., Luyer, M.D.P., Heineman, E., Buurman, W.A., 2010. Non-invasive markers of gut wall integrity in health and disease. *World J. Gastroenterol.* 16, 5272-5279.
- Dheer, R. 2011. Molecular Analyses of Changes Induced in the Microbial Populations of Murine Colon After As(III) Exposure (Tesis doctoral). Duquesne University, pp. 230.
- Directiva, 67/548/CEE. Directiva 67/548/CEE del Consejo, de 27 de junio de 1967, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas. *Diario Oficial* n° 196 de 16/08/1967 p. 0001 - 0098
- Dixon, P., 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J. Veg. Sci.* 14, 927-930.
- Docena, G., Rovedatti, L., Kruidenier, L., Fanning, A., Leakey, N.A., Knowles, C.H., Lee, K., Shanahan, F., Nally, K., McLean, P.G., Di Sabatino, A., MacDonald, T.T., 2010. Down-regulation of p38 mitogen-activated protein kinase activation and proinflammatory cytokine production by mitogen-activated protein kinase inhibitors in inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* 162, 108-115.
- Dong, X., Shulzhenko, N., Lemaitre, J., Greer, R.L., Peremyslova, K., Quamruzzaman, Q., Rahman, M., Hasan, O.S.I., Joya, S.A., Golam, M., Christiani, D.C., Morgun, A., Kile, M.L., 2017. Arsenic exposure and intestinal microbiota in children from Sirajdikhan, Bangladesh. *PLoS One* 12, e0188487.
- Dorofeyev, A.E., Vasilenko, I.V., Rassokhina, O.A., Kondratiuk, R.B., 2013. Mucosal barrier in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2013, 431231.
- Drahota, P., Filippi, M., 2009. Secondary arsenic minerals in the environment: A review. *Environ. Int.* 35, 1243-1255.

- Drewniak, L., Sklodowska, A., 2013. Arsenic-transforming microbes and their role in biomining processes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 7728-7739.
- Drobná, Z., Walton, F.S., Harmon, A.W., Thomas, D.J., Stýblo, M., 2010. Interspecies differences in metabolism of arsenic by cultured primary hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 47-56.
- Du, X., Zhang, J., Zhang, X., Schramm, K.-W., Nan, B., Huang, Q., Tian, M., Shen, H., 2021. Persistence and reversibility of arsenic-induced gut microbiome and metabolome shifts in male rats after 30-days recovery duration. *Sci. Total Environ.* 776, 145972.
- EFSA, 2009. Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA J.* 7, 1351.
- EFSA, 2021. Chronic dietary exposure to inorganic arsenic. *EFSA J.* 19, e06380.
- Elphick, D.A., Mahida, Y.R., 2005. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* 54, 1802-1809.
- EPA, 1991. U.S. Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS) on Arsenic. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC. Last revised 9/01/1991. Disponible en https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=278.
- Faith, M., Sukumaran, A., Pulimood, A.B., Jacob, M., 2008. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? *Clin. Chim. Acta* 396, 23-25.
- Farrell, J., Chaudhary, B.K., 2013. Understanding arsenate reaction kinetics with ferric hydroxides. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8342-8347.
- Felix, K., Manna, S.K., Wise, K., Barr, J., Ramesh, G.T., 2005. Low levels of arsenite activates nuclear factor-kappaB and activator protein-1 in immortalized mesencephalic cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19, 67-77.
- Feng, T., Wang, J., 2020. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes* 12, 1801944.
- Finnegan, P., Chen, W., 2012. Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. *Front. Physiol.* 3.
- Fournier, B.M., Parkos, C.A., 2012. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 5, 354-366.
- Frisbie, S.H., Mitchell, E.J., 2022. Arsenic in drinking water: An analysis of global drinking water regulations and recommendations for updates to protect public health. *PLoS One* 17, e0263505.
- Fry, R.C., Navasumrit, P., Valiathan, C., Svensson, J.P., Hogan, B.J., Luo, M., Bhattacharya, S., Kandjanapa, K., Soontararuks, S., Nookabkaew, S., Mahidol, C., Ruchirawat, M., Samson, L.D., 2007. Activation of inflammation/NF-kappaB signaling in infants born to arsenic-exposed mothers. *PLoS Genet.* 3, e207.
- Fukuta, M., Suzuki, K., Kojima, S., Yabe, Y., Suzuki, K., Iida, K., Yamada, H., Makino, S., Iwata, A., Tanaka, S., Iwamoto, T., Suto, A., Nakagomi, D., Wakashin, H., Maezawa, Y., Maezawa, Y., Takemoto, M., Asanuma, K., Nakajima, H., 2021. Suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) expressed in podocytes attenuates glomerulonephritis and suppresses autoantibody production in an imiquimod-induced lupus model. *Lupus Sci. Med.* 8.

- Furuhashi, T., Sugitate, K., Nakai, T., Jikumaru, Y., Ishihara, G., 2018. Rapid profiling method for mammalian feces short chain fatty acids by GC-MS. *Anal. Biochem.* 543, 51-54.
- Garbinski, L.D., Rosen, B.P., Chen, J., 2019. Pathways of arsenic uptake and efflux. *Environ. Int.* 126, 585-597.
- Garelick, H., Jones, H., Dybowska, A., Valsami-Jones, E., 2008. Arsenic pollution sources. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 197, 17-60.
- Geislinger, A., Goessler, W., Kosmus, W., 2002. Organoarsenic compounds in plants and soil on top of an ore vein. *Appl. Organomet. Chem.* 16, 245-249.
- Gersemann, M., Becker, S., Kübler, I., Koslowski, M., Wang, G., Herrlinger, K.R., Griger, J., Fritz, P., Fellermann, K., Schwab, M., Wehkamp, J., Stange, E.F., 2009. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation* 77, 84-94.
- Ghosh, S.S., Wang, J., Yannie, P.J., Ghosh, S., 2020. Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. *J. Endocr. Soc.* 4.
- Giafis, N., Katsoulidis, E., Sassano, A., Tallman, M.S., Higgins, L.S., Nebreda, A.R., Davis, R.J., Plataniias, L.C., 2006. Role of the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in the Generation of Arsenic Trioxide-Dependent Cellular Responses. *Cancer Res.* 66, 6763-6771.
- Gillois, K., Lévêque, M., Théodorou, V., Robert, H., Mercier-Bonin, M., 2018. Mucus: An Underestimated Gut Target for Environmental Pollutants and Food Additives. *Microorganisms* 6, 53.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J., 2006. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1493-1505.
- Gomez-Caminero, A., Howe, P.D., Hughes, M., Kenyon, E., Lewis, D.R., Moore, M., Aitio, A., Becking, G.C., Ng, J., 2001. Environmental Health Criteria 224. Arsenic and arsenic compounds. World Health Organization, Geneva. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42366>
- Gong, T., Liu, L., Jiang, W., Zhou, R., 2020. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 95-112.
- González, M.J., Aguilar, M.V., Martínez, M.C., 1995. Gastrointestinal absorption of inorganic arsenic (V): The effect of concentration and interactions with phosphate and dichromate. *Vet. Hum. Toxicol.* 37, 131-136.
- González, M.J., Aguilar, M.V., Martínez, M.C., 1997. Mechanisms of absorption of As₂O₅ from rat small intestine: the effect of different parameters. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 11, 239-247.
- Guha Mazumder, D., Dasgupta, U.B., 2011. Chronic arsenic toxicity: Studies in West Bengal, India. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 27, 360-370.
- Guo, H.-R., Yu, H.-S., Hu, H., Monson, R.R., 2001. Arsenic in drinking water and skin cancers: cell-type specificity (Taiwan, R.O.C.). *Cancer Causes Control* 12, 909-916.

- Guo, S., Al-Sadi, R., Said, H.M., Ma, T.Y., 2013. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *Am. J. Pathol.* 182, 375-387.
- Hall, L.L., George, S.E., Kohan, M.J., Styblo, M., Thomas, D.J., 1997. In vitro methylation of inorganic arsenic in mouse intestinal cecum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147, 101-109.
- Halttunen, T., Finell, M., Salminen, S., 2007. Arsenic removal by native and chemically modified lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 173-178.
- Hanash, A.M., Dudakov, J.A., Hua, G., O'Connor, M.H., Young, L.F., Singer, N.V., West, M.L., Jenq, R.R., Holland, A.M., Kappel, L.W., Ghosh, A., Tsai, J.J., Rao, U.K., Yim, N.L., Smith, O.M., Velardi, E., Hawryluk, E.B., Murphy, G.F., Liu, C., Fouser, L.A., Kolesnick, R., Blazar, B.R., van den Brink, M.R., 2012. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* 37, 339-350.
- Hasegawa, H., Papry, R.I., Ikeda, E., Omori, Y., Mashio, A.S., Maki, T., Rahman, M.A., 2019. Freshwater phytoplankton: biotransformation of inorganic arsenic to methylarsenic and organoarsenic. *Sci. Rep.* 9, 12074.
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2014. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Semin. Immunol.* 26, 253-266.
- Heywood, R., Sortwell, R.J., 1978. Arsenic intoxication in the Rhesus monkey. *Toxicol. Lett.* 3, 137-144.
- Higgins, M.A., Metcalf, M.J., Robbins, G.A., 2022. Nonpoint source arsenic contamination of soil and groundwater from legacy pesticides. *J. Environ. Qual.* 51, 66-77.
- Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Regårdh, C.G., Lipka, E., Amidon, G.L., Langguth, P., 2000. Caco-2 versus caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: Permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J. Pharm. Sci.* 89, 63-75.
- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., Ross, R.P., 2018. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Front. Microbiol.* 9.
- Hoehn, A.G., Madan, J.C., Li, Z., Coker, M., Lundgren, S.N., Morrison, H.G., Palys, T., Jackson, B.P., Sogin, M.L., Cottingham, K.L., Karagas, M.R., 2018. Sex-specific associations of infants' gut microbiome with arsenic exposure in a US population. *Sci. Rep.* 8, 12627.
- Hogan, S.P., Seidu, L., Blanchard, C., Groschwitz, K., Mishra, A., Karow, M.L., Ahrens, R., Artis, D., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Rothenberg, M.E., 2006. Resistin-like molecule beta regulates innate colonic function: barrier integrity and inflammation susceptibility. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118, 257-268.
- Hou, Q., Ye, L., Liu, H., Huang, L., Yang, Q., Turner, J.R., Yu, Q., 2018. *Lactobacillus* accelerates ISCs regeneration to protect the integrity of intestinal mucosa through activation of STAT3 signaling pathway induced by LPLs secretion of IL-22. *Cell Death Differ.* 25, 1657-1670.
- Hovsepian, E., Penas, F., Siffo, S., Mirkin, G.A., Goren, N.B., 2013. IL-10 inhibits the NF- κ B and ERK/MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by up-

- regulation of SOCS-3 in Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes. *PLoS One* 8, e79445.
- Huang, C., Ke, Q., Costa, M., Shi, X., 2004. Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis. *Mol. Cell. Biochem.* 255, 57-66.
- Huang, J.H., Fecher, P., Ilgen, G., Hu, K.N., Yang, J., 2012. Speciation of arsenite and arsenate in rice grain – Verification of nitric acid based extraction method and mass sample survey. *Food Chem.* 130, 453-459.
- Hughes, M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133, 1-16.
- Hul, M.V., Geurts, L., Plovier, H., Druart, C., Everard, A., Ståhlman, M., Rhimi, M., Chira, K., Teissedre, P.-L., Delzenne, N.M., Maguin, E., Guilbot, A., Brochot, A., Gérard, P., Bäckhed, F., Cani, P.D., 2018. Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 314, E334-E352.
- IARC, 2012. Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 100, 11-465.
- Islam, S., Rahman, M.M., Duan, L., Islam, M.R., Kuchel, T., Naidu, R., 2017. Variation in arsenic bioavailability in rice genotypes using swine model: An animal study. *Sci. Total Environ.* 599-600, 324-331.
- Jacobse, J., Li, J., Rings, E., Samsom, J.N., Goettel, J.A., 2021. Intestinal Regulatory T Cells as Specialized Tissue-Restricted Immune Cells in Intestinal Immune Homeostasis and Disease. *Front. Immunol.* 12, 716499.
- Jadán Piedra, C., Crespo, A., Monedero, V., Vélez, D., Devesa, V., Zúñiga Cabrera, M., 2019. Effect of lactic acid bacteria on mercury toxicokinetics. *Food Chem. Toxicol.* 128.
- Jain, D., Warren, B.F., Riddell, R.H. 2013. *Inflammatory Disorders of the Large Intestine. En: Morson and Dawson's Gastrointestinal Pathology, Wiley Online Library, pp. 552-635.*
- Jatko, J.T., Darling, C.L., Kellett, M.P., Bain, L.J., 2021. Arsenic exposure in drinking water reduces Lgr5 and secretory cell marker gene expression in mouse intestines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 422, 115561.
- JECFA. 2011. Safety evaluation of certain contaminants in food: prepared by the Seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). World Health Organization, Geneva. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44520>
- Jeong, C.H., Seok, J.S., Petriello, M.C., Han, S.G., 2017. Arsenic downregulates tight junction claudin proteins through p38 and NF-κB in intestinal epithelial cell line, HT-29. *Toxicology* 379, 31-39.
- Jia, X., Qiu, T., Yao, X., Jiang, L., Wang, N., Wei, S., Tao, Y., Pei, P., Wang, Z., Zhang, J., Zhu, Y., Yang, G., Liu, X., Liu, S., Sun, X., 2020. Arsenic induces hepatic insulin resistance via mtROS-NLRP3 inflammasome pathway. *J. Hazard. Mater.* 399, 123034.
- Jiang, W., Wu, N., Wang, X., Chi, Y., Zhang, Y., Qiu, X., Hu, Y., Li, J., Liu, Y., 2015. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci. Rep.* 5, 8096.

Johansson, M.E., Sjövall, H., Hansson, G.C., 2013. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 352-361.

Juhász, 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, 1826-1831.

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, 59.

Kämpfer, A.A.M., Urbán, P., Gioria, S., Kanase, N., Stone, V., Kinsner-Ovaskainen, A., 2017. Development of an in vitro co-culture model to mimic the human intestine in healthy and diseased state. *Toxicol. In Vitro* 45, 31-43.

Kast, R.E., 2000. Tumor necrosis factor has positive and negative self regulatory feed back cycles centered around cAMP. *Int. J. Immunopharmacol.* 22, 1001-1006.

Kenyon, E.M., Hughes, M.F., Levander, O.A., 1997. Influence of dietary selenium on the disposition of arsenate in the female B6C3F1, mouse. *J. Toxicol. Environ. Health* 51, 279-299.

Khairul, I., Wang, Q.Q., Jiang, Y.H., Wang, C., Naranmandura, H., 2017. Metabolism, toxicity and anticancer activities of arsenic compounds. *Oncotarget* 8.

Kile, M.L., Cardenas, A., Rodrigues, E., Mazumdar, M., Dobson, C., Golam, M., Quamruzzaman, Q., Rahman, M., Christiani, D.C., 2016. Estimating Effects of Arsenic Exposure During Pregnancy on Perinatal Outcomes in a Bangladeshi Cohort. *Epidemiology* 27, 173-181.

Kim, H., Jung, B.J., Jung, J.H., Kim, J.Y., Chung, S.K., Chung, D.K., 2012. *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid alleviates TNF- α -induced inflammation in the HT-29 intestinal epithelial cell line. *Mol. Cells* 33, 479-486.

Kim, K.-T., Kim, J.-W., Kim, S.-I., Kim, S., Nguyen, T.H., Kang, C.-H., 2021. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effect and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Canine and Feline Feces. *Microorganisms* 9, 1971.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, e1.

Knoop, K.A., Newberry, R.D., 2018. Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. *Mucosal Immunol.* 11, 1551-1557.

Kulawik, A., Engesser, R., Ehling, C., Raue, A., Albrecht, U., Hahn, B., Lehmann, W.D., Gaestel, M., Klingmüller, U., Häussinger, D., Timmer, J., Bode, J.G., 2017. IL-1 β -induced and p38(MAPK)-dependent activation of the mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MK2) in hepatocytes: Signal transduction with robust and concentration-independent signal amplification. *J. Biol. Chem.* 292, 6291-6302.

Kulshrestha, A., Jarouliya, U., Prasad, G., Flora, S., Bisen, P., 2014. Arsenic induced abnormalities in glucose metabolism: Biochemical basis and potential therapeutic and nutritional interventions. *World J. Transl. Med.* 3, 96-111.

- Langerholc, T., Maragkoudakis, P.A., Wollgast, J., Gradisnik, L., Cencic, A., 2011. Novel and established intestinal cell line models – An indispensable tool in food science and nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* 22, S11-S20.
- Latorre, R., Sternini, C., De Giorgio, R., Greenwood-Van Meerveld, B., 2016. Enteroendocrine cells: a review of their role in brain–gut communication. *Neurogastroenterol. Motil.* 28, 620-630.
- Latz, E., Xiao, T.S., Stutz, A., 2013. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 397-411.
- Lechler, T., 2012. Adherens junctions and stem cells. *Subcell. Biochem.* 60, 359-377.
- Lechuga, S., Ivanov, A.I., 2017. Disruption of the epithelial barrier during intestinal inflammation: Quest for new molecules and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1864, 1183-1194.
- Li, Q., Valerio, M.S., Kirkwood, K.L., 2012. MAPK usage in periodontal disease progression. *J. Signal Transduct.* 2012, 308943.
- Li, X., Brejnrod, A.D., Ernst, M., Rykær, M., Herschend, J., Olsen, N.M.C., Dorrestein, P.C., Rensing, C., Sørensen, S.J., 2019. Heavy metal exposure causes changes in the metabolic health-associated gut microbiome and metabolites. *Environ. Int.* 126, 454-467.
- Lin, H., Peddada, S.D., 2020. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat. Commun.* 11, 3514.
- Lin, X., Xia, Y., Wang, G., Yang, Y., Xiong, Z., Lv, F., Zhou, W., Ai, L., 2018. Lactic Acid Bacteria With Antioxidant Activities Alleviating Oxidized Oil Induced Hepatic Injury in Mice. *Front. Microbiol.* 9, 2684.
- Liu, J., Chen, B., Lu, Y., Guan, Y., Chen, F., 2012. JNK-dependent Stat3 phosphorylation contributes to Akt activation in response to arsenic exposure. *Toxicol. Sci.* 129, 363-371.
- Liu, P., Wang, Y., Yang, G., Zhang, Q., Meng, L., Xin, Y., Jiang, X., 2021. The role of short-chain fatty acids in intestinal barrier function, inflammation, oxidative stress, and colonic carcinogenesis. *Pharmacol. Res.* 165, 105420.
- Liu, X., Zhang, X., Ding, Y., Zhou, W., Tao, L., Lu, P., Wang, Y., Hu, R., 2017. Nuclear Factor E2-Related Factor-2 Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activity by Inhibiting Reactive Oxygen Species-Induced NLRP3 Priming. *Antioxid. Redox Signal.* 26, 28-43.
- Liu, Z., Sanchez, M.A., Jiang, X., Boles, E., Landfear, S.M., Rosen, B.P., 2006. Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 424-430.
- Liu, Z., 2010. Roles of vertebrate aquaglyceroporins in arsenic transport and detoxification. *Adv. Exp. Med. Biol.* 679, 71-81.
- Louis, P., Flint, H.J., 2017. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* 19, 29-41.
- Lu, K., Abo, R.P., Schlieper, K.A., Graffam, M.E., Levine, S., Wishnok, J.S., Swenberg, J.A., Tannenbaum, S.R., Fox, J.G., 2014. Arsenic Exposure Perturbs the Gut Microbiome and Its Metabolic Profile in Mice: An Integrated Metagenomics and Metabolomics Analysis. *Environ. Health Perspect.* 122, 284-291.

- Lu, W.J., Tamai, I., Nezu, J., Lai, M.L., Huang, J.D., 2006. Organic anion transporting polypeptide-C mediates arsenic uptake in HEK-293 cells. *J. Biomed. Sci.* 13, 525-533.
- Lundberg, J.O., Hellström, P.M., Fagerhol, M.K., Weitzberg, E., Roseth, A.G., 2005. Technology insight: calprotectin, lactoferrin and nitric oxide as novel markers of inflammatory bowel disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2, 96-102.
- 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.
- Martin, B.D., Witten, D., Willis, A.D., 2020. Modeling microbial abundances and dysbiosis with beta-binomial regression. *Ann. Appl. Stat.* 14, 94-115.
- Mayne, S.T., 2023. The FDA's action plan to reduce dietary exposure to arsenic, lead, cadmium, and mercury for infants and young children. *Am. J. Clin. Nutr.* 117, 647-648.
- Mazé, A., Boël, G., Zúñiga, M., Bourand, A., Loux, V., Yebra Maria, J., Monedero, V., Correia, K., Jacques, N., Beaufils, S., Poncet, S., Joyet, P., Milohanic, E., Casarégola, S., Auffray, Y., Pérez-Martínez, G., Gibrat, J.-F., Zagorec, M., Francke, C., Hartke, A., Deutscher, J., 2010. Complete Genome Sequence of the Probiotic *Lactobacillus casei* Strain BL23. *J. Bacteriol.* 192, 2647-2648.
- McBride, M.B., Simon, T., Tam, G., Wharton, S., 2012. Lead and Arsenic Uptake by Leafy Vegetables Grown on Contaminated Soils: Effects of Mineral and Organic Amendments. *Water, Air, Soil Pollut.* 224, 1378.
- McClure, R., Massari, P., 2014. TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. *Front. Immunol.* 5, 386.
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8, e61217.
- Medema, J.P., Vermeulen, L., 2011. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* 474, 318-326.
- Mei, X., Gu, M., Li, M., 2020. Plasticity of Paneth cells and their ability to regulate intestinal stem cells. *Stem Cell. Res. Ther.* 11, 349.
- Ménard, S., Candalh, C., Bambou, J.C., Terpend, K., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M., 2004. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut* 53, 821-828.
- Michael, H., Li, Y., Wang, Y., Xue, D., Shan, J., Mazer, B.D., McCusker, C.T., 2015. TGF- β -mediated airway tolerance to allergens induced by peptide-based immunomodulatory mucosal vaccination. *Mucosal Immunol.* 8, 1248-1261.
- Minihane, A.M., Vinoy, S., Russell, W.R., Baka, A., Roche, H.M., Tuohy, K.M., Teeling, J.L., Blaak, E.E., Fenech, M., Vauzour, D., McArdle, H.J., Kremer, B.H., Sterkman, L., Vafeiadou, K., Benedetti, M.M., Williams, C.M., Calder, P.C., 2015. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br. J. Nutr.* 114, 999-1012.
- Miron, N., Cristea, V., 2012. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clin. Exp. Immunol.* 167, 405-412.

- Mitsuyama, K., Suzuki, A., Tomiyasu, N., Tsuruta, O., Kitazaki, S., Takeda, T., Satoh, Y., Bennett, B.L., Toyonaga, A., Sata, M., 2006. Pro-inflammatory signaling by Jun-N-terminal kinase in inflammatory bowel disease. *Int. J. Mol. Med.* 17, 449-455.
- Mohammad, S., Thiemermann, C., 2020. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. *Front. Immunol.* 11, 594150.
- Moon, K., Guallar, E., Navas-Acien, A., 2012. Arsenic exposure and cardiovascular disease: an updated systematic review. *Curr. Atheroscler. Rep.* 14, 542-555.
- Naranmandura, H., Carew, M.W., Xu, S., Lee, J., Leslie, E.M., Weinfeld, M., Le, X.C., 2011. Comparative Toxicity of Arsenic Metabolites in Human Bladder Cancer EJ-1 Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1586-1596.
- Neurath, M.F., Becker, C., Barbulescu, K., 1998. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 43, 856-860.
- Neves, A.L., Coelho, J., Couto, L., Leite-Moreira, A., Roncon-Albuquerque, R., Jr., 2013. Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk. *J. Mol. Endocrinol.* 51, R51-64.
- Ngo, H.K.C., Kim, D.H., Cha, Y.N., Na, H.K., Surh, Y.J., 2017. Nrf2 Mutagenic Activation Drives Hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 77, 4797-4808.
- Ohno, H., 2016. Intestinal M cells. *J. Biochem.* 159, 151-160.
- Ohuchida, K., Mizumoto, K., Yamada, D., Fujii, K., Ishikawa, N., Konomi, H., Nagai, E., Yamaguchi, K., Tsuneyoshi, M., Tanaka, M., 2006. Quantitative analysis of MUC1 and MUC5AC mRNA in pancreatic juice for preoperative diagnosis of pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 118, 405-411.
- OMS, 1981. Environmental Health Criteria 18: Arsenic. World Health Organization, Geneva. Disponible en <https://wedocs.unep.org/20.500.11822/29304>
- OMS. 1993. Guidelines for drinking-water quality: volume 1: recommendations. World Health Organization, Geneva. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/252072>
- Palarea-Albaladejo, J., Martín-Fernández, J., 2015. ZCompositions - R package for multivariate imputation of left-censored data under a compositional approach. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 143, 85-96.
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M.K., Landskron, G., González, M.J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H.J.M., Faber, K.N., Hermoso, M.A., 2019. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front. Immunol.* 10, 277.
- Peng, L., Li, Z.R., Green, R.S., Holzman, I.R., Lin, J., 2009. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J. Nutr.* 139, 1619-1625.
- Pereira, C., Costa, J., Sarmiento, B., Araújo, F. 2016. Cell-based in vitro models for intestinal permeability studies. En: *Concepts and Models for Drug Permeability Studies*, Woodhead Publishing, pp. 57-81.
- Peters, T., 1985. Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.* 37, 161-245.

- Petrick, J.S., Jagadish, B., Mash, E.A., Aposhian, H.V., 2001. Monomethylarsonous acid (MMA(III)) and arsenite: LD(50) in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 651-656.
- Pickert, G., Neufert, C., Leppkes, M., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Lehr, H.A., Hirth, S., Weigmann, B., Wirtz, S., Ouyang, W., Neurath, M.F., Becker, C., 2009. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med.* 206, 1465-1472.
- Pimparkar, B.D., Bhave, A., 2010. Arsenicosis: review of recent advances. *J. Assoc. Physicians India* 58, 617-624, 629.
- Porter, A.C., Fanger, G.R., Vaillancourt, R.R., 1999. Signal transduction pathways regulated by arsenate and arsenite. *Oncogene* 18, 7794-7802.
- Potera, C., 2007. Food Safety: U.S. Rice Serves Up Arsenic. *Environ. Health Perspect.* 115, A296-A296.
- Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Caddle, L.B., Coffman, R.L., 1993. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int. Immunol.* 5, 1461-1471.
- Pussinen, P.J., Havulinna, A.S., Lehto, M., Sundvall, J., Salomaa, V., 2011. Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes. *Diabetes Care* 34, 392-397.
- Qi, Z., Li, Y., Zhao, B., Xu, C., Liu, Y., Li, H., Zhang, B., Wang, X., Yang, X., Xie, W., Li, B., Han, J.-D.J., Chen, Y.-G., 2017. BMP restricts stemness of intestinal Lgr5+ stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nat. Commun.* 8, 13824.
- Qu, M., Xiong, L., Lyu, Y., Zhang, X., Shen, J., Guan, J., Chai, P., Lin, Z., Nie, B., Li, C., Xu, J., Deng, H., 2021. Establishment of intestinal organoid cultures modeling injury-associated epithelial regeneration. *Cell Res.* 31, 259-271.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590-D596.
- Ratsimandresy, R.A., Indramohan, M., Dorfleutner, A., Stehlik, C., 2017. The AIM2 inflammasome is a central regulator of intestinal homeostasis through the IL-18/IL-22/STAT3 pathway. *Cell. Mol. Immunol.* 14, 127-142.
- Real, Decreto 53/2013. Real Decreto 53/2013. de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *BOE-A-2013-1337*.
- Reglamento (UE) 2015/1006 de la comisión de 25 de junio de 2015 por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 en cuanto al contenido máximo de arsénico inorgánico en los productos alimenticios. Disponible en <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R1006&from=DA>.
- Reglamento (UE) 2023/465 de la Comisión de 3 de marzo de 2023 por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 1881/2006 en lo que respecta a los contenidos máximos de arsénico en determinados alimentos. Disponible en <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2023-80324>.

- Reid, M.S., Hoy, K.S., Schofield, J.R.M., Uppal, J.S., Lin, Y., Lu, X., Peng, H., Le, X.C., 2020. Arsenic speciation analysis: A review with an emphasis on chromatographic separations. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 123, 115770.
- Roager, H.M., Licht, T.R., 2018. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat. Commun.* 9, 3294.
- Rodriguez-Viso, P. 2023. Estrategias para mitigar la toxicidad asociada a la exposición crónica al mercurio a través de la dieta (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, pp. 202.
- Roy, P.K., Rashid, F., Bragg, J., Ibdah, J.A., 2008. Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 14, 200-202.
- Sabio, G., Davis, R.J., 2014. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin. Immunol.* 26, 237-245.
- Saint-Geniez, M., Jiang, A., Abend, S., Liu, L., Sweigard, H., Connor, K.M., Arany, Z., 2013. PGC-1 α regulates normal and pathological angiogenesis in the retina. *Am. J. Pathol.* 182, 255-265.
- Samak, G., Rao, R., Rao, R., 2021. Lactobacillus casei and Epidermal Growth Factor Prevent Osmotic Stress-Induced Tight Junction Disruption in Caco-2 Cell Monolayers. *Cells* 10, 3578.
- Sánchez, Ó.J., Barragán, P.J., Serna, L., 2019. Review of Lactobacillus in the food industry and their culture media. *Rev. Colombiana Biotecnol.* 21, 63-76.
- Sato, T., Clevers, H., 2013. Growing Self-Organizing Mini-Guts from a Single Intestinal Stem Cell: Mechanism and Applications. *Science* 340, 1190-1194.
- 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., Clevers, H., 2011. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141, 1762-1772.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., Clevers, H., 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262-265.
- Schliep, K.P., 2010. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27, 592-593.
- Schülke, S., 2018. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Front. Immunol.* 9, 455.
- Scott, A., Rouch, J.D., Jabaji, Z., Khalil, H.A., Solorzano, S., Lewis, M., Martín, M.G., Stelzner, M.G., Dunn, J.C., 2016. Long-term renewable human intestinal epithelial stem cells as monolayers: A potential for clinical use. *J. Pediatr. Surg.* 51, 995-1000.
- Scott, S.A., Fu, J., Chang, P.V., 2020. Microbial tryptophan metabolites regulate gut barrier function via the aryl hydrocarbon receptor. *PNAS* 117, 19376-19387.
- Sedighi, M., Razavi, S., Navab-Moghadam, F., Khamseh, M.E., Alaei-Shahmiri, F., Mehrtash, A., Amirmozafari, N., 2017. Comparison of gut microbiota in adult patients with type 2 diabetes and healthy individuals. *Microb. Pathog.* 111, 362-369.

- Shaji, E., Santosh, M., Sarath, K.V., Prakash, P., Deepchand, V., Divya, B.V., 2021. Arsenic contamination of groundwater: A global synopsis with focus on the Indian Peninsula. *Geosci. Front.* 12, 101079.
- Shale, M., Schiering, C., Powrie, F., 2013. CD4(+) T-cell subsets in intestinal inflammation. *Immunol. Rev.* 252, 164-182.
- Shen, S., Li, X.-F., Cullen, W.R., Weinfeld, M., Le, X.C., 2013. Arsenic Binding to Proteins. *Chem. Rev.* 113, 7769-7792.
- Shimotoyodome, A., Meguro, S., Hase, T., Tokimitsu, I., Sakata, T., 2000. Short chain fatty acids but not lactate or succinate stimulate mucus release in the rat colon. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 125, 525-531.
- Signes-Pastor, A.J., Carey, M., Meharg, A.A., 2016. Inorganic arsenic in rice-based products for infants and young children. *Food Chem.* 191, 128-134.
- Silva-Sanchez, A., Randall, T.D. 2020. Anatomical Uniqueness of the Mucosal Immune System (GALT, NALT, iBALT) for the Induction and Regulation of Mucosal Immunity and Tolerance. En: *Mucosal Vaccines (Second Edition)*, Academic Press, pp. 21-54.
- Silverman, J.D., Washburne, A.D., Mukherjee, S., David, L.A., 2017. A phylogenetic transform enhances analysis of compositional microbiota data. *eLife* 6, e21887.
- Sloth, J.J., Julshamn, 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, A.H., Goycolea, M., Haque, R., Biggs, M.L., 1998. Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water. *Am. J. Epidemiol.* 147 7, 660-669.
- Son, Y., Cheong, Y.K., Kim, N.H., Chung, H.T., Kang, D.G., Pae, H.O., 2011. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J. Signal Transduct.* 2011, 792639.
- Song, M.O., Freedman, J.H., 2005. Expression of copper-responsive genes in HepG2 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 279, 141-147.
- Sorg, T.J., Chen, A.S.C., Wang, L., 2014. Arsenic species in drinking water wells in the USA with high arsenic concentrations. *Water Res.* 48, 156-169.
- Souza, D.G., Fagundes, C.T., Amaral, F.A., Cisalpino, D., Sousa, L.P., Vieira, A.T., Pinho, V., Nicoli, J.R., Vieira, L.Q., Fierro, I.M., Teixeira, M.M., 2007. The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *J. Immunol.* 179, 8533-8543.
- Spandidos, A., Wang, X., Wang, H., Seed, B., 2009. PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res.* 38, D792-799.
- Sternini, C., Anselmi, L., Rozengurt, E., 2008. Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 15, 73-78.
- Sun, L., Ma, L., Ma, Y., Zhang, F., Zhao, C., Nie, Y., 2018. Insights into the role of gut microbiota in obesity: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic perspectives. *Protein Cell* 9, 397-403.

- Takahashi, K., Nishida, A., Fujimoto, T., Fujii, M., Shioya, M., Imaeda, H., Inatomi, O., Bamba, S., Sugimoto, M., Andoh, A., 2016. Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion* 93, 59-65.
- Tanoue, T., Nishitani, Y., Kanazawa, K., Hashimoto, T., Mizuno, M., 2008. In vitro model to estimate gut inflammation using co-cultured Caco-2 and RAW264.7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 565-569.
- Team, R.C. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Thorne, C.A., Chen, I.W., Sanman, L.E., Cobb, M.H., Wu, L.F., Altschuler, S.J., 2018. Enteroid Monolayers Reveal an Autonomous WNT and BMP Circuit Controlling Intestinal Epithelial Growth and Organization. *Dev. Cell* 44, 624-633.
- Tokar, E.J., Qu, W., Waalkes, M.P., 2010. Arsenic, Stem Cells, and the Developmental Basis of Adult Cancer. *Toxicol. Sci.* 120, S192-S203.
- Tolins, M., Ruchirawat, M., Landrigan, P., 2014. The developmental neurotoxicity of arsenic: cognitive and behavioral consequences of early life exposure. *Ann. Glob. Health* 80, 303-314.
- Tseng, C.H., 2004. The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 197, 67-83.
- Uede, K., Furukawa, F., 2003. Skin manifestations in acute arsenic poisoning from the Wakayama curry-poisoning incident. *Br. J. Dermatol.* 149, 757-762.
- Vahter, M., 1986. Environmental and occupational exposure to inorganic arsenic. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)* 59, 31-34.
- Vahter, M.E., 1994. Species differences in the metabolism of arsenic compounds. *Appl. Organomet. Chem.* 8, 175-182.
- Van de Wiele, T., Gallawa, C.M., Kubachka, K.M., Creed, J.T., Basta, N., Dayton, E.A., Whitacre, S., Du Laing, G., Bradham, K., 2010. Arsenic metabolism by human gut microbiota upon in vitro digestion of contaminated soils. *Environ. Health Perspect.* 118, 1004-1009.
- van der Flier, L.G., Clevers, H., 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241-260.
- VanDussen, K.L., Carulli, A.J., Keeley, T.M., Patel, S.R., Puthoff, B.J., Magness, S.T., Tran, I.T., Maillard, I., Siebel, C., Kolterud, Å., Grosse, A.S., Gumucio, D.L., Ernst, S.A., Tsai, Y.H., Dempsey, P.J., Samuelson, L.C., 2012. Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development* 139, 488-497.
- Vanuytsel, T., Senger, S., Fasano, A., Shea-Donohue, T., 2013. Major signaling pathways in intestinal stem cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 2410-2426.
- Verma, A., Mohindru, M., Deb, D.K., Sassano, A., Kambhampati, S., Ravandi, F., Minucci, S., Kalvakolanu, D.V., Plataniias, L.C., 2002. Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to arsenic trioxide. *J. Biol. Chem.* 277, 44988-44995.

- Villa-Bellosta, R., Sorribas, V., 2008. Role of rat sodium/phosphate cotransporters in the cell membrane transport of arsenate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 125-134.
- Vinolo, M.A.R., Rodrigues, H.G., Nachbar, R.T., Curi, R., 2011. Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients* 3, 858-876.
- Vinson, K.E., George, D.C., Fender, A.W., Bertrand, F.E., Sigounas, G., 2016. The Notch pathway in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 138, 1835-1842.
- Wang, H.-T., Zhu, D., Li, G., Zheng, F., Ding, J., O'Connor, P.J., Zhu, Y.-G., Xue, X.-M., 2019. Effects of Arsenic on Gut Microbiota and Its Biotransformation Genes in Earthworm *Metaphire sieboldi*. *Environ. Sci. Technol.* 53, 3841-3849.
- Wang, J., Hu, W., Yang, H., Chen, F., Shu, Y., Zhang, G., Liu, J., Liu, Y., Li, H., Guo, L., 2020. Arsenic concentrations, diversity and co-occurrence patterns of bacterial and fungal communities in the feces of mice under sub-chronic arsenic exposure through food. *Environ. Int.* 138, 105600.
- Wang, L., Llorente, C., Hartmann, P., Yang, A.M., Chen, P., Schnabl, B., 2015. Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *J. Immunol. Methods* 421, 44-53.
- Wang, X., Spandidos, A., Wang, H., Seed, B., 2012. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic Acids Res.* 40, D1144-1149.
- Wickham, H. 2016. *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*, Springer, New York.
- Wiedermann, C.J., Kiechl, S., Dunzendorfer, S., Schratzberger, P., Egger, G., Oberhollenzer, F., Willeit, J., 1999. Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: Prospective results from the bruneck study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 34, 1975-1981.
- Williams, P.N., Islam, M.R., Adomako, E.E., Raab, A., Hossain, S.A., Zhu, Y.G., Feldmann, J., Meharg, A.A., 2006. Increase in Rice Grain Arsenic for Regions of Bangladesh Irrigating Paddies with Elevated Arsenic in Groundwaters. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4903-4908.
- Willis, A., Bunge, J., 2015. Estimating Diversity via Frequency Ratios. *Biometrics* 71, 1042-1049.
- Willis, A.D., Martin, B.D., 2020. Estimating diversity in networked ecological communities. *Biostatistics* 23, 207-222.
- Worthington, J.J., Reimann, F., Gribble, F.M., 2018. Enteroendocrine cells-sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 11, 3-20.
- Wosen, J.E., Mukhopadhyay, D., Macaubas, C., Mellins, E.D., 2018. Epithelial MHC Class II Expression and Its Role in Antigen Presentation in the Gastrointestinal and Respiratory Tracts. *Front. Immunol.* 9, 2144.
- Wright, E.S., 2016. Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data. *The R Journal* 8, 352-359.

- Wu, Z., Pan, D.-d., Guo, Y., Zeng, X., 2013. Structure and anti-inflammatory capacity of peptidoglycan from *Lactobacillus acidophilus* in RAW-264.7 cells. *Carbohydr. Polym.* 96, 466-473.
- Xu, X.Y., McGrath, S.P., Meharg, A.A., Zhao, F.J., 2008. Growing Rice Aerobically Markedly Decreases Arsenic Accumulation. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5574-5579.
- Xu, Y., Zou, Z., Liu, Y., Wang, Q., Sun, B., Zeng, Q., Liu, Q., Zhang, A., 2020. miR-191 is involved in renal dysfunction in arsenic-exposed populations by regulating inflammatory response caused by arsenic from burning arsenic-contaminated coal. *Hum. Exp. Toxicol.* 39, 37-46.
- Yamauchi, H., Yamamura, Y., 1985. Metabolism and excretion of orally administered arsenic trioxide in the hamster. *Toxicology* 34, 113-121.
- Yang, J., Chun, J., 2021. Taxonomic composition and variation in the gut microbiota of laboratory mice. *Mamm. Genome* 32, 297-310.
- Yin, Y., Bijvelds, M., Dang, W., Xu, L., van der Eijk, A.A., Knipping, K., Tuysuz, N., Dekkers, J.F., Wang, Y., de Jonge, J., Sprengers, D., van der Laan, L.J., Beekman, J.M., Ten Berge, D., Metselaar, H.J., de Jonge, H., Koopmans, M.P., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q., 2015. Modeling rotavirus infection and antiviral therapy using primary intestinal organoids. *Antiviral Res.* 123, 120-131.
- Yoon, H., Lee, D.J., Kim, M.H., Bok, J., 2011. Identification of genes concordantly expressed with *Atoh1* during inner ear development. *Anat. Cell Biol.* 44, 69-78.
- 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, 539-547.
- Zhai, Q., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Narbad, A., Chen, W., 2016. Oral Administration of Probiotics Inhibits Absorption of the Heavy Metal Cadmium by Protecting the Intestinal Barrier. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4429-4440.
- Zhang, X., Chen, B.D., Zhao, L.D., Li, H., 2020. The Gut Microbiota: Emerging Evidence in Autoimmune Diseases. *Trends Mol. Med.* 26, 862-873.
- Zhang, Z., Gao, B., 2022. Mechanism of Hyperbaric Oxygen Combined with Astaxanthin Mediating Keap1/Nrf2/HO-1 Pathway to Improve Exercise Fatigue in Mice. *Comput. Intell. Neurosci.* 2022, 6444747.
- Zmora, N., Levy, M., Pevsner-Fishcer, M., Elinav, E., 2017. Inflammasomes and intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 10, 865-883.

Anexo

Listado de publicaciones

La presente tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones.

Domene, A., Rodríguez-Viso, P., Sánchez, A., Burbano, L., Orozco, H., Vélez, D., Devesa, V. (2022). Chapter 10: Arsenic through the gastrointestinal tract. In Handbook of Arsenic Toxicology. Flora, SJS., ed., Elsevier.

Domene A, Orozco H, Rodríguez-Viso P, Monedero V, Zúñiga M, Vélez D, Devesa V. (2023). Intestinal homeostasis disruption in mice chronically exposed to arsenite-contaminated drinking water. Chemical-Biological Interactions 373:110404. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110404>.

Domene A, Orozco H, Rodríguez-Viso P, Monedero V, Zúñiga M, Vélez D, Devesa V. (2023). Chronic exposure to arsenate affects intestinal mucosa and its associated microbiota. Toxicology (enviado para su publicación).

Domene A, Orozco H, Rodríguez-Viso P, Monedero V, Zúñiga M, Vélez D, Devesa V. Lactic acid bacteria as a strategy to reduce intestinal toxicity of an As(III) subchronic exposure. *En vías de publicación*.

Domene A, Orozco H, Rodríguez-Viso P, Monedero V, Zúñiga M, Vélez D, Devesa V. *In vivo* evaluation of the efficiency of lactic acid bacteria at reducing intestinal and systemic toxicity of an As(III) chronic exposure. *En vías de publicación*.

