



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i de Microbiologia

**UTILIDAD DEL ENSAYO DE LINFOMA DE RATÓN EN  
LA DETERMINACIÓN DE LOS MECANISMOS DE  
GENOTOXICIDAD DEL ARSÉNICO. ESPECTRO  
MUTACIONAL DEL TRIÓXIDO DE ARSÉNICO**

**TESIS DOCTORAL  
CAROLINA SORIANO TÁRRAGA  
2009**

**UTILIDAD DEL ENSAYO DE LINFOMA DE RATÓN EN LA  
DETERMINACIÓN DE LOS MECANISMOS DE  
GENOTOXICIDAD DEL ARSÉNICO. ESPECTRO  
MUTACIONAL DEL TRIÓXIDO DE ARSÉNICO**

Memoria presentada para optar al grado de doctora en Genética  
por **Carolina Soriano Tárraga**

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Febrero 2009

VºBº

Los Directores de la Tesis

Dr. Amadeu Creus Capdevila  
Profesor Titular de Genética  
UAB

Dr. Ricard Marcos Dauder  
Catedrático de Genética  
UAB

*A mi hermana*

## Agradecimientos

*Lo primero es decirlo que ¡¡¡¡Ya está!!!! Parecía que nunca iba a llegar este momento, pero ya comienzo a ver la luz al final del túnel jajaja. Y contestando a la pregunta más formulada en los últimos meses: "No, no sé que será de mí ahora, pero puedo aseguraros que estaré bien". Y nuevamente ¡¡¡¡Ya está!!!!*

*Han sido años difíciles, que os voy a contar...Años de trabajo duro, de momentos inolvidables, de largos cafés, de conversaciones trascendentales o no tan trascendentales, de metas alcanzadas y de numerosas cervezas. Así que agradecer hay mucho que agradecer...*

*A mi familia siempre...*

*A todos aquellos que me ayudaron en mi aprendizaje en el laboratorio, me enseñaron, me resolvieron deditas, grandes dudas, problemitas, problemones y siempre estuvieron ahí con una sonrisa (a veces forzada, porque reconozco que soy un poco pesada...pero sólo un poco, eh!) Gracias a aquellos que siempre se han dejado tentar o me han arrastrado a la perdición con la llamada de ¡CAFÉ! o ¡TÉ! o ¡DESCANSO!, que no es que seamos almas débiles, si no más bien, completamente a fines.*

*Y por supuesto me gustaría agradecer a mis tutores, el Dr. Ricard Marcos y el Dr. Amadeu Creus, por haberme ofrecido la oportunidad de realizar esta tesis y todo el tiempo, apoyo y esfuerzos dedicados a mí y a este trabajo.*

*Muchos ya partieron, muchos aún permanecen, pero de todos y cada uno de mis compañeros y amigos, MUTAS y no MUTAS, siempre guardaré un recuerdo especial en mi corazón. Y así, a modo de despedida os voy a desvelar el mayor descubrimiento que he hecho en los últimos años (Noticia: ¡¡¡no está publicado!!!) y que espero que sea tan revelador para vosotros como lo ha sido para mí.*

*Es el siguiente:*

*"No todos los miembros de una misma familia nacen bajo el mismo techo"*

*Así que, Gracias Familia*



# ÍNDICE

|   |            |
|---|------------|
| <b>ÍNDICE.....</b>  | <b>i</b>   |
| <b>RESUMEN.....</b>   | <b>iii</b> |
| <b>ABREVIATURAS.....</b>  | <b>v</b>   |
| <br>  |            |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1. El arsénico.....   | 1          |
| 1.1.1 Características físico-químicas, distribución terrestre y niveles ambientales...2 |            |
| 1.1.1.1 Fuentes naturales .....   | 2          |
| 1.1.1.2 Fuentes antropogénicas.....   | 6          |
| 1.1.2 Efectos de la exposición al arsénico.....   | 7          |
| 1.1.3 Metabolismo del arsénico.....   | 8          |
| 1.1.3.1 Cinética: absorción, metabolización y excreción.....                            | 8          |
| 1.1.3.2 Biotransformación del arsénico inorgánico.....                                  | 10         |
| 1.1.3.2.1 Rutas metabólicas.....  | 12         |
| 1.1.4. Toxicidad del arsénico.....  | 17         |
| 1.1.4.1 Toxicidad de los compuestos arsenicales.....                                    | 19         |
| 1.1.5. Genotoxicidad del arsénico.....  | 20         |
| 1.1.6. Mecanismo de acción del arsénico.....  | 26         |
| 1.1.7. Factores de susceptibilidad al arsénico.....                                     | 31         |
| 1.1.8. Un caso especial: el trióxido de arsénico (TOA).....                             | 32         |
| 1.2. El ensayo de linfoma de ratón.....   | 34         |
| 1.2.1 Ensayos de mutación génica.....   | 34         |
| 1.2.1.1 Ensayos de mutación génica en células de mamífero.....                          | 35         |
| 1.2.2 El ensayo de linfoma de ratón (MLA).....  | 38         |
| 1.2.2.1 Bases genéticas del ensayo.....   | 42         |
| a) Línea celular.....   | 42         |
| b) El gen <i>Tk</i> .....   | 44         |
| c) Colonias mutantes <i>Tk</i> <sup>-/-</sup> .....                                     | 46         |
| d) Pérdida de heterocigosis (LOH).....  | 48         |
| e) Mutaciones detectadas mediante el ensayo MLA.....                                    | 48         |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>  | <b>53</b>  |

---

|  |            |
|--|------------|
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>55</b>  |
| 3.1. Información complementaria a la hallada en los artículos.....   | 55         |
| 3.1.1 Compuestos de arsénico evaluados en el ensayo MLA.....   | 55         |
| 3.1.2. Recuento de colonias.....   | 56         |
| 3.1.3. Cálculo de parámetros.....  | 57         |
| 3.1.4 Criterios de aceptación del ensayo.....  | 58         |
| <b>4. ARTÍCULOS.....</b>   | <b>63</b>  |
| 4.1. Resumen del contenido del artículo 1.....   | 65         |
| Artículo 1: Soriano C, Creus A, Marcos R. Gene-mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay. <i>Mutat Res.</i> 634: 40-50 (2007)..... | 69         |
| 4.2. Resumen del contenido del artículo 2.....   | 81         |
| Artículo 2: Soriano C, Creus A, Marcos R. Arsenic trioxide mutational spectrum analysis in the mouse lymphoma assay. <i>Mutat Res.</i> 646: 1-7 (2008).....  | 85         |
| 4.3. Resumen artículo 3.....   | 93         |
| <b>5. DISCUSIÓN.....</b>   | <b>95</b>  |
| <b>6. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>117</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>119</b> |
| <b>8. ANEXO.....</b>   | <b>147</b> |
| Artículo 3: Soriano C, Creus A, Marcos R. Analysis of arsenic <i>Tk</i> mouse lymphoma mutants by chromosome 11 painting.....                                | 149        |

## RESUMEN

El arsénico es un contaminante de origen natural, responsable de un importante problema de salud mundial debido a la cantidad de poblaciones expuestas crónicamente al mismo y a la gravedad de los efectos inducidos, incluyendo el incremento de algunos tipos de cáncer. Está ampliamente aceptado su potencial carcinogénico aunque, a diferencia de otros carcinógenos, diversos estudios de genotoxicidad han puesto de manifiesto que el arsénico no es un mutágeno muy potente. Hasta ahora, su mecanismo de acción en el desarrollo del cáncer continúa siendo un misterio, y existe cierta controversia respecto al tipo de daño genotóxico que induce, y el tipo de compuesto arsenical que más influye en su carcinogenicidad.

En ausencia de buenos modelos animales para estudiar el mecanismo carcinogénico del arsénico, los estudios *in vitro* se han convertido en herramientas útiles para dilucidar estos mecanismos. Por lo tanto, con la finalidad de evaluar el potencial genotóxico de seis compuestos de arsénico (arsenito sódico, trióxido de arsénico, MMA<sup>V</sup>, DMA<sup>V</sup>, arsenobetaína y cloruro de tetrafenilarsonio), se llevó a cabo inicialmente la puesta a punto del ensayo MLA. Este ensayo se considera como el ensayo *in vitro* de mutación génica en células de mamífero más sensible y con mayor capacidad de detección de un amplio espectro de mutaciones, tanto puntuales como cromosómicas. De esta manera, se pretendía obtener más información respecto al potencial genotóxico y los mecanismos de acción de distintos compuestos de arsénico. Cuatro de los seis compuestos arsenicales evaluados han presentado efectos genotóxicos, consecuencia de su actividad clastogénica: el arsenito sódico, el trióxido de arsénico, el MMA<sup>V</sup> y el DMA<sup>V</sup>.

Paradójicamente, en la actualidad el trióxido de arsénico (TOA) se emplea con éxito en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda y existe un especial interés en evaluar su efectividad terapéutica en otros tipos de cáncer. En este contexto, con motivo de estudiar más profundamente el mecanismo de acción de este compuesto, se analizó el espectro mutacional inducido por el TOA empleando los mutantes inducidos en el MLA y técnicas moleculares y citogenéticas. Nuestros resultados revelan que el principal tipo de cambio presente en estos mutantes es la pérdida de heterocigosidad (LOH), pudiendo ser generada tanto por delección como por recombinación.





## ABREVIATURAS

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>A</b>                 | Adenina  |
| <b>Aprt</b>              | Adenina fosforribosil transferasa  |
| <b>APL</b>               | <i>Acute Promyelocytic Leukemia</i> - Leucemia promielocítica aguda  |
| <b>As</b>                | Arsénico   |
| <b>AS</b>                | Arsenito sódico  |
| <b>As<sup>III</sup></b>  | Arsenito   |
| <b>As<sup>V</sup></b>    | Arsenato   |
| <b>AsBe</b>              | Arsenobetaína  |
| <b>AsC</b>               | Arsenocolina   |
| <b>As-GSH</b>            | Complejo arsénico-glutation  |
| <b>iAs</b>               | Arsénico inorgánico  |
| <b>AS3MT</b>             | <i>Arsenic-3-metiltransferase</i> -Arsénico-3-metiltransferasa   |
| <b>ATG</b>               | Arsénico triglutation  |
| <b>ATP</b>               | Adenosina 5' trifosfato  |
| <b>ATSDR</b>             | <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i> -Agencia para Substancias Tóxicas y Registro de Enfermedades |
| <b>BER</b>               | <i>Base excision repair</i> -Mecanismo de reparación del DNA por escisión de bases                                   |
| <b>BMI</b>               | <i>Body Mass Index</i> - Índice de masa corporal   |
| <b>bp Kb, Mb,</b>        | <i>Base pair</i> - par de bases, kilobase, megabase  |
| <b>BrdU</b>              | 5-Bromodesoxiuridina   |
| <b>C</b>                 | Citosina   |
| <b>CA</b>                | <i>Chromosomal Aberrations</i> -Aberraciones cromosómicas  |
| <b>cel</b>               | Célula   |
| <b>CHO</b>               | Célula de ovario de hámster chino  |
| <b>Cys</b>               | Cisteína   |
| <b>Cyt19</b>             | <i>Cytocrome 19</i> -Citocromo 19  |
| <b>DCG</b>               | <i>Daily Cell Growth</i> -Crecimiento celular diario   |
| <b>DNA</b>               | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> -Ácido desoxirribonucleico  |
| <b>cDNA</b>              | <i>Copy DNA</i> -Ácido desoxirribonucleico complementario  |
| <b>DMA<sup>III</sup></b> | Ácido dimetilarsenioso   |
| <b>DMA<sup>V</sup></b>   | Ácido dimetilarsínico  |
| <b>DMAG</b>              | Dimetil arsénico glutation   |
| <b>EPA</b>               | <i>Environmental Protection Agency</i> -Agencia de Protección Ambiental  |
| <b>g, mg, µg, Kg</b>     | Gramo, miligramo, microgramo, kilogramo  |
| <b>G</b>                 | Guanina  |
| <b>Gly</b>               | Glicina  |
| <b>GPx</b>               | Glutation peroxidasa   |
| <b>GSH</b>               | Glutation  |
| <b>GSTs</b>              | Glutation S-transferasas   |
| <b>GSTO</b>              | Glutation S-transferasa de la clase Omega  |

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>h</b>                 | Hora   |
| <b>Hprt</b>              | Hprt, HPRT-Hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa   |
| <b>HR</b>                | <i>Homologous Recombination</i> -Recombinación homóloga  |
| <b>IARC</b>              | <i>International Agency for Research on Cancer</i> -Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer  |
| <b>ICH</b>               | <i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i> -Conferencia Internacional de Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano |
| <b>IMF</b>               | <i>Induced Mutation frequency</i> -Frecuencia de mutación inducida   |
| <b>IWGT</b>              | <i>International Workshop on Genotoxicity Test</i> – Grupo Internacional de Trabajo sobre Ensayos de Genotoxicidad   |
| <b>L, mL, µL</b>         | Litro, mililitro, microlitro   |
| <b>LC</b>                | <i>Large Colony</i> -Colonia grande  |
| <b>LOH</b>               | <i>Loss of heterozygosity</i> -Pérdida de heterocigosidad  |
| <b>MADG</b>              | Monometilarsénico diglutation  |
| <b>MF</b>                | <i>Mutation frequency</i> -Frecuencia de mutación  |
| <b>min</b>               | Minuto   |
| <b>MLA</b>               | <i>Mouse lymphoma assay</i> –Ensayo de linfoma de ratón  |
| <b>mM, µM</b>            | Milimolar, micromolar  |
| <b>MMA<sup>III</sup></b> | Ácido monometilarsenioso   |
| <b>MMA<sup>V</sup></b>   | Ácido monometilarsónico  |
| <b>MMS</b>               | Metilmetanosulfonato   |
| <b>MN</b>                | Micronúcleo  |
| <b>MTT</b>               | Tiazolil azul  |
| <b>mRNA</b>              | Ácido ribonucleico mensajero   |
| <b>NAC</b>               | N-acetilcisteína   |
| <b>NER</b>               | <i>Nucleotide Excision Repair</i> -Mecanismo de reparación del DNA por escisión de nucleótidos   |
| <b>NHEJ</b>              | <i>Non-homologous end joining</i> -Reparación por recombinación de extremos no homólogos   |
| <b>p. ej.</b>            | Por ejemplo  |
| <b>PARP</b>              | Poli-(ADP-ribosa) polimerasa   |
| <b>PCR</b>               | <i>Polymerase Chain Reaction</i> -Reacción en cadena de la polimerasa  |
| <b>PE</b>                | <i>Plating Efficiency</i> -Eficiencia de clonación o crecimiento   |
| <b>OSHA</b>              | <i>Occupational Safety and Health Administration</i> -Departamento de Seguridad e Higiene en el Trabajo  |
| <b>RNA</b>               | <i>Ribonucleic Acid</i> -Ácido ribonucleico  |
| <b>RNS</b>               | <i>Reactive nitrogen species</i> -Especie reactiva de nitrógeno  |
| <b>ROS</b>               | <i>Reactive oxygen species</i> -Especie reactiva de oxígeno  |
| <b>rpm</b>               | Revoluciones por minuto  |
| <b>RSG</b>               | <i>Relative Suspension Growth</i> -Crecimiento en suspensión relativo  |
| <b>RTG</b>               | <i>Relative Total Growth</i> -Crecimiento total relativo   |
| <b>RTPCR</b>             | PCR retrotranscriptasa   |
| <b>SAM</b>               | S-adenosilmetionina  |

---

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>SC</b>         | <i>Small Colony</i> -Colonia pequeña  |
| <b>SCE</b>        | <i>Sister Chromatid Exchange</i> -Intercambio entre cromátidas hermanas                     |
| <b>SG</b>         | <i>Suspension Growth</i> -Crecimiento en suspensión   |
| <b>SMART</b>      | <i>Somatic mutation and recombination test</i> -Ensayo de mutación y recombinación somática |
| <b>SMF</b>        | <i>Spontaneous Mutation frequency</i> -Frecuencia de mutación espontánea                    |
| <b>SLRLT</b>      | <i>Sex-Linked Recessive Lethal Assay</i> -Ensayo de letales recesivos ligados al sexo       |
| <b>T</b>          | Timina  |
| <b>TFT</b>        | Trifluorotimidina   |
| <b><i>Tk</i></b>  | <i>Tk1</i> , timidina quinasa   |
| <b><i>Tka</i></b> | Tk-, tk1a, tka-, alelo <i>Tk</i> mutado   |
| <b><i>Tkb</i></b> | Tk+, tk1b, tkb+, alelo <i>Tk</i> funcional  |
| <b>TMAO</b>       | Óxido de trimetilarsina   |
| <b>TOA</b>        | Trióxido de arsénico  |
| <b>UV</b>         | Radiación ultravioleta  |
| <b>V</b>          | Viabilidad  |
| <b>WHO</b>        | <i>World Health Organization</i> -Organización Mundial de la Salud                          |
| <b>Xprt</b>       | <i>Xprt</i> , XPRT, <i>gpt</i> -Xantina-guanina fosforribosil transferasa                   |



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El arsénico

El arsénico es un metaloide de origen natural, que se encuentra en el vigésimo lugar en cuanto a su abundancia en la corteza terrestre. Se puede encontrar en niveles traza en todo tipo de ambientes (suelo, agua, aire y biota), y su amplia distribución es debida a la combinación de diferentes procesos naturales como la actividad biológica y las emisiones volcánicas, y por otro lado la actividad antropogénica. La acumulación de arsénico por encima de determinados niveles da como resultado la contaminación por dicho agente. La contaminación, como resultado de la actividad humana, tiene un importante impacto ambiental a través de la minería, del uso de combustibles fósiles y herbicidas, así como de la industria del vidrio (Cullen y Reimer, 1989; Mandal y Suzuki, 2002; Duker *et al.*, 2005; Jones, 2007).

En contraste con la consideración del arsénico como agente tóxico, es importante tener en cuenta los diversos usos de éste dentro del campo de la medicina. Así, distintos compuestos con arsénico se han venido utilizando desde la antigüedad (Grecia y Roma) para tratar la sífilis, la disentería y la tripanosomiasis, entre otras patologías. En nuestros días, el trióxido de arsénico se emplea de forma eficaz en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (APL) (Antman, 2001).

La mayoría de los compuestos de arsénico son altamente tóxicos y están asociados a diversas enfermedades presentes en los grupos expuestos (Basu *et al.*, 2001). Desde 1987, la IARC (Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer) clasifica los compuestos de arsénico dentro del grupo 1, correspondiente a los carcinógenos humanos. De entre las posibles fuentes de arsénico en el ambiente, la contaminación por arsénico del agua de consumo representa la mayor amenaza para la salud humana, seguida por las exposiciones laborales a partículas de arsénico en el aire del lugar de trabajo. La Organización Mundial de la Salud (WHO) estableció como valor límite seguro la concentración de 10 µg/L de arsénico en el agua de consumo. En la actualidad, diversas regiones presentan concentraciones superiores al valor límite establecido, estando afectados por problemas de arsenicismo los habitantes de estas zonas. Algunos países como Argentina, Bangladesh, Canadá, Chile, China, Estados Unidos, Finlandia, Hungría, India, Japón, Méjico, Pakistán, Tailandia y Taiwán tienen

zonas con elevados niveles de arsénico en sus aguas de consumo (Basu *et al.*, 2001; Smedley y Kinniburgh, 2001; Mandal y Suzuki, 2002; IARC, 2004; Tchounwou *et al.*, 2004).

### **1.1.1 Características físico-químicas, distribución terrestre y niveles ambientales**

El símbolo químico del arsénico es As y en la tabla periódica se encuentra situado entre los metales y los no metales, dentro del grupo V(A). Su número atómico es 33 y posee un peso molecular de 74,92, compartiendo características químicas con el nitrógeno, el fósforo, el antimonio y el bismuto.

Este metaloide puede encontrarse en la naturaleza tanto en formas químicas orgánicas como inorgánicas, así como en diferentes estados de oxidación: trivalentes -3 (p.ej. gas arsina); +3 (p.ej. arsenito sódico), 0 (arsénico elemental), y +5 (p.ej. arsenato sódico), dependiendo de las condiciones ambientales. En ambientes fuertemente reductores el arsénico elemental (0) y el gas arsina (-3) pueden existir, aunque son poco frecuentes. Las formas inorgánicas pentavalente (+5, As<sup>V</sup>) y trivalente (+3, As<sup>III</sup>) son las que se encuentran mayoritariamente en el ambiente, especialmente en el agua, y poseen la capacidad de cambiar de un estado a otro por reacciones de oxidación/reducción (Cullen y Reimer, 1989; Wildfang *et al.*, 2000; Duker *et al.*, 2005).

En condiciones naturales, las concentraciones más elevadas de arsénico se encuentran en aguas subterráneas, como resultado de la fuerte interacción agua-roca y la gran tendencia de los acuíferos a favorecer la movilización y acumulación del arsénico por sus condiciones físicas y geológicas (Smedley y Kinniburgh, 2001). Los compuestos de arsénico presentes en el agua y suelo son principalmente inorgánicos, mientras que las formas orgánicas se encuentran en gran cantidad y variedad en muchos alimentos constituyentes de la dieta.

#### **1.1.1.1 Fuentes naturales**

Como se ha mencionado anteriormente, este metaloide raramente se encuentra en la naturaleza en su forma elemental. En este estado no se considera peligroso para la salud, ya que presenta una baja toxicidad, debido a su pobre absorción, rápida eliminación y a su nula metabolización en el cuerpo humano. Sin embargo, suele hallarse en bajas concentraciones en muchos tipos de rocas, habitualmente asociado a otros metales en

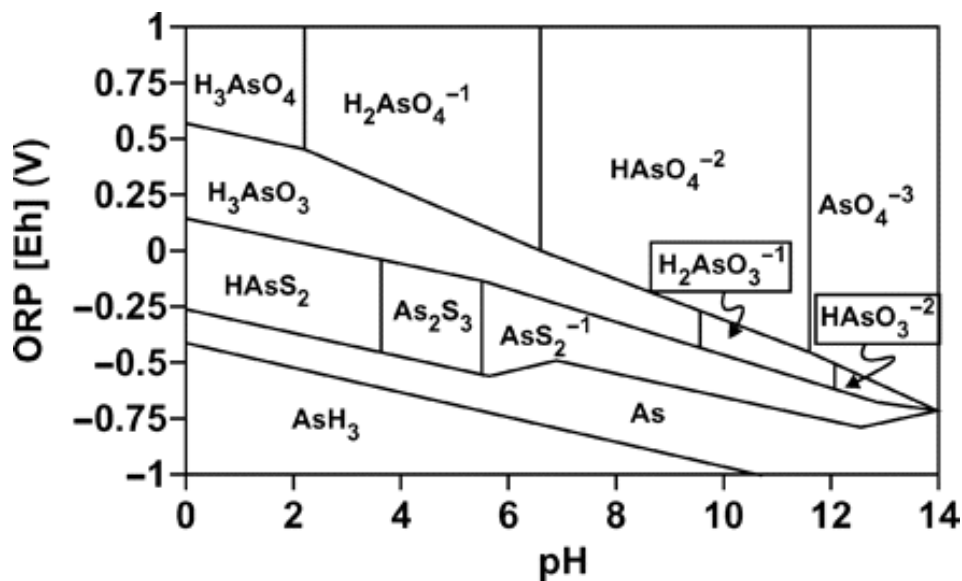
formaciones minerales de cobalto, azufre y otros elementos (manganeso, hierro, cobalto, níquel, plata, cobre o estaño), encontrándose en la corteza terrestre a un nivel medio de 2 mg/Kg. El arsénico forma parte de más de 200 especies minerales y en la naturaleza se presenta con mayor frecuencia en forma de sulfuro de arsénico (oropimente,  $\text{As}_2\text{S}_3$ ) y arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ), encontrándose, generalmente, como impurezas en depósitos mineros. Combinado con estos minerales se encuentra en su forma inorgánica, mientras que en su forma orgánica se combina con carbono e hidrógeno (Morgan, 2001; Mandal y Suzuki, 2002; Duker *et al.*, 2005; Jones, 2007).

Los principales factores que determinan la concentración de arsénico en el suelo son las características geológicas propias del terreno (roca madre) y la actividad humana. Factores como el clima, componentes orgánicos e inorgánicos del suelo, potencial redox y pH, pueden afectar los niveles de arsénico, su biodisponibilidad y su movilidad en el ambiente (Figura 1). La estabilidad de los compuestos inorgánicos de arsénico dependerá de su valencia y de la naturaleza del medio donde se encuentren. En ambientes básicos y oxigenados se favorece la formación de formas pentavalentes ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) o arsenatos, mientras que en ambientes ácidos predominan las formas trivalentes ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) o arsenitos. Por lo tanto, en suelo y agua (superficial y subterránea), el arsénico se encuentra normalmente en su forma inorgánica como arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) y arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ). En aguas superficiales con alto contenido de oxígeno, la especie más común es el arsénico pentavalente ( $\text{As}^{\text{V}}$ ). Bajo condiciones de reducción, generalmente en los sedimentos de los lagos o aguas subterráneas, predomina el arsénico trivalente ( $\text{As}^{\text{III}}$ ). Estas diferencias entre los distintos estados de oxidación tienen gran importancia en relación a la biodisponibilidad y toxicidad de los compuestos arsenicales (Cullen y Reimer, 1989; Smedley y Kinniburgh, 2001; Jones, 2007).

La principal vía de dispersión del arsénico en el ambiente es el agua. Aún si se considera la sedimentación, la solubilidad de los arsenatos y arsenitos es suficiente para que este elemento se movilice en los sistemas acuáticos. La concentración de arsénico en aguas naturales es muy variable y probablemente depende de las formas en que se presente en el suelo local. La concentración de arsénico en aguas oceánicas oscila entre 1-2  $\mu\text{g/L}$ , y en aguas dulces no contaminadas, tanto superficiales como freáticas, la concentración oscila entre 1-10  $\mu\text{g/L}$ . En contraste con estos valores, en áreas con



elevada mineralización, los niveles de arsénico en el agua pueden alcanzar concentraciones superiores a 3.000  $\mu\text{g/L}$ , como en Bangladesh e India (Morgan, 2001).



**Figura 1.** Especiación del arsénico combinando los estados de oxidación-reducción (Eh) y pH. ORP (potencial redox).  $\text{AsO}_4$  = compuestos de arsenato;  $\text{AsO}_3$  = compuestos de arsenito;  $\text{AsS}_2$  = compuestos de arsénico disulfatados; As = arsénico elemental; y  $\text{AsH}_3$  = arsina (Jones, 2007).

El arsénico se considera un elemento que se acumula en los tejidos de animales y plantas, aunque existe una gran variabilidad de concentraciones entre las distintas especies. Los organismos marinos son los que presentan una mayor cantidad de arsénico orgánico, principalmente compuestos orgánicos trimetilados, como arsenobetaína (AsBe) y arsenocolina (AsC), sales de tetrametilarsonio, arsenoazúcares y arsenolípidos, en general no considerados tóxicos debido a su rápida excreción de manera inalterada tras su ingestión. Sin embargo, en el caso de los arsenoazúcares y arsenolípidos, se sabe que están involucrados en la formación de ácido dimetilarsínico (DMA) en la orina (Ma y Le, 1998; Francesconi *et al.*, 2002; Schmeisser *et al.*, 2006; Soleo *et al.*, 2008), el cual posee actividad tóxica conocida y podría jugar un papel importante en la carcinogénesis (Petrick *et al.*, 2000, 2001; Styblo *et al.*, 2000). Además de estos compuestos, existen formas orgánicas producidas por la metabolización de los compuestos de arsénico inorgánico por microorganismos del suelo bajo condiciones oxidativas, animales y humanos. Las formas más comunes son los derivados metilados conocidos como el ácido monometilarsónico ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ), el ácido dimetilarsínico ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ) y el óxido de trimetilarsina (TMAO). Las carnes y los cereales son los alimentos con mayor concentración de arsénico, después de los organismos marinos, aunque con una mayor

proporción de arsénico inorgánico. En cambio, alimentos como frutas y verduras presentan concentraciones mucho más bajas, excepto aquellos que se han cultivado en suelos y aguas contaminadas. Es importante destacar que el uso de plaguicidas y aditivos alimentarios puede hacer aumentar considerablemente las concentraciones de arsénico en alimentos, bebidas y tabaco (Wildfang *et al.*, 2000; Morgan, 2001; Mandal y Suzuki, 2002). En la Tabla 1 se indican los compuestos de arsénico inorgánicos y orgánicos más comunes.

**Tabla 1.** Principales compuestos de arsénico

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

Hasta hace poco, se creía que las formas inorgánicas de arsénico eran más tóxicas que las orgánicas. Esto es así con excepción de las formas orgánicas metiladas de arsénico trivalente como MMA<sup>III</sup> y DMA<sup>III</sup>, originadas en el proceso de metabolización de los compuestos de arsénico inorgánico, que son las que presentan la toxicidad más elevada. Por otra parte, también se podría afirmar que, de manera general, las formas trivalentes de arsénico son más tóxicas que las pentavalentes (Petrick *et al.*, 2000; Styblo *et al.*, 2000; Wildfang *et al.*, 2000; Smedley y Kinniburgh, 2001).

### 1.1.1.2 Fuentes antropogénicas

Aparte de las fuentes naturales que condicionan las concentraciones de arsénico en el medio, también hay que tener en cuenta la aportación ocasionada por la actividad humana. Así, la principal fuente de contaminación por arsénico de origen antropogénico se deriva de la actividad minera. El arsénico se obtiene como producto secundario en la producción y refinación del cobre, plomo, zinc, estaño y oro. Por lo tanto, algunos procesos tanto de extracción minera como de fundición, conllevan un aumento en la concentración de arsénico en el aire como resultado de su calentamiento, generando formas volátiles tóxicas y polvo fino en suspensión. Además, la actividad minera también tiene una repercusión importante en el aumento de la concentración de arsénico en las aguas freáticas, como resultado de filtraciones de compuestos arsenicales derivados de las extracciones (Duker *et al.*, 2005; Jones, 2007).

La presencia de arsénico en las aguas subterráneas también se puede explicar como resultado de la utilización, a veces excesiva y sin control, de productos relacionados con las actividades agrícolas, la jardinería y la limpieza de malezas, como los fungicidas, insecticidas y plaguicidas en general, ya que muchos de ellos contienen arsénico como compuesto tóxico, indicado para erradicar diversas plagas (Mandal y Suzuki, 2002; Jones, 2007).

Actualmente el arsénico se usa en la fabricación de transistores, láseres y semiconductores, así como en la fabricación de vidrios, textiles, papeles, adhesivos de metales, preservantes de alimentos y maderas, y municiones. También se aplica en procesos de bronceado, en la industria de curtiduría y peletería, y en la producción de plaguicidas y de fármacos (p.ej. tratamientos de enfermedades de la piel, como la psoriasis) (Mandal y Suzuki, 2002; Jones, 2007).

Aunque hay una exposición ambiental, generalmente incontrolada, también existen exposiciones controladas como son las exposiciones terapéuticas, ya que no hemos de olvidar el uso del trióxido de arsénico (TOA,  $As_2O_3$ ) en el tratamiento quimioterápico en pacientes con leucemia promielocítica aguda (APL), además del tratamiento de otros tipos de tumores hematológicos y sólidos con los que se están obteniendo resultados esperanzadores (Soignet *et al.*, 1998; Pu *et al.*, 2002; Monzen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2004).

### 1.1.2 Efectos de la exposición al arsénico

El arsénico se ha utilizado como veneno con fines homicidas a lo largo de la historia, principalmente en forma de anhídrido arsenioso (polvo blanco, insípido e inodoro). Entre los siglos XVI y XIX, el trióxido de arsénico ( $As_2O_3$ ) fue la sustancia preferida para este fin, ya que se trata de un envenenamiento difícil de diagnosticar, puesto que la sintomatología que produce es muy parecida a la de una enfermedad gastrointestinal con episodios sucesivos (Graeme y Pollack, 1998; Isbister *et al.*, 2004; Scheindlin, 2005).

La toxicidad del arsénico depende de su forma química y de su estado de oxidación y está asociada fundamentalmente a las exposiciones por ingestión e inhalación (Morgan, 2001). Sus efectos dependen de si la exposición es aguda, con posibles efectos letales, o si es crónica. Las consecuencias de una exposición aguda al arsénico en humanos incluye malestar gastrointestinal, dolor abdominal, vómitos, diarrea, edema pulmonar, orina sanguinolenta, anuria, *shock*, convulsiones, problemas cardíacos, coma y muerte. Los individuos que sobreviven desarrollan hepatomegalia, melanosis, hemólisis, inhibición del sistema inmune y polineuropatías, como resultado del daño causado al sistema nervioso periférico. Se estima que el rango letal de exposición al arsénico en humanos es de 1-3 mg As/Kg (Morgan, 2001; Hughes, 2002; Jones, 2007).

La manifestación de los síntomas del arsenicismo presenta gran variabilidad entre individuos, grupos poblacionales y áreas geográficas, por lo que no existe una definición universal de esta enfermedad (Smedley y Kinniburgh, 2001). Así, se denomina arsenicismo al envenenamiento por arsénico causado por una exposición crónica, normalmente por un periodo de tiempo largo, de 5 a 20 años, a dosis bajas. De esta forma, millones de personas están expuestas a este metaloide, con mayor gravedad en regiones de Bangladesh, India y China (IARC, 2004). Así, el envenenamiento por arsénico en Bangladesh se considera el mayor envenenamiento poblacional en la historia. Estas exposiciones crónicas suelen producirse por el consumo de agua contaminada y los principales síntomas iniciales descritos son: cambios en la pigmentación de la piel (hiperpigmentación e hipopigmentación), hiperqueratosis palmo-plantar, dermatitis alérgica, estrías blancas en las uñas, encefalopatías, disfunción pulmonar, diabetes, disfunción hepática, problemas cardiovasculares, hipertensión, cambios hematológicos, y enfermedad del pie negro (grave enfermedad vascular

periférica que conduce a gangrena, diagnosticada en individuos expuestos a arsénico en Taiwán). Además, existe una clara correlación entre la exposición crónica y el incremento de la tasa de distintos tipos de cáncer, especialmente los de piel, pulmón, hígado, vejiga y riñón, aunque su mecanismo de acción todavía se desconoce (Basu *et al.*, 2001; Morgan, 2001; Smedley y Kinniburgh, 2001; Hughes, 2002; Wang *et al.*, 2002).

Dada la gravedad de los efectos, los niveles ambientales de arsénico son objeto de diversas regulaciones con el objetivo de reducir las exposiciones consideradas peligrosas para la salud. Organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) han establecido que la concentración límite segura de arsénico en aguas de consumo es 10 µg/L, basándose en estudios de evaluación de riesgo y datos epidemiológicos. Sin embargo, teniendo en cuenta que no se han detectado niveles de exposición humana a este elemento que no impliquen efectos nocivos para la salud, la EPA propone eliminar completamente la presencia de arsénico en aguas de consumo. A pesar de que hoy en día parece difícil llegar a cumplir este objetivo, refleja la necesidad y la preocupación por reducir la exposición a este metaloide a niveles mínimos (WHO, 2001).

En el caso de las exposiciones laborales, la Administración de Seguridad y Salud Laboral de los Estados Unidos (OSHA) establece como valor límite seguro de arsénico en el aire el de 10 µg /m<sup>3</sup>, por cada 8 horas de trabajo, considerando la jornada laboral de 40 horas semanales (ATSDR, 2005).

Las características del ciclo del arsénico en el ambiente hace que los seres humanos estemos en mayor o menor medida expuestos inevitablemente a este elemento. De hecho, éste se encuentra presente en todos los organismos vivos por lo que a lo largo de la evolución, se han desarrollado diferentes mecanismos de detoxificación frente a este metaloide.

### **1.1.3 Metabolismo del arsénico**

#### **1.1.3.1 Cinética: absorción, metabolización y excreción**

Los seres humanos podemos estar expuestos al arsénico por vía oral (agua, bebidas, tierra y alimentos), respiratoria (partículas de arsénico presentes en el aire) y dérmica.

La vía y fuente de exposición más importante es a través del agua de consumo y de la ingestión de alimentos cultivados en zonas contaminadas. En la actualidad, varios países presentan niveles de arsénico poco seguros en las aguas de consumo de distintas zonas, alcanzando concentraciones superiores al valor límite seguro establecido por la WHO de 10  $\mu\text{g/L}$ , generando diversos problemas de salud a sus habitantes (WHO, 2001).

La ingestión de arsénico a través de tierra o polvo es poco significativa, ya que la baja biodisponibilidad de los compuestos de arsénico en suelo hace que no sea una fuente de exposición importante (Morgan, 2001). Igualmente, las exposiciones por vía respiratoria y dérmica son poco significativas en comparación con la oral. También se ha puesto de manifiesto la absorción a través de la placenta, aunque esta ruta tenga una menor importancia en comparación con otras vías de penetración (Morgan, 2001; Jones, 2007).

La exposición humana al arsénico a través del aire suele ser baja, alrededor de 1  $\mu\text{g/día}$  en individuos no fumadores, pudiendo llegar a ser de 10  $\mu\text{g/día}$  en individuos fumadores por el contenido de arsénico en las plantas de tabaco. Las concentraciones en el aire de ciertos lugares de trabajo pueden alcanzar niveles de exposición elevados; por lo que, los trabajadores de fundiciones de metales, industria del vidrio, minas extractoras de minerales, manipuladores de plaguicidas y de preservantes de la madera, así como los involucrados en la producción de energía a partir de combustibles fósiles, son colectivos especialmente sensibles a sufrir exposiciones excesivas al arsénico (Morgan, 2001).

Los niveles de exposición global al arsénico en la población general se encuentran entre 20 y 300  $\mu\text{g/día}$ , aunque existe gran variabilidad debido a diferencias poblacionales en la dieta, tanto por el consumo de marisco como por agua contaminada. La biodisponibilidad de la ingesta de arsénico inorgánico variará en función de la forma en que éste se ha ingerido, su solubilidad, y la presencia de otros nutrientes en el tracto gastrointestinal. Después de ser absorbido, su distribución en los tejidos depende del flujo sanguíneo, de los coeficientes de difusión, de las características de las membranas y de las afinidades de los tejidos (Morgan, 2001; Smedley y Kinniburgh, 2001).

En humanos, entre el 60-90% del arsénico soluble ingerido es rápidamente absorbido por el tracto gastrointestinal. Se considera que la proporción de absorción por

vía respiratoria es similar. Existe variabilidad en la capacidad de absorción gastrointestinal, ya que ésta depende de la forma química del compuesto arsenical y de la dosis ingerida. Se estima que prácticamente el 90% del arsénico inorgánico ingerido es rápidamente eliminado del torrente sanguíneo en 1-2 horas, mientras que del 40 al 70% es absorbido, metabolizado y excretado en 48 horas. El órgano metabolizador del arsénico por excelencia es el hígado, aunque también puede ocurrir la metabolización en otros órganos tales como riñones y pulmones. Su eliminación ocurre principalmente a través de la orina, pero también puede ser eliminado por otras rutas menos importantes como las heces, el sudor y la descamación de la piel. Después de 2-4 semanas de la exposición, la mayor parte del arsénico que permanece en el organismo (formas trivalentes), se encuentra acumulada en tejidos ricos en queratina, como piel, pelo y uñas, por lo que también pueden considerarse vías minoritarias de excreción. En base a estos datos, los niveles de arsénico encontrados en orina son indicadores de exposición reciente a arsénico, mientras que los hallados en pelo y uñas son biomarcadores de exposiciones anteriores (Wildfang *et al.*, 2000; Mandal y Suzuki, 2002; Jones, 2007).

La excreción por la orina del arsénico incluye las formas inorgánicas no metabolizadas, así como sus formas metiladas, DMA y MMA. Independientemente del tipo y duración de la exposición, la distribución media de los metabolitos de arsénico en la orina se mantiene constante en los diversos grupos poblacionales analizados siendo ésta 10-30% iAs, 10-20% MMA, 60-80% DMA (Vahter, 1999; Vahter y Concha, 2001).

### **1.1.3.2 Biotransformación del arsénico inorgánico**

Para reducir la posibilidad de que una sustancia produzca una respuesta tóxica dentro de un organismo, se debe disminuir la cantidad de sustancia que llega en forma activa al tejido diana, así como disminuir el tiempo de permanencia de la misma en su sitio de acción. Esto es lo que persiguen los procesos de metabolización de los xenobióticos (compuestos extraños al organismo). La metabolización de un tóxico consiste, fundamentalmente, en convertir un xenobiótico no polar en un compuesto soluble en agua, que facilite su excreción a través de la orina y, de esta manera, detoxificar al organismo.

Existen dos tipos de reacciones involucradas en la metabolización o biotransformación de los compuestos xenobióticos, conocidas como reacciones de fase I y II; además, se podría incluir una fase III que comprende a los transportadores de membrana, encargados del transporte de xenobióticos y de metabolitos. Las enzimas involucradas en los procesos de fase I están representadas mayoritariamente por enzimas de la superfamilia del citocromo P450 (CYP), que convierten los compuestos xenobióticos en sustratos de las enzimas de fase II, al tiempo que los hacen más hidrófilos. Las reacciones de fase II son reacciones de conjugación en las cuales un metabolito con enlaces de alta energía, cede un grupo funcional polar al xenobiótico o a su producto de transformación de fase I, para que pueda ser fácilmente excretado y transportado por los transportadores de fase III (Nakata *et al.*, 2006).

En la actualidad, no existe ningún modelo animal ideal que pueda ser empleado adecuadamente para entender la toxicidad y el metabolismo del arsénico en la especie humana. Por definición, un modelo es la representación de un sistema complejo empleando un sistema más sencillo para su estudio. El sistema modelado y el modelo comparten algunos de los atributos y características, pero no todas. Sin duda alguna, el mejor modelo para el estudio de la toxicidad y el metabolismo del arsénico en humanos es el ser humano, pudiéndose usar tejidos humanos para estudios *in vitro* o el cuerpo humano para estudios *in vivo*. De todas formas, existen varios modelos animales para extrapolar al sistema humano, siendo uno de los parámetros que se considera, a la hora de elegir un modelo animal en el estudio del arsénico, que el perfil de excreción de metabolitos de arsénico por la orina sea similar al humano.

Al igual que en otras especies animales y microorganismos, el arsénico inorgánico también es metilado en humanos, aunque existen considerables diferencias entre especies e individuos. En muchas especies de mamíferos, aunque no en todas, el arsénico inorgánico es metilado a MMA<sup>V</sup> y DMA<sup>V</sup>, que son más rápidamente excretados por la orina que el arsénico inorgánico, especialmente la forma trivalente (arsenito, As<sup>III</sup>) que es altamente reactiva con los tejidos. De cualquier manera, el índice de metilación varía considerablemente entre especies; por ejemplo, los titís y los chimpancés no son capaces de metilar el arsénico inorgánico, habiéndose sugerido que la metilación del arsénico no es un mecanismo de detoxificación en muchos primates no humanos (Wildfang *et al.*, 2001). Esta falta de metilación también se da en *Drosophila*,



donde no se encuentran los metabolitos metilados tras su exposición a arsénico inorgánico (Rizki *et al.*, 2002). Por otro lado, los roedores presentan una metilación más eficiente que los humanos, generando compuestos trimetilados como el óxido de trimetilarsina (TMAO). En el caso de la rata, el DMA<sup>III</sup> resultante se acumula abundantemente en los glóbulos rojos, teniendo como resultado un bajo índice de excreción de arsénico. Por estos motivos, estos animales no son considerados buenos modelos para el metabolismo y toxicidad del arsénico, y los estudios realizados con ellos no pueden ser extrapolados a humanos (Vahter, 1999; Aposhian y Aposhian, 2006). En la actualidad, parece ser que el conejo y el hámster son los modelos animales más fiables (Aposhian y Aposhian, 2006).

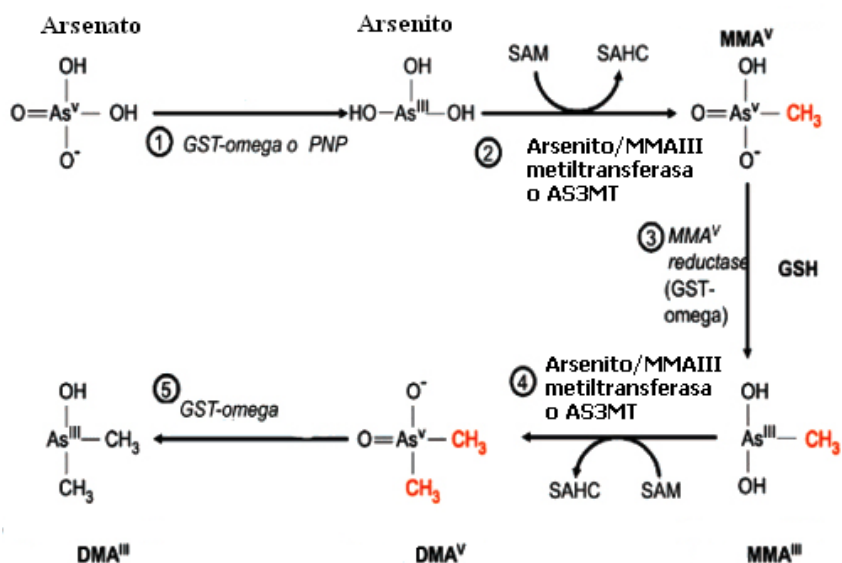
Para estudiar el metabolismo del arsénico, durante décadas se han empleado diferentes modelos animales en la investigación de su metabolismo y su toxicidad. Después de la administración de arsenato y arsenito, se estudiaban los metabolitos excretados en la orina. Aunque ninguno de los modelos animales utilizados parece responder de forma idéntica a como lo hace el ser humano (Aposhian, 1997; Wildfang *et al.*, 2001), la información obtenida a partir de estudios de poblaciones humanas expuestas ha permitido un conocimiento más acertado de su mecanismo. Así, el metabolismo del arsénico ejerce un importante papel modulador de sus efectos tóxicos sobre el organismo, aunque existe una gran variabilidad metabólica entre poblaciones humanas (Hughes, 2002).

#### **1.1.3.2.1 Rutas metabólicas**

Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que la metabolización de los compuestos de arsénico era una ruta de detoxificación, estudios recientes han demostrado que las formas intermediarias metiladas trivalentes de arsénico (MMA<sup>III</sup> y DMA<sup>III</sup>) son mucho más tóxicas que el arsénico inorgánico (Stybło *et al.*, 2000; Kligerman *et al.*, 2003). Estos datos ponen en entredicho que la metabolización sea un proceso de detoxificación, sino que más bien sea un proceso de bioactivación. Sin embargo, tanto la ruta de metabolización como el mecanismo de formación de estos compuestos tóxicos están aún por esclarecer. En la actualidad existen tres propuestas que intentan explicar cómo funciona el proceso de la biotransformación del arsénico.

El metabolismo y la toxicidad del arsénico dependen de su forma química y de su valencia. Los compuestos inorgánicos de arsénico (iAs), arsenato ( $\text{iAs}^{\text{V}}$ ) y arsenito ( $\text{iAs}^{\text{III}}$ ), pueden producir toxicidad tanto en exposiciones agudas como crónicas. Esta toxicidad está asociada a los compuestos primarios y a los metabolitos generados durante su metabolización, llegando a ser el ácido dimetilarsínico ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ) el mayor metabolito de arsénico presente en la orina. (Mandal y Suzuki, 2002; Vahter, 2002).

El modelo clásico fue propuesto originalmente por Challenger en 1951, corroborado por Cullen y Reimer en 1989, y modificado posteriormente a lo largo de los años (Aposhian y Aposhian, 2006). En este modelo, el arsénico inorgánico se transforma a  $\text{DMA}^{\text{III}}$  a través de reacciones de reducción y de metilación oxidativa sucesivas, donde las formas pentavalentes (+5) se forman antes que sus análogas trivalentes (+3) (Figura 2). En mamíferos, esta ruta metabólica es unidireccional, ya que el enlace arsénico-carbono es termodinámicamente muy fuerte (Cullen y Reimer, 1989).



**Figura 2:** Vía metabólica clásica del arsénico, modificada de Marnell y colaboradores (2003).

En humanos, y en otras especies de mamífero, la metabolización del iAs comienza reduciendo arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) a arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ). Se han identificado dos enzimas con actividad  $\text{As}^{\text{V}}$  reductasa, la glutatión-S-transferasa-omega humana ( $\text{hGST}\omega$ ) y la purina nucleósido fosforilasa (PNP). No obstante, aunque PNP presenta actividad  $\text{As}^{\text{V}}$  reductasa, sólo se ha demostrado en condiciones *in vitro*, empleando esta enzima parcialmente purificada de muestras de hígado humano (Radabaugh *et al.*, 2002); *in vivo* no se ha demostrado su actividad reductora (Nemeti *et al.*, 2003). La reacción de

reducción del ácido monometilarsónico ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ) a ácido monometilarsenioso ( $\text{MMA}^{\text{III}}$ ) y del ácido dimetilarsínico ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ) a ácido dimetilarsenioso ( $\text{DMA}^{\text{III}}$ ) es catalizada por la enzima hGST $\omega$  (también conocida como  $\text{MMA}^{\text{V}}$  reductasa, considerada limitante en la ruta de biotransformación del arsénico), que requiere la presencia de glutathion (GSH) como agente reductor (Zakharyan y Aposhian, 1999a; Zakharyan *et al.*, 2001; Aposhian y Aposhian, 2006). Cabe destacar que la reducción de  $\text{As}^{\text{V}}$  puede realizarse a partir de reacciones no enzimáticas, reduciéndose por GSH u otros tioles (Scott *et al.*, 1993; Radabaugh y Aposhian, 2000). En mamíferos, esta reacción no enzimática puede tener lugar en el torrente sanguíneo antes de entrar en los tejidos donde se llevará a cabo la metilación (Huang *et al.*, 2004).

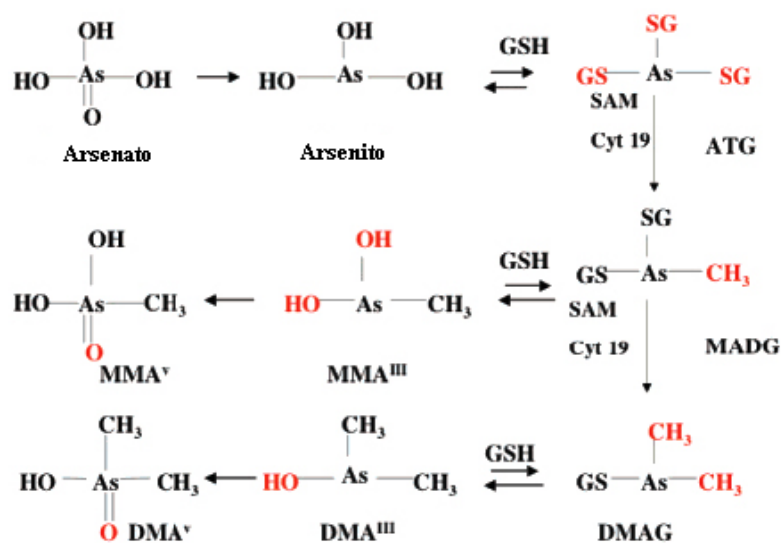
Las reacciones de metilación que dan lugar al ácido monometilarsónico ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ) y al ácido dimetilarsínico ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ) se producen enzimáticamente a partir de la adición de grupos metilo al arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) y al ácido monometilarsenioso ( $\text{MMA}^{\text{III}}$ ), respectivamente. En la actualidad, se ha demostrado experimentalmente la existencia de dos metiltransferasas capaces de catalizar estas reacciones de metilación oxidativa, ambas dependientes de S-adenosilmetionina (SAM) y GSH. La enzima  $\text{As}^{\text{III}}/\text{MMA}^{\text{III}}$  metiltransferasa fue purificada a partir de hígado de conejo y posteriormente detectada en cultivos de hepatocitos humanos (Zakharyan *et al.*, 1995, 1999b). Por otro lado, está la arsénico-3-metiltransferasa (AS3MT) obtenida a partir de hígado de rata, que posteriormente demostró tener una secuencia homóloga a la proteína humana Cyt19 (Lin *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005).

Hoy en día, el modelo clásico ofrece una explicación a la presencia mayoritaria en la orina de  $\text{MMA}^{\text{V}}$  y  $\text{DMA}^{\text{V}}$ , a pesar de que  $\text{MMA}^{\text{III}}$  y  $\text{DMA}^{\text{III}}$  son los metabolitos finales de la ruta. Se hipotetiza que estos podrían ser oxidados y convertidos a sus formas pentavalentes por medio de la enzima hidrógeno peroxidasa, transformando las formas trivalentes a sus homólogas pentavalentes menos tóxicas (Aposhian *et al.*, 2003).

Así, tenemos dos alternativas de metilación y tres de reducción en el metabolismo del arsénico inorgánico. Tanto PNP, hGST $\omega$  como la reducción no enzimática pueden reducir el arsenato a arsenito;  $\text{As}^{\text{III}}/\text{MMA}^{\text{III}}$  metiltransferasa o AS3MT/CYT19 para la metilación, y GSTO para las siguientes reducciones. Además, la enzima hidrógeno peroxidasa podría ir oxidando las formas trivalentes a pentavalentes. Por supuesto,

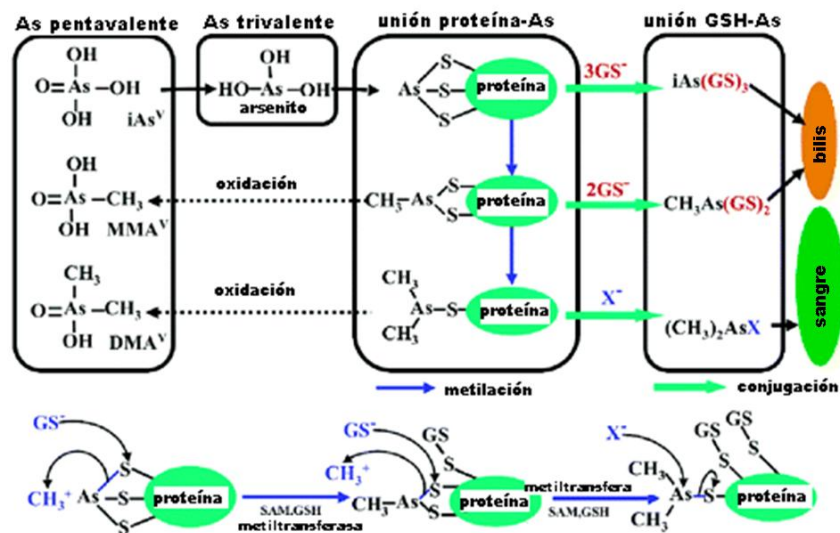
podrían existir muchas más proteínas capaces de reducir y metilar estos compuestos, pero tal como apunta Aposhian, posiblemente haya únicamente dos enzimas involucradas en estas reacciones, la hGST $\omega$  y una metiltransferasa, siempre y cuando consideremos que, en igualdad de condiciones, la solución más sencilla es probablemente la correcta (Aposhian y Aposhian, 2006).

Otro modelo es la ruta alternativa propuesta por Hayakawa y colaboradores (2005). Éste es especialmente atractivo, ya que propone una ruta cuyos productos finales son las formas metiladas pentavalentes, MMA<sup>V</sup> y DMA<sup>V</sup>, que son los principales compuestos hallados en la orina (Figura 3). Esta ruta se basa en las evidencias de la existencia de la reducción no enzimática del As<sup>V</sup>. Así, tras la reducción del As<sup>V</sup> a As<sup>III</sup>, éste forma un complejo con GSH, constituyendo el arsénico triglutation (ATG). Éste será metilado a monometilarsónico diglutation (MADG), y sucesivamente a dimetilarsónico glutation (DMAG) por la enzima AS3MT/CYT19 en presencia de SAM. En este modelo, la única enzima necesaria es la AS3MT, que emplea como sustratos los complejos As-GSH, ATG y MADG. A partir de aquí, los compuestos metilados son oxidados a MMA<sup>V</sup> y DMA<sup>V</sup>. Sin embargo, este modelo también plantea algunos inconvenientes como el de que los complejos As-GSH aún no han sido confirmados, y que la enzima humana AS3MT aún no ha podido ser purificada, ni extraída de tejido humano, sino que ha sido producida mediante técnicas de DNA recombinante (Hayakawa *et al.*, 2005; Aposhian y Aposhian, 2006).



**Figura 3:** Metabolismo alternativo del arsénico a través de complejos arsénico-glutation (As-GSH). Figura modificada de Hayakawa y colaboradores (2005).

La tercera ruta de la biotransformación del arsénico es la recientemente propuesta por Naranmandura y colaboradores (2006) (Figura 4). Esta ruta se basa en el hecho de que los compuestos de arsénico son metilados empleando SAM como donante de grupos metilo y un agente reductor (GSH). Estos investigadores proponen una metilación reductora como la responsable de la metilación de los compuestos arsenicales, basándose en el hecho que la AS3MT es capaz de metilar complejos As-GSH como  $\text{MMA}^{\text{III}}(\text{GS})_2$  pero no  $\text{MMA}^{\text{III}}$  libre (Hayakawa *et al.*, 2005). Esta metilación reductora consiste en que la metilación y reducción del arsénico ocurren en un mismo paso, donde la metiltransferasa llevaría a cabo las metilaciones reductoras de los compuestos de arsénico unidos a proteínas, en lugar de una metilación oxidativa donde primero se metilan los compuestos trivalentes de arsénico y luego se oxidan a sus formas pentavalentes. Así, el arsenito sería captado por los órganos (p.ej. hígado) y sería conjugado con proteínas solubles y no solubles y, posteriormente, metiladas en presencia de SAM por la conjugación de grupos sulfhidrilo (-SH), de grupos tiol (GSH) y/o de grupos -SH de proteínas (metilación reductora) para producir compuestos de arsénico monometilados (primera metilación) y dimetilados.



**Figura 4:** Ruta del metabolismo del arsénico inorgánico propuesta por Naranmandura y colaboradores. Figura modificada de Naranmandura y colaboradores (2006).

La segunda metilación parece ser la limitante de la reacción y excesivas dosis de arsenito podrían llevar a producir los complejos de arsénico y glutatión,  $\text{iAs}^{\text{III}}(\text{GS})_3$  y  $\text{MMA}^{\text{III}}(\text{GS})_2$ , e inducir su excreción por la bilis (Kala *et al.*, 2000). Las formas  $\text{iAs}^{\text{V}}$  y

MMA<sup>V</sup> no serían intermediarias sino productos finales en esta ruta del metabolismo. Cuando el DMA<sup>III</sup> se libera de las proteínas en forma libre o de DMA<sup>III</sup>(GS), parece reaccionar con el sulfuro de sulfano produciendo los compuestos dimetiltioarsénicos DMMTA<sup>V</sup> y DMDTA<sup>V</sup>, que no aparecen en las otras rutas de metabolización del arsénico descritas.

A pesar de haberse desarrollado en rata, que no es un buen modelo para el estudio del metabolismo del arsénico, esta metilación reductora parece explicar al mismo tiempo el modelo de Hayakawa (Hayakawa *et al.*, 2005) y el de Aposhian (Aposhian y Aposhian, 2006).

Por último, y tal como se ha comentado al comienzo de este apartado, diferentes estudios han puesto de manifiesto que distintas especies animales, entre ellas la gran mayoría de primates no humanos, no presentan capacidad metiladora del arsénico inorgánico. Por lo tanto, se ha considerado otra posible vía de detoxificación en la cual los compuestos trivalentes de arsénico se unirían a proteínas, ya que presentan una alta afinidad por los grupos tiol, siendo esta afinidad mayor en los compuestos trivalentes que en los pentavalentes de arsénico. De esta manera, las proteínas funcionarían como un reservorio de especies trivalentes de arsénico, actuando como un mecanismo protector (Aposhian, 1997; Styblo y Thomas, 1997; Wildfang *et al.*, 2001; Aposhian y Aposhian, 2006; Naranmandura *et al.*, 2006).

#### **1.1.4 Toxicidad del arsénico**

La mayoría de los compuestos de arsénico son altamente tóxicos y son causantes de diversas enfermedades presentes en las poblaciones expuestas a este metaloide (Styblo *et al.*, 2000; Basu *et al.*, 2001). Desde 1987, la IARC consideró que había evidencias suficientes para clasificar al arsénico dentro del Grupo 1, que comprende los carcinógenos humanos. Estas evidencias se apoyan en estudios epidemiológicos, donde se relacionan exposiciones crónicas al arsénico con un incremento significativo en la incidencia de cáncer. Además, se ha descrito que el arsénico, en combinación con otros agentes, ejerce un efecto sinérgico en la incidencia de cáncer, como sucede con la radiación UV (Rossman *et al.*, 2004) y el tabaco (Steinmaus *et al.*, 2003). Sin embargo, a día de hoy, existen evidencias limitadas de la carcinogenicidad del arsénico en

animales y su mecanismo de acción continúa siendo bastante desconocido (Hughes, 2002; Rossman, 2003).

Aparte del incremento en la incidencia de distintos tipos de cáncer (p.ej. piel, pulmón y vejiga), existen otros efectos adversos relacionados con exposiciones crónicas de arsénico a través del agua de consumo como son: enfermedades cardiovasculares, cutáneas, respiratorias, neurológicas, problemas hepáticos y renales, hipertensión, diabetes mellitus, anemia, problemas de reproducción e inmunológicos (IARC, 2004; Kapaj *et al.*, 2006).

La neuropatía más común asociada a la toxicidad del arsénico es la degeneración de los nervios periféricos, tanto sensoriales como motores, conllevando a los pacientes a sufrir dolor constante, hipersensibilidad a los estímulos y debilidad o atrofia muscular (Mukherjee *et al.*, 2003; Kapaj *et al.*, 2006). Durante el embarazo, el arsénico puede inducir numerosos efectos sobre el feto, resultando en retraso mental, crecimiento fetal reducido y abortos (Milton *et al.*, 2005; Vahter, 2008). Las complicaciones asociadas al sistema respiratorio son tos y bronquitis crónica (Milton *et al.*, 2003), mientras que las relacionadas con el sistema cardiovascular incluyen la enfermedad del pie negro (pudiendo progresar hasta gangrena y ulceración), hipertensión, isquemia cardíaca, infarto cerebral y diabetes (Tseng, 2008).

Los principales fármacos para tratar la toxicidad aguda y crónica del arsénico son dos agentes quelantes, el 2,3-dimercapato-1-propanosulfonato (DMPS) y el ácido dimercaptosuccínico (DMSA). En particular, el DMPS ha dado resultados significativos en personas con envenenamiento por arsénico por exposiciones agudas y crónicas, mejorando la excreción del metaloide y la sintomatología del arsenicismo (Moore *et al.*, 1994; Wax y Thornton, 2000), mientras que el DMSA únicamente aumenta la excreción de arsénico. Así, el DMPS es el fármaco más eficaz para mejorar las condiciones de vida de los seres humanos expuestos a este metaloide y con reducidos efectos secundarios; sin embargo, son necesarias más investigaciones para confirmar su eficacia (Aposhian y Aposhian, 2006; Kapaj *et al.*, 2006).

Por otro lado, los pacientes con APL sufren efectos secundarios compatibles con la toxicidad aguda y crónica como consecuencia del tratamiento con el TOA. Los problemas cardíacos se observan más frecuentemente en pacientes con hipocalcemia o

hipomagnesemia pudiendo resultar en *torsade de pointes* (taquiarritmia ventricular). También se ha descrito que pueden sufrir el conocido síndrome APL, que se manifiesta con fiebre, dolor muscular, disnea, ganancia de peso, edemas generalizados e infiltraciones pulmonares que pueden llevar a fallo respiratorio. Otros efectos adversos son sequedad y picor de la piel, dolor de cabeza, fatiga, neuropatías, hepatotoxicidad, náuseas, vómitos y falta de apetito. Sin embargo, todos estos síntomas desaparecen al interrumpir el tratamiento (Shen *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1998; Westervelt *et al.*, 2001; IARC, 2004; Dilda y Hogg, 2007).

#### 1.1.4.1 Toxicidad de los compuestos arsenicales

Inicialmente, se creía que los compuestos inorgánicos de arsénico eran más citotóxicos y genotóxicos que las formas orgánicas metiladas derivadas de su metabolismo, ya que según el modelo clásico, la metilación del arsénico inorgánico pretende ser un proceso de detoxificación. Por lo tanto, tenía sentido que los compuestos iniciales de la ruta fueran más citotóxicos que sus formas metiladas, siendo éstas últimas las formas mayoritarias excretadas en la orina. Así, diferentes resultados *in vitro* e *in vivo* obtenidos a partir de distintos ensayos de genotoxicidad revelaban una disminución de la citotoxicidad al aumentar la cantidad de grupos metilo (Eguchi *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1997; Basu *et al.*, 2001).

Los compuestos orgánicos de arsénico consisten en un átomo de arsénico unido covalentemente a un átomo de carbono. En general, estos compuestos suelen ser más estables, menos tóxicos y excretados más rápidamente que los compuestos inorgánicos de arsénico. La toxicidad de un determinado compuesto arsenical está directamente relacionada con su eliminación del cuerpo, evitando de esta manera su bioacumulación en los tejidos (Dilda y Hogg, 2007). Hasta el momento, los compuestos orgánicos de arsénico presentes en organismos marinos tales como la arsenobetaina (AsBe) y la arsenocolina (AsC), no han demostrado producir efectos citotóxicos ni genotóxicos. Estos compuestos son excretados rápidamente del organismo a través de la orina sin ser metabolizados, por lo que su consumo se considera seguro (Eguchi *et al.*, 1997; Mandal y Suzuki, 2002; Guillamet *et al.*, 2004).

Sin embargo, recientes investigaciones han revelado que las formas orgánicas metiladas trivalentes de arsénico, MMA<sup>III</sup> y DMA<sup>III</sup>, compuestos intermediarios del



modelo clásico del metabolismo del arsénico, son más citotóxicas y genotóxicas que el arsénico inorgánico y que sus análogos pentavalentes (Styblo *et al.*, 2000; Kligerman *et al.*, 2003). Así, se ha demostrado experimentalmente que el MMA<sup>III</sup> presenta una LD<sub>50</sub> menor y una mayor toxicidad *in vivo* que el arsenito en hámster (Petrick *et al.*, 2001). Recientemente se ha podido detectar su presencia en la orina de personas expuestas al arsénico a través del agua de bebida, ya que hasta hace poco habían pasado inadvertidas debido a su rápida oxidación en las muestras recogidas; sin embargo, mejoras en los protocolos de conservación y análisis de las muestras han permitido su detección (Le *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2006).

Tal y como se había indicado en el apartado anterior, los compuestos de arsénico presentan una elevada afinidad por los grupos tiol de las proteínas, especialmente por los grupos sulfhidrilo (-SH), siendo esta afinidad mayor en los compuestos trivalentes que en los pentavalentes de arsénico (Styblo y Thomas, 1997; Wildfang *et al.*, 2001; Aposhian y Aposhian, 2006; Naranmandura *et al.*, 2006). Por supuesto, esta alta reactividad implica también un efecto tóxico. Se han descrito interacciones con enzimas de reparación, del metabolismo celular y con factores de transcripción, entre otras, que afectarían tanto a la estructura proteica como a la función. De esta manera, la unión a proteínas se identificaría como uno de los mecanismos empleados en la genotoxicidad y carcinogenicidad de este metaloide (Styblo *et al.*, 2000; Aposhian y Aposhian, 2006; Kitchin y Wallace, 2008).

### **1.1.5 Genotoxicidad del arsénico**

El término genotóxico se aplica a todos aquellos compuestos que inducen daño genético a concentraciones no citotóxicas o que estén asociadas a un bajo grado de citotoxicidad. Es importante destacar que algunas líneas celulares empleadas en estudios de genotoxicidad pueden presentar capacidad metiladora, como es el caso de los hepatocitos. Sin embargo, no es muy frecuente su uso en estudios de genotoxicidad, y por lo tanto, los efectos producidos por los compuestos de arsénico, como por ejemplo el arsenito sódico, serán causados por el propio compuesto, ya que no podrán ser atribuidos a sus metabolitos metilados debido a la falta de actividad metiltransferasa de las líneas celulares empleadas (Rossman, 2003).

En general, los estudios de genotoxicidad ponen de manifiesto que el arsénico no es un mutágeno muy potente, siendo incapaz de producir resultados positivos en ensayos de mutagenicidad en sistemas bacterianos (con y sin activación metabólica), ni en ensayos de mutación génica en células de mamífero, que miden mutaciones en un único gen (Basu *et al.*, 2001; Hughes, 2002). Así, varios compuestos de arsénico han dado resultados negativos en el ensayo de Ames (Shelby, 1988; Kligerman *et al.*, 2003), aunque hay cierta divergencia con respecto a los resultados de mutagenicidad obtenidos con *Escherichia coli*, existiendo resultados tanto negativos (Rossman *et al.*, 1980) como positivos (Yamanaka *et al.*, 1989). En levaduras se obtuvieron resultados positivos para mutación reversa y una respuesta débil para conversión génica (Kharab y Singh, 1985).

Igualmente, se han obtenido resultados discordantes en los ensayos de mutagenicidad realizados en *Drosophila melanogaster*. Empleando el ensayo SMART de alas (*wing spot test*), que permite detectar mutaciones y recombinaciones somáticas, primero se demostró que el arsenito sódico no era genotóxico (Tripathy *et al.*, 1990; Ramos-Morales y Rodríguez-Arnaiz, 1995; Rizki *et al.*, 2002), aunque posteriormente, se han aportado resultados positivos con el mismo ensayo (De la Rosa *et al.*, 1994). Por otro lado, utilizando el ensayo de letales recesivos ligados al sexo (SLRLT), se obtuvieron resultados positivos para el arsenito y arsenato sódico, confirmándose que la forma trivalente es más tóxica y mutagénica que la pentavalente (Ramos-Morales y Rodríguez-Arnaiz, 1995). Además, al evaluar el DMA<sup>V</sup> en el ensayo SMART de alas por nuestro grupo, también se han encontrado resultados positivos. De esta manera, al analizar los resultados obtenidos empleando *Drosophila* como organismo modelo, hay que tener en cuenta que no presenta capacidad metiladora del arsénico inorgánico, al igual que otras especies como tamarinos, conejillo de indias y titís, entre otros (Rizki *et al.*, 2006).

En los ensayos de mutación génica en células de mamífero, el arsénico suele mostrar resultados positivos, no como un inductor de mutaciones puntuales sino como inductor de grandes deleciones. Estas deleciones multilocus son incompatibles con la supervivencia celular cuando las mutaciones son evaluadas en loci que están próximos a genes esenciales, como es el caso del locus *Hprt* (hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa) situado en el cromosoma X. Debido a esta letalidad, muchos tipos de mutaciones no son detectadas en ensayos de mutación génica en bacterias y células de mamífero (Huang *et al.*, 2004). Así, se han obtenido resultados negativos empleando

células de hámster chino en el locus *Hprt* y locus  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa (mutantes con resistencia a la ouabaína) (Rossman *et al.*, 1980). Además, también se obtuvieron resultados negativos en los estudios de genotoxicidad realizados *in vivo* en el ratón transgénico Muta<sup>TM</sup>Mouse donde se estudian las mutaciones en el transgen *lacZ* y en el gen endógeno *cII* (Noda *et al.*, 2002). En cambio, empleando el ensayo de linfoma de ratón (MLA) utilizando el locus *Tk*<sup>+/-</sup> ( timidina quinasa) en la línea celular de ratón L5178Y, se obtuvieron resultados positivos con varios compuestos de arsénico, especies inorgánicas y orgánicas, trivalentes y pentavalentes. Así, en la línea L5178Y, el arsenito y el arsenato sódico produjeron resultados positivos a 1-2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 10-14  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, mientras que el  $\text{MMA}^{\text{V}}$  necesitó 2.500-5.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el  $\text{DMA}^{\text{V}}$  10.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para inducir una respuesta genotóxica (Moore *et al.*, 1997).  $\text{MMA}^{\text{III}}$  y  $\text{DMA}^{\text{III}}$  demostraron poseer un mayor potencial genotóxico, ofreciendo resultados positivos a 0,38  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$ , aunque se considera que esta respuesta es debida a la citotoxicidad producida (Kligerman *et al.*, 2003). Igualmente, se han obtenido resultados positivos para el arsenito sódico en el ensayo de mutación génica con células A<sub>L</sub> híbridas humana-hámster utilizando el locus *CD59* (Hei *et al.*, 1998) y, en células AS52, también aumentó significativamente la frecuencia de mutación en el locus *Xprt* (xantina-guanina fosforribosil transferasa) (Meng y Hsie, 1996).

Por lo tanto, y a diferencia de otros carcinógenos, el arsénico no presenta un gran potencial mutagénico en los ensayos clásicos de mutagenicidad. Sin embargo, sí que es capaz de inducir mutaciones multilocus, no detectables en la mayoría de los ensayos de mutagenicidad con bacterias o células de mamífero (Huang *et al.*, 2004).

La inducción de daño genético por el arsenito sódico también se ha demostrado mediante el ensayo del cometa (Hartmann y Speit, 1994). Así, un estudio reciente efectuado en nuestro grupo, ha evidenciado que los compuestos arsenito y arsenato sódicos son inductores de daño genético en este ensayo en la línea celular linfoblastoide humana TK6, mientras que los compuestos metilados  $\text{DMA}^{\text{V}}$  y  $\text{MMA}^{\text{V}}$  ofrecieron resultados negativos (Guillamet *et al.*, 2004). Mass y colaboradores analizaron mediante el ensayo del cometa y el de inducción de roturas en el DNA en el fago  $\phi\text{X174}$  los compuestos metilados trivalentes, demostrando ser los compuestos de arsénico más potentes en inducir daño genético (Mass *et al.*, 2001). Respecto al ensayo del cometa, hay que matizar que éste permite detectar roturas de simple y doble cadena del DNA. El

uso de enzimas específicas, aumenta la sensibilidad de este ensayo ya que permiten detectar daño por estrés oxidativo actuando sobre las bases oxidadas. En tratamientos con arsénico, las roturas de cadena son un efecto indirecto, ya que no es la interacción directa del arsénico con el DNA la causa de las roturas, sino que es consecuencia del estrés oxidativo generado por estos compuestos. Este hecho está ampliamente demostrado, existiendo numerosos estudios que contrarrestan la genotoxicidad del arsénico aumentando los niveles de GSH (agente reductor) y/o empleando agentes antioxidantes como la vitamina E, la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD) (Lee y Ho, 1995; Hei *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004).

Otro aspecto interesante de la genotoxicidad del arsénico es que es capaz de comportarse como un comutágeno, actuando de forma sinérgica con otros agentes genotóxicos como, por ejemplo, la radiación ultravioleta (UV) (Rossman, 1981; Basu *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004). Se ha observado que el arsenito aumenta la frecuencia de mutaciones inducidas por la radiación UV en ensayos bacterianos. Otros compuestos de arsénico también son capaces de producir citotoxicidad, daño genético y clastogenicidad en células de mamífero al combinarse con la radiación UV, el benzo[ $\alpha$ ]pireno, los rayos X y los agentes alquilantes, entre otros (Lee *et al.*, 1985a, 1986a; Huang *et al.*, 1986, 1987; Jha *et al.*, 1992; Basu *et al.*, 2001). Así, por ejemplo, en un estudio *in vitro* realizado por Lee y colaboradores se observó que el arsenito sódico aumentaba la clastogenicidad y la mutagenicidad de los agentes alquilantes en células de hámster (CHO) y en fibroblastos humanos (Lee *et al.*, 1986b). Se han obtenido resultados similares en linfocitos humanos tratados con arsenito y con el agente alquilante diepoxibutano (Wiencke y Yager, 1992).

En la mayoría de ensayos citogenéticos llevados a cabo, los compuestos de arsénico inducen aberraciones cromosómicas (CA), intercambios entre cromátidas hermanas (SCE) y micronúcleos (MN). Numerosos estudios corroboran el potencial clastogénico del arsénico, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, empleando distintos tipos celulares (Basu *et al.*, 2001; Rossman, 2003; Kligerman y Tennant, 2007). En un estudio muy completo realizado por Kligerman y colaboradores (2003), se emplearon los ensayos de SCE, CA, mutación génica en *Salmonella* y el ensayo de linfoma de ratón para evaluar el potencial genotóxico de seis compuestos de arsénico ( $\text{As}^{\text{V}}$ ,  $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{MMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{MMA}^{\text{III}}$ ,  $\text{DMA}^{\text{V}}$  y  $\text{DMA}^{\text{III}}$ ). Ninguno de los seis compuestos fue efectivo en la inducción de

mutaciones génicas en *Salmonella*. Sin embargo,  $As^V$ ,  $As^{III}$ ,  $MMA^{III}$  y  $DMA^{III}$  indujeron colonias pequeñas en el ensayo de linfoma de ratón, resultado indicativo de mutaciones cromosómicas, siendo  $MMA^{III}$  el compuesto más potente. Estos resultados apoyan los obtenidos en CA, en donde  $As^{III}$ ,  $MMA^{III}$  y  $DMA^{III}$  son fuertes inductores de CA, siendo en este caso el  $DMA^{III}$  el compuesto más potente. No obstante, ninguno de los compuestos fue capaz de inducir SCE. De todas formas, otras investigaciones han obtenido resultados positivos en SCE, pero con una potencia significativamente menor que la obtenida para CA (Wan *et al.*, 1982; Kochhar *et al.*, 1996). De igual manera, estos resultados son apoyados por diversas publicaciones (Schwerdtle *et al.*, 2003; Dopp *et al.*, 2004, 2005).

El ensayo citogenético de micronúcleos (MN) *in vitro* mostró incrementos significativos en células embrionarias de ratón tratadas con arsenito sódico (Muller *et al.*, 1986) y en fibroblastos humanos (Yih y Lee, 1999). Resultados similares se obtuvieron *in vivo* empleando eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón tras una inyección peritoneal de  $As^{III}$  (Deknudt *et al.*, 1986).

Además de ser un agente clastogénico, también posee potencial aneugénico. Eastmond y Tucker empleando el ensayo de MN con anticuerpos anticinetocoro, demostraron que el arsenito sódico era capaz de inducir efectos aneugénicos, ya que los micronúcleos derivados de la exposición eran cinetocoro positivos (Eastmond y Tucker, 1989). Un estudio posterior confirmó estos resultados en fibroblastos humanos aunque, curiosamente, el arsénico a concentraciones bajas (1,25-10  $\mu M$  durante 24 h) generaba MN cinetocoro positivos, mientras que, a concentraciones altas (5-80  $\mu M$  durante 4 h) eran cinetocoro negativos. Al añadir N-acetilcisteína (NAC), un compuesto antioxidante, se reducía la frecuencia de ambos tipos de MN, por lo que su inducción se adjudicó al estrés oxidativo (Yih y Lee, 1999). Por lo tanto, dependiendo del tipo de exposición, el arsénico puede producir diferentes efectos, aneugénicos o clastogénicos. Esta dualidad en su comportamiento presenta especial interés en su uso terapéutico. El trióxido de arsénico (TOA) se emplea en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (APL), y estudios *in vitro* han demostrado que a concentraciones del orden de micromolar (0,5- 2  $\mu M$ ), el TOA desencadena apoptosis en las células APL, mientras que, a dosis más bajas (0,1-0,5  $\mu M$ ), produce diferenciación celular. Ambos efectos son factores importantes en los resultados terapéuticos del arsénico (Zhang *et al.*, 2001).

Asimismo, otros estudios han demostrado que el arsenito sódico es capaz de detener el ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>, interferir en la división mitótica, generar endoreduplicaciones cromosómicas como consecuencia de la inhibición de la actividad fosfatasa, generar tetraploides e inhibir el ensamblaje de las fibras del huso mitótico (Huang *et al.*, 1995; Eguchi *et al.*, 1997). En general, los compuestos de arsénico han demostrado que son capaces de bloquear la mitosis, aunque son los compuestos trivalentes metilados los que presentan el mayor potencial aneugénico. Estudios posteriores han demostrado que la parada mitótica era consecuencia de la interacción del arsénico con el huso, en concreto, inhibiendo la polimerización de la tubulina por la interacción del arsénico con los grupos tiol de esta proteína (Kligerman *et al.*, 2005; Kligerman y Tennant, 2007).

En resumen, el arsénico puede interferir en la división celular interaccionando con el huso mitótico, generar endoreduplicaciones, aneuploidías, amplificación génica (Lee *et al.*, 1988) e inestabilidad genómica, además de clastogenicidad y daños en el DNA, lo cual da credibilidad al potencial de los compuestos de arsénico para actuar como carcinógenos completos.

En estudios *in vitro* de transformación celular con arsenito se han obtenido resultados positivos en varios tipos celulares (Lee *et al.*, 1985b; Rossman, 2003; Tsuchiya *et al.*, 2005). El arsénico se considera un carcinógeno paradójico, ya que existen sólidas evidencias de su potencial carcinogénico en humanos, aunque muestra cierta ambigüedad en los modelos animales empleados. En un estudio reciente, Waalkes y colaboradores demostraron que tras exponer hembras de ratón embarazadas a arsenito, la incidencia de tumores en distintos tejidos en la descendencia aumentaba (Waalkes *et al.*, 2003, 2004). Por otro lado, el DMA<sup>V</sup> ha demostrado ser capaz de inducir cáncer de vejiga en ratas, aunque actuando a través de su forma trivalente (Wei *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2006, 2007). Además, existen diversos trabajos realizados con ratones que señalan que el arsénico actuaría como cocarcinógeno, ya que aumenta la incidencia de tumores en exposiciones combinadas con otros agentes como la radiación UV (Rossman *et al.*, 2004; Waalkes *et al.*, 2007).

Mediante estudios de biomonitorización de poblaciones humanas expuestas al arsénico a través del agua de consumo y exposiciones laborales, se puede establecer una relación entre exposición e inducción de cáncer, empleando diferentes marcadores de

efecto temprano. Estos estudios ponen de manifiesto incrementos en la frecuencia de MN, SCE y CA en linfocitos de sangre periférica y en células epiteliales de mucosa bucal y de vejiga (Dulout *et al.*, 1996; Basu *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2004). Sin embargo, también existen estudios que no demuestran una relación directa entre exposición y daño citogenético, por lo que los estudios de biomonitorización no son concluyentes (Martínez *et al.*, 2005; Paiva *et al.*, 2006). La existencia de factores moduladores de la genotoxicidad del arsénico en estas poblaciones puede generar gran variabilidad de respuesta entre individuos. Algunos de estos factores son la dieta, el tabaco, la edad, el género y la susceptibilidad genética (Basu *et al.*, 2001; Tapio y Grosche, 2006).

En este apartado se ha intentado hacer un breve resumen de los diversos efectos que puede producir el arsénico, aunque existe una gran variabilidad respecto a su genotoxicidad, dependiendo del compuesto arsenical y de las concentraciones empleadas. A pesar de la cantidad de información existente y de los trabajos realizados, continúa siendo un enigma los mecanismos de acción del arsénico que subyacen al desarrollo de diversas enfermedades, especialmente el cáncer.

### **1.1.6 Mecanismos de acción del arsénico**

Por definición, el mecanismo de acción de un carcinógeno es “la secuencia de eventos y procesos claves, que empieza con la interacción de un agente con la célula, seguido de cambios de procesos y cambios anatómicos, resultando en la formación de cáncer” (Klein *et al.*, 2007).

Aunque diversos estudios epidemiológicos han establecido firmemente que el arsénico es un carcinógeno en humanos, el mecanismo a través del cual el arsénico induce cáncer continúa siendo incierto. Se han propuesto diversos mecanismos de acción como, por ejemplo, el daño oxidativo, la inhibición de las enzimas involucradas en la reparación del DNA, la inducción de aberraciones cromosómicas, la alteración de los patrones de metilación del DNA, la alteración de las rutas de señalización, y la inducción de muerte y proliferación celular. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes, pudiendo algunos de ellos actuar al mismo tiempo o de forma secuencial. Por ejemplo, la inducción de estrés oxidativo por arsénico puede ir asociada a la producción de aberraciones cromosómicas, mientras que la alteración de la reparación

del DNA puede afectar la proliferación celular. De entre todos estos mecanismos, es probable que la interacción con las enzimas de reparación y la inducción de daño oxidativo sean los más relevantes (Goering *et al.*, 1999; Kitchin y Ahmad, 2003; Rossman, 2003; Tapio y Grosche, 2006).

El origen del estrés oxidativo inducido está intrínsecamente relacionado con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y otras formas químicas conocidas como radicales libres: radicales superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidroxilo (OH<sup>·</sup>) y peróxido (ROO<sup>·</sup>), generados durante el proceso de metabolización del arsénico inorgánico. Las ROS pueden actuar de forma directa o indirecta sobre el DNA, produciendo roturas simples o de doble cadena, sitios AP (apurínicos o apirimidínicos) o actuar indirectamente en diferentes etapas del proceso de carcinogénesis, afectando a la apoptosis, las rutas de señalización y la proliferación celular. Igualmente, se ha observado que especies reactivas de nitrógeno (RNS), como el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), así como los niveles intracelulares de calcio (Ca<sup>2+</sup>) también juegan un papel importante en el aumento del estrés oxidativo inducido por el arsénico (Bau *et al.*, 2002; Rossman, 2003; Hei y Filipic, 2004; Huang *et al.*, 2004; Tapio y Grosche, 2006).

Así pues, las ROS pueden inducir daño celular por peroxidación lipídica y por alteraciones estructurales en el DNA y en las proteínas. Entre las especies reactivas de oxígeno, ni el O<sub>2</sub><sup>-</sup> ni el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> interactúan con las bases, mientras que el (OH)<sup>·</sup> sí que lo hace, generando una gran variedad de productos a partir de las bases nitrogenadas (Huang *et al.*, 2004). De esta manera, las lesiones más comunes dependientes del estrés oxidativo son las transiciones C→T (40-60%), las transversiones G→T (20-40%) y las deleciones. (Moraes *et al.*, 1990; Schaaper y Dunn, 1991; Tkeshelashvili *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2002). En células tratadas con arsénico también se han podido detectar incrementos de GSH, de ferritina y de heme oxigenasa (HO), parámetros indicadores de la existencia de estrés oxidativo (Rossman, 2003). Hay evidencias de que la producción de ROS por el arsénico también afecta directamente al potencial de la membrana interna de la mitocondria, alterando su permeabilidad; como consecuencia, se libera el citocromo c al citoplasma celular, con la consiguiente activación de la vía de las caspasas, convergiendo en la apoptosis (Hei *et al.*, 1998; Larochette *et al.*, 1999).



Los sistemas de defensa antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos, en los organismos se encargan de controlar el exceso de ROS. Por ejemplo, la enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza el paso de superóxido a  $H_2O_2$  y  $O_2$ , mientras que el glutathion (GSH), que es el sulfhidrilo celular no proteico más abundante, reacciona de forma no enzimática con las ROS o interviene en otras reacciones antioxidantes. Así, se ha observado que descensos de los niveles de GSH conllevan un aumento de la genotoxicidad de los compuestos de arsénico, debido al aumento del estrés oxidativo (Xu *et al.*, 1999; Hei y Filipic, 2004). Estos moduladores del potencial redox tienen un efecto importante sobre la mutagenicidad del arsénico, ya que el uso *in vitro* e *in vivo* de antioxidantes (p.ej. vitamina E, melatonina), captadores de radicales libres como GSH, metales quelantes y enzimas antioxidantes (SOD, catalasa y GPx- glutathion peroxidasa), entre otros, ofrecen protección contra la genotoxicidad del arsénico (Basu *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2004; Tapio y Grosche, 2006). Así, se ha observado que disminuyen la formación de SCE y MN por arsénico (Nordenson y Beckman, 1991; Wang y Huang, 1994; Basu *et al.*, 2001) y en otros estudios han podido detectar una correlación positiva entre la presencia de diferentes tipos de antioxidantes y la reducción de daño genético (Goering *et al.*, 1999; Styblo *et al.*, 2000). La existencia de estrés oxidativo inducido por arsénico también es evidente en los estudios epidemiológicos (Matsui *et al.*, 1999; Tapio y Grosche, 2006). En un estudio llevado a cabo en una población expuesta al arsénico, a través del agua de consumo, se ha confirmado una correlación positiva entre la exposición crónica al arsénico y el estrés oxidativo (Pi *et al.*, 2002).

Estas observaciones ofrecen de nuevo evidencias de que las ROS y las RNS se generan en los sistemas biológicos expuestos a arsénico, y que estas especies reactivas juegan un papel importante en la toxicidad y carcinogenicidad de este metaloide. Es evidente que la exposición al arsénico está asociada con la alteración de los niveles redox intracelulares, resultando así en la inducción de estrés oxidativo. Además, las ROS puede actuar como mensajeros secundarios, modulando la expresión de algunos genes, aunque un exceso de ROS causa daño oxidativo que puede llevar a la muerte celular. Cuando los niveles de estrés oxidativo son bajos, debido a dosis bajas de  $As^{III}$  (0,1-2  $\mu M$ ), se mantiene la homeostasis celular y se produce la activación de factores de transcripción que protegen contra la carcinogénesis. Al contrario, niveles altos por dosis elevadas de  $As^{III}$  (>10  $\mu M$ ), además de producir daño oxidativo, se asocian a alteraciones en los sistemas inmune y cardiovascular y a la activación de factores de

transcripción involucrados en la carcinogénesis (Del Razo *et al.*, 2001; Tapio y Grosche, 2006). Estas respuestas opuestas, en función de la dosis de arsénico, es un fenómeno conocido en Toxicología como *hormesis*, donde dosis bajas del agente producen el efecto contrario que dosis más elevadas; siendo ésta una respuesta característica en presencia de agentes inductores de estrés oxidativo (Calabrese y Baldwin, 2003; Parsons, 2003; Snow *et al.*, 2005)

Otros importantes eventos celulares como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis son coordinados a través de sistemas de transducción de señales, y se ha observado experimentalmente que el arsénico es capaz de alterarlos. Algunos de estos sistemas son las MAPKs, la fosforilación de tirosinas y las familias de factores de transcripción como la AP-1 y la NF- $\kappa$ B (Shi *et al.*, 2004; Tapio y Grosche, 2006).

Cabe destacar que el arsénico también posee la capacidad de alterar el ciclo celular, los patrones de metilación del DNA e inhibir enzimas de reparación del DNA. Así, la inducción de daño por arsénico provoca el bloqueo del ciclo celular en las fases G1 o G2/M, existiendo evidencias que relacionan a la proteína TP53 en este fenómeno, aunque su expresión en respuesta al arsénico es compleja y varía en función de la dosis, tipo celular y tejido (Rossman, 2003; Huang *et al.*, 2004; Tapio y Grosche, 2006).

Recientemente, se ha puesto de manifiesto que el arsénico puede inducir o inhibir la actividad de la telomerasa, que desempeña un papel crucial en la proliferación celular, en la apoptosis y en el mantenimiento de integridad de los cromosomas, teniendo una función importante en la carcinogénesis de este metaloide (Zhang *et al.*, 2003). En el caso del TOA, las dosis terapéuticas (1-2  $\mu$ M) inhiben esta actividad, lo que tiene especial relevancia en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (Chou *et al.*, 2001).

Diversos estudios indican que el arsénico es capaz de inhibir la reparación del DNA, lo que puede repercutir en un efecto cocarcinogénico en presencia de otros agentes genotóxicos. Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos de arsénico, especialmente los trivalentes, pueden interactuar directamente con proteínas debido a su alta afinidad por los grupos sulfhidrilo, alterando de esta manera su estructura y función; esta capacidad podría inhibir enzimas esenciales en la reparación del DNA. Sin embargo, es poco probable que el arsénico actúe de forma directa en la inhibición de los

mecanismos de reparación, sino que su acción más bien ocurriría de forma indirecta, a través de la modulación de la expresión génica y de las ROS (Hu *et al.*, 1998; Rossman *et al.*, 2002; Samikkannu *et al.*, 2003). De cualquier manera, existen sólidas evidencias de la actuación del arsénico sobre diversos sistemas de reparación del DNA, incluidos los sistemas de reparación por escisión de nucleótidos (NER) y escisión de bases (BER), que son inhibidos a bajas concentraciones de arsenito (1-2,5  $\mu\text{M}$ ). Así, se ha citado que el arsénico inhibe el paso de ligación en BER y afecta la expresión de otros componentes de este sistema de reparación (Li y Rossman, 1989; Sykora y Snow, 2008) y afecta al paso de incisión a bajas concentraciones de arsénico (2,5  $\mu\text{M}$ ) en NER, mientras que, a altas concentraciones (20-50  $\mu\text{M}$ ), suprime la ligación (Hartwig *et al.*, 1997, 2002). Cabe destacar que el arsenito, a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ , es capaz de inhibir la poli-(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), una enzima importante en la activación de la reparación del DNA (Yager y Wiencke, 1997; Hartwig *et al.*, 2003). Estos resultados tienen una gran relevancia ya que la actividad enzimática de la PARP constituye la respuesta celular inmediata al daño genético y juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad genómica. La reducción de esta actividad por el arsénico puede explicar, en parte, la clastogenicidad y el efecto inhibitorio del sistema de reparación por escisión de bases (BER), especialmente en los pasos de ligación y en la reparación de daños endógenos en el DNA.

Además, también se ha descrito la inhibición de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) por el TOA, causando disminución de la glucogénesis y produciendo hipoglucemia, dando lugar a una disrupción del proceso de obtención de energía celular, resultando en daño y muerte celular (Samikkannu *et al.*, 2003). Por otro lado, las formas pentavalentes de arsénico son análogas a las del fosfato y pueden sustituirlo de forma competitiva en reacciones endógenas, como la síntesis de ATP, teniendo como consecuencia la pérdida de energía celular (Miller *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Jones, 2007).

Finalmente, la alteración de los patrones de metilación del DNA también tiene un papel relevante en la carcinogénesis del arsénico. Las exposiciones largas a dosis bajas de arsénico (0,2-2  $\mu\text{M}$ ), producen disminución de SAM, principal donante celular de grupos metilo, e inhibe las DNA metiltransferasas, resultando en la hipometilación del DNA (Reichard *et al.*, 2007). De todos modos, se ha observado que los tratamientos con

arsenito generan tanto hipo- como hipermetilación, pudiendo cambiar los patrones de expresión de genes involucrados en la carcinogénesis, como los protooncogenes y los genes supresores de tumores (Hughes, 2002; Jensen *et al.*, 2008; Salnikow y Zhitkovich, 2008).

En resumen, el estrés oxidativo puede influir de forma directa o indirecta en todos estos procesos, jugando un papel importante en la genotoxicidad y carcinogenicidad del arsénico (Rossman, 2003; Huang *et al.*, 2004; Tapio y Grosche, 2006).

### **1.1.7 Factores de susceptibilidad al arsénico**

Diferentes estudios epidemiológicos han evidenciado que existe una correlación entre la susceptibilidad a sufrir enfermedades derivadas de exposiciones a arsénico y las variaciones en los perfiles de excreción de este metaloide. La medición de los niveles de arsénico en orina es el parámetro más fiable para revelar exposiciones recientes, siendo la distribución media de los metabolitos de arsénico en orina la siguiente: 10-30% iAs, 10-20% MMA y 60-70% DMA (Vahter, 1999; Vahter y Concha, 2001).

No obstante, se ha observado que existen excepciones a este patrón estándar de excreción. Poblaciones humanas altamente expuestas a arsénico a través del agua de consumo, como las del norte de Chile y de Argentina, excretan menor cantidad de MMA en la orina, difiriendo de los resultados obtenidos en otras poblaciones en las que solamente unos pocos individuos presentan este patrón (Hopenhayn-Rich *et al.*, 1996; Vahter, 1999, 2000, 2002; Brima *et al.*, 2006). Además, existe también una importante variabilidad interindividual en la metabolización del arsénico. Probablemente, esta variabilidad está causada por factores ambientales y genéticos como, por ejemplo, polimorfismos en la capacidad metabólica y en genes reguladores de la expresión de las arsénico metiltransferasas, entre otros (Vahter, 2000). Igualmente, en un estudio realizado en 10 pacientes con APL tratados con TOA, la muerte repentina de 3 de ellos, demuestra perfectamente la variabilidad y la susceptibilidad interindividual de respuesta frente a exposiciones de este metaloide (Westervelt *et al.*, 2001).

Distintos factores como el nivel de exposición, la dosis, el género (diferencias hormonales), la edad, el índice de masa corporal (BMI), el hábito de fumar, la exposición a otros agentes ambientales y la dieta, entre otros, parecen modular la

variabilidad de respuesta frente a exposiciones al arsénico como, por ejemplo, alterando de manera significativa el proceso de metilación o la defensa frente al estrés oxidativo. Sin embargo, algunos estudios señalan que los factores ambientales explicarían como máximo el 30% de la variabilidad metabólica interindividual, dando más peso a los factores genéticos (Vahter, 2000; Mitra *et al.*, 2004; Lindberg *et al.*, 2007, 2008).

Las variaciones genéticas pueden afectar al metabolismo del arsénico o modificar la susceptibilidad a sufrir enfermedades relacionadas con su exposición. Así, se han realizado estudios de asociación de variaciones en los perfiles de excreción y polimorfismos de genes involucrados en la metabolización del arsénico (p.ej. *GST* y *AS3MT*), el metabolismo del carbono-1 del folato (involucrado indirectamente en la metilación del arsénico a través de SAM), en enzimas de reparación y en el transporte celular, implicados en el flujo de arsénico a través de la membrana (p.ej. *MRP1/2*, *AQP7/9* y *GLUT1*), ya que pueden tener un papel importante en esta variabilidad (Tapio y Grosche, 2006; Thomas, 2007; Hernández y Marcos, 2008; Paiva *et al.*, 2008). Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de estudios realizados hasta el momento, sólo se han obtenido resultados claros para la *AS3MT* (Hernández *et al.*, 2008a, 2008b).

Por lo tanto, este conjunto de factores, ambientales y genéticos, influye de manera significativa en el proceso de metabolización del arsénico y ejerce un papel esencial como moduladores de su toxicidad y la de sus metabolitos (Kurttio *et al.*, 1998; Morgan, 2001; Tapio y Grosche, 2006).

### **1.1.8 Un caso especial: el trióxido de arsénico (TOA)**

El trióxido de arsénico (o arsénico blanco) es un subproducto industrial obtenido de la sublimación del calentamiento de minerales con arsénico (p.ej. rejalgar,  $\text{As}_2\text{S}_2$ ). El humo generado es conservado y purificado, obteniéndose el trióxido de arsénico (TOA,  $\text{As}_2\text{O}_3$ ) (Konkola, 1992). Desde el siglo XVIII hasta comienzos del siglo XX, fue muy popular el empleo de la denominada solución de Fowler, que contenía trióxido de arsénico como principio activo, en diversos tratamientos contra el asma, la anemia, los eczemas, la psoriasis, la malaria y la sífilis. Además, cabe destacar su uso para el tratamiento de la leucemia, debido al descubrimiento en 1878 de la capacidad de este compuesto de disminuir el recuento de glóbulos blancos en sangre. Así, hasta la introducción y utilización de la quimioterapia y la radioterapia a mediados del siglo XX,

el arsénico fue un elemento fundamental en el tratamiento de este tipo de cáncer hematológico. Los temores sobre la toxicidad de los compuestos de arsénico dieron lugar al abandono de su uso terapéutico hasta la década de 1980, cuando unos médicos chinos decidieron evaluar el potencial del TOA en el tratamiento de distintos tipos de cáncer resistentes a los tratamientos estándar con quimioterapia. Descubrieron que, a dosis terapéuticas (1-2  $\mu\text{M}$ ) el TOA era capaz de inducir la remisión completa en el 90% de los pacientes con leucemia promielocítica aguda. Este hecho ha vuelto a despertar el interés en el uso terapéutico de este metaloide, obteniéndose resultados prometedores en tratamientos de otros tipos de tumores tanto hematológicos como sólidos. En el caso de estos últimos se requieren dosis más elevadas de TOA ( $>10 \mu\text{M}$ ), no alcanzables sin severos efectos secundarios a causa de la toxicidad (Antman, 2001; Waxman y Anderson., 2001; Scheindlin, 2005; Liu *et al.*, 2006).

El TOA es un compuesto inorgánico trivalente de arsénico, menos soluble que el arsenito sódico a pH fisiológico, pero menos tóxico al ser inyectado por vía intravenosa, al cual se está expuesto principalmente por su uso terapéutico (Rossman, 2003), pero también por explotaciones mineras (Jones, 2007). Al igual que otros compuestos de arsénico, es un inductor débil de mutaciones génicas, pero ha demostrado ser capaz de inducir CA y MN *in vitro* e *in vivo* (25-100  $\mu\text{M}$ ) (Basu *et al.*, 2001; Patlolla y Tchounwou, 2005) y ha dado resultados positivos en el ensayo del cometa (0,66-32,6  $\mu\text{M}$ ) (Saleha Banu *et al.*, 2001). En cualquier caso, se considera que el efecto clastogénico del TOA posiblemente no represente un riesgo para los pacientes con APL, ya que los efectos inducidos dependen de la dosis empleada, así como del tipo y sensibilidad celular (Basu *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002; Patlolla y Tchounwou, 2005).

La eficacia clínica y el mecanismo de acción del TOA (Trisenox, nombre comercial), no se conocen por completo, sobre todo por lo que respecta a sus posibles efectos secundarios. Sus principales efectos son la diferenciación celular, la inducción de apoptosis, la degradación de la proteína quimérica PML-RAR $\alpha$  (específica de APL), y la antiproliferación e inhibición de la angiogénesis (Lowenberg *et al.*, 2003; Evens *et al.*, 2004). Su mecanismo de acción incluye la inhibición de varias enzimas implicadas en la reparación del DNA e involucradas en el mantenimiento del potencial redox, como la glutatión reductasa (Styblo *et al.*, 1997). Como la mayoría de compuestos de arsénico, el TOA presenta la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno

capaces de inducir daño en el DNA, así como inducir la expresión de genes que codifican diferentes proteínas de respuesta al estrés oxidativo y actuar como comutágeno. Además, puede inducir apoptosis a través de múltiples mecanismos como las ROS, actuando directamente sobre las mitocondrias, destruyendo el potencial de su membrana interna e inhibiendo la actividad telomerasa, entre otros efectos (Miller *et al.*, 2002). Así, a partir de estudios *in vitro* e *in vivo* se ha descrito que a altas concentraciones (1-2  $\mu\text{M}$ ) el TOA induce apoptosis, inhibe el crecimiento celular (parada del ciclo en fase G1) e induce la pérdida de la proteína quimérica PML-RAR $\alpha$  (Shao *et al.*, 1998). En cambio, a bajas concentraciones (0,25-0,5  $\mu\text{M}$ ) y con un largo período de tratamiento, el TOA induce diferenciación celular (Murgo, 2001; Miller *et al.*, 2002; Evens *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). No hemos de olvidar que este compuesto es capaz de inhibir la angiogénesis por interrupción del estímulo recíproco entre células leucémicas y endoteliales, inhibiendo así el crecimiento de las células tumorales. Precisamente, en un estudio *in vivo* con ratones, se demostró que el TOA inducía necrosis masiva en el interior de tumores sólidos, sin afectar a los tejidos sanos a causa de esta inhibición vascular (Lew *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2002).

Aunque las exposiciones crónicas a arsénico puedan causar efectos tóxicos, actualmente podemos hallar numerosas publicaciones con fuertes evidencias sobre la eficiencia terapéutica del TOA en pacientes con APL, ofreciendo un futuro prometedor en los tratamientos de otros tipos de tumores. Sin embargo, hay que insistir en el hecho de que distintas dosis de este compuesto tienen efectos opuestos sobre el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la genotoxicidad, lo que nos revela la existencia de una estrecha ventana terapéutica en su uso, siendo necesarias más investigaciones para esclarecer sus efectos y mecanismos de acción (Liu *et al.*, 2006).

## **1.2 El ensayo de linfoma de ratón**

### **1.2.1 Ensayos de mutación génica**

Los ensayos de genotoxicidad se pueden definir como ensayos *in vitro* e *in vivo* diseñados para detectar agentes capaces de inducir daño genético, directa o indirectamente, a través de diversos mecanismos. La fijación del daño en el DNA puede resultar en mutación génica, daños cromosómicos estructurales, recombinación y cambios en el número de cromosomas. Estos cambios se consideran esenciales en el

proceso multifásico del desarrollo del cáncer. Así, aquellos agentes que ofrecen resultados positivos en los ensayos capaces de detectar tales cambios, presentan el potencial de ser posibles mutágenos y/o carcinógenos en humanos. Además, los resultados obtenidos en estos ensayos son muy valiosos para la interpretación de los estudios de carcinogenicidad (ICH, 1997).

De todas formas, ningún ensayo individual tiene la capacidad de detectar todos los agentes genotóxicos, ni todos los tipos de daño genético, por lo que se hace necesario el empleo de un conjunto de ensayos que abarquen diferentes sistemas biológicos y marcadores de mutación que permitan asegurar que la mayoría de los agentes realmente genotóxicos pueden ser detectados. A este conjunto de pruebas se le denomina batería de ensayos de genotoxicidad. Hay que destacar que no existe una única batería común para todos los países o finalidades, existiendo variaciones en los ensayos que las componen. La batería básica requiere tres ensayos como mínimo (ICH, 1997, 2008): a) un ensayo para detectar mutación génica en bacterias; b) un ensayo *in vitro* de evaluación citogenética de daño cromosómico en células de mamífero (CA o MN) y/o un ensayo *in vitro* de mutación génica en el gen *Tk* en células de linfoma de ratón; y, finalmente, c) un ensayo *in vivo* para el análisis del daño cromosómico usando células hematopoyéticas de roedores.

Los ensayos de genotoxicidad más utilizados que detectan alteraciones a nivel génico son el ensayo de mutación génica en bacterias y los ensayos *in vitro* de mutación génica en células de mamífero. Obviamente, los ensayos de mutagenicidad que usan células de mamífero son más relevantes que los efectuados en bacterias en términos de determinación del posible riesgo en humanos.

#### **1.2.1.1 Ensayos de mutación génica en células de mamífero**

A causa de las diferencias en la organización genómica y en la complejidad genética existentes entre procariotas y eucariotas, los ensayos de mutación génica en células de mamífero son más relevantes y se emplean para complementar el ensayo de mutación génica en bacterias en las baterías de genotoxicidad. En un ensayo de mutación génica en células de mamífero, se evalúa la pérdida de heterocigosidad de un determinado gen, tras exponer un cultivo celular a un agente potencialmente genotóxico.



Tras la secuenciación del genoma de ratón, se ha estimado que este organismo posee alrededor de 30.000 genes (MGSC, 2002), aunque sólo 4 de ellos se han empleado de forma sistemática en los estudios de mutagénesis en células de mamífero (Clive, 1995). De esta manera, a partir del estudio de un gen marcador se pretende hacer una estima del daño global inducido en el genoma por un agente genotóxico. Por supuesto, el daño inducido en un gen no puede extrapolarse a la totalidad del genoma, ya que no todas las regiones se comportan del mismo modo y son igualmente susceptibles al daño. Existen muchas variables que pueden hacer variar la tasa de mutación, como la localización del gen, la estructura de la cromatina (eucromatina y heterocromatina), el patrón de metilación del DNA y el nivel de expresión, entre otros, que afectan a su accesibilidad. Por ejemplo, existen lugares donde la tasa de mutación es más elevada que en el resto del genoma, denominados puntos calientes (*hot spots*), y estos lugares pueden variar en función del mutágeno empleado (Friedberg *et al.*, 2006). En este contexto cabe mencionar un estudio realizado recientemente, comparando el espectro mutacional de dos loci autosómicos, *Tk* y *Aprt*, situados cerca del telómero de los cromosomas 11 y 8 de ratón, respectivamente, para evaluar si ambos eran igualmente susceptibles a sufrir mutaciones o si, por el contrario, características y/o secuencias propias del ambiente cromosómico podían generar espectros de mutación específicos. La elección de estos loci se debió a que su localización próxima al telómero eliminaba tener que considerar la variable de posición del locus al analizar los resultados. Los resultados obtenidos demostraron que el espectro de mutación detectado era esencialmente el mismo en ambos loci, lo que ofrece confianza a la hora de emplear estos genes para estimar el daño inducido (Kasameyer *et al.*, 2008).

En este tipo de ensayos se pueden emplear un gran número de líneas celulares y genes marcadores de mutación; aunque, en la práctica, los genes más utilizados son el de la timidina quinasa (*Tk*), de la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (*Hprt*), de la xantina-guanina fosforribosil transferasa (*Xprt*) y el de la adenina fosforribosil transferasa (*Aprt*). Estos genes deben presentar un único alelo activo en la línea celular empleada, en heterocigosis o en hemicigosis, para que puedan ser empleados en ensayos de mutación génica. En el caso de las líneas celulares, las más utilizadas son la L5178Y de linfoma de ratón, la CHO de ovario de hámster chino, la V79 de fibroblastos de pulmón de hámster, la AS52 construida a partir de la línea CHO deficiente en *Hprt*, a la

que se le insertó una copia del gen *Xprt* o *gpt* de *E. coli*, y la TK6, una línea celular linfoblastoide humana (Ward *et al.*, 1990; OECD, 1997).

Estos genes marcadores de mutación determinan la síntesis de enzimas involucradas en la biosíntesis de los ácidos nucleicos, y permiten a la célula utilizar una vía metabólica alternativa a la síntesis *de novo* para incorporar estos nucleótidos al DNA. Por ejemplo, el gen *Tk* codifica para una enzima citosólica encargada de catalizar la fosforilación de la timidina, reacción necesaria para incorporar la timidina exógena al metabolismo celular. El sistema para seleccionar las células mutantes *Tk*<sup>-/-</sup> es utilizar un análogo tóxico de la timidina, la trifluorotimidina (TFT). Este compuesto, al ser captado por la célula y fosforilado por la timidina quinasa, origina metabolitos tóxicos que producen la muerte de la célula. Así, las células con la enzima TK no funcional serán resistentes a TFT, ya que serán incapaces de metabolizarla y acabarán desarrollando colonias mutantes de origen clonal. Mientras que las que presenten la enzima funcional serán sensibles a TFT y morirán. Por lo tanto, mutaciones en los genes *Tk*, *Hprt*, *Xprt* y *Aprt* pueden eliminar su actividad enzimática y ofrecer resistencia ante análogos tóxicos de nucleósidos.

El gen *Hprt* se encuentra situado en el cromosoma X de ratón y humano, por lo que únicamente se halla representado por una copia activa en el genoma. El transgen *Xprt* se encuentra localizado en un cromosoma autosómico representado por una única copia. Estos dos genes son funcionalmente análogos y las mutaciones pueden ser seleccionadas en virtud de su resistencia a análogos tóxicos de la guanina, la 6-tioguanina (TG) o la 8-azaguanina (AG). Los genes *Aprt* y *Tk* también se encuentran situados en cromosomas autosómicos en heterocigosis en las líneas celulares empleadas en los ensayos de mutación génica. Las células deficientes para APRT se seleccionan mediante análogos tóxicos de la adenina, la 2,6 diaminopurina (DAP) y las deficientes en TK mediante análogos tóxicos de la timidina (TFT) o de la bromodesoxiuridina (BrdU) (Bradley *et al.*, 1981; Stankowski *et al.*, 1986; OECD, 1997; Meng *et al.*, 2000).

Todos ellos son ensayos de mutación directa, que detectan mutaciones que transforman el fenotipo salvaje al fenotipo mutante en presencia de un agente genotóxico. Este proceso se puede dar en presencia o ausencia de activación metabólica, en función de las características del compuesto estudiado. Hay que tener en cuenta que estos ensayos de mutagenicidad no son iguales, detectando espectros de mutación

diferentes, ya sea por las características propias de la línea celular empleada o por el gen marcador seleccionado. Así, la localización autosómica de algunos genes permite la detección de alteraciones genéticas no detectables por el locus *Hprt*, localizado en el cromosoma X (OECD, 1997). Esto es debido a que en las células diploides de mamíferos únicamente un cromosoma X está activo, por lo que aquellos compuestos capaces de inducir grandes deleciones en el DNA no son detectados por el ensayo CHO/*Hprt*. Así, una deleción que se extienda más allá del gen *Hprt* puede afectar a un gen esencial y, en ausencia de otra copia activa, será incompatible con la supervivencia celular. Por lo tanto, las mutaciones inducidas pueden ser subestimadas como consecuencia de la muerte celular, lo que limita la sensibilidad del ensayo para este locus genético. Algo similar ocurre con el locus Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa como gen indicador de mutación. Éste fue uno de los sistemas más populares en su momento, pero que actualmente está en desuso. Esta proteína se encuentra localizada en la membrana plasmática, y la ouabaína era empleada como agente selector. Estudios posteriores revelaron que la inactivación de esta proteína era inviable con la supervivencia celular, demostrando ser un sistema poco eficiente en la evaluación de mutación génica, ya que mutaciones que suprimiesen por completo su actividad eran incompatibles con la supervivencia celular, subestimando una gran cantidad de mutaciones inducidas (Bradley *et al.*, 1981). Por lo tanto, los ensayos de mutación génica con el locus *Tk* pueden detectar un amplia gama de alteraciones genéticas, mientras que el locus *Hprt* sólo detecta mutaciones puntuales y pequeñas deleciones intragénicas (Moore *et al.*, 1989; Muller *et al.*, 1999; Koyama *et al.*, 2006).

Por todo esto, los ensayos de mutagenicidad con células de mamífero más utilizados son los siguientes: L5178Y *Tk*<sup>+/-</sup>, CHO/*Hprt*, CHOAS52/*Xprt* y TK6/*Tk*<sup>+/-</sup>. De todos, el de linfoma de ratón (MLA) L5178Y *Tk*<sup>+/-</sup> es el más extensamente utilizado y preferido respecto a los demás.

### 1.2.2 El ensayo de linfoma de ratón (MLA)

Este ensayo es capaz de detectar un amplio rango de alteraciones genéticas (mutaciones puntuales, cambios cromosómicos, recombinación mitótica, aneuploidías, etc.) que pueden estar involucradas en la etiología del cáncer y otras enfermedades humanas. Se trata de un ensayo capaz de detectar tanto mutágenos puntuales como

clastógenos, siendo por ello considerado como el más sensible de los ensayos de mutación génica en células de mamífero *in vitro* (Applegate *et al.*, 1990).

El ensayo MLA fue originalmente desarrollado por Clive y colaboradores en 1972, quienes utilizaban medio de agar blando para clonar y contar las colonias mutantes (Clive *et al.*, 1972). La elección por parte de estos investigadores de la línea celular linfoblastoide de ratón L5178Y, se debió a que presenta una serie de características que la hacen favorable para su uso en un ensayo de mutación génica *in vitro*. Entre estas características podemos destacar las siguientes: presenta crecimiento en suspensión, un tiempo de duplicación corto (9-11 h), un número estable de cromosomas y una eficiencia de clonación alta. Posteriormente, estos investigadores fueron optimizando el protocolo original, sustituyendo el uso de la bromodesoxiuridina (BrdU) por la trifluorotimidina (TFT) para la selección de los mutantes *Tk*, evaluando el mejor tiempo de expresión para la selección de mutantes (2 días), y efectuando una descripción detallada de los dos tipos de colonias mutantes TFT resistentes, grandes y pequeñas (Clive *et al.*, 1979).

En los primeros años, este ensayo adquirió una reputación controvertida, ya que presentaba una serie de problemas. Así, la calidad del agar, la falta de reproducibilidad, el papel del pH, la osmolaridad y una toxicidad extrema afectaban a su desarrollo, generaban variabilidad y dificultaban la interpretación de los resultados (Clive *et al.*, 1987; Mitchell, 1997; Cole *et al.*, 1999). Se creía que el ensayo era poco fiable y que los resultados definidos como débilmente positivos estaban a menudo asociados a elevados niveles de toxicidad. Posteriormente, se realizaron varias mejoras en la versión agar blando del ensayo MLA, pero con tal de superar el problema de la calidad del agar, y en particular, su efecto en la recuperación de colonias pequeñas, Cole y colaboradores (1983) desarrollaron una nueva versión de este ensayo empleando placas de 96 pocillos, donde las células crecían en medio líquido (Cole *et al.*, 1983, 1986). A partir de aquí se establecieron dos metodologías del ensayo MLA, ambas igualmente aceptadas, como son la versión de agar blando y la multipocillo. No obstante, las diferencias en los protocolos del ensayo se traducen, a veces, en diferencias en los resultados. Por este motivo, la Conferencia Internacional de Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano o ICH (ICH, 1997) aconsejó el uso del método multipocillo por encima del de agar blando; pero los

resultados obtenidos a partir de diferentes estudios han demostrado que ambas versiones del ensayo son igualmente válidas, obteniéndose resultados similares (Oberly *et al.*, 1997; Sofuni *et al.*, 1997; Cole *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2000). Por lo tanto, las mejoras en el protocolo experimental y el empleo del nuevo método multipocillo han convertido a este ensayo en uno de los más sensibles y con mayor capacidad para detectar un amplio espectro de mutaciones y, por tanto, de agentes genotóxicos (Cole *et al.*, 1999; Clements, 2000).

A pesar de que estos dos métodos son básicamente iguales, difieren en el cálculo de la frecuencia de mutación (MF), en la medición de la citotoxicidad y en el recuento y caracterización de las colonias mutantes. Así:

1. La frecuencia de mutación en el método de multipocillo tiende a ser superior que en el sistema de agar blando (Oberly *et al.*, 1997).
2. Los dos sistemas emplean parámetros diferentes para medir la citotoxicidad, por lo que se llegó finalmente al acuerdo de que la medida estándar de citotoxicidad sería el crecimiento total relativo (RTG) para ambos (Moore *et al.*, 2000, 2002).
3. El recuento y caracterización de las colonias en el sistema de agar blando se realiza de forma automatizada empleando un contador de colonias, mientras que en el sistema multipocillo se realiza a simple vista, resultando en valoraciones más subjetivas y con mayor tendencia al error (Cole *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2000).

Finalmente, el ensayo MLA ha sido recomendado por las agencias reguladoras internacionales para la evaluación de mutaciones tanto puntuales como cromosómicas. Aunque para estas últimas, se utiliza normalmente el ensayo *in vitro* de aberraciones cromosómicas (CA), la ICH en su documento S2B estableció que los resultados obtenidos en el ensayo MLA y los obtenidos en el ensayo *in vitro* de CA se pueden considerar equivalentes, pudiendo ser intercambiables ambos ensayos en una batería de ensayos (ICH, 1997, 2008).

Un estudio efectuado por Honma y colaboradores (1999), evaluó la capacidad del sistema multipocillo del ensayo MLA para detectar clastógenos y aneunógenos como alternativa al ensayo CA, para su inclusión en una batería de ensayos de genotoxicidad. Este trabajo concluyó que el MLA no era tan sensible como el CA ya que no podía

detectar compuestos aneugénicos, pero sugería la mejora de su protocolo para hacerlo más efectivo. Así, en aquellos casos en los que el resultado del ensayo MLA había sido negativo en tratamientos de 4 h, con y sin activación metabólica, ampliaron el tiempo de tratamiento a 24 h, en ausencia de activación metabólica. De esta manera, el ensayo MLA condujo a resultados prácticamente equivalentes a los de CA (Honma *et al.*, 1999a), apoyando la propuesta de la ICH. Es por esto que en la actualidad, se están aplicando tratamientos de 24 horas para estudiar la capacidad del ensayo MLA para detectar compuestos aneugénicos (Moore *et al.*, 1999a, 2000, 2002, 2006).

De forma resumida, en la Tabla 2 se presentan las ventajas y desventajas del empleo del ensayo MLA de mutación génica. Un aspecto crítico de este ensayo es el uso de controles positivos apropiados. El propósito de utilizar un control positivo en un ensayo de mutagenicidad es demostrar que el sistema funciona de forma adecuada en el momento en que los agentes potencialmente genotóxicos están siendo evaluados. El control positivo empleado no sólo debe dar una respuesta positiva sino que debe ser una respuesta apropiada, demostrando su capacidad de inducir un aumento significativo de la MF respecto del valor basal. Este control positivo debe inducir, fundamentalmente, colonias pequeñas, debe generar una buena curva de toxicidad y, si es un control positivo que necesita activación metabólica, sólo será efectivo en presencia de un sistema de activación metabólica (Moore *et al.*, 1999b, 2003).

**Tabla 2:** Ventajas y desventajas del ensayo MLA (Clive *et al.*, 1979; ICH, 1997; Moore *et al.*, 1999a, 1999b; Wang *et al.*, 2007)

| <b>Ventajas</b>  | <b>Desventajas</b>  |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Se considera el ensayo de mutación génica <i>in vitro</i> de mamíferos más sensible.</li> <li>○ Capacidad para detectar un amplio espectro de mutaciones, tanto puntuales como cromosómicas. Puede detectar mutágenos puntuales y clastógenos.</li> <li>○ Debido a la distribución bimodal del tamaño de las colonias mutantes, permite conocer el tipo de mecanismo de acción del compuesto que se ensaya.</li> <li>○ Ofrece tanto información cualitativa (tamaño colonias y tipo de mutación) como cuantitativa (MF elevada).</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Especificidad baja y poca fiabilidad cuando las respuestas positivas son débiles y están asociadas a excesiva toxicidad.</li> <li>○ Empleo de controles positivos poco adecuados, sin capacidad de inducir una proporción buena de colonias pequeñas, lo que provoca una pérdida de sensibilidad.</li> <li>○ Tiempo relativamente largo para la realización del ensayo.</li> <li>○ Dificultad para evaluar la toxicidad de los compuestos análogos de la timidina, ya que no serán tóxicos para los mutantes <i>Tk</i> preexistentes en el cultivo celular.</li> </ul> |

### 1.2.2.1 Bases genéticas del ensayo

El ensayo MLA es capaz de cuantificar las alteraciones genéticas inducidas por compuestos químicos que afectan la expresión del gen de la timidina quinasa (*Tk*) en células linfoblastoides de ratón L5178Y *Tk*<sup>+/-</sup> clon 3.7.2c. Ésta es una línea heterocigota para el gen *Tk* (*locus Tk1*) situado en el cromosoma 11 de ratón. Los mutantes *Tk*<sup>-/-</sup> pueden ser seleccionados en un trasfondo de células no mutantes *Tk*<sup>+/-</sup>, gracias a la TFT, que tras varios días acabarán desarrollando una colonia mutante. Estas colonias mutantes presentan una distribución bimodal de tamaño, pudiendo ser grandes (LC) o pequeñas (SC) debido a una cinética de crecimiento distinta. Finalmente, se evalúa el incremento del número de colonias mutantes de origen clonal, con respecto a un control negativo.

Previamente a la realización de un experimento de mutación génica, el cultivo celular debe ser sometido a un purgado para eliminar el exceso de células mutantes *Tk*<sup>-/-</sup> preexistentes, para reducir así la frecuencia de mutación basal del cultivo celular, ya que un exceso de mutantes previos podría generar falsos positivos en el ensayo. El purgado consiste en cultivar las células en medio THMG (timidina, hipoxantina, metotrexato y glicina) durante 24 h. En el medio THMG únicamente sobreviven aquellas células capaces de obtener timidina del medio de cultivo, ya que la síntesis *de novo* está bloqueada por el metotrexato (MTX). El MTX bloquea el metabolismo del folato, con la consiguiente inhibición del metabolismo de las pirimidinas y purinas. Por este motivo se añade timidina e hipoxantina al medio de cultivo. Por otro lado, la glicina está presente como fuente de carbono, sustituyendo al metabolismo del folato. Con estos componentes se enriquece el medio y se asegura el crecimiento de las células *Tk* competentes. Las mutantes, por el contrario, mueren debido a su incapacidad de captar timidina exógena y al bloqueo de su síntesis interna causado por el metotrexato. Una vez obtenido un cultivo celular con una proporción baja de mutantes, éste se emplea para efectuar el ensayo MLA (Clive *et al.*, 1972; Cole *et al.*, 1983).

#### a) Línea celular

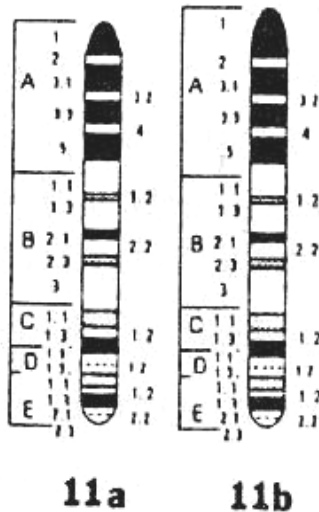
La línea celular que se emplea en el ensayo MLA es la línea celular linfoblastoide de ratón L5178Y *Tk*<sup>+/-</sup> 3.7.2c. Esta línea procede de la línea celular L5178Y obtenida por G. Fischer en los años cincuenta, derivada de un linfoma

neoplásico espontáneo de un ratón DBA/2 (Fischer, 1958). Su cariotipo presenta 40 cromosomas, de los cuales 39 son acrocéntricos y 1 es metacéntrico, resultado de una translocación Robertsoniana (t12;13). Este tipo de translocación se origina por la fusión céntrica de los brazos largos de dos cromosomas acrocéntricos. Cuando ambos centrómeros se fusionan, se forma un único cromosoma. Por lo tanto, esta línea celular actualmente contiene 41 regiones centroméricas. Teniendo en cuenta que ha perdido un cromosoma sexual, esta línea presenta dos cromosomas autosómicos extras, identificados como cromosomas 15. Así, la línea celular L5178Y  $Tk^{+/-}$  3.7.2c manifiesta una tetrasomía para el cromosoma 15 (Sawyer *et al.*, 2006).

Esta línea es heterocigótica para el locus autosómico timidina quinasa ( $Tk$ ), situado en la parte distal del cromosoma 11 de ratón. Las células heterocigotas  $Tk^{+/-}$  cuando crecen en suspensión, mutan espontáneamente a  $Tk^{-/-}$  con una frecuencia de  $2 \times 10^{-6}$  mutaciones/locus/generación. En cambio, la frecuencia de reversión espontánea de  $Tk^{-/-}$  a  $Tk^{+/-}$  es 300 veces inferior,  $6 \times 10^{-9}$  mutaciones/locus/generación, considerándose despreciable en un ensayo de genotoxicidad, y sin repercusión importante en los resultados (Clive *et al.*, 1972, 1979). La frecuencia de mutación espontánea (SMF) en el sistema multipocillo está comprendida entre  $50 \times 10^{-6}$  y  $200 \times 10^{-6}$  (mutantes/ $10^6$  células viables), mientras que como consecuencia de una exposición genotóxica puede alcanzar valores superiores a  $3000 \times 10^{-6}$ , lo que refleja un gran poder de resolución del ensayo (Moore *et al.*, 1999a; Honma y Sofuni, 2001). Esta frecuencia es muy superior a las encontradas en otras líneas celulares empleadas en ensayos de mutación génica en células de mamífero. Recientemente, se ha demostrado que el motivo es debido a que ambos alelos del gen  $Trp53$  están mutados (nomenclatura para el gen  $TP53$  en ratón), también situado en el cromosoma 11 de ratón. Uno de los alelos presenta una mutación puntual en el exón 5, resultante en un cambio de sentido del aminoácido, sustituyendo una cisteína por una arginina en la secuencia proteica, eliminando una de las 4 cisteínas implicadas en la estructura terciaria de la proteína y su unión con un átomo de zinc. En el otro alelo, la mutación se encuentra presente en el exón 4, donde una mutación sin sentido cambia el triplete correspondiente a una glutamina por un codón de parada. Por lo tanto, estas células presentan un fenotipo deficiente en reparación, conocido como fenotipo mutador, resultando en inestabilidad genómica y en un aumento de su susceptibilidad a acumular mutaciones. Así, las células L5178Y no entrarán en apoptosis o en parada del ciclo celular como consecuencia de



una exposición a un agente genotóxico, sino que acumularán mutaciones y aumentará su supervivencia respecto a una línea con *Trp53* funcional. La condición *Trp53* mutante permite aumentar la sensibilidad del ensayo, aunque también se ha relacionado con una disminución de su especificidad (aumento de falsos positivos) en condiciones de elevada citotoxicidad (Storer *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 1998, 2004; Hess *et al.*, 2003).



En la línea L5178Y, los cromosomas 11 homólogos son esencialmente iguales, aunque se diferencian entre sí debido a un heteromorfismo centromérico. Como se observa en la Figura 5, al homólogo con el centrómero más corto, posiblemente debido a una deleción, se le conoce como 11a, mientras que al de mayor tamaño se le conoce como 11b (Hozier *et al.*, 1982; Sawyer *et al.*, 1989).

**Figura.5:** Cromosomas 11 heteromórficos de L5178Y *Tk*<sup>+/-</sup> 3.7.2c. Figura de Sawyer y colaboradores (1989).

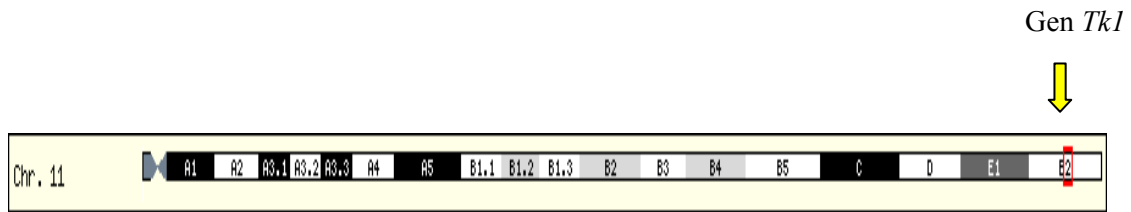
El alelo funcional *Tk*<sup>+</sup> se encuentra localizado en el cromosoma 11b y por este motivo, también se le conoce como *Tkb*, mientras que el alelo mutado se denomina *Tka* (Hozier *et al.*, 1992; Liechty *et al.*, 1994, 1996).

Un estudio reciente ha comprobado mediante la técnica SKY (cariotipado espectral), que tanto su cariotipo como los genes *Tk* y *Trp53* de la línea L5178Y *Tk*<sup>+/-</sup> 3.7.2c, se han mantenido estables a lo largo del tiempo a pesar de su fenotipo mutador (*Trp53*<sup>-/-</sup>) y de la consiguiente inestabilidad genómica (Sawyer *et al.*, 2006). Estas evidencias indican que el cromosoma 11 no tiende a sufrir reorganizaciones y que la línea celular es apropiada para evaluar la inducción de mutaciones, a pesar de su condición mutadora.

## b) El gen *Tk*

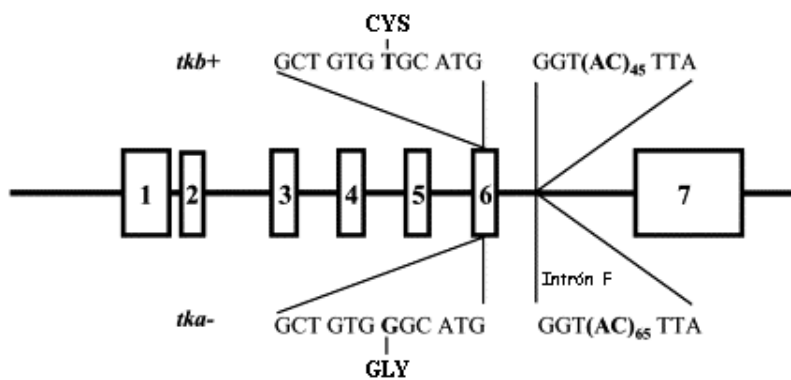
El gen *Tk* o *Tk1* de ratón está constituido por 7 exones y 6 intrones, con una longitud de 10,2 Kb generando un cDNA de 1004 bp (Chen *et al.*, 2002), situado en la parte distal del cromosoma 11 a 5 cM del telómero, en la banda E1-2 (Figura 6) (Hozier *et al.*, 1991; Gudas *et al.*, 1992). Codifica una enzima citosólica encargada de catalizar la

fosforilación de la timidina, necesaria para incorporar la timidina exógena al metabolismo celular. Además, esta enzima presenta una isoforma localizada en las mitocondrias, denominada *Tk2*, cuyo gen se encuentra situado en el cromosoma 8 (Wettin *et al.*, 1999).



**Figura 6:** Posición cromosómica del locus *Tk1* de la línea celular L5178Y *Tk<sup>+/-</sup>* 3.7.2c en el cromosoma 11. Situado en la parte distal del cromosoma, a 5 cM del telómero, en la banda E1-2 ([http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Location/Align?r=11:110217534-121843856](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/Align?r=11:110217534-121843856)).

La secuencia del mRNA de ambos alelos *Tk1* es idéntica, excepto por la sustitución de un nucleótido, una transversión T→G en el exón 6, en la posición 457 del cDNA. Esta sustitución conlleva un cambio de aminoácido, sustituyendo una cisteína (Cys) por una glicina (Gly) y originando una proteína no funcional para *Tka* (Figura 7). Posiblemente, este residuo de cisteína se encuentra involucrado en un enlace disulfuro en la proteína TK resultante. Esta mutación altera la estructura secundaria de la proteína, inactivándola (Liechty *et al.*, 1993).



**Figura 7:** Esquema del locus *Tk1* de 10,2 Kb de la línea celular L5178Y *Tk<sup>+/-</sup>* 3.7.2c. Los alelos *Tkb<sup>+</sup>* y *Tka<sup>-</sup>* son el alelo funcional y no funcional, respectivamente. *Tka<sup>-</sup>* presenta una mutación puntual en el exón 6, cambiando una cisteína (Cys) por una glicina (Gly). También se indica la región dimórfica y repetida en el intrón F del locus *Tk1*. Figura modificada de Honma y colaboradores (2001).

Para poder diferenciar estos dos alelos mediante técnicas moleculares y poder determinar de esta manera cambios en su secuencia o su ausencia/presencia, se pueden utilizar dos métodos: (1) Empleando una RTPCR. Se amplifica el cDNA del locus *Tk1* y

se secuencian el producto de PCR, para detectar la presencia de la transversión (Chen *et al.*, 2002). (2) El locus *Tk1* de ratón contiene un microsatélite heteromórfico con una secuencia repetitiva (AC)<sub>n</sub> en el intrón F, situado entre los exones 6 y 7 (Figura 7). Al amplificar por PCR este microsatélite, el producto correspondiente al alelo *Tk1a* es 80 bp más pequeño que el *Tk1b*, permitiendo de esta manera distinguirlos (Liechty *et al.*, 1996).

### c) Colonias mutantes *Tk*<sup>-/-</sup>

Las colonias mutantes *Tk*<sup>-/-</sup> presentan una distribución de tamaño bimodal. Estas colonias pueden ser grandes (LC) o pequeñas (SC), debido a una cinética de crecimiento diferente, pudiéndose generar tanto de forma espontánea como inducida, aunque la proporción de SC generadas es dependiente del mutágeno (Clive *et al.*, 1979). Varios estudios citogenéticos demuestran que las SC están asociadas con alteraciones numéricas o estructurales del cromosoma 11b, mientras que las LC suelen ser citogenéticamente normales, debiéndose generalmente a mutaciones puntuales (Clive *et al.*, 1979; Hozier *et al.*, 1981, 1982; Moore *et al.*, 1985; Applegate *et al.*, 1990). Estudios moleculares utilizando la técnica de *Southern blot* (o *Southern*) empleando el polimorfismo *NcoI* adyacente a *Tk1*, mostraron que la principal causa del origen de las colonias pequeñas era la pérdida de heterocigosidad por delección completa o parcial del alelo *Tk1b*. En los *Southern* se detecta el fragmento de restricción polimórfico *NcoI*, que permite diferenciar entre el alelo funcional y el mutado, digiriendo el DNA con la enzima de restricción *NcoI* (Applegate *et al.*, 1990; Clive *et al.*, 1990). Este hecho permite detectar y discriminar entre la capacidad de diferentes compuestos de inducir distintos tipos de daño genético. Para una mejor caracterización de las colonias mutantes, se han llevado a cabo estudios de pérdida de heterocigosidad (LOH). Para ello, se han empleado distintos sistemas capaces de detectar la mayoría del espectro de mutaciones inducidas. Estos sistemas son: a) la secuenciación del cDNA del gen *Tk1* (Chen *et al.*, 2002); b) el empleo de distintos microsatélites heterocigotos distribuidos por el cromosoma 11, incluyendo un microsatélite heteromórfico presente en el gen *Tk1* para el análisis de LOH (Liechty *et al.*, 1993); y c) la técnica de pintado cromosómico (Liechty *et al.*, 1998). De esta manera, se pueden caracterizar los eventos genéticos ocurridos en los mutantes *Tk*, obteniéndose una perfecta correlación con los resultados obtenidos por *Southern*, siendo un sistema muchos más rápido, simple, fiable e

informativo, ya que, por ejemplo, el uso del pintado cromosómico proporciona información no apreciable por PCR o por *Southern blot*, como son las reordenaciones (Liechty *et al.*, 1994, 1996; Honma *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). De esta manera, se puede detectar que estas dos clases de colonias surgen como consecuencia de distintos tipos de daño genético y que este ensayo puede ser empleado para discriminar entre compuestos capaces de inducir mutaciones puntuales (generando principalmente LC) y/o cromosómicas (generando SC).

El hecho de que las colonias pequeñas presenten una cinética de crecimiento más lenta que las grandes, sugiere sucesos genéticos que no sólo afectan al alelo *Tk1b*. Una de las hipótesis que se plantean es que algún gen esencial colindante al gen *Tk*, localizado en algún lugar del cromosoma 11 se vería afectado (Hozier *et al.*, 1982; Moore *et al.*, 1985; Liechty *et al.*, 1998). Inicialmente, se consideró que este gen podría ser el *Trp53* (Mitchell, 1997), ya que se había postulado que se encontraba próximo al gen *Tk*. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la localización del gen *Trp53* había sido incorrecta y que, en realidad, se halla a una distancia que hace difícil que fuesen eliminados conjuntamente por una delección, ya que ésta debería ser muy grande. Las colonias mutantes analizadas no mostraban delecciones de ese tamaño, por lo que se consideró más probable que un gen situado más próximo al gen *Tk* fuese el responsable de los mutantes con cinética de crecimiento lenta (Clark *et al.*, 1998, 2004). Una hipótesis alternativa estaría basada en la formación de roturas cromosómicas, sugiriendo que la célula podría sufrir un bloqueo en la división celular hasta que fuese reparado el daño. Así, una colonia sería pequeña porque su división se vería interrumpida durante un periodo largo de tiempo. Esto se fundamenta en el hecho de que el desarrollo de SC se encuentra asociado con la presencia de aberraciones cromosómicas citogenéticamente detectables, a diferencia de lo que sucede en LC (Hozier *et al.*, 1981; Moore *et al.*, 1985; Blazak *et al.*, 1989). Finalmente, se ha sugerido una tercera posibilidad, al postular que otro locus completamente separado, probablemente de otro cromosoma, se vería afectado por mutaciones. Sin embargo, estos tres modelos no son mutuamente excluyentes. De cualquier manera, se ha de tener en cuenta que no necesariamente el tamaño de colonia tiene porque predecir si se han producido mutaciones puntuales o cromosómicas, ya que ambos tipos de alteraciones se pueden encontrar tanto en LC como en SC (Liechty *et al.*, 1998; Clements, 2000).

**d) Pérdida de heterocigosidad (LOH)**

Durante el desarrollo del cáncer, una célula somática sana se transforma en tumoral como consecuencia de un proceso multifásico, que implica un conjunto de mutaciones. Las células neoplásicas han sufrido numerosas alteraciones genéticas, desde mutaciones puntuales a aberraciones cromosómicas, afectando la función y la expresión de oncogenes y de genes supresores de tumores. Las mutaciones en genes supresores de tumores son generalmente recesivas; así, una mutación en uno de sus alelos no tiene como resultado la alteración del crecimiento celular, y se requiere que ambos alelos pierdan su función. Por lo tanto, la pérdida de heterocigosidad (LOH) de un gen supresor de tumores es un paso crucial en el desarrollo del cáncer (Lasko *et al.*, 1991; Honma, 2005).

Aunque pequeños sucesos intragénicos como sustituciones de bases, desplazamiento de la pauta de lectura y silenciamiento epigenético pueden conducir también a la pérdida de expresión de un gen supresor de tumores, el siguiente paso de eliminación del alelo funcional restante suele deberse a mutaciones de gran tamaño. Estas pueden resultar principalmente de tres procesos distintos: recombinación mitótica, pérdida de cromosomas o deleciones intersticiales (Turker, 2003).

Como ya se ha comentado previamente, el ensayo MLA tiene la capacidad de detectar un amplio abanico de mutaciones, muchas de ellas implicadas en la etiología del cáncer, que suponen la pérdida de heterocigosidad del gen *Tk1*. Así, la inducción de LOH puede ser consecuencia de varios sucesos multilocus, como deleciones, recombinación mitótica, pérdida cromosómica con o sin duplicación del cromosoma homólogo, o sucesos restringidos a un locus tales como mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o conversión génica. Igualmente, la LOH puede generarse como resultado de alteraciones en los mecanismos de reparación del DNA encargados de la reparación de diferentes tipos de lesiones, o como consecuencia de una mala segregación cromosómica (Wijnhoven *et al.*, 2001).

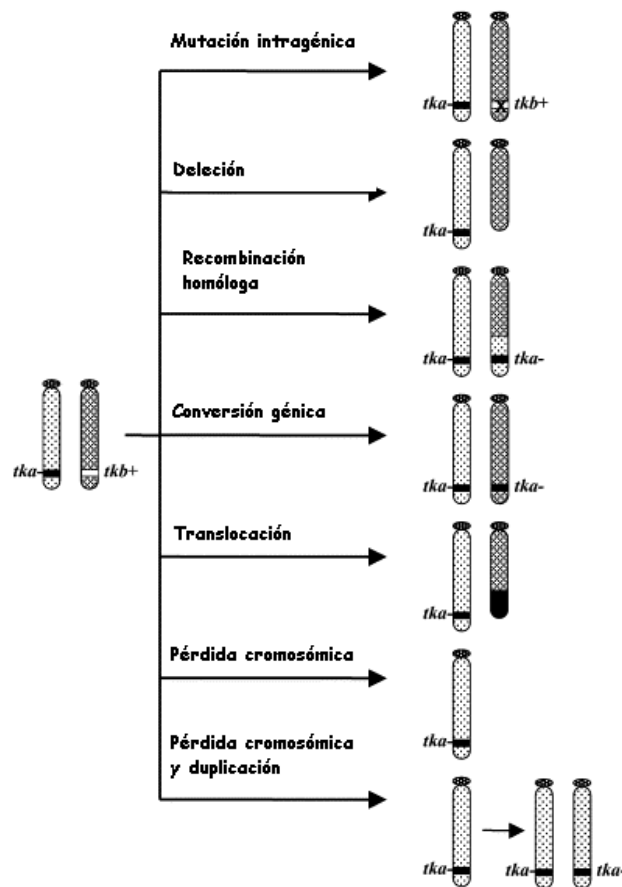
**e) Mutaciones detectadas mediante el ensayo MLA**

Tanto las mutaciones puntuales como las aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas son detectables por el ensayo MLA (Figura 8). Para el estudio preciso sobre

las mutaciones autosómicas en el gen *Tkl* se emplean técnicas moleculares para analizar su cDNA, y además, mediante el análisis de polimorfismos tales como los microsatélites se pueden distinguir los cromosomas homólogos entre sí. De esta manera, los patrones de pérdida de heterocigosis (LOH) para estos marcadores polimórficos pueden emplearse para determinar el tipo de mutaciones producidas.

El término mutación génica o puntual habitualmente hace referencia a la alteración de un par de bases o de un número pequeño de pares de bases. Los dos tipos principales de mutaciones puntuales son las *sustituciones de bases* y las *inserciones o deleciones*. En el caso de las sustituciones, éstas pueden ser *transiciones* o *transversiones*. Una *transición* es una sustitución de una base por otra de la misma categoría química, es decir, una purina por una purina ( $G \leftrightarrow A$ ), o una pirimidina por una pirimidina ( $T \leftrightarrow C$ ). Una *transversión* supone la sustitución de una base por otra de distinta categoría, una pirimidina por una purina ( $TC \rightarrow AG$ ) o viceversa ( $AG \rightarrow TC$ ). Estos cambios pueden tener consecuencias fenotípicas al afectar a la región codificadora de un gen, alterando la secuencia de la cadena polipeptídica de la proteína resultante. Así, pueden converger en mutaciones silenciosas (sin cambio de aminoácido), de cambio de sentido sinónimas (sustitución por un aminoácido químicamente similar), de cambio de sentido no sinónimas (aminoácidos químicamente diferentes), y sin sentido (aparición de un codón de finalización de la traducción). Con excepción de las mutaciones silenciosas y sinónimas, el resto es probable que afecten gravemente la función de la proteína. Además, la adición o deleción de un único par de bases generará *mutaciones de cambio de fase* o *desplazamiento del marco de lectura*, que provocan la alteración de la secuencia aminoacídica en la traducción al crear nuevos tripletes de codones, pudiendo dar lugar a pérdidas completas de la estructura y función de la proteína (Griffiths *et al.*, 2008).

Respecto a las aberraciones cromosómicas numéricas, la generación de LOH se puede originar por la pérdida de cromosomas enteros, fenómeno conocido como *aneuploidía*. La causa de la mayoría de aneuploidías es la no disyunción durante el transcurso de la mitosis o la meiosis. La no disyunción implica un error en la segregación de los cromosomas homólogos o las cromátidas hacia los polos opuestos. Así, los dos cromosomas o cromátidas se desplazarán juntos a un polo, con la consiguiente pérdida en el otro polo (Honma *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 2008).



**Figura 8:** Resumen de las alteraciones que pueden generar LOH del locus *Tk*. Donde *tka* es el alelo mutado y *tkb* es el alelo funcional, cuya pérdida origina LOH. Figura modificada de Honma y colaboradores (2001).

Otros cambios estructurales también pueden derivar en LOH. Esta clase de reordenaciones siempre implica roturas de doble cadena en el DNA. Así, se puede perder un fragmento cromosómico generándose una *delección* y se puede mover un fragmento de un cromosoma a otro, produciéndose una *translocación*. Además, en el proceso de reparación de las roturas de doble cadena, los mecanismos de reparación por *recombinación homóloga* y *unión de extremos no homólogos* también pueden generar LOH. La *recombinación homóloga* (HR) emplea como molde la secuencia no dañada presente en el cromosoma homólogo o la cromátida hermana durante la fase S/G2 del ciclo celular. En el modelo de reparación de *recombinación homóloga*, los intermediarios recombinacionales (estructura de *Holliday*) pueden resolverse como un intercambio recíproco de material (*crossing-over*/entrecruzamiento) o como una transferencia no recíproca de material genético (conversión génica sin entrecruzamiento). La *conversión génica*, también conocida como recombinación

alélica, es un tipo de *recombinación homóloga* donde sólo se ve implicado una pequeña parte del cromosoma (p.ej. un alelo). Este fenómeno sólo ocurre cuando hay heterocigosidad para los dos alelos diferentes de un gen y es un proceso meiótico de cambio en el que un alelo dirige la conversión a su propia forma del otro alelo. De esta manera, la *recombinación homóloga* y/o *conversión génica* entre dos cromátidas de cromosomas homólogos puede resultar en LOH, ya que la información presente en los cromosomas homólogos no tiene porque ser la misma. En cambio, entre cromátidas hermanas no se perdería información (Wijnhoven *et al.*, 2001). La *unión de extremos no homólogos*, conocida por las iniciales NHEJ (del inglés “*non-homologous end joining*”), es un mecanismo de reparación de roturas de doble cadena que puede actuar en cualquier fase del ciclo celular. Se conoce como no homólogo porque los extremos de las roturas se unen directamente sin necesidad de un molde homólogo y las translocaciones se originarían como consecuencia de este mecanismo de reparación (Wijnhoven *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 2008).





## 2. OBJETIVOS

Esta tesis doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación desarrollada en el Grupo de Mutagénesis de la UAB sobre la determinación de los mecanismos de genotoxicidad del arsénico, que centra su interés en la evaluación del potencial genotóxico de diversos compuestos de arsénico y de sus mecanismos de acción genotóxicos. En este contexto, el presente trabajo se ha llevado a cabo para cubrir los objetivos que se especifican a continuación.

### **Objetivo I: Puesta a punto del ensayo MLA en nuestro laboratorio**

El MLA es el ensayo de mutación génica en células de mamífero más sensible y con mayor capacidad de detección de un amplio espectro de mutaciones, tanto puntuales como cromosómicas. Estas características, junto con la necesidad de nuestro laboratorio de incorporar un ensayo de mutación génica en células de mamífero a los ensayos de genotoxicidad ya existentes en nuestro grupo, lo hacían especialmente atractivo para su empleo en la evaluación del potencial genotóxico de diversos agentes. En consecuencia, el primer objetivo ha sido la puesta a punto del ensayo de linfoma de ratón y la evaluación de su bondad.

### **Objetivo II: Evaluación del potencial genotóxico de compuestos de arsénico**

A diferencia de otros carcinógenos, diversos estudios de genotoxicidad han puesto de manifiesto que el arsénico no es un mutágeno muy potente, pero sin embargo ha demostrado tener capacidad para inducir mutaciones multilocus. Hasta ahora, su mecanismo de acción en el desarrollo del cáncer continúa siendo un misterio, y no existe un consenso sobre qué compuestos de arsénico están más asociados con la carcinogenicidad. El segundo objetivo ha sido el de aplicar la metodología MLA al estudio de la genotoxicidad de distintos compuestos de arsénico. Este objetivo se ha cubierto en dos etapas:

- a) Evaluación del potencial genotóxico de seis compuestos de arsénico, a saber: arsenito sódico, trióxido de arsénico, MMA<sup>V</sup>, DMA<sup>V</sup>, arsenobetaina y cloruro de tetrafenilarsonio.

- b) Determinación del mecanismo de genotoxicidad de estos compuestos, a partir de la formación y tamaño de las colonias mutantes generadas en el ensayo.

### **Objetivo III: Estudio del espectro mutacional del trióxido de arsénico**

El trióxido de arsénico (TOA) se emplea con éxito en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda. Actualmente, se están realizando estudios para su aplicación en tratamientos de otros tipos de cáncer, tanto hematológicos como en tumores sólidos. Se ha propuesto que el ensayo MLA genera LOH a través de diversos mecanismos, incluyendo deleciones, recombinación y pérdida cromosómica; por lo que nuestro objetivo ha consistido en caracterizar la naturaleza de los mutantes inducidos por el TOA en el ensayo MLA. Para ello se ha propuesto:

- a) Caracterizar las colonias mutantes inducidas por el TOA en el ensayo MLA, mediante técnicas moleculares, para establecer el espectro mutacional inducido.
- b) Caracterizar mediante técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) la naturaleza de las LOH detectadas previamente, mediante técnicas moleculares.

### 3. Materiales y Métodos


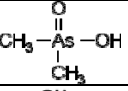
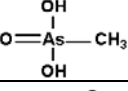
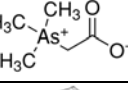
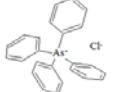
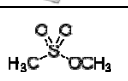
#### 3.1. Información complementaria a la contenida en los artículos

En este apartado se presenta información complementaria que no está detallada en los artículos y que consideramos importante para la comprensión del trabajo realizado. Entre esta información se incluye, por ejemplo, el cálculo de los parámetros evaluados en el ensayo MLA: crecimiento total relativo (RTG), viabilidad (V) y frecuencia de mutación (MF), entre otros. Asimismo, también se indican los criterios de aceptación del ensayo para que los resultados obtenidos sean considerados válidos.

##### 3.1.1 Compuestos de arsénico evaluados en el ensayo MLA

Cada experimento consistió en un control negativo con el solvente, un control positivo (metilmetanosulfonato) y, al menos, cuatro concentraciones de cada compuesto seleccionado. Una vez puesto a punto el ensayo, se evaluaron seis compuestos de arsénico, que se especifican en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Compuestos de arsénico evaluados mediante el ensayo MLA, además del metilmetanosulfonato, empleado como control positivo en el ensayo. Características fisicoquímicas.

| Producto                            | Fórmula  | Valencia | Estructura química  | Peso molecular | Solubilidad      | Pureza  |
|-------------------------------------|--|----------|---|----------------|------------------|---------|
| Arsenito sódico                     | NaAsO <sub>2</sub>   | +3       | $O = As - O^- Na^+$   | 129,91         | H <sub>2</sub> O | 96,7%   |
| Trióxido de arsénico                | As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>   | +3       |  | 197,84         | NaOH<br>0,1M     | 99,995% |
| DMA <sup>V</sup>                    | (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> HAsO <sub>2</sub>                                | +5       |  | 138,00         | H <sub>2</sub> O | ~98%    |
| MMA <sup>V</sup>                    | CH <sub>3</sub> HAsO <sub>2</sub>  | +5       |  | 161,96         | H <sub>2</sub> O | 96,6%   |
| Arsenobetaina                       | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> AsO <sub>2</sub>                                  | +5       |  | 178,06         | H <sub>2</sub> O | >95%    |
| Cloruro de tetrafenilarsonio        | (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>4</sub> As(Cl)<br>o [AsPh <sub>4</sub> ]Cl | +5       |  | 418,79         | H <sub>2</sub> O | 97%     |
| Metilmetanosulfonato (MMS) 10 µg/mL | C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S                                   | -        |  | 110,13         | H <sub>2</sub> O | ~99%    |

El tiempo de tratamiento empleado fue de 4 h a 37 °C, en agitación, más un tratamiento de 24 h con el compuesto arsenobetaina. Las células se mantuvieron en

crecimiento durante dos días, se contaron diariamente, y se subcultivaron para permitir la expresión de las mutaciones inducidas (expresión del fenotipo  $Tk^{-/-}$ ). El recuento celular durante los dos días de expresión y el de postratamiento se usó para determinar el crecimiento relativo en suspensión (RSG%), cuyo cálculo se especificará más adelante (Clive *et al.*, 1979).

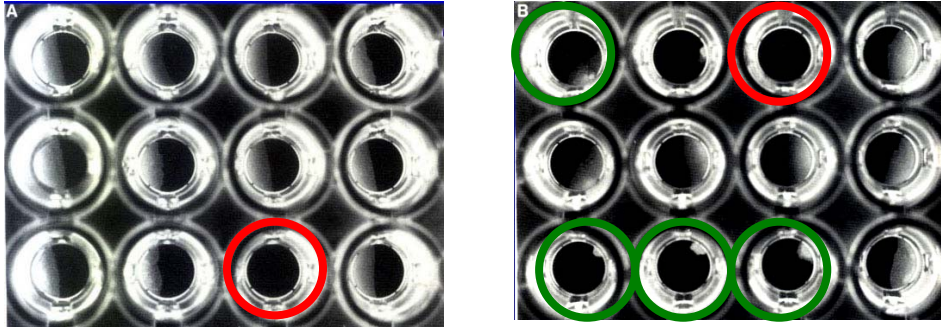
### 3.1.2. Recuento de colonias

Las colonias obtenidas en las placas de viabilidad, así como las colonias mutantes de placas con TFT, se contaron tras 12 días de incubación. Se contaron manualmente, a simple vista, utilizando un espejo para mejorar su visualización. En el caso de las placas sembradas con TFT, para facilitar el recuento de colonias se añadieron 25  $\mu$ L de una solución (2,5 mg/mL) de azul de tiazolil (MTT). De esta manera, se provoca el oscurecimiento de las células, en particular de las colonias pequeñas, permitiendo un recuento y caracterización del tamaño de las colonias más preciso.

Un pocillo que no contenga colonias se considera negativo. Se determina el número de pocillos negativos por placa multipocillo (96 pocillos) para calcular la viabilidad (V) y la frecuencia de mutación (MF). La MF se calculará a partir de las placas con TFT, donde las colonias pequeñas y grandes se cuentan independientemente, ya que nos proporcionan información respecto del mecanismo de acción del compuesto ensayado. En las placas de viabilidad no se valora el tamaño de la colonia, sólo se tiene en cuenta su presencia o ausencia.

Las colonias grandes y pequeñas (Figura 9) se caracterizaron de la siguiente manera (Honma *et al.*, 1999a):

- **Grandes:** tamaño mayor de  $\frac{1}{4}$  del diámetro del pocillo, morfología difusa en todo el pocillo o sólo en la periferia.
- **Pequeñas:** tamaño menor de  $\frac{1}{4}$  del diámetro del pocillo, morfología compacta.



**Figura 9:** Visualización de colonias en placas multipocillo. A) Placa de viabilidad, 11 pocillos positivos y 1 negativo (marcado en rojo). B) Placas con TFT, 7 colonias grandes, 4 pequeñas (marcadas en verde) y un pocillo negativo (Cole *et al.*, 1986).

### 3.1.3. Cálculo de parámetros

La formación de colonias en pocillos se describe por la distribución de Poisson; así, la eficiencia de clonación (PE) o la viabilidad (V) se calculan usando el término cero de la distribución de Poisson  $\{P(0)\}$ .

$$P(0) = \frac{n^{\circ} \text{ pocillos negativos}}{n^{\circ} \text{ total pocillos placa}}$$

$$V\% = \frac{-\ln P(0) \times 100}{n^{\circ} \text{ células / pocillo}}$$

En el caso de las placas de viabilidad, se sembraron 2 células/pocillo. Así que:

$$V\% = \frac{-\ln P(0) \times 100}{2}$$

Para las placas con TFT el cálculo es similar, pero teniendo en cuenta el hecho de que se sembraron con  $2 \times 10^3$  células/pocillo.

$$\text{Frecuencia de mutación (MF)} = -\ln P(0) / 2 \times 10^3$$

La frecuencia de mutación se expresa como mutantes/ $10^6$  células viables y se calcula como:

$$MF/\text{supervivientes} = MF / V\%$$

El crecimiento total relativo (RTG) es la medida de citotoxicidad del compuesto ensayado. Para determinarlo, primero se calculó el crecimiento en suspensión relativo (RSG), a partir del crecimiento diario celular (DCG) durante los dos días de expresión fenotípica.

$$RSG = [DCG1 \times DCG2 \text{ (tratamiento)}] / [DCG1 \times DCG2 \text{ (control)}]$$

DCG es la estima de crecimiento entre el día 0 y 1 (DCG1) o entre el día 1 y 2 (DCG2). Cabe destacar, que el valor obtenido de la multiplicación ( $DCG1 \times DCG2$ ) también se conoce como crecimiento en suspensión (SG).

Entonces el RTG se calcula como:

$$RTG\% = RSG \times RV\%$$

Donde RV (viabilidad relativa) se calcula comparando la eficiencia de clonación (viabilidad) del tratamiento con la del control.

#### 3.1.4. Criterios de aceptación del ensayo

Los criterios de aceptación del ensayo MLA son pautas que deben cumplirse para considerar válidos y fiables los resultados obtenidos en este ensayo de genotoxicidad. Estas recomendaciones se fundamentan en las experiencias y opiniones formadas en varios laboratorios como consecuencia del uso recurrente de este ensayo. Las directrices se plantean y discuten en reuniones especializadas, conocidas como Conferencias Internacionales sobre Ensayos de Genotoxicidad (*International Workshop on Genotoxicity Tests* o IWGT) (Moore *et al.*, 2003), y son reguladas por organizaciones de carácter internacional entre las que destacan la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) y las directrices de la ICH.

Los criterios de aceptación para el control negativo del método multipocillo se indican en la Tabla 4. Estos parámetros se han aprobado en las distintas reuniones internacionales sobre el ensayo de linfoma de ratón.

**Tabla 4:** Criterios de aceptación para el control negativo en el sistema multipocillo del ensayo MLA, para tratamientos de 4 y 24 h (Clive *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 2006, 2007).

| Sistema multipocillo      |                               |                               |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Tratamiento 4 h           |                               | Tratamiento 24 h              |
| <b>Portland (1994)</b>    | <b>Aberdeen (2003)</b>        | <b>San Francisco (2005)</b>   |
| MF: $< 60 \times 10^{-6}$ | MF: $(50-170) \times 10^{-6}$ | MF: $(50-170) \times 10^{-6}$ |
| V: 70-130%                | V: 65-120%                    | V: 65-120%                    |
| SG: 8-32                  | SG: 8-32                      | SG: 32-180                    |

Estos valores se han ido modificando con el paso del tiempo (Sofuni *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2000, 2002, 2003, 2006, 2007) pero los criterios recomendados en la reunión de Portland (Clive *et al.*, 1995) aún se siguen tomando como referencia, aunque no exista unanimidad a este respecto.

En el control negativo, los valores de MF inferiores a  $50 \times 10^{-6}$  suelen indicar una pobre recuperación de colonias pequeñas. Valores superiores a  $170 \times 10^{-6}$ , podrían generar un incremento en la MF de los tratamientos, no como consecuencia de la genotoxicidad del compuesto, sino por la elevada tasa de mutación presente en el cultivo basal. Hay que destacar que los valores de viabilidad (V) o de eficiencia de crecimiento (PE) pueden ser superiores al 100%, reflejando la existencia de errores en el recuento o en la dilución del cultivo. A efectos prácticos, se consideran aceptables los valores que no superen el 130%. Por otro lado, los valores inferiores al 65% pueden afectar a la recuperación de las colonias mutantes en las placas con TFT, influyendo en el cálculo de la MF. El crecimiento en suspensión (SG) del control negativo hace referencia al crecimiento celular durante los 2 días de expresión fenotípica  $Tk^{-/}$ , seguidos al tratamiento. Como el tratamiento de 24 h incluye 3 días de crecimiento en lugar de los 2 días en tratamientos de 4 h, el valor SG para 24 h es superior (Tabla 4). Así, cuando se encuentran valores de SG superiores a los admitidos, es debido a errores en el recuento y en la dilución de los cultivos celulares (Clive *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 2006, 2007).

Según los criterios de aceptación del ensayo de linfoma de ratón establecidos por Clive y colaboradores (1995) y la ICH (1997), la máxima concentración de los compuestos de arsénico utilizada en el ensayo debe ser aquella que, como máximo, produzca un 80-90% de toxicidad (o un 10-20% de crecimiento total relativo o RTG) y



no exceda de 10 mM o 5.000 µg/mL (Clive *et al.*, 1995; ICH, 1997). Sin embargo, revisiones recientes de los resultados de este ensayo han hecho que estos criterios hayan sufrido modificaciones para evitar el exceso de falsos positivos o resultados positivos no relevantes biológicamente. Así, en la actualidad la ICH recomienda la concentración de 1 mM o 500 µg/mL, como concentración máxima a ensayar en el MLA, y una reducción máxima del 80% en el RTG (ICH, 2008). Cabe destacar, que en el presente trabajo el desarrollo de los ensayos MLA se realizaron siguiendo las directrices establecidas por la ICH en 1997.

Para el control positivo debe utilizarse una concentración del compuesto capaz de proporcionar un incremento significativo de la MF, con respecto a la frecuencia de mutación espontánea (SMF). Además, al menos un 40% de la MF debe corresponder a colonias pequeñas. Al igual que las concentraciones de los tratamientos, la concentración utilizada como control positivo no puede dar valores de RTG inferiores al 10-20%, ya que los datos obtenidos en condiciones de excesiva toxicidad (inferior a 10% RTG) se excluyen de la evaluación (Moore *et al.*, 2006).

Una respuesta positiva en el ensayo MLA, es aquella caracterizada por un incremento en la frecuencia de mutación inducida (IMF) en comparación con el control negativo (solvente) y que, además, la respuesta sea dependiente de la concentración. La IMF es la diferencia entre MF y SMF. Así, un compuesto se considerará mutagénico siempre y cuando dé resultados significativos ( $p < 0,05$ ) en el análisis estadístico (comparación múltiple, dos a dos, que permite comparar un conjunto de tratamientos respecto a un control) y en la regresión lineal, con tal de poder determinar una posible relación dosis-respuesta. Cuando no se obtiene significación en ninguno de los dos casos, se considerará *negativo*. Si sólo se alcanza la significación en una de ambas pruebas, el resultado se considerará *ambiguo* y deberá repetirse el experimento (Sofuni *et al.*, 1997).

El empleo de tratamientos de 24 h sin activación metabólica (sin S9) en el ensayo MLA se realizará únicamente cuando se hayan obtenido resultados negativos en tratamientos de 4 h sin activación (Moore *et al.*, 2002).

Se aconseja emplear varias concentraciones del compuesto a evaluar, que abarquen del 100 al 10% del RTG, para valorar las variaciones de respuesta en función de la

dosis. Sin embargo, si un compuesto ofrece una clara respuesta positiva, no es necesario alcanzar los valores de 20-10% del RTG. Se ha observado experimentalmente que, en algunas ocasiones, hay compuestos que no inducen mutagenicidad alcanzando valores del 20% del RTG, por lo que son considerados negativos. En cambio, si únicamente ofrecen respuesta positiva con <10% RTG, serán considerados no mutagénicos, ya que lo más probable es que el aumento de la MF sea consecuencia de la citotoxicidad inducida. Ha sido ampliamente reconocido que en los sistemas *in vitro*, una toxicidad elevada puede conducir a efectos secundarios y que las mutaciones generadas bajo estas circunstancias, normalmente no ocurren *in vivo*. Así, aunque estas respuestas puedan dar resultados estadísticamente significativos, no se consideran biológicamente relevantes (Sofuni *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2002, 2006)

Finalmente, en la Figura 10 se presentan de manera esquemática los pasos y metodologías utilizados en este trabajo de investigación. Como se puede observar, el **artículo 1** abarca la puesta a punto y el desarrollo del ensayo MLA y la evaluación del potencial genotóxico de seis compuestos de arsénico (Tabla 3). En el **artículo 2**, se caracterizan las colonias mutantes grandes (LC) y pequeñas (SC) espontáneas e inducidas por TOA, empleando técnicas moleculares. Mientras que en el **artículo 3** (ver Anexo) se caracterizan los mutantes inducidos por TOA a nivel citogenético, utilizando técnicas de citogenética molecular.

Artículo 1. MLA sistema multipocillo.

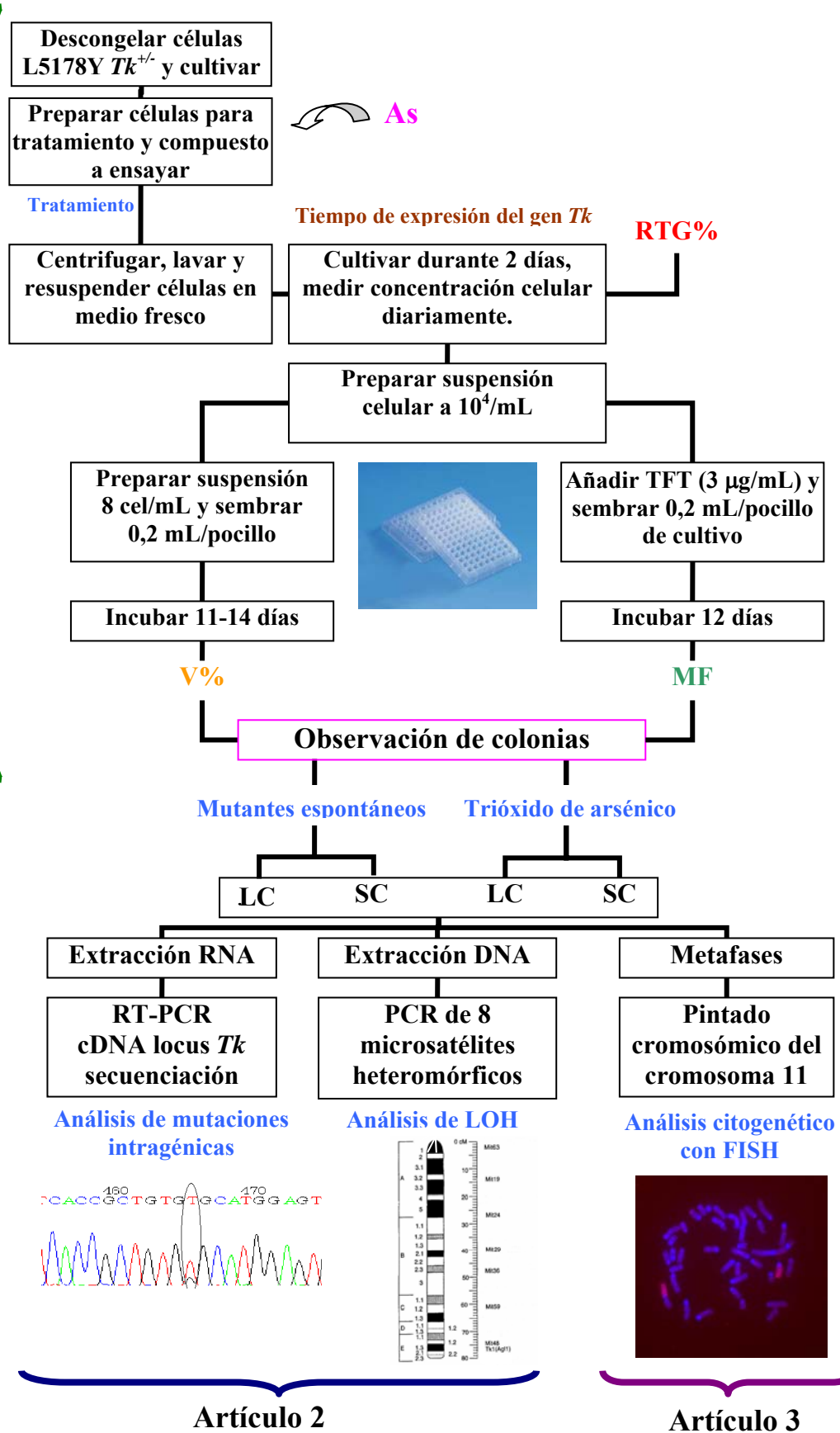


Figura 10: Esquema de las metodologías empleadas en este trabajo y en los artículos presentados.

## 4. ARTÍCULOS

Los resultados obtenidos en este trabajo han sido objeto de dos publicaciones, habiéndose enviado para su publicación la parte final del mismo. Los títulos de los tres artículos son:

- a) *Gene-mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay.*
  
- b) *Arsenic trioxide mutational spectrum analysis in the mouse lymphoma assay.*
  
- c) *Analysis of arsenic Tk mouse lymphoma mutants by chromosome 11 painting.*

A modo de presentación de cada artículo, se hace un breve resumen de su contenido. El contenido de los artículos a) y b) consta en el cuerpo de esta sección, mientras que el contenido del trabajo c) se presenta como anexo.



## Artículo 1:

### *Gene-mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay*

Los compuestos de arsénico han mostrado ser pobres inductores de mutaciones puntuales, tanto en sistemas bacterianos como en mamíferos. Con el propósito de evaluar el potencial mutagénico de los compuestos de arsénico se ha empleado como ensayo de mutación génica el ensayo de linfoma de ratón (MLA), donde se evalúa la inducción de mutaciones en el gen marcador de la timidina quinasa (*Tk*). Lo peculiar de este ensayo de mutagenicidad, a diferencia de otros, es que presenta la capacidad de detectar un amplio espectro de mutaciones, tanto génicas como cromosómicas.

Los compuestos de arsénico evaluados fueron dos inorgánicos [arsenito sódico (AS) y trióxido de arsénico (TOA)], y cuatro orgánicos (arsenobetaína, cloruro de tetrafenilarsonio, y dos metabolitos resultantes de la metabolización del arsénico inorgánico, MMA<sup>V</sup> y DMA<sup>V</sup>). Los resultados obtenidos tras tratamientos de 4 h, demuestran que el arsenito sódico a 10 y 20  $\mu$ M, el trióxido de arsénico a 7 y 10  $\mu$ M, el MMA<sup>V</sup> a 5 y 10 mM y el DMA<sup>V</sup> a 10 mM son mutagénicos, mostrando una clara relación dosis-respuesta. En cambio, en tratamientos de 4 h, el cloruro de tetrafenilarsonio y la arsenobetaína ofrecieron resultados negativos. Igualmente, la arsenobetaína ofreció resultados negativos tras 24 h de tratamiento. Así, podemos afirmar que los compuestos inorgánicos evaluados en este trabajo son inductores más potentes de mutaciones que los compuestos orgánicos utilizados, ya que los inorgánicos ofrecen respuestas positivas a concentraciones del orden de micromolar, mientras que los orgánicos lo hacen a nivel de milimolar.

A partir de estos resultados se ha podido establecer una escala del potencial mutagénico de estos compuestos tal como sigue: TOA > AS > MMA<sup>V</sup> > DMA<sup>V</sup>, generando todos ellos principalmente colonias pequeñas, lo que sugiere que el arsénico actuaría como un agente clastogénico. La alta sensibilidad del ensayo MLA y su capacidad de detección de mutaciones, tanto génicas como multilocus, ha permitido poner de manifiesto la actividad clastogénica del arsénico, no observable en otros ensayos de mutación génica. Sin embargo, para confirmar esta conclusión se hace necesario el análisis molecular de las colonias mutantes inducidas, pequeñas y grandes, para determinar la naturaleza de las mutaciones sufridas.



**Gene mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay**

**Carolina Soriano, Amadeu Creus, Ricard Marcos**

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Volume 634,  
1 December 2007, Pages 40-50





# Gene-mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay

Carolina Soriano<sup>a,b</sup>, Amadeu Creus<sup>a</sup>, Ricard Marcos<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici Cn,  
Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain

<sup>b</sup> CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII, Spain

Received 14 March 2007; received in revised form 2 May 2007; accepted 30 May 2007

Available online 3 August 2007

## Abstract

Arsenic compounds are generally considered as poor inducers of gene mutations. To investigate the mutagenicity of several arsenic compounds at the thymidine kinase (*Tk*) gene, a reporter gene for mutation induction, we used the mouse lymphoma assay (MLA). This test is widely applied and detects a broad spectrum of mutational events, from point mutations to chromosome alterations. The selected arsenic compounds were two inorganic (sodium arsenite and arsenic trioxide) and four organic compounds (monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid, tetraphenylarsenium and arsenobetaine). The results show that sodium arsenite, arsenic trioxide, monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid are mutagenic, showing a clear dose–response pattern. On the other hand, tetraphenylarsenium and arsenobetaine are not mutagenic. Inorganic arsenic compounds are the more potent agents producing significant effects in the micromolar range, while the mutagenic organic arsenic compounds induce similar effects but in the millimolar range.

© 2007 Published by Elsevier B.V.

**Keywords:** *Tk*; Mouse lymphoma assay; Mutant frequency; Gene-mutation; Arsenic compounds

## 1. Introduction

Arsenic is an important environmental toxicant that is widespread in water, soil and air, from both natural and man-made sources. It is naturally occurring in the drinking water in certain regions and therefore, large groups of people are exposed to concentrations much higher than those considered safe, which poses an important health concern. According to epidemiological evidence, arsenic has been classified by the

International Agency for Research on Cancer (IARC) [1,2] as a human carcinogen, and chronic exposure to this metalloid has been associated with different types of cancer in skin, lung, bladder and liver [3]. Nevertheless, in spite of the large amount of literature dealing with both the genotoxic and carcinogenic effects of arsenic, until now it remains unclear how arsenic causes cancer and what types of arsenic compound are most likely associated with carcinogenicity.

Arsenic can exist in different oxidative states and in several inorganic and organic forms, characterizing its toxic and genotoxic properties. Arsenate and arsenite are the most known inorganic forms and mammals are able to metabolize these chemicals to monomethylarsonic and dimethylarsinic acids. Additional sources of arsenic

\* Corresponding author at: Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain.  
Tel.: +34 93 5812052; fax: +34 93 5812387.

E-mail address: [ricard.marcos@uab.es](mailto:ricard.marcos@uab.es) (R. Marcos).

exposure are the organic forms contained in seafood, such as arsenobetaine and arsenosugars [4].

Due to the carcinogenic risk of arsenic, many studies have been carried out to determine its genotoxic potential, but no general agreement has been reached about its mode of action. In bacteria arsenic is not mutagenic, although the results obtained in cytogenetic studies mainly indicate that arsenic is a clear clastogenic agent, as reviewed by Basu et al. [5]. Thus, the ability of arsenic compounds to induce gene mutations is under discussion.

The mouse lymphoma assay (MLA) using the thymidine kinase (*Tk*) gene is the most widely used of the various *in vitro* mammalian cell gene-mutation assays [6]. This assay detects a wide spectrum of genetic damage, including both gene and chromosomal mutations. Due to the autosomal localization of the *Tk* gene, the MLA detects not only intragenic events, mainly point mutations, but also loss of heterozygosity (LOH). This LOH can result from entire *Tk* gene loss leading to karyotypically visible deletions and rearrangements of the *Tk*<sup>+</sup>-bearing chromosome [7]. These features make the MLA particularly useful for evaluating the ability of chemicals to induce a wide variety of mutational events [8,9].

To add more information on the mutagenic action of arsenic compounds, in the present work we show the results obtained in a study on mutation induction by six different arsenic compounds, comprising both inorganic and organic forms, by using the microwell MLA.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Sodium arsenite, arsenic trioxide, monomethylarsonic acid (MMA<sup>V</sup>), dimethylarsinic acid (DMA<sup>V</sup>), arsenobetaine and tetraphenylarsenium chloride were obtained from Sigma (Steinheim, Germany). The solutions were prepared just prior to each experiment, using an appropriate solvent, and diluted as appropriate for treatment of cells in suspension. Methyl methanesulfonate (MMS, Sigma) was used as a positive control.

RPMI 1640 medium, horse serum, L-glutamine, penicillin, streptomycin, sodium pyruvate and amphotericin B were purchased from PAA Laboratories (Pasching, Austria). Tri-fluorothymidine, thymidine, hypoxanthine, methotrexate and glycine were purchased from Sigma.

### 2.2. Cells

L5178Y/*Tk*<sup>+/−</sup>-3.7.2C mouse lymphoma cells were utilized for the mutation assay. They were kindly provided by Dr. Olivier Gillardeux (Sanofi-Synthelabo, Paris, France) and cul-

tured to prepare master stocks, which were maintained in liquid nitrogen at a density of  $2 \times 10^6$  cells/mL, in culture medium containing 5% dimethyl sulfoxide (DMSO). They were confirmed as free of mycoplasma by PCR.

Cells were cultured in suspension in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated horse serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 1 mM sodium pyruvate and 2.5 µg/mL amphotericin B. The serum concentration was lowered during the treatment to 5% and raised to 20% when cells were dispensed into microwells. The cultures were routinely diluted at  $2 \times 10^5$  cells/mL each day to prevent overgrowth ( $>10^6$  cells/mL). Cell density was determined with a haemocytometer.

### 2.3. Cell cleansing

To prepare working stocks for gene-mutation experiments, cultures were purged of excess *Tk*<sup>−/−</sup> mutants by culturing in THMG medium for 24 h. This medium contains thymidine (9 µg/mL), hypoxanthine (15 µg/mL), methotrexate (0.3 µg/mL) and glycine (22.5 µg/mL). After that, cells were transferred to THG medium (without methotrexate) for 2 days. The purged cultures were checked for low background *Tk*<sup>−/−</sup> mutants and stored in liquid nitrogen.

### 2.4. Gene-mutation assay

Preliminary experiments were conducted to determine solubility and cytotoxicity of the test chemicals. Cytotoxicity was determined by the relative total growth (RTG) following 4 h treatments at concentrations up to 10 mM (arsenobetaine was also treated for 24 h, without metabolic activation) [10]. The RTG measurement takes into account cell loss after treatment, reduction in growth rate over the expression period, and any reduction in cloning efficiency on the day of selection for mutants [11]. The recommended highest concentration was one with an RTG of 10–20%. There was no perceived need to test concentrations  $>10$  mM.

Each main experiment consisted of one negative control, one positive control and at least four concentrations of each test compound. A total of  $10^7$  cells per culture were grown in R10 media (10% horse serum) and placed in a series of sterile centrifuge tubes. Solvent, test chemical or positive control was added. Cells were incubated with gentle shaking in an incubator at 37 °C for 4 or 24 h. After exposure, cultures were washed and diluted to  $2 \times 10^5$  cells/mL. Cells were transferred to culture flasks, counted daily and sub-cultured to  $2 \times 10^5$  cells/mL for a period of 2 days to allow expression of induced mutations (*Tk*-deficient phenotype). Then the cells were seeded in duplicate plates per culture to calculate viability and mutation frequency (MF) on day 2.

Cell-count data were used, in conjunction with viability data on day 2 to generate the RTG values corrected for post-treatment toxicity, which provides an indication of post-treatment toxicity in comparison with the vehicle controls. The RTG values were used to decide on the acceptability of the toxicity at each dose level.

### 2.5. Plating for viability

Cultures were adjusted to  $10^4$  cells/mL. A portion of each culture was removed and diluted to 10 cells/mL. Each culture was then dispensed at 0.2 mL/well on 96-well plates (two plates for the solvent control and two plates each for the test chemical treatment and the positive control). The plates were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 11–13 days.

### 2.6. Plating for 5-trifluorothymidine (TFT) resistance

TFT was added to cultures ( $10^4$  cells/mL) at a final concentration of 4 µg/mL. Each TFT-treated culture was dispensed at 0.2 mL/well on 96-well plates (two plates for solvent control and two plates each for treatment with the test chemical and the positive control). The microwell plates were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 12 days and scored for the number of microwells that contained colonies.

Colonies were scored by eye using qualitative judgement. To assist the scoring of TFT mutation plates, thiazolyl blue tetrazolium bromide solution from Sigma (MTT, 2.5 mg/mL) was added to each well and the plates were incubated for 4 h, during which cell colonies are stained black. Colony size was estimated in a manner similar to that described by Honma et al. [12]: a small colony was defined as a colony having a size ≤one-fourth of the well diameter.

### 2.7. Statistical analysis

The IWTG mouse lymphoma workgroup [6] states that biological relevance should be a major factor in data evaluation. Therefore, it recommends a biologically relevant approach to evaluate MLA data, which requires that the induced mutant frequency (IMF) exceed some value based on the global background mutant frequency (MF). This value is the global evaluation factor (GEF), which is considered to be 126 for the microwell version. The IMF is obtained by  $MF - SMF = IMF$ , where MF is one of the test culture mutant frequencies and SMF is the spontaneous mutant frequency.

The response of a test agent in an experiment is positive when the IMF for any treatment meets or exceeds the GEF, and when also a positive trend test is obtained. For example, if the negative/vehicle control MF in a microwell experiment is  $70 \times 10^{-6}$ , then one of the test cultures must have an MF of at least  $70 + 126$  (GEF) =  $196 \times 10^{-6}$  in order to trigger the application of statistics.

The statistical approach used was the one-way ANOVA followed by Dunnett's test, which was used to evaluate the significance of the difference in MF between the control and treated cultures. The dose–response was also evaluated by testing for a linear trend [6,13]. The level of statistical significance was set at 5%.

## 3. Results

Tables 1–4 show the results obtained after treatment of mouse lymphoma cells with the six selected

arsenic compounds. Each compound was tested in two independent experiments and a good concordance was observed between the two. Positive controls with methyl methanesulfonate (10 µg/mL) were run in parallel and showed clear and significantly increased mutant frequencies.

Sodium arsenite (Table 1) was tested in concentrations up to 20 µM and this top concentration induced a pronounced drop in RTG to 24.5%. Although higher concentrations were assayed to assess toxicity, results are not presented when percentage of RTG is lower than 10%, which is the lowest acceptable value. The limit of 10% RTG is widely accepted as the maximum level of cytotoxicity for mutagenicity testing, to avoid biologically irrelevant effects that might occur in severely stressed cells [8]. The induced mutation frequencies reached statistical significance at the two higher concentrations tested (10 and 20 µM), according to the Dunnett's test. The numbers of both small and large colonies increased in all the acceptable cultures, but with a higher proportion of small colonies at higher concentrations.

Arsenic trioxide (Table 1) was slightly more toxic than sodium arsenite and, as a consequence, the highest test dose was 10 µM. The two experiments produced a similar dose–response pattern, with significantly increased values for mutation frequency at the highest dose evaluated (10 µM) and also at 7 µM in experiment 1. When the ratio between small and large colonies is taken into account, higher proportions of small colonies appeared at increased concentrations of arsenic trioxide. The mutagenic potency of arsenic trioxide is higher than that observed after treatment with sodium arsenite. Thus, the induced mutation frequency (IMF) observed after treatment with 10 µM arsenic trioxide ( $494 \times 10^{-6}$ ) is significantly higher than the IMF induced by 20 µM sodium arsenite ( $257 \times 10^{-6}$ ).

The arsenic metabolite MMA<sup>V</sup> showed acceptable toxicity levels at concentrations up to 10 mM (Table 2). For this reason, this was also the highest concentration tested for mutagenicity. The low toxicity of this organic compound in comparison with the two inorganic arsenic compounds previously tested is noteworthy. Thus, organic arsenic compounds were tested at millimolar levels while the inorganic compounds were assayed in micromolar concentrations. A dose–response was observed in both experiments carried out with MMA<sup>V</sup>, showing mutation frequencies at 10 mM similar to those obtained with the positive control. Thus, MMA<sup>V</sup> is the arsenic compound giving the highest induced mutation frequency (IMF =  $647 \times 10^{-6}$ ), although the high concentration required to obtain this response must be taken into account. As in the other cases, the frequency of

Table 1  
Toxicity and mutagenicity of sodium arsenite and arsenic trioxide in mouse lymphoma cells

| Concentration ( $\mu\text{M}$ )   | Percent plating efficiency | Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ ) | Relative total growth | MF (S/L) <sup>a</sup> | IMF (MF – SMF) |
|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|
| Sodium arsenite (1)               |                            |                                       |                       |                       |                |
| 0                                 | 89                         | 164                                   | 100                   | 73/91                 | –              |
| 0.5                               | 86                         | 248                                   | 81                    | 103/145               | 84             |
| 1.0                               | 74                         | 195                                   | 97                    | 85/110                | 31             |
| 10.0                              | 82                         | 344                                   | 37                    | 224/120               | 180            |
| 20.0                              | 69                         | 411*                                  | 12                    | 255/156               | 247            |
| MMS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 62                         | 562**                                 | 45                    | 359/203               | 398            |
| Sodium arsenite (2)               |                            |                                       |                       |                       |                |
| 0                                 | 96                         | 88                                    | 100                   | 25/63                 | –              |
| 0.5                               | 111                        | 82                                    | 119                   | 31/51                 | –6             |
| 1.0                               | 93                         | 88                                    | 97                    | 21/67                 | 0              |
| 10.0                              | 100                        | 235*                                  | 49                    | 131/104               | 147            |
| 20.0                              | 80                         | 355***                                | 37                    | 209/146               | 267            |
| MMS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 82                         | 571***                                | 61                    | 269/302               | 483            |
| Arsenic trioxide (1)              |                            |                                       |                       |                       |                |
| 0                                 | 127                        | 64                                    | 100                   | 51/13                 | –              |
| 0.1                               | 102                        | 96                                    | 92                    | 60/36                 | 32             |
| 1.0                               | 116                        | 104                                   | 98                    | 66/38                 | 40             |
| 5.0                               | 106                        | 123                                   | 52                    | 106/17                | 59             |
| 7.0                               | 94                         | 236**                                 | 33                    | 185/51                | 172            |
| 10.0                              | 100                        | 385***                                | 25                    | 333/52                | 321            |
| MMS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 96                         | 461***                                | 71                    | 346/115               | 397            |
| Arsenic trioxide (2)              |                            |                                       |                       |                       |                |
| 0                                 | 80                         | 171                                   | 100                   | 107/64                | –              |
| 0.1                               | 102                        | 222                                   | 103                   | 144/78                | 51             |
| 1.0                               | 118                        | 255                                   | 99                    | 190/65                | 84             |
| 5.0                               | 96                         | 266                                   | 64                    | 197/69                | 95             |
| 7.0                               | 102                        | 382                                   | 43                    | 328/54                | 211            |
| 10.0                              | 86                         | 838*                                  | 26                    | 736/102               | 667            |
| MMS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 76                         | 1200**                                | 71                    | 947/253               | 1029           |

\* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$  (significantly different from negative control).

<sup>a</sup> Total mutant frequency divided into small/large (S/L) colony mutant frequencies.

small colonies increased with increasing concentration, in comparison with the number of larger colonies.

DMA<sup>V</sup> also showed a clearly positive dose–response pattern, inducing significant increases at the concentration of 10 mM (Table 2). Nevertheless, DMA<sup>V</sup> was less mutagenic than MMA<sup>V</sup> showing an induced mutant frequency of  $259 \times 10^{-6}$  at the highest dose tested. As the other compounds, DMA<sup>V</sup> also induced higher proportions of small colonies than large ones.

Arsenobetaine was not mutagenic at concentrations up to 10 mM (Table 3). Due to the lack of activity observed in both experiments, and as recommended by several authors, this compound was also tested after a prolonged treatment period (24 h) but the results were also negative. Similar results were obtained

when tetraphenylarsenium was tested, although only short treatments were carried out with this compound (Table 4).

To better visualize the overall results obtained in the mutagenicity testing of the six arsenic compounds investigated in this study, Fig. 1 shows graphically the results with the positive compounds, while Fig. 2 shows the results obtained with the two compounds showing a lack of mutagenicity. For all four positive compounds, linear regression analysis showed a clearly positive trend.

#### 4. Discussion

Although it is generally accepted that arsenic is a genotoxic carcinogen in humans, it remains unclear what

Table 2  
Toxicity and mutagenicity of monomethylarsonic (MMA<sup>V</sup>) and dimethylarsinic (DMA<sup>V</sup>) in mouse lymphoma cells

| Concentration (mM)   | Percent plating efficiency | Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ ) | Relative total growth | MF (S/L) <sup>a</sup> | IMF (MF – SMF) |
|----------------------|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|
| MMA <sup>V</sup> (1) |                            |                                       |                       |                       |                |
| 0                    | 88                         | 104                                   | 100                   | 56/48                 | –              |
| 0.05                 | 98                         | 136                                   | 85                    | 89/47                 | 32             |
| 0.10                 | 113                        | 121                                   | 63                    | 69/52                 | 17             |
| 1.0                  | 104                        | 64                                    | 56                    | 35/29                 | –40            |
| 5.0                  | 61                         | 315                                   | 32                    | 227/88                | 211            |
| 10.0                 | 94                         | 745***                                | 12                    | 589/156               | 641            |
| MMS (10 $\mu$ g/mL)  | 91                         | 847***                                | 65                    | 639/208               | 743            |
| MMA <sup>V</sup> (2) |                            |                                       |                       |                       |                |
| 0                    | 77                         | 98                                    | 100                   | 73/25                 | –              |
| 0.05                 | 127                        | 165                                   | 124                   | 108/57                | 67             |
| 0.10                 | 108                        | 187                                   | 116                   | 146/41                | 89             |
| 1.0                  | 110                        | 169                                   | 122                   | 131/38                | 71             |
| 5.0                  | 75                         | 325*                                  | 49                    | 270/55                | 227            |
| 10.0                 | 78                         | 752***                                | 10                    | 662/90                | 654            |
| MMS (10 $\mu$ g/mL)  | 93                         | 645***                                | 72                    | 484/161               | 547            |
| DMA <sup>V</sup> (1) |                            |                                       |                       |                       |                |
| 0                    | 85                         | 126                                   | 100                   | 82/44                 | –              |
| 0.1                  | 90                         | 111                                   | 112                   | 90/21                 | –15            |
| 1.0                  | 85                         | 122                                   | 100                   | 105/17                | –4             |
| 5.0                  | 104                        | 199                                   | 88                    | 161/38                | 73             |
| 10.0                 | 143                        | 437*                                  | 43                    | 382/55                | 311            |
| MMS (10 $\mu$ g/mL)  | 71                         | 791**                                 | 57                    | 668/123               | 665            |
| DMA <sup>V</sup> (2) |                            |                                       |                       |                       |                |
| 0                    | 93                         | 115                                   | 100                   | 94/21                 | –              |
| 0.1                  | 77                         | 143                                   | 104                   | 117/26                | 28             |
| 1.0                  | 127                        | 76                                    | 116                   | 60/16                 | –39            |
| 5.0                  | 108                        | 120                                   | 82                    | 83/37                 | 5              |
| 10.0                 | 115                        | 323**                                 | 51                    | 272/51                | 208            |
| MMS (10 $\mu$ g/mL)  | 76                         | 576***                                | 62                    | 486/90                | 461            |

\* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$  (significantly different from negative control).

<sup>a</sup> Total mutant frequency divided into small/large (S/L) colony mutant frequencies.

kind of mutations are induced, and what type of arsenic compounds are most likely associated with such activity. Our results indicate that both inorganic and organic forms of arsenic are able to induce mutations, as assayed in the mouse lymphoma test.

Our results for sodium arsenite, MMA<sup>V</sup> and DMA<sup>V</sup> agree with other MLA results previously published by Moore et al. [14] with the agar version of the MLA. These authors also showed a positive response for inorganic and organic forms of arsenic, the organic compounds requiring doses more than 3 orders of magnitude higher. Interestingly, these authors also reported that the trivalent methylated forms were more mutagenic than pentavalent forms, giving similar results in both the agar and microwell versions.

Epidemiological studies have demonstrated that inorganic arsenic compounds are carcinogenic to humans. Nevertheless, their carcinogenicity in animals has not been satisfactorily proven, since arsenic does not easily induce cancer in animal models [15]. On the other hand, although they are clearly clastogenic agents, they are usually not mutagenic in bacteria and do not induce gene-mutation in mammalian cells [5]. In addition, they do not induce mitotic recombination as assayed in the wing spot test in *Drosophila melanogaster* [16].

In our study, sodium arsenite was clearly active in the MLA, which confirms the results previously obtained in the same assay system, but using the agar version instead of the microwell version [14]. Nevertheless, these results do not agree with other studies measuring gene-

Table 3  
Toxicity and mutagenicity of arsenobetaine in mouse lymphoma cells

| Concentration ( $\mu\text{M}$ )   | Percent plating efficiency | Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ ) MF | Relative total growth | MF (S/L) <sup>a</sup> | IMF (MF – SMF) |
|-----------------------------------|----------------------------|--|-----------------------|-----------------------|----------------|
| Arsenobetaine (1)                 |                            |  |                       |                       |                |
| 0                                 | 102                        | 144                                      | 100                   | 85/59                 | –              |
| 5                                 | 94                         | 206                                      | 90                    | 103/103               | 62             |
| 40                                | 116                        | 155                                      | 110                   | 93/62                 | 11             |
| 200                               | 106                        | 113                                      | 100                   | 55/58                 | –31            |
| 1,000                             | 113                        | 106                                      | 108                   | 59/47                 | –38            |
| 5,000                             | 113                        | 152                                      | 104                   | 68/84                 | 8              |
| 10,000                            | 94                         | 190                                      | 87                    | 95/95                 | 46             |
| MMS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 86                         | 1178***                                  | 65                    | 896/282               | 1034           |
| Arsenobetaine (2)                 |                            |  |                       |                       |                |
| 0                                 | 121                        | 142                                      | 100                   | 53/89                 | –              |
| 5                                 | 139                        | 114                                      | 116                   | 53/61                 | –28            |
| 40                                | 98                         | 133                                      | 89                    | 66/67                 | –9             |
| 200                               | 102                        | 159                                      | 99                    | 57/102                | 17             |
| 1,000                             | 116                        | 124                                      | 96                    | 57/67                 | –18            |
| 5,000                             | 104                        | 138                                      | 97                    | 49/89                 | –4             |
| 10,000                            | 100                        | 137                                      | 87                    | 71/66                 | –5             |
| MMS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 78                         | 1050***                                  | 55                    | 569/481               | 908            |
| Arsenobetaine 24 h (1)            |                            |  |                       |                       |                |
| 0                                 | 111                        | 149                                      | 100                   | 84/65                 | –              |
| 5                                 | 124                        | 169                                      | 80                    | 72/97                 | 20             |
| 40                                | 94                         | 214                                      | 62                    | 114/100               | 65             |
| 200                               | 118                        | 149                                      | 74                    | 82/67                 | 0              |
| 1000                              | 100                        | 211                                      | 61                    | 141/70                | 62             |
| 5000                              | 102                        | 195                                      | 61                    | 124/71                | 46             |
| 10000                             | 111                        | 143                                      | 88                    | 74/69                 | –6             |
| MMS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 35                         | 3126***                                  | 10                    | 2465/661              | 2977           |
| Arsenobetaine 24 h (2)            |                            |  |                       |                       |                |
| 0                                 | 93                         | 126                                      | 100                   | 59/67                 | –              |
| 5                                 | 94                         | 163                                      | 100                   | 87/76                 | 37             |
| 40                                | 106                        | 119                                      | 104                   | 55/64                 | –7             |
| 200                               | 102                        | 207                                      | 101                   | 113/94                | 81             |
| 1000                              | 100                        | 223                                      | 91                    | 107/116               | 97             |
| 5000                              | 94                         | 190                                      | 81                    | 102/88                | 64             |
| 10000                             | 118                        | 143                                      | 125                   | 83/60                 | 17             |
| MMS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 36                         | 2309***                                  | 17                    | 1811/498              | 2183           |

\*\*\* $P \leq 0.001$  (significantly different from negative control).

<sup>a</sup> Total mutant frequency divided into small/large (S/L) colony mutant frequencies.

mutation. Thus, negative results were obtained in the transgenic model Muta<sup>TM</sup>Mouse, where mutations in the *lacZ* transgene and the endogenous *cII* genes were assayed [17]. Also no gene-mutation was induced in Chinese hamster cells, where sodium arsenite did not induce ouabain-resistant mutants [18]. In this context, it must be remembered that the MLA assay detects a wide spectrum of genetic damage, including both gene and chromosomal mutations, in contrast with the other gene-mutation assay mentioned above.

As sodium arsenite, arsenic trioxide has also shown to be clastogenic, inducing chromosome aberrations and micronuclei in bone-marrow cells of treated rats [19]. In addition, it was also able to induce DNA breakage as measured in the comet assay using human lymphocytes [20] and mouse leukocytes [21]. Although there are no previous studies reporting on gene-mutation induction by arsenic trioxide, our positive findings with the MLA are not surprising in view of the genotoxicity observed with arsenic trioxide in other assays. Arsenic trioxide



Table 4  
Toxicity and mutagenicity of tetraphenylarsenium chloride in mouse lymphoma cells

| Concentration ( $\mu\text{M}$ )   | Percent plating efficiency | Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ ) | Relative total growth | MF (S/L) <sup>a</sup> | IMF (MF – SMF) |
|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|
| Tetraphenylarsenium (1)           |                            |                                       |                       |                       |                |
| 0                                 | 91                         | 177                                   | 100                   | 113/64                | –              |
| 1                                 | 100                        | 203                                   | 106                   | 108/95                | 26             |
| 3                                 | 82                         | 232                                   | 71                    | 118/114               | 55             |
| 6                                 | 96                         | 187                                   | 49                    | 87/100                | 10             |
| 8                                 | 88                         | 244                                   | 36                    | 116/128               | 67             |
| 10                                | 115                        | 101                                   | 33                    | 40/61                 | –76            |
| MMS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 94                         | 1079***                               | 79                    | 575/504               | 902            |
| Tetraphenylarsenium (2)           |                            |                                       |                       |                       |                |
| 0                                 | 98                         | 150                                   | 100                   | 97/53                 | –              |
| 1                                 | 135                        | 148                                   | 126                   | 77/71                 | –2             |
| 3                                 | 106                        | 195                                   | 83                    | 84/111                | 45             |
| 6                                 | 96                         | 172                                   | 42                    | 115/57                | 22             |
| 8                                 | 89                         | 149                                   | 31                    | 61/88                 | –1             |
| 10                                | 113                        | 137                                   | 25                    | 37/100                | –13            |
| 25                                | 89                         | 95                                    | 10                    | 37/58                 | –55            |
| MMS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 84                         | 1150***                               | 68                    | 800/350               | 1000           |

\*\*\* $P \leq 0.001$  (significantly different from negative control).

<sup>a</sup> Total mutant frequency divided into small/large (S/L) colony mutant frequencies.

has shown to be effective in inducing complete remission in patients with acute promyelocytic leukemia [22,23]; thus, as is the case with many other cancer chemotherapeutics that are very potent clastogens, the positive MLA results observed with arsenic trioxide are not surprising. When the results obtained with arsenic trioxide are compared with those seen with sodium arsenite, a slight higher mutation frequency was noted for arsenic trioxide. In addition, the frequency of small colonies is also larger after treatment with arsenic trioxide, which suggest a stronger clastogenic activity. Nevertheless, although there is a general correlation between colony size and gene *versus* chromosomal mutation, it must be pointed out that large colonies with chromosomal mutations and small colonies with gene mutations have also been found.

In our study, both MMA<sup>V</sup> and DMA<sup>V</sup> were able to induce a significant increase in mutation frequency, MMA<sup>V</sup> being slightly more mutagenic than DMA<sup>V</sup>. The pentavalent methylated forms were less toxic than the inorganic forms and, as a consequence, higher doses could be applied. Thus, while inorganic compounds were assayed at micromolar concentrations, the organic (methylated) forms of arsenic were tested at the millimolar level. As a consequence, although the mutation frequencies obtained with inorganic and organic forms of arsenic are not so much different, the amounts required of the methylated forms are about one thousand times

higher. In addition, as reviewed in [5,24], tests with methylated arsenic forms also require much greater doses than assays with inorganic arsenicals to induce cytogenetic damage in mammalian cells.

As has been commented before, our data with pentavalent forms of MMA<sup>V</sup> and DMA<sup>V</sup> agree with the results obtained by Moore et al. [14] with the agar version of the MLA. In addition, although reports of cancer induction in animals by inorganic arsenic are rare, DMA<sup>V</sup> has been proven to be tumorigenic in the most common strains of mice and rats [15]. In *Drosophila*, although inorganic arsenic was non-genotoxic in the wing spot assay [16], positive results have been recently published with DMA, which is explained by the fact that *Drosophila* is unable to metabolize inorganic arsenic into toxic methylated derivatives and may not be the ideal *in vivo* model for evaluating the genotoxicity of inorganic arsenic [25].

Arsenobetaine is mainly present in seafood and ingested upon consumption of crab, lobster, shrimp and fish. Because it is rapidly excreted unchanged into urine [26] it has been considered as not harmful. Nevertheless, arsenobetaine has shown to increase DMA in urine [27] and there are some doubts about its safety. Only two reports have been found on the genotoxicity of arsenobetaine. In bacteria, no genotoxicity was detected in the *Salmonella* test with and without metabolic activation with S9 mix, and similar results were obtained



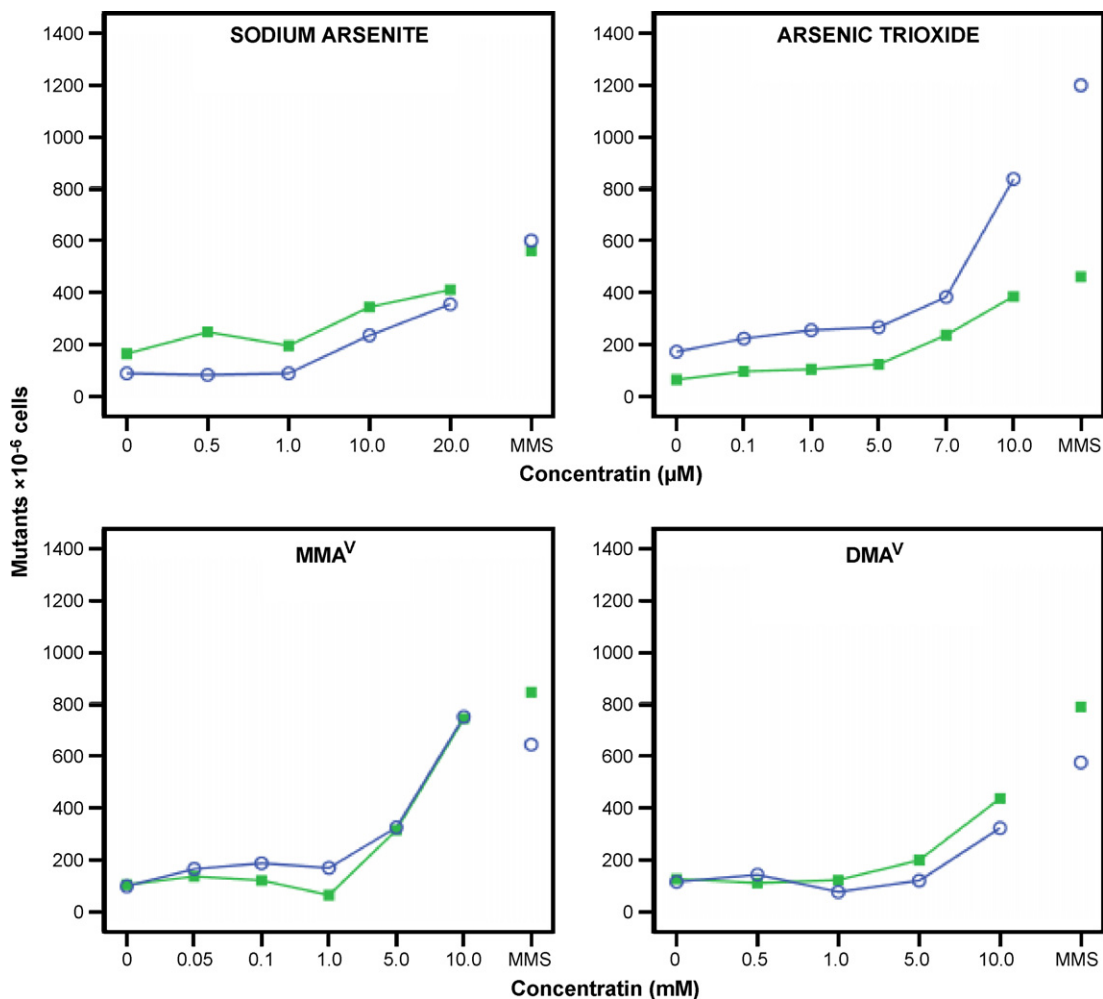


Fig. 1. Mutagenicity of sodium arsenite, arsenic trioxide, monomethylarsenic acid and dimethylarsinic acid compounds on L5178Y/*Tk*<sup>+/-</sup> mouse lymphoma cells. Results are taken from two different experiments.

in the forward mutation test for the *Hgp* gene in V79 Chinese hamster cells [28]. This lack of effect would agree with our results. Nevertheless, in a study on the cytogenetic potential of arsenobetaine in cultured mammalian cells, a slight increase was observed in the frequency of chromosomal aberrations including chromatid gaps, which according to many should not be included with chromosomal aberrations. The study also shows that arsenobetaine did not induce sister-chromatid exchange [29]. All these results, including our own data, seem to support the view that arsenobetaine is not genotoxic.

Tetraphenylarsenium is an organoarsenic compound considered as a possible carcinogen [30]. No data on the genotoxicity of this compound have been reported with the exception of one study carried out by our group showing that this agent induced a positive response in

the comet assay using a human lymphoblastoid cell line [31].

The initial assumption that arsenic does not induce gene mutations in mammalian cells was based on the results obtained in the ouabain resistance assay [18] and in the *Hprt* mutation assay measuring 6-thioguanine resistance [32]. In addition, also the results obtained in the transgenic Muta<sup>TM</sup> Mouse [17] and the study on *HPRT* mutation in workers occupationally exposed to arsenic were negative [33]. These negative findings contrast with the positive results obtained in our study with the MLA, which measures resistance to trifluorothymidine and mutations at the *Tk* locus. The ouabain-resistant assay detects only base substitutions and the *Hprt* gene detects primarily gene mutations [34]. This contrasts with the ability of the MLA to measure both gene and chromosome mutations, according to the colony size,

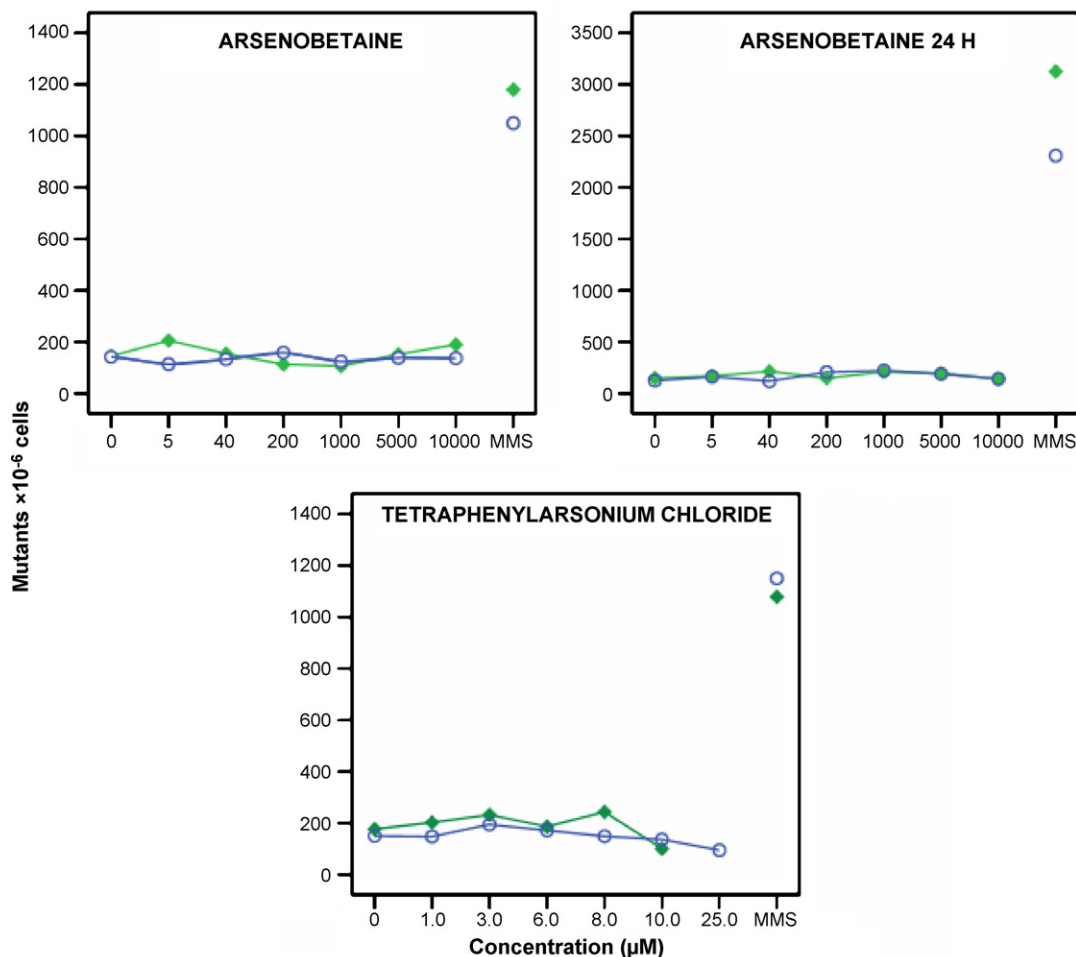


Fig. 2. Mutagenicity of arsenobetaine (4 and 24 h treatments) and tetraphenylarsonium chloride compounds on L5178Y/Tk<sup>+/-</sup> mouse lymphoma cells. Results are taken from two different experiments.

where small colonies are mainly the result of chromosome mutation [35]. Thus, the high sensitivity of the MLA would be related to its ability to detect the clastogenic potential of arsenic more than to detect gene mutations. Further support for this conclusion must come from molecular analysis of the nature of the mutations detected in the MLA assay, both in small and larger colonies.

This study demonstrates that the methylated pentavalent forms of arsenic are substantially less mutagenic than the inorganic forms. In addition, it has been shown that the organoarsenic compounds arsenobetaine and tetraphenylarsonium, are non-mutagenic. Genotoxicity and mutagenicity of arsenic has been explained by various mechanisms including inhibition of different repair enzymes, production of reactive oxygen species, and induction of gene expression of stress-response proteins [36].

In mammals, arsenic metabolism has been extensively studied, showing that inorganic arsenic compounds are methylated to monomethylarsonic acid (MMA<sup>V</sup>) and dimethylarsinic acid (DMA<sup>V</sup>). Although this was considered as a detoxification process, recent studies suggest that trivalent methylated arsenic species may be more toxic and genotoxic than inorganic forms [37]. To explain the higher genotoxicity of the trivalent methylated arsenicals, Mass et al. [38] have shown that trivalent methylated arsenicals are directly genotoxic because they cleave supercoiled  $\phi$ X174 DNA, in contrast to the lack of effects of arsenite, arsenate and the pentavalent forms of MMA and DMA.

In conclusion, our results show that inorganic arsenicals are more mutagenic than the MMA and DMA pentavalent methylated forms, the organic forms arsenobetaine and tetraphenylarsonium being non-mutagenic. Nevertheless, in our study the methylated pentavalent

forms are less toxic than the inorganic forms. Although these results would support the view that metabolism is a detoxification process, the results showing a high cytotoxic and genotoxic potential of the trivalent methylated forms raise doubts on the role of arsenic metabolism as a detoxification pathway. Apart from the concrete results reported here with the six arsenic test compounds, our data reinforce the view that the dual ability of mouse lymphoma assay to detect mutagenic agents at the gene and chromosome level gives special relevance to this assay in genotoxicity testing.

## Acknowledgements

C. Soriano is supported by a postgraduate fellowship from the Generalitat de Catalunya. We wish to thank Dr. Peter Jenkinson (SafePharm Laboratories, Derby, UK) for his warm reception to C.S. during her stay in his laboratory to learn some technical aspects of the MLA. This investigation has been supported in part by the Spanish Ministry of Education and Science (CAICYT, VEM2004-08597) and the Generalitat de Catalunya (CIRIT, 2005SGR-00136).

## References

- [1] IARC, Arsenic and Arsenic Compounds Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans, Suppl. 7, IARC, Scientific Publications, Lyon, 1987.
- [2] IARC, Some Drinking-water Disinfectants and Contaminants Including Arsenic Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans, vol. 84, IARC, Scientific Publications, Lyon, 2004.
- [3] C.O. Abernathy, Y.P. Liu, D. Longfellow, H.V. Aposhian, B. Beck, B. Fowler, R. Goyer, R. Menzer, T. Rossman, C. Thompson, M. Waalkes, Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues, *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 593–597.
- [4] W.R. Cullen, K.J. Reimer, Arsenic speciation in the environment, *Chem. Rev.* 89 (1989) 713–764.
- [5] A. Basu, J. Mahata, S. Gupta, A.K. Giri, Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review, *Mutat. Res.* 488 (2001) 171–194.
- [6] M.M. Moore, M. Honma, J. Clements, G. Bolcsfoldi, M. Cifone, R. Delongchamp, M. Fellows, B. Gollapudi, P. Jenkinson, P. Kirby, S. Kirchner, W. Muster, B. Myhr, M. O'Donovan, J. Oliver, T. Omori, M.C. Oudelhkim, K. Pant, R. Preston, C. Riach, R. San, L.F. Stankowski Jr., A. Thakur, S. Wakuri, I. Yoshimura, Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay, in: International Workshop on Genotoxicity Tests Workgroup Report, Plymouth, UK, 2002, *Mutat. Res.* 540 (2003) 127–140.
- [7] T. Chen, K. Harrington-Brock, M.M. Moore, Mutant frequencies and loss of heterozygosity induced by *N*-ethyl-*N*-nitrosourea in the thymidine kinase gene of L5178Y/*TK*<sup>+/-</sup>-3. 7. 2C mouse lymphoma cells, *Mutagenesis* 17 (2002) 105–109.
- [8] D. Clive, G. Bolcsfoldi, J. Clements, J. Cole, M. Honma, J. Majeska, M.M. Moore, L. Muller, B. Myhr, T. Oberly, M. Oudelhkim, C. Rudd, H. Shimada, T. Sofuni, V. Thybaud, P. Wilcox, in: Consensus agreement regarding protocol issues discussed during the mouse lymphoma workshop, Portland, OR, May 7, 1994, *Environ. Mol. Mutagen.* 25 (1995) 165–168.
- [9] K. Harrington-Brock, D.D. Collard, T. Chen, Bromate induces loss of heterozygosity in the *Thymidine kinase* gene of L5178Y/*TK*<sup>+/-</sup>-3.7. 3C mouse lymphoma cells, *Mutat. Res.* 517 (2003) 21–28.
- [10] M.M. Moore, M. Honma, J. Clements, G. Bolcsfoldi, B. Burlinson, M. Cifone, J. Clarke, P. Clay, R. Doppalapudi, M. Fellows, B. Gollapudi, S. Hou, P. Jenkinson, W. Muster, K. Pant, D.A. Kidd, E. Lorge, M. Lloyd, B. Myhr, M. O'Donovan, C. Riach, L.F. Stankowski Jr., A.K. Thakur, F. Van Goethem, Mouse Lymphoma Assay Group, IWGT, Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay, in: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h treatment, *Mutat. Res.* 627 (2007) 36–40.
- [11] D. Clive, J.F. Spector, Laboratory procedure for assessing specific locus mutation at the TK locus in cultured L5178Y mouse lymphoma cells, *Mutat. Res.* 31 (1975) 17–29.
- [12] M. Honma, M. Hayashi, H. Shimada, N. Tanaka, S. Wakuri, T. Awogi, K.I. Yamamoto, N. Kodani, Y. Nishi, M. Nakadate, T. Sofuni, Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration test, *Mutagenesis* 14 (1999) 5–22.
- [13] R. Michael McClain, E. Wolz, A. Davidovich, J. Bausch, Genetic toxicity studies with genistein, *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 42–55.
- [14] M.M. Moore, K. Harrington-Brock, C.L. Doerr, Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites, *Mutat. Res.* 386 (1997) 279–290.
- [15] J.P. Wang, L. Qi, M.R. Moore, J.C. Ng, A review of animal models for the study of arsenic carcinogenesis, *Toxicol. Lett.* 133 (2002) 17–31.
- [16] M. Rizki, E. Kossatz, N. Xamena, A. Creus, R. Marcos, Influence of sodium arsenite on the genotoxicity of potassium dichromate and ethyl methanesulfonate: studies with the wing spot test in *Drosophila*, *Environ. Mol. Mutagen.* 39 (2002) 49–54.
- [17] Y. Noda, T. Suzuki, A. Kohara, A. Hasegawa, T. Yotsuyanagi, M. Hayashi, T. Sofuni, K. Yamanaka, S. Okada, In vivo genotoxicity evaluation of dimethylarsinic acid in Muta<sup>TM</sup> Mouse, *Mutat. Res.* 513 (2002) 205–212.
- [18] T.G. Rossman, D. Stone, M. Molina, W. Troll, Absence of arsenite mutagenicity in *E. coli* and Chinese hamster cells, *Environ. Mutagen.* 2 (1980) 371–379.
- [19] A.K. Patlolla, P.B. Tchounwou, Cytogenetic evaluation of arsenic trioxide toxicity in Spague–Dawley rats, *Mutat. Res.* 587 (2005) 126–133.
- [20] N. Schaumloffel, T. Gebel, Heterogeneity of the DNA damage provoked by antimony and arsenic, *Mutagenesis* 13 (1998) 281–286.
- [21] B. Saleha Banu, K. Danadevi, K. Jamil, Y.R. Ahuja, K. Visweswara Rao, M. Ishaq, In vivo genotoxic effect of arsenic trioxide in mice using comet assay, *Toxicology* 162 (2001) 171–177.
- [22] P. Zhang, S.Y. Wang, L.H. Hu, F.D. Shi, F.Q. Qiu, G.J. Hong, X.Y. Han, H.F. Yang, Y.Z. Sun, Y.P. Liu, J. Zhao, Z.J. Jin, Arsenic trioxide treated 72 cases of acute promyelocytic leukemia, *Chin. J. Hematol.* 17 (1996) 58–62.
- [23] E. Lengfelder, S. Saussele, A. Weissner, T. Buchner, R. Hehlmann, Treatment concepts of acute promyelocytic leukemia, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 56 (2005) 261–274.

- [24] M.F. Hughes, Arsenic toxicity and potential mechanisms of action, *Toxicol. Lett.* 133 (2002) 1–16.
- [25] M. Rizki, E. Kossatz, A. Velázquez, A. Creus, M. Farina, S. Fortaner, E. Sabbioni, R. Marcos, Metabolism of arsenic in *Drosophila melanogaster* and the genotoxicity of dimethylarsinic acid in the *Drosophila* wing spot test, *Environ. Mol. Mutagen.* 47 (2006) 162–168.
- [26] X.C. Le, W.R. Cullen, K.J. Reimer, Determination of urinary arsenic and impact of dietary arsenic intake, *Talanta* 40 (1993) 185–193.
- [27] M. Ma, X.C. Le, Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation, *Clin. Chem.* 44 (1998) 539–550.
- [28] W.M. Jongen, J.M. Cardinaals, P.M. Bos, P. Hagel, Genotoxicity testing of arsenobetaine, the predominant form of arsenic in marine fishery products, *Food Chem. Toxicol.* 23 (1985) 669–673.
- [29] T. Kaise, T. Ochi, Y. Oya-Ohta, K. Hanaoka, T. Sukurani, T. Saitoh, C. Matsubara, Cytotoxic aspects of organic arsenic compounds contained in marine products using the mammalian cell culturing technique, *Appl. Organomet. Chem.* 12 (1998) 17–24.
- [30] R.E. Lenga (Ed.), *The Sigma–Aldrich Library of Chemical Safety Data*, vol. 2, 2nd ed., Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, 1988, p. 3307.
- [31] E. Guillamet, A. Creus, J. Ponti, E. Sabbioni, S. Fortaner, R. Marcos, *In vitro* DNA damage by arsenic compounds in human lymphoblastoid cell line (TK6), assessed by the alkaline comet assay, *Mutagenesis* 19 (2004) 129–135.
- [32] T.C. Lee, R.Y. Huang, K.Y. Jan, Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity and 6-thioguanine resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res.* 148 (1985) 83–89.
- [33] K. Harrington-Brock, M. Cabrera, D.D. Collard, C.L. Doerr, R. McConnell, M.M. Moore, H. Sandoval, J.C. Fuscoe, Effects of arsenic exposure on the frequency of *HPRT*-mutant lymphocytes in a population of copper roasters in Antofagasta, Chile: a pilot study, *Mutat. Res.* 431 (1999) 247–257.
- [34] D.M. DeMarini, H.E. Brockman, F.J. de Serres, H.H. Evans, L.F. Stankowski Jr., A.W. Hsie, Specific-locus mutations induced in eukaryotes (especially mammalian cells) by radiation and chemicals: a perspective, *Mutat. Res.* 220 (1989) 11–29.
- [35] M.L. Applegate, M.M. Moore, C.B. Broder, A. Burrell, G. Juhn, K.L. Kasweck, P.F. Lin, A. Wadhams, J.C. Hozier, Molecular dissection of mutations at the heterozygous thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (1990) 51–55.
- [36] A.A. Duker, E.J. Carranza, M. Hale, Arsenic geochemistry and health, *Environ. Int.* 31 (2005) 631–641.
- [37] M. Styblo, L.M. Del Razo, L. Vega, D.R. Germolec, E.L. LeCluyse, G.A. Hamilton, W. Reed, C. Wang, W.R. Cullen, D.J. Thomas, Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells, *Arch. Toxicol.* 74 (2000) 289–299.
- [38] M.J. Mass, A. Tennant, B.C. Roop, W.R. Cullen, M. Styblo, D.J. Thomas, A.D. Kligerman, Methylated trivalent arsenic species are genotoxic, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 355–361.



## Artículo 2:

### *Arsenic trioxide mutational spectrum analysis in the mouse lymphoma assay*

Tras los resultados obtenidos con el ensayo MLA, se decidió realizar un análisis más profundo de los mutantes inducidos por arsénico, en concreto de los inducidos por el trióxido de arsénico (TOA,  $\text{As}_2\text{O}_3$ ). El motivo por el cual se decidió estudiar este compuesto es por su uso ya que, paradójicamente, el TOA ha demostrado poseer actividad anticancerígena, a pesar de estar bien documentado el hecho de que exposiciones crónicas a arsénico inorgánico pueden inducir cáncer, entre otras enfermedades. Actualmente, el TOA se emplea de forma regular en el tratamiento de pacientes con leucemia promielocítica aguda (APL).

Para intentar esclarecer el mecanismo a través del cual el arsénico induce daño genotóxico y prever sus posibles efectos secundarios, se evaluó el espectro mutacional inducido por el TOA a partir de las colonias mutantes generadas en el ensayo MLA. Así, 49 colonias mutantes  $Tk^{-/-}$  inducidas por 10  $\mu\text{M}$  de TOA tras 4 h de tratamiento y 49 colonias mutantes  $Tk^{-/-}$  de origen espontáneo, se emplearon para analizar y caracterizar el espectro mutacional inducido por este compuesto de arsénico y, de este modo, entender su mecanismo de acción.

Se emplearon técnicas moleculares para este análisis. El cDNA del gen  $Tk$  se analizó por RT-PCR, para evaluar mutaciones intragénicas, y el análisis de pérdida de heterocigosidad (LOH) se efectuó amplificando por PCR la secuencia de ocho microsatélites heteromórficos para los cromosomas 11 homólogos, para detectar mutaciones de gran tamaño. Los resultados obtenidos demuestran que el TOA es un potente agente clastogénico, donde el 85% de los mutantes inducidos por este agente son consecuencia de LOH multilocus, afectando al gen  $Tk$  y otras regiones colindantes del cromosoma 11.



**Arsenic trioxide mutational spectrum analysis in the Mouse lymphoma assay**

**Carolina Soriano, Amadeu Creus, Ricard Marcos**

Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Volume 646, 10 November 2008, Pages 1-7







Contents lists available at ScienceDirect

# Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/molmut](http://www.elsevier.com/locate/molmut)  
 Community address: [www.elsevier.com/locate/mutres](http://www.elsevier.com/locate/mutres)



## Arsenic trioxide mutational spectrum analysis in the mouse lymphoma assay

Carolina Soriano<sup>a,b</sup>, Amadeu Creus<sup>a</sup>, Ricard Marcos<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain

<sup>b</sup> CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 February 2008  
 Received in revised form 24 July 2008  
 Accepted 26 August 2008  
 Available online 4 September 2008

#### Keywords:

*Tk* locus  
 Arsenic trioxide (ATO, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)  
 Mouse lymphoma assay  
 Mutational spectrum

### ABSTRACT

It has been well documented that long-term exposure to inorganic arsenic induces cancers and vascular diseases in a dose–response relationship. Nevertheless, arsenic has also demonstrated to have anticancer activity; thus, arsenic trioxide (ATO, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) is an inorganic trivalent arsenic form, currently used in the treatment against acute promyelocytic leukaemia (APL). The open discussion about how arsenic compounds induce genotoxic damage has moved us to evaluate the mutational spectrum induced by ATO in mouse lymphoma cells. Thus, 49 *Tk*<sup>-/-</sup> mutant colonies obtained in the mouse lymphoma assay (MLA), after treatments lasting for 4 h with 10 μM ATO, and 49 spontaneous mutant colonies from independent untreated cultures, were used to analyse and to characterise the mutational spectrum induced by this arsenic compound, to understand its mechanism of action. RT-PCR analysis of *Tk* cDNA and PCR amplifications of eight selected microsatellite sequences, located on chromosome 11, were used to carry out this screening. Our results show that, in mouse lymphoma cells, ATO is a strong clastogenic compound inducing large deletions, at chromosomal level, covering the *Tk* gene, as well as other regions of chromosome 11.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Arsenic trioxide (ATO, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) is an inorganic trivalent arsenic compound, used for a long time in medicine. Compounds containing arsenic have been used since the ancient Greece and Rome, in the treatment of syphilis, amoebic dysentery, and trypanosomiasis [1]. Currently, ATO has shown to be effective in inducing complete remission in treating patients with acute promyelocytic leukaemia (APL) at therapeutic concentrations (1–2 μM) [2,3]; thus, nowadays arsenic trioxide treatment seems to be the most promising option in relapsed disease [4]. This arsenic compound also induces apoptosis and inhibits growth of tumours, but the doses needed to trigger such effects are much higher (greater than 10 μM) than those required to inhibit haematological malignancies [5–7]. Such high doses are not achievable without the risk of severe side effects due to toxicity [8–10]. This therapeutic use gives special relevance to the studies on the genotoxic risk associated to ATO exposure.

According to epidemiological evidences, arsenic has been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [11,12] as a human carcinogen. Chronic exposure to this metalloid

has been associated with different types of cancer in skin, lung, bladder and liver, although other diseases such as skin lesions, vascular health effects, diabetes, and reproductive failure, among others, have also been reported [13–15]. Due to the carcinogenic risk of these compounds, many studies have been carried out to determine its genotoxic potential, but no general agreement has been reached about its mode of action, likely related to cell type, arsenic species, and length and dose of exposure [16].

Results obtained in cytogenetic studies indicate that arsenic is a clear clastogenic agent, as reviewed by Basu [14], where is reported that arsenite induces chromosome aberrations (CA) at concentrations ranging from 0.5 to 50 μM, and micronuclei (MN), from 0.5 to 100 μM. Thus, several *in vitro* and *in vivo* studies have shown that arsenic compounds are capable of inducing CA, sister chromatid exchanges (SCE) and MN in animal and human cell lines [14,17–22]. However, in bacteria and in the transgenic Muta<sup>TM</sup> mice, where ATO mutagenicity was evaluated in lung, kidney, bone marrow and bladder after a dose of 10.6 mg/kg/day for 5 days, arsenic was not mutagenic [23], acting weakly as a point mutagen only at toxic concentrations in several mammalian cell lines. In L5178Y cells, sodium arsenite and sodium arsenate were active at concentrations of 1–2 and 10–14 μg/mL, respectively. MMA was active between 2500 and 5000 μg/mL, while DMA required almost 10,000 μg/mL to induce a genotoxic response. In AS52 cells 50 and 100 μM of arsenite enhanced the frequency of spontaneous mutants; but, arsenite acts as comutagen at relative non-toxic concentrations (5 μM for 24 h and 10 μM for 3 h) at hprt locus in V79 cells [24–27]. In spite

\* Corresponding author at: Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain. Tel.: +34 93 5812052; fax: +34 93 5812387.

E-mail address: [ricard.marcos@uab.es](mailto:ricard.marcos@uab.es) (R. Marcos).

that arsenic is considered as a clastogenic and aneugenic agent, its role as an initiator of cancer through genotoxic mechanisms has been questioned because the lack of clear evidence indicating that arsenic can induce gene mutation [11,23].

Although ATO has been the subject of toxicological research, *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity studies are not well clarified. In a recent work carried out by us [28], a positive mutagenic response was obtained at the concentrations of 7 and 10  $\mu\text{M}$  after 4 h of treatment, when the microwell method of the mouse lymphoma assay (MLA) was employed, using the thymidine kinase (*Tk*) gene as a reporter. In these experiments, the mutant frequency (MF) was  $309 \times 10^{-6}$ , and  $611.5 \times 10^{-6}$  for 7 and 10  $\mu\text{M}$ , respectively; achieving more than two-fold the spontaneous MF ( $117.5 \times 10^{-6}$ ). ATO induced mostly small colony (SC) mutants, suggesting a strong clastogenic activity. In contrast to the *Hprt* gene mutation test, the MLA additionally detects also gross genetic alterations, like large deletions and rearrangements [29]. Due to the autosomal localization of the *Tk* gene, the MLA detects not only intragenic events, mainly point mutations, but also loss of heterozygosity (LOH). This LOH can result from entire *Tk*<sup>+</sup> loss (the functional allele) to karyotypically visible deletions and rearrangements of the *Tk*<sup>+</sup>-bearing chromosome [30].

Hence, the purpose of the present study was to evaluate the mutational spectrum generated by ATO in the MLA. Thus, ninety-eight mutant colonies, from both induced and spontaneous origin, have been used to analyse and characterise the mutational spectrum induced by this arsenic compound.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CAS 1327-53-3, purity 99.99%) was obtained from Sigma (Steinheim, Germany). The solutions were prepared just prior each experiment, using 0.1 mM NaOH as solvent and reaching an ATO final concentration of 10  $\mu\text{M}$  for the treatment of cells in suspension. This concentration was clearly mutagenic in a previous study [28]. Methyl methanesulfonate (MMS, Sigma) was used as a positive control.

RPMI 1640 medium, horse serum, L-glutamine, penicillin, streptomycin, sodium pyruvate and amphotericin B were purchased from PAA Laboratories (Pasching, Austria). Trifluorothymidine (TFT), thymidine, hypoxanthine, methotrexate and glycine were from Sigma.

### 2.2. Cells

L5178Y/*Tk*<sup>-/-</sup>-3.7.2C mouse lymphoma cells were used for the mutation assay. They were kindly provided by Dr. Olivier Gillaudeau (Sanofi-Synthelabo, Paris, France) and were cultured to prepare the master stocks. Master stocks were maintained in liquid nitrogen, at a density of  $2 \times 10^6$  cells/mL, in culture medium containing 5% dimethyl sulfoxide (DMSO). They were confirmed as free of mycoplasma by PCR.

Cells were cultured in suspension in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated horse serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin, 1 mM sodium pyruvate and 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  amphotericin B. Serum concentration was lowered during the treatment to 5% and raised to 20% when cells were dispensed into microwells. Cultures were routinely diluted at  $2 \times 10^5$  cells/mL daily to prevent overgrowth ( $>10^6$  cells/mL). Cell density was determined with a haemocytometer. To prepare working stocks for gene mutation experiments, cultures were purged of excess *Tk*<sup>-/-</sup> mutants by culturing the cells in THMG medium for 24 h. This medium contains thymidine (9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), hypoxanthine (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), methotrexate (0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and glycine (22.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). After that, cells were transferred to THG medium (without methotrexate) for 2 days. The purged cultures were checked for low background *Tk*<sup>-/-</sup> mutants and stored in liquid nitrogen.

### 2.3. Gene mutation assay

MLA was carried out as previously described [28]. The *Tk*<sup>-/-</sup> mutants were selected adding 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of TFT to each culture. Each TFT-treated culture was dispensed at 0.2 mL/well on 96-well plates. The microwell plates were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 12 days and scored for the number of microwells containing colonies. Just six mutant colonies were removed from each microwell plate to study the mutational spectrum of ATO. The putative *Tk*-deficient mutant clones were diluted in 15 mL of selection medium (TFT), incubated to confirm their *Tk* status and remaining in culture until getting enough cells to carry out DNA/RNA extraction ( $8 \times 10^5$  cells/mL). Samples of each mutant colony culture were maintained in liquid nitrogen, at a density of  $2 \times 10^6$  cells/mL, in culture medium containing 5% dimethyl sulfoxide (DMSO), for future experiments.

### 2.4. DNA and RNA isolation

For the study of the ATO mutational spectrum, RNA and DNA were isolated from a total of 98 mutant colonies; half of those were background mutants and the other half were from ATO treatments. DNA extraction was carried out by using the conventional phenol-chloroform method. RNA isolation was carried out using *Trizol*<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Paisley, UK), following the manufacturer's instructions.

### 2.5. PCR and sequencing primers for detection of *Tk* mutations

A reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and a later nested PCR were carried out for the amplification of the *Tk* cDNA on an *iCycler*<sup>™</sup> Thermal Cycler (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA). Table 1 shows the primers used

**Table 1**  
Primers and specific conditions used for PCRs amplification of the *Tk* gene and microsatellites

| cDNA Primers    | Primer sequence             | Annealing T° | Mg (mM) | Length (bp) |
|-----------------|-----------------------------|--------------|---------|-------------|
| TK1F            | TTCACGTAGCTGAGAGGTGG        | 60°          | 1       | 1004        |
| TK2R            | GGCTCCAGTCTGCATTGAGG        | 60°          | 1       | 1004        |
| TK3F            | CACGGACTCTCGGTGCTAAC        | 60°          | 1.5     | 788         |
| TK4R            | TCTCTGAGAGTCCAACCTGG        | 60°          | 1.5     | 788         |
| Microsatellites | Primer sequence             | Annealing T° | Mg (mM) | Length (bp) |
| FTk             | AGGGAGGTGCCTGGCTAACTGACCGCA | 65°          | 1.76    | 523/443     |
| RTk             | GCGGCACACGGAGTGATACTTGTCGGC | 65°          | 1.76    | 523/443     |
| F48             | TGCTCTGCTGAGCACACTTGC       | 59°          | 1.76    | 144/180     |
| R48             | CTCCAGGTCAGCGAGATGAA        | 59°          | 1.76    | 144/180     |
| F59             | AGCAGGTGGATGAGTTCATA        | 59°          | 1.76    | 240/265     |
| R59             | AGAGGTCCACAGAAGCAGAG        | 59°          | 1.76    | 240/265     |
| F36             | AGTCGTGCTTTCATCTCCAG        | 59°          | 1.76    | 258/240     |
| R36             | GTCCAGTGAGAGGTTCCAT         | 59°          | 1.76    | 258/240     |
| F29             | CTGATGTGGTCTGCTGAAC         | 59°          | 1.76    | 229/250     |
| R29             | CCACAACATTGATGCCAGG         | 59°          | 1.76    | 229/250     |
| F24             | GGATCAAAGGTACATGGCAC        | 60°          | 1.2     | 156/195     |
| R24             | GGCTACTGAGGAACAACATC        | 60°          | 1.2     | 156/195     |
| F19             | AGCTGCTTCTAGAACCTTCC        | 60°          | 1.2     | 178/200     |
| R19             | AAGTTGCCTTCTGGTGCTC         | 60°          | 1.2     | 178/200     |
| F63             | GCCACAACCTTGTGTCCTT         | 60°          | 2       | 139/155     |
| R63             | TTGACCATGCTCCTCATCAG        | 60°          | 2       | 139/155     |

Primer sequences were designed using sequences available in *GeneBank*. FTk and RTk (*D11Ag12*) [33]. TK1, TK2, TK3 and TK4 [35].

for the amplifications, together with the corresponding annealing temperatures, specific MgCl<sub>2</sub> concentration and product lengths. RNA was used as template for RT-PCR amplification, which was carried out using the SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA polymerase (Sigma), according to the manufacturer's instructions. Primer concentration used was 0.25 μM of each primer. Initial incubation for cDNA synthesis at 48 °C for 45 min and extension at 68 °C for 2 min, was followed by 40 cycles of 94 °C for 30 s, temperature of annealing at 60 °C for 1 min, and 68 °C for 2 min and, finally, an extension at 68 °C for 5 min was done. Nested PCR was carried out using 1 μL of previous RT-PCR reaction and it was amplified in a 30 μL reaction mixture containing 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 × PCR buffer, 1.5 U Taq DNA Polymerase (Bioron, Ludwigshafen, Germany) and 0.2 μM of each primer. Initial denaturation was carried out at 94 °C for 3 min, and after 30 cycles of 94 °C for 1 min, temperature of annealing 60 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, a final extension at 72 °C for 10 min was carried out.

Genomic DNA was used as template for PCR amplifications of the eight selected microsatellite sequences located on chromosome 11 and covering virtually the entire chromosome. This permits to study the loss of genetic material across the whole chromosome [31,32]. Table 1 shows the primers designed and used for the amplifications, together with the corresponding annealing temperatures, specific MgCl<sub>2</sub> concentration and product lengths. The standard conditions were: 200 ng DNA were amplified in a 30 μL reaction mixture containing 0.2 mM of each dNTP, MgCl<sub>2</sub> (variable concentration, see Table 1), 1 × PCR buffer, 1 U Taq DNA Polymerase (Bioron, Ludwigshafen, Germany) and 0.25 μM of each primer. Initial denaturation was carried out at 95 °C for 5 min, and after 35 cycles at 95 °C for 30 s, temperature of annealing (variable) for 45 s, and 72 °C for 1 min, a final extension was carried out at 72 °C for 10 min. All PCR products were analysed on 2.5–3% agarose gels 1 × in TAE. β-actin was used as quality control in all the PCR reactions. In addition, DNA from *Tk*<sup>+/-</sup> L5178Y 3.2.7C mouse cells, and also from a mutant cell line that has lost all of chromosome 11b, was amplified for control.

All primers used for amplifications were obtained from Isogen Life Science (IJssestein, The Netherlands).

## 2.6. Sequence analysis

The selected *Tk*<sup>-/-</sup> mutants were subjected to sequence analysis to determine the loss of *Tk* heterozygosity (LOH) using RT-PCR analysis of the *Tk* cDNA. They were compared to the wild-type sequence to determine point mutations and deletions [33]. PCR products of the 8 microsatellite polymorphisms (*D11Ag12*, *D11Mit48*, *D11Mit59*, *D11Mit36*, *D11Mit29*, *D11Mit24*, *D11Mit19* and *D11Mit63*) were also sequenced. These microsatellite loci are distributed along the entire length of the chromosome with locations at 78.0, 77.0, 58.5, 47.6, 40.0, 27.8, 13.0 and 2 cM, respectively.

The clean-up of the PCR products, for cycle sequencing, was carried out using NucleoSpin® Extract Columns (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany), following the instructions of the manufacturer. The sequence analysis was carried out on a 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the Macrogen sequencing service (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

## 2.7. Statistical analysis

The statistical significance of the mutation data was evaluated with the Chi-square test by using the SPSS version 14.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) software.

Weighted sums of the number of large clones (LC) and small clones (SC) mutants were used in the comparisons of LOH patterns and mutation spectra between different groups. In this analysis, the differences in the proportion of LC and SC mutants between induced and spontaneous mutants were taken into account. Thus, the proportion of SC mutants was 87% and 71% in the ATO-treated culture and control, respectively.

For each class of mutants, the total number including both LC and SC mutants was calculated as the weighted sum of the number of LC and SC mutants, as follows:

### 1. For the spontaneous mutants:

$$\text{Weighted sum} = \left[ \left( 29\% \times \frac{\text{Number of LC mutants}}{24} \right) + \left( 71\% \times \frac{\text{Number of SC mutants}}{25} \right) \right]$$

### 2. For the ATO-induced mutants:

$$\text{Weighted sum} = \left[ \left( 13\% \times \frac{\text{Number of LC mutants}}{25} \right) + \left( 87\% \times \frac{\text{Number of SC mutants}}{24} \right) \right]$$

## 3. Results

### 3.1. *Tk* mutation assay

As we previously described [28], ATO (7 μM and 10 μM) induces a clear increase in the *Tk* mutant frequency (MF) in L5178Y/*Tk*<sup>+/-</sup> mouse lymphoma cells after 4 h of treatment, inducing more SC mutants (87%) than LC mutants. The data for ATO-treated cell survival (RTG) were 38% at 7 μM and 25% at 10 μM, from the average of two experiments; therefore, the induced cytotoxicity was 62% and 75%, respectively. It should be also noticed that the average mutant frequency (MF) induced in ATO-treated cells (10 μM) was of 611.5 × 10<sup>-6</sup>. This value is more than five-fold the spontaneous MF (117.5 × 10<sup>-6</sup>), taking place when the toxicity is greater than 50%. In addition, ATO induced a dose-related cytotoxicity in the MLA. To evaluate such results, the new criteria developed by the Mouse Lymphoma Expert Working Group of the International Workshop for Genotoxicity Testing (IWGT) [34] were followed. According to this guideline, to consider a response as positive, the induced mutant frequency (IMF) for any treatment must meet or exceed 126 × 10<sup>-6</sup> the Global Evaluation Factor (GEF) in one or more treated cultures; in addition, cytotoxicity must be >10% RTG, and a positive statistical trend must be observed.

Additional experiments were carried out with the concentration of 10 μM ATO and enough DNA/RNA was isolated from LC and SC mutants. This material was kept out at -20 °C until its use. The concentration of 10 μM was chosen to establish the mutational spectrum, since it was clearly genotoxic in the MLA and a large number of mutant colonies were obtained. Although ATO is used therapeutically at a dose of 1–2 μM, concentrations greater than 10 μM are used to trigger apoptosis and inhibit tumour growing in solid tumours [5–7]. Therefore, 10 μM could give an approach of the kind of genetic damage induced in these conditions.

### 3.2. Non-LOH analysis

A total of ninety-eight mutant colonies were analysed in this study. Forty-nine colonies belong to spontaneous mutants, half of whom were large colonies and small colonies the other half. The same proportion of ATO-induced mutant colonies was used.

The *Tk* gene was analysed in all mutant colonies to detect possible gene mutations; thus, RT-PCR/cDNA sequencing of the TK protein-coding region was carried out. The results obtained are shown in Table 2, where all the point mutations observed in the functional *Tk* allele were obtained from the LC mutants; no point mutations were found in any of the SC mutants analysed. A total of 12 controls and 6 ATO-induced mutations were identified. Single base-pair substitutions were found in 5/6 (83.3%) mutants from the treated cells, and in all the mutations from untreated control cells. The most commonly induced mutation type in control and ATO-treated cells was the A:T → G:C transition, presents in 4/6 (66.7%) of the ATO-induced mutants and in 11/12 (91.7%) of the spontaneous mutants. In addition, among the ATO-induced mutations, 1/6 (16.7%) was a frameshift, whereas such type of mutation did not occur in the control. All obtained mutations are unique changes in the *Tk* sequence and result in a different amino acid, which is responsible for the loss of protein function.

### 3.3. LOH analysis

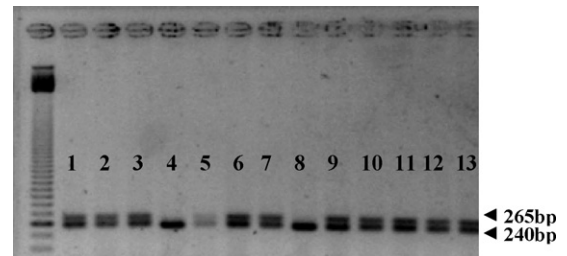
To settle the integrity of the chromosome and display LOH, a screening of the whole chromosome 11 was carried out using eight heterozygote microsatellites (*D11Ag12*, *D11Mit48*, *D11Mit59*, *D11Mit36*, *D11Mit29*, *D11Mit24*, *D11Mit19* and *D11Mit63*). In Fig. 1 there is an example of the loss of a particular microsatellite

**Table 2**  
Mutations in the *Tk* gene determined by RT-PCR/cDNA sequencing analysis of TFT (trifluorothymidine) resistant clones from control (CL) and ATO-treated (L) L5178Y *Tk*<sup>+</sup> mouse lymphoma cells

| Spontaneous Large Colony Mutants (Point Mutations)      |               |        |              |                      |
|---|---------------|--------|--------------|----------------------|
| 1CL   | TAT → CAT     | Exon 7 | Position 541 | Tyrosine → Histidine |
| 4CL   | GTC → GCC     | Exon 3 | Position 119 | Valine → Alanine     |
| 6CL   | GTC → GCC     | Exon 3 | Position 188 | Valine → Alanine     |
| 7CL   | TAT → CAT     | Exon 7 | Position 541 | Tyrosine → Histidine |
| 9CL   | GTC → GCC     | Exon 3 | Position 119 | Valine → Alanine     |
| 11CL  | TAT → CAT     | Exon 7 | Position 541 | Tyrosine → Histidine |
| 13CL  | GTC → GCC     | Exon 3 | Position 119 | Valine → Alanine     |
| 14CL  | TAT → CAT     | Exon 7 | Position 541 | Tyrosine → Histidine |
| 21CL  | GTC → GCC     | Exon 3 | Position 119 | Valine → Alanine     |
| 22CL  | GTC → GCC     | Exon 3 | Position 119 | Valine → Alanine     |
| 23CL  | GGC → GAC     | Exon 4 | Position 284 | Glycine → Asparagine |
| 24CL  | GTC → GCC     | Exon 3 | Position 119 | Valine → Alanine     |
| Arsenic Trioxide Large Colony Mutants (Point Mutations) |               |        |              |                      |
| 1L  | GTC → GCC     | Exon 3 | Position 119 | Valine → Alanine     |
| 2L  | GCC → GGC     | Exon 5 | Position 338 | Alanine → Glycine    |
| 7L  | GTC → GCC     | Exon 3 | Position 119 | Valine → Alanine     |
| 16L   | GTC → GCC     | Exon 3 | Position 119 | Valine → Alanine     |
| 20L   | ATGA deletion | Exon 5 | Position 330 | Frameshift           |
| 24L   | GTC → GCC     | Exon 3 | Position 188 | Valine → Alanine     |

ATO-induced mutants were isolated from cell cultures treated with 10 μM ATO for 4 h.

(*D11Mit59*), where 2 of the 13 mutants analysed present its loss. The global results obtained in this study are shown in Table 3. Forty-nine spontaneous mutants (24 LC and 25 SC) and forty-nine mutants (25 LC and 24 SC) from 10 μM ATO-treated cultures were analysed. LOH at the *D11Ag12* marker, which is located into the *Tk* gene, occurred in all the investigated SC mutants from ATO-treated and untreated

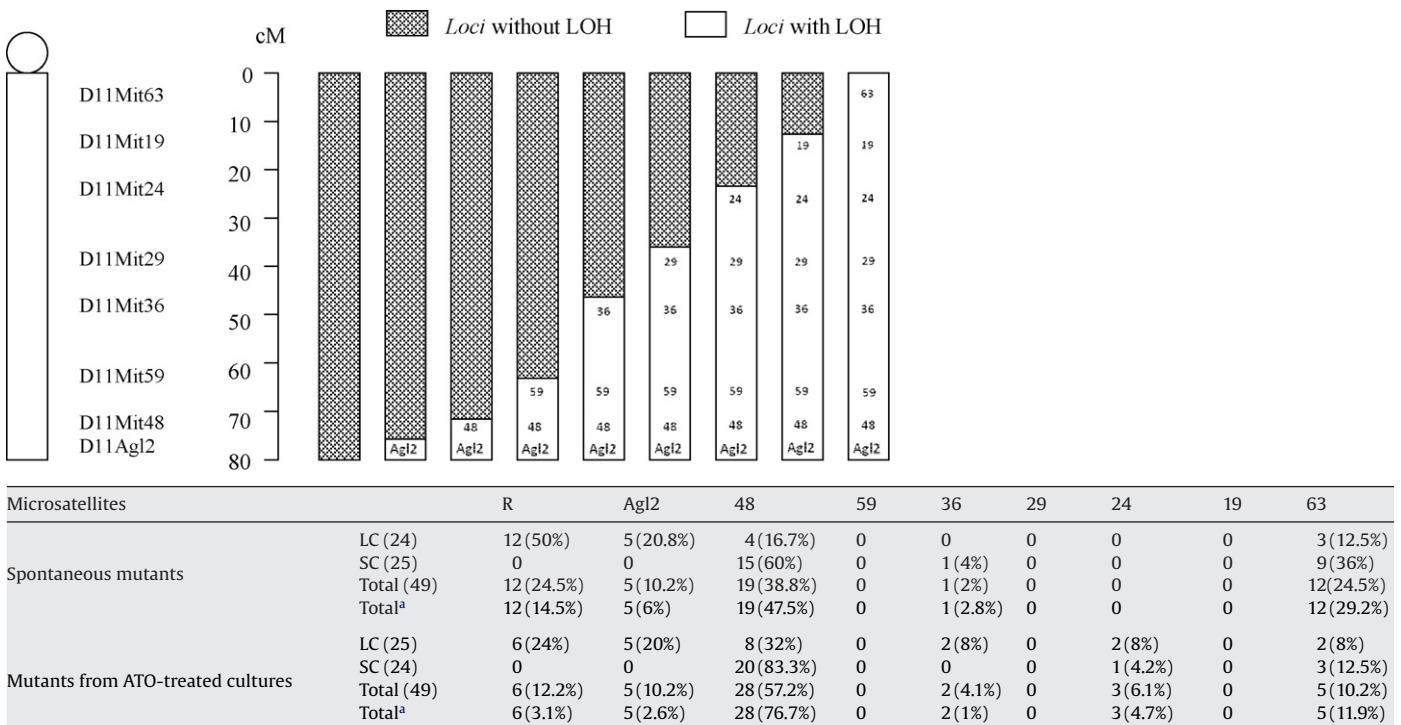


**Fig. 1.** PCR analysis of the loss of heterozygosity (LOH) at the *D11Mit59* microsatellite locus of L5178Y mouse lymphoma cells. Note that lanes 4 and 8 show LOH, since the 265 bp product is lost.

control cultures, suggesting the loss of all or at least part of the *Tk*<sup>+</sup> allele. In contrast, LOH at the *D11Ag12* marker showed differences in LC mutants, since it was observed in 19/25 (76%) of the LC mutants from ATO-treated cultures, but in only 12/24 (50%) of the LC mutants from the untreated cultures. In total, a proportion of 43/49 (87.8%) of the ATO-treated cultures had LOH at the *Tk* locus, while 37/49 (75.5%) of the spontaneous mutants presented *Tk* LOH. Table 3 also indicated the proportion of mutants with no LOH, since only point mutations were detected (R).

A summary of the results of the LOH analysis is presented in Table 4. The LOH pattern from the ATO-treated cultures was significantly different from that of spontaneous mutants isolated from independent cultures ( $P < 0.001$ ). We consider that cells showing loss of all markers reflect the entire loss of chromosome 11. Therefore, these results indicate that ATO-induced LC mutants are predominantly deletions (17/25, 68%), while only 9/24 (37.5%) of

**Table 3**  
Analysis of chromosome 11 deletions, to evaluate loss of heterozygosity (LOH), in *Tk* mutants from ATO-treated and control cultures



The white bars indicate the lost microsatellites (LOH). The black bars are the preserved markers in the chromosome. In the table, the obtained mutants are placed in the microsatellite column, which correspond with the last marker lost. For instance, the mutants present in the column 63 have lost all the markers, even *D11Mit63*; however, the mutants in the column 24 conserve the microsatellites *D11Mit63* and *D11Mit19*, which are painted in black bars at the graph. For columns 59, 29 and 19, there were not cases with LOH arriving until such markers.

<sup>a</sup> Total is the weighted sum of the number of LC and SC mutants considering the proportion difference of LC and SC mutants between the selected mutants and mutants in the original culture (the proportion of SC in the ATO-treated culture and untreated cultures was 87% and 71%, respectively).



**Table 4**  
Comparison of large and small colonies results, using the percentages of mutants

| Source of mutants    | Clone size         | Intragenic mutation     | Deletion                | Chromosome loss          |
|----------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Spontaneous mutants  | LC (24)            | 12 (50%)                | 9 (37.5%)               | 3 (12.5%)                |
|                      | SC (25)            | 0                       | 16 (64%)                | 9 (36%)                  |
|                      | Total (49)         | 12 (24.5%)              | 25 (51%)                | 12 (24.5%)               |
|                      | Total <sup>a</sup> | 12 (14.5%)              | 25 (56.3%)              | 12 (29.2%)               |
| ATO-treated cultures | LC (25)            | 6 (24%)                 | 17 (68%)                | 2 (8%)                   |
|                      | SC (24)            | 0                       | 21 (87.5%)              | 3 (12.5%)                |
|                      | Total (49)         | 6 (12.2%)               | 38 (77.6%)              | 5 (10.2%)                |
|                      | Total <sup>a</sup> | 6 (3.1%) <sup>***</sup> | 38 (85%) <sup>***</sup> | 5 (11.9%) <sup>***</sup> |

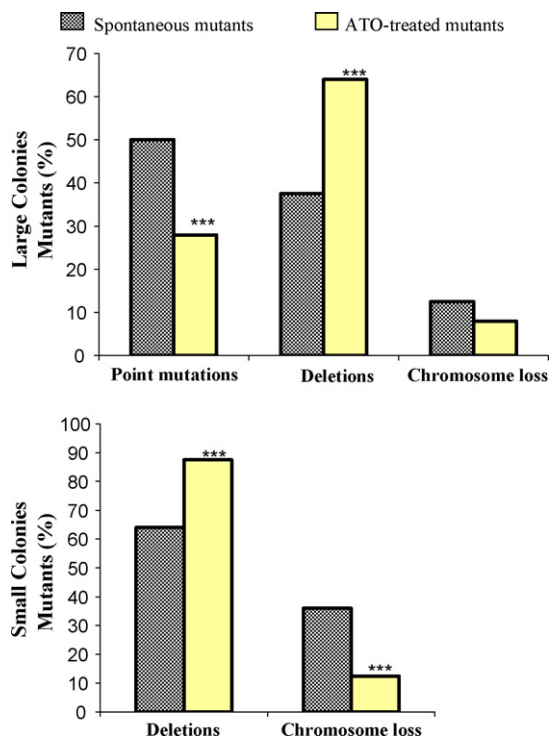
<sup>\*\*\*</sup> Significantly different from controls,  $P < 0.001$ . LC: Large colonies; SC: Small colonies.

<sup>a</sup> Total is the weighted sum of the number of LC and SC mutants considering the proportion difference of LC and SC mutants between the selected mutants and original culture mutants (the proportion of SC in the ATO-treated cultures and untreated cultures was 87% and 71%, respectively).

spontaneous LC mutants are due to deletions. Similarly, for SC mutants, which represent the 87% of ATO-induced mutants, ATO induces mainly large deletions, 21/24 (87.5%), whereas only 16/25 (64%) was observed in spontaneous mutants. However, the number of chromosome losses in SC mutants is significantly higher in those of spontaneous origin, 9/25 (36%), when compared to the ATO-induced ones, 3/24 (12.5%) ( $P < 0.001$ ). Taking into account the weighted sums, 85% of ATO-treated mutants are consequence of large deletions. Fig. 2 shows that these differences were mainly due to the proportion of point mutations vs. deletions in LC mutants ( $P < 0.001$ ), and large deletions vs. chromosome loss in SC mutants ( $P < 0.001$ ).

#### 4. Discussion

The results obtained in the analysis of the mutational spectrum of ATO-induced mutants confirm that this compound is a potent inducer of large deletions, which would confirm the clastogenic potential attributable to arsenic compounds. However, taking into account the toxicity induced by ATO (62% and 74.5%) at 10  $\mu\text{M}$ , it is



**Fig. 2.** Comparison of the results of large and small colonies, using the percentage of mutants. <sup>\*\*\*</sup> Significantly different from background controls,  $P < 0.001$ .

possible that the mutational spectra obtained could be related in part to its toxicity.

This finding is consistent with the existing data on the ATO ability to induce chromosome aberrations and micronuclei in bone marrow cells of rats, treated for 5 days with ATO at doses ranging from 5 to 20 mg/kg body weight (BW) [35], and both small and large colony mutants in the mouse lymphoma *Tk* gene (7 and 10  $\mu\text{M}$ ) [28]. Thus, it appears that when ATO is tested in mutation assays detecting also chromosome mutations, it acts as a potent mutagenic/clastogenic compound. This genotoxic behaviour of ATO agrees with the results obtained in the induction of DNA breakage in human leukaemia cells, by using the comet assay (5 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) [36]. In general, previous genotoxic studies of arsenic compounds have largely yielded negative findings for gene mutations, but positive results for chromosomal aberrations (arsenite, 0.5–50  $\mu\text{M}$ ) [14]. Although no previous studies have been published, reporting whether ATO induces point mutations, other arsenic compounds tested for mutagenicity were non-mutagenic in bacteria, acting weakly at high concentrations (5–10  $\mu\text{M}$ ) in the *Hprt* locus in Chinese hamster V79 cells [27]. The reason of the negative results obtained in the *Hprt* locus, when arsenic compounds are assayed, is due to its location in the X chromosome (single functioning), which makes unlikely the detection of large deletions, since a deletion extended past the *Hprt* locus is often lethal. Nevertheless, the mouse lymphoma assay can detect the arsenic clastogenic effects since it uses an autosomal gene target [25,28]. The negative results for  $\text{As}^{\text{III}}$  and  $\text{As}^{\text{V}}$  in bacteria assays using TA98 and TA100 strains of *Salmonella typhimurium* (0.1–100  $\mu\text{g}/\text{plate}$  of  $\text{As}^{\text{III}}$  and  $\text{As}^{\text{V}}$ ) [37] and in WP2 *Escherichia coli* strain (0–0.1 mM of  $\text{As}^{\text{III}}$ ) [38], as well as with other arsenical compounds tested for gene mutation in microbes [22,39], support the view that the mouse lymphoma results indicate that this agent induces large deletions but not gene mutations [25,28,40].

Oxidative damage predominantly induces C  $\rightarrow$  T transitions [41,42] that are the point mutations most represented in both control and ATO-induced point mutations. Nevertheless, the low incidence of point mutations in the ATO-induced mutants (including C  $\rightarrow$  T transitions) might suggest that the assumed role of oxidative damage induced by arsenic compounds [43] would act via lesions resulting in chromosome damage instead of point mutations.

Arsenic genotoxicity has been explained by diverse mechanisms including inhibition of various DNA repair enzymes, production of reactive oxygen species (ROS), induction of gene expression of stress response proteins [44], and also by epigenetic changes [45]. The production of ROS by arsenic usually results in oxidative stress into the cells. Oxidative stress has been involved in mediating many deleterious effects of arsenic including DNA damage, lipid peroxidation, redox enzyme activity, and decrease of antioxidant defence levels. It has been reported that arsenic-induced oxidative stress

can provoke a broad spectrum of effects on the DNA including DNA single- and double-strand breaks, abasic sites, DNA–protein cross-links, and DNA base modifications [46]. This genotoxic activity of ATO agrees with the results obtained in the induction of DNA breakage in human leukaemia cells, as detected in the comet assay (5 and 10 µg/mL) [36]. In addition, and as reviewed by Hei and Filipic [43], evidences in support of the role of oxidative damage in arsenic genotoxicity/carcinogenesis are overwhelming, since the modulation of the cellular redox status has a profound effect on the genotoxicity of arsenic. The induction of sister-chromatid exchanges in cultured human lymphocytes exposed to arsenite was antagonised by the addition of superoxide dismutase and catalase, and the induction of micronuclei in CHO-K1 cells by 20 µM of arsenite was antagonised by nitric oxide synthase inhibitors, superoxide dismutase or uric acid. These results support the view that some clastogenic effects of arsenic are mediated via free radicals [47].

It has been described in previous papers that arsenic is also an inducer of aneuploidy [48–53]. In *in vitro* studies with human fibroblasts, low doses of arsenite (1.25–10 µM) induced mainly kinetochore-positive MN, whereas high doses (5–80 µM) gave negative results [49]. In human lymphocytes, 0.001–0.1 µM of arsenite induced aneuploidy by disruption of microtubule assembly and spindle formation [51] and 0.01 µM had an aneuploidogenic and a mitotic arrest effect [52]. In humans exposed to 1.312 micrograms As/L in drinking water, both clastogenic and weak aneuploidogenic effects of arsenic were observed in exfoliated epithelial cells [53]; nevertheless, in the current work, the frequency of chromosome loss in ATO-mutants is significantly lower than that found in spontaneous mutants. This would indicate that, at least for the MLA assay, ATO does not seem to exert any aneugenic potential, which would support the negative findings found by other authors [54]. It is becoming increasingly clear that exposure to high doses of arsenic compounds differs from low dose exposure, with regard to genotoxic and therapeutic effects [2,55]; although the response will depend on the cell type, its sensitivity and the arsenic form. A good example is the therapeutically and successful use of ATO in treating patients with acute promyelocytic leukaemia at 1–2 µM therapeutic concentrations and its less effectiveness against solid tumours, needing to use much higher concentrations to trigger apoptosis and inhibit tumour growing. ATO effectiveness against solid tumours is a narrow window of therapeutic opportunity given that low doses of ATO stimulate tumour growth and high doses are toxic [56]. Concentrations higher than 10 µM are used to trigger apoptosis and to inhibit tumour growing [5–7] and, in the present work, we show the genotoxic and clastogenic effects of 10 µM ATO. This would indicate that such high doses are not achievable without the risk of severe side effects due to toxicity. As it has been previously described, ATO may produce cardiac, liver and kidney toxicity, among others, in patients and animal models [8–10,55,57,58]. Nevertheless, inter-individual or interspecies variability in the response to arsenic compounds is often found and it has been attributed to genetic differences in the ability to metabolise arsenic [59]. Inorganic arsenic is metabolised via successive reduction and methylation steps [60], and some of its metabolites, in particular MMA<sup>III</sup>, have shown to be more toxic and genotoxic than its parental forms [61]. Thus, genetic polymorphisms in genes regulating such metabolic steps are considered as potential risk factors, modulating the response to arsenic exposure.

The conclusion of our work is that ATO is a strong clastogenic compound, as observed in the mouse lymphoma assay, where it predominantly induces large deletions at chromosomal level in the *Tk* gene, covering such deletions also other regions of chromosome 11.

## Acknowledgements

Carolina Soriano is supported by a postgraduate fellowship from the Generalitat de Catalunya. This investigation has been supported in part by the Spanish Ministry of Education and Science (CAICYT, SAF2008-02933) and by the Generalitat de Catalunya (CIRIT, 2005SSGR-00136).

## References

- [1] K.H. Antman, Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy, *Oncologist* 6 (Suppl. 2) (2001) 1–2.
- [2] G. Lazo, H. Kantarjian, E. Estey, D. Thomas, S. O'Brien, J. Cortes, Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of patients with acute promyelocytic leukemia. The M.D. Anderson experience, *Cancer* 97 (2003) 2218–2224.
- [3] S.L. Soignet, P. Maslak, Z.G. Wang, S. Jhanwar, E. Calleja, L.J. Dardashti, D. Corso, A. DeBlasio, J. Gabrilove, D.A. Scheinberg, P.P. Pandolfi, R.P. Warrell Jr., Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 1341–1348.
- [4] E. Lengfelder, S. Saussele, A. Weisser, T. Buchner, R. Hehlmann, Treatment concepts of acute promyelocytic leukemia, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 56 (2005) 261–274.
- [5] H. Monzen, R.J. Griffin, B.W. Williams, M. Amano, S. Ando, T. Hasegawa, Study of arsenic trioxide-induced vascular shutdown and enhancement with radiation in solid tumor, *Radiat. Med.* 22 (2004) 205–211.
- [6] Z.Y. Shen, Y. Zhang, J.Y. Chen, M.H. Chen, J. Shen, W.H. Luo, Y. Zeng, Intratumoral injection of arsenic to enhance antitumor efficacy in human esophageal carcinoma cell xenografts, *Oncol. Rep.* 11 (2004) 155–159.
- [7] Y.S. Pu, T.C. Hour, J. Chen, C.Y. Huang, J.Y. Guan, S.H. Lu, Arsenic trioxide as a novel anticancer agent against human transitional carcinoma—characterizing its apoptotic pathway, *Anticancer Drugs* 13 (2002) 293–300.
- [8] K. Naito, M. Kobayashi, N. Sahara, K. Shigeno, S. Nakamura, K. Shinjo, T. Tobita, A. Takeshita, R. Ohno, K. Ohnishi, Two cases of acute promyelocytic leukemia complicated by torsade de pointes during arsenic trioxide therapy, *Int. J. Hematol.* 83 (2006) 318–323.
- [9] A.M. Evens, M.S. Tallman, R.B. Gartenhaus, The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present, and future, *Leuk. Res.* 28 (2004) 891–900.
- [10] Y. Li, X. Sun, L. Wang, Z. Zhou, Y.J. Kang, Myocardial toxicity of arsenic trioxide in a mouse model, *Cardiovasc. Toxicol.* 2 (2002) 63–73.
- [11] IARC, Some Drinking-water Disinfectants and Contaminants Including Arsenic. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans, vol. 84, IARC, Scientific Publication, Lyon, 2004.
- [12] IARC, Arsenic and Arsenic Compounds. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans, Suppl. 7, IARC, Scientific Publication, Lyon, 1987.
- [13] T.G. Rossman, Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach, *Mutat. Res.* 533 (2003) 37–65.
- [14] A. Basu, J. Mahata, S. Gupta, A.K. Giri, Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review, *Mutat. Res.* 488 (2001) 171–194.
- [15] C.O. Abernathy, Y.P. Liu, D. Longfellow, H.V. Aposhian, B. Beck, B. Fowler, R. Goyer, R. Menzer, T. Rossman, C. Thompson, M. Waalkes, Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues, *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 593–597.
- [16] F. Ayala-Fierro, D.S. Barber, L.T. Rael, D.E. Carter, In vitro tissue specificity for arsenite and arsenite toxicity in the rat, *Toxicol. Sci.* 52 (1999) 122–129.
- [17] T.C. Lee, S.F. Tzeng, W.J. Chang, Y.C. Lin, K.Y. Jan, Post-treatments with sodium arsenite during G2 enhance the frequency of chromosomal aberrations induced by S-dependent clastogens, *Mutat. Res.* 163 (1986) 263–269.
- [18] T.C. Lee, N. Tanaka, P.W. Lamb, T.M. Gilmer, J.C. Barrett, Induction of gene amplification by arsenic, *Science* 241 (1988) 79–81.
- [19] A.N. Jha, M. Noditi, R. Nilsson, A.T. Natarajan, Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells, *Mutat. Res.* 284 (1992) 215–221.
- [20] J.K. Wiencke, J.W. Yager, Specificity of arsenite in potentiating cytogenetic damage induced by the DNA crosslinking agent diepoxybutane, *Environ. Mol. Mutagen.* 19 (1992) 195–200.
- [21] T.S. Wang, Y.F. Shu, Y.C. Liu, K.Y. Jan, H. Huang, Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenite, *Toxicology* 121 (1997) 229–237.
- [22] T.W. Gebel, Unanswered questions in arsenic toxicology, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20 (2001) 299–309.
- [23] Y. Noda, T. Suzuki, A. Kohara, A. Hasegawa, T. Yotsuyanagi, M. Hayashi, T. Sofuni, K. Yamanaka, S. Okada, In vivo genotoxicity evaluation of dimethylarsinic acid in MutaMouse, *Mutat. Res.* 513 (2002) 205–212.
- [24] T.K. Hei, S.X. Liu, C. Waldren, Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: role of reactive oxygen species, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 8103–8107.
- [25] M.M. Moore, K. Harrington-Brock, C.L. Doerr, Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites, *Mutat. Res.* 386 (1997) 279–290.
- [26] Z. Meng, A.W. Hsie, Polymerase chain reaction-based deletion analysis of spontaneous and arsenite-enhanced gpt mutants in CHO-AS52 cells, *Mutat. Res.* 356 (1996) 255–259.
- [27] J.H. Li, T.G. Rossman, Comutagenesis of sodium arsenite with ultraviolet radiation in Chinese hamster V79 cells, *Biol. Met.* 4 (1991) 197–200.

- [28] C. Soriano, A. Creus, R. Marcos, Gene-mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay, *Mutat. Res.* 634 (2007) 40–50.
- [29] M. Honma, M. Hayashi, H. Shimada, N. Tanaka, S. Wakuri, T. Awogi, K.I. Yamamoto, N. Kodani, Y. Nishi, M. Nakadate, T. Sofuni, Evaluation of the mouse lymphoma *Tk* assay (microwell method) as an alternative to the in vitro chromosomal aberration test, *Mutagenesis* 14 (1999) 5–22.
- [30] D. Clive, G. Bolcsfoldi, J. Clements, J. Cole, M. Honma, J. Majeska, M. Moore, L. Müller, B. Myhr, T. Oberly, M.-C. Oudelhkim, C. Rudd, H. Shimada, T. Sofuni, V. Thybaud, P. Wilcox, Consensus agreement regarding protocol issues discussed during the mouse lymphoma workshop: Portland, Oregon, May 7, 1994, *Environ. Mol. Mutagen.* 25 (1995) 165–168.
- [31] M.C. Liechty, J.M. Scalzi, K.R. Sims, H. Crosby Jr., D.L. Spencer, L.M. Davis, W.J. Caspary, J.C. Hozier, Analysis of large and small colony L5178Y *Tk*<sup>-/-</sup> mouse lymphoma mutants by loss of heterozygosity (LOH) and by whole chromosome 11 painting: detection of recombination, *Mutagenesis* 13 (1998) 461–474.
- [32] M.C. Liechty, H. Crosby Jr., A. Murthy, L.M. Davis, W.J. Caspary, J.C. Hozier, Identification of a heteromorphic microsatellite within the thymidine kinase gene in L5178Y mouse lymphoma cells, *Mutat. Res.* 371 (1996) 265–271.
- [33] T. Chen, K. Harrington-Brock, M.M. Moore, Mutant frequency and mutational spectra in the *Tk* and *Hprt* genes of *N*-ethyl-*N*-nitrosourea-treated mouse lymphoma cells, *Environ. Mol. Mutagen.* 39 (2002) 296–305.
- [34] M.M. Moore, M. Honma, J. Clements, G. Bolcsfoldi, B. Burlinson, M. Cifone, J. Clarke, R. Delongchamp, R. Durward, M. Fellows, B. Gollapudi, S. Hou, P. Jenkinson, M. Lloyd, J. Majeska, B. Myhr, M. O'Donovan, T. Omori, C. Riach, R. San, L.F. Stankowski Jr., A.K. Thakur, F. Van Goethem, S. Wakuri, I. Yoshimura, Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: follow-up meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, Aberdeen, Scotland, 2003. Assay acceptance criteria, positive controls, and data evaluation, *Environ. Mol. Mutagen.* 47 (2006) 1–5.
- [35] A.K. Patlolla, P.B. Tchounwou, Cytogenetic evaluation of arsenic trioxide toxicity in Sprague–Dawley rats, *Mutat. Res.* 587 (2005) 126–133.
- [36] C.G. Yedjou, P.B. Tchounwou, In-vitro cytotoxic and genotoxic effects of arsenic trioxide on human leukemia (HL-60) cells using the MTT and alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assays, *Mol. Cell. Biochem.* 301 (2007) 123–130.
- [37] F.I. Abdullaev, R. Rivera-Luna, A. García-Carrancá, F. Ayala-Fierro, J.J. Espinosa-Aguirre, Cytotoxic effect of three arsenic compounds in HeLa human tumor and bacterial cells, *Mutat. Res.* 493 (2001) 31–38.
- [38] T.G. Rossman, D. Stone, M. Molina, W. Troll, Absence of arsenite mutagenicity in *E. coli* and Chinese hamster cells, *Environ. Mutagen.* 2 (1980) 371–379.
- [39] IARC, Some Metals and Metallic Compounds. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans, vol. 23, IARC, Scientific Publication, Lyon, 1980.
- [40] A.D. Kligerman, C.L. Doerr, A.H. Tennant, K. Harrington-Brock, J.W. Allen, E. Winkfield, P. Poorman-Allen, B. Kundu, K. Funasaka, B.C. Roop, M.J. Mass, D.M. DeMarini, Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: induction of chromosomal mutations but not gene mutations, *Environ. Mol. Mutagen.* 42 (2003) 192–205.
- [41] S. Daviet, S. Couvé-Privat, L. Gros, K. Shinozuka, H. Ide, M. Saporbaev, A.A. Ishchenko, Major oxidative products of cytosine are substrates for the nucleotide incision repair pathway, *DNA Repair* 6 (2007) 8–18.
- [42] D.H. Lee, T.R. O'Connor, G.P. Pfeifer, Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG → TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 3566–3573.
- [43] T.K. Hei, M. Filipic, Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 574–581.
- [44] A.A. Duker, E.J. Carranza, M. Hale, Arsenic geochemistry and health, *Environ. Int.* 31 (2005) 631–641.
- [45] K. Salnikow, A. Zhitkovich, Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium, *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008) 28–44.
- [46] K.T. Kitchin, S. Ahmad, Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis, *Toxicol. Lett.* 137 (2003) 3–13.
- [47] K.T. Kitchin, Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172 (2001) 249–261.
- [48] T. Ramírez, H. Stopper, T. Fischer, R. Hock, L.A. Herrera, S-adenosyl-L-methionine counteracts mitotic disturbances and cytostatic effects induced by sodium arsenite in HeLa cells, *Mutat. Res.* 637 (2007) 152–160.
- [49] L.H. Yih, T.C. Lee, Effects of exposure protocols on induction of kinetochore-plus and -minus micronuclei by arsenite in diploid human fibroblasts, *Mutat. Res.* 440 (1999) 75–82.
- [50] N. Eguchi, K. Kuroda, G. Endo, Metabolites of arsenic induced tetraploids and mitotic arrest in cultured cells, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32 (1997) 141–145.
- [51] P. Ramírez, D.A. Eastmond, J.P. Lalette, P. Ostrosky-Wegman, Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide, *Mutat. Res.* 386 (1997) 291–298.
- [52] L. Vega, M.E. Gonsebatt, P. Ostrosky-Wegman, Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected, *Mutat. Res.* 334 (1995) 365–373.
- [53] L.E. Moore, M.L. Warner, A.H. Smith, D. Kalman, M.T. Smith, Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells, *Environ. Mol. Mutagen.* 27 (1996) 176–184.
- [54] A.D. Kligerman, C.L. Doerr, A.H. Tennant, Oxidation and methylation status determine the effects of arsenic on the mitotic apparatus, *Mol. Cell. Biochem.* 279 (2005) 113–121.
- [55] S.L. Soignet, Clinical experience of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia, *Oncologist* 6 (Suppl. 2) (2001) 11–16.
- [56] B. Liu, S. Pan, X. Dong, H. Qiao, H. Jiang, G.W. Krissansen, X. Sun, Opposing effects of arsenic trioxide on hepatocellular carcinomas in mice, *Cancer Sci.* 97 (2006) 675–681.
- [57] R.J. Verma, A. Vasu, A.A. Saiyed, Arsenic toxicity in mice and its possible amelioration, *J. Environ. Sci. (China)* 16 (2004) 447–453.
- [58] S.S. Wang, T. Zhang, X.L. Wang, L. Hong, Q.H. Qi, Effect of arsenic trioxide on rat hepatocellular carcinoma and its renal cytotoxicity, *World J. Gastroenterol.* 9 (2003) 930–935.
- [59] Y.M. Hsueh, Y.F. Ko, Y.K. Huang, H.W. Chen, H.Y. Chiou, Y.L. Huang, M.H. Yang, C.J. Chen, Determinants of inorganic arsenic methylation capability among residents of the Lanyang Basin: arsenic and selenium exposure and alcohol consumption, *Toxicol. Lett.* 137 (2003) 49–63.
- [60] W.R. Cullen, K.J. Reimer, Arsenic speciation in the environment, *Chem. Rev.* 89 (1989) 713–764.
- [61] A.D. Kligerman, A.H. Tennant, Insights into the carcinogenic mode of action of arsenic, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222 (2007) 281–288.





**Artículo 3:*****Analysis of arsenic Tk mouse lymphoma mutants by chromosome 11 painting***

Existen serias discrepancias respecto del mecanismo a través del cual el arsénico induce su genotoxicidad, aunque su actividad clastogénica está generalmente aceptada. Con el objetivo de completar el análisis del espectro mutacional del TOA, se realizó un análisis a nivel de citogenética molecular de los mutantes obtenidos. Así, se empleó la técnica del pintado cromosómico, para confirmar los resultados obtenidos a través del análisis de LOH y obtener más información sobre las posibles reordenaciones que hubiesen podido ocurrir, como translocaciones y deleciones, y también cambios en el número de cromosomas.

Se analizaron mediante pintado cromosómico un total de 55 mutantes  $Tk^{-/-}$ : 22 mutantes espontáneos y 23 mutantes inducidos por el TOA, previamente analizados por LOH. Nuestros resultados previos indicaban que el TOA inducía principalmente deleciones de gran tamaño. En general, los resultados obtenidos por pintado cromosómico confirman los obtenidos por LOH, aunque ofrecen nueva información sobre estos mutantes, como la presencia de isocromosomas, y la existencia de posibles recombinaciones mitóticas homólogas y no homólogas. Sin embargo, estos resultados no aportan diferencias importantes entre lo encontrado entre los mutantes espontáneos y lo hallado en los tratados con TOA.

En resumen, el hallazgo más importante de este estudio sería que las pérdidas grandes de heterocigosidad no serían consecuencia de deleciones, sino de sucesos recombinacionales.

El contenido de este artículo se encuentra en el anexo.



## 5. DISCUSIÓN

De acuerdo con las estimas realizadas por expertos, el arsénico en el agua de bebida es la causa de entre 200.000 y 270.000 casos de cáncer únicamente en Bangladesh, donde millones de personas se encuentran expuestas a este metaloide (Smith *et al.*, 2000; WHO, 2001; IARC, 2004). Debido al riesgo carcinogénico del arsénico, y al gran número de grupos poblacionales expuestos en todo el mundo, se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar su potencial genotóxico, pero ningún consenso se ha alcanzado respecto al mecanismo de acción que este agente emplea en la inducción de cáncer así como en la génesis de otras enfermedades. Además, existe cierta controversia respecto al tipo de daño genotóxico que induce, y el tipo de compuesto arsenical que más influye en su carcinogenicidad.

En ausencia de buenos modelos animales para estudiar el mecanismo carcinogénico del arsénico, los estudios *in vitro* se han convertido en herramientas útiles para dilucidar estos mecanismos. Diversos trabajos publicados han puesto de manifiesto que el arsénico es un pobre inductor de mutaciones puntuales, mientras que por otro lado, han demostrado que es un agente con actividad aneugénica y clastogénica (Basu *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2006). De esta manera, se han obtenido resultados negativos en ensayos de mutación génica en sistemas bacterianos como en el test de Ames, empleando *Salmonella* (Shelby, 1988; Kligerman *et al.*, 2003). Igualmente, en ensayos de mutación génica con células de mamífero se han obtenido resultados negativos o han demostrado ser débiles inductores de mutaciones puntuales (Rossman *et al.*, 1980; Basu *et al.*, 2001). Así, en la actualidad la capacidad de los compuestos de arsénico de inducir mutaciones génicas está bajo discusión. Sin embargo, en el trabajo realizado por Moore y colaboradores (1997) empleando el ensayo MLA con el sistema de agar blando, obtuvieron resultados significativos empleando los siguientes cuatro compuestos arsenicales: arsenito sódico, arsenato sódico, MMA<sup>V</sup> y DMA<sup>V</sup>. En un trabajo posterior, empleando el mismo ensayo pero usando tanto el sistema de agar blando como el de multipocillo, se evaluaron los compuestos trivalentes metilados y éstos generaron resultados claramente significativos (Kligerman *et al.*, 2003). Por lo tanto, estos resultados positivos empleando el ensayo MLA indican que la sensibilidad propia de este ensayo es mayor que los ensayos de mutación génica empleados con anterioridad.

Como ya se ha comentado, existen diversos ensayos de mutación génica donde se pueden emplear distintas líneas celulares y marcadores genéticos. Sin embargo, los ensayos de mutagenicidad que emplean células de mamífero más utilizados son: L5178Y  $Tk^{+/-}$ , CHO/*Hprt*, CHOAS52/*Xprt* y TK6/ $TK^{+/-}$ , donde se indica para cada caso el nombre de la línea usada y el gen evaluado.

Las características propias de la línea celular o el gen marcador seleccionado hacen que los espectros de mutación que detectan estos distintos ensayos no sean iguales. De esta manera, existe la preferencia por el MLA, que emplea la línea celular L5178Y y el gen  $Tk^{+/-}$ , respecto a los demás. Esta predilección se debe a varios motivos: a) La localización autosómica del gen *Tk* permite detectar tanto mutaciones génicas como cromosómicas, por lo que no sería estrictamente un auténtico ensayo de mutación génica. Debido a esta capacidad y su elevada sensibilidad, este ensayo se ha convertido en un ensayo intercambiable en la batería de ensayos de genotoxicidad por el ensayo de CA; b) En las células L5178Y también se puede emplear el gen *Hprt*, como gen marcador; c) La línea celular L5178Y crece en suspensión, a diferencia de las líneas celulares CHO y V79 que crecen en monocapa, lo que permite que el número de células no se vea restringido por problemas de cooperación metabólica entre células, ni de inhibición por problemas de espacio; d) Las líneas celulares de roedores comúnmente empleadas en los ensayos de genotoxicidad (CHO, V79 y L5178Y) presentan el gen *Trp53* mutado, lo que hace que sean más sensibles a diversos compuestos genotóxicos en comparación con las líneas celulares con este gen funcional (p.ej. TK6), generando MF más elevadas y aumentando la sensibilidad del ensayo; e) A todo esto, no debemos olvidar que las células mutantes L5178Y  $Tk^{-/-}$  pueden acabar desarrollando colonias de dos tamaños, grandes (LC) y pequeñas (SC), las cuales se las relaciona con el tipo de mutación sufrida, siendo las LC generalmente consecuencia de mutaciones génicas y las SC de mutaciones cromosómicas, pudiendo de esta manera clasificar a los compuestos evaluados como mutágenos o clastógenos en función de la proporción de las colonias inducidas; f) otra de las ventajas de este ensayo es que permite el estudio de las colonias mutantes de forma individual, pudiéndose realizar un estudio más detallado de las mutaciones inducidas en el gen *Tk* y en el cromosoma donde reside, empleando técnicas moleculares y citogenéticas, y así describir el espectro mutacional inducido por el agente genotóxico empleado. Por todos estos motivos, el ensayo de linfoma de ratón (MLA) L5178Y  $Tk^{+/-}$  es el más extensamente utilizado y preferido respecto a los demás

(Moore *et al.*, 1989; Clements, 1995; OECD, 1997; Liechty *et al.*, 1998; Kirkland *et al.*, 2007).

Con tal de validar el ensayo MLA, empleando el sistema multipocillo puesto a punto en nuestro laboratorio, decidimos evaluar tres de los compuestos de arsénico analizados por otros investigadores, y así confirmar sus resultados (Moore *et al.*, 1997; Kligerman *et al.*, 2003). Estos compuestos fueron el arsenito sódico (trivalente inorgánico), el MMA<sup>V</sup> y el DMA<sup>V</sup> (metabolitos intermediarios de la biotransformación del iAs, pentavalentes orgánicos), así como otros tres compuestos no analizados anteriormente mediante este ensayo, como son el trióxido de arsénico (trivalente inorgánico), la arsenobetaína y el cloruro de tetrafenilarsonio (ambos pentavalentes orgánicos). La selección y evaluación del potencial genotóxico de estos compuestos arsenicales pretende ofrecer más información respecto al potencial genotóxico de los compuestos de arsénico y sus mecanismos de acción.

Como se ha comentado en apartados anteriores, el arsénico es un contaminante ambiental presente en el agua de bebida principalmente en su forma inorgánica. El origen de este arsénico proviene de la disolución del arsénico contenido en algunos terrenos por los que fluye el agua. El arsenato (As<sup>V</sup>) suele ser la forma mayoritaria presente en el agua, aunque se han descrito casos donde las aguas subterráneas pueden presentar una concentración de su forma reducida (arsenito, As<sup>III</sup>) de hasta un 50% del arsénico total (Morgan, 2001). Estudios epidemiológicos han demostrado que el iAs es carcinogénico en humanos, aunque los resultados obtenidos a partir de estudios con animales han resultado ambiguos. En ensayos estándar de carcinogenicidad, y en diversos estudios de tumorogénesis empleando distintos modelos animales como por ejemplo en rata, ratón, perro y macaco, no se ha demostrado capacidad carcinogénica (Wang *et al.*, 2002). Sin embargo, el iAs sí ha demostrado ser capaz de actuar como cocarcinógeno al administrarlo conjuntamente con otros agentes carcinogénicos (Cohen *et al.*, 2006, 2007). Recientemente Waalkes y colaboradores (2003) suministraron a ratones altas dosis de arsenito transplacentalmente (42,5 y 85 mg/mL, o 327 y 654  $\mu$ M), incrementando la incidencia de tumores en distintos tejidos de las crías, aunque, por otro lado, el tratamiento no tuvo ningún efecto en los individuos adultos (Waalkes *et al.*, 2003, 2004). Por estos resultados conflictivos, numerosos trabajos han centrado su

interés en el estudio de la genotoxicidad del arsenito sódico, y su relación con el incremento de la incidencia de cáncer en las poblaciones expuestas.

En nuestro trabajo (**artículo 1**), el arsenito sódico ha generado resultados positivos a las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{M}$  en tratamientos de 4 horas en el ensayo MLA, con valores promedio de 49 y 24,5% de RTG respectivamente, confirmando los resultados anteriormente obtenidos por otros autores utilizando concentraciones similares (Moore *et al.*, 1997; Kligerman *et al.*, 2003). La inducción mayoritaria de colonias pequeñas es una indicación de que este compuesto arsenical ejerce su mutagenicidad a través de una acción clastogénica. Ésto coincide con lo obtenido en ensayos citogenéticos, donde el arsenito ha demostrado inducir CA y MN (Basu *et al.*, 2001), confirma la actividad clastogénica y aneugénica del arsénico.

Estos resultados positivos obtenidos en el ensayo MLA no concuerdan con los obtenidos en otros ensayos de mutación génica. Así, el arsenito ha generado resultados negativos en sistemas bacterianos (Rossman *et al.*, 1980; Shelby, 1988; Kligerman *et al.*, 2003), y en la línea celular de hámster chino V79, tanto en el locus *Hprt* como en de resistencia a la ouabaína (Rossman *et al.*, 1980). Debido a la pobre mutagenicidad inducida en estos loci, se han utilizado otros marcadores genéticos que no comprometiesen la supervivencia celular y que estuvieran presentes en cromosomas autosómicos. Así, empleando el gen *gpt* en la línea transgénica G12 de hámster chino (Li y Rossman, 1991; Klein *et al.*, 2007) y en la línea celular transgénica AS52 (Meng y Hsie, 1996), el arsenito demostró ser inductor de mutaciones génicas, pero no como resultado de mutaciones puntuales sino mediante la inducción de deleciones. Igualmente, en la línea celular híbrida CHO-K1/A<sub>L</sub>, que contiene una única copia del cromosoma 11 humano, se obtuvieron resultados significativos, induciendo principalmente deleciones de gran tamaño a la concentración de 7  $\mu\text{M}$  de arsenito, que es una concentración tóxica en esta línea celular (Hei *et al.*, 1998). Estos datos, conjuntamente con los obtenidos en ensayos citogenéticos, apuntan a que los resultados positivos obtenidos en el ensayo MLA son consecuencia de la acción clastogénica del arsenito y no de mutaciones génicas. Como anteriormente se ha comentado, el ensayo MLA presenta una serie de características que lo hacen un ensayo más sensible que otros ensayos de mutación génica en células de mamífero. Así, la explicación de este

resultado positivo para el arsenito en el MLA sería debido principalmente a la capacidad que tiene este ensayo para detectar mutaciones cromosómicas.

Otro de los compuestos evaluados en este trabajo ha sido el TOA, un compuesto trivalente inorgánico de arsénico cuyo interés radica en su actual uso, con éxito, en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda, y con potencial para emplearse en tratamientos contra otros tipos de cáncer (Evens *et al.*, 2004). Como era de esperar, los resultados obtenidos para este compuesto en el ensayo MLA han sido positivos a las concentraciones de 7 y 10  $\mu\text{M}$  en tratamientos de 4 h, con valores promedio de 38 y 25% de RTG, induciendo principalmente colonias pequeñas, indicativo de un mecanismo clastogénico. El TOA, como ocurría con otros compuestos inorgánicos de arsénico, resultó ser no mutagénico en el ensayo de mutación génica *in vivo* en el ratón transgénico Muta<sup>TM</sup> mouse a una dosis de 7,6 mg/Kg/día (38,4  $\mu\text{M}$ ) (Noda *et al.*, 2002). Por otro lado, al igual que con el arsenito sódico, el TOA dio resultados significativos en la inducción de CA y MN tanto *in vitro* como *in vivo* (25-100  $\mu\text{M}$ ), demostrando su actividad clastogénica y apoyando nuestros resultados (Basu *et al.*, 2001; Patlolla y Tchounwou, 2005). Este compuesto también ha mostrado ser capaz de generar resultados positivos en el ensayo del cometa en células leucocitarias de ratón *in vivo*, generando roturas en el DNA a concentraciones que van de 0,66  $\mu\text{M}$  a 32,6  $\mu\text{M}$  en tratamientos de 24, 48 y 72 h (Saleha Banu *et al.*, 2001). En este contexto, los resultados positivos obtenidos en el ensayo MLA con TOA no son sorprendentes, teniendo en cuenta los resultados positivos obtenidos en otros ensayos de genotoxicidad y los previamente obtenidos con el arsenito sódico, también un compuesto trivalente inorgánico de arsénico. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos con ambos compuestos se observa que el TOA es ligeramente más genotóxico que el arsenito sódico, incrementando tanto la MF como la proporción de SC. De esta manera el TOA, al igual que otros agentes quimioterapéuticos empleados en los tratamientos contra el cáncer, ha resultado ser un potente agente clastogénico.

El MMA<sup>V</sup> y el DMA<sup>V</sup> son metabolitos producto de la biotransformación del iAs en humanos. Los resultados obtenidos a partir del ensayo MLA demuestran que ambos compuestos son genotóxicos, pero a la concentración máxima permitida en este ensayo de genotoxicidad según las directrices de la ICH (1997), 10 mM, y el MMA<sup>V</sup> además a la concentración de 5 mM, y tras tratamientos de 4 h. En estas condiciones, ambos



compuestos han demostrado ser menos genotóxicos que los compuestos inorgánicos ensayados a concentraciones de orden micromolar, tres ordenes de magnitud menor. Comparaciones entre ellos muestran que el MMA<sup>V</sup> ha resultado ser ligeramente más mutagénico que el DMA<sup>V</sup>, ofreciendo un mayor incremento en su MF y una mayor citotoxicidad a la concentración de 5 y 10 mM, donde el MMA<sup>V</sup> presenta un valor medio de 40,5% y 11% de RTG, respectivamente, mientras que a 10 mM el DMA<sup>V</sup> tiene un valor medio de 47% de RTG. Nuestros resultados son concordantes con los obtenidos en el trabajo de Moore y colaboradores (1997) empleando la versión de agar blando del ensayo MLA, y a las mismas concentraciones evaluadas. Al igual que ocurría con el SA y con el TOA, estos compuestos generan mayoritariamente SC, indicando que el incremento de la MF es consecuencia de mutaciones cromosómicas y no de eventos de mutación génica. Esta suposición está apoyada por los resultados significativos obtenidos en los ensayos citogenéticos de CA y MN, aunque utilizando altas concentraciones, mucho mayores que las necesarias para inducir daño genotóxico con las formas inorgánicas de arsénico. Estos resultados se han descrito para distintas líneas celulares de mamíferos (Basu *et al.*, 2001; Hughes, 2002; Cohen *et al.*, 2006). De estos dos compuestos orgánicos evaluados, cabe destacar que el DMA<sup>V</sup> ha demostrado poseer capacidad carcinogénica en diversos estudios de carcinogenicidad empleando modelos animales; induciendo fundamentalmente cáncer de vejiga en rata y ratón. Sin embargo, se ha postulado que el DMA<sup>V</sup> actuaría a través de su forma trivalente dimetilada, el DMA<sup>III</sup>, la cual sería la auténtica responsable de la carcinogénesis observada (Wang *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2006, 2007). Es importante destacar, que aplicando las actuales directrices establecidas por la ICH para el desarrollo adecuado del MLA, estos resultados positivos se considerarían irrelevantes biológicamente, puesto que la concentración de 10 mM es diez veces superior a la recomendada actualmente, considerándola una concentración no realista en condiciones normales en la naturaleza y, por lo tanto, no relevante para la valoración de riesgo en humanos (ICH, 2008). De esta manera, teniendo en cuenta las nuevas directrices reguladoras, a la concentración de 1 mM, tanto el MMA<sup>V</sup> como el DMA<sup>V</sup> ofrecen resultados negativos en este ensayo de genotoxicidad. Sin embargo, la escasa información sobre la concentración de arsénico en los tejidos y órganos diana en humanos, es un factor que hace problemático definir qué concentraciones de este metaloide son razonables evaluar *in vitro*. El arsénico se puede acumular en los tejidos, particularmente en la piel, donde se han descrito niveles

de arsénico de hasta 5.700  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $\sim 76 \mu\text{M}$ ) en personas intoxicadas por arsénico en Bangladesh (IARC, 2004; Benbrahim-Tallaa y Waalkes, 2008).

Una cuestión importante en la toxicidad del arsénico es el papel que representa su biotransformación y, por ende, el de los distintos metabolitos que se pueden formar. Inicialmente, se creía que la metilación del arsénico inorgánico era un proceso de detoxificación ya que las formas pentavalentes metiladas, productos de la biotransformación del iAs, son menos tóxicas que las inorgánicas como se puede comprobar en los resultados presentados en este trabajo. Posteriormente, se ha descubierto que las especies trivalentes metiladas son mucho más genotóxicas y citotóxicas que las formas inorgánicas (Styblo *et al.*, 2000; Kligerman *et al.*, 2003). No obstante, es importante matizar que en el caso del iAs la citotoxicidad y la capacidad de inducir transformación celular no son dependientes de la potencialidad metiladora de la célula, ya que el iAs es capaz de generar transformación celular en células incapaces de metilar, como sucede en la línea celular Urotsa, demostrando de esta manera que no siempre actúa a través de sus formas metiladas (Styblo *et al.*, 2002; Sens *et al.*, 2004).

Entre los compuestos orgánicos, la arsenobetaina es un compuesto pentavalente de arsénico, que se encuentra principalmente en el marisco, y se ha sugerido que es el metabolito final del ciclo del arsénico en ecosistemas marinos, ya que se encuentra ampliamente distribuido en distintas especies de animales oceánicos (Sakurai *et al.*, 2004). Los seres humanos están expuestos a este compuesto a través de la dieta pero se considera un compuesto arsenical no peligroso debido a su rápida eliminación por la orina sin ser metabolizado (Le *et al.*, 1993; Mandal y Suzuki, 2002). Además, trabajos previos apoyan estos resultados ya que la AsBe ha generado resultados negativos tanto en el ensayo de Ames, como en el del locus *Hprt*, siendo incapaz de inducir SCE en células V79 de hámster chino (Jongen *et al.*, 1985), e inducir daño genético detectable en el ensayo del cometa (Guillamet *et al.*, 2004). Como era de esperar, los resultados obtenidos para este compuesto en el ensayo MLA han sido negativos, tanto en tratamientos de 4 como de 24 h en todas las concentraciones evaluadas. Por lo tanto, se puede concluir que es un compuesto no mutagénico.

Aunque el cloruro de tetrafenilarsonio no es un compuesto común, el motivo por el cual se decidió evaluar su genotoxicidad es porque es un compuesto orgánico pentavalente de arsénico considerado como un posible carcinógeno (Lenga, 1988). No

existe información previa respecto de la genotoxicidad de este compuesto en la literatura exceptuando un trabajo realizado por nuestro grupo, donde se obtuvieron resultados positivos empleando el ensayo del cometa con la línea celular humana TK6, en tratamientos de 30 min a las concentraciones de 1-3 mM (Guillamet *et al.*, 2004). Sin embargo, aunque en el ensayo MLA este compuesto ha sido capaz de inducir una alta toxicidad a la concentración máxima ensayada de 25  $\mu$ M, con el valor medio de 21,5% RTG, no ha sido capaz de generar resultados significativos en mutagenicidad. Sin duda alguna, la mayor citotoxicidad observada en las células L5178Y puede deberse al mayor tiempo de tratamiento empleado (4 h) y/o que esta línea presenta más sensibilidad que la línea celular TK6. Ya que este compuesto arsenical ofrece resultados positivos en el ensayo del cometa, es muy probable que la alta toxicidad observada en L5178Y impida apreciar el efecto genotóxico inducido por este compuesto y, por lo tanto, el daño infligido a la célula sea letal a las concentraciones genotóxicas.

Existe una preocupación creciente respecto a como deben interpretarse las respuestas positivas en los ensayos de genotoxicidad *in vitro*, especialmente en aquellos casos donde las concentraciones que ofrecen resultados significativos están asociadas a altos niveles de citotoxicidad. La cuestión es si esta respuesta positiva presenta relevancia biológica y es extrapolable a sistemas *in vivo* (Kirkland y Muller, 2000; Muller y Kasper, 2000). En los resultados obtenidos en este trabajo con el ensayo MLA, se observa que las respuestas positivas observadas están asociadas a altos niveles de citotoxicidad (**artículo 1**). Teniendo en cuenta que la concentración en sangre de arsénico en personas altamente expuestas es de 0,5-1,2  $\mu$ M, es poco probable que las concentraciones ensayadas tengan relevancia en el conjunto de grupos expuestos ambiental o laboralmente a este metaloide (Snow *et al.*, 2005). Sin embargo, ofrecen información respecto a los mecanismos de genotoxicidad del arsénico.

Por el contrario, en el caso del TOA estos resultados sí son relevantes, ya que existe un especial interés en evaluar su efectividad terapéutica en otros tipos de cáncer distintos a APL. Para ello, se están empleando concentraciones superiores a 10  $\mu$ M en tratamientos en líneas celulares tumorales y tumores sólidos para determinar su capacidad anticancerígena (Shen *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Dilda y Hogg, 2007; Xiao *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007a, 2007b). Se considera que el efecto clastogénico del TOA posiblemente no represente un riesgo elevado para los pacientes con APL, que

reciben dosis terapéuticas de entre 1 y 2  $\mu\text{M}$ ; aunque los efectos inducidos dependen tanto de la dosis empleada, así como del tipo y sensibilidad celular (Basu *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002; Patlolla y Tchounwou, 2005). Sin embargo, de nuestros resultados se desprende que 10  $\mu\text{M}$  es una concentración que puede generar efectos secundarios, debido a la citotoxicidad y genotoxicidad inducida.

De manera general podemos decir que nuestros resultados demuestran que tanto las formas orgánicas como las inorgánicas de arsénico presentan la capacidad de inducir mutaciones en el locus *Tk* (**artículo 1**). Sin embargo, todo apunta a que la genotoxicidad inducida es consecuencia de la actividad clastogénica, como refleja la inducción mayoritaria de SC, y no a la inducción de mutaciones génicas. A pesar de que se ha postulado que existe una correlación entre el tamaño de la colonia y el tipo de daño sufrido por la célula, se han encontrado casos donde las LC presentan mutaciones cromosómicas y las SC son consecuencia de mutaciones puntuales. Por este motivo y para demostrar nuestra propuesta respecto a la actividad clastogénica del arsénico, ha sido necesario realizar un análisis molecular de los mutantes generados y así dilucidar la naturaleza de las mutaciones detectadas en el ensayo MLA, tanto en SC como en LC.

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de TOA son biológicamente relevantes, debido a las dosis con finalidad terapéutica empleadas en los tratamientos de tumores sólidos, decidimos centrarnos en el estudio del espectro mutacional generado por este compuesto arsenical, empleando para ello las colonias mutantes inducidas en el ensayo MLA. Como se detalla en el **artículo 2**, se analizaron un total de 98 colonias mutantes. La mitad de las cuales correspondían a mutantes espontáneos y la otra mitad a inducidos por TOA; de éstos, la mitad correspondían a SC y la otra mitad a LC. De esta manera, trabajamos con un número total de mutantes representativos de los dos tipos de colonias, LC y SC, tanto en mutantes espontáneos como inducidos. Se ha de tener en cuenta que la proporción de SC entre los mutantes inducidos por TOA es de un 87% mientras que es de un 71% entre los espontáneos, por lo que estas colonias mutantes tienen más peso a la hora de caracterizar el espectro mutacional. Empleando las técnicas moleculares de PCR, secuenciación y RTPCR, se llevó a cabo el análisis del cDNA del gen *Tk* y el análisis de la LOH empleando 8 microsatélites heteromórficos distribuidos a lo largo del cromosoma 11, con tal de determinar el tamaño de LOH. Para confirmar los resultados

obtenidos mediante técnicas moleculares y clarificar la inducción de la LOH en el MLA, se empleó el pintado cromosómico del cromosoma 11 para tener un conocimiento más profundo de los eventos clastogénicos producidos por el TOA. El pintado del cromosoma 11 reveló características de los mutantes no discernibles por el análisis de LOH, como son las reordenaciones cromosómicas, número de cromosomas, determinación de la longitud de las deleciones y la existencia de posibles mecanismos recombinacionales (**artículo 3**).

Los resultados obtenidos demuestran que el arsénico es un potente clastógeno que induce principalmente LOH (deleciones y/o recombinaciones), afectando a varios locus (además del *Tk*), confirmando el potencial clastogénico atribuido a los compuestos de arsénico. Pero, teniendo en cuenta la toxicidad inducida a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  (62% y 74,5%), es posible que parte del espectro mutacional caracterizado para el TOA esté asociado a la citotoxicidad. El TOA genera respuestas clínicas remarcables en pacientes con APL, causando diferenciación de las células tumorales a bajas concentraciones (0,1-0,5  $\mu\text{M}$ ) y desencadenando apoptosis a concentraciones relativamente altas (0,5-2  $\mu\text{M}$ ) (Dilda y Hogg, 2007). Por otro lado, estudios farmacocinéticos han revelado que los niveles de arsénico circulante alcanzan concentraciones de aproximadamente 0,8  $\mu\text{M}$  en sangre y 3,6  $\mu\text{M}$  en orina en personas con intoxicaciones crónicas por arsénico (Benbrahim-Tallaa y Waalkes, 2008). Por tanto, aunque la concentración empleada en este trabajo excede niveles fisiológicamente relevantes, no hemos de olvidar que 10  $\mu\text{M}$  es una concentración empleada actualmente en tratamientos contra tumores sólidos (Shen *et al.*, 2004; Dilda y Hogg, 2007). Además, nuestros resultados coinciden con el conjunto de publicaciones que describen la habilidad del TOA de inducir MN y CA en estudios *in vitro* (Basu *et al.*, 2001) e *in vivo* (Patlolla y Tchounwou, 2005), también empleando concentraciones elevadas de entre 25 y 100  $\mu\text{M}$ . Hay que señalar que en el ensayo de mutación génica en el locus *Tk*, realizado en nuestro grupo, pero empleando la línea celular linfoblastoide humana TK6, también se obtuvieron resultados significativos a la concentración de 2,5  $\mu\text{M}$  de TOA, generando una toxicidad del 63%, similar a la alcanzada a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  en la línea celular L5178Y. La línea celular TK6, a diferencia de la línea L5178Y, presenta el gen *TP53* funcional, lo que explicaría la mayor sensibilidad al TOA, logrando resultados significativos a una menor concentración pero con similares niveles de toxicidad (Moya, 2008). Además, es importante destacar que la TK6 es una línea celular

humana, cuya expresión de la enzima AS3MT y su capacidad metiladora ha sido caracterizada por M. Styblo de la University of North Carolina en Chapel Hill, USA (comunicación personal), revelando que no presenta capacidad metiladora, por lo que el efecto que observamos en el ensayo de mutación génica es consecuencia directa de TOA y no de sus metabolitos. Esta ausencia de metilación podría ser extrapolable a la línea de ratón L5178Y ya que presenta un comportamiento similar, aunque no existen datos al respecto.

Con tal de realizar una buena interpretación del espectro mutacional inducido por el arsénico, es importante conocer las características y el patrón de mutaciones presentes en los mutantes espontáneos de la línea celular L5178Y. En un trabajo de Honma y colaboradores (2001) se observó que la LOH de los mutantes espontáneos *Tk* de L5178Y era principalmente el resultado de deleciones, HR y NHEJ, con translocaciones y pérdidas enteras de cromosomas, en ocasiones acompañadas de duplicaciones del cromosoma 11. Por otro lado, no observaron conversión génica, aunque teniendo en cuenta que la conversión génica suele ocurrir en una longitud de ~500 bp puede que no fuese detectada (Benovoy y Drouin, 2008). Estos resultados concuerdan con los publicados con anterioridad por Liechty y colaboradores (1998) empleando esta misma línea celular. Por otro lado, Applegate y colaboradores (1990) también expusieron que algunas de las alteraciones sufridas por las células L5178Y podrían ser resultado de sucesos recombinacionales, debido al incremento de copias del alelo *Tka* (2-4 veces) en la mayoría de mutante *Tk*<sup>-/-</sup> que habían perdido el alelo *Tkb*, pudiéndose explicar por HR. Sin embargo, difieren de los obtenidos empleando la línea celular humana TK6, utilizada también en ensayos de mutación génica con el locus *TK*<sup>+/-</sup>, donde deleciones y HR son los principales mecanismos de generación de LOH, pero no la pérdida cromosómica (Honma *et al.*, 1997a, 1997b). Posiblemente la condición *Trp53* mutante de la línea celular L5178Y *Tk*<sup>+/-</sup> sea la responsable de estas diferencias (Storer *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 1998).

El gen *TP53* se encuentra frecuentemente mutado en tumores humanos, y su pérdida o inactivación compromete la integridad genómica. La proteína TP53 salvaje regula el control del ciclo celular y media la apoptosis. En respuesta al DNA dañado, la célula queda bloqueada transitoriamente en G1, presumiblemente facilitando la reparación del DNA o la muerte celular de forma dependiente de TP53. La inactivación

de este gen conlleva inestabilidad cromosómica, induciendo amplificación génica, así como alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas (Vogelstein *et al.*, 2000; Meek, 2004). Se ha descrito que la línea L5178Y presenta una respuesta tardía a la apoptosis, probablemente debido a la perturbación de las funciones normales de *Trp53* en respuesta al daño en el DNA en la regulación de la apoptosis (Storer *et al.*, 1997). En células con *Trp53* funcional la inducción de apoptosis en células con daño en el DNA, o el bloqueo del ciclo celular seguido de reparación, reduce el número de mutaciones que pasan a la generación siguiente. En cambio, el fracaso de las células L5178Y a la hora de sufrir apoptosis o bloqueo del ciclo, genera una mayor supervivencia celular y aumenta la frecuencia de mutaciones cromosómicas, como consecuencia de las roturas de DNA no reparadas.

Así, en otro trabajo realizado por Honma y colaboradores (1997a) estos compararon la MF y el espectro mutacional del locus *TK* de la línea celular TK6 (línea linfoblastoide humana con TP53 funcional) y la línea WTK-1 (línea TK6 con TP53 deficiente), y de esta manera evaluaron el efecto de *TP53* en el espectro mutacional, empleando la misma línea celular. Observaron que la línea WTK-1 presentaba una frecuencia de mutación 30 veces superior ( $101,1 \pm 6,8 \times 10^{-6}$ ) a la línea TK6 ( $3,3 \pm 1,1 \times 10^{-6}$ ) como resultado de su fenotipo mutador conferido por su deficiencia en TP53. Estos mismos autores también observaron que las líneas WTK-1 y L5178Y ( $50-200 \times 10^{-6}$ ) presentaban un fenotipo mutador prácticamente idéntico (Honma *et al.*, 1997a, 2001; Storer *et al.*, 1997). Esta diferencia en la MF es similar a la que observamos en los resultados obtenidos en nuestro laboratorio con TK6 (Moya, 2008) y L5178Y (**artículo 1**). Esta comparación entre líneas, apoyaría la propuesta de que las diferencias observadas en el espectro de mutación entre ambas líneas celulares sería básicamente consecuencia de la condición mutante de *TP53* y, por este motivo, estudios realizados con TK6 son también de utilidad para la comprensión de los mecanismos de acción y reparación que suceden en la línea celular L5178Y.

En las células de mamífero, las roturas de doble cadena del DNA (DSB), tanto espontáneas como inducidas, se reparan a través de dos mecanismos: la recombinación homóloga (HR), también conocida como libre de errores, o la unión de extremos no homólogos (NHEJ), o propensa a error. Se considera que en mamíferos el principal sistema de reparación de DSB es el de NHEJ, a pesar de que la HR es más importante

para el mantenimiento de la integridad genómica porque no produce o produce pocas pérdidas de la secuencia informativa del DNA y, en general, cuando ocurre es principalmente a través de la recombinación sin entrecruzamiento o conversión génica (Jackson, 2002; Stark y Jasin, 2003; Sonoda *et al.*, 2006; Shrivastav *et al.*, 2008). NHEJ puede ocurrir durante la fase G1 o S/G2 del ciclo celular reparando DSB, mientras que HR es post-replicacional y ocurre durante la fase S/G2, reparando roturas simples o de doble cadena (Rothkamm *et al.*, 2003). En una situación ideal, la reparación de DSB del genoma de mamíferos debería ocurrir de manera que minimizase la inducción de grandes cambios genéticos; sin embargo, la mayoría de las DSB se reparan mediante NHEJ en células de mamíferos, con mayor tendencia a error. Existe un trabajo realizado con TK6 donde, para clarificar la contribución de cada uno de estos dos sistemas de reparación de las DSB, se diseñó un sistema para averiguar el destino de las DSB reparadas, generadas en el locus *TK* a través de la mutagénesis dirigida, introduciendo una diana para la endonucleasa *I-Sce* en su secuencia. Empleando este sistema, observaron que prácticamente todas las DSB generadas se reparaban mediante NHEJ, mecanismo 270 veces más frecuente que el de HR. Así, la HR raramente contribuía a la reparación y cuando lo hacía era por conversión génica (Honma *et al.*, 2003). En otro trabajo realizado por los mismos autores, donde la mutagénesis era no dirigida, analizaron mutantes espontáneos TK6 *TK*<sup>-/-</sup>. Esta vez valoraron el número de copias del alelo *TK* no funcional por análisis densimétrico, para así clasificar a los mutantes en función de si presentaban una copia del alelo no funcional *TK* (definidos como hemigotos, hemi-LOH), o dos copias iguales del alelo (homo-LOH), y de esta manera determinar el origen de la LOH (Li *et al.*, 1992; Honma *et al.*, 2000). En este estudio, observaron que el 83% de los mutantes espontáneos *TK* se producían por LOH, de los cuales el 63% eran homo-LOH (reparación por HR con entrecruzamiento), el 20% por hemi-LOH (deleciones o NHEJ) y el restante 17% eran mutaciones no debidas a LOH sino a mutaciones puntuales o intragénicas (Honma *et al.*, 2000). La explicación que ofrecen estos investigadores ante esta discrepancia es que hay una fuerte tendencia en los ensayos de mutación génica con genes recesivos, a recuperar mutantes con HR por entrecruzamiento. Cuando las DSB se generan fuera del gen *TK*, los mutantes originados por la reparación de HR con entrecruzamiento y/o pérdida terminal por deleción, se pueden recuperar como un mutante, ya que pierde el alelo *TK* funcional. En cambio, las DSB que no afectan directamente al gen *TK* reparadas mediante NHEJ o HR sin entrecruzamiento, no se podrán detectar ya que no generarán mutantes *TK*, y de



esta manera hay una sobreestima del mecanismo de reparación HR por entrecruzamiento. De hecho, prácticamente todos los mutantes espontáneos homo-LOH en TK6 tienen LOH superiores a 5 cM, desde cerca del locus *TK* hasta el final del cromosoma, indicando que la mayoría de las DSB que ocurren fuera del gen *TK* se recuperaron por HR con entrecruzamiento. Por lo tanto, el espectro mutacional detectado no necesariamente se corresponde con el mecanismo de mutación implicado, ya que existe una sobreestima de la reparación por HR (Honma, 2005).

Otro fenómeno frecuente en los mutantes espontáneos de la línea L5178Y es la génesis de duplicaciones del cromosoma 11a (con el alelo *Tka* mutante) a través de un mecanismo que no está directamente asociado a la mutación primaria en el gen *Tk*. Parece ser, que esta duplicación ocurre en compensación a la pérdida de un cromosoma 11 o a parte de éste. De hecho, es difícil encontrar mutantes monosómicos para el cromosoma 11; así, en nuestro trabajo no hemos encontrado ningún caso, aunque otros autores sí lo han hecho pero en baja proporción (Honma *et al.*, 2001). La generación de otro cromosoma 11a a través del mecanismo de no disyunción, está presente en la mayoría de la población celular, probablemente debido a que debe proporcionar una ventaja en el crecimiento o generar células no viables sin dos cromosomas 11 (Liechty *et al.*, 1998). Los mutantes *Tk* con deleciones y/o translocaciones desequilibradas en ocasiones se acompañan de la duplicación del cromosoma 11, dando como resultado una trisomía parcial, posiblemente para compensar la dosis génica (Honma *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta los resultados de estos trabajos y las características intrínsecas de la línea celular L5178Y de generar un patrón de mutaciones espontáneas, estos coinciden con los mutantes espontáneos analizados en nuestro trabajo (**artículos 2 y 3**). Teniendo este patrón base claro, podemos observar que los mutantes obtenidos tras el tratamiento con TOA muestran un espectro mutacional distinto que el analizado en los espontáneos.

El análisis de las colonias LC y SC, tanto de mutantes espontáneos como inducidos, muestra que la principal causa del fenotipo mutante *Tk*<sup>-/-</sup> es la LOH del locus *Tk* y de otros marcadores genéticos, lo que indica la génesis de deleciones, recombinaciones multilocus y pérdidas del cromosoma estudiado. En el caso de los clones espontáneos estos mutantes representan un 75,5% del total analizado, mientras que en los tratados con TOA son un 87,8%. En el caso de los mutantes espontáneos, el 50% de las LC son

consecuencia de mutaciones puntuales presentes en el cDNA del gen *Tk*, mientras que en el caso de los mutantes inducidos por TOA éstos sólo representan el 24%. Respecto a las SC ningún mutante presentó mutaciones puntuales. De esta manera, se observa que, a pesar de que las LC están asociadas a mutaciones génicas, éstas también se producen como resultado de sucesos cromosómicos tales como deleciones y pérdidas cromosómicas (Clark *et al.*, 1998, 2004; Liechty *et al.*, 1998). Por el contrario, nuestros resultados ponen de manifiesto una buena correlación entre las SC y las mutaciones cromosómicas, ya que los datos obtenidos a partir del análisis de la LOH demuestran que el 77,6% de los mutantes inducidos por TOA presentan LOH en dos o más de los marcadores analizados, pudiéndose adjudicar la inducción de LOH a deleciones o a eventos recombinogénicos.

Se ha sugerido que los compuestos de arsénico tanto pentavalentes como trivalentes, y tanto orgánicos como inorgánicos, así como sus metabolitos, no reaccionan directamente con el DNA. Por consiguiente, cualquier daño que ocurra en el DNA como consecuencia de una exposición a un compuesto de arsénico, sucedería de forma indirecta (Nesnow *et al.*, 2002). Agentes que no inducen daño directo en el DNA pueden, sin embargo, ser clastogénicos por alterar otros procesos celulares, y este tipo de clastogenicidad suele estar asociada con la citotoxicidad (Greenwood *et al.*, 2004). Para esclarecer las bases moleculares de estas manifestaciones de la toxicidad del arsénico se han llevado a cabo exhaustivos estudios con diferentes cultivos celulares, tanto animales como humanos, demostrándose que este metaloide causa estrés oxidativo a través de la generación de ROS (Kitchin y Ahmad, 2003; Lantz y Hays, 2006; Kumagai y Sumi, 2007; Ruiz-Ramos *et al.*, 2008). La producción de ROS genera estrés oxidativo dentro de la célula, el cual se ha propuesto como un posible modo de acción de la toxicidad y carcinogenicidad del arsénico. Se han realizado diversos estudios *in vitro* e *in vivo* donde se demuestra que los efectos genotóxicos y citotóxicos generados por distintos compuestos de arsénico son contrarrestados al realizar cotratamientos con agentes antioxidantes, captadores de radicales libres y enzimas antioxidantes (Basu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2004; Tapio y Grosche, 2006). Así, se ha visto que el arsenito incrementa la formación de MN de forma dosis dependiente, y que su incidencia se reduce al emplear catalasa exógena (Wang y Huang, 1994); de manera similar se ha demostrado que el uso de enzimas antioxidantes, como la superóxido

dismutasa (SOD), disminuye la incidencia de SCE en cultivos de linfocitos humanos tras exposiciones con arsenito (Nordenson y Beckman, 1991).

Las ROS son capaces de generar un amplio espectro de daño en el DNA, incluyendo alteración de las bases nitrogenadas y roturas de cadena simple. De forma alternativa, también pueden oxidar lípidos y proteínas, y de esta manera generar intermediarios que reaccionen con el DNA formando aductos. Una de las vías más estudiadas a través de las cuales las ROS generan daño en el DNA es atacando la posición C-8 de la 2-deoxiguanina, formando 8-OHdG (8 oxoguanina o 7,8-dihidro-8-oxoguanina), que es el marcador de daño oxidativo en el DNA más utilizado. Así, la base oxidada guanina tras la replicación da lugar a transversiones G→T, ocurriendo la mutación G:C→T:A (Marnett, 2000). Éste es sólo un ejemplo de un tipo de lesión inducida por ROS sobre las bases nitrogenadas existiendo muchas otras, y siendo las lesiones más comunes dependientes del estrés oxidativo las transiciones C→T (40-60%), las transversiones G→T (20-40%) y las deleciones (Moraes *et al.*, 1990; Schaaper y Dunn, 1991; Tkeshelashvili *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2002). Sin embargo, tanto en los mutantes LC inducidos por TOA como en los mutantes espontáneos, el principal tipo de mutación puntual observado han sido transiciones A:T→G:C, sugiriendo que el papel del daño oxidativo inducido por los compuestos de arsénico actuaría a través de mutaciones cromosómicas en lugar de puntuales. Además, tanto los 6 mutantes espontáneos como los 6 mutantes obtenidos tras el tratamiento con TOA con mutaciones puntuales, mostraron cromosomas 11 normales al ser analizados por FISH (**artículo 3**).

De nuestros resultados se observa que en los mutantes espontáneos la pérdida de un cromosoma 11 es un fenómeno relativamente frecuente, en función de los resultados obtenidos a partir del análisis de LOH (12/49 de los mutantes, el 24,5%), lo que se confirmó posteriormente empleando FISH. Además, como otros autores ya habían descrito previamente, se pudo apreciar que la pérdida del cromosoma 11b va acompañada de la duplicación de un cromosoma 11a, lo que se puede determinar por el heteromorfismo del centrómero (Liechty *et al.*, 1998; Honma *et al.*, 2001). Otra curiosidad observada, es la presencia de isocromosomas 11 en tres mutantes espontáneos, dos con LOH completa (10CL y 16CS) y en otro con LOH hasta el microsatélite *DIIMit36* (24CS), fenómeno ya descrito por otros autores (Liechty *et al.*,

1998), que posiblemente es el resultado de un acontecimiento independiente y secundario a la mutación del gen *Tk*, debido a la inestabilidad cromosómica otorgada por su deficiencia en *Trp53*. Por otro lado, se ha descrito en la literatura la capacidad del arsénico de inducir aneuploidías (Vega *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1996; Eguchi *et al.*, 1997; Ramírez *et al.*, 1997; Yih y Lee, 1999; Ramírez *et al.*, 2007), pero nuestros resultados no muestran que la concentración de 10  $\mu$ M en el ensayo del MLA incremente la pérdida cromosómica en los mutantes inducidos por TOA, en comparación con lo que se observa en los mutantes espontáneos, ya que sólo representan el 10,2% de los mutantes inducidos por TOA (5/49 de los mutantes), en comparación con el 24,5% observado en mutantes espontáneos.

Como se ha comentado previamente, los mutantes *Tk* con deleciones y/o translocaciones desequilibradas en ocasiones se acompañan de la duplicación del cromosoma 11, dando como resultado una trisomía parcial, como es el caso de los mutantes inducidos, 19S, 25S y 4L, o trisomía total como el mutante 18CS. Así, en nuestro caso, las duplicaciones del cromosoma 11 van acompañadas de deleciones y de pérdidas del cromosoma 11b, ya sea total o parcialmente.

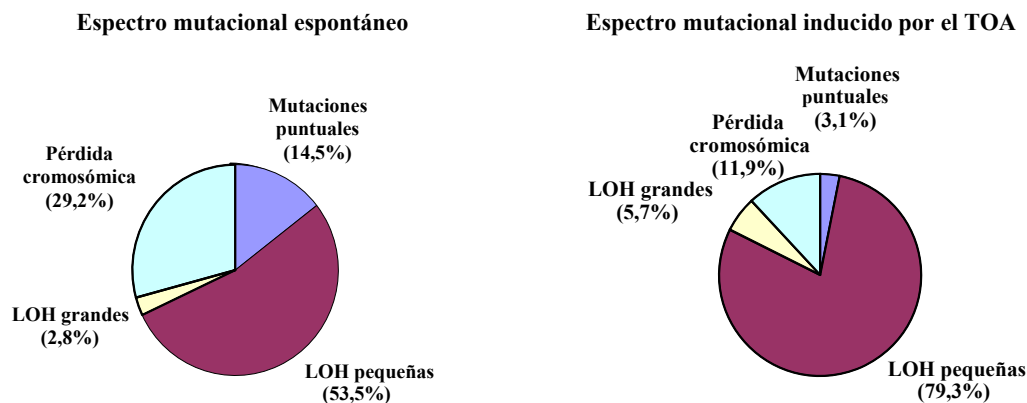
Para determinar la extensión de las LOH en los mutantes, éstos se analizaron empleando loci heterocigotos de microsatélites abarcando todo el cromosoma 11 y posteriormente analizados también por FISH. Un total de 63 mutantes, 25 espontáneos (51%) y 38 inducidos por TOA (77,6%), se clasificaron como producidos por deleciones (**artículo 2**). De éstos, 19 mutantes, 5 espontáneos (3 SC y 2 LC) y 14 inducidos (8 SC y 6 LC) se analizaron también por FISH, para valorar a nivel citogenético las LOH sufridas. Debido a las limitaciones de la técnica, las pequeñas deleciones, menores de unos 16 cM, son indetectables por análisis citogenético (Liechty *et al.*, 1998). De esta manera, el análisis de los mutantes con LOH por FISH reveló que de los 6 mutantes con grandes LOH (8L, 19L, 4L, 22L, 24SC y 25S), sólo 2 (4L y 25S) eran producto de deleciones, el resto presentaban cromosomas 11 de longitud aparentemente normal. Estos mutantes pueden ser resultado de HR con entrecruzamiento o deleciones de una región seguidas de duplicaciones. Sin embargo, la gran mayoría de mutantes analizados para LOH, 19/49 ó el 38,8% de mutantes espontáneos y 28/49 ó el 57,2% de mutantes inducidos con TOA, y por FISH, presentan una LOH que afecta únicamente a dos marcadores, *Tk1* y *D11Mit48*. Debido a que la

resolución de la técnica de FISH no nos permitía determinar visualmente la delección de estos fragmentos no se pudo determinar si eran consecuencia de delecciones o posibles sucesos recombinogénicos. Sin embargo, se observaron longitudes anómalas del cromosoma 11b en algunos de estos mutantes, generalmente en los inducidos con TOA (4 de los 9 analizados, 14L, 3S, 4S y 9S) y uno de los mutantes espontáneos (4SC), hecho no observable en los mutantes analizados por FISH con mutaciones puntuales, lo que podría indicarnos que podría haber ocurrido HR. Por otra parte, esta longitud anormal también podría deberse a un efecto óptico o a un distinto grado de condensación de los cromosomas.

En general, si tenemos en cuenta que el 87% de las colonias mutantes generadas por TOA son SC, siendo las mutaciones presentes en este tipo de colonias más representativas del efecto inducido por este compuesto arsenical, obtenemos unos valores que indican que únicamente el 3,1% de los mutantes son resultado de mutaciones puntuales, mientras que el 79,3% de los mutantes presentan LOH que afecta a los marcadores *Tk1* y *Tk1-D11Mit48*, el 5,7% presentan LOH de mayor tamaño y el 11,9% de los mutantes son el resultado de pérdida cromosómica, por lo que las mutaciones debidas a LOH representarían el 85% de los mutantes. Al comparar este patrón con el espontáneo, observamos que entre los mutantes espontáneos el 14,5% pertenecen a mutaciones puntuales, el 53,5% a LOH que cubre los marcadores *Tk1* y *Tk1- D11Mit48*, el 2,8% a LOH de mayor tamaño y el 29,2% de los mutantes son resultado de pérdida cromosómica, siendo un 56,3% de las mutaciones debidas a LOH, a diferencia del 85% de TOA (Figura 11). Estos resultados nos indican que el patrón de mutaciones inducido por el arsénico es distinto al observado entre los mutantes de origen espontáneo, generando el arsénico delecciones y/o recombinaciones en la parte terminal del cromosoma 11.

A pesar de que el arsénico es un reconocido agente clastogénico y aneugénico, su papel en la iniciación del proceso carcinogénico continúa siendo un misterio. Su poca efectividad en la inducción de mutaciones puntuales hace que la carcinogenicidad del arsénico en humanos se asocie a alteraciones de tipo cromosómico, o bien, a cambios en la expresión génica y a otros efectos epigenéticos (Noda *et al.*, 2002; Tapio y Grosche, 2006). La visión general de que la carcinogénesis ocurre principalmente debido a la interacción directa del genotóxico con el DNA parece ser simple, y empieza a no

encajar para muchos compuestos carcinogénicos como el arsénico. Así, en ausencia de mutagenicidad, el riesgo se valoraría en función de mecanismos indirectos de genotoxicidad (Klein *et al.*, 2007).



**Figura 11:** Representación gráfica del espectro mutacional de los mutantes espontáneos y de los inducidos con TOA. LOH pequeñas incluye aquellos mutantes con LOH que afecta a los marcadores *Tkl* y *Tkl-D11Mit48*, mientras que LOH grandes son de mayor tamaño.

Se ha observado experimentalmente que el comportamiento del TOA, al igual que otros compuestos de arsénico, presenta diferentes modos de acción dependiendo de su concentración. La clastogenicidad se había propuesto como un buen candidato para el mecanismo de acción empleado por los compuestos de arsénico en la inducción de cáncer. Numerosos estudios avalan que los niveles de CA aumentan en los linfocitos de las personas expuestas a arsénico a través del agua de bebida (Mahata *et al.*, 2003, 2004; Ghosh *et al.*, 2007); sin embargo, el arsenito y los metabolitos trivalentes únicamente generan clastogenicidad a concentraciones asociadas con altos niveles de citotoxicidad, generando grandes dudas sobre si este mecanismo de acción es el responsable de la carcinogénesis (Oya-Ohta *et al.*, 1996; Kligerman *et al.*, 2003), por lo que la clastogenicidad en condiciones de excesiva toxicidad puede que no sea un mecanismo de acción realista de carcinogénesis (Klein *et al.*, 2007). Por el contrario este mecanismo si que resulta útil en los tratamientos contra el cáncer, donde en APL a altas concentraciones (1-2  $\mu\text{M}$ ) el TOA induce apoptosis, inhibe el crecimiento celular (parada en fase G1), induce la pérdida de la proteína quimérica PML-RAR $\alpha$  (Shao *et al.*, 1998), e inducen ROS que finalmente acaban generando deleciones cromosómicas multilocus (Hei *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001).

Como la mayoría de compuestos de arsénico, el TOA presenta la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno capaces de inducir daño en el DNA. Además,

presenta la habilidad de inducir apoptosis a través de múltiples mecanismos como las ROS, actuando directamente sobre las mitocondrias, destruyendo el potencial de su membrana interna e inhibiendo la actividad telomerasa, entre otros efectos (Miller *et al.*, 2002). De esta manera, y apoyándonos en las evidencias experimentales presentes en la literatura, podemos considerar que el principal mecanismo de acción implicado en la clastogenicidad del TOA sería la inducción de clastogenicidad a través de la inducción de estrés oxidativo. Además, podríamos añadir que a pesar de haber realizado únicamente el análisis del espectro mutacional del TOA, éste podría ser extrapolable al resto de compuestos de arsénico (AS, MMA<sup>V</sup> y DMA<sup>V</sup>) quienes muestran un perfil de inducción de mutantes caracterizado por la generación de colonias pequeñas, similares al obtenido en los tratamientos con TOA. Por supuesto, puede que no todos los compuestos de arsénico se comporten igual y puedan emplear distintos mecanismos de acción, aunque aquellos cuyos resultados ofrecen respuestas significativas asociadas a una elevada toxicidad, podrían reflejar un espectro mutacional semejante al del TOA, consecuencia del estrés oxidativo.

Por lo tanto, teniendo en cuenta nuestros resultados *in vitro* y los encontrados en la literatura relativos a estudios con animales (Li *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Verma *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008) y pruebas clínicas en humanos (Shen *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1998; Westervelt *et al.*, 2001; Evens *et al.*, 2004; IARC, 2004; Dilda y Hogg, 2007), hay evidencias suficientes que demuestran que concentraciones elevadas de arsénico no son alcanzables sin severos efectos tóxicos, a pesar de su eficiencia terapéutica en el tratamiento de la APL. Así, su aplicación en el tratamiento del cáncer iría asociada a la inducción de graves efectos secundarios, aunque el metabolismo y factores moduladores de la toxicidad del arsénico pueden reducirlos. De esta manera, también la variabilidad de respuesta interindividual e interespecie, como consecuencia de polimorfismos genéticos y otros factores moduladores de la toxicidad (la edad, el BMI y la dieta, entre otros), parecen modular la variabilidad de respuesta frente a estas exposiciones en los pacientes. En este contexto, habría que señalar que prácticamente todos los compuestos que se utilizan en terapia antitumoral tienen graves efectos secundarios, fundamentalmente del tipo genotóxico, pero frente a estas patologías tan graves el binomio riesgo-beneficio ha de tenerse siempre en cuenta, mientras no existan tratamientos más prometedores. En este sentido, los avances en este campo han conseguido mejorar las monoterapias con TOA, y su aplicación conjunta con

otros compuestos quimioterápicos (p.ej. ATRA, ácido ascórbico y genisteína) y compuestos antioxidantes con capacidad protectora (p.ej. resveratrol) pueden potenciar el efecto terapéutico del TOA, a la vez que reducen sus efectos tóxicos. Esto representa una mayor esperanza para un número considerable de pacientes, siendo un tratamiento más seguro y con menos efectos adversos (Qazilbash *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2008; Tallman, 2008; Zhao *et al.*, 2008).





## 6. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos propuestos y el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La versión multipocillo del MLA, puesta a punto en nuestro laboratorio, ofrece resultados similares a los publicados en la literatura especializada. Así, todos los experimentos efectuados cumplen con los criterios de aceptación para considerar válidos sus resultados. Por lo tanto, la validación de su funcionamiento se ha llevado a cabo con éxito, confirmándose la bondad del protocolo utilizado.
2. Cuatro de los seis compuestos de arsénico evaluados mediante el ensayo de linfoma de ratón han producido efectos genotóxicos: el arsenito sódico, el trióxido de arsénico, el MMA<sup>V</sup> y el DMA<sup>V</sup>. El incremento de las colonias pequeñas respecto a las grandes indica que el efecto generado por estos cuatro compuestos es de origen cromosómico, lo que confirmaría su acción clastogénica. Sin embargo, aplicando los nuevos criterios de aceptación del ensayo MLA, el MMA<sup>V</sup> y el DMA<sup>V</sup> deberían ser considerados como genotóxicos débiles.
3. Los resultados obtenidos permiten confirmar que los compuestos inorgánicos de arsénico son más genotóxicos que los orgánicos pentavalentes ensayados. La escala del potencial mutagénico de estos compuestos se puede establecer tal como sigue: TOA > AS > MMA<sup>V</sup> > DMA<sup>V</sup>.
4. Por el contrario, los compuestos orgánicos pentavalentes de arsénico, arsenobetaína y cloruro de tetrafenilarsonio, han resultado claramente negativos en el ensayo MLA.
5. El análisis del espectro mutacional obtenido tras los tratamientos con la concentración de 10 µM del TOA indica que el principal tipo de cambio presente en estos mutantes es la LOH, consecuencia de la clastogenicidad del TOA. Los estudios de FISH revelan que el origen de estos mutantes se debe, fundamentalmente, a deleciones o recombinaciones.
6. El TOA a la concentración evaluada no presenta actividad aneugénica.

7. El análisis de las colonias espontáneas indica que las LC son consecuencia tanto de mutaciones puntuales como de mutaciones cromosómicas y que las SC se deben a mutaciones cromosómicas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicology profile for arsenic (data for public comment). Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA; U.S (2005).
- Antman, K.H. Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy. *Oncologist* 6: 1-2 (2001).
- Aposhian, H.V. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 397-419 (1997).
- Aposhian, H.V. and Aposhian, M.M. Arsenic toxicology: five questions. *Chem Res Toxicol* 19: 1-15 (2006).
- Aposhian, H.V., Zakharyan, R.A., Avram, M.D., Kopplin, M.J. and Wollenberg, M.L. Oxidation and detoxification of trivalent arsenic species. *Toxicol Appl Pharmacol* 193: 1-8 (2003).
- Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., Juhn, G., Kasweck, K.L., Lin, P.F., Wadhams, A. and Hozier, J.C. Molecular dissection of mutations at the heterozygous thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 51-55 (1990).
- Basu, A., Mahata, J., Gupta, S. and Giri, A.K. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat Res* 488: 171-194 (2001).
- Basu, A., Mahata, J., Roy, A.K., Sarkar, J.N., Poddar, G., Nandy, A.K., Sarkar, P.K., Dutta, P.K., Banerjee, A., Das, M., Ray, K., Roychaudhury, S., Natarajan, A.T., Nilsson, R. and Giri, A.K. Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat Res* 516: 29-40 (2002).
- Bau, D.T., Wang, T.S., Chung, C.H., Wang, A.S., Wang, A.S. and Jan, K.Y. Oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-links are the major DNA lesions induced by arsenite. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 5: 753-756 (2002).
- Benbrahim-Tallaa, L. and Waalkes, M.P. Inorganic arsenic and human prostate cancer. *Environ Health Perspect* 116: 158-164 (2008).
- Benovoy, D. and Drouin, G. Ectopic gene conversions in the human genome. *Genomics* (2008).

- Blazak, W.F., Los, F.J., Rudd, C.J. and Caspary, W.J. Chromosome analysis of small and large L5178Y mouse lymphoma cell colonies: comparison of trifluorothymidine-resistant and unselected cell colonies from mutagen-treated and control cultures. *Mutat Res* 224: 197-208 (1989).
- Bradley, M.O., Bhuyan, B., Francis, M.C., Langenbach, R., Peterson, A. and Huberman, E. Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res* 87: 81-142 (1981).
- Brima, E.I., Haris, P.I., Jenkins, R.O., Polya, D.A., Gault, A.G. and Harrington, C.F. Understanding arsenic metabolism through a comparative study of arsenic levels in the urine, hair and fingernails of healthy volunteers from three unexposed ethnic groups in the United Kingdom. *Toxicol Appl Pharmacol* 216: 122-130 (2006).
- Calabrese, E.J. and Baldwin, L.A. Inorganics and hormesis. *Crit Rev Toxicol* 33: 215-304 (2003).
- Challenger, F. Biological methylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 12: 429-491 (1951).
- Chen, T., Harrington-Brock, K. and Moore, M.M. Mutant frequency and mutational spectra in the *Tk* and *Hprt* genes of N-ethyl-N-nitrosourea-treated mouse lymphoma cells. *Environ Mol Mutagen* 39: 296-305 (2002).
- Chou, W.C., Hawkins, A.L., Barrett, J.F., Griffin, C.A. and Dang, C.V. Arsenic inhibition of telomerase transcription leads to genetic instability. *J Clin Invest* 108: 1541-1547 (2001).
- Clark, L.S., Hart, D.W., Vojta, P.J., Harrington-Brock, K., Barrett, J.C., Moore, M.M. and Tindall, K.R. Identification and chromosomal assignment of two heterozygous mutations in the *Trp53* gene in L5178Y/*Tk*(+/-)-3.7.2C mouse lymphoma cells. *Mutagenesis* 13: 427-434 (1998).
- Clark, L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. Loss of P53 heterozygosity is not responsible for the small colony thymidine kinase mutant phenotype in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutagenesis* 19: 263-268 (2004).
- Clements, J. Gene mutation assays in mammalian cells. *Methods Mol Biol* 43: 277-286 (1995).
- Clements, J. The mouse lymphoma assay. *Mutat Res* 455: 97-110 (2000).

- Clive, D. Mammalian cell mutation assays. Environmental Mutagenesis. Phillips, D.H. and Venitt, S. Ed. BIOS Scientific Publishers. Oxford, UK (1995).
- Clive, D., Flamm, W.G., Machesko, M.R. and Bernheim, N.J. A mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Mutat Res* 16: 77-87 (1972).
- Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F., Batson, A.G. and Brown, M.M. Validation and characterization of the L5178Y/*Tk*<sup>+/-</sup> mouse lymphoma mutagen assay system. *Mutat Res* 59: 61-108 (1979).
- Clive, D., Caspary, W., Kirby, P.E., Krehl, R., Moore, M., Mayo, J. and Oberly, T.J. Guide for performing the mouse lymphoma assay for mammalian cell mutagenicity. *Mutat Res* 189: 143-156 (1987).
- Clive, D., Glover, P., Applegate, M. and Hozier, J. Molecular aspects of chemical mutagenesis in L5178Y/*Tk*<sup>+/-</sup> mouse lymphoma cells. *Mutagenesis* 5: 191-197 (1990).
- Clive, D., Bolcsfoldi, G., Clements, J., Cole, J., Homna, M., Majeska, J., Moore, M., Muller, L., Myhr, B. and Oberly, T. Consensus agreement regarding protocol issues discussed during the mouse lymphoma workshop: Portland, Oregon, May 7, 1994. *Environ Mol Mutagen* 25: 165-168 (1995).
- Cohen, S.M., Arnold, L.L., Eldan, M., Lewis, A.S. and Beck, B.D. Methylated arsenicals: the implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 36: 99-133 (2006).
- Cohen, S.M., Ohnishi, T., Arnold, L.L. and Le, X.C. Arsenic-induced bladder cancer in an animal model. *Toxicol Appl Pharmacol* 222: 258-263 (2007).
- Cole, J., Arlett, C.F., Green, M.H., Lowe, J. and Muriel, W. A comparison of the agar cloning and microtitration techniques for assaying cell survival and mutation frequency in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat Res* 111: 371-386 (1983).
- Cole, J., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. The mutagenicity of sodium fluoride to L5178Y [wild-type and *Tk*<sup>+/-</sup> (3.7.2c)] mouse lymphoma cells. *Mutagenesis* 1: 157-167 (1986).
- Cole, J., Harrington-Brock, K. and Moore, M.M. The mouse lymphoma assay in the wake of ICH4--where are we now? *Mutagenesis* 14: 265-270 (1999).
- Cullen, W.R. and Reimer, K.J. Arsenic speciation in the environment. *Chem Rev* 89: 713-764 (1989).

- De la Rosa, M.E., Magnusson, J., Ramel, C. and Nilsson, R. Modulating influence of inorganic arsenic on the recombinogenic and mutagenic action of ionizing radiation and alkylating agents in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 318: 65-71 (1994).
- Deknudt, G., Leonard, A., Arany, J., Jenar-Du Buisson, G. and Delavignette, E. In vivo studies in male mice on the mutagenic effects of inorganic arsenic. *Mutagenesis* 1: 33-34 (1986).
- Del Razo, L.M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderon-Aranda, E.S., Manno, M. and Albores, A. Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 177: 132-148 (2001).
- Dilda, P.J. and Hogg, P.J. Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat Rev* 33: 542-564 (2007).
- Dopp, E., Hartmann, L.M., Florea, A.M., von Recklinghausen, U., Pieper, R., Shokouhi, B., Rettenmeier, A.W., Hirner, A.V. and Obe, G. Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 201: 156-165 (2004).
- Dopp, E., Hartmann, L.M., von Recklinghausen, U., Florea, A.M., Rabieh, S., Zimmermann, U., Shokouhi, B., Yadav, S., Hirner, A.V. and Rettenmeier, A.W. Forced uptake of trivalent and pentavalent methylated and inorganic arsenic and its cyto-/genotoxicity in fibroblasts and hepatoma cells. *Toxicol Sci* 87: 46-56 (2005).
- Duker, A.A., Carranza, E.J. and Hale, M. Arsenic geochemistry and health. *Environ Int* 31: 631-641 (2005).
- Dulout, F.N., Grillo, C.A., Seoane, A.I., Maderna, C.R., Nilsson, R., Vahter, M., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water. *Mutat Res* 370: 151-158 (1996).
- Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ Mol Mutagen* 13: 34-43 (1989).
- Eguchi, N., Kuroda, K. and Endo, G. Metabolites of arsenic induced tetraploids and mitotic arrest in cultured cells. *Arch Environ Contam Toxicol* 32: 141-145 (1997).
- Evens, A.M., Tallman, M.S. and Gartenhaus, R.B. The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present, and future. *Leuk Res* 28: 891-900 (2004).

- Fischer, G.A. Studies of the culture of leukemic cells in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 76: 673-680 (1958).
- Francesconi, K.A., Tanggaar, R., McKenzie, C.J. and Goessler, W. Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar. *Clin Chem* 48: 92-101 (2002).
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A. and Ellenberg, T. *DNA Repair and Mutagenesis*. 2<sup>o</sup> Edition. Ed. ASM Press Washington D.C., USA (2006).
- Ghosh, P., Banerjee, M., De Chaudhuri, S., Das, J.K., Sarma, N., Basu, A. and Giri, A.K. Increased chromosome aberration frequencies in the Bowen's patients compared to non-cancerous skin lesions individuals exposed to arsenic. *Mutat Res* 632: 104-110 (2007).
- Goering, P.L., Aposhian, H.V., Mass, M.J., Cebrian, M., Beck, B.D. and Waalkes, M.P. The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. *Toxicol Sci* 49: 5-14 (1999).
- Graeme, K.A. and Pollack, C.V., Jr. Heavy metal toxicity, Part I: arsenic and mercury. *J Emerg Med* 16: 45-56 (1998).
- Greenwood, S.K., Hill, R.B., Sun, J.T., Armstrong, M.J., Johnson, T.E., Gara, J.P. and Galloway, S.M. Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the in vitro assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results. *Environ Mol Mutagen* 43: 36-44 (2004).
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C. and Carrol, S.B. *Genética*. 9<sup>o</sup> Edición. Ed. McGraw-Hill/Internacional de España, S.A.U. Madrid, Spain (2008).
- Gudas, J.M., Fridovich-Keil, J.L., Datta, M.W., Bryan, J. and Pardee, A.B. Characterization of the murine thymidine kinase-encoding gene and analysis of transcription start point heterogeneity. *Gene* 118: 205-216 (1992).
- Guillamet, E., Creus, A., Ponti, J., Sabbioni, E., Fortaner, S. and Marcos, R. In vitro DNA damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 19: 129-135 (2004).
- Hartmann, A. and Speit, G. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cells gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environ Mol Mutagen* 23: 299-305 (1994).
- Hartwig, A., Groblinghoff, U.D., Beyersmann, D., Natarajan, A.T., Filon, R. and Mullenders, L.H. Interaction of arsenic(III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis* 18: 399-405 (1997).



- Hartwig, A., Asmuss, M., Ehleben, I., Herzer, U., Kostelac, D., Pelzer, A., Schwerdtle, T. and Burkle, A. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 5: 797-799 (2002).
- Hartwig, A., Blessing, H., Schwerdtle, T. and Walter, I. Modulation of DNA repair processes by arsenic and selenium compounds. *Toxicology* 193: 161-169 (2003).
- Hayakawa, T., Kobayashi, Y., Cui, X. and Hirano, S. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch Toxicol* 79: 183-191 (2005).
- Hei, T.K. and Filipic, M. Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radic Biol Med* 37: 574-581 (2004).
- Hei, T.K., Liu, S.X. and Waldren, C. Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: role of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8103-8107 (1998).
- Hernández, A. and Marcos, R. Genetic variations associated with interindividual sensitivity in the response to arsenic exposure. *Pharmacogenomics* 9: 1113-1132 (2008).
- Hernández, A., Xamena, N., Sekaran, C., Tokunaga, H., Sampayo-Reyes, A., Quinteros, D., Creus, A. and Marcos, R. High arsenic metabolic efficiency in AS3MT287Thr allele carriers. *Pharmacogenet Genomics* 18: 349-355 (2008a).
- Hernández, A., Xamena, N., Surrallés, J., Sekaran, C., Tokunaga, H., Quinteros, D., Creus, A. and Marcos, R. Role of the Met(287)Thr polymorphism in the AS3MT gene on the metabolic arsenic profile. *Mutat Res* 637: 80-92 (2008b).
- Hess, J.L., Clark, L.S. and Moore, M.M. Trp53 sequence analysis of L5178Y cell line derivatives. *Environ Mol Mutagen* 42: 122-124 (2003).
- Honma, M. Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen* 45: 162-176 (2005).
- Honma, M. and Sofuni, T. The mouse lymphoma assay (MLA) using the microwell method. *Genetic toxicology and cancer risk assessment*. Choy, W.N. Ed. Marcel Dekker. Schering-Plough Research Institute, Lafayette, New Jersey (2001).
- Honma, M., Hayashi, M. and Sofuni, T. Cytotoxic and mutagenic responses to X-rays and chemical mutagens in normal and p53-mutated human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 374: 89-98 (1997a).
- Honma, M., Zhang, L.S., Hayashi, M., Takeshita, K., Nakagawa, Y., Tanaka, N. and Sofuni, T. Illegitimate recombination leading to allelic loss and unbalanced

- translocation in p53-mutated human lymphoblastoid cells. *Mol Cell Biol* 17: 4774-4781 (1997b).
- Honma, M., Hayashi, M., Shimada, H., Tanaka, N., Wakuri, S., Awogi, T., Yamamoto, K.I., Kodani, N., Nishi, Y., Nakadate, M. and Sofuni, T. Evaluation of the mouse lymphoma *Tk* assay (microwell method) as an alternative to the in vitro chromosomal aberration test. *Mutagenesis* 14: 5-22 (1999a).
- Honma, M., Zhang, L.Z., Sakamoto, H., Ozaki, M., Takeshita, K., Momose, M., Hayashi, M. and Sofuni, T. The need for long-term treatment in the mouse lymphoma assay. *Mutagenesis* 14: 23-29 (1999b).
- Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. Requirement of wild-type p53 protein for maintenance of chromosomal integrity. *Mol Carcinog* 28: 203-214 (2000).
- Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. Spindle poisons induce allelic loss in mouse lymphoma cells through mitotic non-disjunction. *Mutat Res* 493: 101-114 (2001).
- Honma, M., Izumi, M., Sakuraba, M., Tadokoro, S., Sakamoto, H., Wang, W., Yatagai, F. and Hayashi, M. Deletion, rearrangement, and gene conversion; genetic consequences of chromosomal double-strand breaks in human cells. *Environ Mol Mutagen* 42: 288-298 (2003).
- Hopenhayn-Rich, C., Biggs, M.L., Smith, A.H., Kalman, D.A. and Moore, L.E. Methylation study of a population environmentally exposed to arsenic in drinking water. *Environ Health Perspect* 104: 620-628 (1996).
- Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. Cytogenetic analysis of the L5178Y/*Tk*<sup>+/-</sup> leads to *Tk*<sup>-/-</sup> mouse lymphoma mutagenesis assay system. *Mutat Res* 84: 169-181 (1981).
- Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M. Cytogenetic distinction between the *Tk*<sup>+</sup> and *Tk*<sup>-</sup> chromosomes in the L5178Y *Tk*<sup>+/-</sup> 3.7.2C mouse-lymphoma cell line. *Mutat Res* 105: 451-456 (1982).
- Hozier, J., Scalzi, J., Sawyer, J., Carley, N., Applegate, M., Clive, D. and Moore, M.M. Localization of the mouse thymidine kinase gene to the distal portion of chromosome 11. *Genomics* 10: 827-830 (1991).
- Hozier, J., Applegate, M. and Moore, M.M. In vitro mammalian mutagenesis as a model for genetic lesions in human cancer. *Mutat Res* 270: 201-209 (1992).

- Hu, Y., Su, L. and Snow, E.T. Arsenic toxicity is enzyme specific and its effects on ligation are not caused by the direct inhibition of DNA repair enzymes. *Mutat Res* 408: 203-218 (1998).
- Huang, C., Ke, Q., Costa, M. and Shi, X. Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 255: 57-66 (2004).
- Huang, R.Y., Lee, T.C. and Jan, K.Y. Cycloheximide suppresses the enhancing effect of sodium arsenite on the clastogenicity of ethyl methanesulphonate. *Mutagenesis* 1: 467-470 (1986).
- Huang, R.Y., Jan, K.Y. and Lee, T.C. Posttreatment with sodium arsenite is coclastogenic in log phase but not in stationary phase. *Hum Genet* 75: 159-162 (1987).
- Huang, S.Y., Chang, C.S., Tang, J.L., Tien, H.F., Kuo, T.L., Huang, S.F., Yao, Y.T., Chou, W.C., Chung, C.Y., Wang, C.H., Shen, M.C. and Chen, Y.C. Acute and chronic arsenic poisoning associated with treatment of acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 103: 1092-1095 (1998).
- Hughes, M.F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 133: 1-16 (2002).
- IARC. Some Drinking-water Disinfectants and Contaminants Including Arsenic Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans. IARC, volume 84 (2004).
- ICH. S2A, Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals. <http://www.ich.org/cache/compo/502-272-1.html> (1997).
- ICH. S2 (R1), Guidance on Genotoxicity testing and data interpretation for Pharmaceuticals intended for human use. <http://www.ich.org/cache/compo/502-272-1.html> (2008).
- Isbister, G.K., Dawson, A.H. and Whyte, I.M. Arsenic trioxide poisoning: a description of two acute overdoses. *Hum Exp Toxicol* 23: 359-364 (2004).
- Jackson, S.P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23: 687-696 (2002).
- Jensen, T.J., Novak, P., Eblin, K.E., Gandolfi, A.J. and Futscher, B.W. Epigenetic remodeling during arsenical-induced malignant transformation. *Carcinogenesis* 29: 1500-1508 (2008).
- Jha, A.N., Noditi, M., Nilsson, R. and Natarajan, A.T. Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutat Res* 284: 215-221 (1992).

- Jones, F.T. A broad view of arsenic. *Poult Sci* 86: 2-14 (2007).
- Jongen, W.M., Cardinaals, J.M., Bos, P.M. and Hagel, P. Genotoxicity testing of arsenobetaine, the predominant form of arsenic in marine fishery products. *Food Chem Toxicol* 23: 669-673 (1985).
- Kala, S.V., Neely, M.W., Kala, G., Prater, C.I., Atwood, D.W., Rice, J.S. and Lieberman, M.W. The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. *J Biol Chem* 275: 33404-33408 (2000).
- Kapaj, S., Peterson, H., Liber, K. and Bhattacharya, P. Human health effects from chronic arsenic poisoning--a review. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 41: 2399-2428 (2006).
- Kasameyer, E., Connolly, L., Lasarev, M. and Turker, M.S. The spectra of large second-step mutations are similar for two different mouse autosomes. *Mutat Res* 637: 66-72 (2008).
- Kharab, P. and Singh, I. Genotoxic effects of potassium dichromate, sodium arsenite, cobalt chloride and lead nitrate in diploid yeast. *Mutat Res* 155: 117-120 (1985).
- Kirkland, D.J. and Muller, L. Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. *Mutat Res* 464: 137-147 (2000).
- Kirkland, D.J., Aardema, M., Banduhn, N., Carmichael, P., Fautz, R., Meunier, J.R. and Pfuhrer, S. In vitro approaches to develop weight of evidence (WoE) and mode of action (MoA) discussions with positive in vitro genotoxicity results. *Mutagenesis* 22: 161-175 (2007).
- Kitchin, K.T. and Ahmad, S. Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicol Lett* 137: 3-13 (2003).
- Kitchin, K.T. and Wallace, K. The role of protein binding of trivalent arsenicals in arsenic carcinogenesis and toxicity. *J Inorg Biochem* 102: 532-539 (2008).
- Klein, C.B., Leszczynska, J., Hickey, C. and Rossman, T.G. Further evidence against a direct genotoxic mode of action for arsenic-induced cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* 222: 289-297 (2007).
- Kligerman, A.D. and Tennant, A.H. Insights into the carcinogenic mode of action of arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 222: 281-288 (2007).
- Kligerman, A.D., Doerr, C.L., Tennant, A.H., Harrington-Brock, K., Allen, J.W., Winkfield, E., Poorman-Allen, P., Kundu, B., Funasaka, K., Roop, B.C., Mass, M.J. and DeMarini, D.M. Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic

- forms of arsenic: induction of chromosomal mutations but not gene mutations. *Environ Mol Mutagen* 42: 192-205 (2003).
- Kligerman, A.D., Doerr, C.L. and Tennant, A.H. Oxidation and methylation status determine the effects of arsenic on the mitotic apparatus. *Mol Cell Biochem* 279: 113-121 (2005).
- Kochhar, T.S., Howard, W., Hoffman, S. and Brammer-Carleton, L. Effect of trivalent and pentavalent arsenic in causing chromosome alterations in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol Lett* 84: 37-42 (1996).
- Konkola, K. More than a coincidence? The arrival of arsenic and the disappearance of plaque in early modern Europe. *J Hist Med Allied Sci* 47: 186-209 (1992).
- Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinae, N. and Honma, M. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat Res* 603: 151-158 (2006).
- Kumagai, Y. and Sumi, D. Arsenic: signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 243-262 (2007).
- Kurtio, P., Komulainen, H., Hakala, E., Kahelin, H. and Pekkanen, J. Urinary excretion of arsenic species after exposure to arsenic present in drinking water. *Arch Environ Contam Toxicol* 34: 297-305 (1998).
- Lantz, R.C. and Hays, A.M. Role of oxidative stress in arsenic-induced toxicity. *Drug Metab Rev* 38: 791-804 (2006).
- Larochette, N., Decaudin, D., Jacotot, E., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S.A., Zamzami, N., Xie, Z., Reed, J. and Kroemer, G. Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Exp Cell Res* 249: 413-421 (1999).
- Lasko, D., Cavenee, W. and Nordenskjold, M. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu Rev Genet* 25: 281-314 (1991).
- Le, X.C., Cullen, W.R. and Reimer, K.J. Determination of urinary arsenic and impact of dietary arsenic intake. *Talanta* 40: 185-193 (1993).
- Le, X.C., Ma, M., Cullen, W.R., Aposhian, H.V., Lu, X. and Zheng, B. Determination of monomethylarsonous acid, a key arsenic methylation intermediate, in human urine. *Environ Health Perspect* 108: 1015-1018 (2000).

- Lee, D.H., O'Connor, T.R. and Pfeifer, G.P. Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG→TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucleic Acids Res* 30: 3566-3573 (2002).
- Lee, T.C. and Ho, I.C. Modulation of cellular antioxidant defense activities by sodium arsenite in human fibroblasts. *Arch Toxicol* 69: 498-504 (1995).
- Lee, T.C., Huang, R.Y. and Jan, K.Y. Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity, and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 148: 83-89 (1985a).
- Lee, T.C., Oshimura, M. and Barrett, J.C. Comparison of arsenic-induced cell transformation, cytotoxicity, mutation and cytogenetic effects in Syrian hamster embryo cells in culture. *Carcinogenesis* 6: 1421-1426 (1985b).
- Lee, T.C., Wang-Wuu, S., Huang, R.Y., Lee, K.C. and Jan, K.Y. Differential effects of pre- and posttreatment of sodium arsenite on the genotoxicity of methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 46: 1854-1857 (1986a).
- Lee, T.C., Lee, K.C., Tzeng, Y.J., Huang, R.Y. and Jan, K.Y. Sodium arsenite potentiates the clastogenicity and mutagenicity of DNA crosslinking agents. *Environ Mutagen* 8: 119-128 (1986b).
- Lee, T.C., Tanaka, N., Lamb, P.W., Gilmer, T.M. and Barrett, J.C. Induction of gene amplification by arsenic. *Science* 241: 79-81 (1988).
- Lenga, R.E. The Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data. Vol.2: Aldrich Chemical Co. Milwaukee, WI (1988).
- Lew, Y.S., Brown, S.L., Griffin, R.J., Song, C.W. and Kim, J.H. Arsenic trioxide causes selective necrosis in solid murine tumors by vascular shutdown. *Cancer Res* 59: 6033-6037 (1999).
- Li, C.Y., Yandell, D.W. and Little, J.B. Molecular mechanisms of spontaneous and induced loss of heterozygosity in human cells in vitro. *Somat Cell Mol Genet* 18: 77-87 (1992).
- Li, J., Waters, S.B., Drobna, Z., Devesa, V., Styblo, M. and Thomas, D.J. Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the inorganic arsenic methylation phenotype. *Toxicol Appl Pharmacol* 204: 164-169 (2005).
- Li, J.H. and Rossman, T.G. Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Mol Toxicol* 2: 1-9 (1989).

- Li, J.H. and Rossman, T.G. Comutagenesis of sodium arsenite with ultraviolet radiation in Chinese hamster V79 cells. *Biol Met* 4: 197-200 (1991).
- Li, Y., Sun, X., Wang, L., Zhou, Z. and Kang, Y.J. Myocardial toxicity of arsenic trioxide in a mouse model. *Cardiovasc Toxicol* 2: 63-73 (2002).
- Liechty, M.C., Rauchfuss, H.S., Lugo, M.H. and Hozier, J.C. Sequence analysis of tka- and tkb+ alleles in L5178Y tk<sup>+/-</sup> mouse-lymphoma cells and spontaneous tk<sup>-/-</sup> mutants. *Mutat Res* 286: 299-307 (1993).
- Liechty, M.C., Hassanpour, Z., Hozier, J.C. and Clive, D. Use of microsatellite DNA polymorphisms on mouse chromosome 11 for in vitro analysis of thymidine kinase gene mutations. *Mutagenesis* 9: 423-427 (1994).
- Liechty, M.C., Crosby, H., Jr, Murthy, A., Davis, L.M., Caspary, W.J. and Hozier, J.C. Identification of a heteromorphic microsatellite within the thymidine kinase gene in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat Res* 371: 265-271 (1996).
- Liechty, M.C., Scalzi, J.M., Sims, K.R., Crosby, H., Jr, Spencer, D.L., Davis, L.M., Caspary, W.J. and Hozier, J.C. Analysis of large and small colony L5178Y tk<sup>-/-</sup> mouse lymphoma mutants by loss of heterozygosity (LOH) and by whole chromosome 11 painting: detection of recombination. *Mutagenesis* 13: 461-474 (1998).
- Lin, S., Shi, Q., Nix, F.B., Styblo, M., Beck, M.A., Herbin-Davis, K.M., Hall, L.L., Simeonsson, J.B. and Thomas, D.J. A novel S-adenosyl-L-methionine:arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol. *J Biol Chem* 277: 10795-10803 (2002).
- Lindberg, A.L., Kumar, R., Goessler, W., Thirumaran, R., Gurzau, E., Koppova, K., Rudnai, P., Leonardi, G., Fletcher, T. and Vahter, M. Metabolism of low-dose inorganic arsenic in a central European population: influence of sex and genetic polymorphisms. *Environ Health Perspect* 115: 1081-1086 (2007).
- Lindberg, A.L., Ekstrom, E.C., Nermell, B., Rahman, M., Lonnerdal, B., Persson, L.A. and Vahter, M. Gender and age differences in the metabolism of inorganic arsenic in a highly exposed population in Bangladesh. *Environ Res* 106: 110-120 (2008).
- Liu, B., Pan, S., Dong, X., Qiao, H., Jiang, H., Krissansen, G.W. and Sun, X. Opposing effects of arsenic trioxide on hepatocellular carcinomas in mice. *Cancer Sci* 97: 675-681 (2006).
- Liu, S.X., Athar, M., Lippai, I., Waldren, C. and Hei, T.K. Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1643-1648 (2001).

- Lowenberg, B., Griffin, J.D. and Tallman, M.S. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 82-101 (2003).
- Ma, M. and Le, X.C. Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation. *Clin Chem* 44: 539-550 (1998).
- Mahata, J., Basu, A., Ghoshal, S., Sarkar, J.N., Roy, A.K., Poddar, G., Nandy, A.K., Banerjee, A., Ray, K., Natarajan, A.T., Nilsson, R. and Giri, A.K. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat Res* 534: 133-143 (2003).
- Mahata, J., Chaki, M., Ghosh, P., Das, L.K., Baidya, K., Ray, K., Natarajan, A.T. and Giri, A.K. Chromosomal aberrations in arsenic-exposed human populations: a review with special reference to a comprehensive study in West Bengal, India. *Cytogenet Genome Res* 104: 359-364 (2004).
- Mandal, B.K. and Suzuki, K.T. Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58: 201-235 (2002).
- Marnell, L.L., Garcia-Vargas, G.G., Chowdhury, U.K., Zakharyan, R.A., Walsh, B., Avram, M.D., Kopplin, M.J., Cebrian, M.E., Silbergeld, E.K. and Aposhian, H.V. Polymorphisms in the human monomethylarsonic acid (MMA V) reductase/hGSTO1 gene and changes in urinary arsenic profiles. *Chem Res Toxicol* 16: 1507-1513 (2003).
- Marnett, L.J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21: 361-370 (2000).
- Martínez, V., Creus, A., Venegas, W., Arroyo, A., Beck, J.P., Gebel, T.W., Surrallés, J. and Marcos, R. Evaluation of micronucleus induction in a Chilean population environmentally exposed to arsenic. *Mutat Res* 564: 65-74 (2004).
- Martínez, V., Creus, A., Venegas, W., Arroyo, A., Beck, J.P., Gebel, T.W., Surrallés, J. and Marcos, R. Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. *Toxicol Lett* 155: 319-327 (2005).
- Mass, M.J., Tennant, A., Roop, B.C., Cullen, W.R., Styblo, M., Thomas, D.J. and Kligerman, A.D. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem Res Toxicol* 14: 355-361 (2001).
- Matsui, M., Nishigori, C., Toyokuni, S., Takada, J., Akaboshi, M., Ishikawa, M., Imamura, S. and Miyachi, Y. The role of oxidative DNA damage in human arsenic carcinogenesis: detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in arsenic-related Bowen's disease. *J Invest Dermatol* 113: 26-31 (1999).



- Meek, D.W. The p53 response to DNA damage. *DNA Repair* 3: 1049-1056 (2004).
- Meng, Q., Grosovsky, A.J., Shi, X. and Walker, V.E. Mutagenicity and loss of heterozygosity at the APRT locus in human lymphoblastoid cells exposed to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Mutagenesis* 15: 405-410 (2000).
- Meng, Z. and Hsie, A.W. Polymerase chain reaction-based deletion analysis of spontaneous and arsenite-enhanced gpt mutants in CHO-AS52 cells. *Mutat Res* 356: 255-259 (1996).
- Miller, W.H., Jr, Schipper, H.M., Lee, J.S., Singer, J. and Waxman, S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res* 62: 3893-3903 (2002).
- Milton, A.H., Hasan, Z., Rahman, A. and Rahman, M. Non-cancer effects of chronic arsenicosis in Bangladesh: preliminary results. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 38: 301-305 (2003).
- Milton, A.H., Smith, W., Rahman, B., Hasan, Z., Kulsum, U., Dear, K., Rakibuddin, M. and Ali, A. Chronic arsenic exposure and adverse pregnancy outcomes in bangladesh. *Epidemiology* 16: 82-86 (2005).
- Mitchell, A.D. Alternate hypothesis for the bimodal size distribution of mutant colonies of L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ Mol Mutagen* 29: 431-433 (1997).
- Mitra, S.R., Mazumder, D.N., Basu, A., Block, G., Haque, R., Samanta, S., Ghosh, N., Smith, M.M., von Ehrenstein, O.S. and Smith, A.H. Nutritional factors and susceptibility to arsenic-caused skin lesions in West Bengal, India. *Environ Health Perspect* 112: 1104-1109 (2004).
- Monzen, H., Griffin, R.J., Williams, B.W., Amano, M., Ando, S. and Hasegawa, T. Study of arsenic trioxide-induced vascular shutdown and enhancement with radiation in solid tumor. *Radiat Med* 22: 205-211 (2004).
- Moore, D.F., O'Callaghan, C.A., Berlyne, G., Ogg, C.S., Davies, H.A., House, I.M. and Henry, J.A. Acute arsenic poisoning: absence of polyneuropathy after treatment with 2,3-dimercaptopropanesulphonate (DMPS). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57: 1133-1135 (1994).
- Moore, L.E., Warner, M.L., Smith, A.H., Kalman, D. and Smith, M.T. Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* 27: 176-184 (1996).

- Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. Analysis of trifluorothymidine-resistant (TFTr) mutants of L5178Y/TK+/- mouse lymphoma cells. *Mutat Res* 151: 161-174 (1985).
- Moore, M.M., Harrington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. Differential mutant quantitation at the mouse lymphoma tk and CHO hgprr loci. *Mutagenesis* 4: 394-403 (1989).
- Moore, M.M., Harrington-Brock, K. and Doerr, C.L. Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites. *Mutat Res* 386: 279-290 (1997).
- Moore, M.M., Harrington-Brock, K. and Cole, J. Issues for conducting the microtiter version of the mouse lymphoma thymidine kinase (tk) assay and a critical review of data generated in a collaborative trial using the microtiter method. *Mutagenesis* 14: 271-281 (1999a).
- Moore, M.M., Collard, D.D. and Harrington-Brock, K. Failure to adequately use positive control data leads to poor quality mouse lymphoma data assessments. *Mutagenesis* 14: 261-263 (1999b).
- Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M.C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F., Jr. Mouse lymphoma thymidine kinase locus gene mutation assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report. *Environ Mol Mutagen* 35: 185-190 (2000).
- Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, J., Ouldelhkim, M.C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F., Jr. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: follow-up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, April 2000. *Environ Mol Mutagen* 40: 292-299 (2002).
- Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., DeLongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, J., Omori, T., Ouldelhkim, M.C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F., Jr, Thakur, A., Wakuri, S., Yoshimura, I. and Mouse Lymphoma Assay Workgroup. Mouse lymphoma thymidine kinase gene

- mutation assay: International Workshop on Genotoxicity Tests Workgroup report--Plymouth, UK 2002. *Mutat Res* 540: 127-140 (2003).
- Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F., Jr, Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: follow-up meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing--Aberdeen, Scotland, 2003--Assay acceptance criteria, positive controls, and data evaluation. *Environ Mol Mutagen* 47: 1-5 (2006).
- Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F., Jr, Thakur, A.K., Van Goethem, F. and Mouse Lymphoma Assay Workgroup, IWGT. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment. *Mutat Res* 627: 36-40 (2007).
- Moraes, E.C., Keyse, S.M. and Tyrrell, R.M. Mutagenesis by hydrogen peroxide treatment of mammalian cells: a molecular analysis. *Carcinogenesis* 11: 283-293 (1990).
- Morgan, A. Exposure and health effects. Arsenic. Anonymous Office of Water, Office of Science and Technology. Health and Ecological Criteria Division. United States Environmental Protection Agency. Washington, DC (2001).
- MGSC. Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S.E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M.R., Brown, D.G., Brown, S.D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R.D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A.T., Church, D.M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F.S., Cook, L.L., Copley, R.R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520-562 (2002).

- Moya, R. Trabajo de Máster: Evaluación genotóxica del trióxido de arsénico (TOA) en la línea celular TK6. Grup de Mutagènesi. Departament de Genètica i Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona. (2008).
- Mukherjee, S.C., Rahman, M.M., Chowdhury, U.K., Sengupta, M.K., Lodh, D., Chanda, C.R., Saha, K.C. and Chakraborti, D. Neuropathy in arsenic toxicity from groundwater arsenic contamination in West Bengal, India. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 38: 165-183 (2003).
- Muller, L. and Kasper, P. Human biological relevance and the use of threshold-arguments in regulatory genotoxicity assessment: experience with pharmaceuticals. *Mutat Res* 464: 19-34 (2000).
- Muller, L., Kikuchi, Y., Probst, G., Schechtman, L., Shimada, H., Sofuni, T. and Tweats, D. ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutat Res* 436: 195-225 (1999).
- Muller, W.U., Streffer, C. and Fischer-Lahdo, C. Toxicity of sodium arsenite in mouse embryos in vitro and its influence on radiation risk. *Arch Toxicol* 59: 172-175 (1986).
- Murgo, A.J. Clinical trials of arsenic trioxide in hematologic and solid tumors: overview of the National Cancer Institute Cooperative Research and Development Studies. *Oncologist* 6 Suppl 2: 22-28 (2001).
- Nakata, K., Tanaka, Y., Nakano, T., Adachi, T., Tanaka, H., Kaminuma, T. and Ishikawa, T. Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab Pharmacokinet* 21: 437-457 (2006).
- Naranmandura, H., Suzuki, N. and Suzuki, K.T. Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation. *Chem Res Toxicol* 19: 1010-1018 (2006).
- Nemeti, B., Csanaky, I. and Gregus, Z. Arsenate reduction in human erythrocytes and rats--testing the role of purine nucleoside phosphorylase. *Toxicol Sci* 74: 22-31 (2003).
- Nesnow, S., Roop, B.C., Lambert, G., Kadiiska, M., Mason, R.P., Cullen, W.R. and Mass, M.J. DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol* 15: 1627-1634 (2002).
- Noda, Y., Suzuki, T., Kohara, A., Hasegawa, A., Yotsuyanagi, T., Hayashi, M., Sofuni, T., Yamanaka, K. and Okada, S. In vivo genotoxicity evaluation of dimethylarsinic acid in MutaMouse. *Mutat Res* 513: 205-212 (2002).

- Nordenson, I. and Beckman, L. Is the genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radicals? *Hum Hered* 41: 71-73 (1991).
- Oberly, T.J., Yount, D.L. and Garriott, M.L. A comparison of the soft agar and microtitre methodologies for the L5178Y tk +/- mouse lymphoma assay. *Mutat Res* 388: 59-66 (1997).
- OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. OECD Guideline for the testing of chemicals, No 476. Genetic Toxicology: *In vitro* mammalian cell gene mutation test (1997).
- Oya-Ohta, Y., Kaise, T. and Ochi, T. Induction of chromosomal aberrations in cultured human fibroblasts by inorganic and organic arsenic compounds and the different roles of glutathione in such induction. *Mutat Res* 357: 123-129 (1996).
- Paiva, L., Martínez, V., Creus, A., Quinteros, D. and Marcos, R. Sister chromatid exchange analysis in smelting plant workers exposed to arsenic. *Environ Mol Mutagen* 47: 230-235 (2006).
- Paiva, L., Marcos, R., Creus, A., Coggan, M., Oakley, A.J. and Board, P.G. Polymorphism of glutathione transferase Omega 1 in a population exposed to a high environmental arsenic burden. *Pharmacogenet Genomics* 18: 1-10 (2008).
- Parsons, P.A. Metabolic efficiency in response to environmental agents predicts hormesis and invalidates the linear no-threshold premise: ionizing radiation as a case study. *Crit Rev Toxicol* 33: 443-449 (2003).
- Patlolla, A.K. and Tchounwou, P.B. Cytogenetic evaluation of arsenic trioxide toxicity in Sprague-Dawley rats. *Mutat Res* 587: 126-133 (2005).
- Petrick, J.S., Ayala-Fierro, F., Cullen, W.R., Carter, D.E. and Vasken Aposhian, H. Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 163: 203-207 (2000).
- Petrick, J.S., Jagadish, B., Mash, E.A. and Aposhian, H.V. Monomethylarsonous acid (MMA(III)) and arsenite: LD(50) in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chem Res Toxicol* 14: 651-656 (2001).
- Pi, J., Yamauchi, H., Kumagai, Y., Sun, G., Yoshida, T., Aikawa, H., Hopenhayn-Rich, C. and Shimojo, N. Evidence for induction of oxidative stress caused by chronic exposure of Chinese residents to arsenic contained in drinking water. *Environ Health Perspect* 110: 331-336 (2002).

- Pu, Y.S., Hour, T.C., Chen, J., Huang, C.Y., Guan, J.Y. and Lu, S.H. Arsenic trioxide as a novel anticancer agent against human transitional carcinoma--characterizing its apoptotic pathway. *Anticancer Drugs* 13: 293-300 (2002).
- Qazilbash, M.H., Saliba, R.M., Nieto, Y., Parikh, G., Pelosini, M., Khan, F.B., Jones, R.B., Hosing, C., Mendoza, F., Weber, D.M., Wang, M., Popat, U., Alousi, A., Anderlini, P., Champlin, R.E. and Giralt, S. Arsenic trioxide with ascorbic acid and high-dose melphalan: results of a phase II randomized trial. *Biol Blood Marrow Transplant* 14: 1401-1407 (2008).
- Radabaugh, T.R. and Aposhian, H.V. Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: reduction of arsenate to arsenite by human liver arsenate reductase. *Chem Res Toxicol* 13: 26-30 (2000).
- Radabaugh, T.R., Sampayo-Reyes, A., Zakharyan, R.A. and Aposhian, H.V. Arsenate reductase II. Purine nucleoside phosphorylase in the presence of dihydrolipoic acid is a route for reduction of arsenate to arsenite in mammalian systems. *Chem Res Toxicol* 15: 692-698 (2002).
- Ramírez, P., Eastmond, D.A., Laclette, J.P. and Ostrosky-Wegman, P. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat Res* 386: 291-298 (1997).
- Ramírez, T., Stopper, H., Fischer, T., Hock, R. and Herrera, L.A. S-Adenosyl-l-methionine counteracts mitotic disturbances and cytostatic effects induced by sodium arsenite in HeLa cells. *Mutat Res* (2007).
- Ramos-Morales, P. and Rodriguez-Arnaiz, R. Genotoxicity of two arsenic compounds in germ cells and somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 25: 288-299 (1995).
- Reichard, J.F., Schnekenburger, M. and Puga, A. Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 188-192 (2007).
- Rizki, M., Kossatz, E., Xamena, N., Creus, A. and Marcos, R. Influence of sodium arsenite on the genotoxicity of potassium dichromate and ethyl methanesulfonate: studies with the wing spot test in *Drosophila*. *Environ Mol Mutagen* 39: 49-54 (2002).
- Rizki, M., Kossatz, E., Velázquez, A., Creus, A., Farina, M., Fortaner, S., Sabbioni, E. and Marcos, R. Metabolism of arsenic in *Drosophila melanogaster* and the

- genotoxicity of dimethylarsinic acid in the *Drosophila* wing spot test. *Environ Mol Mutagen* 47: 162-168 (2006).
- Rossman, T.G., Stone, D., Molina, M. and Troll, W. Absence of arsenite mutagenicity in *E. coli* and Chinese hamster cells. *Environ Mutagen* 2: 371-379 (1980).
- Rossman, T.G. Enhancement of UV-mutagenesis by low concentrations of arsenite in *E. coli*. *Mutat Res* 91: 207-211 (1981).
- Rossman, T.G., Uddin, A.N., Burns, F.J. and Bosland, M.C. Arsenite cocarcinogenesis: an animal model derived from genetic toxicology studies. *Environ Health Perspect* 110: 749-752 (2002).
- Rossman, T.G. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat Res* 533: 37-65 (2003).
- Rossman, T.G., Uddin, A.N. and Burns, F.J. Evidence that arsenite acts as a cocarcinogen in skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* 198: 394-404 (2004).
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L.H. and Lobrich, M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23: 5706-5715 (2003).
- Ruiz-Ramos, R., Lopez-Carrillo, L., Rios-Perez, A.D., De Vizcaya-Ruiz, A. and Cebrian, M.E. Sodium arsenite induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF-kappaB activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells. *Mutat Res* (2008).
- Sakurai, T., Kojima, C., Ochiai, M., Ohta, T. and Fujiwara, K. Evaluation of in vivo acute immunotoxicity of a major organic arsenic compound arsenobetaine in seafood. *Int Immunopharmacol* 4: 179-184 (2004).
- Saleha Banu, B., Danadevi, K., Jamil, K., Ahuja, Y.R., Visweswara Rao, K. and Ishaq, M. In vivo genotoxic effect of arsenic trioxide in mice using comet assay. *Toxicology* 162: 171-177 (2001).
- Salnikow, K. and Zhitkovich, A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem Res Toxicol* 21: 28-44 (2008).
- Samikkannu, T., Chen, C.H., Yih, L.H., Wang, A.S., Lin, S.Y., Chen, T.C. and Jan, K.Y. Reactive oxygen species are involved in arsenic trioxide inhibition of pyruvate dehydrogenase activity. *Chem Res Toxicol* 16: 409-414 (2003).
- Sánchez, Y., Amran, D., Fernandez, C., de Blas, E. and Aller, P. Genistein selectively potentiates arsenic trioxide-induced apoptosis in human leukemia cells via reactive

- oxygen species generation and activation of reactive oxygen species-inducible protein kinases (p38-MAPK, AMPK). *Int J Cancer* 123: 1205-1214 (2008).
- Sawyer, J.R., Moore, M.M. and Hozier, J.C. High-resolution cytogenetic characterization of the L5178Y TK<sup>±</sup> mouse lymphoma cell line. *Mutat Res* 214: 181-193 (1989).
- Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. Multicolor spectral karyotyping of the L5178Y Tk<sup>±</sup> -3.7.2C mouse lymphoma cell line. *Environ Mol Mutagen* 47: 127-131 (2006).
- Schaaper, R.M. and Dunn, R.L. Spontaneous mutation in the Escherichia coli lacI gene. *Genetics* 129: 317-326 (1991).
- Scheindlin, S. The duplicitous nature of inorganic arsenic. *Mol Interv* 5: 60-64 (2005).
- Schmeisser, E., Goessler, W. and Francesconi, K.A. Human metabolism of arsenolipids present in cod liver. *Anal Bioanal Chem* 385: 367-376 (2006).
- Schwerdtle, T., Walter, I., Mackiw, I. and Hartwig, A. Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA. *Carcinogenesis* 24: 967-974 (2003).
- Scott, N., Hatlelid, K.M., MacKenzie, N.E. and Carter, D.E. Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chem Res Toxicol* 6: 102-106 (1993).
- Sens, D.A., Park, S., Gurel, V., Sens, M.A., Garrett, S.H. and Somji, S. Inorganic cadmium- and arsenite-induced malignant transformation of human bladder urothelial cells. *Toxicol Sci* 79: 56-63 (2004).
- Shao, W., Fanelli, M., Ferrara, F.F., Riccioni, R., Rosenauer, A., Davison, K., Lamph, W.W., Waxman, S., Pelicci, P.G., Lo Coco, F., Avvisati, G., Testa, U., Peschle, C., Gambacorti-Passerini, C., Nervi, C. and Miller, W.H., Jr. Arsenic trioxide as an inducer of apoptosis and loss of PML/RAR alpha protein in acute promyelocytic leukemia cells. *J Natl Cancer Inst* 90: 124-133 (1998).
- Shelby, M.D. The genetic toxicity of human carcinogens and its implications. *Mutat Res* 204: 3-15 (1988).
- Shen, Z.X., Chen, G.Q., Ni, J.H., Li, X.S., Xiong, S.M., Qiu, Q.Y., Zhu, J., Tang, W., Sun, G.L., Yang, K.Q., Chen, Y., Zhou, L., Fang, Z.W., Wang, Y.T., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T.D., Chen, S.J., Chen, Z. and Wang, Z.Y. Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 89: 3354-3360 (1997).



- Shen, Z.Y., Zhang, Y., Chen, J.Y., Chen, M.H., Shen, J., Luo, W.H. and Zeng, Y. Intratumoral injection of arsenic to enhance antitumor efficacy in human esophageal carcinoma cell xenografts. *Oncol Rep* 11: 155-159 (2004).
- Shi, H., Shi, X. and Liu, K.J. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 255: 67-78 (2004).
- Shrivastav, M., De Haro, L.P. and Nickoloff, J.A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 18: 134-147 (2008).
- Smedley, P.L. and Kinniburgh, D.G. Source and behaviour of arsenic in natural water. WHO. United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water. British Geological Survey. Wallingford, Oxon, UK (2001).
- Smith, A.H., Lingas, E.O. and Rahman, M. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bull World Health Organ* 78: 1093-1103 (2000).
- Snow, E.T., Sykora, P., Durham, T.R. and Klein, C.B. Arsenic, mode of action at biologically plausible low doses: what are the implications for low dose cancer risk? *Toxicol Appl Pharmacol* 207: 557-564 (2005).
- Sofuni, T., Wilcox, P., Shimada, H., Clements, J., Honma, M., Clive, D., Green, M., Thybaud, V., San, R.H., Elliott, B.M. and Muller, L. Mouse lymphoma workshop: Victoria, British Columbia, Canada, March 27, 1996 protocol issues regarding the use of the Microwell Method of the Mouse Lymphoma Assay. *Environ Mol Mutagen* 29: 434-438 (1997).
- Soignet, S.L., Maslak, P., Wang, Z.G., Jhanwar, S., Calleja, E., Dardashti, L.J., Corso, D., DeBlasio, A., Gabilove, J., Scheinberg, D.A., Pandolfi, P.P. and Warrell, R.P., Jr. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med* 339: 1341-1348 (1998).
- Soleo, L., Lovreglio, P., Iavicoli, S., Antelmi, A., Drago, I., Basso, A., Lorenzo, L.D., Gilberti, M.E., Palma, G.D. and Apostoli, P. Significance of urinary arsenic speciation in assessment of seafood ingestion as the main source of organic and inorganic arsenic in a population resident near a coastal area. *Chemosphere* 73: 291-299 (2008).
- Sonoda, E., Hohegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y. and Takeda, S. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair* 5: 1021-1029 (2006).

- Stankowski, L.F., Jr, Tindall, K.R. and Hsie, A.W. Quantitative and molecular analyses of ethyl methanesulfonate- and ICR 191-induced mutation in AS52 cells. *Mutat Res* 160: 133-147 (1986).
- Stark, J.M. and Jasin, M. Extensive loss of heterozygosity is suppressed during homologous repair of chromosomal breaks. *Mol Cell Biol* 23: 733-743 (2003).
- Steinmaus, C., Yuan, Y., Bates, M.N. and Smith, A.H. Case-control study of bladder cancer and drinking water arsenic in the western United States. *Am J Epidemiol* 158: 1193-1201 (2003).
- Storer, R.D., Kraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. The mouse lymphoma L5178Y Tk<sup>±</sup> cell line is heterozygous for a codon 170 mutation in the p53 tumor suppressor gene. *Mutat Res* 373: 157-165 (1997).
- Stybło, M. and Thomas, D.J. Binding of arsenicals to proteins in an in vitro methylation system. *Toxicol Appl Pharmacol* 147: 1-8 (1997).
- Stybło, M., Serves, S.V., Cullen, W.R. and Thomas, D.J. Comparative inhibition of yeast glutathione reductase by arsenicals and arsenothiols. *Chem Res Toxicol* 10: 27-33 (1997).
- Stybło, M., Del Razo, L.M., Vega, L., Germolec, D.R., LeCluyse, E.L., Hamilton, G.A., Reed, W., Wang, C., Cullen, W.R. and Thomas, D.J. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch Toxicol* 74: 289-299 (2000).
- Stybło, M., Drobna, Z., Jaspers, I., Lin, S. and Thomas, D.J. The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update. *Environ Health Perspect* 110: 767-771 (2002).
- Sykora, P. and Snow, E.T. Modulation of DNA polymerase beta-dependent base excision repair in cultured human cells after low dose exposure to arsenite. *Toxicol Appl Pharmacol* 228: 385-394 (2008).
- Tallman, M.S. What is the role of arsenic in newly diagnosed APL? *Best Pract Res Clin Haematol* 21: 659-666 (2008).
- Tapio, S. and Grosche, B. Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutat Res* 612: 215-246 (2006).
- Tchounwou, P.B., Centeno, J.A. and Patlolla, A.K. Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis--a health risk assessment and management approach. *Mol Cell Biochem* 255: 47-55 (2004).

- Thomas, D.J. Molecular processes in cellular arsenic metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 222: 365-373 (2007).
- Tkeshelashvili, L.K., McBride, T., Spence, K. and Loeb, L.A. Mutation spectrum of copper-induced DNA damage. *J Biol Chem* 266: 6401-6406 (1991).
- Tripathy, N.K., Wurgler, F.E. and Frei, H. Genetic toxicity of six carcinogens and six non-carcinogens in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 242: 169-180 (1990).
- Tseng, C.H. Cardiovascular disease in arsenic-exposed subjects living in the arseniasis-hyperendemic areas in Taiwan. *Atherosclerosis* 199: 12-18 (2008).
- Tsuchiya, T., Tanaka-Kagawa, T., Jinno, H., Tokunaga, H., Sakimoto, K., Ando, M. and Umeda, M. Inorganic arsenic compounds and methylated metabolites induce morphological transformation in two-stage BALB/c 3T3 cell assay and inhibit metabolic cooperation in V79 cell assay. *Toxicol Sci* 84: 344-351 (2005).
- Turker, M.S. Autosomal mutation in somatic cells of the mouse. *Mutagenesis* 18: 1-6 (2003).
- Vahter, M. Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Sci Prog* 82: 69-88 (1999).
- Vahter, M. Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. *Toxicol Lett* 112-113: 209-217 (2000).
- Vahter, M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 181-182: 211-217 (2002).
- Vahter, M. Health effects of early life exposure to arsenic. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102: 204-211 (2008).
- Vahter, M. and Concha, G. Role of metabolism in arsenic toxicity. *Pharmacol Toxicol* 89: 1-5 (2001).
- Vega, L., Gonshebbat, M.E. and Ostrosky-Wegman, P. Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected. *Mutat Res* 334: 365-373 (1995).
- Verma, R.J., Vasu, A. and Saiyed, A.A. Arsenic toxicity in mice and its possible amelioration. *J Environ Sci* 16: 447-453 (2004).
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310 (2000).
- Waalkes, M.P., Ward, J.M., Liu, J. and Diwan, B.A. Transplacental carcinogenicity of inorganic arsenic in the drinking water: induction of hepatic, ovarian, pulmonary, and adrenal tumors in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 186: 7-17 (2003).

- Waalkes, M.P., Liu, J., Ward, J.M. and Diwan, B.A. Animal models for arsenic carcinogenesis: inorganic arsenic is a transplacental carcinogen in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 198: 377-384 (2004).
- Waalkes, M.P., Liu, J. and Diwan, B.A. Transplacental arsenic carcinogenesis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 222: 271-280 (2007).
- Wan, B., Christian, R.T. and Soukup, S.W. Studies of cytogenetic effects of sodium arsenicals on mammalian cells in vitro. *Environ Mutagen* 4: 493-498 (1982).
- Wang, J., Heflich, R.H. and Moore, M.M. A method to distinguish between the de novo induction of thymidine kinase mutants and the selection of pre-existing thymidine kinase mutants in the mouse lymphoma assay. *Mutat Res* 626: 185-190 (2007).
- Wang, J., Li, L., Cang, H., Shi, G. and Yi, J. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are responsible for the high susceptibility to arsenic cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk Res* 32: 429-436 (2008).
- Wang, J.P., Qi, L., Moore, M.R. and Ng, J.C. A review of animal models for the study of arsenic carcinogenesis. *Toxicol Lett* 133: 17-31 (2002).
- Wang, S.S., Zhang, T., Wang, X.L., Hong, L. and Qi, Q.H. Effect of arsenic trioxide on rat hepatocellular carcinoma and its renal cytotoxicity. *World J Gastroenterol* 9: 930-935 (2003).
- Wang, T.S. and Huang, H. Active oxygen species are involved in the induction of micronuclei by arsenite in XRS-5 cells. *Mutagenesis* 9: 253-257 (1994).
- Ward, M.A., Yu, M., Glickman, B.W. and Grosovsky, A.J. Loss of heterozygosity in mammalian cell mutagenesis: molecular analysis of spontaneous mutations at the *aprt* locus in CHO cells. *Carcinogenesis* 11: 1485-1490 (1990).
- Wax, P.M. and Thornton, C.A. Recovery from severe arsenic-induced peripheral neuropathy with 2,3-dimercapto-1-propanesulphonic acid. *J Toxicol Clin Toxicol* 38: 777-780 (2000).
- Waxman, S. and Anderson, K.C. History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy. *Oncologist* 6: 3-10 (2001).
- Wei, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., Iwai, S., Yoshida, K., Endo, G., Nakae, D. and Fukushima, S. Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats and genetic alterations in induced urinary bladder tumors. *Carcinogenesis* 23: 1387-1397 (2002).
- Westervelt, P., Brown, R.A., Adkins, D.R., Khoury, H., Curtin, P., Hurd, D., Luger, S.M., Ma, M.K., Ley, T.J. and DiPersio, J.F. Sudden death among patients with

- acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide. *Blood* 98: 266-271 (2001).
- Wettin, K., Johansson, M., Zheng, X., Zhu, C. and Karlsson, A. Cloning of mouse mitochondrial thymidine kinase 2 cDNA. *FEBS Lett* 460: 103-106 (1999).
- WHO. World Health Organization. Arsenic in drinking water. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs210/en/> (2001).
- Wiencke, J.K. and Yager, J.W. Specificity of arsenite in potentiating cytogenetic damage induced by the DNA crosslinking agent diepoxybutane. *Environ Mol Mutagen* 19: 195-200 (1992).
- Wijnhoven, S.W., Kool, H.J., van Teijlingen, C.M., van Zeeland, A.A. and Vrieling, H. Loss of heterozygosity in somatic cells of the mouse. An important step in cancer initiation? *Mutat Res* 473: 23-36 (2001).
- Wildfang, E., Healy, S.M. and Aposhian, H.V. Chapter 3: Arsenic. *Molecular Biology and Toxicology of metals*. Koropatrik, J. and Zalups, R.K. Ed. Mercer University of School of Medicine and London Regional Centre. (2000).
- Wildfang, E., Radabaugh, T.R. and Aposhian, H.V. Enzymatic methylation of arsenic compounds. IX. Liver arsenite methyltransferase and arsenate reductase activities in primates. *Toxicology* 168: 213-221 (2001).
- Xiao, Y.F., Wu, D.D., Liu, S.X., Chen, X. and Ren, L.F. Effect of arsenic trioxide on vascular endothelial cell proliferation and expression of vascular endothelial growth factor receptors Flt-1 and KDR in gastric cancer in nude mice. *World J Gastroenterol* 13: 6498-6505 (2007).
- Xie, R., Johnson, W., Spayd, S., Hall, G.S. and Buckley, B. Arsenic speciation analysis of human urine using ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 578: 186-194 (2006).
- Xu, A., Wu, L.J., Santella, R.M. and Hei, T.K. Role of oxyradicals in mutagenicity and DNA damage induced by crocidolite asbestos in mammalian cells. *Cancer Res* 59: 5922-5926 (1999).
- Yager, J.W. and Wiencke, J.K. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase by arsenite. *Mutat Res* 386: 345-351 (1997).
- Yamanaka, K., Ohba, H., Hasegawa, A., Sawamura, R. and Okada, S. Mutagenicity of dimethylated metabolites of inorganic arsenics. *Chem Pharm Bull* 37: 2753-2756 (1989).

- Yih, L.H. and Lee, T.C. Effects of exposure protocols on induction of kinetochore-plus and -minus micronuclei by arsenite in diploid human fibroblasts. *Mutat Res* 440: 75-82 (1999).
- Yu, J., Qian, H., Li, Y., Wang, Y., Zhang, X., Liang, X., Fu, M. and Lin, C. Arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) reduces the invasive and metastatic properties of cervical cancer cells in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol* 106: 400-406 (2007a).
- Yu, J., Qian, H., Li, Y., Wang, Y., Zhang, X., Liang, X., Fu, M. and Lin, C. Therapeutic effect of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) on cervical cancer in vitro and in vivo through apoptosis induction. *Cancer Biol Ther* 6: 580-586 (2007b).
- Zakharyan, R.A. and Aposhian, H.V. Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: the rate-limiting enzyme of rabbit liver arsenic biotransformation is MMA(V) reductase. *Chem Res Toxicol* 12: 1278-1283 (1999).
- Zakharyan, R.A., Wu, Y., Bogdan, G.M. and Aposhian, H.V. Enzymatic methylation of arsenic compounds: assay, partial purification, and properties of arsenite methyltransferase and monomethylarsonic acid methyltransferase of rabbit liver. *Chem Res Toxicol* 8: 1029-1038 (1995).
- Zakharyan, R.A., Ayala-Fierro, F., Cullen, W.R., Carter, D.M. and Aposhian, H.V. Enzymatic methylation of arsenic compounds. VII. Monomethylarsonous acid (MMAIII) is the substrate for MMA methyltransferase of rabbit liver and human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 158: 9-15 (1999).
- Zakharyan, R.A., Sampayo-Reyes, A., Healy, S.M., Tsaprailis, G., Board, P.G., Liebler, D.C. and Aposhian, H.V. Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem Res Toxicol* 14: 1051-1057 (2001).
- Zhang, T.C., Schmitt, M.T. and Mumford, J.L. Effects of arsenic on telomerase and telomeres in relation to cell proliferation and apoptosis in human keratinocytes and leukemia cells in vitro. *Carcinogenesis* 24: 1811-1817 (2003).
- Zhang, T.D., Chen, G.Q., Wang, Z.G., Wang, Z.Y., Chen, S.J. and Chen, Z. Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL. *Oncogene* 20: 7146-7153 (2001).
- Zhao, X.Y., Li, G.Y., Liu, Y., Chai, L.M., Chen, J.X., Zhang, Y., Du, Z.M., Lu, Y.J. and Yang, B.F. Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced cardiotoxicity in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 154: 105-113 (2008).



## **8. ANEXO**

**Analysis of arsenic *Tk* mouse lymphoma mutants by chromosome 11 painting**

**Carolina Soriano , Amadeu Creus, Ricard Marcos (Manuscript to be submitted)**





## **Analysis of Arsenic *Tk* Mouse Lymphoma Mutants by Chromosome 11 Painting**

Carolina Soriano<sup>1,2</sup>, Amadeu Creus<sup>1</sup>, Ricard Marcos<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain.*

<sup>2</sup>*CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII*

\*Correspondence to: Ricard Marcos, Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Genètica i de Microbiologia, Grup de Mutagènesi, Edifici Cn, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain.

E-mail address: [ricard.marcos@uab.es](mailto:ricard.marcos@uab.es)

**Abstract**

Arsenic is a world health problem due to the seriousness of its effects, mainly related with the increase of cancer. Important discrepancies exist about the genotoxic mechanisms of arsenic, although clastogenicity is usually a well accepted one. To confirm this view, an analysis of 55 *Tk*<sup>-/-</sup> mutants derived from L5178Y *Tk*<sup>+/-</sup> mouse lymphoma cells, 22 spontaneous and 23 arsenic trioxide-treated mutants, previously analyzed for LOH in a earlier work, were examined by chromosome painting. Our results showed that ATO is a strong clastogen, predominantly inducing LOH at chromosomal level in the *Tk* gene of mouse lymphoma cells. In general, chromosome 11 painting probe confirms preceding observations from LOH analysis, and gives us new information about these mutants, such as the presence of iso-11 chromosomes, the number of chromosome 11, and possible homologous and non-homologous mitotic recombination. However, these results are not showing remarkable differences between spontaneous and ATO-treated mutants at cytogenetic level. The most important finding is that regions of LOH might not usually result from deletions, but from recombinational events.

*Keywords:* *Tk* locus; Arsenic trioxide (ATO, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>); Mouse lymphoma assay; Loss of heterozygosity (LOH).

## 1. Introduction

The mouse lymphoma assay (MLA), using the thymidine kinase (*Tk*) gene as a reporter gene in L5178Y *Tk*<sup>+/-</sup> 3.7.2c cells, is the most widely used of the various *in vitro* mammalian cell gene mutation assays (Moore *et al.*, 2002). This assay detects a wide spectrum of genetic damage, including both point and chromosomal mutations. L5178Y cells are mutated at the *Trp53 locus* which makes these cells particularly sensible to multiple mutants (Clark *et al.*, 2004). Due to *Tk locus* autosomal localization, the MLA detects not only intragenic events, mainly point mutations, but also loss of heterozygosity (LOH). This LOH can result from entire *Tk* gene loss to karyotypically visible deletions and rearrangements of the *Tkb* (the functional allele) bearing chromosome (Chen *et al.*, 2002). LOH is an important mutational event in tumorigenesis and is frequently observed in a variety of human cancers at loci harboring tumor suppressor genes (Lasko *et al.*, 1991). These features make the MLA particularly useful for evaluating the ability of chemicals to induce a wide variety of mutational events (Clive *et al.*, 1995; Harrington-Brock *et al.*, 2003).

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) studies have shown that *Tk* gene resides at the distal end of the chromosome 11, band E1-2 (Hozier *et al.*, 1991). The two chromosomes 11 are essentially equal, but are distinguishable by a centromeric heteromorphism (Hozier *et al.*, 1982). The homologous chromosome 11 with the smaller centromere has been designated chromosome 11a, while with the larger centromere is called 11b, where *Tkb* is present (Sawyer *et al.*, 1985). These two chromosomes can be distinguished in a painted preparation just by this heteromorphism.

The *Tk*<sup>-/-</sup> mutants recovered in the MLA display a bimodal frequency distribution of colony sizes. It has been long characterized that there are two classes of *Tk* mutants that differ in their growth rate developing two kinds of colony sizes: large colonies (LC) and small colonies (SC). These two growth-rate phenotypes seem to be associated with different extents and types of genetic lesions, being dependent on the identity of the mutagen employed (Clive *et al.*, 1979; Moore *et al.*, 1987; 1989). The molecular distinction between LC and SC mutants is not clear, since *Tkb* appeared to be completely lost in many mutants in both size classes. Generally, LC are usually the result of small intragenic mutations such as point mutations, small deletions and small insertions involving only the *Tk* gene and showing a cytogenetically normal

chromosome 11, while SC mutants are associated with gross structural changes, which presumably is affecting growth regulating genes, and are induced in greater proportions by clastogenic agents and other agents causing multilocus events (Clive *et al.*, 1979; Hozier *et al.*, 1981, 1982; Moore *et al.*, 1985, 1986; Applegate *et al.*, 1990). However, the majority of MLA mutants, both spontaneous and induced, are the result of loss of heterozygosity (LOH) (Clive *et al.*, 1990).

Long-term exposure to inorganic arsenic has been documented to induce cancers and vascular diseases in a dose-response relationship (Tapio y Grosche, 2006). Nevertheless, arsenic has also demonstrated to have anticancer activity in some cases; thus, arsenic trioxide (ATO, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) is an inorganic trivalent arsenic form, currently used as treatment against acute promyelocytic leukaemia (APL) (Antman, 2001; Waxman y Anderson, 2001). In a recent study (Soriano *et al.*, 2008), forty-nine *Tk*<sup>-/-</sup> mutant colonies obtained from MLA, after 4 h-treatment with 10 μM ATO, and forty-nine mutant colonies from independent untreated cultures, were used to analyze and to characterize the mutational spectrum induced by this arsenic compound, as a way to understand its mechanism of action. RT-PCR analysis of *Tk* cDNA and PCR amplifications of eight selected microsatellite sequences on chromosome 11 to detected allelic loss, which is usually observed as LOH, were used to carry out this screening (Applegate *et al.*, 1990; Liechty *et al.*, 1994; 1998). Our results showed that ATO is a strong clastogen, which predominantly induce SC (87%), with LOH affecting several loci spread on chromosome 11 measured as loss of microsatellite markers.

In the current study, we tried to clarify how ATO induces LOH in the MLA. To complete and have a deeper acknowledgment about the mutagenic events caused by ATO, a total of 55 *Tk*<sup>-/-</sup> mutants, 22 spontaneous and 23 ATO-treated, previously analyzed for LOH (Soriano *et al.*, 2008), were studied by chromosome painting. The chromosome 11 painting probe can reveal certain features of the mutants that are not discernible by LOH analysis, such as chromosome rearrangements and chromosome copy number, and can be used to determine if extensive LOH results from deletions or chromosome rearrangements.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Cells and culture medium

L5178Y/*Tk*<sup>+/-</sup>-3.7.2C mouse lymphoma cells were used for the mutation assay. They were kindly provided by Dr. Olivier Gillardeux (Sanofi-Synthélabo, Paris, France) and were cultured to prepare master stocks. Master stocks were maintained in liquid nitrogen, at a density of  $2 \times 10^6$  cells/mL, in culture medium containing 5% dimethyl sulfoxide (DMSO). They were confirmed as free of mycoplasma by PCR.

Cells were cultured in suspension in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated horse serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 1 mM sodium pyruvate and 2.5 µg/mL amphotericin B. The serum concentration was lowered during the treatment to 5% and raised to 20% when cells were dispensed into microwells. The cultures were routinely diluted at  $2 \times 10^5$  cells/mL each day to prevent overgrowth ( $> 10^6$  cells/mL). Cell density was determined with a haemocytometer. To prepare working stocks for gene mutation experiments, cultures were purged of excess *Tk*<sup>-/-</sup> mutants by culturing the cells in THMG medium for 24 h. This medium contains thymidine (9 µg/mL), hypoxanthine (15 µg/mL), methotrexate (0.3 µg/mL) and glycine (22.5 µg/mL). After that, cells were transferred to THG medium (without methotrexate) for 2 days. The purged cultures were checked for low background *Tk*<sup>-/-</sup> mutants and stored in liquid nitrogen.

### 2.2 Gene mutation assay

MLA was carried out as previously described (Soriano *et al.*, 2007). The *Tk*<sup>-/-</sup> mutants were selected adding 4 µg/mL of TFT to each culture. Each TFT-treated culture was dispensed at 0.2 mL/well on 96-well plates. The microwell plates were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 12 days and scored for the number of microwells containing colonies. Just six mutant colonies were removed from each microwell plate to study the mutational spectrum of ATO. The putative *Tk*-deficient mutant clones were diluted in 15 mL of selection medium (TFT), incubated to confirm their *Tk* status and remaining in culture until getting enough cells to carry out DNA/RNA extraction ( $8 \times 10^5$  cells/mL). Moreover, samples of each mutant colony culture were maintained in liquid nitrogen, at a density of  $2 \times 10^6$  cells/mL, in culture medium containing 5% DMSO, for future experiments.

### *2.3 Preparation of metaphase chromosomes for painting*

Metaphase chromosomes suitable for painting were prepared from each mutant clone by treating 5 mL cell suspension ( $1 \times 10^6$  cells/mL) with 0.1  $\mu\text{g/mL}$  of colcemid for 2 h at 37 °C in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ . Cells were pelleted by centrifugation at 130 g for 8 min. The supernatant was decanted and the pellet resuspended in the residual medium. Then, 5 mL of 0.075 M KCl was added slowly with gentle agitation and the suspension was incubated at 37 °C for 25 min. During this time, each sample was vortexed every 5 min during 10 s. The suspension was again centrifuged at 130 g for 8 min. The supernatant was decanted and the pellet resuspended in the residual fluid. Next, 5 mL Carnoy's fixative (4:1 cold methanol:glacial acetic acid) was added slowly with gentle agitation. Then, fixed preparations were pelleted at 130 g for 8 min, and washed twice with fresh fixative. Slides with metaphase spreads were prepared by dropping 25  $\mu\text{L}$  of fixed cells onto clean glass slides. Slides were aged for 5 days at room temperature and then stored at -20 °C prior to hybridization.

### *2.4 Chromosome 11 painting*

Chromosomes on slides were dehydrated in 100% ethanol for 5 min and dried at room temperature. Then slides were incubated in 0.01% pepsin solution for 3 min at 37 °C, washed twice in 2 $\times$ SSC for 1 min, and rinsed briefly in distilled water. After that, slides were dehydrated by serial ethanol washing for 5 min each in 70%, 90% and 100%, and dried at room temperature. Chromosomes were denatured by incubating for 2 min at 65 °C in 70% formamide, 2 $\times$ SSC. Prepared chromosome 11 probe (ready to use, Cy3-conjugated StarFISH; Cambio, UK) was denatured at 65 °C for 10 min, pre-annealed for 45 min at 37 °C and applied 10  $\mu\text{L}$ /slide. The slides were hybridized overnight in a humidified chamber in the dark at 37 °C. Next, they were washed twice in 1 $\times$ SSC for 5 min per wash, twice in 50% formamide/1 $\times$ SSC for 5 min per wash, twice in 1 $\times$ SSC for 5 min per wash, and incubated three times in detergent wash solution (4 $\times$ SSC, 0.05% Tween) for 4 min, everything at 45 °C. After that, slides were counterstained with DAPI and stored in the dark at 4 °C. At least 10 metaphases for each slide were examined, and the abnormalities recorded. It is important to take into account that each cell culture comes from a colony from a unique mutated cell.

### 3. Results

#### 3.1 Cytotoxic and mutagenic responses to arsenic trioxide

The mouse lymphoma L5178Y/*Tk*<sup>+/-</sup> cells were exposed to various doses of arsenic trioxide (ATO) as previously described in Soriano et al., (2007). ATO (7  $\mu$ M and 10  $\mu$ M) induced a clear increase in the *Tk* mutant frequency (MF) after 4 h of treatment, inducing more SC mutants (87%) than LC mutants. The cell survival (relative total growth, RTG) data of ATO was 38% at 7  $\mu$ M and 25% at 10  $\mu$ M, from the average of two experiments; therefore, the induced cytotoxicity was 62% and 75%, respectively. It should be also noticed that the average mutant frequency (MF) induced in ATO-treated cells (10  $\mu$ M) was of  $611.5 \times 10^{-6}$ . This value is more than five-fold the spontaneous MF ( $117.5 \times 10^{-6}$ ). In addition, ATO induced a dose-related cytotoxicity in the MLA.

A previous study analyzing the loss of heterozygosity (LOH) of *Tk*-deficient mutant has been carried out (Soriano *et al.*, 2008). The results obtained in the analysis of the mutational spectrum of ATO-induced mutants confirm that this compound is a potent inducer of LOH, which would confirm the clastogenic potential attributable to arsenic compounds. Nevertheless, a direct chromosome approach is needed to confirm such data.

#### 3.2 Cytogenetic analysis of TK-deficient mutants

To analyze the presence of gross chromosomal changes in the LOH mutants, we have used chromosome painting. This technique shows that in this cell line the modal chromosome number of parental L5178Y cell line was 40; that one chromosome 12 was joined to a chromosome 13 by a Robertsonian translocation, producing a metacentric chromosome; and that there were no structural abnormalities involving chromosome 11 in the parental cells (Figure 1A). It must be pointed out that methotrexate pretreatment to reduce the background mutation fraction did not affect the karyotype of the parental cells.

A total of 22 spontaneous mutants and 23 ATO-treated mutants, previously evaluated for LOH (Soriano *et al.*, 2008), were examined by chromosome painting using a whole chromosome 11 probe. The number of mutant clones painted from each



LOH category is shown in Figure 2. Tables I and II summarize the results of LOH and painting analyses for these mutants. The mutants analyzed included point mutants (LOH was not observed at any of the test loci) and mutants with varying degrees of LOH, from loss of the *Tk1b* allele alone, to loss of markers at all tested loci. In every painted mutant there were at least two chromosomes 11 in each cell; thus, mutants containing only one copy of chromosome 11 were not observed.

All LC mutants showing point mutations in their cDNA showed a normal karyotype, keeping both chromosomes 11. Thus, each metaphase spread had two painted chromosomes 11 which appeared normal in length, one being an 11a and the other an 11b, as determined by centromeric heteromorphism, as it is represented in Figure 1B.

The fusion of two chromosomes 11 by a Robertsonian translocation was observed in three spontaneous mutants (10LC, 24SC and 16SC), which seemed independent of *Tk* mutation (Figure 1C). These three mutants had apparent iso-11 chromosomes (i.e. two copies of chromosome 11 joined by a centromeric fusion). It is not clear whether the apparent iso-11 represents an 11a-11b fusion, an 11b-11b fusion or an 11a-11a fusion, since there is no apparent demarcation between the fused centromeres. However, taking into account the previous results obtained by LOH analysis, it could be stated that 10LC and 16SC iso-11 are 11a-11a since they had LOH at all tested loci and therefore is expected to have lost chromosome 11b. On the other hand, 24SC mutant must be 11a-11b because LOH analysis determines that this mutant has lost all tested microsatellites from *Tk1* to *D11Mit36*. It is not clear what role would play an isochromosome in mutation at the *Tk locus* and it may be the result of a secondary event. A further translocation was observed in a small colony mutant (5SC), that presents a translocation involving one chromosome 11 and another chromosome, both fused by the telomere of the non 11 chromosome and the centromere of the 11 chromosome (Figure 1D).

All mutants which have lost all tested loci (complete LOH) have at least two chromosomes 11 (both 11a), two mutants (19S and 18SC) carrying three 11 chromosomes and none monosomic mutant for chromosome 11 was found. The 19S ATO-treated mutant presents two equal chromosomes 11a and another one shorter which to correspond to one 11b (Figure 3A); the 18SC mutant presents three 11a

chromosomes. Moreover, the mutant 8SC, which has complete LOH, is the only mutant analyzed that has shown a non 11 translocation on the distal end of one of its 11a chromosomes (Figure 3B).

In addition, there are other two ATO-treated mutants (4L and 25S) also presenting three chromosomes 11, one of them being a shorter 11b, confirming the LOH of the tested microsatellites, from *Tkl* to *D11Mit24* (Figure 3C).

A total of five mutants (14L, 3S, 4S, 9S and 4SC) apparently have a chromosome 11b abnormally long, but it is all of 11 origin, as determined by chromosome painting (Figure 3D). These mutants present LOH extend from *Tkl* to *D11Mit48*. A possible explanation could be a non-homologous recombination between chromosomes 11 that would explain the LOH of *Tkl* and *D11Mit48* microsatellites. Something similar happens to 22L mutant that present an abnormal long length of 11b and it was classified as suffering a LOH from *Tkl* to *D11Mit24* (Figure 3E).

#### 4. Discussion

The results obtained in this investigation by using chromosome painting confirm our previously reported data obtained by *Tkl* cDNA and LOH analysis (Soriano *et al.*, 2008), showing that ATO is a strong clastogen, which predominantly induces LOH as a result of deletion/recombinational events at chromosomal level in the *Tk* gene of mouse lymphoma cells, and give new information that could not have been obtained by the techniques previously mentioned. On the other hand, these results are not showing big differences between the spontaneous and ATO-treated mutants at cytogenetic level.

As other authors have previously reported, the L5178Y cell line is mutated for *Trp53* (Storer *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 1998), making these cells particularly susceptible to induction of multiple mutations as reflected in the spontaneous mutants, but at the same time gives a high sensitivity to the assay. It has been described that spontaneous *Tk* mutants are mainly consequences of LOH, result of deletion, homologous recombination, illegitimate recombination with translocation, and whole chromosome loss. Moreover, duplication of chromosome 11 was usually accompanied by deletion, translocation, and whole chromosome loss partially or completely (Liechty *et al.*, 1998; Honma *et al.*, 2001).

From our results is noticeable that spontaneous mutacional spectrum obtained is in accordance of the previously cited studies (Liechty *et al.*, 1998; Honma *et al.*, 2001), and frequently suffering from whole chromosome 11b loss as early showed LOH analysis (12/49 mutants, or 24.5%) (Soriano *et al.*, 2008), and now confirmed by FISH. Nevertheless, mutants with whole 11b chromosome loss, in stead of having only a chromosome 11a, usually two copies of 11a are present because of duplication through non-disjunction. It seemed to occur in compensation for the loss of some part of chromosome 11. In fact, it is difficult to find a mutant that was monosomic for chromosome 11; in our case none was found. This event is probably explained because having two chromosomes 11 must provide some kind of growth advantage. (Liechty *et al.*, 1998; Honma *et al.*, 2001). Moreover, *Tk* mutants with large deletions and unbalanced translocations sometimes are also accompanied by the duplication of chromosome 11a, resulting in partial trisomy, such as ATO-induced mutants 19S, 25S and 4L (Figure 3A, 3C).

The six mutants with large LOH analyzed by FISH (4L, 8L, 19L, 22L, 24SC and 25S), only 2 (4L and 25S) are result from deletion, rest of them apparently present a normal chromosome 11 (Figure 3C). These mutants could be the result of homologous recombination or deletion of a region followed by duplication (Liechty *et al.*, 1998). In other cases as 19S mutant, which has also suffered LOH at all tested loci, or 22L mutant, with an extensive LOH from *Tk1* to *D11Mit24*, they retained both chromosomes 11a and 11b, based on the centromeric heteromorphism (Figure 3A, 3E). Although 11b of 19S mutant is shorter, they should not be present according to LOH analysis. It could be proposed that much of the LOH measured in mutants, at least in cases of extensive LOH, is unlikely to be the result of deletion but instead could reflect recombinational events.

However, most of *Tk* mutants analyzed by LOH and FISH have just LOH from *Tk1* to *D11Mit48*, 19/49 or 38.8% of spontaneous mutants and 28/49 or 57.2% of ATO-treated mutants (Soriano *et al.*, 2008). The chromosome painting resolution, ~16 cM does not let to evaluate by eye small deletions, being impossible to determine if these mutants are consequence of deletion or recombinational events. Nevertheless, 4 of 9 LOH *Tk1* to *D11Mit48* ATO-treated mutants analyzed by FISH (14L, 3S, 4S and 9S) and one spontaneous mutant (4SC) seem to contain a chromosome 11b longer than its homologue 11a (Figure 3D). All the extra length of chromosome 11b was of 11-origin, as chromosome painting clearly shows. It is possible that the differences in chromosome length seen in these mutants are an artifact of the painting technique, although this event is just seen in this kind of mutant, not appearing in mutants with point mutations. However, this event could also be explained by a non-homologous recombination, or a deletion or homologous recombination followed by duplication at chromosome 11b, outside the LOH region, as it was described previously (Liechty *et al.*, 1998). In this context, Applegate *et al.* (1990) proposed that some of these alterations in L5178Y may be a result of recombinational events, based on their observation of a 2- to 4-fold increase in the number of copies of *Tka* gene sequences in most of their *Tk*<sup>-/-</sup> mutants that had lost the *Tkb* allele supporting the proposal of homologous recombination.

Therefore, chromosomal damage from arsenic exposure is a well established feature of arsenic toxicity showing positive results at MN and CA *in vitro* (Basu *et al.*, 2001) and *in vivo* assays (Patlolla and Tchounwou, 2005), and in the induction of DNA

breakage in in the comet assay (Guillamet *et al.*, 2004; Yedjou and Tchounwou, 2007) in agreement with our results, but it could be a secondary effect of more immediate form of arsenic-related toxicity, such as oxidative damage. The metabolism of inorganic arsenic results in the generation of free radicals, providing a source of oxidative stress. Arsenic-induced oxidative stress that can provoke a broad spectrum of effects on the DNA, including DNA single- and double-strand breaks, abasic sites, DNA-protein cross-links, and DNA base modifications (Kitchin and Ahmad, 2003), supported by numerous studies as reviewed in Rossman (2003). On the other hand, the concept that arsenite increases oxidant levels is supported by studies demonstrating protection against arsenite genotoxicity by GSH elevation and antioxidants (Rossman, 2003; Tapio and Grosche, 2006).

Summing up all the results obtained in this chromosome painting study, it seems that they agree with the LOH results obtained previously by PCR analysis of 8 microsatellites, confirming that ATO is a strong clastogen at the concentration of 10  $\mu$ M (Soriano *et al.*, 2008). However, they do not show big differences between spontaneous and ATO-treated mutant clones at cytogenetic level. However, this study has given more information about numerical and structural aberrations in the karyotypes of the mutant clones, not visible by LOH, such as the presence of iso-11 and total number of chromosome 11 and demonstrate that ATO mainly induces deletions and recombinational events at chromosomal level in the *Tk* gene of mouse lymphoma cells, also covering other parts of chromosome 11. Moreover, our results confirm SC mutants are mainly product of cytogenetical rearrangements in contrast with LC, mostly result of point mutations cytogenetically normal.

## **Acknowledgements**

Carolina Soriano is supported by a postgraduate fellowship from the Generalitat de Catalunya. This investigation has been supported in part by the Spanish Ministry of Education and Science (CAICYT, VEM2004-08597, SAF2008-02933) and by the Generalitat de Catalunya (CIRIT, 2005SGR-00136).

## 5. References.

- Antman, K.H. Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy. *Oncologist* 6 Suppl 2: 1-2 (2001).
- Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., Juhn, G., Kasweck, K.L., Lin, P.F., Wadhams, A. and Hozier, J.C. Molecular dissection of mutations at the heterozygous thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 51-55 (1990).
- Basu, A., Mahata, J., Gupta, S. and Giri, A.K. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat Res* 488: 171-194 (2001).
- Chen, T., Harrington-Brock, K. and Moore, M.M. Mutant frequencies and loss of heterozygosity induced by N-ethyl-N-nitrosourea in the thymidine kinase gene of L5178Y/TK(+/-)-3.7.2C mouse lymphoma cells. *Mutagenesis* 17: 105-109 (2002).
- Clark, L.S., Hart, D.W., Vojta, P.J., Harrington-Brock, K., Barrett, J.C., Moore, M.M. and Tindall, K.R. Identification and chromosomal assignment of two heterozygous mutations in the Trp53 gene in L5178Y/Tk(+/-)-3.7.2C mouse lymphoma cells. *Mutagenesis* 13: 427-434 (1998).
- Clark, L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. Loss of P53 heterozygosity is not responsible for the small colony thymidine kinase mutant phenotype in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutagenesis* 19: 263-268 (2004).
- Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F., Batson, A.G. and Brown, M.M. Validation and characterization of the L5178Y/TK+/- mouse lymphoma mutagen assay system. *Mutat Res* 59: 61-108 (1979).
- Clive, D., Glover, P., Applegate, M. and Hozier, J. Molecular aspects of chemical mutagenesis in L5178Y/tk +/- mouse lymphoma cells. *Mutagenesis* 5: 191-197 (1990).
- Clive, D., Bolcsfoldi, G., Clements, J., Cole, J., Homna, M., Majeska, J., Moore, M., Muller, L., Myhr, B. and Oberly, T. Consensus agreement regarding protocol issues discussed during the mouse lymphoma workshop: Portland, Oregon, May 7, 1994. *Environ Mol Mutagen* 25: 165-168 (1995).
- Guillamet, E., Creus, A., Ponti, J., Sabbioni, E., Fortaner, S. and Marcos, R. In vitro DNA damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 19: 129-135 (2004).

- Harrington-Brock, K., Collard, D.D. and Chen, T. Bromate induces loss of heterozygosity in the thymidine kinase gene of L5178Y/Tk(+/-)-3.7.2C mouse lymphoma cells. *Mutat Res* 537: 21-28 (2003).
- Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. Spindle poisons induce allelic loss in mouse lymphoma cells through mitotic non-disjunction. *Mutat Res* 493: 101-114 (2001).
- Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M. Cytogenetic distinction between the TK+ and TK- chromosomes in the L5178Y TK+/- 3.7.2C mouse-lymphoma cell line. *Mutat Res* 105: 451-456 (1982).
- Hozier, J., Scalzi, J., Sawyer, J., Carley, N., Applegate, M., Clive, D. and Moore, M.M. Localization of the mouse thymidine kinase gene to the distal portion of chromosome 11. *Genomics* 10: 827-830 (1991).
- Kitchin, K.T. and Ahmad, S. Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicol Lett* 137: 3-13 (2003).
- Lasko, D., Cavenee, W. and Nordenskjold, M. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu Rev Genet* 25: 281-314 (1991).
- Liechty, M.C., Hassanpour, Z., Hozier, J.C. and Clive, D. Use of microsatellite DNA polymorphisms on mouse chromosome 11 for in vitro analysis of thymidine kinase gene mutations. *Mutagenesis* 9: 423-427 (1994).
- Liechty, M.C., Scalzi, J.M., Sims, K.R., Crosby, H., Jr, Spencer, D.L., Davis, L.M., Caspary, W.J. and Hozier, J.C. Analysis of large and small colony L5178Y tk-/- mouse lymphoma mutants by loss of heterozygosity (LOH) and by whole chromosome 11 painting: detection of recombination. *Mutagenesis* 13: 461-474 (1998).
- Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. Analysis of trifluorothymidine-resistant (TFTr) mutants of L5178Y/TK+/- mouse lymphoma cells. *Mutat Res* 151: 161-174 (1985).
- Moore, M.M., Amtower, A., Strauss, G.H. and Doerr, C. Genotoxicity of gamma-irradiation in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat Res* 174: 149-154 (1986).
- Moore, M.M., Brock, K.H., Doerr, C.L. and DeMarini, D.M. Mutagenesis of L5178Y/TK(+/-)-3.7.2C mouse lymphoma cells by the clastogen ellipticine. *Environ Mutagen* 9: 161-170 (1987).



- Moore, M.M., Harrington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. Differential mutant quantitation at the mouse lymphoma tk and CHO hgp<sub>rt</sub> loci. *Mutagenesis* 4: 394-403 (1989).
- Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolesfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, J., Ouldelhkim, M.C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F., Jr. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: follow-up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, April 2000. *Environ Mol Mutagen* 40: 292-299 (2002).
- Patlolla, A.K. and Tchounwou, P.B. Cytogenetic evaluation of arsenic trioxide toxicity in Sprague-Dawley rats. *Mutat Res* 587: 126-133 (2005).
- Rossman, T.G. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat Res* 533: 37-65 (2003).
- Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. Cytogenetic characterization of the L5178Y TK<sup>+</sup>/3.7.2C mouse lymphoma cell line. *Mutat Res* 147: 243-253 (1985).
- Soriano, C., Creus, A. and Marcos, R. Gene-mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay. *Mutat Res* 634: 40-50 (2007).
- Soriano, C., Creus, A. and Marcos, R. Arsenic trioxide mutational spectrum analysis in the mouse lymphoma assay. *Mutat Res* 646: 1-7 (2008).
- Storer, R.D., Kraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. The mouse lymphoma L5178Y Tk<sup>+</sup>/ cell line is heterozygous for a codon 170 mutation in the p53 tumor suppressor gene. *Mutat Res* 373: 157-165 (1997).
- Tapio, S. and Grosche, B. Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutat Res* 612: 215-246 (2006).
- Waxman, S. and Anderson, K.C. History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy. *Oncologist* 6 Suppl 2: 3-10 (2001).
- Yedjou, C.G. and Tchounwou, P.B. In-vitro cytotoxic and genotoxic effects of arsenic trioxide on human leukemia (HL-60) cells using the MTT and alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assays. *Mol Cell Biochem* 301: 123-130 (2007).

### Legends:

**Figure 1.** L5178Y control spread with a normal karyotype (A). 11LC mutant has a point mutation in *Tk1* and presents a normal karyotype (B). 10LC mutant has an iso11 chromosome, 11 joined at the centromere (C). 5SC mutant presents a translocation involving one chromosome 11 and a different one, both fused by the telomere of non-11 chromosome and centromere of chromosome 11 (D). The arrows are showing the 11 chromosomes, and which 11 chromosome is in every case.

**Figure 2:** Map of chromosome 11 showing the 8 microsatellite loci studied (*Tk1*, *D11Mit48*, *D11Mit59*, *D11Mit36*, *D11Mit29*, *D11Mit24*, *D11Mit19* and *D11Mit63*), which are heteromorphic in the L5178Y *Tk*<sup>+/-</sup> cell line. Map position is shown in centiMorgans (cM). These microsatellite loci are distributed along the entire length of the chromosome with locations at 78.0, 77.0, 58.5, 47.6, 40.0, 27.8, 13.0 and 2 cM from centromere. Table shows the number of mutants subjected to painting analysis categorized by size phenotype and extent of LOH. LC, large colony mutants. SC, small colony mutants.

**Figure 3.** 19S mutant shows two equal 11a chromosomes and another one shorter which seems to correspond to an 11b, even when it has shown complete LOH (A). 8SC mutant has a clearly 11a translocation at the distal end of non 11 chromosome. This mutant has two 11a chromosomes, containing a complete LOH (B). 4L mutant has two equal 11a chromosomes and a shorter 11b, based on the centromeric heteromorphism, according to LOH analysis which showed that this mutant had LOH from *Tk1* to *D11Mit24* (C). 22L mutant presents an abnormal length of 11b being longer, despite having suffered a LOH from *Tk1b* to *D11Mit24* (D). 4S mutant seems to present an abnormal length of 11b being longer, despite having suffered a LOH from *Tk1b* to *D11Mit48* (E). The arrows are showing the 11 chromosomes, and which 11 chromosome is in every case based on the centromeric heteromorphism.

Figure 1.

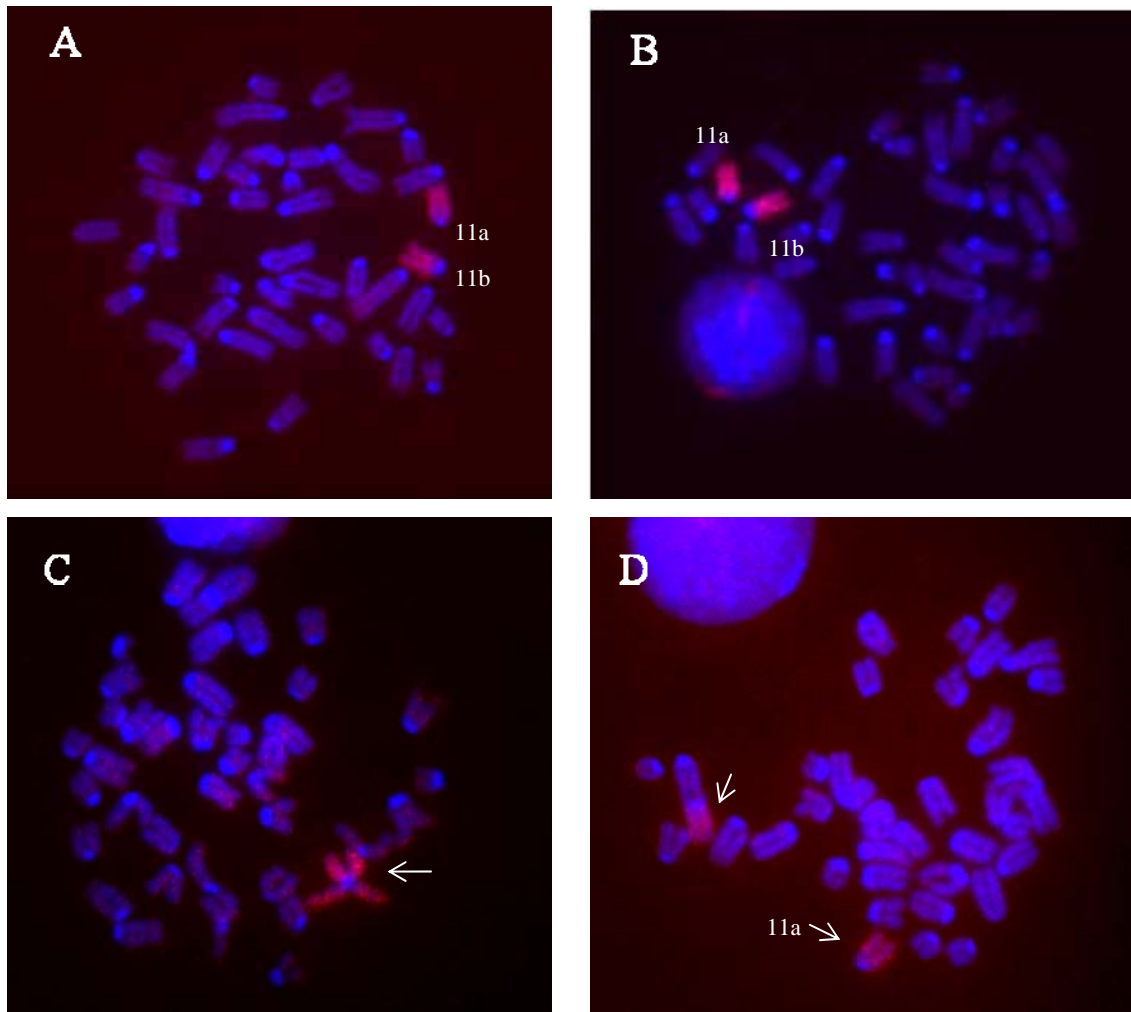
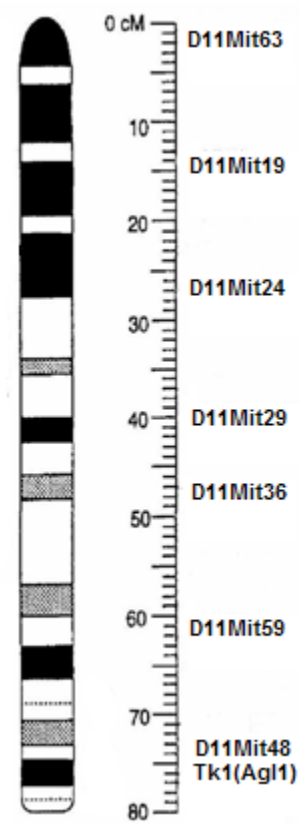
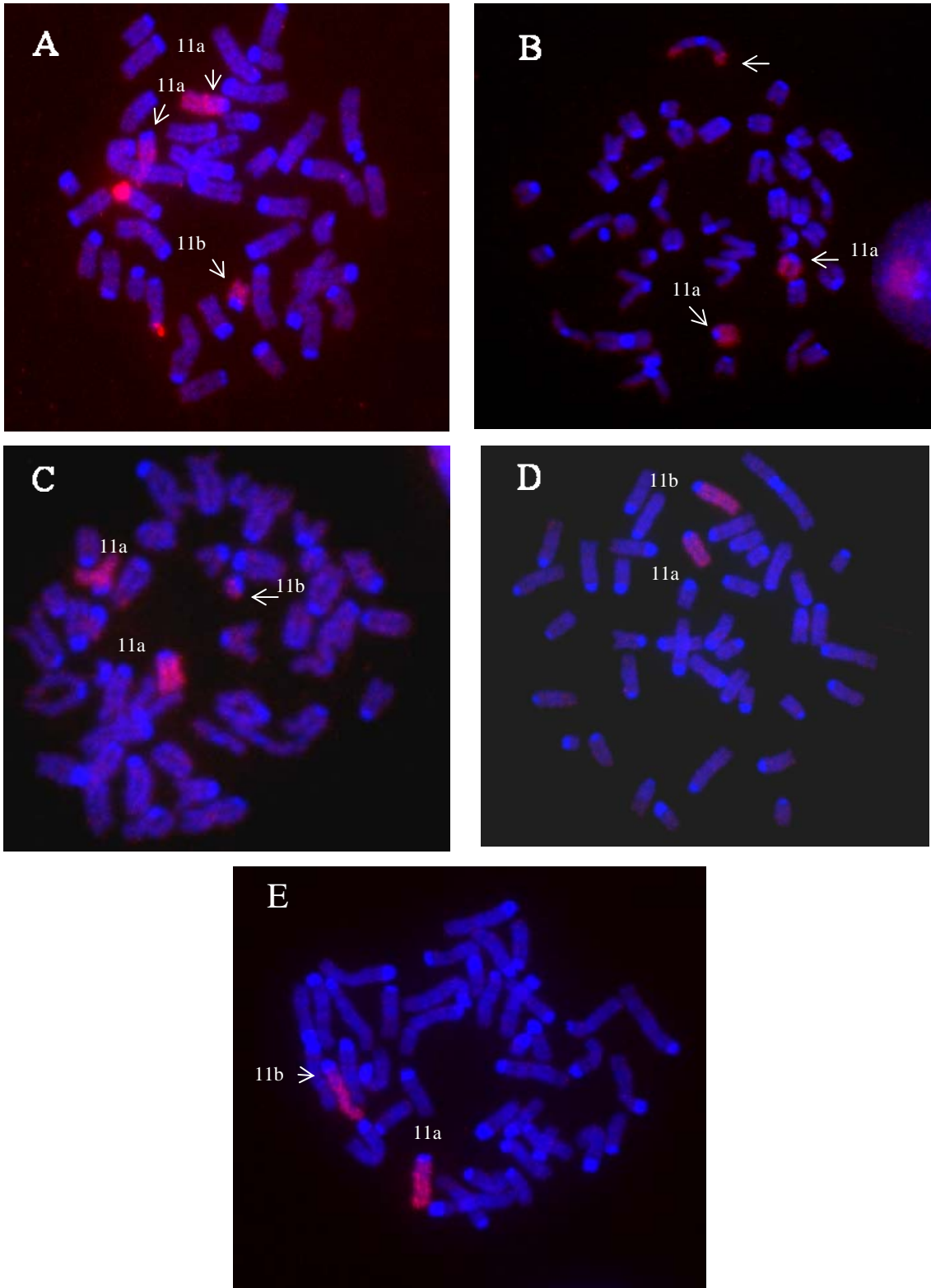


Figure 2.



| Mutants     |    | Mutants analyzed for LOH | Mutations  | Mutants analyzed by chromosome painting |
|-------------|----|--------------------------|--|---|
| Spontaneous | LC | 24                       | Point mutations<br>LOH <i>Tk1-D11Mit48</i><br>Complete LOH   | 6<br>2<br>3                             |
|             | SC | 25                       | LOH <i>Tk1-D11Mit48</i><br>LOH <i>Tk1-D11Mit36</i><br>Complete LOH   | 2<br>1<br>8                             |
| ATO-treated | LC | 25                       | Point mutations<br>LOH <i>Tk1-D11Mit48</i><br>LOH <i>Tk1-D11Mit36</i><br>LOH <i>Tk1-D11Mit24</i><br>Complete LOH | 6<br>2<br>2<br>2<br>2                   |
|             | SC | 24                       | LOH <i>Tk1-D11Mit48</i><br>LOH <i>Tk1-D11Mit24</i><br>Complete LOH   | 7<br>1<br>1                             |

Figure 3.



**Table 1.** Extent of LOH and results of chromosome 11 painting in large colony mutants.

| MUTANTSs                         | LOH          | KARYOTYPE  |
|----------------------------------|--------------|--|
| <b>Point mutations</b>           |              |  |
| 1L                               | None         | Normal   |
| 2L                               | None         | 39 chromosomes, 11 a+b                             |
| 7L                               | None         | Normal   |
| 16L                              | None         | Normal   |
| 20L                              | None         | Normal   |
| 24L                              | None         | Normal   |
| 1LC                              | None         | Normal   |
| 4LC                              | None         | Normal   |
| 6LC                              | None         | Normal   |
| 7LC                              | None         | Normal   |
| 9LC                              | None         | Normal   |
| 11LC                             | None         | Normal   |
| <b>LOH from Tk1 to D11Mit48</b>  |              |  |
| 9L                               | Tk1-D11Mit48 | 40 chromosome, 11 a+b, 11b shorter than normal     |
| 14L                              | Tk1-D11Mit48 | 40 chromosome, 11 a+b, 11b longer than normal      |
| 15LC                             | Tk1-D11Mit48 | Normal   |
| 20LC                             | Tk1-D11Mit48 | Normal   |
| <b>LOH from Tk1 to D11Mit 36</b> |              |  |
| 8L                               | Tk1-D11Mit36 | Normal   |
| 19L                              | Tk1-D11Mit36 | 39 chromosomes, 11 a+b                             |
| <b>LOH from Tk1 to D11Mit 24</b> |              |  |
| 4L                               | Tk1-D11Mit24 | 42 chromosomes, two 11a and one 11b shorter        |
| 22L                              | Tk1-D11Mit24 | 41 chromosomes, 11 a+b, 11b longer than normal     |
| <b>Complete LOH</b>              |              |  |
| 21L                              | All          | 40 chromosomes, 11 a+a                             |
| 26L                              | All          | 40/41 chromosomes, 11 a+a, karyotypically unstable |
| 10LC                             | All          | 39 chromosomes, Iso-11                             |
| 26LC                             | All          | 41 chromosomes, a+a                                |
| 28LC                             | All          | 39 chromosomes, a+a                                |

**Table 2.** Extent of LOH and results of chromosome 11 painting in small colony mutants.

| MUTANTS                          | LOH          | KARYOTYPE  |
|----------------------------------|--------------|--|
| <b>LOH from Tk1 to D11Mit48</b>  |              |  |
| 1S                               | Tk1-D11Mit48 | Normal   |
| 3S                               | Tk1-D11Mit48 | Normal, 11b longer than normal                     |
| 4S                               | Tk1-D11Mit48 | Normal, 11b longer than normal                     |
| 6S                               | Tk1-D11Mit48 | 39 chromosomes, 11 a+b, 2 translocated chromosomes |
| 9S                               | Tk1-D11Mit48 | Normal, 11b longer than normal                     |
| 11S                              | Tk1-D11Mit48 | Normal   |
| 12S                              | Tk1-D11Mit48 | Normal   |
| 4SC                              | Tk1-D11Mit48 | Normal, 11b longer than normal                     |
| 6SC                              | Tk1-D11Mit48 | 41 chromosomes, 11 a+b                             |
| <b>LOH from Tk1 to D11Mit 36</b> |              |  |
| 24SC                             | Tk1-D11Mit36 | 39 chromosomes, Iso-11                             |
| <b>LOH from Tk1 to D11Mit 24</b> |              |  |
| 25S                              | Tk1-D11Mit24 | 41 chromosomes, two 11a and 11b shorter            |
| <b>Complete LOH</b>              |              |  |
| 19S                              | All          | 41 chromosomes, two 11a and 11b shorter            |
| 2SC                              | All          | 41 chromosomes, two 11a, non 11b                   |
| 5SC                              | All          | 38 chromosomes, two 11a, 11 translocated on non 11 |
| 7SC                              | All          | 40 chromosomes, two 11a, non 11b                   |
| 8SC                              | All          | 40 chromosomes, two 11a, 11 translocated on non 11 |
| 13SC                             | All          | 40 chromosomes, two 11a, non 11b                   |
| 16SC                             | All          | 39 chromosomes, Iso-11                             |
| 18SC                             | All          | 41 chromosomes, three 11a, non 11b                 |
| 21SC                             | All          | 40 chromosomes, two 11a, non 11b                   |