

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

Modulación del efecto citotóxico del arsénico por moléculas bioactivas

Trabajo de Tesis para optar al
Título de Doctor en Medicina y Cirugía

Elio Andrés Soria
Médico Cirujano

CORDOBA
REPUBLICA ARGENTINA
2009

Comisión de Seguimiento de Tesis

Director:

Prof. Dr. Aldo Renato Eynard

Integrantes:

Prof. Dra. Mirta Ana Valentich

Prof. Dra. Patricia Adriana Paglini

Artículo 30° del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Medicina y Cirugía:

“LA FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS OPINIONES DE ESTA TESIS.”

Dedicatorias

A mis padres Miriam y Andrés

A mis maestras Guillermina y Laura

Agradecimientos

El desarrollo de la presente Tesis Doctoral implicó compromiso profesional y personal sostenido felizmente por una red irreemplazable de vínculos, destacándose mi familia, amigos y nuevos afectos por su incondicional apoyo. En el ámbito académico, amigos y compañeros de trabajo me brindaron sostén y confianza permanentes, tanto laboral como afectivo, desde el primer día. Así, uno de los mayores logros fue la oportunidad de conocer a estas personas y compartir con ellas esta etapa, durante la cual recibí guía y consejo del Prof. Dr. Aldo R. Eynard, así como de los miembros de la Comisión de Seguimiento de Tesis, las Prof. Dras. Mirta A. Valentich y Patricia A. Paglini. Asimismo, merecen especial mención las Dras. Guillermina A. Bongiovanni (codirectora de la beca doctoral) y Laura R. Pascual, cuya impronta me define como investigador y docente, por lo que mi trabajo, presente y futuro, se vuelve consecuencia de su aporte inextinguible.

Además, agradezco los apoyos académicos y económicos brindados a este proyecto por: Secretaría de Ciencia y Tecnología de esta Universidad (beca doctoral y subsidios de investigación), Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación (beca y subsidio “Ramón Carrillo – Arturo Oñativia”), Ministerio de Educación de la Nación (categorización en el programa de incentivos) y Ministerios de Ciencia y Tecnología Provincial y Nacional (subsidios de investigación).

Una frase dice: “Fuerza para soportar lo que no puedo cambiar, valor para cambiar lo que sí puedo y sabiduría para diferenciar entre ambos”. Le debo lo primero a mi papá, quien me ha dejado un gran legado, y lo segundo a mi mamá, quien me ha honrado con su infinita entrega. Lo tercero aún requiere de un largo camino, que espero siga en compañía de todas estas personas.

Índice

	Pág.
Resumen.....	8
Summary.....	10
1. Introducción.....	12
1.1. Aspectos toxicológicos del arsénico	12
1.1.1. Determinantes ambientales del consumo humano	12
1.1.2. Patología asociada al consumo y clínica en el ser humano.....	13
1.1.3. Situación sanitaria en la República Argentina	14
1.1.4. Metabolismo.....	15
1.1.5. Mecanismos de acción.....	15
1.2. Cáncer e implicancias biomédicas del estrés celular	16
1.2.1. Regulación redox-dependiente de la biología celular.....	16
1.2.2. Oncogénesis y biología tumoral	19
1.2.3. Regulación epigenética nutricional.....	20
1.3. Flavonoides como moléculas bioactivas.....	21
1.3.1. Farmacognosia	21
1.3.2. Farmacocinética.....	23
1.3.3. Potencial biomédico	23
1.3.4. Flavonoides ensayados: quercetina y silimarina	24
1.4. Hipótesis y objetivos	26
1.4.1. Hipótesis	26
1.4.2. Objetivos	26
2. Materiales y métodos	28
2.1. Materiales y equipamiento.....	28
2.1.1. Materiales	28
2.1.2. Equipamiento	29
2.2. Condiciones experimentales.....	30
2.2.1. Cultivo celular	30
2.2.2. Diseño experimental	31
2.2.3. Fraccionamiento celular	32

2.3. Determinación de biomarcadores	33
2.3.1. Citotoxicidad	33
2.3.2. Estrés celular	34
2.3.3. Respuestas celulares y moleculares.....	35
2.4. Análisis estadístico	38
2.4.1. Efecto de los tratamientos.....	38
2.4.2. Efecto del tiempo (modelaciones).....	39
3. Resultados	40
3.1. Cultivo no-tumoral bajo tratamiento agudo (modelo 1: toxicidad temprana).....	40
3.1.1. Citotoxicidad	40
3.1.2. Estrés celular (marcadores derivados del oxígeno y del nitrógeno - estrés oxidativo y nitrosativo, respectivamente-: 2 h de tratamiento)....	44
3.1.3. Respuestas celulares y moleculares I: Citoplasma.....	46
3.1.4. Respuestas celulares y moleculares II: Biomembranas.....	50
3.2. Cultivos modificados (modelos 2 y 3: toxicidad diferencial según tiempo de exposición o según tipo celular, respectivamente).....	51
3.2.1. Cultivo no-tumoral bajo tratamiento subcrónico (modelo 2: toxicidad tardía)	51
3.2.2. Cultivo tumoral bajo tratamiento agudo (modelo 3: efecto antitumoral).....	54
4. Discusión.....	60
Conclusiones.....	77
5. Bibliografía	79
Anexo: Trabajos publicados	95

Resumen

El arsénico es un contaminante ampliamente distribuido en el medio ambiente, siendo un cancerígeno humano de acuerdo a evidencias epidemiológicas, clínicas y experimentales. Se estima que en Argentina existen alrededor de 5 millones de personas que consumen agua con niveles tóxicos del mismo. Se postula que la toxicidad inducida por arsénico podría ser modulada por sustancias dietarias antioxidantes, que intervendrían sobre sus mecanismos prooxidantes, dependiendo de la magnitud de la exposición y del grado de diferenciación celular. Entonces, el objetivo de esta tesis fue determinar el efecto modulador de los flavonoides quercetina y silimarina sobre la toxicidad por arsenito sódico, desarrollando modelos celulares para evaluar diferentes biomarcadores: viabilidad y muerte celular, niveles de especies reactivas, respuestas celulares y moleculares asociadas, integridad y susceptibilidad redox de las membranas biológicas. Modelo 1 (cultivo de células no-tumorales CHO-K1 bajo tratamiento agudo, 8 horas): Inicialmente, las células conservaban su viabilidad pero ya exhibían signos de estrés oxidativo, acompañado por activación de la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) y redistribución de los microfilamentos de actina, co-localizando ambas en el citoplasma. Posteriormente, se encontraron dos formas de respuesta según la exposición fuera continua o no. En el primer caso, la progresión llevó a apoptosis de manera tiempo-dependiente (relación estrés oxidativo-JNK-apoptosis), mientras que en el segundo se halló un proceso de recuperación, con expresión de las proteínas Hsp72 (proteína de choque térmico de 72 kDa) y GGT (γ -glutamiltanspeptidasa). Por otro lado, la vía oxidativa del óxido nítrico (vía nitrosativa) no estaría implicada, al menos tempranamente, como mecanismo de estrés, hallándose una respuesta bifásica (inhibición seguida por recuperación). Modelo 2 (cultivo de células no-tumorales CHO-K1 bajo tratamiento subcrónico, 6 semanas): El tratamiento prolongado con arsenito a bajas concentraciones llevó a un incremento gradual de oxidación de las membranas celulares. Al evaluar la actividad de GGT, se hallaron efectos que dependían más de acciones farmacológicas de los diferentes tratamientos que de modificaciones del

estado redox de las membranas, no presentando arsenito efectos directos. Además, se halló una asociación temporal entre el cambio de los patrones de respuesta a arsenito con una reducción sostenida de 50% en el contenido de gangliósidos, mostrando una relación inversa con la oxidación lipídica. Modelo 3 (cultivo de células tumorales bajo tratamiento agudo, 8 horas): Las líneas ZR-75-1 y MCF-7 muestran disímiles grados de diferenciación, conservando la segunda muchas características del epitelio mamario bien diferenciado. Estas diferencias fueron confirmadas por el hecho que ZR-75-1 mostró elevada actividad constitutiva de GGT, mayor inducción de gangliósidos y una débil respuesta al efecto trófico de quercetina, en el ensayo de viabilidad, donde arsenito se comportó como citotóxico para ambas líneas. Este efecto antitumoral no tuvo directa relación con el estado redox de las membranas neoplásicas. En la línea que presentaba niveles basales altos de GGT (ZR-75-1), el efecto citotóxico se asociaba a su inhibición, apoyando su rol citoprotector y protumoral, mientras que el mismo efecto era observado tras su inducción en células con nivel iniciales menores (MCF-7). Otra diferencia fue que se redujo el contenido de gangliósidos en MCF-7, mientras la tendencia en ZR-75-1 fue de incremento. Así, el valor de los biomarcadores dependería del grado de diferenciación celular y su estado funcional. Conclusiones: En resumen, el estrés inducido por arsenito es de tipo oxidativo, siendo citotóxico y afectando múltiples blancos celulares y moleculares. Silimarina presentó un mejor perfil farmacológico frente a ello, puesto que fue capaz de controlar la respuesta citotóxica temprana asociada a estrés en el Modelo 1, conservó dentro de límites normales los parámetros evaluados en el Modelo 2, y no mostró efectos citoprotectores ni interacciones farmacodinámicas de relevancia en el Modelo 3. Quercetina, en cambio, presentó resultados disímiles frente al arsenito, con inconstancia de efectos positivos en los tres Modelos, acciones farmacológicas adicionales y toxicológicas propias, y potencial protumoral. Los hallazgos aquí presentados apuntan a estimular los estudios bioprospectivos de fitoquímicos, con el propósito de reducir los riesgos sanitarios de la contaminación arsenical en amplias áreas del mundo actualmente.

Summary

Arsenic is a widely-distributed environmental contaminant, being a human pro-neoplastic agent in accordance to epidemiological, clinical and experimental evidences. Around 5 million people consume water with toxic arsenic levels in Argentina. It has been proposed that arsenic toxicity could be modulated by dietary antioxidant compounds, which may act on its pro-oxidant mechanisms depending on the exposure extent and cellular differentiation grade. Thus, the aim of this thesis was to determine the modulating effect of the flavonoids quercetin and silymarin on the sodium arsenite toxicity, by developing cellular models in order to evaluate different biomarkers: cellular viability and death, reactive specie levels, associated cellular and molecular responses, biological membrane integrity and redox susceptibility. Model 1 (culture of non-tumour cells CHO-K1 under acute treatment, 8 hours): Initially, cells conserved their viability, but they already exhibited signs of oxidative stress, followed with the c-Jun N-terminal kinase (JNK) and actin microfilament redistribution, with both ones co-localizing in the cytoplasm. Then, two kinds of response were found depending on the exposure (continued or not). In the first case, the progression led to apoptosis in a time-dependent manner (oxidative stress-JNK-apoptosis relation), whereas cell recuperation was seen in the second case, with the expression of the proteins Hsp72 (72 kDa heat shock protein) and GGT (γ -glutamyltranspeptidase). On the other hand, the nitric oxide-related oxidative pathway (nitrosative pathway) might not be implicated, at least promptly, as stress mechanism, with a biphasic response being found (inhibition followed by recovery). Model 2 (culture of non-tumour cells CHO-K1 under sub-chronic treatment, 6 weeks): The prolonged treatment with arsenite at low concentrations caused a gradual increase of the cellular membrane oxidation. When GGT was assayed, outcomes depended on pharmacological interactions of the different treatments, with modifications of the membrane redox state being less implicated. Arsenite did not show direct effects. Also, it was found a temporal association between the change of the response pattern to arsenite and the sustained 50% reduction of ganglioside content,

showing an inverse relation with membrane oxidation. Model 3 (culture of tumour cells under acute treatment, 8 hours): The lines ZR-75-1 and MCF-7 showed dissimilar grades of differentiation, with the second one exhibiting many features of well-differentiated mammary epithelia. Those differences were confirmed by the fact that ZR-75-1 presented high constitutive GGT activity and ganglioside induction, and a weak response to the quercetin trophic effect in the viability assay, where arsenite was cytotoxic for both lines. This anti-tumour effect was not directly-related with the redox state of the neoplastic membranes. In the line with high basal levels of GGT (ZR-75-1), the cytotoxic effect was associated to enzyme inhibition, supporting its cytoprotective and pro-tumour role, whereas the cell death was seen after GGT induction in cells with lower basal levels (MCF-7). Another disparity was the decrease of ganglioside content in MCF-7, whereas it was found an increasing tendency in ZR-75-1. Thus, the biomarker value may depend on the grade of cell differentiation and their functional state. Conclusions: The kind of stress induced by arsenite is oxidative, being cytotoxic and affecting multiple cellular and molecular targets. Silymarin presented the best pharmacological profile in front of it, since it was able to control the early cytotoxic response associated to stress in the Model 1, maintained within normal limits the parameters studied in the Model 2, and did not show cytoprotective effects or relevant pharmacodynamical interactions in the Model 3. On the contrary, quercetin exhibited dissimilar results in front of the arsenite, with inconstant positive effects in the three Models, own additional pharmacological-toxicological actions, and pro-tumour potential. The findings showed here lead to stimulate the bioprospective studies of phytochemicals with the purpose of reducing the sanitary risks of the arsenical contamination in extensive areas worldwide at present.

1. Introducción

1.1. Aspectos toxicológicos del arsénico

1.1.1. Determinantes ambientales del consumo humano

El arsénico es un elemento ampliamente distribuido en el medio ambiente, siendo transportado principalmente por el agua. Evidencias epidemiológicas, clínicas y experimentales han demostrado que el arsénico es un cancerígeno humano ⁽¹⁾. Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido 10 µg/L como límite de concentración del mismo en el agua potable para consumo humano ⁽²⁾. Debido al origen geológico del suelo de la República Argentina, las capas freáticas de las zonas bajas como la Llanura Pampeana contienen elevados valores, incluso hasta 1 mg/L de arsénico ⁽³⁾. La presencia de arsénico en estos suelos data de finales de la Era Terciaria y principios de la Cuaternaria, cuando sedimentos volcánicos fueron depositados en las llanuras. Adsorbido como oxianiones en oxihidróxidos de hierro, aluminio y manganeso, fue movilizado a los acuíferos aluviales donde, debido al ambiente reductor, los oxihidróxidos fueron disueltos por procesos biogeoquímicos, liberando al arsénico en el agua subterránea ⁽⁴⁾. En función de datos obtenidos en diferentes fuentes de agua, se estima que en Argentina existen alrededor de 5 millones de personas que consumen agua con niveles arsenicales tóxicos ⁽⁵⁾. Además, por ser un contaminante natural, afecta a toda la biota a través de la cadena trófica ⁽⁶⁾, hallándose principalmente en ciertos alimentos humanos (dependiendo del tipo y origen de éstos), como en el arroz, la papa, los vegetales verdes, el pescado y otros alimentos marinos ⁽⁷⁾. En algunas especies (algas marinas y peces), el arsénico es incorporado en compuestos orgánicos de menor toxicidad y mejor perfil cinético (rápido *clearance* -eliminación-), como arsenobentaína y arsenocolina ⁽⁸⁾. Como fuentes humanas de contaminación, se pueden citar: desechos industriales (pinturas, disecantes, semiconductores, diodos, circuitos electrónicos), mineros (auríferos) y agroquímicos (pesticidas y herbicidas) ⁽⁹⁾. Además, el arsénico se encuentra en formulaciones utilizadas por la medicina oriental y como

contaminante en el 14% de productos herbales (en concentraciones de 20-114000 mg/L con una media de 145,5 mg/L y una mediana de 180,5 mg/L) y cosméticos ⁽¹⁰⁾, así como en ciertos protocolos de terapia oncológica ⁽¹¹⁾.

1.1.2. Patología asociada al consumo y clínica en el ser humano

Diferentes cuadro nosológicos están asociados a un consumo de arsénico en sus diferentes formas químicas. No obstante se han descrito trastornos por deficiencias en modelos animales (mayor mortalidad, daño de eritrocitos y problemas obstétricos con menor fertilidad), el principal problema para la salud humana lo representa el consumo incrementado de dicho elemento, situación que puede llevar a intoxicación aguda o crónica ⁽¹²⁾. Al respecto, la exposición aguda es un cuadro perteneciente al campo de la toxicología y de la medicina legal, por su relación con la ingesta accidental o intencional de arsénico ⁽¹³⁾. La dosis letal es de 0,6 mg/Kg./día de arsénico inorgánico, evolucionando en 1-4 días, considerándose diagnósticos niveles altos en orina y pelo (1-3 mg/Kg. o superiores), con la siguiente sintomatología: náuseas, vómitos, cólico abdominal de tipo abdomen agudo, sialorrea y diarrea acuosa profusa, similar a la colérica, que lleva a deshidratación y colapso circulatorio con trastornos de la conciencia. Además es posible observar exantemas, convulsiones, trastornos hematológicos (anemia normocítica y normocrómica, hemoglobinuria, coagulación intravascular diseminada, depresión medular, pancitopenia, puntillado basófilo) y metabólicos (acidosis, hipoglucemia, hipocalcemia), formas agudas de daño tisular inflamatorio e insuficiencia multisistémica (sistemas cardiovascular, urinario, digestivo y nervioso) ⁽¹⁴⁾.

En cambio, la intoxicación crónica, con niveles en pelo de 0,1-0,5 mg/Kg., consecuencia de la exposición prolongada a dosis subletales, lleva a un compromiso multisistémico dependiente del tiempo y la dosis, donde las deficiencias nutricionales actúan como predisponentes. Las manifestaciones clínicas varían entre individuos y grupos demográficos, siendo las más relevantes revisadas por Singh y colaboradores ⁽¹⁵⁾:

- Cutáneas: hiperqueratosis difusa o nodular, hiperpigmentación, líneas de Mee (notables líneas blancas transversales en uñas, enfermedad de Bowen, HACRE (hidroarsenicismo crónico regional endémico)).
- Cardiovasculares: cardiopatía isquémica e hipertensión, miocardiopatía y arritmias, vasculopatías (mal del pie negro).
- Otras: neuropatía central y periférica, trastornos cognitivos, enfermedad cerebrovascular, diabetes mellitus, afecciones renales, disfunciones digestivas y respiratorias, discrasias sanguíneas y morbilidad perinatal, entre otras.

No obstante la dimensión de la lista precedente, la eventualidad más temida son las neoplasias (piel, pulmón, hígado, riñón, vejiga, próstata, colon, cabeza y cuello, entre otros), aumentando la incidencia de tipos tumorales que, ya por sí solos, son los más frecuentes en la patología humana (¹⁶). Son importantes, en consecuencia, los estudios que relacionen las posibles patologías asociadas a la exposición crónica a arsénico con aspectos de susceptibilidad individual (género, edad, polimorfismo genético, tasa de biotransformación, estado nutricional) y el rol protector de vitaminas, minerales y antioxidantes.

1.1.3. Situación sanitaria en la República Argentina

En nuestro país, la enfermedad producida por el consumo crónico de agua con arsénico se denomina HACRE, descrita hace casi un siglo, posteriormente caracterizada y documentada principalmente por los médicos de la Escuela Cordobesa de Medicina Dr. Enrique Tello y Dr. Remo Bergoglio, entre otros. Se ha encontrado una estrecha correlación entre el grado de contaminación del agua, la incidencia de HACRE y un alto índice de carcinomas en la población del sudeste de Córdoba (¹⁷). La provisión de agua segura debe ser la prioridad de los programas sanitarios, para lo que se han desarrollado métodos de remoción del arsénico y propuesto el uso de agua de lluvia (¹⁸). Sin embargo, principalmente por motivos económicos y

culturales, estos no están disponibles para el grueso de la población por lo que la modificación de la susceptibilidad humana al arsénico se transforma en una alternativa importante. Al respecto, se ha descrito que los problemas alimentarios son factores de alto impacto en el complejo proceso de la patogénesis asociada al consumo de As (¹⁹).

1.1.4. Metabolismo

La incorporación del arsénico puede ser por vía inhalatoria, transdérmica y, principalmente, por ingestión (aguas contaminadas). Toxicocinéticamente, el principal sitio de absorción es el intestino delgado a través de transportadores de fósforo y de acuoporinas. Posteriormente, el arsénico absorbido es metilado en casi todo los órganos, siendo los principales metabolitos los ácidos monometilarsónico (AsV) y dimetilarsínico (AsIII) (²⁰). Más del 50% de la dosis ingerida se elimina por orina en 3-5 días, cuyo metabolito dominante es el dimetilado (60-70%), con pequeñas cantidades de arsénico inorgánico sin cambios. Una fracción del As ingerido se distribuye y acumula diferencialmente en órganos internos, como el riñón, y en tegumentos, piel y faneras, tanto en sus formas inorgánicas como sus metabolitos orgánicos (²¹⁻²²).

1.1.5. Mecanismos de acción

El arsénico inorgánico existe en varios estados de oxidación siendo los mayoritarios: la forma trivalente (As(III)) y la pentavalente (As(V)), siendo la primera más tóxica. El arsénico inactiva alrededor de 200 enzimas y/o compromete su regulación, principalmente aquellas involucradas en procesos bioenergéticos y genéticos. Algunos ejemplos de ellos son: señalización intracelular, cadena respiratoria, metilación del ADN, entre otros. Puede también sustituir al fosfato en compuestos de alta energía, como en el ATP (el pentavalente), o formar arsenozúcares y arsenolípidos (²³). En general, el arsénico inorgánico, al ingresar a una célula es reducido a arsenito As(III), el cual es altamente reactivo e interacciona con grupos

tioles de proteínas (entre ellas, enzimas antioxidantes) y péptidos, como el glutatión (GSH), que participan en el mantenimiento del balance redox ⁽²⁴⁾. Posteriormente, los conjugados GSH-As pueden ser metabolizados por la enzima γ -glutamyltranspeptidasa ⁽²⁵⁾. Además, su biotransformación (metilación), la cual es activada por GSH, a pesar de tratarse de un proceso de detoxificación, puede dar productos también cancerígenos ⁽²⁶⁾. En consecuencia, la exposición a arsénico produce daño oxidativo con activación de varias quinasas relacionadas a estrés oxidativo, alteraciones morfológicas, junto a otros efectos pro-tumorales ⁽²⁷⁾, con cambios en los patrones de crecimiento y diferenciación celular, la sobre-expresión de oncogenes, la interferencia de las enzimas de reparación y transcripción de genes, llevando a una aberrante expresión génica e induciendo transformación neoplásica ⁽²⁸⁾. No obstante, el rol etiopatológico del As en el cáncer aún no está completamente dilucidado, ya que no comparte muchos de los mecanismos estudiados para otros cancerígenos ambientales ⁽²⁹⁾.

1.2. Cáncer e implicancias biomédicas del estrés celular

1.2.1. Regulación redox-dependiente de la biología celular

El delicado balance entre los efectos positivos y negativos de los radicales libres es un aspecto de vital importancia. En el concepto de estrés celular está implícita la pérdida del equilibrio y el conjunto de respuestas tendientes a restablecerlo, y su persistencia puede llevar a modificaciones celulares preneoplásicas ⁽³⁰⁾. Los radicales de mayor relevancia son los derivados del anión superóxido (SO) y el óxido nítrico (NO), siendo sus efectos biológicos mediados por derivados de reacciones químicas mediadas o no enzimáticamente (especies reactivas del oxígeno -ROS- y del nitrógeno -RNS-, respectivamente). La producción de estos intermediarios debe ser controlada firmemente por la células a fin de mantener la homeostasis redox, de la que dependen mecanismos de señalización, regulación y supervivencia de las células integradas en tejidos ⁽³¹⁾. A altas concentraciones, son nocivos, dañando casi todos los constituyentes de las

mismas. Sin embargo, a niveles moderados, cumplen un rol relevante como mediadores regulatorios en procesos de señalización, que finalmente protegen a la célula contra el estrés oxidativo, restableciendo la homeostasis redox. Más aún, los organismos superiores han incorporado este tipo de moléculas como mediadores de numerosas funciones fisiológicas (inmunidad, circulación, ventilación, etc.) ⁽³²⁾. Por otro lado, una excesiva y/o sostenida producción de radicales y derivados ha sido implicada en la patogénesis de cáncer, diabetes mellitus, vasculopatías, enfermedades neurodegenerativas, disfunción inmune e infecciones crónicas, trastornos cardiorrespiratorios, daño por isquemia-reperfusión y neuropatías, senescencia celular, entre otras. Incluso, estos mismos problemas han sido observados en personas expuestas crónicamente a arsénico ⁽³³⁾.

El control del estado redox depende de múltiples elementos en estrecha relación, tales como:

- El balance entre la tasa de producción de oxidantes y la de su aclaramiento por antioxidantes enzimáticos (superóxido-dismutasa, glutatión-peroxidasa, catalasa) y no-enzimáticos (vitaminas C y E, glutatión) ⁽³⁴⁾.
- La proteólisis de cadenas oxidadas con la consiguiente liberación de aminoácidos, que, si bien cualitativamente son menos eficientes como secuestradores de oxidantes que los anteriores, constituyen un recurso abundante ⁽³⁵⁾.
- La cisteína, libre o incorporada en macromoléculas (principalmente glutatión), tiene un rol central en el mantenimiento del estado redox celular, dada su capacidad para reaccionar con radicales libres. Las especies químicas derivadas de ésta, como ácidos sulfénicos y sulfínicos, tioradicales, sulfanilamidas y tiosulfatos, participan y regulan numerosos procesos de oxidorreducción, catálisis enzimática y señalización intracelular ⁽³⁶⁾. Esto es importante dada la mencionada afinidad del arsénico por los grupos tioles.
- La inducción de la síntesis de enzimas antioxidantes y la producción de glutatión. El nivel intracelular de este péptido, que contiene

cisteína, y el equilibrio de sus formas tiol y disulfuro son claves en el mantenimiento del estado de oxidorreducción celular y los procesos de señalización de receptores de membrana (³⁷).

- Un caso que merece especial atención es el de la γ -glutamyltranspeptidasa (GGT). Es ésta una ectoenzima presente en la membrana plasmática capaz de liberar el residuo glutamil del glutatión extracelular, dando inicio al ciclo del glutamato, por el cual aumenta el suministro intracelular de este y otros aminoácidos. Así, esta enzima participa en varios mecanismos de regulación redox (disponibilidad de aminoácidos libres, entre ellos cisteína, y formación de glutatión intracelular) (³⁸).
- La nutrición tiene un papel de gran importancia, ya que las distintas sustancias aportadas por la dieta son capaces de modificar la formación de radicales libres independientemente de su actividad redox per se. Ejemplo de ello es la modulación del balance redox por sustancias dietarias, que pueden determinar estados prooxidantes cuando se hallan en cantidades inadecuadas, estando bajo control neuroendocrino (³⁹).
- Entre los mecanismos de señalización y respuesta molecular, se encuentran: mediación de efectos inducidos por receptores de membrana y activación de quinasas (proteínquinasa C, quinasa N-terminal de c-jun -JNK- y otras quinasas activadas por mitógenos -MAPK-) y de factores de transcripción, como AP-1 y nuclear κ B (NF κ B) (⁴⁰), inducción de otros mediadores, como los eicosanoides y el calcio intracelular (⁴¹), con los consiguientes cambios en expresión de proteínas de diferenciación y adhesión celular (⁴²), y en regulación de la muerte celular programada y del ciclo celular (⁴³).

Así, los efectos de las diferentes especies reactivas dependen de la magnitud y la duración de su formación, que partiendo de niveles basales normales, lleva a eventos tendientes a recuperar la homeostasis (respuesta a estrés) o a la desregulación crónica (transformación celular).

La intervención nutricional o farmacológica sobre el balance redox celular debe ser llevada a cabo con adecuado criterio sin caer en extremos, porque la pérdida de este equilibrio, sea en un sentido (oxidación) o en el otro (antioxidación), resultarían deletéreos. Incluso, un aspecto crítico en la biología tumoral es la pérdida de la capacidad de respuesta a estrés oxidativo, haciendo las células resistentes a las terapias oxidantes y otras formas de daño oxidativo proapoptótico ⁽⁴⁴⁾. Además, la repuesta oxidante puede ser necesaria en determinados procesos fisiológicos. Ejemplo de esto es la participación de los intermediarios reactivos en la regulación y ejecución de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa ⁽⁴⁵⁾.

1.2.2. Oncogénesis y biología tumoral

El cáncer resulta de un proceso multietapa que lleva a fallas crecientes en los mecanismos que controlan la diferenciación y proliferación de la célula, con aparición de clones capaces de invadir y colonizar territorios normalmente reservados para otros tipos celulares normales ⁽⁴⁶⁾. Las etapas involucradas sucesivamente son la iniciación (la célula normal es transformada o iniciada), la promoción (la célula iniciada se vuelve preneoplásica) y la progresión (la célula preneoplásica pasa a neoplásica). La iniciación es el resultado de un ataque rápido e irreparable a la célula produciendo en su ADN un daño permanente. Las células transformadas pueden, en el proceso de promoción, sufrir muchos cambios para formar células preneoplásicas durante un periodo prolongado de tiempo. Por último, el fenotipo neoplásico se pone de manifiesto con la progresión tumoral. Durante este proceso, se establecen seis alteraciones esenciales en la fisiología celular, que colectivamente determinan el comportamiento maligno: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias, evasión de la muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida y capacidad de invasión tisular y metástasis ⁽⁴⁷⁾. La complejidad de esto se ve incrementada por la heterotipia celular que constituye el microambiente tumoral y condiciona su evolución, incluyendo células tumorales (subclones) y normales (conectivas) ⁽⁴³⁾.

Crecientes evidencias experimentales y epidemiológicas soportan la hipótesis que diversos agentes ambientales dietarios actuarían modulando a favor o en contra (agentes iniciadores y promotores, agentes preventivos y terapéuticos, respectivamente) el proceso de oncogénesis ⁽⁴⁸⁾. A su vez, estos podrían ser generales (para varios tipos tumorales) o particulares (para algunas estirpes) ⁽⁴⁹⁾. En tal sentido, se ha descrito una estrecha relación entre estrés oxidativo y transformación celular, a través de numerosos procesos bioquímicos conducentes a modificaciones moleculares importantes dentro de la célula (ej.: sobre-expresión del factor nuclear κ B) y a cambios hostiles del microambiente extracelular con selección de clones resistentes a señales apoptogénicas ⁽⁵⁰⁾. Por lo antedicho, la acción de antioxidantes no-enzimáticos medioambientales han sido intensamente estudiados, como es el caso de oligoelementos ingeridos por la dieta (selenio, zinc), vitaminas (A, C, E) y polifenoles (flavonoides, curcumina), entre otros. Esto resultaría especialmente válido cuando se plantea la quimioprevención de neoplasias asociadas a la exposición al As, dado su papel como oxidante celular, a través de la eventual recomendación dietaria en referencia a dichos compuestos ⁽⁵¹⁾.

1.2.3. Regulación epigenética nutricional

La susceptibilidad celular a tóxicos y cancerígenos asienta sobre dos pilares: información genética y regulación epigenética, que en su conjunto determinan un dinámico fenotipo particular. En referencia a dicha modulación, los nutrientes asimilados por la célula adquieren gran protagonismo, sea en los aspectos plásticos (constitución de macromoléculas, estructura de organoides) como funcionales (energética, catálisis). Consecuentemente, la expresión de muchos genes y el funcionamiento celular se hayan fuertemente supeditados a la disponibilidad y el tipo de sustancias dietarias incorporadas. Dada la trascendencia biológica de las membranas celulares, su modificación estructural puede afectar diversos aspectos de la fisiología celular. En tal sentido, el continuo flujo de membranas suele tener aparejado la posibilidad de alterar sus

propiedades en respuesta a factores exógenos como aquellos aportados por la dieta ⁽⁵²⁾. Por ejemplo, la activación-inactivación de quinasas asociadas a *rafts* (del inglés, balsas: agrupamientos transcientes de lípidos y otras macromoléculas que determinan una región funcional particular en la membrana) en respuesta a tóxicos como el arsénico, depende de la composición lipídica de las membranas, como así también lo hacen marcadores de malignidad tumoral ⁽⁴²⁾. Subsecuentemente, diferentes parámetros de membrana deben ser estudiados, como es el caso de la composición e integridad oxidativa de sus lípidos, y la actividad de enzimas integrales. El daño oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados de membrana, el cual es acompañado por la formación de una mezcla compleja de lipohidroperóxidos y otros productos secundarios altamente reactivos afectan las respuestas celulares, modificando la sensibilidad celular, principalmente en estirpes tumorales, frente a citotóxicos como arsénico ⁽⁵³⁾. Además, estos metabolitos pueden usarse como biomarcadores para evaluar la actividad de agentes dietarios sobre el balance redox ⁽⁵⁴⁾. En relación a esto, han recibido particular atención los compuestos polifenólicos debido a su capacidad antioxidante y su afinidad por bicapas lipídicas ⁽⁵⁵⁾. Estos compuestos son los antioxidantes más abundantes en la dieta, encontrándose en frutas, cereales, legumbres, chocolate, infusiones (té, café), vino y otros alimentos de origen vegetal. Existe evidencia experimental y epidemiológica consistente que soporta el estudio de estos compuestos y moléculas en la prevención de enfermedades crónicas de diversa naturaleza, entre ellas, las neoplásicas ⁽⁵⁶⁾.

1.3. Flavonoides como moléculas bioactivas

1.3.1. Farmacognosia

Flavonoide (del latín flavus, amarillo) es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Los flavonoides comprenden el mayor grupo de polifenoles vegetales con más de 9000 compuestos. Las principales subclases son: flavonas (apigenina,

luteolina), flavonoles (quercetina, miricetina), flavanonas (naringenina, hesperidina), catequinas o flavanoles (epicatequina, galocatequina), antrocianidinas (cianidina, pelargonidina) e isoflavonas (genisteína, daidzeína). La mayoría de ellas se encuentran naturalmente glicosiladas, aunque ocasionalmente se puedan hallar como agliconas o polimerizadas⁽⁵⁷⁾. Estos compuestos, denominados en el pasado como vitamina P (por la disminución que inducen de la permeabilidad vascular) y también vitamina C2 (por tener propiedades similares a la vitamina C), se biosintetizan en todas las plantas (taxón *Embryophyta* y también en algunas algas *Charophyta*), que aunque comparten la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente. En las plantas cumplen varias funciones (antioxidación, protección ante la luz UV, defensa ante el herbivorismo, regulación del transporte de la hormona auxina, atracción de animales polinizadores, dispersores de semillas y presas, inducción de la modulación por parte de las bacterias fijadoras de nitrógeno, protección contra los hongos, etc.).

Los flavonoides son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina (proveniente de vía del ácido shikímico) y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", cuyo producto, la estructura base (un esqueleto C6-C3-C6), se cicla gracias a una enzima isomerasa. La vía biosintética de los flavonoides comienza cuando la fenilalanina, por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa se transforma en ácido cinámico, que luego es transformado en ácido p-cumarínico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático, y la acción de una CoA ligasa lo transforma en cumaril-SCoA, el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los flavonoides (Figura 1)⁽⁵⁸⁾. Son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos e insolubles en agua, con un máximo de absorción de luz a los 280 nm. Los flavonoides pueden conservar su esqueleto (flavonoides propiamente dichos, derivados

de la estructura 2-fenilcromen-4-ona) o presentar cambios en el mismo, convirtiéndose entonces en el esqueleto de los isoflavonoides (derivados de la estructura 3-fenilcromen-4-ona) o el de los neoflavonoides (derivados de la estructura 4-fenilcumarina) ⁽⁵⁹⁾.

1.3.2. Farmacocinética

Los beneficios potenciales del uso dietario de flavonoides por seres humanos aún se encuentran en etapas tempranas de experimentación. Esto está relacionado a su complejo metabolismo ⁽⁶⁰⁾. El destino químico de estas sustancias está determinado por numerosos procesos farmacocinéticos, donde pueden generarse productos secundarios bioactivos ⁽⁶¹⁾. Su biodisponibilidad permite su absorción intestinal en cantidades suficientes como para ejercer efectos biológicos, alcanzando concentraciones de hasta 10 µM, las que deben ser tenidas en cuenta en las pruebas in vitro, ya que el umbral de actividad varía en un rango de <0,1 µM a >100 µM. No obstante, esto depende de cada compuesto en particular y su metabolismo. Esto último, junto a la producción de metabolitos de la microflora intestinal, da origen a derivados con diferente actividad biológica ⁽⁶²⁾.

1.3.3. Potencial biomédico

El impulso que estas sustancias han ganado como potenciales agentes preventivos y terapéuticos ha adquirido enormes dimensiones. Más aún, su empleo empírico utilizando las plantas que las contienen en sus tejidos data desde la aparición de las primeras sociedades humanas. Existen evidencias provenientes de distintas ramas científicas que apoyan tales presunciones, presentando un abanico de aplicaciones tan amplio como enfermedades y disfunciones se abordan en la práctica médica usual. Entre numerosos ejemplos, se destacan: el clásico síndrome metabólico ⁽⁶³⁾, diferentes infecciones crónicas ⁽⁶⁴⁾, inflamaciones y trastornos vasculares ⁽⁶⁵⁾, el síndrome climatérico y la demencia tipo Alzheimer ⁽⁶⁶⁻⁶⁷⁾. Sin embargo, esta lista no agota en lo más mínimo las menciones que hace la

bibliografía disponible al respecto. No obstante, uno de los campos de aplicación con mayor expansión es el oncológico, sea como agentes quimiopreventivos (⁶⁸), quimioterapéuticos o quimiadyuvantes, considerando además que pueden exhibir acciones mixtas de gran complejidad (⁶⁹).

Otra implicancia médica que no debe ser olvidada es la capacidad de algunos polifenoles de interferir los efectos de otras sustancias dietarias, ambientales y farmacológicas, modificando su farmacocinética y/o actividad biológica dentro de un organismo complejo (⁷⁰), que a su vez es capaz de alterar cualitativa y cuantitativamente a los diferentes compuestos polifenólicos (⁷¹).

1.3.4. Flavonoides ensayados: quercetina y silimarina

La quercetina es uno de los flavonoides más estudiados en las últimas décadas, por sus efectos antioxidantes y moduladores del proceso de oncogénesis (⁷²). Se encuentra en altas cantidades en cebollas, manzanas, brócoli, té, vino tinto, ginkgo (con terpenoides activos), entre otros. Tras ser absorbida por vía oral, la forma aglicona (Figura 1), puede ser transformada en conjugados metilados, sulfatados o de glucuronato, presentando luego recirculación enterohepática (⁷³). Aunque las formas conjugadas son menos activas, la deconjugación puede suceder en los tejidos como el hígado, con reactivación de la misma (⁷⁴).

Otro flavonoide antioxidante es la silimarina (Figura 1), proveniente de *Silybum marianum* (L.) Gaertner (Familia *Asteraceae*), conocido en Argentina como cardo mariano (Figura 2). Es menos abundante que la quercetina, pero ya se ha incluido en la farmacopea de muchos países (incluso Argentina) como hepatoprotector. Se trata de una mezcla racémica de silibina (principal constituyente), isosilibina, silidianina y silicristina, lignanos derivados de los flavonoles por combinación con coniferol. Su absorción intestinal, cuando es ingerido, es baja aunque suficiente, pudiendo optimizarse por conjugación con fosfatidilcolina, incorporando a su vez las propiedades nutraceuticas de ésta (⁷⁵). El extracto metanólico de semillas de *S. marianum* posee 70-80% de silimarina y ha sido utilizado empíricamente para prevenir y tratar hepatopatías por diversas culturas desde la

antigüedad, y cuyo consumo mostró ser inocuo en un seguimiento de 41 meses de uso, no observándose reacciones adversas importantes ni interacciones problemáticas con otras drogas (⁷⁶). Sus propiedades se basan en su capacidad antioxidante y de interacción con lípidos, influenciando cualitativa y cuantitativamente la composición de las membranas y su estabilidad. También ejerce acción sobre la síntesis de esteroides, llevándose a cabo actualmente estudios clínicos y de seguimiento en oncología, inmunología e infectología, que buscan determinar la eficacia y la efectividad de este compuesto como agente citoprotector y quimiopreventivo, puesto que la evidencia disponible es de grado B-C (⁷⁷). Se han identificado numerosos efectos potencialmente benéficos de silimarina, entre los que se cuentan: neurotrofismo e inmunomodulación (⁷⁸⁻⁷⁹), además de potencialidad antitumoral (⁸⁰).

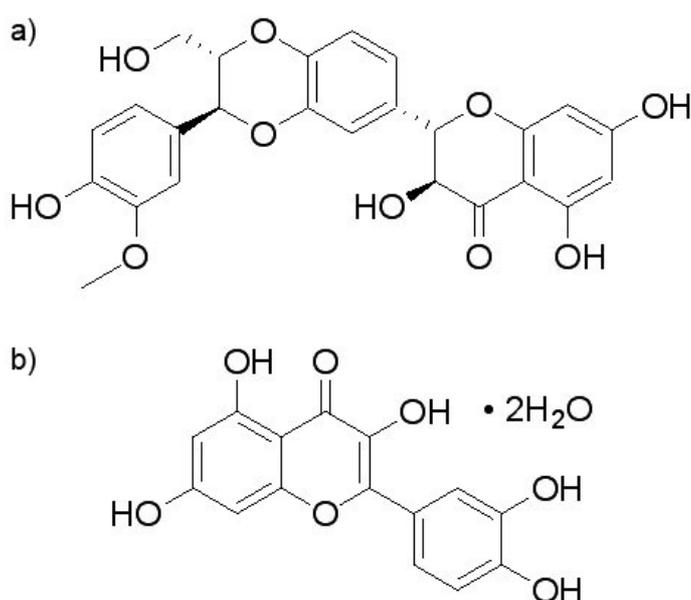


Figura 1. Estructura molecular de los flavonoides estudiados: Silimarina (isómero silibinina, a) y quercetina (anillo flavonoide tetrahidroxilado, b).



Figura 2. Cardo mariano (*Silybum marianum*): Flor (a) y hojas (b).

1.4. Hipótesis y objetivos

1.4.1. Hipótesis

Las estrategias para el abordaje quimiopreventivo y/o quimioterapéutico de enfermedades crónicas, como el cáncer y el HACRE, se basan en gran medida en modificaciones de la fisiología celular inducidas por oligoelementos y biofármacos, sentando la estrecha relación entre salud y nutrición.

Así, se postula que la toxicidad inducida por arsénico podría ser modulada por sustancias aportadas por la dieta, principalmente xenobióticos antioxidantes, que intervendrían sobre los mecanismos intracelulares afectados por este elemento, dependiendo de la magnitud de la exposición y del grado de diferenciación celular.

Dado el conjunto de información detallada antes, los flavonoides quercetina y silimarina poseerían un potencial modulador de los efectos del arsénico sobre las células, cuya determinación tendría una importante repercusión biomédica.

1.4.2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo de tesis fue determinar el efecto modulador de agentes dietarios (flavonoides) sobre la toxicidad de arsenito de sodio en diferentes modelos celulares, permitiendo realizar nuevos aportes sobre las bases biológicas de la patología arsenical y su apropiado abordaje.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- Desarrollar modelos de estudio in vitro (cultivo de líneas tumorales mamarias y no-tumorales, bajo distintas condiciones experimentales).
- Evaluar diferentes biomarcadores de daño celular por arsenito en dichos modelos, incluyendo: a) magnitud y características de los estados de viabilidad y muerte celular; b) formación de especies reactivas; c) aparición de respuestas celulares y moleculares

asociadas; d) estado de integridad y susceptibilidad de las membranas biológicas.

- Establecer el potencial biomédico de los flavonoides quercetina y silimarina y quercetina sobre los efectos prooxidantes y citotóxicos de la forma trivalente arsenito, estudiando la modulación de tales biomarcadores.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales y equipamiento

2.1.1. Materiales

Químicos: Los flavonoides empleados fueron silimarina (CAS n° 22888-70-6: 2,3-dihidro-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(hidroximetil)-6-(3,5,7-trihidroxi-4-oxobenzopirano-2-il)benzodioxina, $C_{25}H_{22}O_{10}$, 31% de silibinina, PM=482,4 g/mol) de Sigma-Aldrich Inc. (EEUU) y quercetina (CAS n° 6151-25-3: 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopirano-4-ona dihidrato, $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$, PM=338,3 g/mol) de E. Merck (Alemania). Arsenito de sodio ($NaAsO_2$, PM=130 g/mol) provino de Anedra (Argentina).

Ensayos enzimáticos: Para determinar la actividad de las enzimas γ -glutamyltranspeptidasa (GGT, EC 2.3.2.2, CD224) y caspasas ejecutoras (CASP-3 y -7, EC 3.4.22.56 y EC 3.4.22.60, respectivamente), se utilizaron el kit γ -G-test AA (Wiener Lab, Argentina) y el sustrato específico Ac-DEVD-pNA (N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilida, PM=638,6 g/mol, Sigma-Aldrich Inc., EEUU), respectivamente.

Anticuerpos: Para las reacciones primarias, se utilizaron IgG policlonal de conejo anti-Hsp70 (*heat shock protein*, proteína de choque térmico) inducible, de 72 kDa humana (SPA-812, StressGen Bioreagentes, Canadá), IgG policlonal de conejo anti-actina multiespecífica (A-5060, Sigma-Aldrich Inc., EEUU) e IgG monoclonal de ratón anti-JNK (*c-jun N-terminal kinase*, quinasa N-terminal de c-jun, EC 2.7.11.24) activada difosforilada humana (J-4750, Sigma-Aldrich Inc., EEUU). Para las reacciones secundarias, se usaron anticuerpos de Sigma-Aldrich Inc. (EEUU) conjugados con peroxidasa (IgG policlonal de cabra anti-IgG de conejo, IgG policlonal de cabra anti-IgG de ratón) o con fluoróforos (IgG policlonal de oveja anti-IgG de conejo, con isotiocianato de fluoresceína FITC; IgG policlonal de burro anti-IgG de ratón, con rojo Texas).

Kits comerciales para determinar especies reactivas: Los hidroperóxidos se estudiaron usando las soluciones provistas en el PeroxiDetect™ Kit por Sigma-Aldrich Inc. (EEUU), mientras que las soluciones para detectar nitritos fueron adquiridas a Laboratorios Britania (Argentina).

Otras marcaciones celulares: Los colorantes y fluoróforos empleados fueron de Sigma-Aldrich Inc. (EEUU): cristal violeta, dihidrocloruro de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina 1,4 (TMPD, C₁₀H₁₆N₂ 2HCl, PM=237,2 g/mol), diacetato de fluoresceína (FDA), yoduro de propidio (PI), y anexina-V conjugada con FITC.

Material fungible: El material plástico descartable provino de ETC (Argentina). El resto de reactivos e insumos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Inc. (EEUU), mientras los solventes fueron de Cicarelli (Argentina). Se utilizó al estándar preteñido Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories Inc., EEUU) como marca de peso molecular en electroforesis.

2.1.2. Equipamiento

Equipo mayor: Las instalaciones generales de trabajo en el Instituto de Biología Celular (Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) incluyeron el correspondiente laboratorio de cultivo celular y de bioquímica, junto a cámara frigorífica y demás infraestructura estándar, donde se encontraban equipos e instrumental menor (sistema para electroforesis, baños termostatzados y demás material pertinente). Las lecturas de absorbencia se realizaron con un espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Japón) y con un lector de microplacas BioRad 680 (Bio-Rad Laboratories Inc., EEUU), según el caso. Los estudios citológicos por fluorescencia se realizaron utilizando las tecnologías *Axiovert 135 – Axiovision* para las microfotografías y *Fluorescence Analyzer Cell Sorter* para la citometría de flujo (EEUU).

Programas informáticos y bases de datos (en línea): Los análisis de imágenes se llevaron a cabo con Scion Image Beta 4.0.3 (Scion Corporation, EEUU, <http://www.scioncorp.com>) y los estadísticos a través de

InfoStat 2008e.1 (Grupo InfoStat, Argentina, <http://www.infostat.com.ar>). La nomenclatura enzimática con el número EC (catálisis enzimática) se obtuvo de la base disponible en <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme> (acceso: mayo/2008), generada a partir de *Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) on the Nomenclature and Classification of Enzyme-Catalysed Reactions in consultation with the IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) (1992)*, actualizada al 21/03/2005.

2.2. Condiciones experimentales

2.2.1. Cultivo celular

Líneas epiteliales: Se emplearon tres líneas celulares de estirpe epitelial: CHO-K1 (*European Collection of Cell Cultures*), MCF-7 y ZR-75-1 (*American Type Culture Collection*). Las células CHO-K1 fueron elegidas por derivar de epitelio no-tumoral, permitiendo así estudiar los efectos de xenobióticos y aquellos eventos que puedan preceder la transformación celular. De hecho, los epitelios constituyen el tipo celular mayormente comprometido en la oncogénesis in-vivo asociada al arsénico (⁸¹). Además, puesto que se ha propuesto el uso potencial de arsénico como quimioterápico, las últimas dos líneas provienen de adenocarcinomas mamarios. Se buscó desarrollar dos modelos in-vitro con células no-tumorales y células tumorales, que permitieran evaluar el rol de las biomoléculas estudiadas en citoprotección (quimioprevención) y citotoxicidad (quimioterapia), respectivamente. La línea CHO-K1 ya ha sido bastante empleada como referente no-tumoral y sus respuestas comparadas con las de estirpes neoplásicas humanas (⁸²).

Mantenimiento: Las células fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM 10 g + NaHCO₃ 3,75 g + HEPES 4,76 g + H₂O miliQ csp 1 L) con suero fetal bovino al 10%, 100 IU/mL de penicilina G sódica y 40 µg/mL de sulfato de gentamicina, en atmósfera de 5% CO₂ a

37°C. Los subcultivos se obtuvieron por tratamiento suave con tripsina al 0,25% sembrando 10^5 células/mL, para tratarlas 48 horas después.

2.2.2. Diseño experimental

Modelos planteados: Fueron establecidos tres modelos experimentales, a fin de evaluar los efectos pretumorales, protumorales y antitumorales, respectivamente, de arsenito de sodio en cultivos epiteliales y su modulación por flavonoides vegetales, a saber:

- Modelo 1: Las células no-tumorales de origen epitelial CHO-K1 fueron tratadas bajo condiciones agudas de alta toxicidad. Se llevaron a cabo las mediciones de las diferentes respuestas celulares, a fin de establecer la cronología en horas (intervalos de 2 horas) de tales eventos (*ver sección 3.1.1*), para evaluar luego el efecto potencial de los mencionados polifenoles, cuando la variable fuera afectada significativamente por As. Se emplearon dos variantes experimentales: continuación del tratamiento hasta comprometer la viabilidad celular o interrupción seguida de incubación en DMEM libre de tratamiento para permitir la recuperación celular.
- Modelo 2: Seguidamente, se estudiaron en cultivos de la línea CHO-K1 incubada bajo condiciones subcrónicas de baja toxicidad a lo largo de 6 semanas (intervalos de 1,5 semanas), las modificaciones en la concentración de gangliósidos, la integridad redox-asociada de lípidos (nivel de dienos conjugados) y la capacidad adaptativa (actividad de GGT) de las membranas celulares. Tras lo cual, se procedió a una prueba de respuesta a peróxido de hidrógeno (quimiorresistencia), para evaluar si las células expuestas subcrónicamente a As habían adquirido diferente susceptibilidad a otro agente oxidante (signo de transformación), utilizando los mismos marcadores, cuya finalidad fue controlar que las respuestas halladas sean aún de epitelio no-tumoral. Para ello, se les permitió crecer en DMEM libre de tratamiento (cumplidas 6 semanas) por 48 horas con renovación diaria para retirar

químicos remanentes, con exposición posterior a 0,5 mM de H₂O₂ por 30 minutos.

- Modelo 3: Para finalizar, nuevamente se analizaron tales parámetros en membranas de células tumorales de estirpe epitelial (líneas mamarias ZR-75-1 y MCF-7), junto al ensayo de viabilidad de estas células (0-8 horas), cultivadas bajo tratamiento agudo, a fin de comparar los distintos efectos en líneas con diferente grado de diferenciación.

Tratamientos (en función de concentración y tiempo): Los diferentes tratamientos se realizaron bajo dos condiciones: aguda (exposición corta -horas- con alta toxicidad) y subcrónica (exposición prolongada -semanas- con baja toxicidad). Para la primera, la incubación de las células (0-8 horas) se hizo con: arsenito 200 µM (As), silimarina 5 µM (S), quercetina 50 µM (Q), arsenito 200 µM + silimarina 5 µM (As+S), arsenito 200 µM (As) + quercetina 50 µM (As+Q), y sin tratamiento (control, C). Para la segunda, se emplearon (0-6 semanas, a concentraciones subletales): arsenito 5 µM (As), silimarina 0,125 µM (S), quercetina 5 µM (Q), arsenito 5 µM + silimarina 0,125 µM (As+S), arsenito 5 µM (As) + quercetina 5 µM (As+Q) o sin tratamiento (control, C), renovando el medio cada 72 horas.

2.2.3. Fraccionamiento celular

Separación de fracciones celulares: Tras ser liberadas enzimáticamente con tripsina porcina, las células fueron lisadas (10001 homogenizer, OMNI Internacional, EEUU) a 20000 rpm por 30 segundos en 1 mL de buffer HEPES 10 mM (pH 7,4, conteniendo 2 µg/mL de leupeptin y EDTA 1 mM). Luego, fueron centrifugadas a 100000 g por 1 hora a 4°C (L5-50B ultracentrifuge, Beckman Coulter Inc., EEUU). Se obtuvieron pellets (P) y sobrenadantes acuosos (SN), para las diferentes determinaciones. P fue resuspendido en 0,3 mL de buffer HEPES 10 mM. P representaba las membranas totales (biomembranas), mientras que SN los constituyentes solubles (citoplasma). El contenido proteico de cada fracción (P y SN) se determinó por el método de Lowry (⁸³).

Extracción de lípidos: La mezcla de 0,15 mL de suspensión P y 0,75 mL de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) se centrifugó a 1000 g por 10 minutos (⁸⁴), trabajando bajo condiciones de baja temperatura (4°C). La fase superior se utilizó para la medición de ácido siálico (fracción FS) y la inferior fue lavada 2 veces con cloroformo/metanol/agua 3:48:47 (v/v/v) y secada bajo flujo de nitrógeno puro a temperatura ambiente. Luego, la muestra de lípidos se resuspendía en etanol (0,2 mL, fracción FI), modificando el solvente final habitual (ciclohexano) por etanol, para lograr mayor estabilidad de la muestra.

2.3. Determinación de biomarcadores

2.3.1. Citotoxicidad

Tinción con cristal violeta (viabilidad celular): Este procedimiento se escogió pues no es interferido por peróxidos (⁸⁵). Después de los diferentes tratamientos, las células, sembradas en placas de 96 pozos (10000 células/pozo), fueron coloreadas con cristal violeta al 0,5% en metanol al 50% por 15 minutos. Cada placa fue lavada tres veces con metanol al 50% y secada. Luego, se agregaron 0,2 mL de una solución de citrato de sodio 0,1 M (pH 5,4 en metanol al 20%). Puesto que las células viables se mantienen adheridas a la placa captando colorante, la viabilidad celular se definió como porcentaje de densidad óptica respecto a control (C=100%) en cada pozo a 570 nm.

Citofluorescencia (fenotipo vital o condición de vitalidad): La doble marcación con PI (emisión roja, células muertas) y FDA (emisión verde, células vivas) permitió determinar la integridad de la membrana plasmática y el fenotipo vital (células viables, apoptóticas o necróticas). Las células cultivadas bajo los distintos tratamientos fueron incubadas posteriormente con ambos fluoróforos (concentración final en DMEM de cada uno: 10 µg/mL) durante 15 minutos, a 37°C y en oscuridad, para ser observadas luego por microscopio. Otro procedimiento llevado a cabo fue la citometría de flujo (⁸⁶). Para ello, las células resuspendidas en DMEM

(5×10^5 - 1×10^6 células en 0,5 mL de medio) fueron incubadas con 5 μ L de anexina-V y 10 μ L de PI (10-15 minutos previos a la lectura, a 37°C y en oscuridad), los cuales reconocen específicamente fosfatidilserina exteriorizada en la membrana plasmática (marcador de apoptosis) y ácido desoxirribonucleico (marcador de muerte), respectivamente.

2.3.2. Estrés celular

Detección de ROS (*reactive oxygen species*, especies reactivas del oxígeno): El procedimiento, basado en la capacidad de los hidroperóxidos (HP) de oxidar Fe^{2+} a Fe^{3+} en condiciones de pH bajo, formando luego un aducto coloreado a 560 nm con naranja de xilenol (XO) (⁸⁷), fue llevado a cabo sobre células adheridas a placas de 96 pozos (40000 células/pozo) después de descartar el medio de cultivo. Tras lisar las monocapas con SDS al 1% (5 μ L por pozo, detergente sin interferencia técnica), se estudiaron las fracciones acuosas y lipídicas de HP (AHP y LHP, respectivamente) en cantidades micromolares. Para medir AHP, se realizó una curva de concentración de H_2O_2 (0, 2, 4 y 8 μ L de H_2O_2 100 μ M para 0, 1, 2 y 4 μ M, respectivamente), incluyendo 5 μ L de SDS al 1% y llevando todo a un volumen de 20 μ L con agua. Mientras que para cuantificar LHP, se empleó una solución metanólica de *tert*-butil-hidroperóxido 200 μ M (0, 2, 4 y 8 μ L para 0, 2, 4 y 8 μ M, respectivamente) para realizar la curva estándar correspondiente, agregando csp 20 μ L de metanol, asimismo a las muestras. Luego, se adicionó 0,2 mL del cromógeno para incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la lectura. El cromógeno era sulfato amonio ferroso 25 mM en ácido sulfúrico 2,5 M reconstituido (1:100) con solución acuosa de sorbitol 100 mM y XO 0,125 mM para AHP, o con solución de hidroxitolueno butilado 4 mM y XO 0,125 mM en metanol al 90% para LHP.

Detección de RNS (*reactive nitrogen species*, especies reactivas del nitrógeno): La producción enzimática de óxido nítrico (NO), dependiente de la NO-sintetasa (EC 1.14.13.39; reacción: L-arginina + n NADPH + n H^+ + m O_2 = L-citrulina + NO + n NADP⁺), fue evaluada midiendo nitritos (producto estable de la reacción de NO con oxígeno) por la reacción de diazotización

de Griess⁽⁸⁸⁾. Brevemente, se sembraron 40000 células/pozo con 0,1 mL de DMEM en placa de 96 para tratamiento, tras el cual se agregó igual volumen del reactivo de Griess, en el siguiente orden: 1 parte de sulfanilamida al 1% en HCl 0,1 N y 1 parte de dihidrocloruro de naftil-etilendiamina al 0,1%, incubando a temperatura ambiente por 15 minutos, antes de la cuantificación colorimétrica a 550 nm. La concentración de nitritos fue calculada usando una curva estándar de NaNO₂ (0-100 µM). Conjuntamente, la L-citrulina, co-producto de la reacción biosintética del NO, fue determinada utilizando un ensayo colorimétrico⁽⁸⁹⁾. Para ello, la preparación de las soluciones se realizó al menos cuatro días antes, para permitir la estabilización de las mismas. Las muestras fueron deproteinizadas por la adición de ácido tricloroacético a concentración final de 5%, tomando previamente una alícuota de 10 µL para determinar proteínas. Tras centrifugar, se mezclaron 0,1 mL del sobrenadante con 3 mL de la solución cromógena (1 parte de diacetilmonoxima al 0.5%/tiosemicarbacida al 0,01% y 2 partes de una solución ácido-férrica, conteniendo FeCl₃ al 0,025% p/v, H₂SO₄ al 25% y H₃PO₄ al 20%; estable dentro de la primera hora de preparada), calentando seguidamente a 96°C en baño de María por 5 minutos. Luego de enfriado a temperatura ambiente, se leyó absorbancia a 530 nm, dentro las primeras 3 horas, frente a curva estándar (0, 10, 20 y 30 µL de L-citrulina 1 mM más csp 0,1 mL de agua).

2.3.3. Respuestas celulares y moleculares

Inmunocitoquímica (actina y JNK activada): Las células fueron fijadas con metanol a -20°C por 10 minutos, lavadas tres veces con solución PBS y bloqueadas con albúmina sérica bovina al 2% en PBS (30 minutos). Tras un lavado, se incubaron con los anticuerpos A-5060 y J-4750, en cámara húmeda por 90 minutos a 37°C. Luego de lavar tres veces, se reiteró el bloqueo, tras lo cual se procedió a incubar 60 minutos y en oscuridad con los anticuerpos secundarios fluorescentes correspondientes, para visualización microscópica tras cinco lavados.

Western-blottig (Hsp72 y JNK activada): Se determinó la expresión de Hsp72 y la activación de JNK en SN de acuerdo al procedimiento desarrollado por Laemmli ⁽⁹⁰⁾. Brevemente, a cada muestras SN se le incorporó Tris-HCl 60 mM (pH 6,8), conteniendo glicerol al 10%, 2-mercaptoetanol al 5%, 0,005% de azul de bromofenol y SDS al 3%, incubando 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras (μ g de proteína por muestra: 200 para Hsp72 y 350 para JNK) se analizaron mediante SDS-PAGE (gel: 10%). Después de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada por incubación con albúmina sérica bovina al 2%. Tras ser lavada, la membrana se incubó a 4°C durante 24 horas con el anticuerpo SPA-812 (Hsp72) o con el J-4750 (JNK), según el caso. El complejo antígeno-anticuerpo fue reconocido por el anticuerpo secundario correspondiente (incubación por 2 horas a 37°C en movimiento suave). Dicho reconocimiento fue revelado por la reacción de peroxidasa ⁽⁹¹⁾, usando como revelador (incubación por 1 hora a 37°C en oscuridad): 1 mL de 4-Cl-naftol al 0,3% p/v (en metanol) + 5 mL de TBS (o PBS) + 6 μ L de H₂O₂ al 30% v/v. La masa molecular se determinó por comparación con un estándar preteñido. La cantidad de proteína por banda se determinó digitalmente por análisis bidimensional (densidad = valor de gris / píxeles por banda, tras anular el efecto de fondo, en escala monocromática con 256 niveles de gris).

Medición de actividad específica de caspasas (CASP): Se realizó un ensayo colorimétrico, por el cual se determinó en células lisadas (2×10^6) con 50 μ L de buffer de lisis (HEPES 50 mM con pH 7,4, conteniendo CHAPS 0,1%, DTT 1 mM y EDTA 0,1 mM, a 0-4°C por 5 minutos). Después de centrifugar a 15000 g por 15 minutos, se recuperó el sobrenadante, al que se le adicionó 100 μ L de mezcla de reacción (HEPES 50 mM con pH 7,4, conteniendo CHAPS 0,1%, DTT 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, glicerol al 10% y Ac-DEVD-pNA 2mM). La liberación de p-nitroanilina a partir del sustrato Ac-DEVD-pNA (específico de CASP-3 y -7), se determinó por lectura a 410 nm, tras 2 horas de incubación a 37°C ⁽⁸²⁾. La actividad

catalítica se expresó en mUI/mg de proteínas, determinadas por el método de Bradford en la suspensión en el buffer de lisis (⁹²).

Cuantificación de ácido siálico lipídico (gangliósidos): En la fracción FS de Fölch, los glicoesfingolípidos asociados a ácido siálico (SA), expresados en nanomoles de SA/mg de proteínas, fueron determinados de acuerdo a lo descrito por Svennerholm (⁹³), modificado por Miettinen y Takki-Luukkainen (⁹⁴). Brevemente, las muestras problema se constituían por 25 µL de FS y 75 µL de agua, mientras que los testigos tenían 25 µL de cloroformo/metanol/agua 3:48:47, más 0, 25 y 50 µL de SA 0,5 mM (curva de calibración: 0, 125 y 250 nmoles, respectivamente) y csp 100 µL de agua. Posteriormente, se adicionaba 1 mL de una solución reveladora (10 mL de resorcinol 2% p/v + 80 mL de HCl al 37% v/v + 0,25 mL de sulfato cúprico 0,1 M + csp 100 mL de agua) y se calentaba a baño de María (96°C) durante 15 minutos. Una vez frío, se procedía a la extracción agregando 2 mL de acetato de butilo/n-butanol 85:15 v/v. Luego de 30 minutos de centrifugación, se utilizó la fase superior de cada muestra para su lectura a 580 nm. Considerando que los gangliósidos presentes en la FS de extracciones de tejidos extraneurales son mayormente monosialilados, las modificaciones del grado de sialilación de las biomembranas fueron directamente relacionadas con cambios en el nivel de estos lípidos en las mismas (⁹⁵).

Medición de actividad específica de GGT: Se utilizó el método de Szasz modificado, basado en la cinética de la enzima en la reacción L-γ-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida (2,9 mM) + glicilglicina (100 mM) → L-γ-glutamilglicilglicina + 5-amino-2-nitrobenzoato en buffer Tris 100mM (⁹⁶). El sistema se constituyó por muestra (pellet), Tritón X-100 al 1% y buffer con sustratos (relación 1:1:9 v/v). Luego, se determinó la diferencia promedio por minuto de la absorbancia (ΔA/min) a 405 nm, valor que se multiplicaba por una constante (UI/L = ΔA/min x 1158). En condiciones de velocidad inicial y en rangos de linealidad, los resultados fueron expresados en mUI/mg de proteína. Las mediciones se realizaron en células estresadas y recuperadas.

Determinación del estado redox de membranas: En la fracción FI de Fölch, se midió la actividad de radicales libres, basada en la capacidad de

éstos de oxidar a TMPD (forma coloreada) ⁽⁹⁷⁾. Cada muestra se mezcló con igual volumen de TMPD 2 mM disuelto en etanol, en ambiente libre oxígeno por 30 minutos a temperatura ambiente, para ser medido luego (560 nm). Conjuntamente, el nivel de dienos conjugados (CD) fue establecido en las mismas muestras por un procedimiento antes descrito ⁽⁹⁸⁾, realizando las lecturas correspondientes a 234 nm (luz UV). Frente a blanco de etanol, los resultados de ambos ensayos se expresaron como absorbancia relativa a control (porcentaje de densidad óptica/mg de proteínas, C=100%).

2.4. Análisis estadístico

2.4.1. Efecto de los tratamientos

Comparaciones: Los datos fueron expresados como media \pm error estándar (ES) de \geq tres experimentos separados realizados en triplicado. Modelos de ANOVA fueron utilizados para evaluar el efecto de los tratamientos (C, S, Q, As, As+S y As+Q) sobre las diferentes respuestas celulares estudiadas. Para la comparación de las medias, se empleó el test de Tukey, considerando como significativo un valor de $p < 0,05$. Para evaluar una determinada respuesta en dos instancias distintas (células tratadas con y sin tiempo recuperación) se empleó en el test de Student apareado, con valor $p < 0,05$.

Asociaciones: El grado de asociación entre respuestas de tipo continuo fue determinado por el coeficiente de correlación de Pearson (CC), considerándose relevantes CC mayores a 0,5 o menores que -0,5. Por otro lado, la relación entre categorías de respuestas se estableció por el método de Chi cuadrado ($p < 0,05$). Asimismo, se consideraron como significativos coeficientes de chances (*odds ratios*, OR) obtenidos por regresión logística con valores de $p < 0,05$ al estudiar los distintos tratamientos y fenotipos celulares.

2.4.2. Efecto del tiempo (modelaciones)

Progresión temporal aguda: El efecto del tiempo sobre aquellas fue establecido, en primera instancia, por regresión lineal simple. Mientras que para aquellas respuestas que no ajustasen a dicha regresión, se emplearon curvas bifásicas.

Progresión subcrónica: Considerando que la evolución de las respuestas a lo largo de las semanas durante tratamientos de baja toxicidad no tenía adecuado ajuste al ser evaluada por métodos regresivos usuales, las curvas de tiempo fueron generadas por una técnica de suavizado (medias móviles - ventana 3).

3. Resultados

3.1. Cultivo no-tumoral bajo tratamiento agudo (modelo 1: toxicidad temprana)

3.1.1. Citotoxicidad

Cinética arsenotóxica y viabilidad celular: Las respuestas de las células CHO-K1 a As mostraron una cinética toxicológica particular a lo largo del tiempo de incubación. Morfológicamente, las células estresadas presentaban reorganización de los microfilamentos, si bien la cantidad de gangliósidos en las biomembranas no fue afectada. Molecularmente, se hallaron dos patrones diferentes de respuesta, según se prolongara la incubación con As o se permitiera la recuperación en DMEM completo libre de tratamiento (Figura 3). Se seleccionó para la evaluación de los flavonoides estudiados el punto cronológico donde el As modificó significativamente la respuesta en cuestión. Las células tratadas con As mostraron una reducción de su viabilidad a lo largo del tiempo, volviéndose ésta significativamente menor a partir de la sexta hora ($R^2=0,41$; $F_{(5,25)}=3,2$; $p<0,05$), con una vida media (tiempo necesario reducir a la mitad una densidad celular dada) de 8 horas, marcando el final de la experimento. Los restantes tratamientos fueron similares a C en todos los tiempos (Tabla 1).

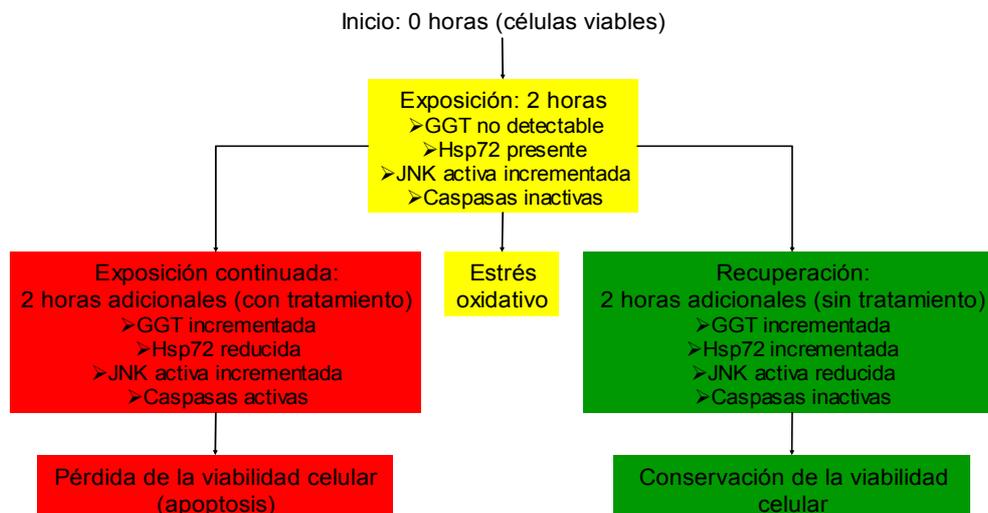


Figura 3. Respuesta molecular por exposición a 200 µM de NaAsO₂ frente a control.

Tabla 1. Curva temporal de viabilidad celular para línea no tumoral CHO-K1 (% respecto al control correspondiente para cada tiempo: media \pm ES, n=5)					
Tratamiento*	Tiempo (horas)				Estimación lineal (R ²)
	2	4	6	8	
S	104,84 \pm 8,51	99,56 \pm 3,73	97,56 \pm 2,00	97,34 \pm 2,45	-0,63 (0,43)
Q	87,38 \pm 12,14	91,29 \pm 0,92	96,34 \pm 10,49	81,45 \pm 3,91	-1,41 (0,37)
As	103,83 \pm 12,38	85,56 \pm 8,80	60,15 \pm 4,15 \downarrow	52,92 \pm 1,31 \downarrow	-6,89 (0,89)
As+S	86,69 \pm 8,71	90,36 \pm 7,33	97,56 \pm 12,63	92,74 \pm 5,64	-0,18 (0,01)
As+Q	95,77 \pm 9,15	97,78 \pm 4,71	98,54 \pm 6,34	97,43 \pm 3,11	-0,12 (0,06)

\downarrow Disminución significativa respecto a C ($p < 0,05$).

*S: silimarina (5 μ M); Q: quercetina (50 μ M); As: arsenito de sodio (200 μ M).

Fenotipo vital por citofluorescencia: Este parámetro fue evaluado por citometría de flujo y por microscopía a los 4 y 6 horas de tratamiento. Dicho periodo fue seleccionado por representar una etapa intermedia de compromiso de la viabilidad, dos horas luego de inducido el estrés celular (2^o hora) y dos horas previas a la finalización de los experimentos (8^o hora). Por el primer procedimiento, se analizó la distribución celular en *dot plots* de acuerdo a la marcación con los fluoróforos FITC y PI, y se obtuvieron los correspondientes coeficientes de chances (odds ratio, OR; $p < 0,005$), para las siguientes categorías: viabilidad conservada (FITC-/PI-), apoptosis temprana (FITC+/PI-), apoptosis tardía (FITC+/PI+) y necrosis (FITC-/PI+). Tomando como referencia a C, los tratamientos con S y As+S mostraron mayores chances de conservar la viabilidad celular (OR: 2,04 y 1,91, respectivamente), mientras que la misma fue afectada negativamente por Q, As, y As+Q (OR: 0,21, 0,25 y 0,1, respectivamente), mostrando un fenotipo apoptótico tanto temprano como tardío, para los tres casos (Figura 4). Los hallazgos fueron similares en ambos tiempos de determinación. Por otro lado, se observaron modificaciones morfológicas posteriormente (6^o hora) por microscopía de fluorescencia. Se evaluaron coloración y morfología, a fin

de determinar el fenotipo vital predominante: células viables (capaces de captar activamente por endocitosis la FDA) y células apoptóticas (incapaces de excluir activamente PI), tal como se observó con una magnificación de 400x (fenotipo apoptótico con retracción celular y formación de los cuerpos característicos) (Figura 5). Los cambios hallados en las células tratadas con As fueron aumento de la captación de PI, con una intensidad 1,6 veces superior a la lograda con FDA en campos de 100x con similar luminosidad. Para los tratamientos C y S, el fenotipo hallado en todos los campos era el viable. Con el tratamiento As+S se obtuvo un claro predominio de este último patrón, menos constante con Q y As+Q (Figura 6).

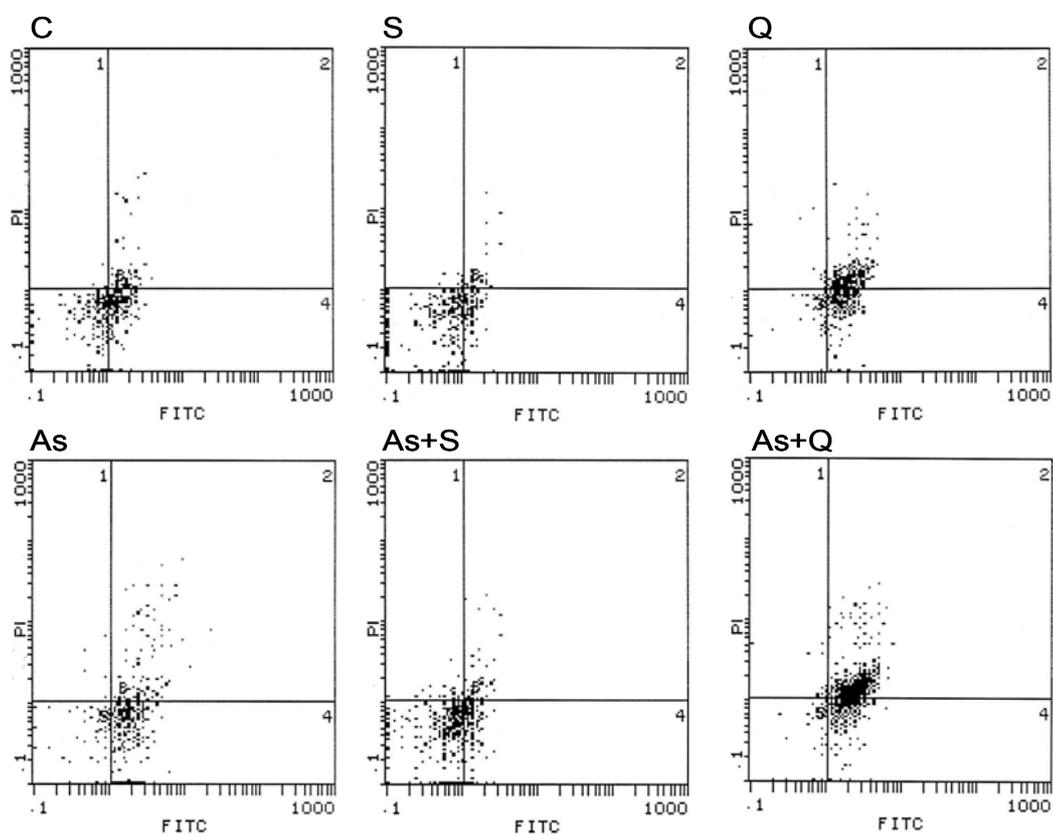


Figura 4. Citometría de flujo de la línea CHO-K1 bajo tratamiento agudo: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por cuatro horas: C (control), S (5 μ M de silimarina), Q (50 μ M de quercetina), As (200 μ M de arsenito de sodio), As+S y As+Q. PI: yoduro de propidio; FITC: anexina-V conjugada con el fluoróforo FITC. Imágenes representativas de cuatro experimentos separados.

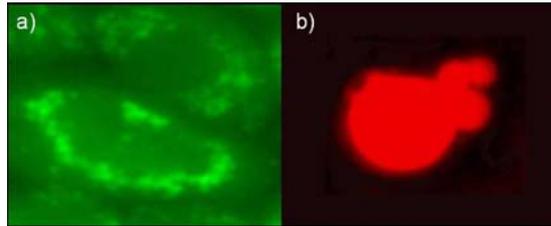


Figura 5. Citología por doble fluorescencia de la línea CHO-K1 bajo tratamiento agudo: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por seis horas: C (control) vs. As (200 μ M de arsenito de sodio). Fenotipo vital en verde (fluoresceína diacetato, a) y fenotipo apoptótico en rojo (yoduro de propidio, b). Imágenes representativas de seis experimentos separados (x400).

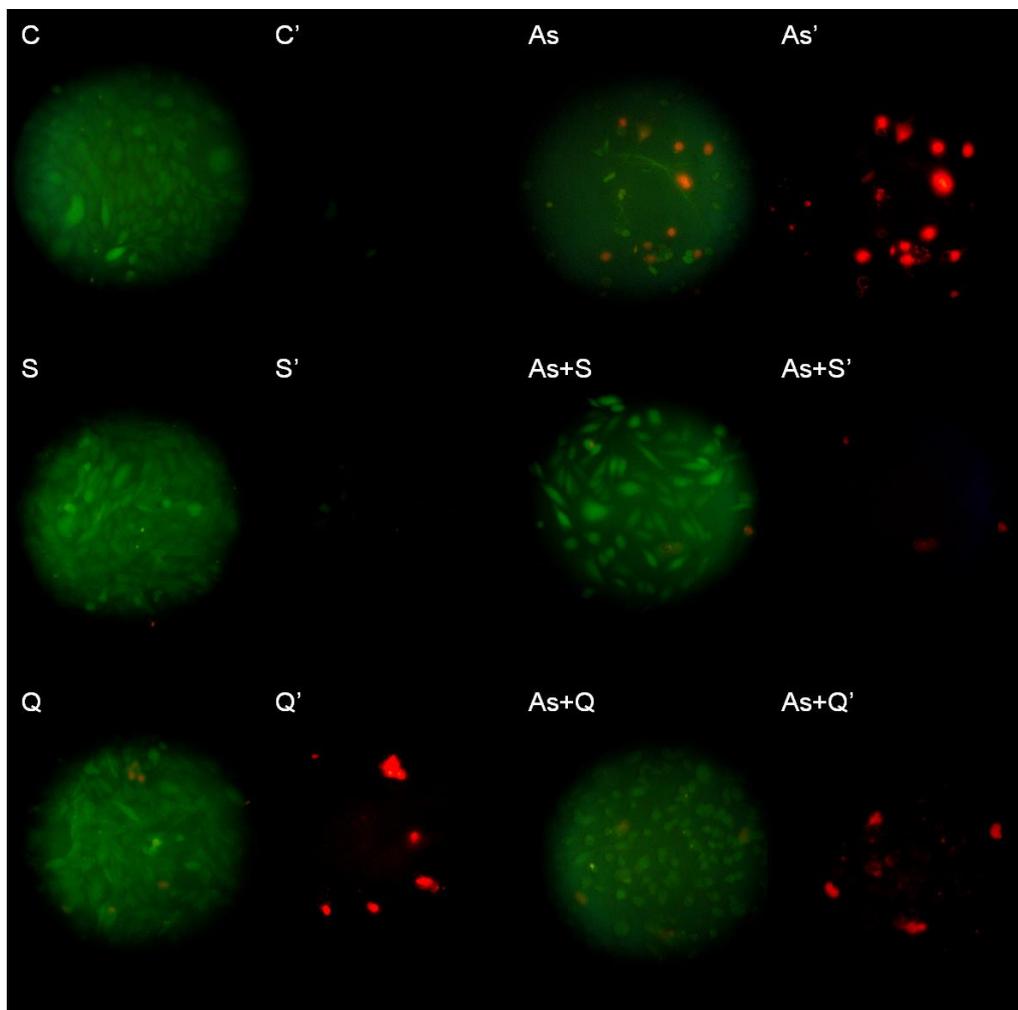


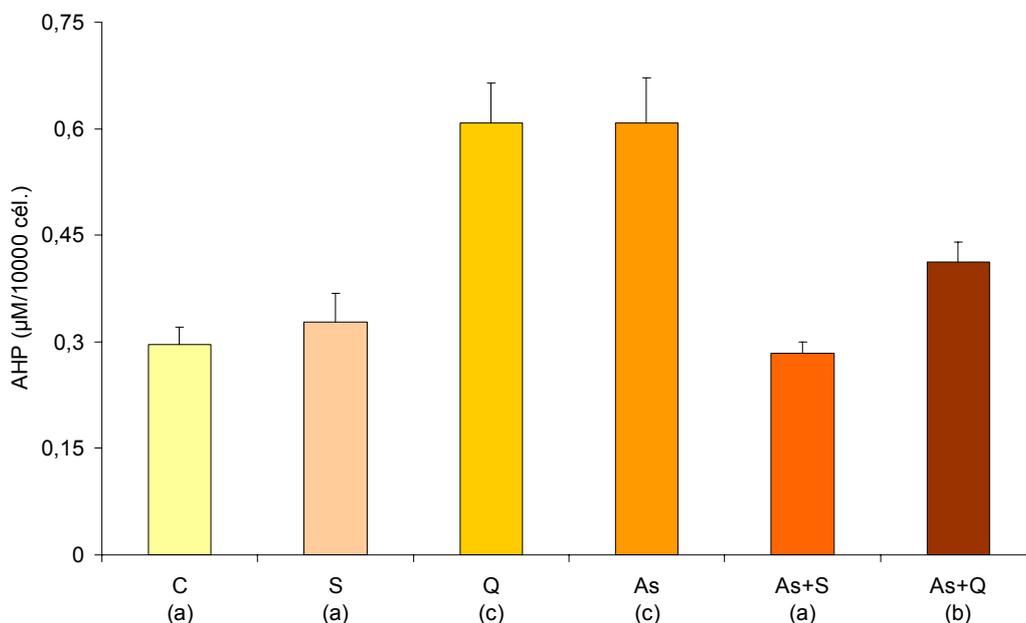
Figura 6. Citología por doble fluorescencia de la línea CHO-K1 bajo tratamiento agudo: Las células fueron incubadas bajo las siguientes condiciones por seis horas: C (control), S (5 μ M de silimarina), Q (50 μ M de quercetina), As (200 μ M de arsenito de sodio), As+S y As+Q. Las letras con tilde señalan fluorescencia roja (yoduro de propidio) y sin tilde verde (fluoresceína diacetato). Imágenes representativas de seis experimentos separados (x100).

3.1.2. Estrés celular (marcadores derivados del oxígeno y del nitrógeno -estrés oxidativo y nitrosativo, respectivamente-: 2 h de tratamiento)

Hidroperóxidos acuosos (AHP): El nivel de AHP fue afectado por los tratamientos de manera significativa ($R^2=0,63$; $F_{(5,31)}=10,51$; $p<0,0001$). Las células tratadas con As mostraron un marcado incremento de los valores (2,1 veces comparado a C), el cual fue contrarrestado completamente por silimarina (As+S) y parcialmente por quercetina (As+Q). Esta última tuvo un efecto oxidante por sí misma (Q), mientras que con el tratamiento S, se observaron valores similares a C (Figura 7).

Hidroperóxidos lipídicos (LHP): El nivel de LHP fue afectado de manera significativa ($R^2=0,55$; $F_{(5,31)}=7,72$; $p<0,0001$), viéndose incrementados 1,6 veces respecto a C por el tratamiento As. En cambio, el uso de flavonoides se asoció con niveles similares a C (Figura 7).

Nitritos: La formación de estos productos finales de la vía sintética del NO fue disminuida significativamente respecto de C (100%=8,89±0,62 μM de NaNO_2 por pozo sembrado) por todos los tratamientos ($R^2=0,83$; $F_{(5,12)}=11,95$; $p=0,0003$), excepto por el de As+Q (Figura 8).



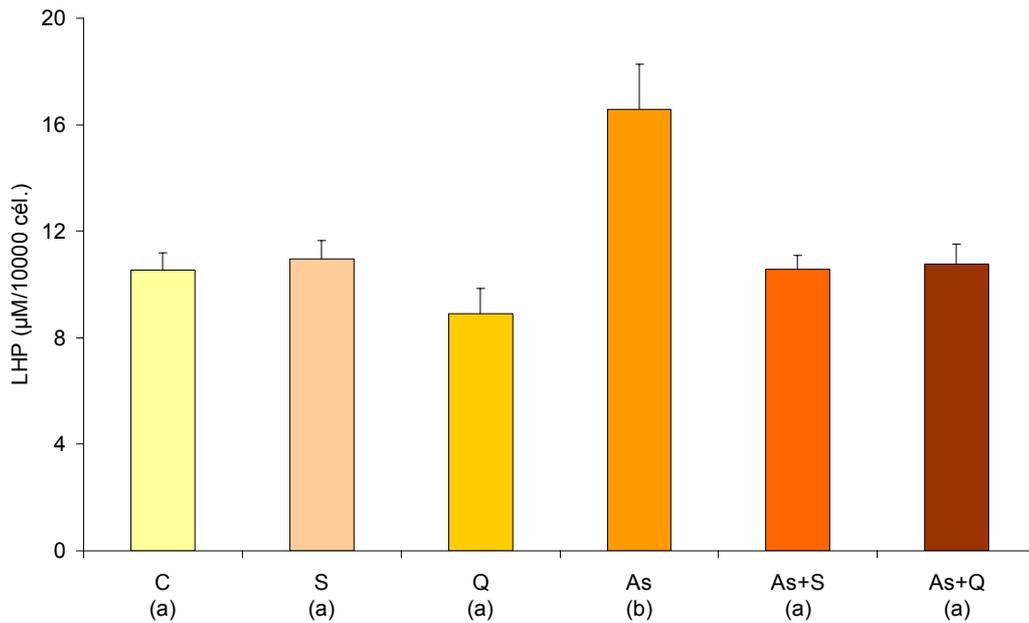


Figura 7. Hidroperóxidos en la línea CHO-K1 bajo tratamiento agudo: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por dos horas: C (control), S (5 µM de silimarina), Q (50 µM de quercetina), As (200 µM de arsenito de sodio), As+S y As+Q. Distintas letras entre paréntesis indican que existen diferencias estadísticas ($p < 0,05$). Arriba (página anterior): hidroperóxidos acuosos (AHP); abajo: hidroperóxidos lipídicos (medias \pm ES, $n=6$).

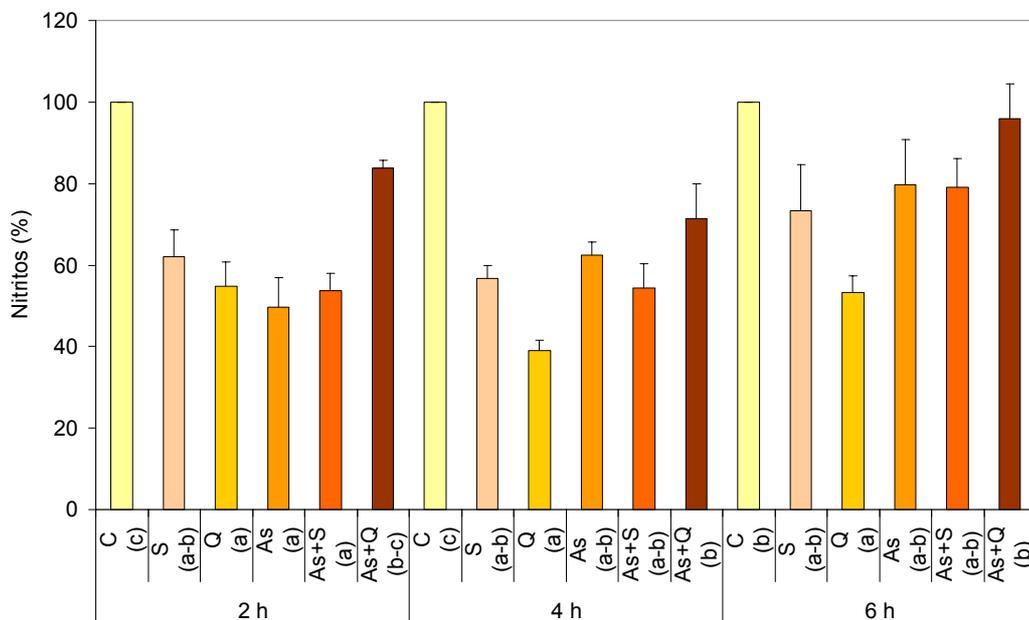


Figura 8. Nitritos en la línea CHO-K1 bajo tratamiento agudo: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por 2-6 horas: C (control), S (5 µM de silimarina), Q (50 µM de quercetina), As (200 µM de arsenito de sodio), As+S y As+Q. Distintas letras entre paréntesis indican que existen diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre medias \pm ES ($n=3$).

L-citrulina: El nivel intracelular de L-citrulina no fue modificado por los distintos tratamientos ($R^2=0,43$; $F_{(5,17)}=2,61$; $p=0,0626$), presentando las siguientes medias \pm ES (n=4, nmol/mg. prot.): C=36,02 \pm 2,83, S=33,36 \pm 2,38, Q=34,28 \pm 3,34, As=40,67 \pm 2,88, As+S=47,41 \pm 2,85 y As+Q=42,78 \pm 4,81.

3.1.3. Respuestas celulares y moleculares I: Citoplasma

Distribución de microfilamentos de actina: A partir de la segunda hora de tratamiento, se observaron cambios morfológicos asociados a la reorganización del citoesqueleto, con redistribución de las moléculas de actina, estableciéndose distintos patrones citoplasmáticos (Figura 9):

- Difuso: Los microfilamentos se distribuyeron por el citoplasma de manera más o menos uniforme con una marca levemente mayor en áreas cercanas al núcleo. Este patrón fue hallado en las células controles (C), por lo que fue tomado como referente de normalidad. El mismo también fue observado bajo los tratamientos con silimarina (S, As+S).
- Perinuclear con fibras: Las células tratadas con arsenito mostraron un patrón diferente, con intensa marcación perinuclear y desarrollo de algunas proyecciones fibrilares. Esta distribución se consideró como marcadora de efecto del tratamiento As.
- Granular con alteraciones morfológicas: En este caso, las células presentaban una distribución citoplasmática de la actina similar a la normal, pero no uniforme, sino conformando un patrón granular. Además, éstas estaban aumentadas de tamaño y con alteración de la forma celular (hipertrofia). Mostraron esta apariencia las células sometidas a los tratamientos que incluían quercetina (Q y As+Q).

Activación de JNK: La fosforilación de esta quinasa fue un proceso temprano asociado a la duración de la exposición a As. Se emplearon dos tipos de controles, negativo (incubación en DMEM completo sin tratamiento: C) y positivo (incubación en DMEM incompleto desde 24 horas antes al experimento: privación celular de factores tróficos), a fin de realizar las

comparaciones necesarias. De esta manera, su activación fue observada desde la primera hora de incubación, aunque en bajo tenor y aún exhibiendo doble banda tras el revelado de la nitrocelulosa inmunotransferida, marcando también la etapa inicial monofosforilada. A la segunda hora, la banda correspondiente a la forma difosforilada se hizo más manifiesta, punto en el cual se evaluaron el resto de los tratamientos. Este estado se sostenía si se continuaba el tratamiento. En cambio, si se permitía su recuperación, las células mostraban un descenso del nivel de enzima activada también en forma tiempo-dependiente. Cuando se evaluaron los diferentes tratamientos por Western-blotting, se halló que As incrementaba la cantidad de JNK activada duplicando a C, mientras que el co-tratamiento con flavonoides contrarrestaba este efecto (As+S y As+Q). Asimismo, en comparación con C, las células redujeron sus niveles de activación levemente cuando fueron tratadas con S y de manera completa con Q (Figura 10). Cuando se evaluó su ubicación a la segunda hora, JNK activa co-localizaba con actina en todos los tratamientos, mostrando niveles mayores cercanos al núcleo, tras exponerse los cultivos al As (Figura 11).

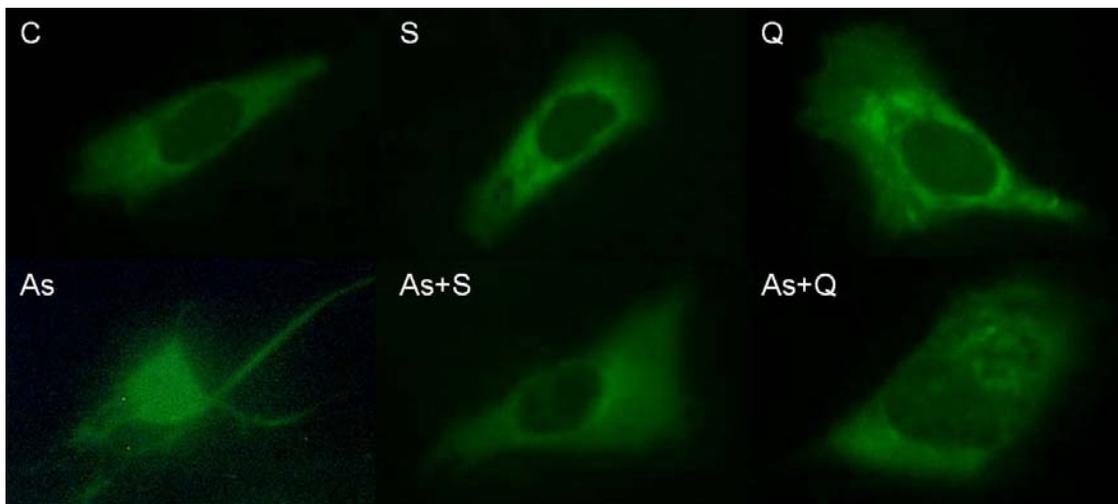


Figura 9. Distribución de los microfilamentos de actina en la línea CHO-K1 bajo tratamiento agudo: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por dos horas: C (control), S (5 μ M de silimarina), Q (50 μ M de quercetina), As (200 μ M de arsenito de sodio), As+S y As+Q. Imágenes representativas de ocho experimentos separados (x400).

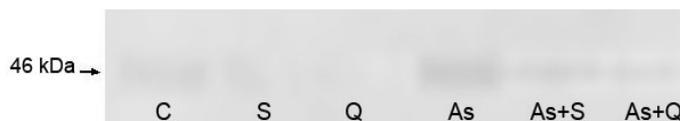


Figura 10. Activación de JNK en la línea CHO-K1 bajo tratamiento agudo: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por dos horas: C (control), S (5 μM de silimarina), Q (50 μM de quercetina), As (200 μM de arsenito de sodio), As+S y As+Q. Imágenes representativas de cuatro experimentos separados.

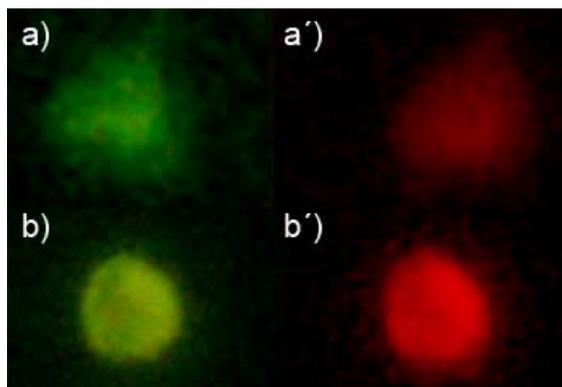


Figura 11. Co-localización de actina y JNK activada en la línea CHO-K1 bajo tratamiento agudo: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por dos horas con As (200 μM de NaAsO_2), con distintos grados de ubicación perinuclear (a: menor; b: mayor). Verde: actina; rojo: JNK. Imágenes representan tres experimentos separados (x400).

Expresión de Hsp72: La expresión de esta chaperona fue evaluada estableciendo previamente las condiciones de tiempo óptimas para realizar luego las comparaciones correspondientes. Así, se observó que dicha proteína, mínima en los controles, no se incrementaba tras 0-2 horas de incubación con As y lo hacía levemente tras 3-4 horas de la misma, punto en el cual se comprometía la viabilidad celular, dejando de inducirse respuestas de recuperación. Dado que la síntesis esta proteína debe ser inducida, se les permitió a las células tratadas con As recuperarse, siendo incubadas en medio libre por 1-2 horas adicionales, periodo tras el cual el nivel de Hsp72 era máximo. Con mayores tiempos de recuperación, tales niveles iniciaban su descenso gradual. Al comparar los tratamientos por Western-blotting, se encontró un claro incremento de Hsp72 en las células tratadas con As, mientras el resto de los mismos poseían niveles similares a C (Figura 12).

Actividad específica de CASP: El tratamiento con As incrementó la actividad de CASP significativamente a las 4 horas de exposición continua ($R^2=0,86$; $F_{(5,14)}=16,87$; $p<0,0001$). Los demás tratamientos mostraron actividades catalíticas similares a C en ese tiempo (Figura 13).



Figura 12. Expresión de Hsp72 en la línea CHO-K1 bajo tratamiento agudo con recuperación: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por dos horas: C (control), S (5 μM de silimarina), Q (50 μM de quercetina), As (200 μM de arsenito de sodio), As+S y As+Q, seguido por dos horas sin tratamientos. Imágenes representativas de cuatro experimentos separados.

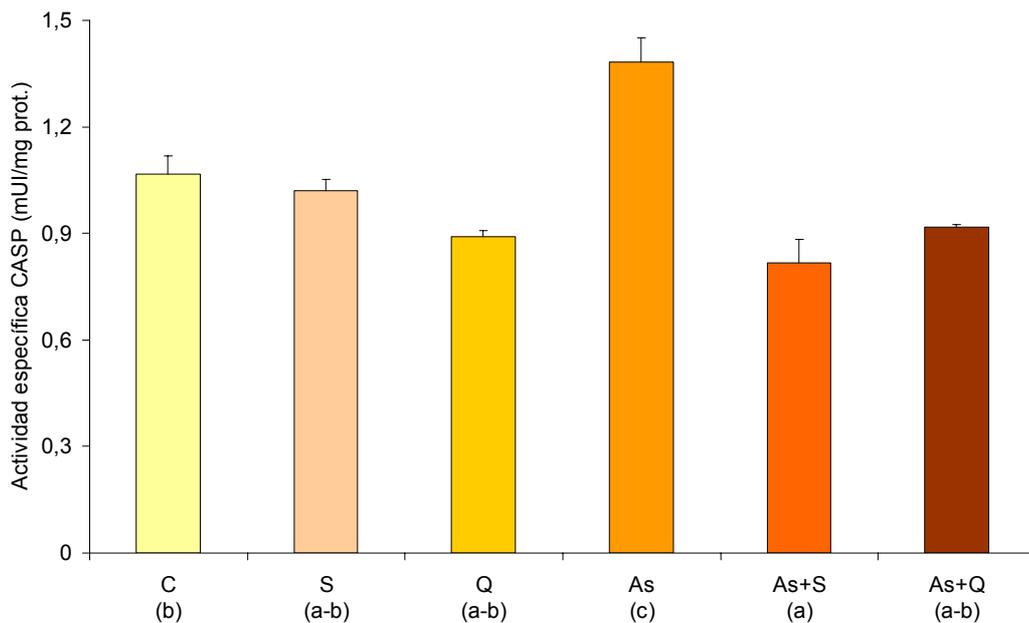


Figura 13. Actividad de específica de caspasas (CASP) en la línea CHO-K1 bajo tratamiento agudo: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por cuatro horas: C (control), S (5 μM de silimarina), Q (50 μM de quercetina), As (200 μM de arsenito de sodio), As+S y As+Q. Distintas letras entre paréntesis indican diferencias estadísticas ($p<0,05$) entre medias \pm ES ($n=3$).

3.1.4. Respuestas celulares y moleculares II: Biomembranas

Contenido de SA lipídico (gangliósidos): Este no fue un parámetro afectado significativamente por los tratamientos realizados durante 2 horas a las células CHO-K1 ($R_2=0,12$; $F_{(5,17)}=0,66$; $p=0,6563$), presentando las siguientes medias \pm ES ($n=4$; nmol/mg. prot.): C= $0,81\pm 0,17$, S= $0,60\pm 0,21$, Q= $0,71\pm 0,24$, As= $0,68\pm 0,28$, As+S= $0,85\pm 0,45$ y As+Q= $1,29\pm 0,27$.

Actividad específica de GGT: Tras el periodo de recuperación, no hallándose niveles basales detectables, la actividad de la enzima fue similar a C en las células tratadas con S, Q, y As+S, mientras As tuvo el mayor valor. Por otro lado, este parámetro se vio significativamente disminuido por As+Q ($R_2=0,81$; $F_{(5,24)}=20,89$; $p<0,0001$) (Figura 14).

Estado redox: Respecto a los controles, se observaron niveles significativamente mayores de CD en las células expuestas a As (1,85 veces). Los tratamientos restantes presentaron valores semejantes a C ($R_2=0,85$; $F_{(5,14)}=15,39$; $p<0,0001$) (Figura 15). Al determinar la capacidad oxidante de las muestras por el ensayo con TMPD, se obtuvieron resultados similares, aunque en diferente extensión dada la menor especificidad (67%) y sensibilidad (22%) del método en comparación con la medición de CD.

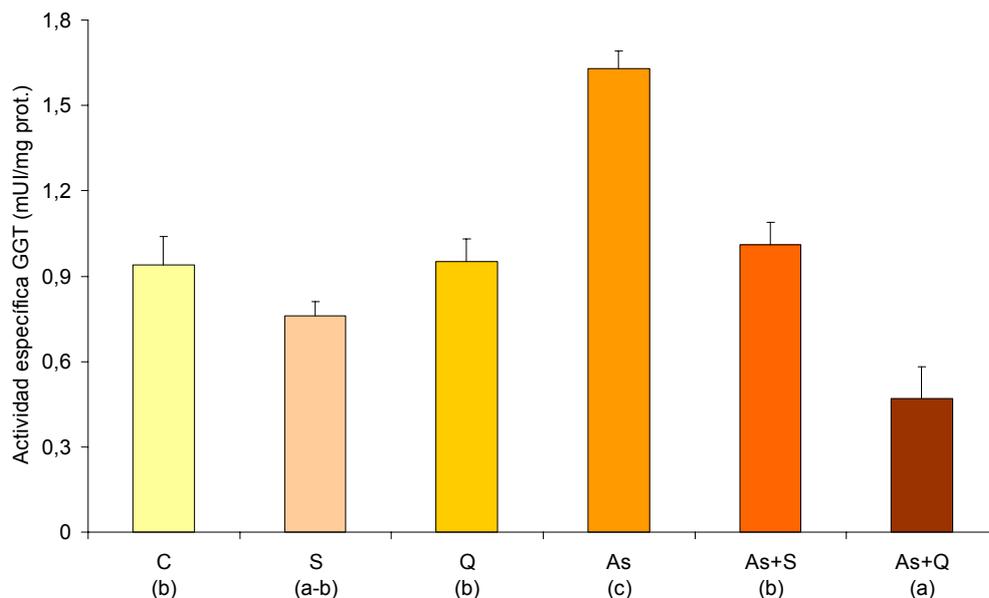


Figura 14. Actividad de específica de γ -glutamyltranspeptidasa (GGT) en la línea CHO-K1 bajo tratamiento agudo con periodo de recuperación: Las células fueron tratadas bajo las

siguientes condiciones por dos horas: C (control), S (5 μM de silimarina), Q (50 μM de quercetina), As (200 μM de arsenito de sodio), As+S y As+Q, incubando luego por dos horas en medio libre. Distintas letras entre paréntesis indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre medias \pm ES ($n=5$).

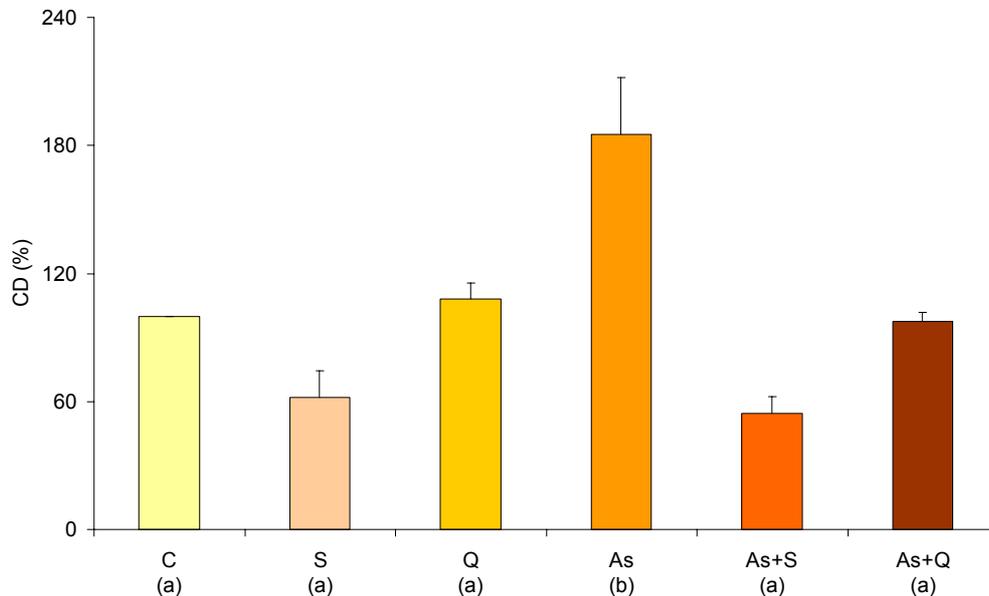


Figura 15. Dienos conjugados (CD) en la línea CHO-K1 bajo tratamiento agudo: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por dos horas: C (control), S (5 μM de silimarina), Q (50 μM de quercetina), As (200 μM de arsenito de sodio), As+S y As+Q. Distintas letras entre paréntesis indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre medias \pm ES ($n=3$).

3.2. Cultivos modificados (modelos 2 y 3: toxicidad diferencial según tiempo de exposición o según tipo celular, respectivamente)

3.2.1. Cultivo no-tumoral bajo tratamiento subcrónico (modelo 2: toxicidad tardía)

Contenido de SA lipídico (gangliósidos): La presencia de lípidos sialilados en las membranas de las células CHO-K1 exhibió diferentes comportamientos con tendencia decreciente, cuando este parámetro fue seguido a lo largo de las seis semanas de cultivo. El tratamiento con As llevó prontamente a una reducción significativa de los mismos, alcanzando valores de alrededor del 50% respecto a C a la tercera semana, situación

que se sostuvo durante el resto del seguimiento. Si bien As+Q retrasó tal descenso, tal efecto no fue visto ya durante la segunda mitad del experimento. Los tratamientos con S, Q y As+S mostraron valores que no difirieron significativamente de C. Se encontró, además, una apariencia similar al comparar las curvas de As+S y de As+Q, las que se comportaron “en espejo” con la generada por Q, la que fue similar a la de S (Figura 16).

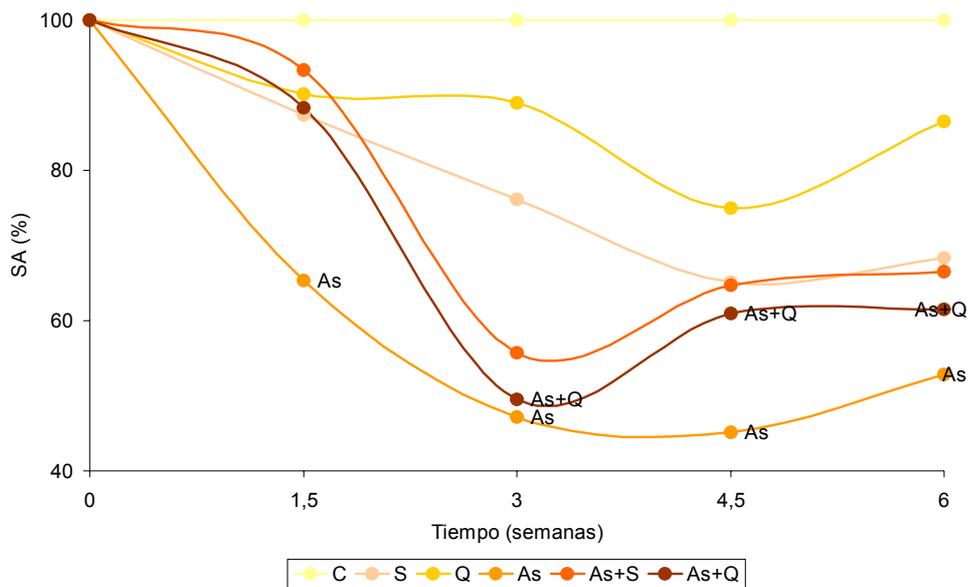


Figura 16. Ácido siálico lípidico (SA, gangliósidos) en la línea CHO-K1 bajo tratamiento subcrónico: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por seis semanas: C (control), S (0,125 μ M de silimarina), Q (5 μ M de quercetina), As (5 μ M de arsenito de sodio), As+S y As+Q. Los rótulos (medias \pm ES, n=3) indican puntos alejados (por arriba o debajo) del nivel control ($p < 0,05$).

Actividad específica de GGT: La actividad catalítica de la misma fue similar a C para los tratamientos S, As y As+S. Las curvas de actividad en los cultivos con Q y As+Q exhibieron un patrón sigmoideo a diferentes niveles de magnitud (superiores para Q). Así Q fue capaz de inducir de manera marcada a la enzima después de la tercera semana. As+Q, por su parte, la inhibió durante las primeras tres semanas de tratamiento, antes de retornar a valores controles (Figura 17). No se encontraron diferencias en este parámetro entre las células provenientes de los distintos tratamientos, que fueron peroxidadas luego de la incubación subcrónica.

Estado redox: Los CD se mantuvieron a niveles controles por seis semanas en las células bajo los tratamientos S y As+S. As indujo un incremento progresivo en tales niveles hasta la mitad de la quinta semana, presentando ya a la tercera semana diferencias significativas respecto a C. As+Q tuvo llevó a una elevación transitoria significativa tras una semana y media de tratamiento. Los cultivos incubados con Q redujeron sus niveles de CD hacia la tercera semana. Ambos tratamientos (Q y As+Q) se comportaron como C luego de esa semana (Figura 18). Por oxidación de TMPD, se halló un incremento en la actividad oxidante en las membranas expuestas a As, en particular a la mitad del tratamiento, en acuerdo con los resultados vistos al medir CD. Al comparar las curvas de tiempo para ambos métodos en los diferentes tratamientos, se encontró una correlación general entre ambos del 67%, que alcanzaba el 94% en el periodo medio de los mismos, cuando las distancias entre los valores de cada uno son mayores. Cuando CD y TMPD fueron analizados, se observó similar resistencia oxidativa a la exposición a peróxido de hidrógeno al finalizar los cultivos subcrónicos bajo los diferentes tratamientos.

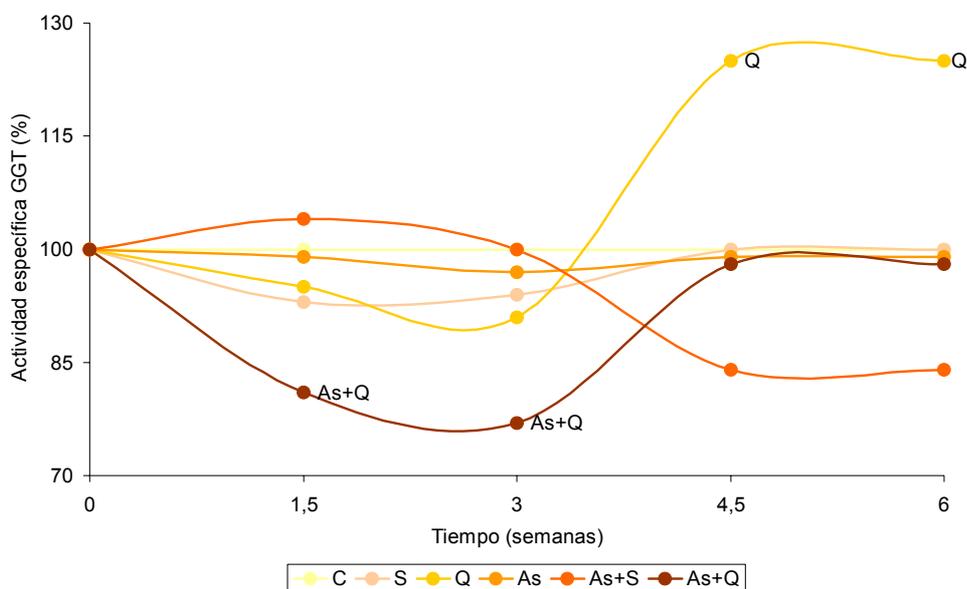


Figura 17. Actividad específica de γ -glutamyltranspeptidasa (GGT) en la línea CHO-K1 bajo tratamiento subcrónico: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por seis semanas: C (control), S (0,125 μ M de silimarina), Q (5 μ M de quercetina), As (5 μ M de

arsenito de sodio), As+S y As+Q. Los rótulos (medias \pm ES, n=3) indican puntos alejados (por arriba o debajo) del nivel control ($p < 0,05$).

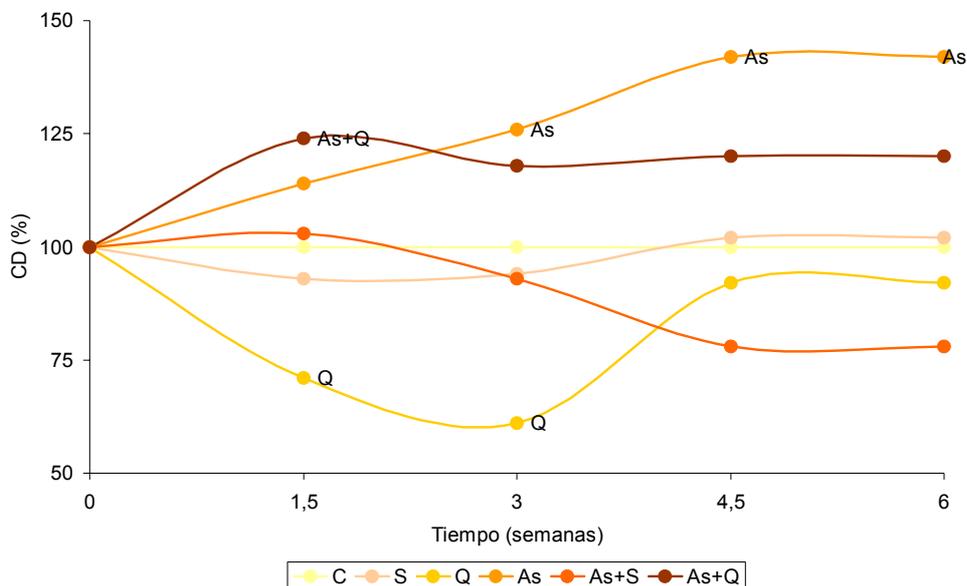


Figura 18. Dienos conjugados (CD) en la línea CHO-K1 bajo tratamiento subcrónico: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por seis semanas: C (control), S (0,125 μ M de silimarina), Q (5 μ M de quercetina), As (5 μ M de arsenito de sodio), As+S y As+Q. Los rótulos (medias \pm ES, n=3) indican puntos alejados (por arriba o debajo) del nivel control ($p < 0,05$).

3.2.2. Cultivo tumoral bajo tratamiento agudo (modelo 3: efecto antitumoral)

Viabilidad celular: Las líneas celulares humanas provenientes de cáncer de mama estudiadas mostraron diferente susceptibilidad a los tratamientos, reduciéndose de manera tiempo dependiente la viabilidad de las células ZR-75-1 con As (6^o h: $R^2=0,80$; $F_{(5,12)}=9,43$; $p=0,0008$), As+S (2^o h: $R^2=0,79$; $F_{(5,12)}=8,78$; $p=0,0011$) y As+Q (8^o h: $R^2=0,84$; $F_{(5,12)}=12,65$; $p=0,0002$), mientras tal efecto fue observado en las MCF-7 con As y As+S (ambos a partir de la 6^o h: $R^2=0,79$; $F_{(5,16)}=12,34$; $p=0,0001$) (Tabla 2).

Contenido de SA lipídico (gangliósidos): A pesar del hecho que las células ZR-75-1 y MCF-7 tenían niveles basales de control similares de SA en sus respectivas membranas ($0,29 \pm 0,02$ y $0,23 \pm 0,03$ nmol/mg prot.), respondieron diferente. El contenido de SA en las MCF-7 fue menor que en

las ZR-75-1 bajo los cinco tratamientos restantes: 3,4 veces para S, 18,9 para Q, 8,8 para As, 7,4 para As+S y 4,21 para As+Q. En cuanto a los primeros cuatro, fueron capaces de reducir SA sólo en la línea MCF-7 ($R^2=0,93$; $F_{(5,12)}=32,37$; $p<0,0001$), mientras As+Q lo incrementó, al igual que en las membranas de ZR-75-1 ($R^2=0,81$; $F_{(5,18)}=15,72$; $p<0,0001$) (Figura 19).

Tabla 2. Curva temporal de viabilidad celular para líneas tumorales de mama (% respecto al control correspondiente para cada tiempo: media \pm ES, n=3)					
Línea ZR-75-1					
Tratamiento*	Tiempo (horas)				Estimación lineal (R^2)
	2	4	6	8	
S	77,14 \pm 4,51	108,54 \pm 16,51	65,44 \pm 12,92	83,26 \pm 12,49	-2,26 (0,17)
Q	93,80 \pm 8,48	71,52 \pm 6,65	79,64 \pm 0,53	83,75 \pm 13,39	-2,33 (0,43)
As	72,15 \pm 6,96	80,43 \pm 12,12	35,29 \pm 8,35 \downarrow	31,90 \pm 5,98 \downarrow	-8,65 (0,86)
As+S	58,00 \pm 8,08 \downarrow	52,96 \pm 0,26 \downarrow	49,54 \pm 2,67 \downarrow	33,44 \pm 7,08 \downarrow	-7,08 (0,81)
As+Q	102,24 \pm 6,15	80,19 \pm 1,41	70,45 \pm 9,13	43,29 \pm 0,13 \downarrow	-7,26 (0,90)
Línea MCF-7					
Tratamiento*	Tiempo (horas)				Estimación lineal (R^2)
	2	4	6	8	
S	111,47 \pm 4,04	82,99 \pm 3,24	102,15 \pm 5,60	93,64 \pm 6,13	-1,10 (0,11)
Q	133,81 \pm 15,69	110,87 \pm 19,27	130,23 \pm 14,92	115,04 \pm 7,62	0,29 (0,01)
As	93,36 \pm 7,18	82,61 \pm 3,41	54,69 \pm 10,91 \downarrow	46,00 \pm 3,39 \downarrow	-7,33 (0,95)
As+S	92,51 \pm 11,70	89,61 \pm 8,67	58,79 \pm 7,50 \downarrow	53,59 \pm 4,22 \downarrow	-6,33 (0,89)
As+Q	113,22 \pm 6,03	106,84 \pm 8,27	92,50 \pm 0,57	95,92 \pm 4,31	-1,44 (0,30)
\downarrow Disminución significativa respecto a C ($p<0,05$).					
*S: silimarina (5 μ M); Q: quercetina (50 μ M); As: arsenito de sodio (200 μ M).					

Actividad específica de GGT: Tanto MCF-7 como ZR-75-1 mostraron valores basales cuantificables de la enzima, aunque la última presentaba los mayores niveles y con mayor capacidad de inducción que la primera ($p < 0,05$). Tras las primeras 2 horas de exposición, las células MCF-7 no respondieron a ninguno de los tratamientos instaurados ($R^2 = 0,45$; $F_{(5,12)} = 1,94$; $p = 0,1607$). Por otro lado, la actividad enzimática fue incrementada en las membranas de ZR-75-1 por exposición a los flavonoides, aunque Q tuvo el mayor efecto, mientras As, As+S y As+Q presentaron niveles menores de actividad que no alcanzaron a ser significativos respecto a C ($R^2 = 0,95$; $F_{(5,16)} = 57,59$; $p < 0,0001$) (Figura 20). Luego del periodo adicional de recuperación, las células MCF-7 tratadas con S, As, As+S y As+Q incrementaron la actividad de GGT con respecto a C ($R^2 = 0,84$; $F_{(5,14)} = 14,21$; $p < 0,0001$). En cambio, las células ZR-75-1 tratadas con As y As+S registraron actividades catalíticas menores, que las controles ($R^2 = 0,86$; $F_{(5,15)} = 18,32$; $p < 0,0001$) (Figura 21). Cuando se compararon dentro de cada línea y tratamiento a los cultivos sin recuperación con los que se recuperaron, se encontró que Q disminuía la actividad 4,4 veces ($p < 0,02$), mientras As la incrementaba 2,1 veces ($p < 0,05$), en las células MCF-7. Al realizar tales comparaciones con ZR-75-1, se hallaron incrementos en la actividad de la enzima de 3,6, 2,4, 3,8, 5,1 y 5,7 veces para los tratamientos C, S, As, As+S y As+Q, respectivamente.

Estado redox: Ambas líneas tumorales resultaron insensibles al efecto agudo de los tratamientos, no modificándose significativamente la formación de CD (ZR-75-1: $R^2 = 0,29$; $F_{(5,18)} = 1,44$; $p = 0,258$; MCF-7: $R^2 = 0,22$; $F_{(5,18)} = 1,04$; $p = 0,425$), obteniéndose los siguientes valores para ZR-75-1 (%; medias \pm ES, $n = 4$): C = 100 ± 0 , S = $112 \pm 9,8$, Q = $126 \pm 16,7$, As = $121 \pm 26,1$, As+S = $113 \pm 23,6$ y As+Q = 95 ± 26 . Para MCF-7, los valores fueron: C = 100 ± 0 , S = $102 \pm 5,6$, Q = $96 \pm 8,4$, As = $95 \pm 11,4$, As+S = $99 \pm 15,9$ y As+Q = 85 ± 20 . Cuando se evaluó la relación entre DC y la oxidación de TMPD, se halló un $CC > 0,5$ en las membranas celulares de MCF-7, lo que no sucedía en las muestras de ZR-75-1 ($CC < 0,5$). En ambas líneas tumorales, las membranas mostraron menor actividad oxidante (ensayo con TMPD) cuando las mismas

respondieron con elevación de la actividad de GGT y/o del contenido de SA (CC<-0,5), el cual también se asoció con menor nivel de CD (CC<-0,5). Además, modificaciones de este último parámetro se acompañaron por los consiguientes cambios en la actividad de la mencionada enzima (CC>0,5).

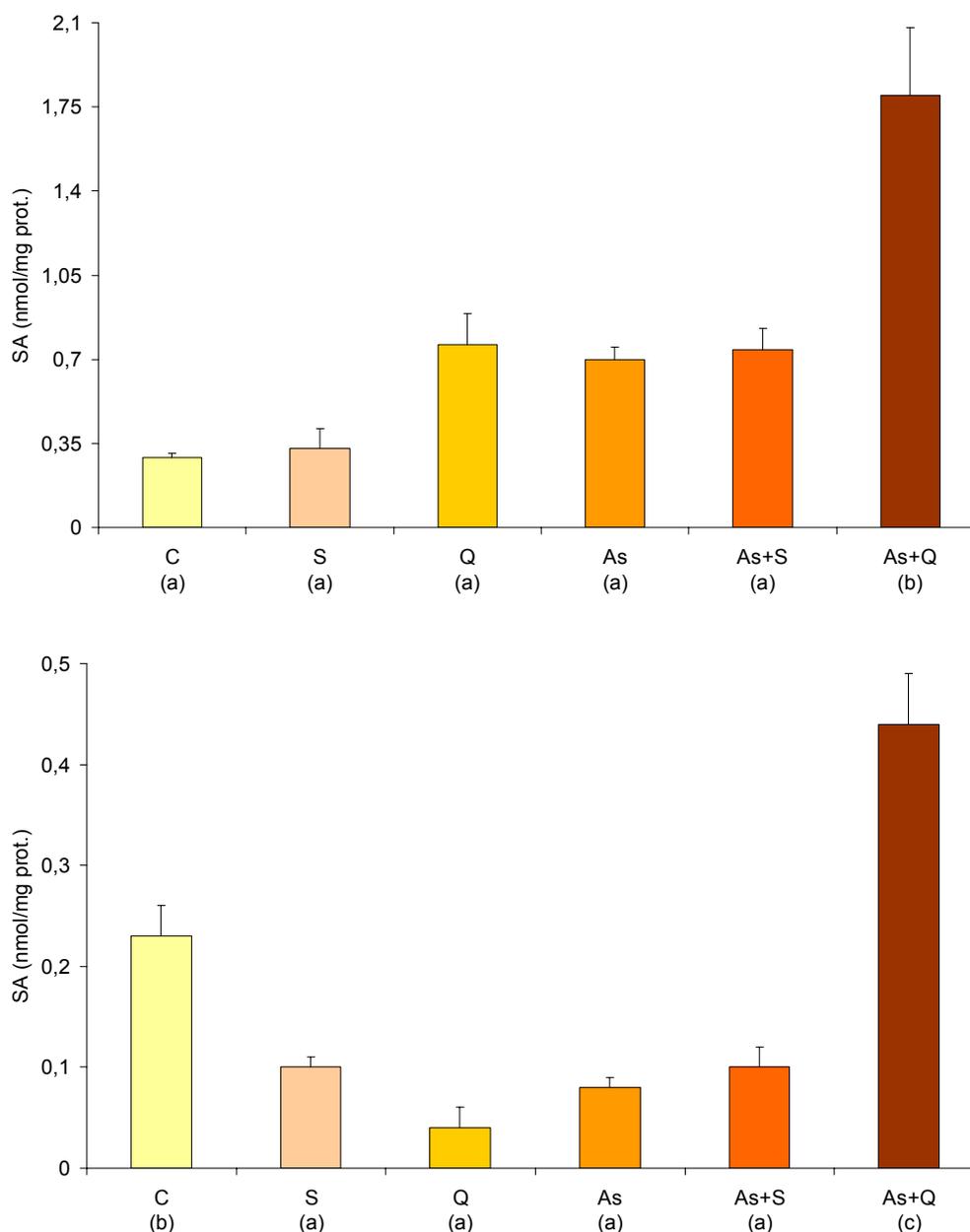


Figura 19. Ácido siálico (SA) en gangliósidos en las líneas ZR-75-1 (arriba) y MCF-7 (abajo) bajo tratamiento agudo (2 h): Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones: C (control), S (5 μ M de silimarina), Q (50 μ M de quercetina), As (200 μ M de arsenito de sodio), As+S y As+Q. Distintas letras entre paréntesis indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre medias \pm ES ($n=4$).

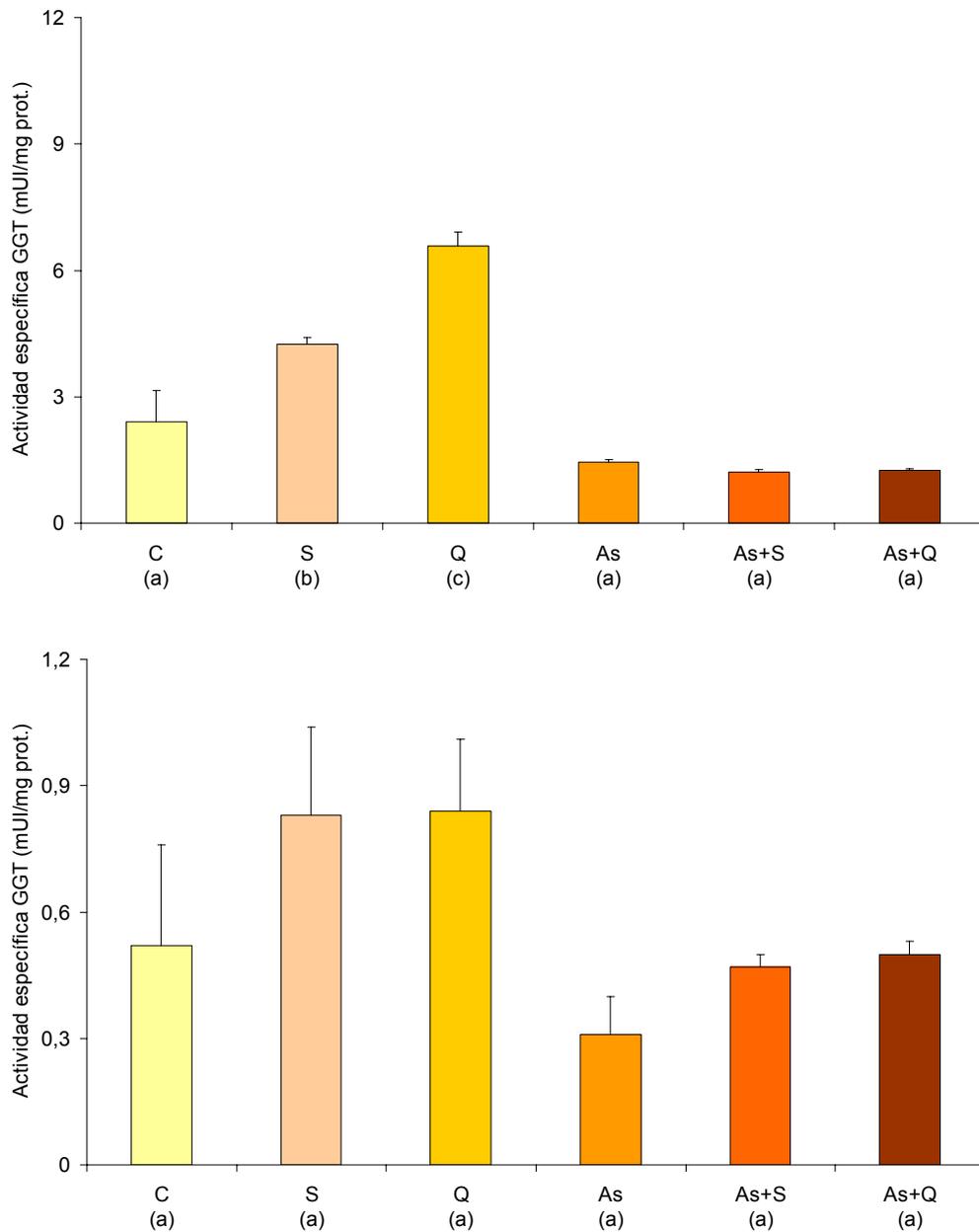


Figura 20. Actividad específica de γ -glutamiltanspeptidasa (GGT) en las líneas ZR-75-1 (arriba, página anterior) y MCF-7 (abajo) bajo tratamiento agudo: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por dos horas: C (control), S (5 μ M de silimarina), Q (50 μ M de quercetina), As (200 μ M de arsenito de sodio), As+S y As+Q. Distintas letras entre paréntesis indican que existen diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre medias \pm ES ($n=4$).

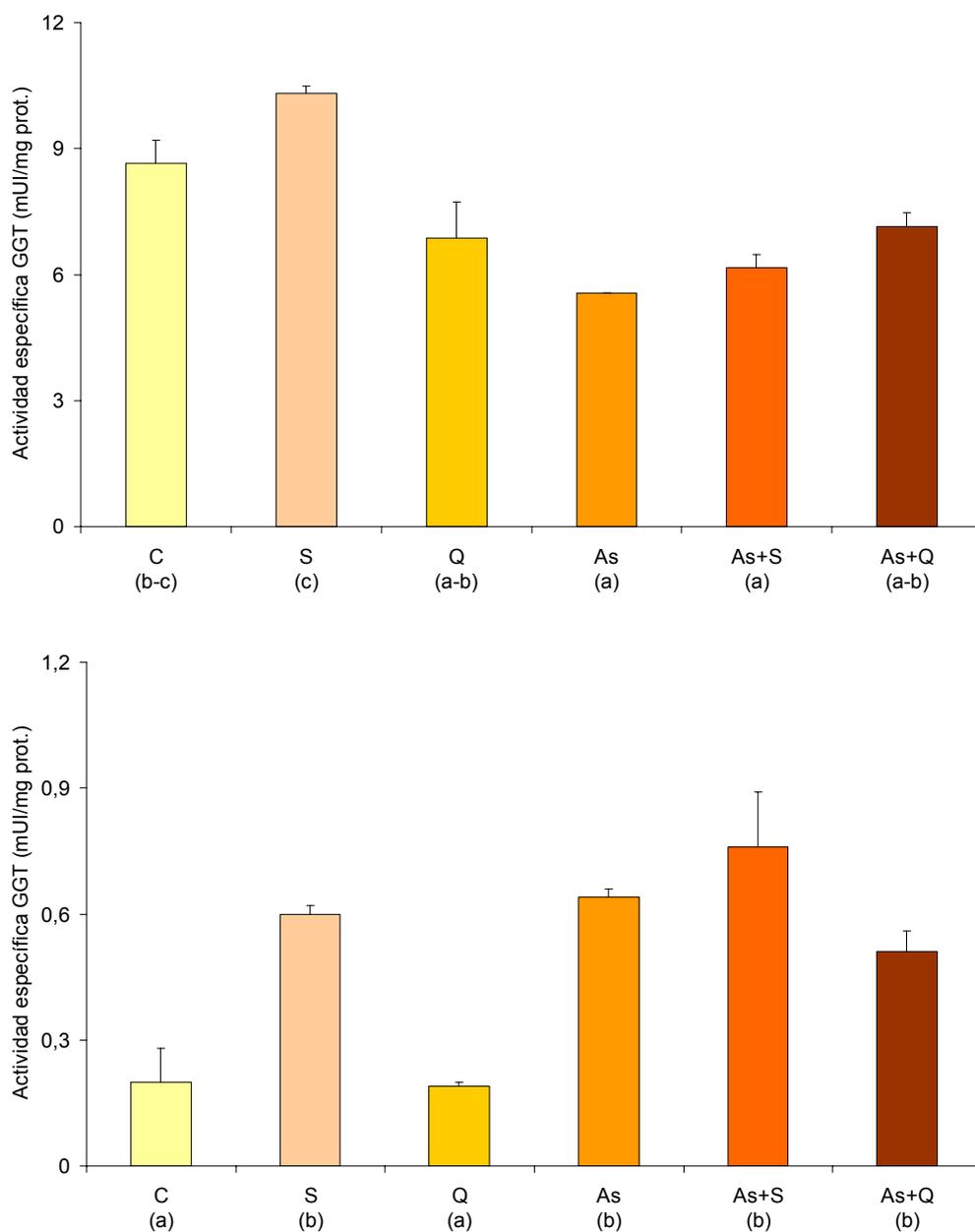


Figura 21. Actividad de específica de γ -glutamiltanspeptidasa (GGT) en las líneas ZR-75-1 (arriba) y MCF-7 (abajo) bajo tratamiento agudo con periodo de recuperación: Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones por dos horas: C (control), S (5 μ M de silimarina), Q (50 μ M de quercetina), As (200 μ M de arsenito de sodio), As+S y As+Q, incubando luego durante dos horas adicionales en medio de cultivo libre de tratamientos. Distintas letras entre paréntesis indican que existen diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre medias \pm ES (n=4).

4. Discusión

Millones de personas en el mundo sufren los efectos de la exposición a arsénico, principalmente por el consumo de aguas que lo contienen en niveles elevados. Los mecanismos biológicos responsables de la toxicidad inducida por este elemento y especialmente sus efectos crónicos adversos, incluyendo el efecto cancerígeno, no han sido completamente dilucidados.

Por siglos, la intoxicación aguda ha sido notablemente reconocida, sin embargo las consecuencias a largo plazo por exposición ambiental a bajas dosis recién comienzan a ser abordadas con mayor meticulosidad. Dada la relación existente entre tal exposición y la mayor incidencia de enfermedades tumorales, se ha planteado, como posible intervención epigenética, la modulación de la susceptibilidad celular al arsénico utilizando sustancias de origen vegetal, que modificarían los procesos carcinogénicos involucrados. En tal sentido, un creciente número de productos obtenidos de vegetales han mostrado propiedades quimiopreventivas promisorias (⁹⁹). No obstante, los mecanismos de acción de éstos deben ser exhaustivamente estudiados. En la presente tesis doctoral, fueron evaluados los efectos de dos flavonoides, silimarina (S) y quercetina (Q), sobre la citotoxicidad inducida por arsénico en modelos celulares, utilizando una línea no tumoral y dos neoplásicas humanas.

Primeramente, se establecieron la concentración óptima de arsenito de sodio (As) y el tiempo de cultivo necesario para obtener marcadores tempranos de estrés celular, a fin de evaluar los efectos potenciales de los flavonoides S y Q sobre la citotoxicidad inducida por As. Por otro lado, la concentración del mismo durante la exposición subcrónica se determinó en función del rango conocido como deletéreo cuando hay exposición humana a aguas subterráneas contaminadas (³). Dada la complejidad de procesos implicados en la citotoxicidad arsenical, se procedió al seguimiento temporal de la misma (análisis cinético), utilizando diferentes modelos celulares.

La viabilidad celular se evaluó cada dos horas durante un periodo de ocho horas, bajo las condiciones que definían el Modelo 1. A las primeras

dos horas, las células conservaban su viabilidad pero ya exhibían signos de estrés oxidativo, distinguiéndose como células estresadas y viables (CEV), definidas por las siguientes características: elevación en su nivel de radicales libres (TMPD oxidado) con el correspondiente incremento de dienos conjugados (CD), hidroperóxidos acuosos y lipídicos (AHP y LHP, respectivamente). Alcanzado este estado panoxidativo, el primer cambio morfológico observado fue la redistribución de los microfilamentos de actina. Posteriormente, se encontraron dos formas de respuesta según la exposición fuera continua o no. En el primer caso, la progresión llevó a la muerte de las células (definido molecularmente por la vía de JNK y caspasas, células estresadas no viables -CENV-), mientras que en el segundo se halló un proceso de recuperación (definido molecularmente por la vía Hsp, células estresadas recuperadas -CER-). A continuación, se describirán cada una de éstas, con sus correspondientes marcadores, y los efectos de S y Q.

Luego de dos horas de incubación, en las CEV se halló mayor oxidación de lípidos, de acuerdo a los hallazgos en la cantidad de CD. Este método ha sido utilizado clásicamente para la determinación de lipoperoxidación, sin embargo no se puede descartar que una proporción importante de los CD sea, en realidad, ácido linoleico conjugado. No obstante, dado que las células de mamíferos no son capaces de sintetizarlo (¹⁰⁰), es posible concluir que los diferentes valores de CD observados tras los tratamientos pueden ser atribuibles a cambios en el estado de redox de las membranas celulares. Esta hipótesis fue apoyada en los resultados obtenidos al medir una etapa previa, como lo es la presencia de radicales libres con capacidad de oxidar al TMPD, y, también, por los hallados en una etapa posterior de oxidación, como son los niveles de LHP. Referencias previas indican que los compuestos polifenólicos poseen actividad antioxidante (⁵¹). En tal sentido, se encontró que los dos flavonoides empleados pudieron inhibir la formación de CD inducida por As en los cultivos agudos de CHO-K1, siendo incluso más efectivos que otros antioxidantes de uso corriente como el selenio (¹⁰¹). Más aún, de la misma

manera fue controlado el incremento de LHP. Estos hallazgos resultarían de gran interés debido a la participación de estos metabolitos en las reacciones oxidativas en cadena y a su rol como ligandos de receptores que regulan el ciclo celular (¹⁰²).

Los hallazgos en el nivel de AHP fueron contradictorios e inesperados. En este sentido, quercetina mostró diferencias según fuera administrada sola o junto con As. En este último caso, Q fue capaz de controlar los efectos del metaloide, pero cuando fue utilizada como único tratamiento, elevó por sí sola a los AHP en los cultivos. Anteriormente, se había descrito un potencial prooxidante de la misma debido al decremento que induce de glutatión (GSH), con resultados distintos según esté asociada o no con otras sustancias (¹⁰³). A fin de considerar porque aún así contrarrestó a As, podría plantearse la posibilidad de la interacción directa de ambos, con el consecuente efecto quelante (¹⁰⁴), causando depleción mutua en el interior de la célula y evitando su interacción con los grupos tioles. De allí, que tales disparidades se hayan encontrado con las formas acuosas iniciales de HP, propias del citoplasma, mientras que dicho fenómeno no fue visto con los LHP dada la lipofilia de Q, favoreciendo el contacto y la protección de los lípidos. En cambio, silimarina mantuvo sus propiedades antioxidantes frente al aumento de ambas formas de HP, tanto sola como en co-tratamiento con As, hablando ello de una cinética molecular diferente operando en la formación de AHP y LHP (⁵⁴).

Los marcadores antes mencionados representan la vía oxidativa de estrés, cuya denominación genérica es ROS (del inglés *reactive oxygen species*, especies reactivas del oxígeno). Además, existe un vía nitrosativa (vía oxidativa del óxido nítrico) representada por las RNS (del inglés *reactive nitrogen species*, especies reactivas del nitrógeno), que no ha sido estudiada tan intensamente como las anteriores como mecanismo de estrés celular inducido por arsénico, aunque se ha propuesto su participación en los procesos carcinogénicos causados por éste (¹⁰⁵⁻¹⁰⁶). Esta vía debe ser evaluada, además, por las constantes interacciones que mantiene con la primera y sus implicancias en la fisiología celular (¹⁰⁷). Ambas familias

reactivas participan en importantes procesos, tales como la generación de energía, la oxidación y otras reacciones (nitración/nitrosación/nitrosilación) con macromoléculas, etc., y serían susceptibles de ser neutralizadas por enzimas y antioxidantes (¹⁰⁸). En consecuencia, merecen mención aparte los resultados obtenidos al evaluar la vía nitrosativa, ya que, al menos tempranamente, no estaría implicada como mecanismo de estrés por As. Así lo muestran los valores intracelulares de L-citrulina, que no fueron afectados tras dos horas de tratamiento. Sin embargo, el otro marcador evaluado, nivel de nitritos liberado en el medio de cultivo, sí se modificó, mostrando todos los tratamientos inhibición del mismo respecto a los controles. La diferencia entre los hallazgos de ambas técnicas se debería a que la cantidad de L-citrulina dentro de la célula está determinada no sólo por la actividad de la NOS, sino también por otras rutas metabólicas, como por ejemplo las implicadas en el ciclo de la urea (¹⁰⁹), necesitando de esta manera mayor estrés para ocasionar perturbaciones, mientras que los nitritos eliminados resultarían un parámetro con más estrecha interrelación (¹¹⁰). Éstos indicarían que los diferentes tratamientos causaban inhibición de la síntesis enzimática del óxido nítrico, involucrando diversos mecanismos. La regulación e inducción de la actividad NOS se produce a múltiples niveles: transcripcional (inducción por esteroides, estrés oxidativo y exposición a metales pesados), postraduccional (maduración y translocación intracelular y a membranas) y catalítico (regulación directa, fosforilación, disponibilidad de sustratos y cofactores, como el calcio) (¹¹¹⁻¹¹²). El As podría ejercer su acción a través de varios de ellos, sea como inductor transcripcional en función de ser un estresante celular (¹¹³), o al mismo tiempo como inhibidor catalítico dado que causa consumo de cofactores y que podría unirse a Cys²⁰⁰ y Cys⁴⁵³ (¹¹⁴), inactivando la enzima. Entonces, el resultado final dependería de la suma algebraica de sus efectos sobre esta vía. En las condiciones experimentales utilizadas, predominaría inicialmente el último efecto debido a las altas concentraciones usadas, sin descartar la posibilidad de recuperación posterior en virtud de la inducción de la síntesis de la NOS, produciéndose lo que se conoce como hormesis o respuesta bifásica en U

(¹¹⁵). Más aún, existe evidencia contradictoria de las implicancias del NO en la arsenotoxicidad con publicaciones que hablan de un efecto protector del gas sobre las células o, incluso, de su escasa participación en la misma (¹¹⁶), como se observó durante los experimentos de esta tesis. Ahora bien, cuando se evaluaron los tratamientos con flavonoides, ambos mostraron un comportamiento similar, excepto con Q sola, pues se registró una inhibición sostenida, posiblemente asociada con su uso en alta concentración. Nuevamente, se observó disparidad entre el efecto de Q frente a As+Q, tal como sucedió al medir AHP, reforzando la idea de interacción entre ambas sustancias. Además de las consideraciones hechas para As, cuando se analizan compuestos polifenólicos no deben olvidarse otros mecanismos, como por ejemplo su papel como ligandos de receptores celulares y su capacidad de interacción con las biomembranas donde se ubican enzimas, debido a su lipofilia (¹¹⁷). De hecho, a este tipo de fenómeno, resultante de heterogéneas susceptibilidades celulares frente a diferentes rangos de dosis, subyace una imbricada de red vías bioquímicas, donde arsénico y xenobióticos podrían intervenir en múltiples blancos moleculares. Otro aspecto a tener en cuenta es que con tal complejidad, el valor de algunos biomarcadores debería ser minuciosamente analizado. En tal sentido y a manera de ejemplo, se halla la capacidad del anión superóxido de secuestrar óxido nítrico para formar peroxinitrito, llevando a menores niveles de nitratos y nitritos (¹¹⁸), con la consiguiente subestimación de una vía activa cuando se estudian parámetros aisladamente.

Tras las modificaciones del estado redox descritas, la primera respuesta celular observada fue la reorganización del citoesqueleto, particularmente de los microfilamentos (MF) de actina, relacionado temporalmente un cambio bioquímico precoz con uno biológico posterior. El citoesqueleto juega un rol capital en el mantenimiento de la integridad, morfología y estructura de la matriz citoplasmática, actuando como importante determinante del fenotipo celular y organizando partes de la maquinaria de señalización que regulan la adhesión y la comunicación intercelular (¹¹⁹). Los diferentes tratamientos mostraron patrones de

distribución especiales. La base estructural de tales respuestas asienta en la capacidad de la actina monomérica (actina G) para polimerizarse y depolimerizarse en MF (actina F) (¹²⁰). Esto resulta particularmente relevante en células epiteliales (como las CHO-K1 empleadas en el presente trabajo), donde alteraciones del balance redox llevan a compromiso funcional y cambios estructurales (¹²¹). Más aún, la susceptibilidad de la actina a la oxidación es un aspecto crítico en la homeostasis celular, tal como lo demuestra la presencia en el citoplasma de numerosos sistemas enzimáticos de reparación (¹²²). Las CEV tratadas con S y As+S mostraron el típico patrón propio de los controles, con MF citoplasmáticos difusamente distribuidos, con una mayor densidad cerca del núcleo. La incubación con As llevó ahora a cambios marcados, con un patrón netamente perinuclear y con formación de prolongaciones. Esta morfología sería la resultante de múltiples mecanismos, tanto directos (unión de As a grupos tioles evolutivamente conservados de la actina y oxidación de éstos, ej.: Cys²⁸⁴ y Cys³⁷³), como indirectos (respuestas dependientes de estrés celular), actuando de manera no excluyente entre ellos. Consecuentemente, estas células presentarían menos adhesiones focales, lo que llevaría a reducción de la adherencia extracelular y a alteración de la migración de las mismas. Además, As podría comprometer otras funciones como las vías de señalización que regulan el plegamiento proteico (ej.: inhibición de tirosinquinasa de vías asociadas a integrinas) (¹²³). Entre los mecanismos ya descritos, se piensa que los cambios mencionados responderían a la activación de Cdc42 con la consiguiente reorganización de los MF, activando a NADPH-oxidasa y llevando a la generación de oxidantes. Esto también incrementaría la migración celular (¹²⁴). Otra forma de afectar la organización cuaternaria de la actina es por daño oxidativo directo, involucrando nitración de residuos tirosinas por RNS (¹²⁵), señalización intracelular inducida por ROS (¹²⁶), oxidación de grupos sulfhidrilos con formación de puentes disulfuro intra- e intermoleculares, principalmente de tipo Cys³⁷³-Cys³⁷³, entre otros. Merece especial mención la formación de puentes disulfuro, que constituye uno de los principales blancos del estrés oxidativo, causando entrecruzamientos de

los MF, siendo Cys³⁷³ altamente reactiva a agentes oxidantes que alteran la distribución de los mismos (¹²⁷). No obstante, no debe olvidarse que los residuos de metionina (formación de sulfóxidos en las posiciones 44, 47, 176, 190, 269 y 355) presentes en los cuatro subdominios de la actina también pueden ser blancos de oxidación, llevando a cambios conformacionales y limitando la proteólisis de las moléculas oxidadas. Dentro de las mencionadas regiones, tendría importantes implicancias la oxidación en los subdominios 1 y el 2, por participar en la regulación por unión a otras proteínas y en la polimerización y estabilización del MF, respectivamente (¹²⁸). Con respecto a la quercetina, se encontró que el hecho que las células tratadas con Q y As+Q exhibían un patrón dismórfico notable con una marcación granular. Esto hablaría de compromiso de las propiedades de las membranas celulares y generación de un tipo especial de estrés. De hecho, bajo condiciones estresantes empleadas, algunas proteínas pueden ser susceptibles de modificaciones postraduccionales, ser reubicadas y asociarse a gránulos de estrés (¹²⁹). Dichos gránulos son estructuras dinámicas y transitorias constituidas por diferentes moléculas, como ARNm, calreticulina y actina, entre otras, cuyo empaquetamiento llevaría a regulación de la expresión génica y retardo específico de la traducción (¹³⁰). Por todo lo antedicho, sólo silimarina preservó la distribución de normal de los MF, en función de sus propiedades citoprotectoras.

Una vez estresadas, se observó que las células podían tomar dos caminos, según la exposición tóxica prosiguiera o no. Así, continuando la incubación con As más allá de las dos horas, la viabilidad celular se vio comprometida progresivamente, transformándose en CENV (no viables). El primer hallazgo de este proceso fue la activación de JNK por fosforilación. De hecho, esto fue observado ya tras la primera hora de tratamiento, incrementando progresivamente sus niveles. A la segunda hora, se alcanzaron valores de alrededor de dos veces superiores, sosteniéndose tal activación posteriormente. Cuando As era retirado del medio, esta respuesta disminuía, indicando la estrecha relación entre la agresión química y la activación de la quinasa. Más aún, una investigación previa de Lau y

colaboradores ha descrito un mecanismo molecular por el cual las vías de las MAPK podrían contribuir diferencialmente con la regulación celular de su crecimiento y muerte en función a diferentes concentraciones de As. A baja dosis, éste estimula la vía de señalización ERK (del inglés *extracellular signal-regulated kinase*, quinasa regulada por señal extracelular) e induce la proliferación celular; en contraste, altos niveles inducen la vía JNK, llevando a apoptosis (¹³¹). De acuerdo a esto, en el modelo epitelial aquí utilizado, As se comportó como un agente citotóxico con aumento de JNK activa. Con el objetivo de prevenir esto, Q y S se emplearon como co-tratamientos. Ambas fueron capaces de contrarrestar el efecto de As de manera similar. Sin embargo, cuando Q y S fueron usados individualmente, los resultados diferían en cuanto a magnitud. Q suprimía la activación de JNK, mientras S presentaba valores apenas por debajo de los controles. Más allá de la actividad antioxidante de estos flavonoides, no puede ser descartada la modulación directa sobre las cascadas de señales intracelulares involucradas en el control de la supervivencia celular (¹³²).

Subsecuentemente, al prolongar la exposición a As, se observó el inicio del proceso apoptótico, de manera dependiente del tiempo. Dadas las características específicas que permiten diferenciarlo de otras formas de muerte como la necrosis (¹³³), fue posible determinar este particular fenotipo letal analizando distintos parámetros en las células CHO-K1. Secuencialmente, después de dos horas, gradualmente se fue incrementando la actividad de caspasas ejecutoras, la que se volvió significativamente superior al C hacia la cuarta hora. En este momento, otro marcador, la fosfatidilserina expuesta en la superficie externa de la membrana plasmática, pudo detectarse por el resto del periodo estudiado. Luego (6-8 horas), el severo compromiso en la viabilidad celular llevó a despegamiento de las células de su sustrato plástico, precedido por los cambios citomorfológicos propios de la apoptosis. En esta línea, la relación entre el estrés oxidativo, la vía JNK y apoptosis en contexto de arsenotoxicidad experimental ha ganado apoyo utilizando diferentes modelos (¹³⁴⁻¹³⁵). En cuanto a los flavonoides evaluados, los mismos se comportaron

como citoprotectores de diferentes modos. En este sentido, el tratamiento con silimarina fue capaz de proteger a línea CHO-K1, con reducción de la actividad de caspasas y la correspondiente conservación de su viabilidad, según lo mostraron los estudios por citofluorescencia, tanto sola (S) como coadministrada con arsenito (As+S). Entonces, las células permanecían adheridas hasta la octava hora de incubación, manteniendo un fenotipo vital normal. Quercetina, en cambio, mostró respuestas contradictorias. Aunque previno que se activasen las caspasas, no fue capaz de evitar la exteriorización ulterior de la fosfatidilserina, revelando su capacidad por si sola de inducir más tardíamente apoptosis y, por lo tanto, su incapacidad de controlar el efecto arsenical sobre este parámetro. Inclusive, las células no alcanzaron a despegarse hacia el final del experimento (octava hora), confirmando el retardado inicio de la muerte asociada a quercetina. La toxicidad hallada para este flavonoide podría responder al hecho que, a altas dosis, causa depleción del GSH (¹³⁶), siendo este péptido crítico para la mantener la homeostasis redox celular (¹³⁷). Si bien la forma de muerte celular predominante fue la apoptótica, no debe dejar de ser considerada la necrosis, en vista de que las dos forman parte de un proceso con mecanismos comunes y posibilidad de intercambio entre ambas (¹³⁸). Esto sería de importancia biológica, ya que la necrosis podría actuar como estímulo inflamatorio en tejidos muy afectados por arsénico.

Otro camino posible seguido por las CEV (viables) fue convertirse en CER (células a las que se les permitió recuperarse en medios libres de tratamiento), cuando se les permitió recuperarse quitando As del medio una vez estresadas. Con dos horas adicionales libres de tratamiento, las células fueron capaces de responder al daño oxidativo a fin de conservar su viabilidad, debido a la acción de proteínas inducidas por estrés. Entre ellas, las Hsp (del inglés *heat shock proteins*, proteínas por choque térmico) constituyen una familia de chaperonas claves en la respuesta a diferentes tipos de agresiones, tendiente a favorecer la recuperación de las células y su supervivencia (³⁰). Existen miembros de la misma que se expresan constitutivamente y otros que son inducibles, como es el caso de la de 72

kDa, denominada Hsp70 inducible o Hsp72. La relación dosis-dependiente entre ésta y arsénico ha sido establecida previamente (¹³⁹). En cuanto a las condiciones temporales de exposición de la línea CHO-K1, se realizaron las curvas de expresión correspondientes, observándose escasos niveles en las siguientes instancias: primeras dos horas de estrés, dado el requerimiento de mayor tiempo para su transcripción; más de cuatro horas de exposición continua, debido a la menor viabilidad celular con la consiguiente degradación proteica; o más de dos horas adicionales de recuperación, por remisión de la respuesta (¹⁰¹). De allí, que las comparaciones se hayan realizado en las CER, donde ambos flavonoides fueron capaces de reducir la expresión de este marcador. El valor biológico de esto radicaría en el crítico rol de la modulación de la muerte celular programada en el proceso neoplásico, dado que, en vista de la naturaleza integradora de los sistemas vivientes, las distintas vías bioquímicas deben asegurar la homeostasis tanto a nivel celular como orgánico. Consecuentemente, la desregulación y/o perpetuación de la expresión génica inducida por arsénico y estrés se constituiría en una condición protumoral (¹⁴⁰). En tal sentido, la familia Hsp70 se comporta principalmente como antiapoptótica, actuando a diferentes niveles, tal como en la modulación de las vías de señalización mediadas por JNK, NFkB y Akt (³⁰).

El conjunto de respuestas citosólicas (señalización vía JNK, reorganización de MF de actina y respuesta por Hsp) podrían estar integradas desde el punto de vista molecular por diferentes caminos de transducción de señales (¹⁴¹). Ejemplo de ello es la familia Rho de GTPasas pequeñas (entre ellas, Cdc42), que regulan el ensamblado de la actina filamentosa (fibras de estrés, lamelipodios y filipodios) y de las adhesiones focales asociadas a integrinas, permitiendo la interacción entre citoesqueleto y biomembranas. Esta familia controla, además, las cascadas mediadas por JNK y p38 MAPK, la actividad de NADPH-oxidasa (clave en la formación de ROS) y de factores de transcripción (NFkB, SRF), con los subsecuentes cambios en la progresión del ciclo celular y la expresión génica, permitiendo modificar el comportamiento de la célula de manera coordinada (¹⁴²). Esta

circunstancia fue revelada morfológicamente en las células CHO-K1 por la co-localización inmunocitoquímica de actina y JNK en las CEV. Más aún, existe evidencia que el citoesqueleto posee un rol regulatorio sobre la apoptosis, y que sus modificaciones, provocando contracción citoplasmática y retracción de la membrana plasmática, dependen de la actividad de JNK y de las caspasas (¹⁴³).

La actividad de GGT fue otro parámetro evaluado, dadas su participación en la regeneración de GSH intracelular, su inducción por estrés oxidativo y su capacidad para metabolizar conjugados GSH-As (²⁵). GGT inicia la degradación extracelular de GSH para facilitar la captación de cisteína y cistina para la síntesis de novo del tripéptido, lo que permite mantener el depósito intracelular del mismo, disminuyendo los niveles de ROS endógenos e inducidos por agentes exógenos (¹⁴⁴). Las células no-tumorales, en tanto su entorno disponga de aminoácidos azufrados en niveles apropiados para la síntesis de GSH y sin estrés oxidativo sobreagregado que deplecione sus reservas intracelulares, poseen mínima actividad constitutiva de la misma (¹⁴⁵). Ello se observó en las CEV, por lo que se requirió un periodo apropiado para su inducción, realizando entonces las determinaciones en las CER. Efectivamente, As incrementó la actividad de GGT en éstas, siendo silimarina capaz de controlar este efecto (As+S). Inesperadamente, As+Q llevó a inhibición de la misma, indicando una vez más una interacción entre ambos compuestos.

El rol funcional de los lípidos celulares es de gran trascendencia, participando y regulando las propiedades biofísicas de las membranas, la acilación proteica, la señalización intracelular y extracelular (mediadores autocrinos, paracrinos y endocrinos), modulación de enzimas, reactividad química y coadyuvancia con otras moléculas (⁴⁹). De allí, que hayan sido estudiado aquí como parámetros de susceptibilidad a estrés. Particularmente, fueron evaluados los gangliósidos presentes en las biomembranas, ya que previamente otros lípidos han sido caracterizados *in extenso* en la línea CHO-K1 empleada, estableciendo su rol frente a estrés oxidativo, principalmente en lo que se refiere a la conformación de las balsas

de membrana (¹⁴⁶). En las CEV, los gangliósidos (monosialilados) no fueron sensibles a los distintos tratamientos agudos. Sin embargo, sí se vieron afectados por ellos en los Modelos 2 y 3, cuyos resultados se discuten a continuación. Así, bajo tratamientos llevados a cabo subcrónicamente (Modelo 2), las células CHO-K1 mostraron cambios en los tres parámetros de membranas en experimentos de seis semanas de duración. La duración de los experimentos se consideró subcrónica, al no haberse adquirido quimiorresistencia-termotolerancia (signo de transformación celular), necesiéndose para ello tiempos de cronicidad mayores (¹⁴⁷), aunque no puede ser descartado otro tipo de alteraciones de la fisiología celular relacionadas con As, como la inhibición de la poliADP-ribosilación inducida por peróxido de hidrógeno (¹⁴⁸).

El tratamiento prolongado con As a bajas concentraciones llevó a un incremento gradual en la formación de CD en las membranas celulares. En acuerdo con observaciones de otros autores quienes determinaron que los polifenoles silimarina y quercetina incrementarían la resistencia lipídica a la peroxidación (¹⁴⁹), se encontró que ambos flavonoides pudieron inhibir la inducción de CD generada por As en las células CHO-K1 bajo condiciones agudas. Sin embargo, sólo As+S fue capaz de reducirlos a lo largo de las seis semanas bajo condiciones subcrónicas, mientras As+Q lo hizo recién luego de la tercera semana. Es necesario tener en cuenta que el patrón de respuesta redox cambió después de esa semana en los cultivos tratados con flavonoides, cuya base biológica aún no ha sido esclarecida. En resumen, la medición de CD fue un apropiado método para evaluar estrés inducido por As, ya que fue sensible a los distintos tratamientos.

Al evaluar la actividad de GGT, se hallaron efectos que dependían más de acciones farmacológicas complejas que de modificaciones del estado redox de las membranas, al no registrarse correlación directa con el nivel de CD. De hecho, nuevamente se observó el efecto inhibitorio de As+Q, similar a lo hallado en el Modelo 1, durante las primeras tres semanas de incubación utilizando el Modelo 2, siendo que As no afectó la curva de seguimiento de actividad catalítica de esta enzima. Por otro lado, al graficar

los resultados obtenidos con los tratamientos Q y As+Q, se hallaron curvas de morfología similar. Esto indicaría un efecto propio del flavonoide, cuyas diferentes magnitudes estarían dadas por interacciones con el As, ya que la quercetina indujo sostenidamente la actividad de la enzima cuando era administrada sola, pero no así bajo el co-tratamiento. Tal como sucedió con los CD, se halló un cambio en el patrón de respuesta luego de la tercera semana, claramente visible bajo los tratamientos con quercetina.

Es importante, al estudiar parámetros de membrana, tener en cuenta que modificaciones de su perfil lipídico podrían dar cuenta de respuestas celulares modificadas frente a diversas condiciones estresantes ⁽¹⁵⁰⁾. De hecho, se observó una asociación temporal entre el cambio de los patrones de respuesta a As hacia la tercera semana de cultivo y una reducción sostenida de 50% en el contenido de gangliósidos, mostrando una relación inversa con el nivel de CD conjugados a lo largo de los experimentos. Este hecho podría estar indicando una mayor resistencia oxidativa brindada por estas moléculas con ácido siálico. La disminución de los gangliósidos fue registrada con los tres tratamientos con As, aunque sólo fue significativa para As+Q. La similitud entre las curvas de seguimiento de los co-tratamientos (As con cualquiera de los flavonoides) revelaría mecanismos compartidos por ambos xenobióticos, aunque en diferentes intensidades. Las existencia de interacciones farmacológicas se pusieron nuevamente de manifiesto al comparar la curva de Q, que se comportó en espejo respecto de la de As+Q (distinta de la de As y similar a la de S).

Respecto a los modelos con células cancerosas, los resultados podrían estar estrechamente relacionados con las propiedades biológicas de sus membranas celulares ⁽⁴²⁻⁴³⁾. Empleando las condiciones que definieron al Modelo 3, se evaluaron los efectos de los tratamientos sobre la viabilidad celular, en función de marcadores presentes en las biomembranas tumorales, siendo éstos de susceptibilidad (CD), respuesta (GGT) y estructura (gangliósidos). Las líneas ZR-75-1 y MCF-7 son de utilidad experimental, ya que permiten identificar eventos representativos implicados en el desarrollo del cáncer de mama humano. Esto se debe a que comparten

de manera global y sustancial similitudes en sus características fenotípicas y en la estructura de sus transcriptomas, expresando ambos receptores para estrógenos (¹⁵¹). No obstante, en presencia de la heterogeneidad de estos tumores, pueden hallarse algunas diferencias con relevancia biomédica. Por ejemplo, las células ZR-75-1 son selectivamente insensibles a la acción antiproliferativa del 2-metoxiestradiol debido a sus altos niveles de 17-B-hidroxiesteroide-dehidrogenasa II, que rápidamente lo inactiva (¹⁵²). Más aún, las dos líneas muestran disímiles grados de diferenciación, conservando MCF-7 muchas características del epitelio mamario bien diferenciado (¹⁵³). Aquí, estas diferencias fueron confirmadas por el hecho que ZR-75-1 mostró elevada actividad constitutiva de GGT, mayor inducción de lípidos sialilados y una débil respuesta al efecto trófico de un fitoestrógeno, como la quercetina (¹⁵⁴), en el ensayo de viabilidad. Por esta técnica, se determinó que la toxicidad tiempo-dependiente inducida por As sobre las células ZR-75-1 no era prevenida por ninguno de los flavonoides, mientras que quercetina sí protegía a las células MCF-7 durante las ocho horas de exposición a As, corroborando su potencial estrogénico.

Con respecto a la GGT, que se halla presente constitutivamente en varios tumores (¹⁵⁵), ambas líneas mamarias exhibieron niveles basales detectables, a diferencia de lo que sucedía con la línea no-tumoral CHO-K1. Esta necesitaba de un periodo de recuperación para tener valores cuantificables de la enzima, siendo su presencia constitutiva muy baja o ausente. Dado que la actividad de GGT en ZR-75-1 se incrementó en CER en comparación con CEV, incluso en los controles, el cambio de medio de cultivo resultó una instancia estresante por sí misma. Este fenómeno no fue visto en las células tratadas con quercetina, que tuvieron una elevación significativa de 2,73 veces tras las dos primeras horas de incubación, pero sin mostrar ninguna variación luego del cambio de medio. Considerando que la expresión de GGT está regulada por la reserva en el citosol de GSH y por receptores esteroidales (¹⁵⁶⁻¹⁵⁷), el incremento de la actividad de la enzima por parte de quercetina podría deberse a su rol de ligando sobre tales receptores y a sus efectos sobre el nivel intracelular del péptido antioxidante.

Dicha circunstancia podría causar una inducción intensa, rápida y sostenida de la actividad catalítica, aún durante la recuperación. En cambio, aunque silimarina elevó 1,76 veces la actividad de GGT, no protegió a las células del estrés asociado al cambio de medio. En aquellas tratadas con arsenito, sólo quercetina evitó la inhibición causada por éste, requiriendo al menos dos horas de recuperación. En la línea MCF-7, la enzima fue menos activada por los estresantes (cambio de medio y tratamientos), con baja actividad basal (respecto a ZR-75-1). Así incrementó tal parámetro luego del periodo de recuperación; efecto que no fue contrarrestado por ninguno de los dos flavonoides. Así, el nivel constitutivo de expresión de GGT determinaría la modalidad de respuesta ulterior a agentes químicos potencialmente nocivos. Esto estimula una visión alternativa sobre biomarcadores de estrés, cuyo real valor dependería del grado de diferenciación celular y su estado funcional. Como aquí se ha visto, en la línea que presentaba niveles basales altos de GGT (ZR-75-1), el efecto citotóxico se asociaba a su inhibición, apoyando su rol citoprotector y protumoral (¹⁵⁸); mientras que el mismo efecto era observado tras su estimulación en células con nivel iniciales menores (MCF-7 y CHO-K1), ilustrando que un parámetro individual no puede ser evaluado sin considerar el contexto biológico de dónde proviene (ej.: GGT como marcador de progresión neoplásica y, simultáneamente, como marcador de daño oxidativo).

En la fase superior de la partición de Fölch (protocolo de extracción lipídica) proveniente de tejidos extraneurales, el contenido de ácido siálico (SA) representa esencialmente gangliósidos monosialilados de la superficie de la membrana plasmática (⁹⁵). En relación a esto, ZR-75-1 poseían mayor contenido de éstos que MCF-7. El tratamiento con As+Q incrementó este parámetro en ambas líneas, mientras que As, S y As+S lo redujeron sólo en las células MCF-7. Aunque no se haya establecido una relación directa con la viabilidad celular, las modificaciones en el contenido de gangliósidos son de gran valor farmacológico, dada su capacidad moduladora del daño oxidativo (sea por captación de radicales libres y/o por su propiedad estabilizadora de las membranas) (¹⁵⁹), y la relevante participación de sus

interacciones moleculares en el desarrollo del cáncer, en especial en lo referido a inmunidad tumoral y metástasis (¹⁶⁰).

La actividad de GGT y el contenido de gangliósidos fueron escogidos como marcadores en virtud de haber sido susceptibles a la exposición prolongada a As (Modelo 2). La línea CHO-K1 es utilizada usualmente como referente no-tumoral y sus respuestas comparadas con las registradas en células cancerosas humanas (⁸²). Más aún, las células CHO-K1 poseen receptores estrogénicos y niveles basales de gangliósidos similares a las contrapartes neoplásicas estudiadas (¹⁶¹). Además, dichos marcadores deben ser tenidos en cuenta en el seguimiento del efecto ejercido por compuestos carcinogénicos, dado que la inadecuada sialilación y la activación sostenida de GGT son biomarcadores tumorales de alta sensibilidad, aunque de menor especificidad (¹⁵⁵⁻¹⁶²). De hecho, las células no-tumorales requerirían tiempos mayores para inducir la GGT y modificar el contenido de gangliósidos en sus membranas.

En lo que concierne a lipooxidación, se hallaron distintas sensibilidades de los lípidos de las líneas ZR-75-1 y MCF-7 (diferentes coeficientes de correlación entre las lecturas TMPD y CD para cada una). La regulación de la actividad de GGT y el contenido sialilglicolipídico pudieron haber modulado la resistencia de las membranas a la oxidación, llevando a una disminución en la actividad de radicales libres y la formación de CD. Desde que la cinética de la enzima y el estado redox de las biomembranas pueden ser modificados por cambios en la composición lipídica (¹⁵⁰), los efectos de Q y S sobre células tratadas con As podrían estar mediados por distintas afinidades por la bicapa de lípidos. Incluso, mecanismos multidireccionales (no clásicos) tanto del arsenito como de los antioxidantes estudiados determinarían conjuntamente su actividad antitumoral (¹⁶³), ya que no encontró una estrecha relación entre la viabilidad tumoral y la respuesta oxidativa (concepción clásica), con la muerte celular no estando precedida por la elevación de CD.

En conjunto, estos resultados mostraron diferencias entre las líneas de adenocarcinoma mamario, lo que debe ser tenido en mente cuando se

realicen extrapolaciones. En cuanto a los flavonoides estudiados, cuyo potencial citoprotector ha sido valorado en células no-tumorales, sería conveniente considerar a silimarina en investigaciones clínicas como quimioadyuvante. Contrariamente, el uso de quercetina debería ser cuidadosamente evaluado en pacientes oncológicas, ya que fue capaz de incrementar los niveles de GGT y SA, considerados ambos marcadores tumorales de riesgo. Más aún, este compuesto podría interferir con opciones terapéuticas que involucren el empleo de As como parte de la quimioterapia.

Los resultados del presente trabajo de tesis refuerzan la necesidad de evaluación cronológica de citotoxicidad utilizando diferentes metodologías a fin de comparar compuestos *in vitro*. El curso temporal de las respuestas toxicológicas es muy relevante en el estudio del modo de acción de sustancias carcinógenas y quimiopreventivas, principalmente en el caso de aquellas que no actúan por drástica alteración de los procesos celulares (¹⁶⁴). A fin de evitar interpretaciones incorrectas, la citotoxicidad debe ser probada bajo las condiciones apropiadas y especiales que cada compuesto químico requiera, sobre todo cuando se abordan los que poseen efectos más lentos. Más aún, los datos obtenidos fueron analizados de manera más exhausta, tanto por las técnicas estadísticas clásicas (ANOVA, test de Student, etc.) como por otras especiales para cada tipo de respuesta según su distribución. Ejemplo de ello fue el ajuste de un modelo de regresión logística para procesar la información provista por citometría de flujo, incrementando el poder de predicción dónde cada célula fue tomada en cuenta por este procedimiento. Otro caso fue el diseño de curvas suavizadas de tiempo para modelar respuestas que no ajustasen linealmente. Así, fue posible obtener datos pronósticos confiables de acuerdo a la naturaleza de cada variable ensayada, además de las comparaciones usuales entre los efectos de los tratamientos. Otro aspecto metodológico importante es el empleo de biomarcadores filogenéticamente conservados, que facilitarían las extrapolaciones de resultados provenientes de distintos modelos experimentales. Ejemplos de ellos son la expresión de Hsp72, la activación

de JNK, la reorganización de MF de actina, la actividad de GGT y la formación de especies reactivas, entre los aquí empleados.

Como proyección biomédica y sanitaria de esto, puede señalarse que la inclusión de xenobióticos en la alimentación humana ha abierto nuevas posibilidades en el campo de la prevención de numerosas enfermedades, en especial de las crónicas, y la mejoría de la calidad de vida a través de la intervención nutricional. Esto se ve reflejado por el desarrollo de los alimentos funcionales, que pueden ser definidos como aquellos que proveen beneficios para la salud más allá de la nutrición básica. De hecho, ellos brindan un efecto benéfico cuando se consumen como parte de una dieta variada en niveles efectivos y regulares, cuyo potencial esta dado por la presencia de compuestos biológicamente activos, sean de origen vegetal (fitoquímicos) o animal (zooquímicos). Este concepto abarca no solo a productos completos fortificados, enriquecidos o reforzados con fines específicos (nutracéuticos), sino también a los alimentos tradicionales de uso corriente, cuyas propiedades han sido reconocidas, a veces por la tradición, y reevaluadas por recientes investigaciones (¹⁶⁵). Por ello, son necesarios estudios preclínicos, incluyendo análisis fisicoquímico, estudios mecanísticos en cultivo celular y comparación de efectos de componentes purificados y de alimentos completos en experimentos con animales, ya que las interacciones in vivo entre diferentes nutrientes pueden ser sinérgicas, antagónicas o de enmascaramiento. A este respecto, es necesario establecer biomarcadores diagnósticos y pronósticos, a fin de evaluar las propiedades de los nutrientes sobre el proceso de salud-enfermedad. Probablemente, se requiera conjuntamente de varios de ellos para conformar un perfil de respuesta a la dieta, teniendo en cuenta su asociación con la genética individual (¹⁶⁶).

Conclusiones

Los resultados sugieren que el estrés inducido por arsénico partiría de sus efectos sobre los mecanismos antioxidantes de la célula. Ello acarrearía el consiguiente daño oxidativo, desencadenando una respuesta citotóxica de

tipo *bottom-up* (del inglés, de abajo hacia arriba/de adentro hacia afuera), comprometiendo múltiples blancos celulares y moleculares.

Por otra parte, silimarina presentó un mejor perfil farmacológico frente a los efectos del arsenito, puesto que fue capaz de controlar los eventos citotóxicos tempranos inducidos por estrés oxidativo agudo en los cultivos de células epiteliales no-tumorales (Modelo 1), conservó dentro de límites normales los parámetros evaluados subcrónicamente en esas mismas células (Modelo 2), en tanto que no presentó acciones citoprotectoras ni interacciones farmacodinámicas de relevancia durante el tratamiento agudo de las líneas tumorales mamarias humanas (Modelo 3). En cambio, quercetina presentó resultados disímiles frente al tratamiento arsenical, con inconstancia de efectos positivos en los tres Modelos, acciones farmacológicas adicionales y toxicológicas propias (directas y por medio de interacciones), y potencial protumoral, ya que fue capaz de proteger a las células MCF-7 tratadas con As y de incrementar marcadores de malignidad, tales como la actividad de GGT y el contenido de SA lipídico en las membranas celulares.

En este trabajo, los modelos in vitro desarrollados utilizando diferentes líneas y condiciones han permitido el estudio de eventos tempranos de citotoxicidad por exposición a arsénico. Más aún, fue posible evaluar el potencial biomédico de los silimarina y quercetina, que mostraron efectos diferenciales sobre las respuestas inducidas por el arsénico. Los flavonoides, presentes en una dieta adecuadamente balanceada, podrían actuar a través de diversos mecanismos farmacológicos tendientes a prevenir una amplia gama de enfermedades humanas. Los hallazgos aquí presentados apuntan a estimular los estudios bioprospectivos de compuestos de origen vegetal (⁵⁴), con el propósito de reducir los riesgos para la salud que implica la contaminación con arsénico en amplias áreas del mundo actualmente.

5. Bibliografía

- 1 Tapio S, Grosche B. Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutat Res* 612:215-246. 2006.
- 2 WHO (World Health Organization). Arsenic in water drink. Fact Sheet 210. 2001.
- 3 Francisca FM, Carro Perez ME. Assessment of natural arsenic in groundwater in Cordoba Province, Argentina. *Environ Geochem Health*, en prensa.
- 4 Matschullat J. Arsenic in the geosphere. *Sci Total Environ* 249:297-312. 2000.
- 5 Blanco MC, Paoloni JD, Morrás HJ, Fiorentino CE, Sequeira M. Content and distribution of arsenic in soils, sediments and groundwater environments of the southern Pampa region, Argentina. *Environ Toxicol* 21:561-574. 2006.
- 6 Zhu YG, Williams PN, Meharg AA. Exposure to inorganic arsenic from rice: A global health issue? *Environ Pollut* 154:169-171. 2008.
- 7 Loźna K, Biernat J. The occurrence of arsenic in the environment and food. *Rocz Panstw Zakl Hig* 59:19-31. 2008.
- 8 Borak J, Hosgood HD. Seafood arsenic: Implications for human risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 47:204-212. 2007.
- 9 Rossy KM, Janusz CA, Schwartz RA. Cryptic exposure to arsenic. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 71:230-235. 2005.
- 10 van der Voet GB, Sarafanov A, Todorov TI, Centeno JA, Jonas WB, Ives JA, Mullick FG. Clinical and analytical toxicology of dietary supplements: a case study and a review of the literature. *Biol Trace Elem Res* 125:1-12. 2008.
- 11 Dilda PJ, Hogg PJ. Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat Rev* 33:542-564. 2007.
- 12 Ahamed S, Sengupta MK, Mukherjee SC, Pati S, Mukherjeel A, Rahman MM, Hossain MA, Das B, Nayaki B, Pal A, Zafar A, Kabir S, Banu SA, Morshed S, Islam T, Rahman MM, Quamruzzaman Q, Chakraborti D. An

eight-year study report on arsenic contamination in groundwater and health effects in Eruani village, Bangladesh and an approach for its mitigation. *J Health Popul Nutr* 24:129-141. 2006.

13 Weller JP, Larsch KP, Teske J, Tröger HD. Lethal intoxication with arsenic using prepared butter. *Arch Kriminol* 221:159-164. 2008.

14 Dueñas-Laita A, Pérez-Miranda M, González-López MA, Martín-Escudero JC, Ruiz-Mambrilla M, Blanco-Varela J. Acute arsenic poisoning. *Lancet* 365:1982. 2005.

15 Singh N, Kumar D, Sahu AP. Arsenic in the environment: effects on human health and possible prevention. *J Environ Biol* 28:359S-365S. 2007.

16 Yoshida T, Yamauchi H, Sun GF. Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose–response relationships in review. *Toxicol Appl Pharmacol* 198:243-252. 2004.

17 Steinmaus C, Bates MN, Yuan Y, Kalman D, Atallah R, Rey OA, Biggs ML, Hopenhayn C, Moore LE, Hoang BK, Smith AH. Arsenic methylation and bladder cancer risk in case-control studies in Argentina and the United States. *J Occup Environ Med* 48:478-488. 2006.

18 Malik AH, Khan ZM, Mahmood Q, Nasreen S, Bhatti ZA. Perspectives of low cost arsenic remediation of drinking water in Pakistan and other countries. *J Hazard Mater*, en prensa.

19 WCRF/AICR (World Cancer Research Foundation/American Institute for Cancer Research). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. 2007.

20 Thomas DJ, Waters SB, Styblo M. Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicol Appl Pharmacol* 198:319-326. 2004.

21 Pérez RD, Rubio M, Pérez CA, Eynard AR, Bongiovanni GA. Study of the effects of chronic arsenic poisoning on rat kidney by means of synchrotron microscopic X ray fluorescence analysis. *X Ray Spectrom* 35:352-358. 2006.

22 Clewell HJ, Tan YM, Campbell JL, Andersen ME. Quantitative interpretation of human biomonitoring data. *Toxicol Appl Pharmacol* 231:122-133. 2008.

-
- 23 Schmeisser E, Goessler W, Francesconi KA. Human metabolism of arsenolipids present in cod liver. *Anal Bioanal Chem* 385:367-376. 2006.
- 24 Messens J, Silver S. Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *J Mol Biol* 362:1-17. 2006.
- 25 Kala SV, Kala G, Prater CI, Sartorelli AC, Lieberman MW. Formation and urinary excretion of arsenic triglutathione and methylarsenic diglutathione. *Chem Res Toxicol* 17:243-249. 2004.
- 26 Cohen SM, Arnold LL, Eldan M, Lewis AS, Beck BD. Methylated arsenicals: the implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 36:99-133. 2006.
- 27 Shi H, Shi X, Liu KJ. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 255:67-78. 2004.
- 28 Lantz RC, Hays AM. Role of oxidative stress in arsenic-induced toxicity. *Drug Metab Rev* 38:791-804. 2006.
- 29 Silva RA, Muñoz SE, Perez CA, Eynard AR. Effects of dietary fat on benzo-a-pyrene-induced forestomach tumorigenesis in mice chronically exposed to arsenic. *Exp Toxicol Pathol* 52:11-16. 2000.
- 30 Arya R, Mallik M, Lakhotia SC. Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci* 32:595-610. 2007.
- 31 Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 10:1343-1374. 2008.
- 32 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84. 2007.
- 33 Meliker JR, Wahl RL, Cameron LL, Nriagu JO. Arsenic in drinking water and cerebrovascular disease, diabetes mellitus, and kidney disease in Michigan: a standardized mortality ratio analysis. *Environ Health* 6:4. 2007.
- 34 Foyer CH, Pellny TK, Locato V, De Gara L. Analysis of redox relationships in the plant cell cycle: determinations of ascorbate, glutathione and poly (ADPribose)polymerase (PARP) in plant cell cultures. *Methods Mol Biol* 476:199-215. 2008.

-
- 35 Costa V, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P. Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *IUBMB Life* 59:293-298. 2007.
- 36 Jacob C, Knight I, Winyard PG. Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. *Biol Chem* 387:1385-1397. 2006.
- 37 Circu ML, Yee Aw T. Glutathione and apoptosis. *Free Radic Res* 1:1-18. 2008.
- 38 Murugan RS, Uchida K, Hara Y, Nagini S. Black tea polyphenols modulate xenobiotic-metabolizing enzymes, oxidative stress and adduct formation in a rat hepatocarcinogenesis model. *Free Radic Res* 42:873-884. 2008.
- 39 Fernandez EB. Glucolipotoxicity, resistance to the action of insulin and type 2 diabetes mellitus. *An R Acad Nac Med (Madr)* 124:547-556. 2007.
- 40 Wang J, Wang G, Ansari GA, Khan MF. Activation of oxidative stress-responsive signaling pathways in early splenotoxic response of aniline. *Toxicol Appl Pharmacol* 230:227-234. 2008.
- 41 Pasqualini ME, Berra MA, Yurawecz MP, Repossi G, Eynard AR. Dietary manipulation of precursor polyunsaturated fatty acids modulates eicosanoid and endocannabinoid synthesis: a potential tool to control tumor development. *Curr Nutr Food Sci* 4:161-175. 2008.
- 42 Pasqualini ME, Heyd VL, Manzo P, Eynard AR. Association between E-cadherin expression by human colon, bladder and breast cancer cells and the 13-HODE:15-HETE ratio. A possible role of their metastatic potential. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68:9-16. 2003.
- 43 Espada CE, Berra MA, Martinez MJ, Eynard AR, Pasqualini ME. Effect of Chia oil (*Salvia hispanica*) rich in omega-3 fatty acids on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77:21-28. 2007.
- 44 Florea AM, Büsselberg D. Arsenic trioxide in environmentally and clinically relevant concentrations interacts with calcium homeostasis and induces cell

type specific cell death in tumor and non-tumor cells. *Toxicol Lett* 179:34-42. 2008.

45 Sauerwein H, Schmitz S, Hiss S. Effects of a dietary application of a yeast cell wall extract on innate and acquired immunity, on oxidative status and growth performance in weanling piglets and on the ileal epithelium in fattened pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 91:369-380. 2007.

46 Burnworth B, Arendt S, Muffler S, Steinkraus V, Bröcker EB, Birek C, Hartschuh W, Jauch A, Boukamp P. The multi-step process of human skin carcinogenesis: a role for p53, cyclin D1, hTERT, p16, and TSP-1. *Eur J Cell Biol* 86:763-780. 2007.

47 Abbott RG, Forrest S, Pienta KJ. Simulating the hallmarks of cancer. *Artif Life* 12:617-634. 2006.

48 Andreatta MM, Muñoz SE, Lantieri MJ, Eynard AR, Navarro A. Artificial sweetener consumption and urinary tract tumors in Cordoba, Argentina. *Prev Med* 47:136-139. 2008.

49 Quiroga PL, Eynard AR, Soria EA, Valentich MA. Interaction between retinoids and eicosanoids: their relevance to cancer chemoprevention. *Curr Nutr Food Sci*, en prensa.

50 Orzechowski A. Possible implications of redox-sensitive tumour cell transformation; lessons from cell culture studies. *Pol J Vet Sci* 10:123-126. 2007.

51 Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1-40. 2006.

52 Bongiovanni GA, Eynard AR, Calderón RO. Altered lipid profile and changes in uroplakin properties of rat urothelial plasma membrane with diets of different lipid composition. *Mol Cell Biochem* 271:69-75. 2005.

53 Lindskog M, Gleissman H, Ponthan F, Castro J, Kogner P, Johnsen JI. Neuroblastoma cell death in response to docosahexaenoic acid: Sensitization to chemotherapy and arsenic-induced oxidative stress. *Int J Cancer* 118:2584-2593. 2006.

-
- 54 Soria EA, Goleniowski ME, Cantero JJ, Bongiovanni GA. Antioxidant activity of different extracts of Argentinian medicinal plants against arsenic-induced toxicity in renal cells. *Hum Exp Toxicol* 27:341-346. 2008.
- 55 Uekusa Y, Takeshita Y, Ishii T, Nakayama T. Partition coefficients of polyphenols for phosphatidylcholine investigated by HPLC with an immobilized artificial membrane column. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:3289-3292. 2008.
- 56 Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:287-306. 2005.
- 57 Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 22:19-34. 2002.
- 58 Ferrer JL, Austin MB, Stewart C Jr, Noel JP. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiol Biochem* 46:356-370. 2008.
- 59 Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* 126:485-493. 2001.
- 60 Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 36:829-837. 2004.
- 61 Spencer JP, Abd-el-Mohsen MM, Rice-Evans C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch Biochem Biophys* 423:148-161. 2004.
- 62 Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 81:243S-255S. 2005.
- 63 Cefalu WT, Ye J, Zuberi A, Ribnicky DM, Raskin I, Liu Z, Wang ZQ, Brantley PJ, Howard L, Lefevre M. Botanicals and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 87:481S-487S. 2008.
- 64 Xu J, Wang J, Deng F, Hu Z, Wang H. Green tea extract and its major component epigallocatechin gallate inhibits hepatitis B virus in vitro. *Antiviral Res* 78:242-249. 2008.

-
- 65 Belcaro G, Cesarone MR, Ledda A, Cacchio M, Ruffini I, Ricci A, Ippolito E, Di Renzo A, Dugall M, Corsi M, Marino Santarelli AR, Grossi MG. 5-Year control and treatment of edema and increased capillary filtration in venous hypertension and diabetic microangiopathy using O-(beta-hydroxyethyl)-rutosides: a prospective comparative clinical registry. *Angiology* 59:14S-20S. 2008.
- 66 Jou HJ, Wu SC, Chang FW, Ling PY, Chu KS, Wu WH. Effect of intestinal production of equol on menopausal symptoms in women treated with soy isoflavones. *Int J Gynaecol Obstet* 102:44-49. 2008.
- 67 Jefremov V, Rakitin A, Mahlapuu R, Zilmer K, Bogdanovic N, Zilmer M, Karelson E. 17beta-Oestradiol stimulation of G-proteins in aged and Alzheimer's human brain: comparison with phytoestrogens. *J Neuroendocrinol* 20:587-596. 2008.
- 68 Stoner GD, Wang LS, Casto BC. Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries. *Carcinogenesis* 29:1665-1674. 2008.
- 69 Khan N, Mukhtar H. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer Lett* 269:269-280. 2008.
- 70 Rodeiro I, Donato MT, Lahoz A, Garrido G, Delgado R, Gómez-Lechón MJ. Interactions of polyphenols with the P450 system: possible implications on human therapeutics. *Mini Rev Med Chem* 8:97-106. 2008.
- 71 Auger C, Mullen W, Hara Y, Crozier A. Bioavailability of polyphenon E flavan-3-ols in humans with an ileostomy. *J Nutr* 138:1535S-1542S. 2008.
- 72 Valentich MA, Eynard AR, Barotto NN, Díaz MP, Bongiovanni GA. Effect of the co-administration of phenobarbital, quercetin and mancozeb on nitrosomethylurea-induced pancreatic tumors in rats. *Food Chem Toxicol* 44:2101-2105. 2006.
- 73 Moon YJ, Wang L, DiCenzo R, Morris ME. Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharm Drug Dispos* 29:205-217. 2008.
- 74 Oi N, Hashimoto T, Kanazawa K. Metabolic conversion of dietary quercetin from its conjugate to active aglycone following the induction of

hepatocarcinogenesis in fisher 344 rats. *J Agric Food Chem* 56:577-583. 2008.

75 Kidd P, Head K. A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: A silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos®). *Altern Med Rev* 10:193-203. 2005.

76 Doehmer J, Tewes B, Klein KU, Gritzko K, Muschick H, Mengs U. Assessment of drug-drug interaction for silymarin. *Toxicol In Vitro* 22:610-617. 2008.

77 Rainone F. Milk Thistle. *Am Fam Physician* 72:1285-1288. 2005.

78 Nencini C, Giorgi G, Micheli L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. *Phytomedicine* 14:129-135. 2007.

79 Webb CB, McCord KW, Twedt DC. Assessment of oxidative stress in leukocytes and granulocyte function following oral administration of a silibinin-phosphatidylcholine complex in cats. *Am J Vet Res* 70:57-62. 2009.

80 Davis-Searles PR, Nakanishi Y, Kim NC, Graf TN, Oberlies NH, Wani MC, Wall ME, Agarwal R, Kroll DJ. Milk thistle and prostate cancer: differential effects of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative end points in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 65:4448-4457. 2005.

81 Durham TR, Snow ET. Metal ions and carcinogenesis. *EXS* 96:97-130. 2006.

82 Ling YH, Jiang JD, Holland JF, Perez-Soler R. Arsenic trioxide produces polymerization of microtubules and mitotic arrest before apoptosis in human tumor cell lines. *Mol Pharm* 62:529-538. 2002.

83 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275. 1951.

84 Fölch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509. 1957.

85 Mehlen P, Preville X, Chareyron P, Briolay J, Klemenz R, Arrigo AP. Constitutive expression of human hsp27, *Drosophila* hsp27, or human alpha B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced

cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *J Immunol* 154:363-74. 1995.

86 Schmid I, Lambert C, Ambrozak D, Marti GE, Moss DM, Perfetto SP, International Society of Analytical Cytology. International Society for Analytical Cytology: Biosafety standard for sorting of unfixed cells. *Cytometry A* 71:414-437. 2007.

87 Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38:1103-1111. 2005.

88 Green LC, Wagner DA, Glogowski-Skipper J, Wishnok PL, Tannenbaum SR. Analysis of nitrite, nitrate, and [¹⁵N] in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138. 1982.

89 Boyde TR, Rahmatullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline using diacetylmonoxime. *Anal Biochem* 107:424-431. 1980.

90 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685. 1970.

91 Nakane PK. Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat. *J Histochem Cytochem* 16:557-560. 1968.

92 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254. 1976.

93 Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim Biophys Acta* 24:604-611. 1957.

94 Miettinen T, Takki-Luukkainen IT. Use of butyl acetate in the determination of sialic acid. *Acta Chem Scand* 13:856-858. 1959.

95 Hammache D, Yahia N, Maresca M, Pieroni G, Fantini J. Human erythrocyte glycosphingolipids as alternative cofactors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entry: evidence for CD4-induced interactions between HIV-1 gp120 and reconstituted membrane

-
- microdomains of glycosphingolipids (Gb3 and GM3). *J Virol* 73:5244-5248. 1999.
- 96 Szasz G. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin Chem* 15:124-136. 1969.
- 97 Cavalleri A, Colombo C, Venturelli E, Miceli R, Mariani L, Cornelli U, Pala V, Berrino F, Secreto G. Evaluation of reactive oxygen metabolites in frozen serum samples. Effect of storage and repeated thawing. *Int J Biol Markers* 19:250-253. 2004.
- 98 Recknagel RO, Glende EA. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods Enzymol* 105:331-337. 1984.
- 99 Desai AG, Qazi GN, Ganju RK, El-Tamer M, Singh J, Saxena AK, Bedi YS, Taneja SC, Bhat HK. Medicinal plants and cancer chemoprevention. *Curr Drug Metab* 9:581-591. 2008.
- 100 Delmonte P, Roach JA, Mossoba MM, Losi G, Yurawecz MP. Synthesis, isolation, and GC analysis of all the 6,8- to 13,15-cis/trans conjugated linoleic acid isomers. *Lipids* 9:185-191. 2004.
- 101 Bongiovanni GA, Soria EA, Eynard AR. Effects of the plant flavonoids silymarin and quercetin on arsenite-induced oxidative stress in CHO-K1 cells. *Food Chem Toxicol* 45:971-976. 2007.
- 102 Obinata H, Hattori T, Nakane S, Tatei K, Izumi T. Identification of 9-hydroxyoctadecadienoic acid and other oxidized free fatty acids as ligands of the G protein-coupled receptor G2A. *J Biol Chem* 280:40676-40683. 2005.
- 103 Choi EJ, Lee BH, Lee K, Chee KM. Long-term combined administration of quercetin and daidzein inhibits quercetin-induced suppression of glutathione antioxidant defenses. *Food Chem Toxicol* 43:793-798. 2005.
- 104 Mishra D, Flora SJ. Quercetin administration during chelation therapy protects arsenic-induced oxidative stress in mice. *Biol Trace Elem Res* 122:137-147. 2008.
- 105 Ding W, Hudson LG, Liu KJ. Inorganic arsenic compounds cause oxidative damage to DNA and protein by inducing ROS and RNS generation in human keratinocytes. *Mol Cell Biochem* 279:105-112. 2005.

-
- 106 Hofseth LJ. Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer. *Cancer Lett* 268:10-30. 2008.
- 107 Afanas'ev IB. Signaling functions of free radicals superoxide & nitric oxide under physiological & pathological conditions. *Mol Biotechnol* 37:2-4. 2007.
- 108 Rutkowski R, Pancewicz SA, Rutkowski K, Rutkowska J. Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process. *Pol Merkur Lekarski* 23:131-136. 2007.
- 109 Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:906-911. 2007.
- 110 Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 7:156-167. 2008.
- 111 Marjanovic JA, Stojanovic A, Brovkovich VM, Skidgel RA, Du X. Signaling-mediated functional activation of inducible nitric-oxide synthase and its role in stimulating platelet activation. *J Biol Chem* 283:28827-28834. 2008.
- 112 Menyhárd DK. Comparative computational analysis of active and inactive cofactors of nitric oxide synthase. *J Phys Chem B*, en prensa.
- 113 Wang TC, Jan KY, Wang ASS, Gurr JR. Trivalent arsenicals induce lipid peroxidation, protein carbonylation, and oxidative DNA damage in human urothelial cells. *Mutat Res* 615:75-86. 2007.
- 114 Barrett DM, Black SM, Todor H, Schmidt-Ullrich RK, Dawson KS, Mikkelsen RB. Inhibition of protein-tyrosine phosphatases by mild oxidative stresses is dependent on S-nitrosylation. *J Biol Chem* 280:14453-14461. 2005.
- 115 Bae ON, Lim KM, Han JY, Jung BI, Lee JY, Noh JY, Chung SM, Lee MY, Lee JY, Chung JH. U-shaped dose response in vasomotor tone: a mixed result of heterogenic response of multiple cells to xenobiotics. *Toxicol Sci* 103:181-190. 2008.

-
- 116 Qu W, Liu J, Fuquay R, Saavedra JE, Keefer LK, Waalkes MP. The nitric oxide prodrug, V-PYRRO/NO, mitigates arsenic-induced liver cell toxicity and apoptosis. *Cancer Lett* 256:238-245. 2007.
- 117 Soria EA, Eynard AR, Quiroga PL, Bongiovanni GA. Differential effects of quercetin and silymarin on arsenite-induced cytotoxicity in two human breast adenocarcinoma cell lines. *Life Sci* 81:1397-1402. 2007.
- 118 Bae ON, Lim KM, Han JY, Jung BI, Lee JY, Noh JY, Chung SM, Lee MY, Lee JY, Chung JH. U-shaped dose response in vasomotor tone: a mixed result of heterogenic response of multiple cells to xenobiotics. *Toxicol Sci* 103:181-190. 2008.
- 119 Burke JM. Epithelial phenotype and the RPE: is the answer blowing in the Wnt? *Prog Retin Eye Res* 27:579-595. 2008.
- 120 Nandadasa S, Tao Q, Menon NR, Heasman J, Wylie C. N- and E-cadherins in *Xenopus* are specifically required in the neural and non-neural ectoderm, respectively, for F-actin assembly and morphogenetic movements. *Development*, en prensa.
- 121 Farah ME, Amberg DC. Conserved actin cysteine residues are oxidative stress sensors that can regulate cell death in yeast. *Mol Biol Cell* 18:1359-1365. 2007.
- 122 Haarer BK, Amberg DC. Old yellow enzyme protects the actin cytoskeleton from oxidative stress. *Mol Biol Cell* 15:4522-4531. 2004.
- 123 Yancy SL, Shelden EA, Gilmont RR, Welsh MJ. Sodium arsenite exposure alters cell migration, focal adhesion localization and decreases tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in H9C2 myoblasts. *Toxicological Sciences* 84:278-286. 2005.
- 124 Qian Y, Liu KJ, Chen Y, Flynn DC, Castranova V, Shi X. Cdc42 regulates arsenic-induced NADPH oxidase activation and cell migration through actin filament reorganization. *J Biol Chem* 280:3875-3884. 2005.
- 125 Neumann P, Gertzberg N, Vaughan E, Weisbrot J, Woodburn R, Lambert W, Johnson A. Peroxynitrite mediates TNF-alpha-induced endothelial barrier dysfunction and nitration of actin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L674-L684. 2006.

-
- 126 Sung HJ, Chandra P, Treiser MD, Liu E, Iovine CP, Moghe PV, Kohn J. Synthetic polymeric substrates as potent pro-oxidant versus anti-oxidant regulators of cytoskeletal remodeling and cell apoptosis. *J Cell Physiol* 218:549-557. 2009.
- 127 Dalle-Donne I, Rossi R, Milzani A, Di Simplicio P, Columbo R. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radic Biol Med* 31:1624-1632. 2001.
- 128 Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Gagliano N, Di Simplicio P, Colombo R, Milzani A. Methionine oxidation as a major cause of the functional impairment of oxidized actin. *Free Radic Biol Med* 32:927-937. 2002.
- 129 Decca MB, Carpio MA, Bosc C, Galiano MR, Job D, Andrieux A, Hallak ME. Post-translational arginylation of calreticulin: a new isospecies of calreticulin component of stress granules. *J Biol Chem* 282:8237-8245. 2007.
- 130 Kedersha N, Anderson P. Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol* 431:61-81. 2007.
- 131 Lau AT, Li M, Xie R, He QY, Chiu JF. Opposed arsenite-induced signaling pathways promote cell proliferation or apoptosis in cultured lung cells. *Carcinogenesis* 25:21-28. 2004.
- 132 Hakimuddin F, Tiwari K, Paliyath G, Meckling K. Grape and wine polyphenols down-regulate the expression of signal transduction genes and inhibit the growth of estrogen receptor-negative MDA-MB231 tumors in nu/nu mouse xenografts. *Nutr Res* 28:702-713. 2008.
- 133 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516. 2007.
- 134 Kang YH, Lee SJ. The role of p38 MAPK and JNK in arsenic trioxide-induced mitochondrial cell death in human cervical cancer cells. *J Cell Physiol* 217:23-33. 2008.
- 135 Pei B, Wang S, Guo X, Wang J, Yang G, Hang H, Wu L. Arsenite-induced germline apoptosis through a MAPK-dependent, p53-independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Chem Res Toxicol* 21:1530-1535. 2008.

-
- 136 Ramos AM, Aller P. Quercetin decreases intracellular GSH content and potentiates the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide in human leukemia cell lines. *Biochem Pharmacol* 75:1912-1923. 2008.
- 137 Habib GM, Shi ZZ, Lieberman MW. Glutathione protects cells against arsenite-induced toxicity. *Free Radic Biol Med* 42:191-201. 2007.
- 138 Fietta P. Many ways to die: passive and active cell death styles. *Riv Biol* 99:69-83. 2006.
- 139 Wijeweera JB, Gandolfi AJ, Parrish A, Lantz RC. Sodium arsenite enhances AP-1 and NFkB DNA binding and induces stress protein expression in precision-cut rat lung slices. *Toxicol Sci* 61:283-294. 2001.
- 140 Qu W, Bortner CD, Sakurai T, Hobson MJ, Waalkes MP. Acquisition of apoptotic resistance in arsenic-induced malignant transformation: role of the JNK signal transduction pathway. *Carcinogenesis* 23:151-159. 2002.
- 141 Singh D, McCann KL, Imani F. MAPK and heat shock protein 27 activation are associated with respiratory syncytial virus induction of human bronchial epithelial monolayer disruption. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L436-L445. 2007.
- 142 Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 33:891-895. 2005.
- 143 Zihni C, Mitsopoulos C, Tavares IA, Baum B, Ridley AJ, Morris JD. Prostate-derived sterile 20-like kinase 1-alpha induces apoptosis. JNK- and caspase-dependent nuclear localization is a requirement for membrane blebbing. *J Biol Chem* 282:6484-6493. 2006.
- 144 Gamcsik MP, Dubay GR, Cox BR. Increased rate of glutathione synthesis from cystine in drug-resistant MCF-7 cells. *Biochem Pharmacol* 63:843-851. 2002.
- 145 Antczak C, Kart DR, London RE, Bauvois B. Reanalysis of the involvement of γ -glutamyl transpeptidase in the cell activation process. *FEBS Lett* 508:226-230. 2001.
- 146 Morgan MJ, Kim YS, Liu Z. Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death. *Antioxid Redox Signal* 9:1471-1483. 2007.

-
- 147 Liu J, Chen H, Miller DS, Saavedra JE, Keefer LK, Johnson DR, Klaassen CD, Waalkes MP. Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. *Mol Pharm* 60:302-309. 2001.
- 148 Walter I, Schwerdtle T, Thuy C, Parsons JL, Dianov GL, Hartwig A. Impact of arsenite and its methylated metabolites on PARP-1 activity, PARP-1 gene expression and poly(ADP-ribosyl)ation in cultured human cells. *DNA Repair (Amst.)* 4:61-70. 2007.
- 149 Gazák R, Svobodová A, Psotová J, Sedmera P, Prikrylová V, Walterová D, Kren V. Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity. *Bioorg Med Chem* 12:5677-5687. 2004.
- 150 Medina-Basso M, Eynard AR, Valentich MA. Dietary lipids modulate fatty acid composition, gamma glutamyltranspeptidase and lipid peroxidation levels of the epididymis tissue in mice. *Anim Reprod Sci* 92:364-372. 2006.
- 151 Zhu Y, Wang A, Liu MC, Zwart A, Lee RY, Gallagher A, Wang Y, Miller WR, Dixon JM, Clarke R. Estrogen receptor alpha positive breast tumors and breast cancer cell lines share similarities in their transcriptome data structures. *Int J Oncol* 29:1581-1589. 2006.
- 152 Liu ZJ, Lee WJ, Zhu BT. Selective insensitivity of ZR-75-1 human breast cancer cells to 2-methoxyestradiol: evidence for type II 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase as the underlying cause. *Cancer Res* 65:5802-5811. 2005.
- 153 Engel LW, Young NA. Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Res* 38:4327-4339. 1978.
- 154 Oh SM, Chung KH. Estrogenic activities of Ginkgo biloba extracts. *Life Sci* 74:1325-1335. 2004.
- 155 King JB, West MB, Cook PF, Hanigan MH. A novel, species-specific class of uncompetitive inhibitors of gamma-glutamyltranspeptidase. *J Biol Chem*, en prensa.
- 156 Rasmussen TH, Teh SJ, Bjerregaard P, Korsgaard B. Antiestrogen prevents xenoestrogen-induced testicular pathology of eelpout (*Zoarces viviparus*). *Aquat Toxicol* 72:177-194. 2005.

-
- 157 Chinta SJ, Kumar JM, Zhang H, Forman HJ, Andersen JK. Up-regulation of gamma-glutamyltranspeptidase activity following glutathione depletion has a compensatory rather than an inhibitory effect on mitochondrial complex I activity: implications for Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 40:1557-1563. 2006.
- 158 Palomares T, Castro B, del Olmo M, Iglesias A, Bilbao P, Alonso-Varona A. Influence of the level of gamma-glutamyltranspeptidase activity on the response of poorly and moderately differentiated rhabdomyosarcoma cell lines to all-trans-retinoic acid. *Anticancer Drugs* 17:1127-1139.2006.
- 159 Gavella M, Lipovac V, Rakos R, Colak B. Reduction of oxidative changes in human spermatozoa by exogenous gangliosides. *Andrología* 37:17-24. 2005.
- 160 Varki NM, Varki A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest* 87:851-857. 2007.
- 161 Nethrapalli IS, Tinnikov AA, Krishnan V, Lei CD, Toran-Allerand CD. Estrogen activates mitogen-activated protein kinase in native, nontransfected CHO-K1, COS-7, and RAT2 fibroblast cell lines. *Endocrinology* 146:56-63. 2005.
- 162 Ono M, Hakomori S. Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness. *Glycoconj J* 20:71-78. 2004.
- 163 Piga R, Saito Y, Yoshida Y, Niki E. Cytotoxic effects of various stressors on PC12 cells: involvement of oxidative stress and effect of antioxidants. *Neurotoxicology* 28:67-75. 2007.
- 164 Komissarova EV, Saha SK, Rossman TG. Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicol Appl Pharmacol* 202:99-107. 2005.
- 165 Dixon JM, Donati KJ, Pike LL, Hattersley L. Functional foods and urban agriculture: two responses to climate change-related food insecurity. *N S W Public Health Bull* 20:14-18. 2009.
- 166 Jeffery E. Component interactions for efficacy of functional foods. *J Nutr* 135:1223-1225. 2005.

Anexo: Trabajos publicados

Bongiovanni GA, Soria EA, Eynard AR. Effects of the plant flavonoids silymarin and quercetin on arsenite-induced oxidative stress in CHO-K1 cells. *Food Chem Toxicol* 45:971-976. 2007.

Soria EA, Eynard AR, Quiroga PL, Bongiovanni GA. Differential effects of quercetin and silymarin on arsenite-induced cytotoxicity in two human breast adenocarcinoma cell lines. *Life Sci* 81:1397-1402. 2007.

Soria EA, Goleniowski ME, Cantero JJ, Bongiovanni GA. Antioxidant activity of different extracts of Argentinian medicinal plants against arsenic-induced toxicity in renal cells. *Hum Exp Toxicol* 27:341-346. 2008.