

Estudi *in vitro* del paper del dany oxidatiu com a mecanisme d'acció en la carcinogènesi associada a l'arsènic.

Tesi Doctoral

Jordi Bach Grieria

Grup de Mutagènesi
Departament de Genètica i de Microbiologia
Facultat de Biocències
Universitat Autònoma de Barcelona
Setembre de 2015



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Grup de Mutagènesi

Estudi *in vitro* del paper del dany oxidatiu com a mecanisme d'acció en la carcinogènesi associada a l'arsènic.

Memòria presentada per JORDI BACH GRIERA en el marc del programa d'estudis de doctorat en Genètica realitzat a la Universitat Autònoma de Barcelona per optar al grau de Doctor.

Directors:

Dr. Ricard Marcos Dauder

Catedràtic de Genètica UAB

Autor:

Jordi Bach Griera

Dra. Alba Hernández Bonilla

Professora Agregada UAB

AGRAÏMENTS

He recorregut un llarg camí fins a arribar al punt culminant de tota Tesi Doctoral, la seva defensa. Al llarg d'aquest camí he crescut en la meva persona adquirint un gran ventall de coneixement en el marc teòric i pràctic, cultivant alhora tot un seguit de valors indispensables per treballar en el món de la ciència.

M'agradaria agrair especialment la confiança que el **Dr. Ricard Marcos** i la **Dra. Alba Hernández** van dipositar en mi en el seu moment alhora d'oferir-me la possibilitat d'aventurar-me en un projecte de recerca interessant i motivador.

Voldria especialment agrair la paciència, la motivació i la dedicació que la **Dra. Alba Hernández** ha dedicat sempre amb mi. Ella ha estat i és font d'inspiració i tot un referent per mi, moltes gràcies Alba.

També voldria agrair la confiança cega del **Dr. Gareth Thomas** en facilitar-me una estada al seu laboratori de recerca en càncer ubicat a la Universitat de Southampton del Regne Unit, i igualment al **Dr. Max Mellone** per dedicar el seu temps en l'adoctrinament d'un gran ventall de tècniques permetent-me la seva posterior implementació al laboratori de Mutagènesi del Departament de Genètica i de Microbiologia.

Igualment agraeixo al personal tècnic i altres membres del Grup de Mutagènesi del Departament de Genètica i de Microbiologia, als presents i als que no estan, els quals sempre han tingut temps per ajudar-me en tot dubte en la realització experimental.

També, als companys i amics creats al llarg de la meva tesi, els quals m'han acompanyat en els bons i mals moments d'aquesta èpica aventura.

Finalment a la meva família, voldria agrair-los el suport que m'han donat en tot moment per poder arribar fins al pas final per poder realitzar la presentació d'aquest treball.

"Sóc de les que pensen que la ciència té una gran bellesa. Un científic al seu laboratori no és només un tècnic: és també un nen col·locat davant fenòmens naturals que l'impressionen com en un conte de fades".

Marie Curie (1867-1934) Premi Nobel de Física i Química

RESUM

L'arsènic inorgànic es presenta com un carcinogen molt ben establert en humans. Milions de persones es troben exposades arreu del món, fonamentalment a través de l'aigua de consum contaminada per aquest compost. Encara que existeixen múltiples mecanismes d'acció pels quals l'arsènic pot exercir els seus efectes carcinògens, la generació de dany oxidatiu en el DNA a partir de les espècies reactives d'oxigen derivades de la seva biotransformació es presenta com un dels mecanismes importants a l'hora d'explicar l'aparició dels fenòmens tumorals associats amb la seva exposició.

En aquest context, l'objectiu principal d'aquesta Tesi ha estat demostrar la connexió existent entre la presència de dany oxidatiu i la carcinogènesi associada a una exposició amb arsènic inorgànic. Per arribar a aquest objectiu s'ha implementat una estratègia innovadora de treball en el qual s'emulen les condicions d'exposició ambiental a les que es troben exposades les poblacions humanes. Concretament, aquesta estratègia es basa a desenvolupar un model d'exposició crònica *in vitro* a dosis subtòxiques d'arsènic inorgànic. A més, s'ha utilitzat un model cel·lular particular constituït per dues línies cel·lulars isogèniques de fibroblasts embrionaris de ratolí (MEF), una de les quals és deficient en la reparació de lesions oxidants del DNA que requereixen el mecanisme BER, exhibint un genotip *knockout* pel gen *Ogg1*, un dels gens principals de l'esmentada ruta de reparació del DNA.

Al llarg d'aquest període d'exposició crònica a dosis de 0,5, 1 i 2 μM d'arsenit sòdic es van avaluar diferents paràmetres en ambdues línies cel·lulars, els valors dels quals van ser comparats amb els corresponents controls temporals. Dits paràmetres mesuren els nivells acumulats de dany oxidatiu (8-OH-dG), la capacitat de reparar el dany en el DNA, l'estudi de possibles mecanismes d'adaptació i, finalment, l'adquisició d'un fenotip tumoral *in vitro* en ambdues línies cel·lulars al llarg d'un procés d'exposició a arsenit sòdic del voltant 40 setmanes.

Els resultats obtinguts donen suport a la hipòtesi reflectida en l'objectiu principal. Així, les línies cel·lulars *Ogg1* deficientes (MEF *Ogg1*^{-/-}) crònicament exposades a l'arsènic mostren una acumulació progressiva de dany oxidatiu en el DNA, mentre que l'increment d'aquest dany no es detecta en la línia salvatge. Paral·lelament, l'eficiència dels mecanismes de reparació del dany induït en el DNA es veu afectada en ambdues línies cel·lulars, manifestant-se així l'activitat cocarcinògena de l'arsènic. Pel que fa referència a l'adquisició del fenotip tumoral, trobem que l'arsènic és capaç d'induir un fenotip tumoral de manera primerenca en la línia deficient, el que indicaria que el dany oxidatiu en el DNA juga un paper fonamental en la carcinogènesi associada a l'exposició. Així, les cèl·lules *Ogg1*^{-/-} manifesten un fenotip tumoral al cap de 30 setmanes d'exposició, caracteritzat per canvis morfològics, un increment en la proliferació cel·lular, el descontrol en estat de diferenciació, l'increment en la secreció de metal·loproteïnases de la matriu

extracel·lular, l'adquisició de la capacitat de créixer independent d'ancoratge, i la capacitat de promoure el creixement tumoral i la invasió.

A manera de conclusió, aquesta Tesi demostra, principalment i per primera vegada, que el fons genètic referent al gen *OGGI* i la inducció de 8-OH-dG són factors rellevants en el procés de carcinogènesi associada a l'arsènic. Indirectament, el treball posa de manifest el risc associat dels individus amb polimorfismes al gen *OGGI*, fent-los més susceptibles a l'aparició dels efectes genotòxics i carcinògens derivats de l'exposició.

INDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Descripció, localització i ús de l'arsènic al llarg de la història	1
1.2. Ingesta, transport i metabolisme de l'arsènic	3
1.3. ROS i mecanismes antioxidants	6
1.4. Via <i>NRF2-KEAP1</i> : Implicacions de l'arsènic.	8
1.5. Contribució de l'arsènic en l'aparició del dany oxidatiu en el DNA	10
1.6. Reparació del dany en el DNA: Mecanisme de reparació BER	11
1.7. N-glicosidases específiques en la reparació de la lesió 8-oxoG en el DNA: la OGG1	13
1.7.1. Del descobriment de OGG1 a l'ús de models de ratolí <i>Ogg1^{-/-}</i>	14
1.7.2. Polimorfisme OGG1 <i>Ser326Cys</i> en humans	16
1.8. El càncer com a conseqüència de l'exposició a l'arsènic	17
1.8.1. Tècniques de detecció del fenotip tumoral <i>in vitro</i>	17
- <i>Soft-agar</i>	17
- <i>Soft-agar indirecte</i>	18
- <i>Zimograma</i>	19
- Valoració del potencial metastàsic	20
- <i>PCR a temps real i Western-blot</i>	21
1.9. Inducció de carcinogènesi <i>in vitro</i> per l'arsènic	21
1.10. Càncer en models animals exposats a l'arsènic	24
1.11. Càncer en poblacions humanes exposades a l'arsènic	26
2. OBJECTIUS	29
3. ARTICLES	31
3.1. Article 1	33
Ogg1 genetic background determines the genotoxic potential of environmentally relevant arsenic exposures.	33
3.2. Article 2	37
Reduced cellular DNA repair capacity after environmentally relevant arsenic exposure. Influence of <i>Ogg1</i> deficiency	37
3.3. Article 3	41
Oxidative DNA damage enhances the carcinogenic potential of chronic arsenic exposure. ..	41
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	45
5. CONCLUSIONS	63
6. BIBLIOGRAFIA	65

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Descripció, localització i ús de l'arsènic al llarg de la història

El mot arsènic provoca cert temor quan es pronuncia, i és que la major part de la població l'associa a les seves propietats com a verí, que és com clàssicament s'ha atribuït el seu ús al llarg de la història (Cullen, 2008a).

Tot i el seu clàssic ús com eina mortífera, l'home també l'ha utilitzat des de temps immemorials en medicina, sent emprat en el tractament de malalties com la sífilis i la tripanosomiasi (Cullen, 2008b; Hughes et al., 2011) i més recentment en el tractament de la leucèmia promielocítica aguda (Lengfelder et al., 2013) i altres tumors sòlids (Subbarayan i Ardalan, 2014). L'arsènic també s'utilitza en diferents camps com a pesticida i insecticida en l'agricultura, com a semiconductor en la indústria, en la fabricació de vidre i com a pigment i preservant de la fusta (Cullen, 2008c). A més, fàrmacs que contenen arsènic (Roxasona) s'utilitzen en el tractament de malalties dels pollastres (Nachman et al., 2013) i en el món dels cosmètics (Sainio et al., 2000).

Aïllat i documentat per primer cop per Albert Magne l'any 1250 A.C. es tracta d'un metal·loide el qual es presenta en el grup 15 de la taula periòdica dels elements, mostrant un número atòmic de 33 i un pes molecular de 74,91 g/mol (Emsley, 2001). En la natura es troba en estat metàl·lic en tres formes al·lotròpiques α (groc), β (negra) i γ (grisa) així com en diferents formes iòniques, presentant quatre estats d'oxidació; As^{-3} (arsina), As^0 (arsènic elemental), As^{+3} (arsenit) i As^{+5} (arsenat). Tant les valències trivalents com les pentavalents es poden trobar formant part de compostos inorgànics o orgànics (Lim et al., 2014). Depenent de les condicions presents en l'ambient, l'arsènic inorgànic es presentarà en una valència o altra. Així, en ambients aquàtics i terrestres oxigenats i oxidants la forma predominant és l'arsenat (As^{V}) mentre que en ambients reductors i anaeròbics l'arsenit (As^{III}) és la forma més freqüent i estable (Duker et al., 2005). La taxa de conversió d'una a l'altra forma depèn de diversos factors com el pH del sòl i les característiques físico-químiques i biològiques d'aquest (Jones, 2007). Pel que fa a les formes orgàniques, les més comunes són algunes que provenen del metabolisme de l'arsènic com l'àcid monometil arsònic (MMA^{V}) i l'àcid dimetil arsínic (DMA^{V}), així com l'arsina i les seves formes metilades, i els compostos que es troben formant part d'organismes marins com la arsenobetaina i la arsenocolina (Cullen, 2008c).

De manera natural, l'arsènic es troba en estat inorgànic en l'escorça terrestre per l'aportació de roques volcàniques o sedimentaries. Per lixiviació i dissolució d'aquestes roques l'arsènic es troba present en l'aigua, amb les formes inorgàniques As^{V} predominant sobre les As^{III} . L'arsènic

es troba també en l'aire per l'acció erosiva del vent, encara que en nivells baixos, formant part de partícules mixtes d'arsenit i arsenat inferiors a 2 µm (EPA, 1998).

A més de les fonts naturals, l'activitat antropogènica suposa la introducció al medi d'importants quantitats d'arsènic. Aquestes activitats inclouen la mineria, en l'extracció dels minerals que se solen trobar acoblats a l'arsènic; l'agricultura, en l'ús de pesticides formulats a partir d'arsènic; i en la combustió de matèria orgànica. Aquestes activitats constitueixen les principals vies d'introducció d'aquest element en l'aigua, sòl i aire, posant-lo en total disposició de les poblacions pròximes a la zona on es produeixen aquestes activitats. Aquesta disposició, presència i circulació de l'arsènic en el medi s'engloba i s'explica resumidament en el que s'anomena el cicle de l'arsènic (NRC, 1977), on l'arsènic en la seva forma inorgànica és introduït en l'ambient per l'activitat volcànica i incendis naturals, o bé a través de l'activitat humana en la seva extracció a partir de minerals, en la indústria minera i en la crema de combustibles fòssils. Aquestes activitats lliuren l'arsènic a l'aire, i aquest arsènic volàtil torna a la superfície terrestre a través de precipitacions o per l'acció del vent. A més, l'activitat minera i la construcció de pous o excavacions en zones riques en arsènic promou la lixiviació d'aquest, promovent la seva posada en contacte en l'aire, oxidant-lo i fent-lo soluble en l'aigua (Duker et al., 2005). Aquest arsènic circulant en el medi aquàtic pot ser incorporat per les plantes o metabolitzat pels microorganismes presents en el sòl, alliberant altres formes d'arsènic volàtils tals com les arsines i les metil arsines (Islam et al., 2004).

Pel que fa a la biosfera, l'arsènic es troba present en plantes i animals. En plantes la seva concentració interna dependrà de les condicions dels sòls on creixen (Jones, 2007). Pel que fa als animals, l'arsènic s'acumula sobretot en animals marins tals com mol·luscs i crustacis en concentracions dependents dels nivells de la zona on viuen. Pel que fa als mamífers, aquests també l'acumulen principalment en els teixits d'origen ectodèrmic com el pèl i les ungles (Mandal i Suzuki, 2002).

Els humans acumulen arsènic en nivells que depenen, fonamentalment, de les concentracions presents en la regió on viuen. Malgrat les diferents fonts potencials d'exposició, l'aigua contaminada per arsènic constitueix la principal via d'entrada en l'espècie humana (Jones, 2007), essent milions les persones arreu del món que es troben actualment exposades a dosis que poden oscil·lar entre 100-5000 µg/L (WHO, 2011). Els primers indicis de la presència d'arsènic en l'aigua es van trobar en diferents països (Austràlia, Canadà, Mèxic, Tailàndia, el Regne Unit i Estats Units) on es va atribuir a l'activitat minera com la responsable en la contaminació d'aqüífers pròxims. Posteriorment es detectaren casos similars en països arreu del món (Mukherjee et al., 2006), presentant-se en el continent asiàtic els països més contaminats (Kim et al., 2011). L'Amèrica Llatina també presenta zones força contaminades (Bundschuh et al., 2012)

mentre que a Europa tan sols algunes regions concretes de països com Romania, Hongria, Itàlia i Espanya presenten zones amb elevats nivells d'arsènic en l'aigua (Halem, 2009).

Molts d'aquests països contenen grups poblacionals que han estat estudiats sota diferents aspectes, i els quals seran posteriorment comentats més detalladament en l'apartat de càncer en humans. Aquestes exposicions massives suposen un greu problema de salut mundial, ja que l'arsènic ha estat declarat com a carcinogen en humans per l'Agència Internacional de Recerca en Càncer (IARC) en diferents ocasions (IARC 1980, 2004, 2012), presentant-se com un greu problema actualment en països com Bangladesh, on milions de persones estan exposades a alts nivells d'arsènic conferint-los increments notables en el risc de desenvolupar càncer, junt amb altres patologies en el sistema circulatori, pell y sistema nerviós (Caldwell et al., 2006; Cullen, 2008a). Diferents estudis han tractat d'identificar quins són els nivells d'arsènic en l'aigua segurs des del punt de vista de la salut. L'Agència de Protecció Ambiental dels Estats Units (EPA) va proposar, ja a l'any 1942, un nivell màxim permès en l'aigua de consum de 50 µg/L, adoptant-ne aquesta mesura de manera immediata en altres països. Més endavant, l'any 2001, la EPA proposà una reducció fins als 10 µg/L, basant-se en estudis d'avaluació del risc i l'anàlisi de dades epidemiològiques d'exposició a l'arsènic. Aquesta proposta va estar acceptada per l'Organització Mundial de la Salut (OMS), essent aquests els nivells màxims d'arsènic permès en l'aigua de consum que s'estan adoptant en molts països, tot i que en alguns països com Bangladesh els és del tot impossible assolir aquests nivells. Cal dir que l'establiment d'aquesta dosi no sembla ser definitiva, ja que actualment es troba en debat si realment existeix una dosi segura la qual no aportí efectes perjudicials per a la salut de les persones crònicament exposades (Schmidt, 2014).

1.2. Ingesta, transport i metabolisme de l'arsènic

Un cop ingerit, l'arsènic és absorbit en la seva major part en l'intestí i alliberat al torrent sanguini, on el 90% de la seva presència desapareix en 1-2 hores, essent eliminat a través de l'orina en uns dies, tot i que algunes traces poden romandre mesos acumulades en les ungles i el cabell (Aposhian et al., 2000). El fet que es tracti d'un element altament tòxic ha suposat l'aparició evolutiva de diferents tipus d'estratègies per controlar els seus nivells interns. Aquestes es troben representades tant en procariotes com en eucariotes, no essent l'home una excepció (Rosen, 2002). En mamífers, la captació l'arsenit (As^{III}) es realitza mitjançant les aqua-gliceroporines o altres transportadors com el de la glucosa *GLUT1*; en el cas de l'arsenat (As^V) aquest és captat per part dels transportadors de fosfats cel·lulars (Calatayud et al., 2012). La seva expulsió de la cèl·lula es dona per l'acció de transportadors pertanyents a la família de transportadors ABC amb unió a ATP, els quals presenten dues subfamílies com la ABCC (que inclouria transportadors tals com *MRP1* i *MRP2*) i la ABCB que inclou el transportador *MDR1/P-*

gp (Drobná et al., 2010), on l'arsènic inorgànic es conjuga amb el glutatió (GSH) per tal de ser expulsat a través d'aquests transportadors (Leslie, 2012).

Un altre mecanisme de desintoxicació consisteix en la metilació de l'arsènic. En mamífers, i particularment en l'home, l'arsènic en la seva forma inorgànica pot ser metilat en diferents òrgans tals com el ronyó, els testicles i els pulmons, encara que és en el fetge on es realitza principalment la seva metabolització (Cohen et al., 2006). Així, l'arsenit (As^{III}) es metila donant lloc a metabòlits intermediaris mono o dimetilats trivalents tals com l'àcid monometilarsènic (MMA^{III}) o el dimetilarsènic (DMA^{III}), i mono o dimetilats pentavalents com l'àcid monometilarsinic (MMA^{V}) o el dimetilarsinic (DMA^{V}) (Aposhian, 1997). Aquest darrer metabòlit és més soluble que el mateix arsenit, essent més fàcilment excretable, presentant-se com el principal metabòlit que es presenta en l'orina d'individus exposats, tot i que els intermediaris MMA^{III} i DMA^{III} també s'observen en individus exposats (Wang et al., 2004).

Encara que des d'un inici la biometilació de l'arsènic va ser considerat com un possible mecanisme de desintoxicació, aviat es va veure que alguns dels metabòlits intermediaris eren més tòxics que el mateix arsenit (As^{III}), principalment el MMA^{III} (Stýblo et al., 2000). Per una altra banda també s'ha vist que aquesta via no es troba present en tots els animals, el que posa en dubte el seu paper com a mecanisme universal en l'eliminació de l'arsènic. Així, la metilació es troba absent en mamífers tals com els micòtids, el ximpanzé i el conillet d'índies i, contràriament es troba present en el conill, el ratolí, la rata, el gos, la vaca, el mico "Rhesus" i l'ésser humà (Aposhian i Aposhian 2006).

Dues possibles vies han estat proposades per explicar el metabolisme de l'arsènic. La primera ruta proposada és la més popularment acceptada i va ser formalment postulada per Cullen i Reimer l'any 1989. Aquest model es basa en una metilació oxidativa (l'afegiment de grups CH_3^+) dels compostos trivalents produint la consegüent aparició de compostos pentavalents, els quals presenten un estat d'oxidació superior als seus predecessors, essent posteriorment reduïts de nou a l'estat trivalent (Cullen, 2014). La principal font de grups CH_3^+ és la S-adenosil metionina (SAM), que és un metabòlit procedent del metabolisme de l'àcid fòlic (Cullen i Reimer, 1989). Així, en els primers passos de la ruta metabòlica l'arsenat (As^{V}), un cop incorporat intracel·lularment, és reduït enzimàticament a arsenit (As^{III}) en el citosol per part de la glutatió-S-transferasa omega-1 (GSTO-1), la qual pertany a la família de les glutatió S-transferases (Zakharyan et al., 2001) amb l'ajuda del GSH com a font de poder reductor. Un cop reduït l'arsenit és posteriorment metilat per l'addició d'un grup CH_3^+ per part de una metil-transferasa formant-se el metabòlit intermediari MMA^{V} , que posteriorment és reduït per l'acció enzimàtica d'una MMA^{V} reductasa a MMA^{III} i seguidament metilat de nou a DMA^{V} , el qual serà novament reduït a DMA^{III} per l'acció d'una DMA^{V} reductasa. Aquests metabòlits poden seguir essent metilats a òxid trimetilarsènic (TMAO^{V}) i reduïts a àcid trimetilarsènic (TMA^{III}). Tal com podem apreciar

en aquesta via és la metilació sobre els compostos trivalents la que produeix compostos pentavalents que són posteriorment reduïts a compostos trivalents essent els metabòlits finals de la ruta.

Donat que en humans són els compostos pentavalents intermediaris (tal com el DMA^V) i no els metabòlits trivalents els que principalment es troben en l'orina, aquest model ha estat qüestionat. Per donar resposta a aquest fet s'ha proposat l'acció del peròxid d'hidrogen (H₂O₂) com a mecanisme oxidant dels productes finals trivalents, formant els compostos pentavalents menys reactius i altament representats en l'orina (Aposhian et al., 2004). Alternativament, Hayakawa et al. (2005) van proposar una nova ruta en la qual la metilació és dona sobre l'arsenit que es troba conjugat a GSH, de manera que aquest no és oxidat tal com proposa la primera ruta. Així, l'arsenat seria reduït a arsenit sense necessitat d'una acció enzimàtica a través de la contribució única de GSH, seguidament l'arsenit s'acomplexaria amb tres molècules de GSH a fi de formar complexos As-GSH, que posteriorment seran metilats a l'intermediari monometil arsònic diglutatió MMA-(GS)₂ i dimetil arsònic glutatió DMA-GS. El mecanisme suggerit per la formació de tals intermediaris seria mitjançant un atac del grup sulfidril nucleofilic del complex As-GSH sobre el grup sulfur catiònic de SAM, transferint-se un grup CH₃⁺ per part d'una metiltransferasa. Aquests intermediaris seran reduïts posteriorment a MMA^{III} a partir de MMA-(GS)₂ i a DMA^{III} a partir de DMA-GS gràcies a l'acció del GSH. Finalment, aquests compostos poden ser oxidats per l'acció del H₂O₂ tal com s'ha mencionat abans, donant els productes finals pentavalents MMA^V i DMA^V, respectivament (Hayakawa et al., 2005). Just un any després de la publicació de la via proposada per Hayakawa i col·laboradors, apareix una tercera via descrita per Naranmandura i col·laboradors, en la qual es dona una metilació igualment reductora i la presentació dels compostos pentavalents MMA^V i DMA^V com a productes finals i no com a intermediaris del metabolisme. En aquesta proposta, l'arsenit formarà complexos amb proteïnes (Naranmandura et al., 2006). La seva proposta es fonamenta bàsicament en el fet que l'arsenit té molta més afinitat per unir-se a proteïnes solubles i insolubles que amb el mateix GSH a través dels seus grups tiol (-SH) presents en els residus de l'aminoàcid cisteïna (Cys). Breument, l'arsenit captat per òrgans com el fetge, és reduït formant complexos amb proteïnes, seguidament és metilat gràcies a l'activitat d'una metil transferasa, on simultàniament serà seqüencialment metilat i reduït per la conjugació amb els grups tiol de les Cys presents en les proteïnes, formant els respectius compostos monometilats i dimetilats i finalment oxidats als productes finals MMA^V i DMA^V.

Cal remarcar que malgrat que les diferències existents entre les tres rutes proposades comparteixen el fet que l'enzim responsable en l'addició de grups CH₃⁺ es considera que és l'arsènic-3-metiltransferasa (*AS3MT*) (Lin et al., 2002) i que la font de grups CH₃⁺ prové de la SAM.

A continuació s'esquematitzen les tres rutes indicades (Figura 1).

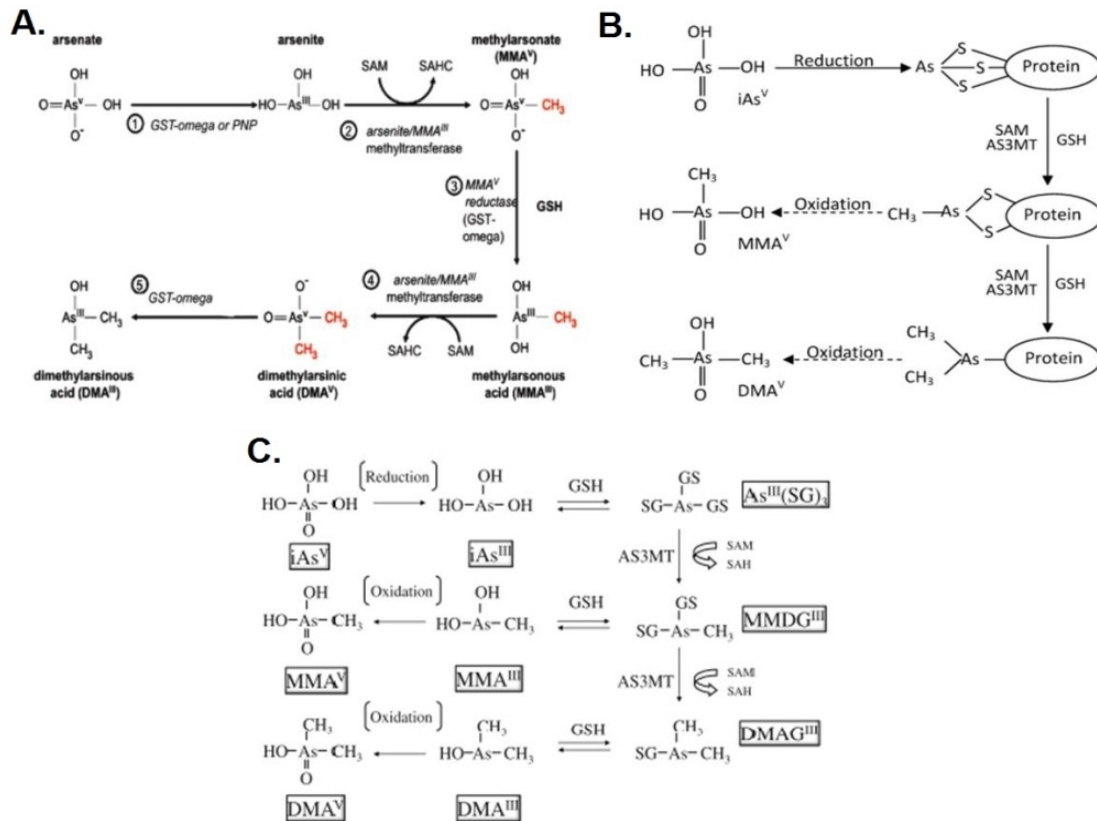


Fig. 1. Metabolisme de l'arsènic. A) Via de la metilació oxidativa. B) Via proposada per Naranmandura et al. C) Via proposada per Hayakawa et al. [aquest esquema és una adaptació dels publicats per Aposhian i Aposhian (2006), Rehman i Naranmandura (2012) i Watanabe i Hirano (2013)].

1.3. ROS i mecanismes antioxidants

En la metabolització de l'arsènic, durant les successives oxidacions metilants i les reduccions conseqüents posteriors, es generen espècies reactives d'oxigen (ROS). Aquesta implicació del metabolisme en la producció de ROS ha estat descrita en diferents estudis (Martinez et al., 2011), mostrant-se com un dels mecanismes pels quals es generen aquests ROS, tot i no ser l'únic. Altres mecanismes contempnen a) la interacció de l'arsènic amb els mitocondris i la seva posterior desestabilització alliberant ROS interns formats durant la fosforilació oxidativa, b) l'oxidació de l'arsenit (As^{III}) a arsenat (As^{V}) en plasma, c) la contribució del Fe alliberat de la ferritina per l'acció dels metabòlits intermediaris, d) la reducció dels nivells de GSH a causa del metabolisme de l'arsènic i e) la possible interacció de l'arsènic sobre enzims antioxidants, promovent el consegüent increment de ROS (Flora, 2011).

Independentment de quins són els mecanismes de generació, està totalment acceptat que l'exposició a l'arsènic genera la presència i augment de ROS (Kitchin i Conolly, 2010). Aquestes

molècules contenen un o més electrons desaparellats en les seves òrbites atòmiques o moleculars, el que els confereix una alta reactivitat amb multitud de molècules, incloent-hi els àcids nucleics (Valko et al., 2007). Aquests es poden presentar en diferents formes, i les principals detectades en exposicions a l'arsènic són les següents: anió superòxid ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($\bullet OH$), peròxid d'hidrogen (H_2O_2), di-oxigen (1O_2) i radicals peroxils ($ROO\bullet$) (Jomova et al., 2011). El radical $O_2^{\cdot-}$ és considerat com un radical "ROS primari" que prové de l'addició d'un electró a la molècula de 1O_2 , i la producció d'aquest radical se sol donar majoritàriament en els mitocondris a través dels complexos I i III de la cadena de transport electrònic (Valko et al., 2007), on l'arsènic crea pertorbacions en les membranes mitocondrials promovent la seva l'alliberació al citoplasma (Flora, 2011). L'acció dels enzims NADPH oxidases i xantines oxidases també promouen la seva formació d'igual forma que el metabolisme de l'arsènic. El radical $O_2^{\cdot-}$ pot ésser posteriorment dismutat en l'àmbit dels mitocondris o en el citosol a H_2O_2 . Un altre punt de formació de H_2O_2 són els peroxisomes, que l'alliberen al citosol quan són danyats (Valko et al., 2007).

La combinació de $O_2^{\cdot-}$ amb H_2O_2 produeix la formació d'un altre radical com a producte final essent $\bullet OH$: ($O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \bullet OH + OH^-$). Aquesta reacció es denomina de Haber-Weiss, descrita per primer cop als anys 30 del segle XX (Haber i Weiss, 1932). Per altra banda, l' H_2O_2 en combinació amb un metall tal com el Fe^{2+} produeix l'oxidació del ferro, convertint-lo a Fe^{3+} i formant novament el radical $\bullet OH$: ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$). Aquesta reacció es coneix com a reacció de Fenton descrita ja al segle XIX (Fenton, 1894). L'oxidació posterior del Fe^{3+} a Fe^{2+} en presència del radical $O_2^{\cdot-}$: $Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ reconstitueix de nou els nivells de Fe^{2+} disponibles a ser oxidats de nou per part del H_2O_2 reconstituint de nou la reacció de Fenton. Aquestes dues reaccions (Haber-Weiss i Fenton) treballen paral·lelament formant el radical $\bullet OH$ com a producte final de l'oxidació de l'oxigen. Com podem observar el ferro es constitueix com un element molt important com a cofactor de tals reaccions. En condicions normals aquests nivells es troben sota un control cel·lular. Establint-se uns nivells fisiològics, però en condicions d'estrès aquest ferro pot ser alliberat de molècules que el contenen, essent un exemple el provinent de grups (4Fe-4S) dels enzims de la família deshidratases-liases (Liochev i Fridovich, 1994). En el cas d'exposicions a l'arsènic, les espècies intermediàries metilades provinents del seu metabolisme poden alliberar el ferro de la ferritina, augmentant el seu nivell i posant-lo disponible per participar en les reaccions esmentades, promovent la formació final de $\bullet OH$ (Ahmad et al., 2000).

El radical $\bullet OH$, tot i tenir una vida mitjana curta de 10^{-9} segons, és capaç d'atacar l'enllaç N-glicosídic format entre les bases nitrogenades i la desoxiribosa en el DNA, a més de les mateixes bases nitrogenades púriques i pirimidíniques (Valko et al., 2007). Les conseqüències negatives d'aquests radicals ha portat a la cèl·lula al llarg de l'evolució a desenvolupar estratègies per combatre els efectes derivats indesitjables (Cadenas, 1997) amb la finalitat de mantenir una

homeòstasi cel·lular, ja que aquests efectes es manifesten quan existeix un desequilibri entre els ROS i els sistemes preventius desenvolupats per la cèl·lula (Valko et al., 2007). Cal indicar que nivells moderats dels ROS poden mostrar efectes beneficiosos essent citotòxics per patògens, controlant processos de senyalització cel·lular, i promovent la mitosi (Dröge, 2002). Les estratègies cel·lulars dissenyades a fi de controlar els nivells de ROS inclouen: estratègies preventives, barreres defensives i defenses antioxidants, aquestes últimes inclouen enzims antioxidants tals com la superòxid dismutasa (SOD) encarregada de dismutar el superòxid produint el radical intermedi peròxid d'hidrogen, la glutatió peroxidasa (GPx), i la catalasa (CAT) encarregades d'eliminar aquest peròxid d'hidrogen produint aigua i de nou oxigen. Per una altra banda també inclouen molècules amb propietats antioxidants tals com àcid ascòrbic (vitamina C), α -tocopherol (vitamina E), glutatió (GSH), carotenoides i flavonoides, entre d'altres. El balanç entre aquests i la quantitat de ROS presents confereixen una situació d'homeòstasi a nivell cel·lular (Valko et al., 2007; Flora, 2011).

Són diversos els treballs que mostren que l'arsènic incrementa la producció de ROS trencant l'equilibri homeostàtic present a la cèl·lula. Alguns estudis han mostrat desregulacions en els nivells d'antioxidants, reduint els nivells de glutatió hepàtics en rates i ratolins exposades crònicament a l'arsènic (Flora et al., 2008). Aquesta davallada se suposa i postula que és conseqüència de l'augment del metabolisme de l'arsènic, on el GSH participa en diferents reduccions en aquest metabolisme i és cofactor d'enzims participes tals com la GSTO-1. Sembla que les variacions en els nivells d'enzims antioxidants difereixen segons les exposicions a l'arsènic siguin agudes o cròniques. Estudis amb exposicions agudes a dosis baixes han mostrat un augment de SOD, CAT i GPx (Kitchin i Conolly, 2010), tot i que d'altres com l'hemoxygenasa (HO-1) s'han trobat sobre-expressats. Contràriament, alguns estudis emprant exposicions cròniques han mostrat una davallada en la presència i activitat dels enzims antioxidants prèviament mencionats (Mishra et al., 2008).

1.4. Via *NRF2-KEAP1*: Implicacions de l'arsènic.

Tots aquests sistemes protectors antioxidants necessiten un control per tal de mantenint-se a nivells basals en homeòstasi i poder ser activats en el moment que es requereixi la seva acció. En aquest punt la principal via de senyalització que governa l'activació de la resposta a l'estrès oxidatiu és la coneguda com Nrf2-Keap1-ARE (Kobayashi et al., 2006). Aquesta via regula l'expressió de diferents gens, essent classificats en diferents categories. En primera instància ens trobem proteïnes de regulació dels nivells redox tals com la GPx, SOD, CAT i HO-1, entre d'altres. En un segon nivell trobem enzims desintoxicants cel·lulars de segona fase tals com les glutatió S-transferases, entre d'altres, mentre que en la tercera fase ens trobem amb transportadors tals com els MRPs. L'activació de tot aquest sistema es regula a través dels nivells de ROS. Així,

en condicions fisiològiques normals de ROS, el factor de transcripció *NRF2* es troba unit a *KEAP1* en el citoplasma, aquesta unió permet la ubiquitinització i posterior degradació de *NRF2* en el proteosoma 26S a través del complex que formen amb *KEAP1* i la lligasa Cullin3-based E3. En el moment que es produeix un increment de ROS, que promou una desregulació del balanç redox intracel·lular, es produeix una dissociació del complex *NRF2-KEAP1-Cul3-E3*-lligasa, permetent la consegüent translocació de *NRF2* al nucli, on s'uneix al promotor de la seqüència denominada "element de resposta antioxidant, ARE" promovent la transcripció seqüencial en cascada de les diferents categories de gens associats a la resposta antioxidant (Sinha et al., 2013). El paper que juga l'arsènic en l'activació d'aquesta via es considera com una prova indirecta de la formació de ROS per part de l'arsènic (Kumagai i Sumi, 2007), fet àmpliament demostrat en múltiples estudis *in vitro* (Córdova et al., 2014) i en animals utilitzant ratolins *knockout* pel gen *Nrf2* i analitzant el paper protector d'aquesta via en resposta a l'exposició crònica a l'arsènic (Jiang et al., 2009). La majoria d'aquests estudis demostren l'activació de la via, però alguns van més enllà i han proposat un mecanisme alternatiu al convencional pel qual l'arsènic podria activar-la. L'activació convencional de la via es promou, majoritàriament, a través de la dissociació del *KEAP1-Cullin3-basedE3*-lligasa i *NRF2*, mitjançant la interacció amb el residu de Cys151 de *KEAP1*, promovent la posterior translocació a nucli i consegüent unió de *NRF2* al ARE. Aquest es coneix com a mecanisme canònic que confereix una activació de la via controlada intermitent amb una vida mitjana de *NRF2* de 15-45 minuts (Sinha et al., 2013). Per altra banda es troba el mecanisme alternatiu pel qual l'arsènic activaria la via, mantenint-la sobre-activada i des-regulada emulant una expressió constitutiva, que és tal com se sol presentar en les cèl·lules tumorals. Aquest mecanisme es coneix com la part fosca del *NRF2* (Lau et al., 2013). En aquesta proposta alternativa la proteïna p62 implicada en els processos d'autofàgia tindria un paper clau segregant el complex *KEAP1-Cullin3-basedE3*-lligasa, augmentant la vida de *NRF2* a hores i aproximant-lo a una situació d'expressió constitutiva d'activació de la via. Aquesta via atorgaria a les cèl·lules una resistència als agents quimioteràpics inductors de ROS, el que podria suposar un problema en l'eliminació dels tumors derivats de les exposicions cròniques a l'arsènic (Lau et al., 2013).

En la figura 2 s'esquematitza la desregulació de la ruta *NRF2-KEAP1*.

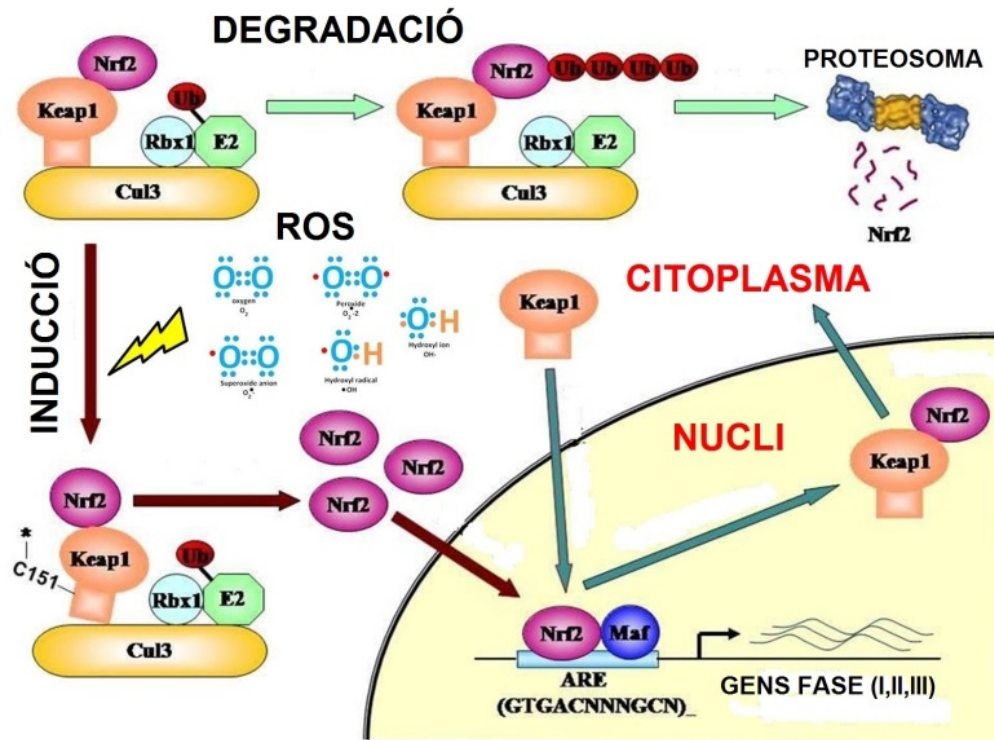


Fig.2. Desregulació de la ruta NRF2-KEAP1.

(Adaptat de <http://www.u.arizona.edu/~zhangd/RESEARCH.html> i J.E.M. Wall (original artwork; Copyright ©2009 Joyce E.M. Wall)

1.5. Contribució de l'arsènic en l'aparició del dany oxidatiu en el DNA

El dany oxidatiu en el DNA generat per ROS s'ha proposat com un dels principals mecanismes de carcinogènesi promogut per l'arsènic (Kitchin i Conolly, 2010). Malgrat això, altres mecanismes d'acció mediat per l'arsènic també s'han associat al procés carcinogènic. Entre aquests cal assenyalar la genotoxicitat exercida, la proliferació cel·lular alterada, les interaccions amb altres carcinògens promovent un comportament co-carcinogènic, la promoció tumoral i la interacció amb els mecanismes de reparació del DNA (Hughes, 2002).

Més recentment s'ha postulat la seva interacció amb els mecanismes epigenètics, modificant els patrons de metilació del DNA (Bailey i Fry, 2014). Aquests mecanismes d'acció, juntament amb el dany oxidatiu, poden portar a la cèl·lula a presentar inestabilitat genòmica, que és una característica comunament presentada per les cèl·lules tumorals (Bhattacharjee et al., 2013). Existeix un extens llistat de treballs els quals mostren l'aparició de dany oxidatiu en el DNA posterior a una exposició a arsènic. Aquests contemplen estudis *in vitro* amb línies cel·lulars (Li et al., 2001; Kojima et al., 2009; Alarifi et al., 2013), basant-se alguns en el paper del metabolisme de l'arsènic per explicar la generació de ROS (Orihuela et al., 2013; Tokar et al., 2014), i altres centrant-se a mostrar la seva presència i acumulació en línies deficientes en la seva capacitat d'

eliminació (Bach et al., 2014). També són múltiples els estudis que ho han demostrat *in vivo*, preferentment amb rates i ratolins (Bhadoria i Flora, 2007; Sinha et al., 2010) així com estudis epidemiològics en humans, a escala de poblacions crònicament exposades per consumir aigua contaminada (Biswas et al., 2010; Chou et al., 2014), o grups exposats laboralment (Lin et al., 2012; Pei et al., 2013) i inclús en pacients sota tractament amb ATO en quimioteràpia de APL (Ninomiya et al., 2006).

El dany oxidatiu en el DNA es concreta en tot un ampli ventall de lesions que pateixen les bases nitrogenades, essent oxidades i modificades, el que pot provocar futures mutacions en el DNA. Aquestes lesions tenen el seu origen en l'acció dels ROS, especialment en el radical •OH que ataca el DNA formant diferents tipus de bases oxidades (Bohr et al., 2002). Entre totes aquestes lesions, la més estudiada, encara que no és la més freqüent, és la 7, 8- dihidro-8-oxoguanina, més popularment coneguda com a 8-OH-dG, abreviada a 8-oxo-Gua o 8-OH-Gua. Aquesta és una de les 15 variants possibles d'oxidació de la base púrica guanina i va ser descoberta i descrita als anys 80 (Kasai i Nishimura, 1984). Es forma espontàniament en els organismes aeròbics a través de l'acció dels ROS generats durant la respiració cel·lular, la radiació ionitzant i l'acció de metalls entre d'altres (Hirano, 2008), apareixent intracel·lularment ja sigui en el *pool* de nucleòtids o integrada en el DNA (Klungland i Bjelland, 2007). La perillositat d'aquesta lesió s'esdevé en el fet que és mutagènica promovent l'aparició de mutacions puntuals del tipus transversions GC:TA (Cheng et al., 1992), essent la base oxidada més freqüent en càncers com els de pulmó, mama, ovàric, gàstric i colorectal (van Loon et al., 2010). Aquesta capacitat de produir mutacions ha estat corroborada recentment en ratolins exposats a arsènic (Takumi et al., 2014). Tant la seva incidència com les seves conseqüències han fet que aquesta lesió en el DNA sigui utilitzada com a biomarcador per detectar poblacions altament exposades de manera crònica (Loft et al., 2012), convertint-se en una eina molt útil en la prevenció del risc associat a càncer degut a l'arsènic (De Vizcaya-Ruiz et al., 2009).

1.6. Reparació del dany en el DNA: Mecanisme de reparació BER

Els organismes, al llarg de l'evolució i davant el perill que suposa la presència i acumulació de mutacions en el DNA, han creat diferents mecanismes de reparació per mantenir la integritat dels seus genomes, evitant la promoció de la seva inestabilitat. Un dels mecanismes desenvolupats és l'anomenat mecanisme de reparació per excisió de bases (BER), que és el mecanisme escollit per reparar les lesions generades pels ROS, que produeixen més de 60 tipus de lesions diferents tals com l'oxidació, l'alquilació i la desaminació o depurinització/depurimidització de bases nitrogenades (Robertson et al., 2009).

Aquest sistema de reparació es troba conservat al llarg de l'evolució, presentant-se des de bacteris com *Escherichia coli* fins a humans (Wallace et al., 2013). Fou descobert als anys 70 del

segle XX, buscant una possible ruta enzimàtica capaç d'eliminar els uracils incorporats en el DNA de *E. coli*, i avui en dia es coneix bastant bé aquesta ruta de reparació que consta de diferents passos que es produeixen de manera seqüencial amb participació de quatre proteïnes; una DNA glicosidasa, una AP endonucleasa o AP DNA liasa, una DNA polimerasa i una DNA lligasa, complementades per la coordinació d'altres.

En funció del tipus de lesió, existeixen dues variants en la modalitat de BER denominades com a curta o llarga (Sung i Dimple, 2006). La principal diferència entre les dues vies, a part de les proteïnes complementàries que puguin participar, és l'eliminació d'un nucleòtid en la via curta, i l'eliminació de més d'un nucleòtid en la llarga. La via curta és la més emprada i, breument, en els primers passos una N-glicosidasa reconeix específicament la base danyada, catalitzant el trencament de l'enllaç N-glicosídic existent entre la desoxiribosa i la base nitrogenada, eliminant la base i creant un lloc abàsic (AP).

Seguidament, la desoxiribosa és trencada i processada per una DNA-AP endonucleasa essent la proteïna APEX1 i una DNA-AP liasa la qual per un mecanisme de β -eliminació promourà l'aparició en la posició 3' d'un α,β aldehyd insaturat adjacent al fosfat en la posició 5', formant un forat en una de les dues cadenes de DNA. L'activitat de la DNA-AP endonucleasa crea un tall en l'extrem 5', mentre que la DNA-AP liasa crea un tall en l'extrem oposat 3'. Es crea així un forat a fi de ser omplert posteriorment per l'acció d'una DNA polimerasa, essent la DNA polimerasa β la que primerament processarà l'extrem 5' d'RP creat per la APEX1, formant un extrem 5'-P lliure i l'extrem 3' formant un 3'-OH, fent compatible el forat a ser omplert amb la base complementària corresponent. Finalment, aquest forat serà segellat per l'acció d'una DNA lligasa, en particular la DNA lligasa III (LIG3) (Wallace et al., 2013). Altres proteïnes tals com la XRCC1 participen també activament en la via reclutant les proteïnes participants i fent-les de suport a fi que realitzen les seves funcions específiques dintre la ruta (Wallace et al., 2013).

La fidelitat en la reparació de les diferents lesions i tipus de bases danyades radica en l'àmplia varietat de N-glicosidasas existents. Es considera que existeixen onze variants diferents, cadascuna destinada a reconèixer una o múltiples lesions específiques, algunes d'elles essent mono funcionals podent únicament reconèixer una lesió específica i trencant l'enllaç N-glicosídic, mentre que altres són bifuncionals tenint una activitat AP liasa extra (Robertson et al., 2009).

Un esquema d'aquesta ruta s'indica en la figura 3.

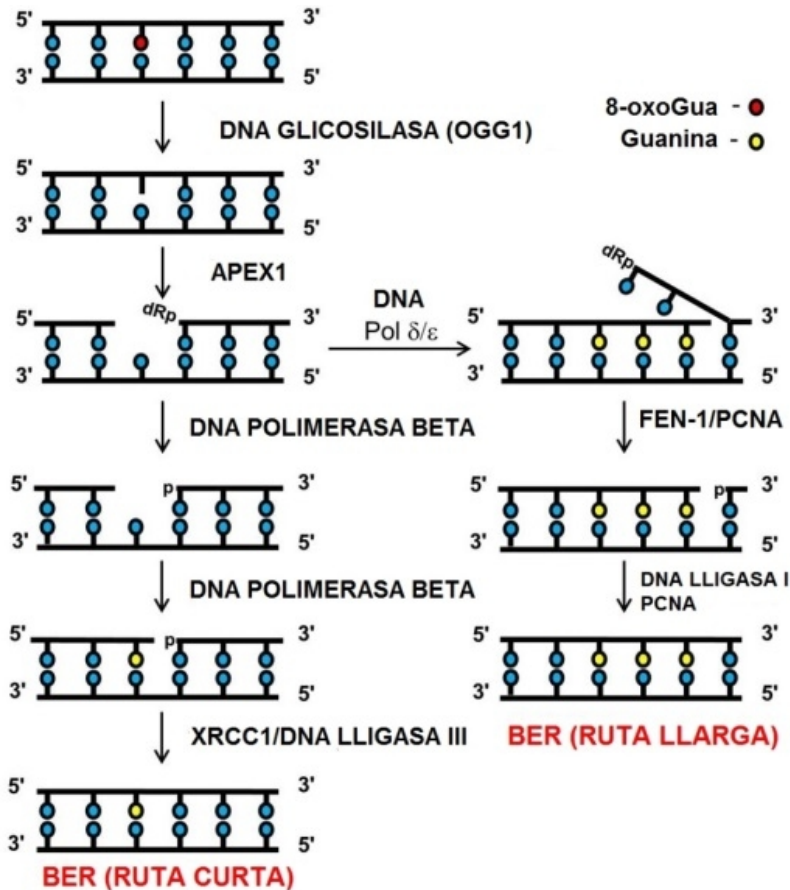


Fig.3. Ruta BER. (Adaptat de Nickson i Parsons, 2014).

1.7. N-glicosidases específiques en la reparació de la lesió 8-oxoG en el DNA: la OGG1

Una de les lesions més estudiades i present en les cèl·lules exposades a l'arsènic és la 8-OH-dG, que és eliminada del DNA emprant la ruta curta BER en mamífers a través del reconeixement específic per la N-glicosidasa bifuncional OGG1. Aquest enzim mostra una alta especificitat per aquesta lesió, tot i que també reconeix altres lesions com el FaPy-G i la 8-oxoadenina (Robertson et al., 2009; Wallace et al., 2013). La seva unió i reconeixement de bases danyades en el DNA es realitza a partir de la participació de dos motius continguts en l'estructura proteica, essent un d'ells en format "helix-hairpin-helix" i l'altre corresponent a motius en format dits de zinc Cys2-His2 (C2H2) (Hirano, 2008). Tot i mostrar-se específica en el reconeixement i eliminació de la lesió 8-OH-dG, no es confereix com l'únic enzim en fer-ho, ja que altres N-glicosilases com la NEIL1 poden realitzar tal acció, encara que de forma més inespecífica (Hailer et al., 2005).

A part de l'acció directa per part d'aquestes dues N-glicosilases en l'eliminació de les 8-oxoG presents en el DNA, la cèl·lula ha desenvolupat estratègies alternatives que no actuen directament eliminant la 8-OH-dG del DNA. Aquests sistemes actuen sobre les guanines oxidades provinents

del pool de nucleòtids, prevenint la seva incorporació en el DNA per part de les DNA polimerases. Exemples d'aquest tipus d'actuació el troben en enzims com la MTH1, que actua com a fosfatasa convertint les 8-oxoGTP en 8-oxoGMP, prevenint així l'aparició de futures mutacions (Sakai et al., 2002).

Respecte a la seva localització en el genoma, en humans el gen *OGG1* es localitza en el cromosoma 3 presentant 8 exons, la seva transcripció produeix 4 variants obtingudes per processat alternatiu, i totes aquestes variants comparteixen un únic C-terminal i una seqüència de senyalització mitocondrial a l'extrem N-terminal. Les variants més freqüents corresponen a les anomenades α -OGG1 i β -OGG1, amb seqüències peptídiques de 345 i 424 aminoàcids i pesos moleculars de 39 i 47 kDa, respectivament. Les dues variants es troben presents en compartiments cel·lulars diferents; així, mentre la variant α -OGG1 es localitza principalment en el nucli cel·lular, la β -OGG1 es troba en els mitocondris (Nishioka et al., 1999). Paradoxalment, la seva ubicació no garanteix la seva funció, ja que mentre la α -OGG1 és capaç de reparar les 8-oxoG en el nucli, la variant β -OGG1 és incapaç, concedint-li aquesta funció a la variant α -OGG1 (Hashiguchi et al., 2004).

La seva expressió en condicions no patològiques es troba preferentment en teixits com el fetge, intestí, ronyó, testicles, nodus limfàtics, còrtex cerebral i placenta, entre d'altres. És interessant remarcar que en condicions patològiques, com en diversos tumors (mama, còlon, pròstata, pulmó i fetge) la seva expressió es troba molt augmentada (Sampath, 2014).

1.7.1. Del descobriment de OGG1 a l'ús de models de ratolí *Ogg1*^{-/-}

La història del descobriment de gen *Ogg1* es remunta als anys 90 del segle XX en la cerca de la presència d'un gen homòleg en eucariotes a la glicosidasa *Fpg* (formamido pirimidina DNA glicosidasa) present en procariotes, la qual era capaç de reconèixer la 8-OH-dG entre altres bases oxidades (Boiteux et al., 1990). Així, l'any 1996 els científics aconseguiren identificar un gen homòleg a *Fpg* en *Saccharomyces cerevisiae*, essent identificat per primera vegada en un organisme eucariota (van der Kemp et al., 1996); anys després fou clonat i identificat en mamífers propo-sant-se com l'enzim clau en la reparació de les 8-OH-dG (Hirano, 2008).

Al llarg del temps l'interès a estudiar el paper de la ruta BER *in vivo* ha portat als científics a utilitzar models murins *knockout*. Aquests models, que es poden generar utilitzant diferents estratègies, presenten la inactivació selectiva de gens, eliminant la seva posterior expressió i compromentent les funcions determinades pels mateixos en les vies corresponents (Hall et al., 2010). En el cas de la ruta BER es basen en el silenciament d'una o més proteïnes components de la ruta. La utilització d'aquesta estratègia permet estudiar la implicació del dany oxidatiu en termes fisiològics i de carcinogènesis en l'àmbit d'organisme. Paral·lelament es pot demostrar la necessitat vital d'algunes d'aquestes proteïnes en veure letalitat en els individus portadors dels

gens corresponents inactivats. Un exemple ho tenim en *APEX1* i en el gen de la DNA polimerasa β .

Pel que fa a ratolins *knockout* en N-glicosilases específiques, aquests no presenten letalitat, mostrant una possible polivalència d'aquestes proteïnes en els primers passos de reconeixement del dany en la ruta. Analitzant el cas de *OGG1*, el primer model murí *knockout* per aquest gen fou obtingut de manera simultània per dos laboratoris a finals del segle XX (Klungland et al., 1999; Minowa et al., 2000). Aquesta soca de ratolins era viable i presentava un fenotip normal lliure de patologies, tot i que l'eliminació de l'expressió de la N-glicosidasa *Ogg1* (*Ogg1*^{-/-}) els conduïa com a candidats teòrics a acumular nivells basals més elevats de 8-OH-dG. La hipòtesi fou descartada quan s'observà que els nivells espontanis elevats de 8-OH-dG eren detectats exclusivament en teixits de lenta proliferació tals com el fetge; a part, aquest increment espontani no s'associà a l'aparició de tumors (Epe, 2002). Al contrari altres investigadors mostraren un increment global genòmic dels nivells de 8-OH-dG i la posterior aparició de tumors pulmonars i de còlon (Liao et al., 2008) discrepant sobre la contribució en l'increment de la lesió 8-OH-dG respecte a l'aparició de càncer, com a principal conseqüència en la deficiència de la ruta BER. Tot i aquestes discrepàncies, la generació d'aquest model, i les línies cel·lulars embrionàries provinents, han estat de gran utilitat en l'estudi de la implicació del dany oxidatiu en múltiples àrees de recerca. Així, el model murí *Ogg1*^{-/-} ha estat utilitzat en l'estudi de malalties metabòliques tals com la diabetis (Yuzefovych et al., 2013) i l'obesitat (Sampath et al., 2012); en estudis immunològics referents a la resposta inflamatòria generada per ROS (Li et al., 2012) o en el camp de les nanopartícules valorant la seva genotoxicitat (Asare et al., 2012), entre altres molts camps.

La utilització d'aquest model de ratolins en estudis amb carcinògens ha confirmat l'alta sensibilitat d'aquestes soques als compostos oxidants; mostrant per exemple un increment dels nivells de 8-OH-dG en els ronyons de ratolins tractats crònicament amb KBrO₃, mostrant-se 70 vegades superiors als ratolins salvatges i amb un posterior increment associat de mutacions tipus transversions GC-TA (Arai et al., 2002), tot i sorprenentment no associant-se aquest fet a l'aparició de tumors (Arai et al., 2006). Per altra banda, també ha mostrat una sensibilitat d'aquests als efectes de la radiació UV-B promovent l'aparició de tumors de pell (Yogianti et al., 2012).

Respecte a les línies cel·lulars aïllades a partir d'embrions de ratolins *Ogg1*^{-/-}, aquestes han estat principalment de tipus fibroblàstic, i s'han utilitzat en diversos estudis com els encaminats a identificar l'especificitat de *Ogg1* en reparar falsos aparellaments produïts per la 8-OH-dG (Dantzer et al., 2003), els que estudien la seva implicació en la reparació durant la transcripció gènica (Le Page et al., 2000), i els que estudien la unió de proteïnes a *Ogg1* durant la reparació (Noren Hooten et al., 2011). Diversos camps han utilitzat aquestes línies cel·lulars incloent els estudis de genotoxicitat de diferents agents com són els nanomaterials (Annangi et al., 2015).

Pel que fa als estudis amb arsènic tan sols un estudi ha utilitzat el model de ratolí *Ogg1*^{-/-} explorant la seva capacitat carcinogènica a través del mecanisme de generació de dany oxidatiu (Kinoshita et al., 2007). En aquest estudi ratolins *knockout* per *Ogg1* foren tractats crònicament a través la ingesta d'aigua que contenia el metabòlit DMA^V durant 72 setmanes, mostrant nivells de 8-OH-dG sis vegades superiors als observats en els controls, i associant-se amb l'aparició de tumors pulmonars. Aquesta via ha estat explotada pel nostre grup utilitzant línies de fibroblasts de ratolí (MEF) per determinar la generació de dany oxidatiu en exposicions cròniques i la possible capacitat carcinògena a través d'aquest mecanisme. Així, línies cel·lulars MEF *Ogg1*^{-/-} crònicament exposades durant 20 setmanes a diferents concentracions sub-tòxiques d'arsenit sòdic han mostrat un increment en els nivells de dany oxidatiu (Bach et al., 2014). Aquest increment s'ha mostrat acompanyant d'una precoç adquisició d'un fenotip tumoral (sense publicar).

1.7.2. Polimorfisme OGG1 *Ser326Cys* en humans

En el cas de l'espècie humana no existeixen individus *knockout* per a la ruta BER, sinó que aquests presenten variants en diferents gens de la ruta BER algunes de les quals s'han associat amb increments en la incidència de diversos càncers (Wallace et al., 2013). En aquest context el gen *Ogg1* no és una excepció i també registra diferents polimorfismes alguns dels quals comprometen la seva activitat, disminuint o anul·lant la seva capacitat reparadora (Audebert et al., 2000), i associant-se amb l'increment de la incidència en càncer (Wallace et al., 2013).

Un dels polimorfismes del gen *Ogg1* més estudiats és el denominat *Ser326Cys*. Aquest polimorfisme de simple substitució de nucleòtid fou citat per primer cop en la població japonesa, un 47,6% de la qual era heterozigota per aquesta variant (Dherin et al., 1999). Més tard s'ha vist que les freqüències al·lèliques varien entre un 40-60% en les poblacions asiàtiques i un 23-41% en les poblacions caucàsiques (Hung et al., 2005). Aquesta mutació puntual s'origina a la posició 1245 de l'exó 7 del gen, resultant en una substitució d'una serina per una cisteïna en la posició 326 en la seqüència proteica. La substitució d'un aminoàcid que conté en el seu grup radical un hidroxil (-OH) per un que conté un grup tiol (-SH), compromet l'activitat reparadora de l'enzim disminuint la seva K_M i la seva afinitat per unir-se al dany específicament, mostrant com a resultat una disminució en la capacitat d'excisió de la lesió 8-OH-dG del DNA de 2 a 6 cops inferiors comparada amb l'exhibida per la variant salvatge (Hill i Evans, 2006). La importància de l'activitat desenvolupada per l'enzim explica que la presència de l'al·lel mutant s'hagi trobat associada a diversos càncers com els de pulmó, esòfag, pàncrees i còlon (Wei et al., 2011).

Existeixen estudis avaluant les associacions existents entre incidència de càncer i individus portadors del polimorfisme *Ser326Cys* en poblacions crònicament exposades arsènic. Encara que no s'han pogut demostrar associacions significatives, sí que s'han trobat augments en els nivells de 8-OH-dG en els individus portadors de la mutació (Fujihara et al., 2011), el que els fa candidats

a patir càncer en un futur. La poca literatura referent a les implicacions d'aquest polimorfisme en el càncer generat per l'arsènic obliga a realitzar més estudis emmarcats en aquest camp per tal de reforçant la teoria de la implicació directa del dany oxidatiu com a mecanisme d'acció en la generació de tumors.

1.8. El càncer com a conseqüència de l'exposició a l'arsènic

El càncer és una malaltia d'origen multifactorial que comporta una desregulació en l'àmbit de la integritat, organització i homeòstasis dels teixits diferenciats adults provocant la desregulació del creixement a nivell cel·lular que, en el pitjor dels casos, comporta la mort del pacient. S'han descrit més de 200 tipus diferents de càncer que afecten diferents òrgans i teixits, essent milions les persones que es troben afectades per algun tipus de càncer (Siegel et al., 2013). Tant l'elevada incidència com la seva transcendència fa que siguin molts els grups que es dediquen a conèixer els mecanismes involucrats en la iniciació, promoció i progressió del càncer per tal de trobar una possible cura (Haber et al., 2011). Una de les grans innovacions en aquest tipus d'estudis és l'ús de cultius cel·lulars, el qual ha permès estudiar múltiples mecanismes implicats en la transformació de cèl·lules tumorals aïllades de pacients. A més, aquestes línies cel·lulars permeten estudiar els efectes de potencials agents carcinògens en humans, estudiant el seu comportament en cultius *in vitro* a fi de trobar possibles teràpies. Com també en els escenaris *in vivo*, les cèl·lules transformades presenten *in vitro* unes propietats d'identitat úniques que les diferencien d'una cèl·lula no tumoral. Entre aquestes característiques destaquem: un increment en la proliferació cel·lular, l'evasió a la supressió del creixement, la tolerància a l'apoptosi, la formació de capil·lars sanguinis (angiogènesi) per tal de nodrir-se el tumor, i activació de programes d'invasió i metastasi. A més, cal afegir altres propietats com la re-programació del metabolisme cel·lular i l'evasió de la destrucció per part del sistema immune (Hanahan i Weinberg, 2011). Aquestes marques d'identitat úniques en les cèl·lules amb un fenotip tumoral poden ser identificades *in vitro* utilitzant bateries d'assaigs que inclourien diferents tècniques enfocades a la seva detecció (Breheny et al., 2011).

1.8.1. Tècniques de detecció del fenotip tumoral *in vitro*

En les següents seccions es descriuen les característiques principals d'aquelles tècniques de detecció del fenotip tumoral *in vitro* que s'han fet servir en el desenvolupament d'aquesta Tesi.

- *Soft-agar*

La capacitat de creixement independent d'ancoratge a un substrat en una matriu tridimensional és una de les característiques que s'englobarien dintre les propietats d'identitat presents en cèl·lules tumorals i que no presenten les cèl·lules amb un fenotip normal. Aquesta habilitat es pot presentar tant en cèl·lules derivades de tumors primaris com en cèl·lules transformades *in vitro* per l'acció de carcinògens (Cifone, 1982) i és atribuïda a l'activació d'oncogens en les fases

d'iniciació de la transformació cel·lular (Brunner et al., 2004). La tècnica descrita per Hamburger i Salmon (1977) fou anomenada assaig de tumorigenicitat clonogènica, o *soft-agar*, donat que les cèl·lules creixien en aquesta matriu. La seva essència radica en la valoració de la capacitat intrínseca mostrada per les cèl·lules en creixement i expansió formant colònies visibles un cop es troben sembrades en placa en una matriu d'agar tridimensional formada per dues capes d'agar. Aquestes capes presenten diferents concentracions d'agar i l'assaig suposa; la tripsinització de les cèl·lules crescudes *in vitro*, el seu filtratge per tal de ser aïllades, i la seva sembra en un número adequat en la capa superior. A continuació s'incuben a 37 °C i 5% CO₂ durant un període comprès entre 3-4 setmanes. Passat aquest temps les plaques es tenyeixen utilitzant colorants tal com el cristall de violeta 0,005%, o el INT (2-p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl-5-phenyltetrazoliumchloride) a la concentració del 1%. La tinció posarà de manifest la presència de colònies cel·lulars aïllades, les quals provenen d'un clon cel·lular primari que adquirí la capacitat de créixer de manera independent d'ancoratge al substrat i proliferà independentment, formant una colònia visible. Les plaques s'escanejen i el nombre de colònies formades es compta utilitzant un software de comptatge automàtic tals com el NICE[®] (Clarke et al., 2010) o el OPENCFU[®] (Geissmann, 2013).

- *Soft-agar indirecte*

A part de valorar la iniciació en la transformació cel·lular és també important valorar els efectes sobre la promoció en el creixement tumoral. Això és possible amb una petita modificació de la tècnica del *soft-agar* original enfocada a avaluar la capacitat exercida per cèl·lules que es trobarien presents en l'estroma circumdant d'un tumor en promoure el seu creixement i progressió. Actualment la idea que la composició cel·lular dels tumors és homogènia està quedant obsoleta, acceptant-se que la seva composició és heterogènia i composta per diferents tipus cel·lulars, essent un dels tipus els fibroblasts associats a tumor. Aquests es troben rodejant la massa tumoral en l'estroma del tumor, contribuint a diferents processos tals com en la promoció del seu creixement, la formació d'una xarxa capil·lar sanguínia per tal de nodrir-lo (angiogènesis), i inflamació i promoció de la metàstasi (Madar et al., 2013), a part d'intervenir en la reprogramació del metabolisme de les cèl·lules tumorals adjacents en la massa tumoral (Lisanti et al., 2013). Així, no és doncs sorprenent que aquestes cèl·lules s'hagin convertit en les futures dianes en la quimioteràpia (Madar et al., 2013).

El fet que els fibroblasts poden exercir un efecte en la promoció del creixement de línies cel·lulars tumorals en una matriu d'agar és conegut ja des de fa anys (Citron et al., 1986). La importància del paper dels fibroblasts dintre el microambient tumoral ha portat a dissenyar una tècnica capaç de valorar la promoció del creixement tumoral utilitzant com a base la ja desenvolupada tècnica del *soft-agar*. Es parteix de cultius cel·lulars amb una capacitat intrínseca de créixer de manera independent no ancorada a substrat i que mostren una resposta a la inducció

al creixement per sèrum. Per una altra banda es cultiven fibroblasts que han estat exposats de forma crònica a un agent del qual volem esbrinar les seves propietats carcinògenes. Aquestes cèl·lules se les manté sense sèrum durant 72 hores a fi de forçar l'excreció de factors de creixement i citoquines que solen estar contingudes en el sèrum en condicions normals per tal de garantir un nivell òptim de creixement en cultiu. Aquest medi sense sèrum es coneix com a medi condicionat. Les línies tumorals es tripsinitzen i es resuspenen en una mescla d'agar que conté el medi condicionat provinent dels fibroblasts i es sembren en la capa superior del sistema de doble capa del *soft-agar*. A partir d'aquí se segueix el protocol abans descrit. La característica d'aquest assaig és que no interessa tant el nombre de colònies sinó la mida de les colònies que es compara en l'obtinguda en un creixement sense medi condicionat. Així, la quantificació de la mida de les colònies ens permetrà revelar si un suposat carcinogen pot exercir efectes sobre l'estroma tumoral, a part de valorar la seva interacció específica amb un determinat tipus de teixit tumoral.

- Zimograma

A part de l'efecte en la promoció del creixement tumoral, la promoció de l'angiogènesi i la metàstasi són altres propietats intrínseques mostrades per les cèl·lules tumorals. En aquest camp les metal·loproteïnases de matriu (MMPs) juguen un paper molt important, ja que se solen trobar altament incrementades promovent tals efectes en les cèl·lules tumorals (Kessenbrock et al., 2010). Aquestes proteïnes pertanyen a una família d'endopeptidases dependents de zinc i comprenen actualment 23 tipus diferents, les quals es classifiquen segons bàsicament la seva preferència en degradar diferents components que es troben a la matriu extracel·lular. En condicions d'homeòstasis se solen trobar en formes preenzimàtiques no actives, inhibides pels seus inhibidors anomenats TIMPs. La seva activació a una forma activa enzimàtica respon a un mecanisme anomenat interruptor de cisteïna (Visse i Nagase, 2003). En les MMPs el residu de cisteïna (Cys73) es troba formant un enllaç amb una molècula de Zn^{2+} la desestabilització d'aquest enllaç a partir d'una molècula de H_2O promou la formació d'una forma enzimàtica intermediària que és subjecte posterior a un autotrencament per acció de proteases que confereixen la forma final activa (Springman et al., 1990). De les 23 descrites actualment, hi ha dues (MMP-2 i MMP-9) amb preferència per la gelatina i diferents formes del col·lagen, que es troben altament incrementades en cèl·lules transformades i, per aquesta raó, són les més comunament avaluades (Snoek-van Beurden i Von den Hoff, 2005). L'avaluació de la presència de MMPs es pot detectar mitjançant la denominada tècnica del zimograma amb diverses variants, entre les quals la variant dependent de substrat és la més utilitzada (Wilkesman i Kurz, 2012). En aquesta variant el medi condicionat de les cèl·lules es recol·lecta per tal de valorar la presència de MMPs. Es carrega en un gel de SDS amb poliacrilamida al 10-12% que conté gelatina i es corre mitjançant electroforesis en condicions no reductores durant 90 min. Durant l'electroforesi el SDS provocarà la formació de la forma intermediària de les pre-MMPs, mimetitzant el que passaria en la situació

in vivo, interactuant sobre l'enllaç format entre Cys73 i Zn²⁺ i migrant a través del gel segons el seu pes molecular. Un cop finalitzada l'electroforesi el gel és incubat amb una solució de renaturalització que permet la recuperació de l'activitat perduda durant l'electroforesi a través d'un bescanvi entre el SDS per Triton[®] X-100. Posteriorment el gel s'incuba amb una solució de revelat durant tota la nit permetent a les MMPs activades digerir *in situ* la gelatina continguda en el gel. Una contra-tinció utilitzant Coomassie[®] Blue amb posteriors rentats permetrà revelar la posició i quantitat de les MMPs en el gel. Els gels poden ser posteriorment escanejats i quantificats utilitzant softwares de quantificació arbitrària tals com ImageJ (Rasband i Ferreira, 2014).

- Valoració del potencial metastàtic

La presència d'alts nivells de determinades MMPs és important per valorar la metastasi, però no és un marcador exclusiu de tal procés. Per tant, és important tenir eines per identificar-lo i quantificar-lo com tret característic de fenotip tumoral. El fenomen de la metastasi té un interès molt rellevant, ja que es correspon amb els estadis finals del càncer i s'associa amb una alta taxa de mortalitat (Chaffer i Weinberg, 2011). La necessitat de desvetllar els mecanismes *in vivo* ha portat als científics a l'establiment de diferents tècniques per estudiar-la *in vitro* (Kramer et al., 2013).

Encara que són moltes tècniques que han estat proposades, la més utilitzada és l'assaig d'invasió utilitzant les cambres de Boyden (Falasca et al., 2011). Aquestes consten d'un *transwell* adaptat a un pouet, on el *transwell* correspon a la part superior de la cambra contenint una membrana semifluida amb un porus de mida definit essent normalment de 8 µm i en la part inferior de la cambra es troba un pouet aïllat del *transwell*. El principi bàsic de la tècnica es basa a mimetitzar *in vitro* el procés de metastasi a través de la construcció d'una barrera física en la base del *transwell* creant dos espais ben diferenciats per l'addició d'una matriu sintètica. La matriu sintètica està constituïda per un extracte del tumor de *Engelbreth-Holm-Swarm* provinent de ratolí que conté bàsicament tots els components que presenta una matriu extracel·lular anomenada comercialment com a Matrigel[®] (Benton et al., 2014). Les cèl·lules destinades a valorar la seva capacitat invasora se sembren tot just per sobre de la barrera física constituïda pel Matrigel[®] i, paral·lelament, es disposa a la part inferior de la cambra un quími-atraient que sol correspondre a medi condicionat provinent del cultiu de fibroblasts. Així, les cèl·lules que presentin o hagin adquirit una capacitat d'envair seran capaces de travessar la barrera física introduir-se en els porus del filtre migrant vers el quími-atraient.

La tècnica consta de múltiples processos i d'una preparació prèvia per al seu correcte desenvolupament. En primer lloc les cèl·lules a ser avaluades, siguin tumorals o sospitoses d'haver adquirit un fenotip tumoral a causa d'una exposició crònica a un possible carcinogen, se'ls hi priva de sèrum durant 24 h a fi d'estimular la seva migració. Paral·lelament es prepara

medi condicionat provinent de fibroblasts seguint de manera igual el protocol utilitzat en el *soft-agar* indirecte. El dia de l'assaig es prepara la matriu sintètica preparant una mix 1:2 (Matrigel®: medi cultiu cèl·lules a avaluar + 0,1% BSA) disposant-la a l'interior de la cambra en la part del *transwell* i deixant-la solidificar a 37 °C creant la barrera física que habilitarà dues zones diferenciades en la cambra de Boyden. Seguidament es col·loca a la part inferior de la cambra de Boyden el medi condicionat més 0,1% de BSA. Per altra banda, les cèl·lules a avaluar es tripsinitzen i recol·lecten a fi de preparar una suspensió cel·lular que contingui un número adequat (5×10^4 - 1×10^5) resuspeses en medi fresc específic pel creixement normal en cultiu sense sèrum però amb presència de 0,1% de BSA. Aquesta suspensió es disposa just a la barrera de Matrigel®. L'addició de BSA evita l'agregació cel·lular mantenint les cèl·lules individualitzades. Seguidament es deixa incubar a 37 °C i a 5% CO₂ durant diferents períodes de temps compresos entre 24 - 72 h. Passat aquest període de temps les cèl·lules que hagin pogut migrar i travessar digerint la barrera de Matrigel® romandran en la part inferior de la cambra de Boyden. Aquestes poden ser tenyides, marcades amb fluorocroms i observades en microscopi de fluorescència o ser tripsinitzades i comptades utilitzant un comptador cel·lular (Moutasim et al., 2011).

La utilització d'aquesta tècnica no tan sols permet valorar el guany en la capacitat invasora en una cèl·lula fenotípicament normal, sinó que també permet l'estudi de l'efecte de fàrmacs sobre cèl·lules tumorals o en les mateixes cèl·lules de l'estroma tumoral per detectar una possible disminució de la seva capacitat invasora (Bersini et al., 2014).

- **PCR a temps real i Western-blot**

La complementació en la valoració de canvis genètics intrínsecs esdevinguts en les cèl·lules al llarg de l'exposició a carcinògens esdevé també un fet prou important a tenir en compte com a marcador d'adquisició de fenotip tumoral, complementant la informació prèvia aportada per les anteriors tècniques.

Aquests canvis intrínsecs es refereixen per exemple en la valoració de l'expressió de gens tals com marcadors de cèl·lules mare o implicats en els processos de transició d'epiteli a mesènquima, ja que aquests se solen trobar desregulats en diversos tumors (Hanahan i Weinberg, 2011) i especialment en cèl·lules crònicament exposades arsènic (Tokar et al., 2011b). En aquests casos la valoració de la desregulació soferta s'avalua mitjançant una PCR a temps real (Real time RT-PCR), quantificant els nivells de mRNA presents (Freeman et al., 1999) o per Western-Blot (Erickson et al., 1982), valorant la quantitat de proteïna traduïda específica per cadascun dels gens.

1.9. Inducció de carcinogènesi *in vitro* per l'arsènic

Tot aquest seguit de tècniques englobades i dintre un marc de bateries d'assaig s'utilitzen actualment per a la detecció i l'estudi dels mecanismes implicats en la carcinogènesi *in vitro* a l'exposició a diferents agents ambientals, essent l'arsènic un exemple d'ells.

La possible implicació de l'arsènic en la carcinogènesi ja era motiu de sospita en el passat (Hutchinson, 1911), encara que no va ser fins als anys 80 quan l'Agència Internacional de Recerca en Càncer (IARC) va reunir suficients proves per classificar-lo en el grup I com a carcinogen en humans promovent l'aparició de càncers en pell, bufeta i pulmó (IARC, 1980), i com a possible en fetge, pròstata i ronyó (IARC, 2012). Aquest fet epidemiològic ha estimulat la recerca dels mecanismes pels quals l'arsènic podria generar l'aparició de tumors, proposant-se la utilització de models *in vitro* per resoldre tal qüestió.

En la determinació de la carcinogenicitat *in vitro* de l'arsènic han jugat un paper molt important els assaigs denominats de transformació cel·lular. Aquests es defineixen com tot assaig *in vitro* capaç de mesurar els canvis fenotípics en la conversió de cèl·lules de mamífer de fenotip normal a fenotip tumoral per l'acció de possibles carcinògens (Sakai et al., 2002). Aquests tenen com a finalitat valorar diferents característiques d'identitat presents en cèl·lules tumorals tals com la pèrdua d'inhibició per contacte, canvis en la morfologia cel·lular i el guany de la capacitat de créixer de manera independent ancorat a substrat (Combes, 2012). Un d'aquests assaigs altament utilitzat en la cerca de la potencial carcinogènesi exercida per determinats agents és el que utilitza la línia cel·lular aïllada de ratolí BALB/c3T3 i valora els efectes iniciadors o promotors d'un determinat agent basant-se en la formació de *foci* en cultiu per la inhibició del creixement per contacte (Mascolo et al., 2010). Diferents treballs han trobat una relació positiva en aquest assaig entre exposició a l'arsènic i inducció de carcinogènesi (Tsuchiya et al., 2005; Kim et al., 2012). Un altre assaig que té com a punt final l'avaluació del creixement per inhibició de contacte és el que utilitza la línia cel·lular murina aïllada C3H/10T1/2, amb la que diversos treballs han mostrat associacions positives en la capacitat de l'arsènic de provocar neoplàsies *in vitro* (Kowalski et al., 1996).

Una altra de les característiques pròpies d'una cèl·lula que exhibeixi un fenotip tumoral és la pèrdua de la seva morfologia característica i és en aquest tret en què es basa l'assaig de morfologia en línies cel·lulars embrionàries d'Hàmster Sirià (SHE) on es valora la morfologia adquirida de les colònies crescudes exposades a un suposat agent carcinogen (Notario i DiPaolo, 1998). Utilitzant aquesta tècnica s'han obtingut resultats positius mostrant a l'arsènic com a carcinogen *in vitro* (Takahashi et al., 2002). Igualment, l'exposició crònica a l'arsènic de la línia cel·lular murina JB6 Cl 41 mostrà increment en la formació de colònies en *soft-agar* (Dong, 2002). La rellevància d'aquestes tècniques és interessant en l'estudi del potencial carcinogen d'un agent, però es basen únicament en la comprovació individual de la presentació d'unes o altres propietats característiques de les cèl·lules amb fenotip tumoral i en unes condicions que sovint no

mimetitzen prou les condicions ambientals en què les poblacions es troben exposades pel que fa a dosi i temps d'exposició. És aquí quan en els últims 15 anys apareixen estudis *in vitro* que tracten de solucionar aquestes qüestions fent ús de bateries d'assaigs per valorar la transformació cel·lular adquirida *in vitro*, i fent tractaments crònics per simular el que succeeix en les poblacions humanes (Breheny et al., 2011).

Estudis pioners utilitzant la línia cel·lular TRL1215 de fetge de rata demostraren la conversió d'un fenotip normal a tumoral al cap de 18 setmanes d'exposició a dosis subtòxiques d'arsenit sòdic (Zhao et al., 1997). Seguint la mateixa filosofia de mimetitzar al màxim les condicions d'exposició (dosis baixes i tractaments prolongats), s'observà transformació en línies cel·lulars humanes de teixits diana o probables dianes per l'arsènic. Així, amb la línia cel·lular humana normal de pròstata RWPE-1 es va aconseguir una transformació cel·lular irreversible en les cèl·lules exposades crònicament a dosis sub-tòxiques d'arsenit al llarg de 29 setmanes (Achanzar et al., 2002), igual que es demostrà en la línia cel·lular humana de bufeta UROtsa on tant l'arsenit com el seu metabòlit intermediari MMA^{III} van generar un fenotip tumoral irreversible sota una exposició crònica (Sens et al., 2004; Wnek et al., 2010). Altres òrgans diana en la carcinogènesi produïda per l'arsènic són la pell i el pulmó. Així doncs, no resulta estrany que s'hagi utilitzat la línia cel·lular humana de pell HaCat amb exposicions cròniques a l'arsenit produint un fenotip tumoral, confirmat en l'aparició de tumors *in vivo* un cop injectades en ratolí (Chien et al., 2004). També la línia humana epitelial de pulmó h-TERT mostrà signes tumorals clars al cap de 28 setmanes d'exposició (Wen et al., 2008). Altres línies normals de pulmó també han estat emprades mostrant signes de transformació sota exposicions cròniques, com amb la línia epitelial humana bronquial BEAS-2B (Chang et al., 2010), línies cel·lulars pulmonars de rata (Li et al., 2011), fibroblasts humans de pulmó (Ling et al., 2012) o la línia epitelial humana Nuli-1 (Liu et al., 2014).

L'establiment de línies cel·lulars transformades per l'arsènic o el coneixement de l'adquisició de transformació d'aquestes permet la derivació de posteriors estudis per explorar els possibles mecanismes d'acció. Un exemple pot ser la desregulació en l'expressió gènica per tal d'esbrinar quins són aquests gens. Això s'ha vist tant en línies hepàtiques (Chen et al., 2001) com pulmonars (Clancy et al., 2012), uretrals (Somji et al., 2008) i de pell (Chien et al., 2009). La desregulació per arsènic en la metilació genètica mitjançant mecanismes epigenètics també ha estat objecte d'estudi tant utilitzant línies cel·lulars hepàtiques (Zhao et al., 1997) com en línies cel·lulars d'uretra (Wang et al., 2014) i de pròstata (Severson et al., 2013).

Un altre mecanisme d'acció en la carcinogènesi exercida per l'arsènic es basa en l'acumulació de dany oxidatiu en el DNA generat per les espècies reactives d'oxigen conseqüència de les exposicions cròniques a compostos d'arsènic, tant inorgànics (Kojima et al., 2009; Bach et al., 2014) com orgànics (Tokar et al., 2014). Cal remarcar que aquest dany oxidatiu també s'ha

detectat en el DNA mitocondrial de les cèl·lules tractades (Singh et al., 2011). Altres possibles mecanismes es basen en la desregulació de l'autofàgia que té com a funció el control i reciclatge dels orgànuls cel·lulars (Rosenfeldt i Ryan, 2011), com s'ha vist en estudis utilitzant línies pulmonars exposades a l'arsènic (Qi et al., 2014). Les cèl·lules mare poden convertir-se també en dianes de l'arsènic sobretot en exposicions cròniques exercides al llarg del desenvolupament embrionari, adquirint un fenotip tumoral i convertint-se en les anomenades cèl·lules mare tumorals, marcant en l'individu adult l'aparició de futurs càncers (Tokar et al., 2011b). És, doncs, lògic, que prengui importància la generació d'estudis que focalitzen tal valoració en la transformació fenotípica tumoral de les cèl·lules mare i els mecanismes derivats en la seva producció en cèl·lules mare aïllades de les línies cel·lulars RWPE-1 (Ngalame et al., 2014), HaCat (Jiang et al., 2013) i en la línia cel·lular de ronyó de rata RIMM-18 (Tokar et al., 2013).

Resumint, la utilització de models *in vitro* permet mimetitzar les condicions ambientals en les quals es troben exposades les poblacions humanes. La utilització de bateries de tècniques enfocades a revelar les característiques exclusives de les cèl·lules tumorals permet l'estudi dels diferents mecanismes d'acció implicats en la carcinogènesi exercida per l'arsènic. Així doncs, aquest és un model d'estudi amb un futur prometedor per millorar el nostre coneixement dels mecanismes implicats en el procés carcinogen.

1.10. Càncer en models animals exposats a l'arsènic

Malgrat la utilitat dels estudis de transformació cel·lular *in vitro* per valorar la potencialitat carcinògena de l'arsènic i els seus mecanismes d'acció, és obvi que la utilització de models *in vivo* és una eina molt útil alhora d'extrapolar en humans els resultats obtinguts, al mateix temps que es poden mimetitzar millor les condicions d'exposició humana. Malgrat això, els primers estudis en models de rosegadors van resultar molt decebedors donats els resultats negatius obtinguts (Huff et al., 2000) a causa de les diferents maneres de metabolitzar l'arsènic entre humans i rosegadors (Waalkes et al., 2007).

Donat que la principal via d'exposició a l'arsènic en humans és l'oral, a través de l'aigua de consum, és doncs lògic que aquesta hagi estat la via d'exposició utilitzada en animals d'experimentació. A causa de la dificultat en manifestar tumors en models murins estàndards exposats a arsènic, es creà la necessitat de buscar models alternatius. La utilització de la soca de ratolí A/J sensible a carcinògens pulmonars va demostrar l'aparició de múltiples tumors de pulmó (Cui et al., 2006). Resultats positius també s'han observat en una soca de ratolins deficient en la reparació del dany oxidatiu al DNA incrementant la freqüència de tumors pulmonars (Kinoshita et al., 2007). Per una altra banda, la utilització de ratolins heterozigots per p53 també incrementà la presència de sarcomes i limfomes (Salim et al., 2003).

A part de valorar la carcinogènesi directa exercida per l'arsènic, ja des d'un bon principi es va començar a veure que aquest actuava com un potent co-mutagen i co-carcinogen. Així, treballs inicials van demostrar que el triòxid d'arsènic promovia l'increment de càncer pulmonar en rates pre-exposades al carcinogen benzo(α)pirè, cosa que no succeïa en rates tractades únicament amb el compost inorgànic d'arsènic (Ishinishi et al., 1977). Aquesta activitat co-carcinògena s'ha demostrat per diversos compostos d'arsènic combinats amb diferents genotòxics/carcinògens. Exemples ho són els estudis amb DMA^V promovent la incidència de càncer de pulmó en ratolins iniciats amb el carcinogen 4NQO (Yamanaka et al., 1996), i promovent càncer de bufeta en rates preiniciades amb una varietat de cinc carcinògens diferents (Yamamoto et al., 1995). Aquests efectes co-mutagènics s'han estudiat per veure efectes en la incidència de càncer de pell en ratolins sense pèl prèviament exposats per via oral a arsenit sòdic i posteriorment tractats tòpicament en la pell amb 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetat (TPA), mostrant un increment en la freqüència de tumors de pell. Resultats similars van ser trobats amb altres agents com 9,10, dimetil-1,2-benzoentracè (DMBA) o òxid 4-nitroquinolina (4NQO), tant per l'acció d'arsenit sòdic (Motiwale et al., 2005) com DMA^V (Mizoi et al., 2005). En aquest punt, cal emfatitzar els estudis d'interacció de l'arsènic amb la llum ultraviolada en la producció de càncer de pell. Així, efectes sinèrgics han estat demostrats en diversos treballs (Rossman et al., 2002) mostrant una bona relació dosi-efecte (Burns et al., 2008).

Són molts els treballs que també han demostrat que l'arsènic és un carcinogen trans-placentari que, quan s'administra a mares gestants passa la placenta i afecta els fetus, que mostren una elevada incidència de tumors en el seu desenvolupament cap adults (Anderson et al., 2000). Amb aquest tipus de treballs s'ha demostrat que els tipus de tumors que apareixen en els individus exposats transplacentariament difereixen entre sexe, mostrant els mascles elevades presències de tumors adrenals i hepàtics mentre que les femelles els presenten en ovari i úter (Waalkes et al., 2004). En conjunció amb aquest tipus d'estudis, també s'han avaluat els efectes d'estrògens sintètics tals com el dietilstilbestrol (DES) o el tamoxifè en la promoció de l'aparició de tumors en la descendència de femelles de ratolí pre-exposades a l'arsènic. L'exposició a DES promogué un increment notable dels tumors urogenitals en aquestes femelles, proposant-se doncs un mecanisme co-carcinogen de l'arsènic juntament amb el DES en l'aparició post gestacional d'aquests determinats tumors (Waalkes et al., 2006).

Per simular més fidelment el que succeeix en poblacions humanes s'han dissenyat estudis amb exposicions ininterrompudes al llarg de tota la vida. Aquests estudis utilitzen ratolins ja exposats durant el període intrauterí, continuant aquesta exposició durant un any (Ahlborn et al., 2009) o dos (Tokar et al., 2011a). En aquests dos casos es trobaren increments significatius en la incidència de múltiples tumors localitzats en diferents teixits. De manera interessant, aquests estudis s'han fet també amb dosis baixes (50 μ g/L), similars a les admeses com a màximes en les

legislacions d'alguns països, observant-se increments en l'aparició de tumors bronquio-pulmonars (Waalkes et al., 2014).

Com a resum de l'anteriorment indicat, en l'actualitat existeix un cos suficientment robust de dades que demostren que l'arsènic actua com a carcinogen o co-carcinogen en animals, fent possible mitjançant la utilització d'aquests models *in vivo* la resolució de qüestions tècnicament impossibles en aplicar en estudis epidemiològics en humans.

1.11. Càncer en poblacions humanes exposades a l'arsènic

El potencial carcinogen dels compostos xenobiòtics, i en particular de l'arsènic, hem vist que es pot detectar mitjançant la utilització de línies cel·lulars o la utilització de models animals. Malgrat això, les dades positives en humans són l'única font fiable a l'hora de catalogar un agent com a carcinogen per humans. De fet aquesta es la manera de treballar de la IARC que tant sols classifica a un compost com a carcinogen en humans (grup 1) quan hi ha suficients dades epidemiològiques en poblacions exposades. De fet, aquesta agència considera a l'arsènic com a un contrastat carcinogen en humans, que promou l'aparició de càncers de pell, bufeta i pulmó i possiblement contribuint també a l'aparició d'altres càncers tals com els de fetge, ronyó i pròstata (IARC, 2012). De tots aquests tumors el càncer de pell és la forma més comuna de càncer relacionada amb la ingesta d'arsènic i el càncer de pulmó la més mortífera (Mead, 2005).

Les primeres evidències del possible paper carcinogen de l'arsènic en humans es remunten a exposicions en petits grups exposats a tractaments medicinals tòpics que utilitzaven arsènic (Hutchinson, 1911), o exposats laboralment a través de la utilització de pesticides (Grobe, 1977). Tot i l'interès generat per aquests estudis previs en l'àmbit laboral, aviat es va veure que les exposicions a través de l'aigua potable destinada al consum, eren les més perilloses, per la magnitud de les poblacions exposades.

Els mètodes per detectar la incidència de càncer són epidemiològics. Aquests estudis són complexos a causa de la quantitat de variables que poden jugar i que un estudi acurat ha de tenir en compta. Exemples clàssics de poblacions els trobem en països tals com Xina, Bangladesh, Índia, Argentina o Xile. En particular, en el cas de l'illa xinesa de Taiwan es tenen registres que daten del 1910 on quantitats massives d'individus han estat consumint aigua de pous contaminats amb dosis d'arsènic en aigua superiors als 100 µg/L i que, en alguns casos, arriben als 3500 µg/L (Chiou et al., 2001). En aquest escenari asiàtic s'han dut a terme diferents estudis a fi de buscar associacions entre exposició i adquisició de càncer, havent-se trobat increments significatius en la incidència de càncers tals com el de pell (Guo et al., 1997), pulmó (Chen et al., 2004), bufeta (Chen et al., 2010), fetge (Chen et al., 1985) i ronyó (Liao et al., 2009).

Un dels altres casos altament estudiats ha estat el cas de Bangladesh, on els nivells d'arsènic en aigua encara es presenta com un greu problema de salut i la contaminació es considera com un dels enverinaments massius més grans de la història de la humanitat on milions de persones han estat i es troben exposades a l'arsènic a través de l'aigua de beguda (WHO, 2011). El problema d'aquest enverinament massiu començà amb la instal·lació massiva de pous a principis dels anys 70 del segle passat a fi d'evitar el consum d'aigua provinent del Ganges per tal de prevenir la gran incidència de malalties gastrointestinals d'origen bacterià. Tot i solucionar aquest problema s'incrementà una silenciosa exposició d'arsènic a través de l'aigua de beguda al llarg dels anys al no estar aquests pous analitzats respecte a la presència d'arsènic. No fou fins al 1993 on aquest element surti a la llum desvelant un llarg període ocult on milions d'individus haurien estat perillosament exposats (Smith et al., 2000). D'aquestes exposicions massives cròniques en derivaren treballs on s'identificà un increment en la incidència de múltiples càncers i específicament de pulmó (Argos et al., 2014).

Una altra zona afectada en el globus terrestre per contaminació a través de l'aigua de beguda és la zona del nord d'Argentina i de Xile. Afortunadament aquesta és una zona bastant desèrtica amb poblacions petites, en comparació a les zones asiàtiques. Malgrat tot, el descobriment de minerals en la zona ha portat a moviments importants de poblacions d'altres zones generant ciutats importants com Antofagasta en Xile. En aquest cas, al ser una zona habitada recentment, es disposa d'informació rellevant respecte al període d'exposició i la mida de la població afectada calculant-se que entre 1958-1970 unes 250.000 persones residents en aquella zona foren exposades a dosis rondant els 800 µg/L d'arsènic en l'aigua de consum a causa de la desviació de rius i l'increment de l'activitat minera. No fou fins al 1970 quan el descobriment de la contaminació va generar mesures derivades a reduir els nivells d'arsènic en l'aigua destinada a consum (Fraser, 2012). Com en el cas de les regions asiàtiques també aquí s'han trobat increments de càncer en individus exposats, destacant-se els de bufeta (Bates et al., 2004; Ferreccio et al., 2013), pulmó (Steinmaus et al., 2010; Melak et al., 2014) i ronyó (Hopenhayn-Rich et al., 1998). En aquesta zona són interessants els estudis que mostren en adults l'aparició de tumors múltiples en els casos on s'havia donat exposició via uterina (Steinmaus et al., 2014).

Com es pot veure la utilització d'estudis epidemiològics suposa una poderosa eina per trobar possibles associacions entre exposicions cròniques a l'arsènic i el consegüent increment en la incidència de tumors en els grups exposats. Una extensa recopilació d'exemples d'estudis epidemiològics es pot trobar en la revisió de Mandal i Suzuki (2002). Malgrat que molts dels estudis epidemiològics s'han dedicat a trobar associacions amb càncer, cal dir que altres patologies també es troben afectades com diabetis i patologies vasculars (Faita et al., 2013).

2. OBJECTIUS

Del contingut de la Introducció es desprèn que l'arsènic és un evident carcinogen en humans. Així, l'Agència Internacional de Recerca sobre el Càncer (IARC) el classifica i cataloga en la categoria de Tipus 1 i l'involucra especialment en els càncers de pell, de bufeta i de pulmó, encara que també contribueix a la possible aparició d'altres càncers com els de fetge, de ronyó i de pròstata.

Malgrat la ben coneguda associació epidemiològica entre arsènic a l'ambient i risc de patir càncer, molts han estat els estudis dedicats a esbrinar les possibles bases mecanístiques d'aquesta associació. Aspectes tals com genotoxicitat, l'alteració del control de cicle cel·lular i de la proliferació cel·lular, i la interacció amb la maquinària de reparació del DNA han estat aproximacions clàssiques en l'estudi de possibles mecanismes d'acció. Altres aproximacions involucren als mecanismes epigenètics i a la possible concurrència del dany oxidatiu en el DNA a través de la contribució en l'estrès oxidatiu derivat de l'exposició a l'arsènic. És en aquest darrer mecanisme en el qual hem focalitzat l'interès principal d'aquesta Tesi.

Des d'un punt de vista metodològic, aquesta Tesi presenta dos trets característics. El primer és que, a diferència del que és normal en la majoria d'estudis on els efectes es demostren sota condicions d'altres dosis i temps d'exposició curts, nosaltres hem optat per mimetitzar situacions similars a les que afecten les poblacions humanes ambientalment exposades; és a dir, exposicions cròniques a concentracions subtòxiques.

Assumint la hipòtesi que l'arsènic produeix estrès oxidatiu que es tradueix en l'acumulació del dany oxidatiu en el DNA, cal recordar que aquestes lesions són reconegudes i reparades pel mecanisme d'escissió de bases (BER). Per tant, una segona característica del nostre estudi ha estat generar un model cel·lular deficient pel gen *Ogg1* com a gen clau en el mecanisme BER. D'aquesta manera, en eliminar la pressió selectiva els potencials efectes oxidatius de l'arsènic poden quedar de manifest, sobretot en comparar-los amb el que succeeix en un fons genètic normal.

De manera concreta, els **Objectius Específics** d'aquesta Tesi els podríem concretar en tres, cadascun d'ells associats als articles inclosos en la Tesi. És a dir:

Objectiu 1. Determinar si, sota unes condicions d'exposició crònica a un rang de concentracions subtòxiques, l'arsènic és capaç de produir dany oxidatiu.

Per cobrir aquest objectiu en l'**article 1** s'ha treballat amb les línies MEF *Ogg1*^{+/+} i *Ogg1*^{-/-} tractades durant 18 setmanes amb dosis subtòxiques. L'efecte oxidant s'ha determinat mitjançant l'augment dels nivells de bases oxidades 8-OH-dG en els seus genomes, trobant-se que en un fons

genètic en absència de reparació hi ha un increment seqüencial en els nivells de dany oxidatiu al DNA.

Objectiu 2. Determinar si l'exposició prolongada a l'arsènic és capaç de modificar la capacitat reparadora, no tant sòls enfront dels efectes genotòxics de l'arsènic sinó front altres agents genotòxics.

Per cobrir aquest objectiu, en l'**article 2** s'han valorat les cinètiques de reparació de les línies MEF *Ogg1*^{+/+} i *Ogg1*^{-/-} sotmeses crònicament a l'arsènic. Així, la resposta tant front l'arsènic com enfront del bromat potàssic i la llum ultraviolada s'han valorat per tractar de demostrar si la capacitat de reparar el dany induït es veu modulada per l'exposició perllongada a l'arsènic.

La finalitat d'aquest objectiu ha estat demostrar que en condicions d'exposicions ambientals la gent exposada és més sensible als riscos de qualsevol carcinogen ambiental el que confirmaria l'assumida potencialitat co-carcinògena de l'arsènic.

Objectiu 3. Determinar si la presència d'aquest dany oxidatiu juga un paper específic en la carcinogènesi associada a aquest tipus d'exposició.

Per cobrir aquest objectiu, en l'**article 3 (Annex)** s'ha estès el temps d'exposició fins a les 40 setmanes i s'han hagut de posar a punt tot un seguit de metodologies indicatives del fenotip tumoral. D'especial rellevància han estat les tècniques per determinar la secreció de metal·loproteases i les de determinar la capacitat de creixement sense necessitat de substrat.

La finalitat d'aquest objectiu ha estat trobar associacions entre processos de desdiferenciació cel·lular al llarg del temps i nivells de dany oxidatiu per tractar de vincular aquest dos tipus de processos moleculars.

3. ARTICLES

Seguidament es presenten els articles generats en el desenvolupament d'aquesta Tesi, elaborada en el format de compendi d'articles, i que pretenen donar resposta als tres objectius anteriorment plantejats. Cadascun d'ells reflecteix el disseny experimental i les metodologies necessàries per arribar a contestar els objectius formulats, arribant als resultats i les conclusions pertinents.

Així, la Tesi consta d'un cos principal format per dos articles, que són els que es troben ja publicats, i d'un tercer que en aquests moments es troba ja acceptat.

3.1.Article 1

Ogg1 genetic background determines the genotoxic potential of environmentally relevant arsenic exposures.

Archives of Toxicology, 88: 585–596 (2014)

Index d'impacte: 5.98

doi: 10.1007/s00204-013-1151-0

Resum article 1

Aquest primer article pretén donar resposta a l'objectiu 1 de la Tesi, el qual planteja la necessitat de determinar la capacitat d'aparició de dany oxidatiu en el DNA com a conseqüència d'una exposició a l'arsènic sota unes condicions prolongades en el temps, i a unes concentracions d'arsènic no tòxiques; essent aquest el marc d'exposició ambiental en el qual es troben la majoria de poblacions humanes exposades a l'arsènic.

Cal remarcar l'interès del protocol experiment emprant, donat que la majoria d'estudis publicats s'enfoquen en valorar l'aparició i generació de dany oxidatiu en el DNA emprant concentracions d'arsènic tòxiques i temps d'exposició curts. Per tant, hi havia una incertesa respecte a la resposta en un marc d'exposició com el proposat en aquest estudi.

A fi d'indagar en aquest buit, es preparà un disseny experimental que contemplava una exposició *in vitro* a l'arsenit sòdic emprant un model cel·lular de fibroblasts embrionaris de ratolí constituït per dues línies amb un mateix fons genètic (soques isogèniques), una d'elles amb activitat normal pel gen *Ogg1*, mentre que l'altra és deficient per aquest gen (*knockout*). El present estudi és clau en els objectius de la Tesi, ja que assenta les bases del disseny experimental pel que fa a les condicions d'exposició crònica que contemplaran seguidament els articles posteriors; valorant-se aspectes tals com l'elecció del rang de dosis subtòxiques idònies i la mateixa caracterització de les línies cel·lulars, assegurant la seva veritable inactivació en l'expressió del gen *Ogg1* i la seva capacitat inherent en metabolitzar l'arsènic, aspecte valorat indirectament a través de l'expressió de l'enzim clau en el seu metabolisme, l'As3mt.

Així, ambdues línies cel·lulars foren exposades crònicament al voltant de 17 setmanes a les dosis seleccionades d'arsenit sòdic 0,5, 1 i 2 μM , i els nivells de dany genotòxic i oxidatiu en el DNA de les línies cel·lulars exposades foren avaluats emprant la tècnica de l'assaig del cometa en la seva versió alcalina. De manera resumida, els resultats indiquen que les línies cel·lulars MEF *Ogg1*^{-/-} exhibiren més sensibilitat als efectes tòxics, genotòxics i inducció de dany oxidatiu en comparació a la línia MEF *Ogg1*^{+/+}. Sota un marc d'exposició crònica *in vitro* a dosis subtòxiques, les línies cel·lulars MEF deficientes en *Ogg1* presentaren una acumulació significativa en els nivells de dany genotòxic i sobretot dany oxidatiu en les bases del seu DNA (8-OH-dG). La persistent acumulació de dany oxidatiu presenciada en les línies MEF *Ogg1*^{-/-} ens suggereix la importància de la integritat de la ruta BER per tal de fer front a la possible incorporació de mutacions degudes a la sobreacumulació de la presència de 8-OH-dG,

esdevenint-se com un potencial factor de risc en la carcinogènesi associada a l'esmentada acumulació, que és producte de l'exposició a l'arsènic.

L'estudi exhibit en aquest present article es converteix en una estratègia innovadora a seguir en el Grup de Mutagènesi del Departament de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona. Aquesta es presenta pionera respecte a l'ús d'un marc d'exposició *in vitro* que pretén emular les condicions reals ambientals on es troben generalment exposades les poblacions humanes. A més, la utilització de models cel·lulars *knockout* ens ha permès estudiar la possible implicació de diferents vies o mecanismes en l'aparició del càncer. D'aquesta manera hem pogut detectar la inducció de dany específic en les guanines del DNA (8-OH-dG) com un important efecte genotòxic associat amb exposicions cròniques a l'arsènic.

3.2. Article 2

Reduced cellular DNA repair capacity after environmentally relevant arsenic exposure. Influence of *Ogg1* deficiency.

Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 779: 144–151 (2015)

Índex d'impacte: 3.68

doi: 10.1016/j.mrfmmm.2015.07.004.

Resum article 2

Aquest segon article pretén donar resposta a l'objectiu 2 de la Tesi. Així, basant-nos en el disseny experimental previ, es van exposar les línies MEF *Ogg1*^{+/+} i MEF *Ogg1*^{-/-} al llarg de 18 setmanes. En aquest punt es van avaluar les cinètiques de reparació del dany genotòxic i oxidatiu en el DNA mitjançant l'assaig del cometa, enfront dels tractaments amb arsenit i altres agents genotòxics com el bromat potàssic i la llum ultraviolada.

Els resultats obtinguts mostraren que ambdues línies cel·lulars crònicament exposades a l'arsenit oferien dificultats alhora de reparar el dany generat pels tractaments, tant amb el mateix arsenit com amb el bromat potàssic i la llum ultraviolada, en comparació als seus respectius controls temporals. Aquests efectes van ser més pronunciats en la línia MEF *Ogg1*^{-/-}. Com a conseqüència d'aquesta ineficient reparació dels danys generats, les línies cel·lulars presentaren una sobreacumulació de dany no reparat al final del període d'avaluació. És de destacar que la línia MEF *Ogg1*^{-/-}, tot i tenir la ruta BER inactivada, és capaç de reparar part del dany oxidatiu induït. Es va suggerir que aquest fet podria ser degut a l'existència de gens redundants que puguin suplir la seva funció, com podria ser el cas del gen *Neil1*. Per comprovar la nostra hipòtesi es va procedir a comprovar l'expressió d'aquest gen en les línies MEF crònicament exposades al llarg de 18 setmanes, certificant la seva implicació com a substitut del gen *Ogg1* per mantenir la reparació del dany oxidatiu atribuït a una exposició crònica a l'arsenic. Així, mentre que la línia MEF *Ogg1*^{+/+} no presentà canvis apreciables en els nivells d'expressió de *Neil1*, la línia cel·lular MEF *Ogg1*^{-/-} mostrà una sobreexpressió significativa de *Neil1*. A fi d'explicar la presència d'una disminució del dany genotòxic i oxidatiu inicial es van proposar possibles fenòmens d'adaptació al dany, tals com la valoració de la tolerància a la toxicitat del mateix arsenit i dels altres agents assajats, i la probable implicació de la via *Nrf2-Keap1* com a resposta antioxidant en la disminució de ROS.

En referència a l'adaptació a la toxicitat exercida per l'arsenit i els diferents agents assajats, ambdues línies mostraren una disminució de les seves respectives IC₅₀. Pel que feia als gens associats a la ruta *Nrf2-Keap1* (*Nrf2*, *Keap1*, *Gstp1*, *Hmox1*, *Sod1* i *Sod2*) no mostraren canvis biològics significatius que poguessin explicar una resposta adaptativa enfront del dany conseqüent de l'exposició crònica (sols un d'ells, la *Hmox1*, presenta una sobre-regulació en la seva expressió en les línies cel·lulars crònicament exposades). No observant-se una resposta que pogués explicar aquest fenomen d'adaptació, es van buscar altres possibles mecanismes. El metabolisme de l'arsenic es presentà com una via lògica adoptada per la cèl·lula a fi d'eliminar en primera instància

l'arsènic absorbit, modificant-lo a través d'oxidacions i posteriors metilacions fent-lo més soluble i, consegüentment, més excretable. Per aquesta raó es valorà d'expressió de l'enzim clau en el metabolisme de l'arsènic, la As3mt. Els resultats obtinguts mostraren que ambdues línies presentaren una sobre-regulació en l'expressió d'As3mt essent molt més accentuada en les línies MEF *Ogg1*^{-/-}.

Resumint, aquest treball ha demostrat que una exposició prolongada en el temps a l'arsènic inorgànic afecta la capacitat dels mecanismes de reparació, reduint la seva eficàcia. A més, es va veure que la deficiència en el gen *Ogg1* incentiva aquest fenomen. Cal emfatitzar que la tolerància a la mortalitat junt amb la inducció de dany genotòxic i oxidatiu en el DNA poden contribuir als efectes carcinògens exercits per l'arsènic. De manera complementària, s'ha demostrat la importància del metabolisme de l'arsènic a l'hora d'explicar l'adaptació enfront dels efectes tòxics de les exposicions cròniques i, en particular, la implicació de l'As3mt.

3. 3. Article 3

Oxidative DNA damage enhances the carcinogenic potential of chronic arsenic exposure.

Archives of Toxicology, acceptat (2015)

Índex d'impacte: 5.98

Resum article 3

Com a conseqüència dels resultats que mostraven que les exposicions cròniques a l'arsènic produeixen dany oxidatiu al DNA al mateix temps que interfereixen amb diferents mecanismes de reparació del dany genètic, semblava adient demostrar si l'arsènic, sota aquestes condicions d'exposició, pot exercir el seu potencial carcinogen. A més, donat el bon model desenvolupat en la Tesi, calia demostrar el paper que juga el dany oxidatiu al DNA en la potencialitat carcinògena de l'arsènic.

Aquests objectius han constituït l'article 3 que permeten cobrir l'objectiu 3 de la Tesi. La nostra hipòtesi de partida era que si el dany oxidatiu està directament lligat en la carcinogènesi associada a l'arsènic, les línies cel·lulars MEF genotípicament deficientes en reparació BER i que es troben crònicament exposades a l'arsènic presentaran un fenotip tumoral abans en el temps que les línies MEF salvatges, que presenten la total integritat en el gen *Ogg1* dels seus genomes i, per tant, garanteixen de la funcionalitat del mecanisme de reparació BER.

Seguint les condicions d'exposició ja indicades, el temps d'aquesta es va prolongar fins a les 40 setmanes. La valoració en l'adquisició d'un fenotip tumoral *in vitro* a causa de la consegüent exposició fou valorada d'acord amb diferents criteris, tals com: l'activitat en la secreció de MMPs per la tècnica del zimograma, la capacitat de creixement de manera independent a substrat o la promoció del creixement tumoral a través del *soft-agar*, i la capacitat d'invasió cel·lular simulant una metàstasi *in vitro* mitjançant assaigs de valoració de la invasió a través de les cambres modificades de Boyden. Altres paràmetres complementaris foren emprats a fi d'atribuir, amb criteri, l'adquisició del fenotip tumoral. Aquests foren la valoració de la morfologia cel·lular analitzant l'aparició de la morfologia (*spindle-like*) tipificada en EMT, l'estatus en el creixement, la capacitat de duplicació (*doubling time*) en la mida poblacional i l'estat de diferenciació cel·lular mitjançant l'anàlisi dels nivells d'expressió de gens implicats en processos de EMT, identitat específica en teixit i regulació de l'estat de pluripotència cel·lular.

Conseqüentment amb la hipòtesi inicialment plantejada, les línies cel·lulars exposades MEF *Ogg1*^{-/-} presentaren signes evidents de transformació al voltant de la setmana 30. Aquest fet fou evidenciat per les suficients proves aportades: canvis en la morfologia, increment en la proliferació cel·lular, desregulació gènica en l'estatus de diferenciació cel·lular, increment en la secreció de MMPs, aparició de la capacitat de creixement independent d'ancoratge a substrat, promoció de les propietats de creixement i invasió tumoral.

Contràriament a la precocitat observada en les línies MEF *Ogg1*^{-/-}, les línies cel·lulars MEF *Ogg1*^{+/+} no presentaren un fenotip tumoral evident en aquest punt temporal. Es necessitaren 10 setmanes extres d'exposició per observar algun dels signes esmentats en la valoració de l'adquisició en el fenotip tumoral, i solament a la dosi més alta avaluada (2 µM). Sembla ser, doncs, que l'existència d'un fons genètic que altera el correcte funcionament del gen *Ogg1*, i la subsegüent aparició i acumulació de dany genètic (8-OH-dG), actuarien com a mecanisme d'acció en la carcinogènesi associada a l'arsènic.

En base el nostre coneixement aquest estudi es presenta com a pioner en trobar una connexió entre el dany oxidatiu i el càncer produït per l'exposició a l'arsènic.

L'article complet pot consultar-se a l'annex.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Al llarg de la història l'arsènic ha estat reconegut com un element tòxic essent responsable de milers de morts, algunes d'elles de personatges il·lustres, a causa del seu ús com a verí. Aquest fet li ha permès semblar temor al llarg dels segles, reconeixent el seu efecte tòxic letal com a únic efecte advers reconegut (Cullen, 2008a, b i c). A finals del segle XIX i principalment al llarg del segle XX, el seu paper tòxic esdevingué més secundari a causa del descobriment d'un nou paper: la carcinogènesi exercida en humans, el qual esdevingué una causa de major impacte en la societat comparat al que hagués causat en el passat per la seva condició tòxica letal. Les primeres evidències mostrades com a carcinogen ja foren detectades a finals del segle XIX (Hutchinson, 1911), però no fou fins a principis dels anys 70 del segle XX on l'arsènic es declarà com a carcinogen en humans, concretament promovent l'aparició de càncer de pell (IARC, 1980). La posterior realització d'estudis epidemiològics permeté trobar relacions en l'aparició d'altres càncers. Així, es documentà un augment de la incidència de càncers tals com el de bufeta i pulmó i la probable relació amb els de fetge, ronyó i pròstata (IARC, 2012), reforçant l'evidència del seu paper com a carcinogen en humans. Paral·lelament, la seva capacitat d'inducció tumoral ha estat també avaluada en estudis amb animals i en cultius cel·lulars, exhibint en aquests últims una clara evidència d'aquesta capacitat. Actualment es desconeix el mecanisme exacte que expliqui la carcinogènesi associada a l'arsènic, tot i que es contemplen diferents vies (no excloents) per explicar aquest fet. Exemples de tals mecanismes d'acció són: l'increment en la genotoxicitat, l'alteració dels patrons de metilació del DNA, l'alteració en la proliferació cel·lular, la cocarcinogènesi, la promoció tumoral, la interacció amb proteïnes tals com les implicades en vies de reparació del DNA i l'estrès oxidatiu (Hughes, 2002) fomentant, a la llarga, la presència i augment de la inestabilitat genòmica, la qual està totalment lligada amb l'increment en la incidència en el risc de patir càncer (Bhattacharjee et al., 2013).

Un d'aquests mecanismes d'acció proposats ha guanyat molt interès al llarg dels últims anys: la generació d'estrès oxidatiu (Kitchin i Conolly, 2010), documentant-se en una gran varietat d'estudis. Es creu que la principal via de generació d'aquest estrès, no essent l'única, és a través del metabolisme de l'arsènic, on es produeixen espècies reactives d'oxigen (ROS), les quals provoquen l'oxidació de les bases nitrogenades del DNA, promovent i augmentant el dany oxidatiu en el material genètic. La lesió més freqüentment englobada dintre aquest dany és la 8-OH-dG, formada senzillament per la interacció del radical $\bullet\text{OH}$ amb la guanina. Aquesta lesió és altament mutagènica i es troba representada en diferents tipus de càncers (van Loon et al., 2010) utilitzant-se com a biomarcador d'exposició sobretot en poblacions exposades arsènic (Hughes, 2006; De Vizcaya-Ruiz et al., 2009). La perillositat enfront de la generació de mutacions en el DNA per part de lesió 8-OH-dG obliga a la cèl·lula al desenvolupament d'un mecanisme específic

a fi d'eliminar tal lesió, responent al nom de reparació per escissió de bases (BER). Dintre el sistema de reparació BER, el reconeixement de la lesió es destaca com un pas molt important englobat dintre el mecanisme, mostrant-se com el primer i dirigint posteriorment el desencadenament correcte de la via. El reconeixement específic de la lesió 8-OH-dG es dona gràcies a l'acció de la N-glicosilasa OGG1, la qual remou aquesta base danyada promovent el correcte desenvolupament de la via prevenint la incorporació i fixació de futures mutacions. Mutacions en *OGG1* tals com l'altament documentada Ser326Cys produeixen una disminució de l'activitat de l'enzim, provocant una ineficiència en la reparació i, conseqüentment, un augment de la inestabilitat genòmica i el risc d'incidència de càncer. Existeixen un cert nombre d'estudis que mostren un increment de l'estrès oxidatiu i posteriorment de l'augment en el dany oxidatiu, però aquests malauradament no aconsegueixen ajustar-se a les condicions en les quals es troben realment exposades les poblacions humanes, crònicament a dosis subtòxiques. Tenint en compte aquests criteris, pocs estudis s'ajusten a les situacions reals.

Estudis pioners intentaren simular *in vitro* les condicions reals d'exposició presentades en poblacions humanes, utilitzant cèl·lules de possibles teixits diana de l'arsènic tals com la pròstata (Achanzar et al., 2002) o el fetge (Zhao et al., 1997). Aquests, però, no s'enfocaren en avaluar l'efecte del dany oxidatiu en la transformació associada a l'exposició a l'arsènic. Aquest va ser l'enfoc dels estudis duts a terme per Kojima et al., on trobaren un increment del dany oxidatiu en línies cel·lulars exposades crònicament a dosis subtòxiques d'arsènic, aconseguint presentar les línies exposades un fenotip tumoral. Aquest fenotip fou accelerat en les línies cel·lulars que presentaren capacitat metabolitzant de l'arsènic, fet que va permetre relacionar el metabolisme de l'arsènic com el principal inductor indirecte de tal adquisició tumoral (Kojima et al., 2009). Posteriorment, altres estudis utilitzant el mateix enfoc però utilitzant compostos intermediaris del metabolisme de l'arsènic han mostrat resultats similars (Tokar et al., 2014). La dificultat de demostrar la presència d'estrès oxidatiu i el posterior dany oxidatiu generat treballant en un rang subtòxic radica sobretot en l'ús de línies cel·lulars que presenten la capacitat intacta en la reparació del dany oxidatiu generat en el DNA. Enfront de condicions d'exposició a rangs de dosis d'arsènic subtòxics, les línies normals són capaces d'eliminar el dany oxidatiu generat, reparant eficientment les lesions induïdes, fent finalment gairebé invisible la presència de dany oxidatiu.

La generació de models cel·lulars deficients, concretament en la reparació BER, es presenta com una solució interessant a fi de solucionar aquest problema. La generació de ratolins *knockout* pel gen *Ogg1* i el posterior aïllament de cèl·lules provinents d'aquests animals va permetre l'establiment de línies cel·lular deficients en la reparació de les 8-OH-dG. Aquest és el cas dels fibroblasts embrionaris de ratolí (MEF) (Klungland et al., 1999; Minowa et al., 2000). Les mencionades línies cel·lulars es presenten com isogèniques. És a dir, són genèticament idèntiques amb l'excepció que en una se li ha eliminat el gen *Ogg1*, provocant la nul·litat en la seva

expressió. Aquesta característica les fa ser candidates ideals per a estudis on es vulgui valorar la implicació del dany oxidatiu en el procés l'adquisició d'un fenotip tumoral sota condicions d'exposicions cròniques *in vitro* a rangs subtòxics (Ondovcik et al., 2013; Annangi et al., 2015).

Sent conscients dels problemes que comporten l'exposició crònica a l'arsènic, ens vam plantejar la pregunta: *És la generació de dany oxidatiu en el DNA un dels principals mecanismes d'acció en la carcinogènesi exercida per l'arsènic?* Així, amb la finalitat de respondre aquesta pregunta es va plantejar el disseny experimental del primer article. Aquest es basa en la simulació *in vitro* d'una exposició a escala ambiental, la qual respon a les condicions on se solen trobar exposades les poblacions humanes: temps prolongats i concentracions d'arsènic que no confereixen sovint toxicitat immediata als individus exposats.

En el nostre cas el material seleccionat per dur a terme tal estudi va ser les línies cel·lulars MEF en la seva variant salvatge normal i la seva variant *Ogg1 knockout*. Aquestes línies s'exposaren crònicament a arsenit sòdic a diferents dosis corresponents al ventall subtòxic específic per cada línia cel·lular. Al llarg de l'exposició es mesurà i valorà la presència i acumulació de dany oxidatiu i, paral·lelament, la manifestació d'un fenotip tumoral adquirit a causa de l'exposició. D'acord amb la nostra principal hipòtesis, les línies cel·lulars exposades *Ogg1 knockout* haurien de presentar una acumulació precoç dels nivells de 8-OH-dG, acompanyada d'una transformació a fenotip tumoral abans en el temps que les línies salvatges.

En aquest estudi, aspectes com el coneixement del temps de duplicació de les línies cel·lulars, la selecció del rang de dosis adequat, la capacitat de metabolitzar l'arsènic inorgànic i la comprovació del genotip de les línies cel·lulars MEF, validant sobretot en la línia cel·lular *knockout* la nul·la expressió del gen *Ogg1*, van ser considerats. Un altre aspecte a tenir en compte va ser l'observació de la capacitat d'inducció de dany oxidatiu en les bases del DNA per part de l'arsènic en aquestes línies cel·lulars, posant èmfasi en la línia cel·lular *knockout*, reafirmant-les com models cel·lulars molt útils per a la realització de l'estudi plantejat (Bach et al., 2014). Respecte al primer punt, que fa referència al coneixement del temps de duplicació que presenten les MEFs, es trobà que era del voltant de 24 hores. Aquest coneixement permet establir el nombre de cèl·lules inicials a sembrar per a cada línia a fi d'exposar-les crònicament, establint els tractaments crònics en exposicions setmanals amb canvi de medi bisetmanal, partint d'una sembra inicial de $2 \cdot 10^5$ cèl·lules. Això garanteix un 80% de confluència al cap de 7 dies d'exposició. Aquest procés es repeteix setmanalment fins a l'assoliment de 50 setmanes.

Pel que fa al segon punt, referent a la selecció de les dosis a aplicar al llarg del tractament de llarga durada, aquest es presenta com un punt clau important en l'estudi. Cal assegurar que treballem en el rang de dosis d'arsènic desitjat i que no presenta efectes tòxics, ja que el fet de treballar en exposicions emprant dosis tòxiques no té cap sentit en termes de valoració del risc

d'incidència de càncer. Les dosis tòxiques generen nivells tan elevats de dany en el conjunt global de la cèl·lula que acaben promovent l'apoptosi cel·lular. La toxicitat de qualsevol compost és específica per cada línia cel·lular. Per tant, no podem extrapolar els valors coneguts de determinades línies cel·lulars obtinguts en estudis previs a fi d'utilitzar-los sobre les nostres línies MEF en el desenvolupament de l'estudi. Aquest fet ens obligà a realitzar els pertinents assaigs de viabilitat a 24 i 48 hores, observant diferents IC_{50} per cada línia cel·lular MEF. Les MEF *Ogg1*^{+/+} presenten una IC_{50} de $21,33 \pm 1,00 \mu\text{M}$ mentre que les MEF *Ogg1*^{-/-} exhibeixen una IC_{50} de $12,60 \pm 0,70 \mu\text{M}$ a les 24 hores (Bach et al., 2014). Els valors observats al cap de 48 hores es troben disminuïts i corresponen a $17,85 \pm 1,25 \mu\text{M}$ i $8,17 \pm 0,53 \mu\text{M}$ respectivament (Bach et al., 2014). Les diferències en els valors de IC_{50} exhibides per cada línia ens mostra que els valors de les MEF *Ogg1*^{-/-} són dos ordres de magnitud més sensibles que les MEF *Ogg1*^{+/+}, donant-nos una pista de la possible implicació de l'arsènic en la generació de ROS i la consegüent formació de lesions oxidatives en el DNA tals com la 8-OH-dG. El fet de tenir dues línies que presenten de base IC_{50} significativament diferents ens obliga a treballar en una finestra en la qual les dues línies presentin una viabilitat \geq al 90% per tal d'assegurar que treballem en condicions equivalents per ambdues línies al llarg del tractament crònic. D'acord amb les corbes de citotoxicitat obtingudes les dosis seleccionades d'arsenit sòdic varen ser de 0,5, 1 i 2 μM .

A causa del fet que el metabolisme de l'arsènic determina la seva toxicitat, genotoxicitat i carcinogènesi, es considerà totalment rellevant determinar la capacitat de metabolitzar l'arsènic inorgànic per part de les MEFs. En aquest procés metabòlic l'enzim clau esdevé l'As3mt. La comprovació de la seva presència és fàcil, ja que tan sols requereix fer una RT-PCR semiquantitativa per mostrar l'expressió d'aquest enzim que ens indica, indirectament, la capacitat intrínseca de metabolitzar l'arsènic per part de les MEFs. Cal assenyalar que la demostració en l'expressió de *As3mt* no és una prova conclouent, ja que es necessita observar la formació de les espècies intermediàries corresponents al metabolisme de l'arsènic com la prova evident de l'habilitat de metabolitzar l'arsènic inorgànic per part d'una determinada línia cel·lular. L'exposició durant 24 ó 48 hores a diferents concentracions d'arsenit sòdic (2,5 i 8 nM) dins el rang subtòxic a les MEFs ens va permetre detectar, mitjançant cromatografia d'alta resolució (HPLC), l'existència d'espècies intermediàries d'arsènic metilades tals com el MMA^{III}, MMA^V, DMA^{III} i DMA^V en ambdues línies a nivells similars, conclouent que aquestes línies són capaces de metabolitzar l'arsènic a una ràtio similar (Bach et al., 2014). Un altre aspecte ben rellevant a tenir en compte és la comprovació en l'estabilitat del fons genètic de les línies cel·lulars amb les quals basarem el nostre treball; assegurant-nos que mostren una total absència d'expressió de *Ogg1* en la línia cel·lular MEF *Ogg1*^{-/-}. Com en el cas anterior, la utilització de la RT-PCR semiquantitativa ens permet visualitzar el compliment d'aquestes característiques per part de les

MEF, observant la presència de mRNA del gen *Ogg1* en la línia salvatge i la seva absència total en la línia *knockout* (Bach et al., 2014).

La detecció del possible dany oxidatiu generat dintre un rang de dosis subtòxiques i tòxiques per l'arsenit sòdic utilitzant aquests models cel·lulars es presenta com a clau alhora de decidir finalment l'elecció d'aquests MEF com a línies model per portar a terme el projecte desitjat. Idealment, les línies salvatges haurien de mostrar nivells de dany oxidatiu elevats en rangs d'exposició pròxims als tòxics, mentre que les línies deficientes en la reparació BER, al presentar problemes alhora d'eliminar el dany oxidatiu, s'esperaria que la visualització del dany es produís a dosis més baixes, cobrint el límit subtòxic.

Per tal de demostrar realment que les línies MEF són les adequades per observar la inducció de dany oxidatiu, es plantejà un tractament agut a diferents dosis d'arsenit sòdic (0, 5, 10, 15 i 20 μM) emprant diferents temps d'incubació; 1,5, 3 i 24 hores. La detecció dels nivells de dany oxidatiu en el DNA es realitzà mitjançant l'ús de l'assaig del cometa. Els resultats indiquen que les dues línies cel·lulars presenten inducció de dany oxidatiu en el DNA, però a diferents rangs de dosis. Pel que fa referència a la línia cel·lular salvatge, aquest dany s'indueix únicament a la dosi de 20 μM , exhibint un increment significatiu del dany oxidatiu per a tots els temps de tractament. Per altra banda, en les línies cel·lulars *knockout*, aquest increment és manifesta en tots els rangs de dosis i a tots els temps d'exposició emprats. El fet que la línia cel·lular *knockout* presenti ja un increment del dany oxidatiu a la dosi més baixa (5 μM) es presenta com a un punt molt important a tenir present. Aquesta dosi es troba relativament pròxima a les dosis escollides per al tractament crònic (0,5, 1 i 2 μM) integrada dintre el rang subtòxic. Si en aquestes condicions de tractament agut observem presència de dany oxidatiu ja a dosis relativament subtòxiques, podríem pronosticar que la nostra línia cel·lular MEF *Ogg1*^{-/-} molt probablement presentarà un increment dels nivells de dany oxidatiu al llarg del tractament crònic. Tot i així, aquesta hipòtesi ha de ser confirmada, valorant els nivells de dany oxidatiu en exposicions cròniques. Sota aquestes condicions els resultats obtinguts van confirmar la nostra hipòtesi, ja que els nivells de dany oxidatiu es van manifestar molt precoçment en la línia *Ogg1 knockout*, la qual exhibia ja al cap de 4 setmanes de tractament un increment dels nivells de dany oxidatiu significativament diferents dels nivells presentats per les cèl·lules control. Aquests nivells es van mantenir clarament elevats i significativament diferents al llarg de tot el tractament analitzat. En canvi, la línia cel·lular salvatge mostrà nivells de dany similars als exhibits per les línies control no exposades arsenit sòdic fins al últim punt temporal crònic analitzat; la setmana 20. Encara que en aquest punt temporal a les dosis d'1 i 2 μM ja es van obtenir valors significativament diferents dels controls, aquests no van arribar als nivells mostrats per les línies *knockout*.

Fent referència als nivells de dany genotòxic global observat sota aquest escenari d'exposició crònica, les línies *knockout* també mostren nivells significativament superiors als exhibits per les

cèl·lules control al voltant de la setmana 20. De tots aquests resultats es conclou que, sota una exposició crònica d'arsenit a nivells ambientals *in vitro* emprant un model cel·lular sensible a la generació de dany oxidatiu, s'indueixen increments en els nivells de 8-OH-dG. A més, aquests nivells de dany oxidatiu s'acumulen al llarg del temps. La presència d'aquests nivells reforcen la idea que en les exposicions humanes l'arsènic és el responsable de la generació de dany oxidatiu en el DNA. Això està d'acord amb els múltiples estudis fets *in vitro* en condicions d'exposició agudes (Li et al., 2001; Sugden et al., 2004; Soto-Reyes et al., 2005; Wang et al., 2007; Alarifi et al., 2013; Orihuela et al., 2013) i també en aquells fets en condicions *in vitro* que simulen més realment els escenaris naturals ambientals d'exposició emprant dosis cròniques baixes (Kojima et al., 2009; Tokar et al., 2014).

Una de les hipòtesis que pren més força per explicar l'acumulació de dany en el DNA després d'una exposició amb arsènic es basa en la inhibició produïda en els sistemes de reparació associats a la reparació del dany generat en el DNA. Aquest fenomen ha estat al llarg del temps freqüentment documentat en diversos estudis, avaluant alguns la inhibició del sistema de reparació per excisió de nucleòtids (NER) tan *in vitro* (Hartwig et al., 1997; Danaee et al., 2004; Ding et al., 2008; Nollen et al., 2009; Ebert et al., 2011) com *in vivo* (Tran et al., 2002) o en poblacions humanes exposades (Andrew et al., 2006; Jasso-Pineda et al., 2012). Altres rutes de reparació com la BER (Li i Rossman 1989; Lynn et al., 1997; Ebert et al., 2011) i la ruta Fanconi/BRCA (Peremartí et al., 2014) també es mostren inhibides en escenaris d'exposició *in vitro*. La importància del correcte funcionament de les vies de reparació, les quals garanteixen una prevenció en l'acumulació de mutacions en el DNA, mantenint l'estabilitat genòmica, propulsà als científics a estudiar específicament el mecanisme o mecanismes concrets pel qual l'arsènic pot estar inhibint les diferents vies de reparació conegudes.

Una de les teories proposades es basa en la capacitat mostrada per l'arsènic inorgànic i orgànics trivalents a unir-se als grups tiol de les Cys contingudes en les seqüències proteïques (Shen et al., 2013) i, més concretament, en aquesta unió sobre els anomenats dits de zinc. Aquestes estructures de reconeixement contenen diferents configuracions de Cys-His que estan presents en moltes de les proteïnes que participen en les diferents vies de reparació del DNA anteriorment mencionades (Witkiewicz-Kucharczyk i Bal 2006; Piatek et al., 2008). Entre aquestes proteïnes cal assenyalar a la PARP-1, la qual ha estat altament estudiada en condicions d'exposició *in vitro* (Yager i Wiencke 1997; Ding et al., 2009; Qin et al., 2008, 2012), observant-se la inhibició de la seva activitat a dosis relativament baixes dintre el rang subtòxic (Qin et al., 2008; Ding et al., 2009). Com en casos anteriors, la majoria d'estudis realitzats en valorar aquesta inhibició s'han realitzat en períodes d'exposició temporals aguts, no existint cap estudi que hagi valorat els efectes exercits per part de l'arsènic sobre els mecanismes de reparació durant i al llarg d'una exposició crònica a dosis subtòxiques.

L'estudi previ *in vitro* ens proporciona una situació ideal per estudiar la naturalesa en l'increment d'aquesta genotoxicitat exercida per part de l'arsènic sota un marc d'exposició crònica a dosis subtòxiques. Per avaluar el possible efecte sobre els diferents mecanismes de reparació en el DNA s'han realitzat cinètiques de reparació, utilitzant la tècnica del comet en la seva versió alcalina, sobre les línies cel·lulars MEF exposades al llarg d'unes 20 setmanes, analitzant l'efecte en la reparació del dany induït per part de l'arsenit i per part de compostos que produeixen danys específics subjectes a la reparació BER i NER, tals com el KBrO₃ i la llum ultraviolada UVC. Les línies cel·lulars exposades crònicament a l'arsènic durant prop de 20 setmanes van ser tractades durant 4 hores a una dosi de 20 µM d'arsenit sòdic, 30 minuts a una dosi de 5 mM de KBrO₃ o 20 Joules de radiació UVC. Posteriorment van ser subjectes a la valoració de la seva capacitat de reparació al llarg de 12 hores (Bach et al., 2015).

Els resultats indiquen que ambdues línies no exposades necessiten al voltant de 12 hores per eliminar el dany genotòxic induït. En canvi, quan observem el comportament de les cèl·lules exposades crònicament observem que al cap de 12 hores presenten nivells de dany genotòxic superiors al mostrat pels controls, confirmant l'afectació de la reparació del dany genotòxic induït en el DNA per part de l'arsenit. Quan s'analitza el comportament de les dues línies quant a la seva capacitat de reparar el dany oxidatiu en el DNA, observem diferències. Així, la línia cel·lular salvatge no exposada necessita 2-4 hores per arribar a nivells basals de dany. Aquest fet no s'observa en les línies *Ogg1 knockout*, les quals reparen el dany al cap de 12 hores. El fet que aconseguixin reparar tot i ser deficientes per *Ogg1* es deu probablement a l'acció d'altres enzims amb activitats similars com el *Neil* (Hailer et al., 2005), tal com discutirem més endavant. Quan analitzem el comportament mostrat per les línies cel·lulars pre-exposades crònicament a l'arsenit, observem que en el cas de les línies salvatges al cap de 12 hores es presenten nivells de dany significativament superiors als presentats pels controls, fet que també és igualment observat en el cas de les línies *Ogg1 knockout*, tot i que els perfils de cinètica de reparació són diferents. En el cas de les línies cel·lulars salvatges, al cap de 2-4 hores els nivells de dany oxidatiu exhibits corresponen al 40% del nivell residual i aquests es mantenen similars fins al voltant de les 12 hores. Pel que fa les línies *Ogg1 knockout*, entre les 2-4 hores després de l'exposició mostren nivells de dany oxidatiu residual en el DNA entre el 60 i el 90%, mantenint-se elevats fins al cap de 12 hores, on es presenten encara significativament superiors als mostrats pel control amb valors que varien del 30 al 60% de dany residual. Aquests resultats ens mostren una afectació en els mecanismes de reparació associats a la reparació del dany oxidatiu en el DNA al mateix temps que apunten la importància de la integritat en la reparació de la ruta BER, com es veu en els majors efectes observats en la línia *Ogg1 knockout*, la qual ja de per si presenta una inicial capacitat de reparació del dany oxidatiu en el DNA reduïda.

El posterior anàlisi del comportament exhibit per les cèl·lules exposades a l'arsenit a la dosi de 2 µM en la valoració de l'afectació més específica de les rutes de reparació BER i NER es mostra igualment una certa inhibició general tant en inhibició de la ruta BER, on les cèl·lules exposades crònicament reparen deficientment el dany causat pel KBrO₃, un clar agent oxidant del DNA. En aquesta exposició observem que les línies control salvatges són capaces d'assolir nivells basals de dany oxidatiu residual al cap de 2 hores, mentre que les línies *Ogg1 knockout* necessiten més temps, assolint aquests nivells al cap de 4 hores. Quan analitzem els nivells de dany residuals mostrats en les cèl·lules exposades crònicament a la dosi de 2 µM d'arsenit, aquests es mostren sempre valors de dany residual, significativament superior, sent prop del 30% en el cas de les línies salvatges, i del 40% en el cas de les línies *knockout*, mantenint-se en aquests nivells fins al final del període de 12 hores. D'acord amb aquests resultats, podem afirmar que l'arsenit està exercint un paper inhibitor en la ruta de reparació BER. Aquest paper pren força en la línia cel·lular *Ogg1 knockout* crònicament exposada a l'arsènic, on s'observen greus problemes alhora de reparar el dany oxidatiu generat en el DNA.

En els estudis enfocats a valorar els efectes sobre el sistema de reparació NER, no s'observa una inducció de dany oxidatiu després d'una exposició a 20 Joules de radiació UVC com, d'altra banda, era d'esperar. Malgrat això, es va observar que les línies MEF exposades crònicament a l'arsenit presentaren cinètiques de reparació diferents de les exhibides pels controls. Els nivells de dany eren superiors, i la seva reparació més lenta. Els comportaments exhibits per ambdues línies foren similars, no presentant diferències entre elles. Aquest fet no és sorprenent, ja la inhibició de la reparació del dany genotòxic produït per la radiació UVC ja ha estat documentat prèviament (Hartwig et al., 1997), i es considera que és una de les raons per les quals l'arsènic actua com a co-carcinogen. De fet, s'ha trobat augment del càncer de pell en les poblacions exposades a l'arsènic i a la llum ultraviolada (Rossman et al., 2004).

Les cinètiques de reparació del dany oxidatiu en el DNA indiquen que, de manera més o menys eficient, ambdues línies posseeixen la capacitat de reparar el dany oxidatiu induït en el DNA. La principal curiositat sorgeix sobre les línies MEF *Ogg1^{-/-}*, les quals presenten absència total d'expressió del gen *Ogg1*, clau en l'eliminació de les bases oxidades 8-OH-dG. La resposta a aquest fet es basa en els mecanismes redundants desenvolupats per les cèl·lules al llarg de l'evolució amb la finalitat de suplir la carència d'una resposta específica. Així, en el cas del sistema de reparació BER existeixen diferents N-glycosilases, una de les quals, la *NEIL-1*, mostra certa especificitat en el reconeixement de les lesions 8-OH-dG, podent participar en la seva eliminació (Hailer et al., 2005). Al analitzar els nivells d'expressió de *Neil1* en ambdues línies MEF exposades crònicament vam observar una clara sobreexpressió en la línia MEF *Ogg1^{-/-}*. Així, l'expressió basal de la línia *knockout* per *Ogg1* mostrà al voltant de 3 vegades més expressió que la línia salvatge, essent aquests efectes clarament significatius ($P < 0,05$), mentre que la línia

knockout crònicament exposada a 0,5, 1 i 2 μM presentaren inclús nivells superiors, demostrant una total sobre-regulació en la seva expressió gènica, amb valors de clarament significatius en la dosi més alta ($P < 0,001$). Tenint en compte que alguns autors han documentat canvis en l'expressió del gen *Ogg1* al llarg d'exposicions amb arsènic (Mo et al., 2006; Hirano, 2008), vàrem tractar de demostrar aquest fet però els resultats no revelaren l'existència de cap diferència significativa entre els nivells d'expressió exhibits per les línies control no exposades comparades amb les línies exposades crònicament al llarg de 18 setmanes. Això podria implicar l'existència de mecanismes d'adaptació desenvolupats per part de les cèl·lules que es troben en constant pressió en un ambient tòxic hostil generat per part d'una constant presència d'arsènic.

Aquests mecanismes tenen com a principal funció disminuir l'increment en la toxicitat de la cèl·lula prevenint la inducció en l'apoptosi. Explorant si existeix una possible adaptació sota unes condicions d'exposició crònica en les línies cel·lulars MEF al llarg de 18 setmanes, observem efectes adaptatius al analitzar les IC_{50} , ja que les línies MEF salvatges presentaren valors de $27,31 \pm 1,36 \mu\text{M}$ en els controls i de $53,98 \pm 3,90 \mu\text{M}$ ($P < 0,001$) per les línies salvatges exposades crònicament a 2 μM d'arsenit sòdic, suposant un increment del voltant de dues vegades al valor presentat pel control. De manera similar, les línies MEF *Ogg1*^{-/-} es mostraren més sensibles, exhibint IC_{50} amb valors de $9,28 \pm 0,75 \mu\text{M}$ i $21,17 \pm 1,24 \mu\text{M}$ ($P < 0,001$) per a controls i exposats crònicament, exhibint un increment igualment un increment de la resistència a la toxicitat al voltant de dues vegades comparada amb el control. El fenomen de l'adaptació observat pot ser no exclusiu de les exposicions front l'arsènic, ja que altres compostos de naturalesa oxidant com el KBrO_3 i el H_2O_2 , inductors de la reparació BER, i la radiació UVC subjecta al mecanisme de reparació NER també ho podrien ser. En base aquesta hipòtesi, vàrem analitzar les IC_{50} dels agents mencionats sobre les dues línies crònicament exposades a 2 μM d'arsenit, observant comportaments diferents per les dues línies. Les línies MEF salvatges no mostraren cap indicatiu d'adaptació a cap dels compostos analitzats, mentre que les línies MEF *Ogg1*^{-/-} mostraren un increment en la resistència de tots els compostos assajats. Així, una possible explicació dels resultats observats podria fomentar-se en la sensibilitat de base que presenten les línies deficientes en el gen *Ogg1*, motiu suficient que les obliga a adoptar estratègies adaptatives per prevenir els efectes tòxics derivats per tals compostos oxidants. D'aquesta manera els mecanismes d'adaptació adoptats per les cèl·lules que es troben en constant pressió per la presència d'arsènic inclourien l'activació de barreres preventives i de mecanismes antioxidants.

Es coneix que en la resposta al dany oxidatiu la ruta *Nrf2-keap1* és de cabdal importància (Sun et al., 2011). Amb la finalitat de comprovar possibles inter-relacions entre adquisició de resistència a la toxicitat i aquesta via, valorarem l'expressió gènica de diferents grups de gens com: transportadors cel·lulars (*Glut* i *Pgp*), enzims antioxidants (*Gstp1*, *Sod2* i *Sod1*), la *Hol* i el factor de transcripció *Nrf2* i el seu regulador *Keap1* de la via *Nrf2-Keap1*. Tret de la *Hol*, la qual

revelà un clar patró d'increment en la seva expressió en les cèl·lules exposades crònicament a l'arsènic, fet visualitzat prèviament en diversos estudis *in vitro* (Kojima et al., 2009; Liu et al., 2006; Pi et al., 2008), la resta de gens analitzats no mostraren un clar patró d'increment que pogués explicar l'adopció d'aquesta maquinària per combatre els efectes tòxics derivats de l'exposició crònica al llarg de 18 setmanes en la resistència aquesta toxicitat.

Enfront d'aquests resultats negatius, vàrem proposar un possible paper del metabolisme de l'arsènic en aquesta resposta adaptativa. Així, la conversió de substàncies insolubles a més solubles a través de l'addició de grups polars s'erigeix com un principal lògic mecanisme a ser emprat per les cèl·lules reduint la seva toxicitat per l'increment en la seva facilitat d'eliminació de l'organisme. El metabolisme de l'arsènic segueix aquesta estratègia, metilant l'arsènic inorgànic i formant espècies intermediàries metilades d'arsènic, les quals són més solubles excretades finalment en l'orina de l'organisme. Aquesta observació ha fet pensar ja des del principi que el metabolisme de l'arsènic és la principal estratègia de destoxificació adoptada per la cèl·lula per combatre la toxicitat exercida per una exposició a arsènic (Vahter et al., 1988). Per això vàrem avaluar el paper del principal gen implicat en el metabolisme de l'arsènic, l'*As3mt*. Els resultats obtinguts revelaren una inducció en els nivells d'expressió de l'*As3mt* en les cèl·lules MEF exposades. Tot i mostrar un patró de sobre expressió en les dues línies, aquests foren significatius solament en el cas de les MEF *Ogg1^{-/-}* exposades. Aquest fet corrobora l'adquisició d'una acceleració en la biotransformació de l'arsènic per part de les línies deficientes, per excretar l'arsènic més ràpidament. Aquesta estratègia al llarg del temps no semblaria però ser positiva, promovent en aquestes línies exposades crònicament a l'arsènic l'acumulació de dany oxidatiu en el DNA induït pel ROS generats durant el metabolisme. És interessant destacar que fins ara cap autor hauria demostrat la sobre expressió de l'enzim *As3mt* en condicions d'exposició crònica *in vitro*.

A manera de resum, podem dir que una exposició crònica a dosis subtòxiques d'arsenit afecta els mecanismes de reparació BER i NER, inhibint-los en les cèl·lules crònicament exposades al llarg de 18 setmanes. Cal destacar que la inhibició en la ruta BER es presenta com un principal mecanisme genotòxic que promouria l'increment del dany oxidatiu en el DNA de les línies crònicament exposades. Aquest fet es veuria accelerat en les línies MEF *Ogg1^{-/-}*, les quals, a pesar de poder reparar en part el dany oxidatiu generat mitjançant la utilització de la N-glycosilasa *Neil1*, són més sensibles i promptes a l'acumulació d'aquest dany, abocant-les, al llarg del temps a un suposat increment de la inestabilitat genòmica. A més, la sobre expressió observada de l'*As3mt* suggereix l'acceleració en el metabolisme de l'arsènic com a hipotètic mecanisme utilitzat per la cèl·lula per enfrontar-se als efectes tòxics de l'arsènic, essent malauradament, però, un inductor posterior de la formació de ROS. Aquest fet podria lligar-se amb una acceleració en

la transformació cel·lular, adquirint aquesta línia deficient un fenotip tumoral abans que la línia salvatge sota aquest marc d'exposició crònica a l'arsenit sòdic.

Aquestes conclusions són les que ens van portar a plantejar-nos les preguntes de: *Està l'arsenit induint l'adquisició d'un fenotip tumoral a les línies MEF exposades sota aquest marc d'exposició crònica? La presentació d'aquest fenotip tumoral es veuria accelerada en les línies MEF *Ogg1*^{-/-} crònicament exposades?* La resposta a aquestes preguntes constitueix l'objectiu del tercer article d'aquesta Tesi.

La resposta afirmativa a les dues preguntes plantejades ens portaria a trobar un vincle entre el dany oxidatiu i la carcinogènesi exercida per l'arsènic, reafirmant-lo com uns dels seus principals mecanismes d'acció tumoral i considerant-lo, a part, com un mecanisme molt important a tenir en compte en individus de poblacions exposades portadors de polimorfismes en gens de reparació com *Ogg1*. La carcinogènesi exercida per l'arsènic ha estat altament documentada en diversos estudis *in vitro* i *in vivo*, però cap d'aquests estudis ha aconseguit demostrar l'adquisició d'un fenotip tumoral en l'àmbit cel·lular o la inducció de tumors en el cas d'animals com a resposta directa a l'acumulació de dany oxidatiu en el DNA. La manca de resultats en la detecció d'increments en el dany oxidatiu en resposta a exposicions prolongades d'arsenit podria ser el resultat de la utilització de línies cel·lulars que no presenten cap polimorfisme per gens constituents en la ruta de reparació BER. En aquestes condicions les cèl·lules podrien anar reparant els baixos nivells de dany induïts. De fet, únicament un estudi ha aconseguit demostrar l'aparició de càncer, concretament de pulmó, com a resultat d'una exposició prolongada a DMA^V en ratolins *Ogg1*^{-/-}, els quals presentaren al final del tractament nivells de 8-OH-dG significativament superiors als ratolins *Ogg1*^{-/-} no exposats, i també superiors als salvatges exposats i controls (Kinoshita et al., 2007). Tot i l'ús d'individus amb fons genètics deficient en la reparació BER, aquest estudi presenta el problema que utilitza DMA^V, que és un subproducte situat al final de la biometilació de l'arsènic, i que avalua tan sols una única dosi. Es coneix que la producció de ROS en les etapes finals del metabolisme es troba disminuïda i, per tant, també la seva aportació a incrementar el dany oxidatiu en el DNA. Això no succeeix amb l'arsenit, que es presenta com el compost inorgànic trivalent per excel·lència i la principal font primària d'incorporació a l'organisme. Donat que es troba en la primera línia del procés de metabolització, desencadenaria la formació de ROS en major mesura que el DMA^V exhibint, per tant, major poder en danyar el DNA. A més, el nostre estudi busca avaluar l'associació existent entre la generació de dany oxidatiu en el DNA i la carcinogènesi exercida per part de l'arsènic utilitzant un rang de dosis en la banda subtòxica, D'aquesta manera, a més de descobrir el paper oxidant de l'arsènic també permet establir relacions dosis-resposta en el grau de transformació cel·lular de les línies MEF.

Alhora de determinar l'adquisició d'un fenotip tumoral *in vitro* és de màxima importància utilitzar una bateria d'assaigs que permetin identificar la presentació d'aquest fenotip tumoral per part d'una cèl·lula, podent discriminar-la d'una cèl·lula totalment normal. La majoria d'aquests assaigs es basen a identificar característiques pròpies exhibides per les cèl·lules tumorals tals com l'augment en la proliferació cel·lular, evasió a la supressió del creixement, tolerància a l'apoptosi autoritzant la replicació del seu material genètic de manera indefinida, promoció a la formació de capil·lars sanguinis per tal de nodrir-se (angiogènesis), activació de programes d'invasió i metastasi, re-programació del metabolisme cel·lular i l'evasió de la destrucció per part del sistema immune (Hanahan i Weinberg, 2011). Algunes d'aquestes tècniques incloses en les mencionades bateries d'assaig són el *soft-agar*, el zimograma i els assaigs d'invasió cel·lular, entre d'altres (Breheny et al., 2011). Aquestes tècniques avaluen determinades característiques extrínseques pròpies de les cèl·lules transformades tals com l'adquisició de la capacitat de creixement independent d'ancoratge a substrat, la secreció de metal·loproteïnases i la promoció de la invasió de cèl·lules pertanyents a teixits circumdants respectivament.

Altres característiques sovint apreciades es corresponen a canvis intrínsecs que es produeixen en el transcurs de l'adquisició d'un fenotip tumoral per part d'una cèl·lula. Aquests canvis sovint es manifesten en gens lligats amb l'estat de diferenciació cel·lular. Així, gens com *C-MYC*, *OCT3/4*, *NOTCH2*, *SOX2*, *NANOG* i *KLF4* es conformem com a marcadors que determinen l'estat de pluripotència cel·lular. El seu nivell d'expressió pot ser comprovat mitjançant la utilització de PCR a temps real i Western-blot, valorant els nivells d'expressió gènica i proteica, respectivament. Altres marcadors més específics d'identitat de teixit, són igualment utilitzats a fi de valorar l'estat de diferenciació cel·lular; gens com *ACTA2* i *VIMENTINA* es presenten com a candidats a valorar la identitat fibroblàstica.

L'aplicació d'una bateria d'assaigs que inclogui les tècniques anteriorment mencionades, a més de la valoració de l'estat d'expressió dels gens implicats en determinar l'estat de diferenciació cel·lular, la varem portar a terme a fi de determinar l'adquisició d'un fenotip tumoral en les línies MEF crònicament exposades a l'arsènic al llarg de 40 setmanes d'exposició. Així, la valoració en la morfologia cel·lular mitjançant observació en microscopi, el nivell de proliferació cel·lular mitjançant la valoració dels temps de divisió cel·lular, la capacitat en créixer de manera independent d'ancoratge mitjançant el *soft-agar*, la capacitat de promoció tumoral mitjançant la variant de *soft-agar* modificat, l'increment en la secreció de MMPs mitjançant zimogrames i l'augment en la inducció de la invasió cel·lular en línies de possibles teixits circumdants a través dels assaigs d'invasió cel·lular emprant cambres modificades de Boyden van ser les eines utilitzades a fi de determinar aquests canvis extrínsecs propis de les cèl·lules tumorals.

A part, també es valorà els nivells d'expressió gènica mitjançant la utilització de la PCR a temps real dels gens *Acta2*, *Vimentina*, *Sox2*, *Nanog* i *klf4*, i els nivells d'expressió proteica dels

gens *C-myc*, *Oct3/4*, *Notch2* mitjançant l'ús del Western-blot. Aquests canvis els utilitzem com a dades complementàries aportant informació dels canvis a escala intrínseca que pateixen les cèl·lules al llarg de la seva transformació tumoral.

Els resultats obtinguts mostren canvis en la morfologia cel·lular de les línies MEF *Ogg1*^{-/-} exposades, presentant una morfologia allongada després del tractament a totes les dosis cròniques emprades (0,5, 1 i 2 µM) durant 30 setmanes d'exposició. Aquest fenomen no es va observar en cap de les línies MEF *Ogg1*^{+/+} crònicament exposades. Aquest fenomen aporta certa informació qualitativa referent a la resposta en la transició epiteli-mesènquima que es du a terme en les cèl·lules al llarg de tot procés tumoral, mostrant-se com una marca qualitativa en el prolongat procés neoplàsic. Aquestes variacions morfològiques ja han estat prèviament documentades en estudis *in vitro* sota condicions d'exposició crònica a l'arsènic (Li et al., 2011; Wang et al., 2011; Xu et al., 2014). Un dels altres trets característics exhibits per les cèl·lules tumorals correspon a l'increment en la proliferació cel·lular ja en les primeres etapes d'iniciació de la transformació cel·lular (Hanahan i Weinberg, 2011). Aquesta característica es determina d'acord amb el temps de duplicació poblacional (*doubling time*), que es correspon amb el temps necessari per a una línia cel·lular determinada en dividir-se doblant el seu número. En el nostre cas les cèl·lules MEF *Ogg1*^{-/-} ja mostren canvis en els seus valors de duplicació poblacional amb tan sols 20 setmanes d'exposició. En canvi, en la línia cel·lular salvatge no es mostraren canvis apreciables per aquest punt temporal. La comprovació del creixement de les línies cel·lulars MEF *Ogg1*^{-/-} crònicament exposades a arsenit sota l'absència de sèrum revelà una disminució significativa del temps de duplicació d'aquestes línies en comparació als controls i aquests resultats suposen una altra prova qualitativa del procés de transformació.

Totes les cèl·lules, sense excepció, disposen de marcadors específics que determinen la seva naturalesa tissular. Alguns d'aquests marcadors al llarg del període de transició d'epiteli-mesènquima es veuen alterats, observant-se una desregulació gènica que condueix finalment a l'aparició del fenotip mesenquimàtic que té lloc al final del procés d'adquisició tumoral (Kothari et al., 2014). Els fibroblasts, a pesar de ser una població heterogènia i, per tant, difícils d'atorgar-los marcadors específics d'identificació, presenten els marcadors *ACTA2* i *VIMENTINA* que es mantenen expressats en la gran majoria de poblacions fibroblàstiques adultes. Aquests gens no identifiquen únicament l'estat de diferenciació adult fibroblàstic, sinó que es veuen igualment implicats en el llarg procés de transició epiteli-mesènquima (Mimeault i Batra, 2014) i són marcadors claus d'identificació dels fibroblasts associats a tumor, on es presenta sobre-expressió dels dos gens (Madaret al., 2013). La importància d'aquestes cèl·lules radica en la seva localització dins l'estroma tumoral, erigint-se com a partícipes directes en l'orquestració dirigida de la progressió tumoral (Cirri i Chiarugi, 2012; Madar et al., 2013), com ho demostra la seva presència en diferents tipus de càncers (Kalluri i Zeisberg, 2006). Per tant, donada la naturalesa

tissular de les línies emprades en el nostre estudi vàrem utilitzar els gens *Acta2* i *Vimentina* com a candidats ideals a ser avaluats al llarg de l'exposició crònica a arsènic.

Els resultats en els nivells d'expressió gènica en les línies MEF crònicament exposades mostren canvis significativament diferents i apreciables en els dos gens al llarg del període de tractament de 40 setmanes. Aquests canvis es veuen més pronunciats en la línia MEF *Ogg1^{-/-}* i amb tractaments amb 2 µM, on els nivells d'*Acta2* i *Vimentina* es veuen clarament sobre-regulats, assolint nivells d'expressió gènica 1,5 i 2 vegades superiors al control, al cap de 40 setmanes d'exposició prolongada. El comportament exhibit pels dos marcadors en la línia MEF *Ogg1^{-/-}* suggereixen la conversió d'aquesta línia a un estat similar al dels fibroblasts associats a tumor, tot i que la valoració única d'aquests marcadors no és prova suficient per realitzar tal afirmació.

Existeixen gens implicats en la regulació de l'estat de desdiferenciació/diferenciació cel·lular que responen al nom de marcadors de pluripotència; aquests prenen tal nom a causa del seu paper en mantenir l'estat de desdiferenciació i auto renovació de les cèl·lules mare pluripotents, dirigint la seva desdiferenciació a diferents tipus cel·lulars i, conseqüentment, a la formació dels diferents teixits presents en qualsevol individu adult. Exemples d'aquests gens són *C-MYC*, *OCT3/4*, *NOTCH2*, *SOX2*, *NANOG* i *KLF4*. La desdiferenciació cel·lular és un fenomen contemplat al llarg de tot el procés de transició epiteli-mesènquima. Per tant, no seria estrany observar una manifestació de canvis d'expressió dels gens prèviament citats en les nostres condicions experimentals. De fet, la seva desregulació ha estat demostrada al llarg del procés neoplàsic cel·lular en estudis *in vitro* (Mathieu et al., 2012), en multitud de càncers (Schoenhals et al., 2009), i també en estudis on línies cel·lulars han estat transformades com a causa de la seva exposició crònica a l'arsènic (Tokar et al., 2011b). Així, el seguiment en l'expressió d'aquesta bateria de gens es presenta com una opció complementària a fi de documentar els canvis intrínsecs soferts per les MEFs sota exposicions prolongades a l'arsènic. Els resultats obtinguts revelaren la presentació d'una desregulació gènica en les línies MEF exposades, essent aquesta a diferent nivell segons la línia cel·lular analitzada. En el cas de les línies salvatges, no presentaren al llarg de tota l'exposició cap patró de comportament que fos significativament diferent dels presentats pels controls. Contràriament, les MEF *Ogg1^{-/-}* presentaren patrons clarament de desregulació gènica, mostrant en alguns gens tals com el *Notch2* tendències decreixents, o increments com en el cas de *Sox2*, en l'expressió proteica i gènica respectivament al cap de 40 setmanes d'exposició crònica. Altres gens com el *C-myc*, *Nanog* i *klf4* exhibiren un patró de forma de "U". Aquest fet no és insòlit, ja que ha estat documentat en diferent varietat d'estudis *in vitro* en exposicions prolongades a arsènic igual que en la progressió d'altres càncers independents a l'exposició per arsènic (Tokar et al., 2011b). Tal fet porta a la formulació d'una possible teoria per explicar el fenomen de visualització del patró en forma de "U" per aquests determinats gens, un primer període de diferenciació aberrant i decreixement en l'expressió dels gens relacionats com

marcadors de cèl·lules mare amb una progressiva disminució dels nivells del gen *PTEN*, i més tard una reactivació i restabliment dels nivells dels gens relacions en el manteniment de l'estat autoregulat present en les cèl·lules mare. Durant aquest segon augment, es pensa que es promou el descontrol dels processos de diferenciació donant lloc a la formació de cèl·lules mare tumorals (Tokar et al., 2010).

La promoció en el creixement tumoral es presenta com una marca destacada present en els fibroblasts associats a càncer, els quals es presenten com a principals cooperants en la promoció del creixement tumoral mitjançant l'excreció de factors que creen un micro-ambient favorable al creixement de les cèl·lules tumorals que voregen l'estroma del teixit específic (Cirri i Chiarugi 2011, 2012). La tècnica del *soft-agar*, desenvolupada a finals dels anys 70 del segle XX (Hamburger i Salmon, 1977), amb unes petites modificacions es presenta com una tècnica ideal a fi de determinar la capacitat promotora exercida de les MEFs crònicament exposades a arsènic. En el nostre cas, hem emprat medi condicionat "CM" excretat per les cèl·lules crònicament exposades al llarg del temps, que conté tots o parts dels factors excretats pels fibroblasts associats a càncer. Aquest medi és assajat en dues línies cel·lulars tumorals com són la HCT116, d'adenocarcinoma de còlon, i la HeLa, d'adenocarcinoma de cèrvix. En aquest assaig s'analitzen diferents paràmetres com ara el nombre de colònies formades, el nombre de colònies grans i la seva mida mitjana. Els nostres resultats indiquen un comportament clarament promotor en la inducció del creixement tumoral, manifestat clarament en les línies MEF *Ogg1*^{-/-} exposades al llarg de 30 setmanes. Així, el nombre de colònies de les cèl·lules HCT116 es duplica un cop exposades al CM de les línies deficientes crònicament exposades; únicament el CM provinent de les línies salvatges crònicament exposades a la dosi de 2 µM durant 40 setmanes fou capaç d'induir efectes similars. De manera secundària, l'avaluació de la mida mitjana de les colònies esdevé una característica molt rellevant alhora de mesurar els efectes promotors sobre el creixement de línies tumorals. L'establiment d'una mida límit per designar quan una colònia es considera gran ens permet estudiar el poder promotor del CM. En aquest context, s'establiren com a mínim 200 µm de diàmetre com a punt de partida per considerar una colònia com a gran. La freqüència del nombre de colònies fou incrementada dramàticament per l'acció del CM provinent de les MEF *Ogg1*^{-/-} crònicament exposades, tot i no seguir una tendència dosis-dependent. Per altra banda, l'increment en el nombre de colònies fou únicament apreciat en CM provinent de les MEF salvatges crònicament exposades durant 40 setmanes a la dosi de 2 µM. Finalment, al analitzar la mida mitjana exhibida per les colònies formades per la línia HCT116 exposada als diferents CM, es van observar increment en la seva mida, assolint valors pròxims a les 800 µm. Aquest fet no fou observat en les línies salvatges. Per altra banda, el comportament en la promoció en el creixement tumoral mostrarà una resposta diferent en la línia tumoral HeLa. Pel que fa a la mida mitjana final de les colònies, en aquesta línia cel·lular es mostrarà una clara tendència dosis-

dependent i significativament diferent del control, tot i assolir la línia tumoral mides inferiors a les mostrades per la línia tumoral HCT116.

La comprovació en l'adquisició de l'habilitat de créixer de forma independent d'ancoratge a substrat es presenta com una característica altament avaluada al llarg del temps des de la implementació inicial de l'assaig del *soft-agar* dissenyat de forma pionera per Hamburger i Salmon (Hamburger i Salmon, 1977). Tot i la dificultat coneguda dels fibroblasts en créixer en *soft-agar*, les colònies obtingudes foren prou visibles, presentant una mida uniforme del voltant de $290 \pm 19 \mu\text{m}$. Els resultats van mostrar que 30 setmanes d'exposició foren suficients per induir en les cèl·lules el fenotip de creixement independent d'ancoratge. Contràriament, les cèl·lules salvatges van necessitar 40 setmanes per mostrar un comportament similar.

L'estadi final del procés d'adquisició tumoral comprèn l'aparició de la capacitat de produir metàstasi. És a dir, la deslocalització de l'origen primari del tumor i la posterior colonització de teixits distants a fi de formar el renaixement de nous tumors. Aquesta capacitat es mostra com una altra marca característica exhibida per tota cèl·lula tumoral (Hanahan i Weinberg, 2011) i, per tant, serà avaluada en el treball. L'avaluació dels nivells de metal·loproteïnases i la mateixa capacitat d'inducció de la invasió cel·lular *in vitro* s'ofereixen com les dues alternatives possibles a fi d'avaluar l'aparició d'aquesta determinada marca tumoral. La importància en l'avaluació dels nivells de metal·loproteïnases i, més específicament de les MMP-2 i MMP-9 es presenta prou interessant gràcies a la seva contrastada omnipresència incrementada en multitud de càncers, ser reguladores del microambient tumoral i contribuint bàsicament en els processos de metàstasi i altres com la promoció i angiogènesis (Kessenbrock et al., 2010). Els fibroblasts associats a càncer es presenten com les principals cèl·lules estromals en l'excreció de tals metal·loproteïnases, orquestrant la maduració i destí final de les cèl·lules tumorals circumdants al seu estroma.

Així, la sobre-presència de MMPs digereix la matriu extracel·lular, habilitant la metàstasi de les cèl·lules tumorals (Cirri i Chiarugi 2011, 2012). Una de les principals tècniques emprada a fi de valorar els nivells excretats de MMPs és el zimograma dependent de substrat, descrita inicialment a principis dels anys 80 del segle XX (Heussen i Dowdle, 1980). La variant de substrat de gelatina permet revelar els nivells cel·lulars de MMP-2 i MMP-9 excretats en el CM. Diferents estudis en el camp de la carcinogènesi *in vitro* exercida per l'arsènic han mostrat un increment significatiu en els seus nivells comparats als presentats per les cèl·lules control (Achanzar et al., 2002; Kojima et al., 2009; Tokar et al., 2014). Inclús han estat utilitzades com a un biomarcador d'exposició a l'arsènic, ja que la seva concentració en el plasma d'individus de poblacions crònicament exposades a l'arsènic a través de l'aigua es veu incrementada (Kurzius-Spencer et al., 2015). Els nostres resultats mostren que els nivells excretats totals de MMP-2+9 per part de les MEFs *Ogg1*^{-/-} crònicament exposades per 30 setmanes assoleixen increments significativament diferents de les cèl·lules no exposades. Per altra banda, les MEF *Ogg1*^{+/+}

començaren a presentar canvis al voltant de la setmana 40, però només evidents en les dosis d'1 i 2 μM . La contribució en la promoció de la metastasi per part de les MEFs crònicament exposades durant un llarg període a l'arsenit comprès entre les 30 i 40 setmanes queda totalment comprovada quan es va valorar l'efecte promotor en la invasió sobre les cèl·lules tumorals HCT116 mitjançant l'assaig d'invasió utilitzant les cambres modificades de Boyden. Aquest assaig va ser descrit a finals dels anys 80 (Albini et al., 1987) i es presenta útil alhora de mimetitzar *in vitro* la metastasi produïda *in vivo*. La valoració dels efectes dels CM provinents de les MEF *Ogg1*^{-/-} crònicament exposades al voltant de 30 setmanes revelà un patró dosi-resposta en promoure la invasió de la línia tumoral d'adenocarcinoma de colon, promovent unes 6 vegades més la invasió en el cas del CM provinent de la dosi 2 μM . En el cas de la línia MEF *Ogg1*^{+/+} foren necessàries 10 setmanes més d'exposició per observar un patró de comportament similar, però a menor escala.

L'anàlisi global dels resultats aportats per les tècniques destinades a valorar els canvis extrínsecs (*Soft-agar*, zimograma i assaigs d'invasió per cambres modificades de Boyden) al llarg de la transformació cel·lular a un fenotip tumoral confirmarien el trobat per altres autors en estudis *in vitro* que demostraren una transformació cel·lular adquirida per exposicions cròniques a dosis d'arsènic a nivell subtòxic (Zhao et al., 1997; Achanzar et al., 2002; Chien et al., 2004; Sens et al., 2004; Eblin et al., 2007; Wen et al., 2008; Kojima et al., 2009; Chang et al., 2010; Wnek et al., 2010; Li et al., 2011; Ling et al., 2012; Tokar et al., 2013, 2014; Liu et al., 2014; Xu et al., 2014;). Per tant, el nostre estudi s'afegiria a aquesta llarga llista, reforçant la idea del poder de l'arsènic com agent carcinogen inclús sota exposicions a dosis rellevants en l'àmbit ambiental. A més, demostra de manera explícita la hipòtesi que planteja la contribució del dany oxidatiu com un mecanisme d'acció en la carcinogènesi exercida per l'arsènic. Aquesta evidència, per altra banda, es presenta com una alerta a tenir en compte a fi de valorar el possible risc associat a càncer en les poblacions exposades, sobretot en els individus portadors de polimorfismes com el *Ser326Cys* en el gen *OGG1*, que fan disminuir la seva capacitat d'eliminar lesions en el DNA com és la 8-OHdG.

Per altra banda, l'establiment d'aquest model *in vitro* permetrà futures exploracions d'altres canvis intrínsecs soferts en les línies cel·lulars al llarg del procés de transformació induït per l'arsènic. Alguns exemples podrien ser l'estudi dels canvis epigenètics soferts en el genoma a escala global o específic de gens i la mesura de la inestabilitat genòmica. Alguns d'ells inclús podrien estar actualment sota el nostre desconeixement.

5. CONCLUSIONS

Les conclusions finals d'aquesta Tesi, que té com a objectiu general estudiar la implicació del dany oxidatiu en el DNA en la carcinogènesi associada a l'arsènic utilitzant un marc d'exposició *in vitro* crònic i un model de línies cel·lulars MEFs isogèniques, una de les quals presenta deficiència en la reparació BER, són les següents:

1. Les línies cel·lulars MEF salvatge i MEF *Ogg1*^{-/-} utilitzades en aquesta Tesi es confirmen com a portadores de les característiques requerides per l'estudi.

- La línia MEF *Ogg1*^{-/-} es confirma genotípicament *knockout* pel gen *Ogg1*.
- Ambdues línies expressen l'enzim *As3mt* i exhibeixen capacitat metabolitzadora de l'arsènic, fent-ho, a més, a una ràtio similar.
- Vint-i-quatre i quaranta-vuit hores d'exposició a dosis subtòxiques d'arsenit sòdic són capaces d'induir dany genotòxic en ambdues línies cel·lulars, però només són capaces d'induir dany oxidatiu en la línia *Ogg1*^{-/-}, confirmant la seva utilitat en la detecció del paper del dany oxidatiu en la carcinogènesi associada a l'arsènic.

2. L'exposició crònica a l'arsenit sòdic és capaç d'induir dany genotòxic i dany oxidatiu en el DNA de les línies MEF exposades crònicament.

- L'exposició crònica a 0,5, 1 i 2 µM d'arsenit sòdic durant 18 setmanes revela una acumulació de dany genotòxic i oxidatiu irreversible en la línia MEF *Ogg1*^{-/-}. Aquest increment és progressiu i s'observa a totes les dosis emprades.
- En canvi, la línia MEF *Ogg1*^{+/+} mostra un lleuger increment del dany oxidatiu a les dosis d'1 i 2 µM, però únicament al final del període avaluat.

3. L'exposició crònica a arsenit sòdic durant 18 setmanes altera la capacitat de reparar el dany en el DNA mitjançant les vies BER i NER. Aquesta inhibició de les vies de reparació s'observa especialment en la línia *Ogg1* deficient.

- L'exposició crònica a 0,5, 1 i 2 µM d'arsenit sòdic durant 18 setmanes redueix la capacitat de reparar el dany genotòxic i oxidatiu produït pel mateix arsenit sòdic, el KBrO₃ i la llum UVC.

-Aquesta resposta adaptativa no s'explica per l'activació de la via de resposta antioxidant *Nrf2-Keap1*.

- L'acceleració del metabolisme de l'arsènic -visualitzat com la sobre-expressió de l'*As3mt*- observada en ambdues línies, però significativament accentuada en la línia *knockout*, es confereix com a una possible explicació al fenomen de l'adaptació.

4. L'exposició crònica a les dosis subtòxiques 0,5, 1 i 2 μ M d'arsenit sòdic durant 30 setmanes és capaç d'induir l'aparició d'un fenotip tumoral en la línia cel·lular MEF *Ogg1*^{-/-}.

-A partir de la setmana 30 d'exposició, les cèl·lules exhibeixen i) una morfologia alterada específica tendent a *spindle-like*, ii) un increment en la capacitat proliferativa, present inclús en condicions deprivants de nutrients, iii) una desregulació en els patrons d'expressió de marcadors d'identitat de teixit i d'autoregulació de la pluripotència cel·lular, iv) un increment en la promoció del creixement tumoral d'altres línies cel·lulars tumorals com les HCT116 i les HeLa, v) l'adquisició de la capacitat de creixement independent d'ancoratge, vi) un increment en la secreció de MMPs i vii) un increment en la promoció de la invasió cel·lular.

5. L'exposició crònica a les dosis subtòxiques més elevades d'1 i 2 μ M d'arsenit sòdic durant 40 setmanes només és capaç d'induir algun signe de transformació cel·lular en la línia cel·lular MEF *Ogg1*^{+/+}.

- A partir de la setmana 40 d'exposició a 1 i 2 μ M d'arsenit sòdic, les cèl·lules exhibeixen un augment en la secreció de MMPs i la capacitat d'inducció en la invasió cel·lular. La promoció del creixement tumoral, i el guany en la capacitat de creixement independent de substrat, s'observa només a la dosi més alta de 2 μ M.

6. Com a conclusió general, aquest treball demostra, per primera vegada, que el dany oxidatiu juga un paper rellevant en la genotoxicitat i la carcinogenicitat de l'arsènic. Per aquesta raó, els individus amb polimorfismes al gen *OGGI* tindrien, per tant, un augment del risc de patir les conseqüències de l'exposició a l'arsènic.

6. BIBLIOGRAFIA

- Achanzar WE, EM. Brambila, BA. Diwan, MM. Webber, MP. Waalkes, 2002. Inorganic arsenite-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells. *J Nat Cancer Inst.* **94**: 1888-1891.
- Ahlborn GJ, GM. Nelson, RD. Grindstaff, MP. Waalkes, BA. Diwan, 2009. Impact of life stage and duration of exposure on arsenic-induced proliferative lesions and neoplasia in C3H mice. *Toxicology* **262**: 106-113.
- Ahmad S, KT. Kitchin, WR. Cullen, 2000. Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Arch Biochem Biophys.* **382**: 195-202.
- Alarifi S, D. Ali, S. Alkahtani, MA. Siddiqui, BA. Ali, 2013. Arsenic trioxide-mediated oxidative stress and genotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarg Ther.* **6**: 75-84.
- Albini A, Y. Iwamoto, HK. Kleinman, GR. Martin, SA. Aaronson, et al. 1987. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.* **47**: 3239-3245.
- Anderson LM, BA. Diwan, NT. Fear, E. Roman, 2000. Critical windows of exposure for children's health: cancer in human epidemiological studies and neoplasms in experimental animal models. *Environ Health Perspect.* **108**: 573-594.
- Annangi B, J. Bach, G. Vales, L. Rubio, R. Marcos, et al. 2015. Long-term exposures to low doses of cobalt nanoparticles induce cell transformation enhanced by oxidative damage. *Nanotoxicology* **9**: 138-147.
- Aposhian HV, 1997. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **37**: 397-419.
- Aposhian HV, MM. Aposhian, 2006. Arsenic toxicology: Five questions. *Chem Res Toxicol.* **19**: 1-15.
- Aposhian, HV, B. Zheng, MM. Aposhian, XC. Le, ME. Cebrian, et al. 2000. DMPS-arsenic challenge test. II. Modulation of arsenic species, including monomethylarsonous acid (MMA(iii)), excreted in human urine. *Toxicol Appl Pharmacol.* **165**: 74-83.
- Aposhian HV, RA. Zakharyan, MD. Avram, A. Sampayo-Reyes, ML. Wollenberg, 2004. A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicol Appl Pharmacol.* **198**: 327-335.
- Arai T, VP. Kelly, O. Minowa, T. Noda, S. Nishimura, 2002. High accumulation of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, in mmh/ogg1 deficient mice by chronic oxidative stress. *Carcinogenesis* **23**: 2005-2010.
- Arai T, VP. Kelly, O. Minowa, T. Noda, S. Nishimura, 2006. The study using wild-type and ogg1 knockout mice exposed to potassium bromate shows no tumor induction despite an extensive accumulation of 8-hydroxyguanine in kidney DNA. *Toxicology* **221**: 179-186.
- Argos M, F. Parvez, M. Rahman, M. Rakibuz-Zaman, A. Ahmed, et al. 2014. Arsenic and lung disease mortality in Bangladeshi adults. *Epidemiology* **25**: 536-43.
- Asare N, C. Instanes, WJ. Sandberg, M. Refsnes, P. Schwarze, et al. 2012. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* **291**: 65-72.
- Audebert M, JP. Radicella, M. Dizdaroglu, 2000. Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the ogg1 protein. *Nucleic Acids Res.* **28**: 2672-2678.

- Bach J, A. Sampayo-Reyes, R. Marcos, A. Hernández, 2014. Ogg1 genetic background determines the genotoxic potential of environmentally relevant arsenic exposures. *Arch Toxicol.* **88**: 585-596.
- Bach J, J. Peremartí, B. Annangi, R. Marcos, A. Hernández, 2015. Reduced cellular DNA repair capacity after environmentally relevant arsenic exposure. Influence of Ogg1 deficiency. *Mutat Res.* **779**: 144-151
- Bailey K, RC. Fry, 2014. Arsenic-associated changes to the epigenome: what are the functional consequences? *Curr Environ Health Rep.* **1**: 22-34.
- Bates MN, OA. Rey, ML. Biggs, C. Hopenhayn, LE. Moore, et al., 2004. Case-control study of bladder cancer and exposure to arsenic in Argentina. *Am J Epidemiol.* **159**: 381-389.
- Benton G, I. Arnaoutova, J. George, HK. Kleinman, J. Koblinski, 2014. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev.* **15**: 3-18.
- Bersini S, JS. Jeon, M. Moretti, RD. Kamm, 2014. In vitro models of the metastatic cascade: from local invasion to extravasation. *Drug Discov Today* **19**: 735-742.
- Bhadauria S, SJS. Flora, 2007. Response of arsenic-induced oxidative stress, DNA damage, and metal imbalance to combined administration of DMSA and monoisoamyl-DMSA during chronic arsenic poisoning in rats. *Cell Biol Toxicol.* **23**: 91-104.
- Bhattacharjee P, M. Banerjee, AK. Giri, 2013. Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review. *Environ Int.* **53**: 29-40.
- Biswas J, D. Sinha, S. Mukherjee, S. Roy, M. Siddiqi, et al. 2010. Curcumin protects DNA damage in a chronically arsenic-exposed population of West Bengal. *Hum Exp Toxicol.* **29**: 513-524.
- Bohr VA, T. Stevnsner, NC. de Souza-Pinto. 2002. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene* **286**: 127-134.
- Boiteux S, TR. O'Connor, F. Lederer, A. Gouyette, J. Laval, 1990. Homogeneous Escherichia coli fpg protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/aprimidinic sites. *J Biol Chem.* **265**: 39163922.
- Breheny D, O. Oke, SP. Faux, 2011. The use of *in vitro* systems to assess cancer mechanisms and the carcinogenic potential of chemicals. *ATLA* **39**: 233-355.
- Brunner TB, SM. Hahn, WG. McKenna, EJ. Bernhard, 2004. Radiation sensitization by inhibition of activated Ras. *Strahlenther Onkol.* **180**: 731-740.
- Bundschuh J, MI. Litter, F. Parvez, G. Román-Ross, HB. Nicolli, et al. 2012. One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries. *Sci Total Environ.* **429**: 2-35.
- Burns FJ, T. Rossman, K. Vega, A. Uddin, S. Vogt, et al., 2008. Mechanism of selenium-induced inhibition of arsenic-enhanced UVR carcinogenesis in mice. *Environ Health Perspect.* **116**: 703-708.
- Cadenas E, 1997. Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors* **6**: 391-397.
- Calatayud M, D. Vélez, V. Devesa, 2012. Metabolism of inorganic arsenic in intestinal epithelial cell lines. *Chem Res Toxicol.* **25**: 2402-2411.
- Caldwell BK, WT. Smith, K. Lokuge, G. Ranmuthugala, K. Dear, et al. 2006. Access to drinking-water and arsenicosis in Bangladesh. *J Health Pop Nutr.* **24**: 336-345.
- Chaffer CL., RA. Weinberg, 2011. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* **331**: 1559-1564.

- Chang Q, J. Pan, X. Wang, Z. Zhang, F. Chen, et al. 2010. Reduced reactive oxygen species-generating capacity contributes to the enhanced cell growth of arsenic-transformed epithelial cells. *Cancer Res.* **70**: 5127-5135.
- Chen H, J. Liu, BA. Merrick, MP. Waalkes, 2001. Genetic events associated with arsenic-induced malignant transformation: applications of cDNA microarray technology. *Mol Carcinogen.* **30**: 79-87.
- Chen CJ, YC. Chuang, TM. Lin, HY. Wu, 1985. Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: high-arsenic artesian well water and cancers. *Cancer Res.* **45**: 5895-5899.
- Chen C-L, L-I. Hsu, H-Y. Chiou, Y-M. Hsueh, S-Y. Chen, et al. 2004. Ingested arsenic, cigarette smoking, and lung cancer risk: a follow-up study in arseniasis-endemic areas in Taiwan. *JAMA* **292**: 2984-2990.
- Chen C-L, H-Y. Chiou, L-I. Hsu, Y-M. Hsueh, M-M. Wu, et al. 2010. Arsenic in Drinking Water and Risk of Urinary Tract Cancer: A Follow-up Study from Northeastern Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* **19**: 101-110.
- Cheng KC, DS. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura, LA. Loeb, 1992. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A---C substitutions. *J Biol Chem* **267**: 166-72.
- Chien C-W, M-C. Chiang, IC. Ho, T-C. Lee, 2004. Association of chromosomal alterations with arsenite-induced tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes in nude mice. *Environ Health Perspect.* **112**: 1704-1710.
- Chien C-W, IC. Ho, T-C. Lee, 2009. Induction of neoplastic transformation by ectopic expression of human aldo-keto reductase 1C isoforms in NIH3T3 cells. *Carcinogenesis* **30**: 1813-1820.
- Chiou HY, ST. Chiou, YH. Hsu, YL. Chou, CH. Tseng, et al. 2001. Incidence of transitional cell carcinoma and arsenic in drinking water: a follow-up study of 8,102 residents in an arseniasis-endemic area in Northeastern Taiwan. *Am J Epidemiol.* **153**: 411-418.
- Chou W-C, Y-T. Chung, H-Y. Chen, C-J. Wang, T-H. Ying, et al. 2014. Maternal arsenic exposure and DNA damage biomarkers, and the associations with birth outcomes in a general population from Taiwan. *PloS One* **9**: e86398.
- Cifone MA, 1982. In vitro growth characteristics associated with benign and metastatic variants of tumor cells. *Cancer Metastasis Rev.* **1**: 335-347.
- Citron ML, ND. Jaffe , AW. Hamburger, AL. Lindblad, FP. Banda, et al. 1986. Improvement of human tumor cloning assay by suspension of fibroblasts into the bottom layer of agarose. *Cancer* **57**: 2357-2362.
- Cirri P, P. Chiarugi, 2011. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res.* **1**: 482-97.
- Cirri P, P. Chiarugi, 2012. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **31**: 195-208.
- Clancy HA, H. Sun, L. Passantino, T.Kluz, A. Muñoz, et al. 2012. Gene expression changes in human lung cells exposed to arsenic, chromium, nickel or vanadium indicate the first steps in cancer. *Metallomics* **4**: 784-793.
- Clarke ML, RL. Burton, AN. Hill, M. Litorja, MH. Nahm, et al. 2010. Low-cost, high-throughput, automated counting of bacterial colonies. *Cytometry* **77**: 790-797.
- Cohen SM, LL. Arnold, M. Eldan, AS. Lewis, BD. Beck, 2006. Methylated arsenicals: the implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment. *Crit Rev Toxicol.* **36**: 99-133.

- Combes RD, 2012. Cell transformation assays: are we barking up the wrong tree? *ATLA* **40**: 115-130
- Córdova EJ, A. Martínez-Hernández, L. Uribe-Figueroa, F. Centeno, M. Morales-Marín, et al. 2014. The NRF2-KEAP1 pathway is an early responsive gene network in arsenic exposed lymphoblastoid cells. *PLoS One* **9**: e88069.
- Cui X, T. Wakai, Y. Shirai, K. Hatakeyama, S. Hirano, 2006. Chronic oral exposure to inorganic arsenate interferes with methylation status of p16INK4a and RASSF1A and induces lung cancer in A/J mice. *Toxicol Sci.* **91**: 372-381.
- Cullen WR, 2008a. Accidental exposure to arsenic: The law of unintended consequences. En: Is arsenic an aphrodisiac? The sociochemistry of an element. *RSC Publishing*, pp. 349-397.
- Cullen WR, 2008b. Arsenic and crime: The law of intended consequences. En: Is arsenic an aphrodisiac? The sociochemistry of an element. *RSC Publishing*, pp. 166-214.
- Cullen WR, 2008c. Arsenic and the environment. En: Is arsenic an aphrodisiac? The sociochemistry of an element. *RSC Publishing*, pp. 287-348.
- Cullen WR, 2014. Chemical mechanism of arsenic biomethylation. *Chem Res Toxicol.* **27**: 457-461.
- Cullen WR, KJ. Reimer, 1989. Arsenic speciation in the environment. *Chem Rev.* **89**: 7137-7164.
- Danaee H, HH. Nelson, H. Liber, JB. Little, KT. Kelseynn, 2004. Low dose exposure to sodium arsenite synergistically interacts with UV radiation to induce mutations and alter DNA repair in human cells. *Mutagenesis* **19**: 143-148.
- Dantzer F, M. Bjørås, L. Luna, A. Klungland, E. Seeberg, 2003. Comparative analysis of 8-oxog:c, 8-oxog:a, a:c and c:c DNA repair in extracts from wild type or 8-oxog DNA glycosylase deficient mammalian and bacterial cells. *DNA Repair* **2**: 707-718.
- De Vizcaya-Ruiz A, O. Barbier, R. Ruiz-Ramos, ME. Cebrian, 2009. Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic. *Mutat Res.* **674**: 85-92.
- Dherin C, JP. Radicella, M. Dizdaroglu, S. Boiteux, 1999. Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hogg1 protein and the polymorphic alpha-HOGG1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. *Nucleic Acids Res.* **27**: 4001-4007.
- Ding W, LG. Hudson, X. Sun, C. Feng, KJ. Liu, 2008. As(III) inhibits ultraviolet radiation-induced cyclobutane pyrimidine dimer repair via generation of nitric oxide in human keratinocytes. *Free Radical Bio Med.* **45**: 1065-1072.
- Ding W, W. Liu, KL. Cooper, X-J. Qin, PL. de Souza Bergo, LG. Hudson, KJ. Liu, 2009. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by arsenite interferes with repair of oxidative DNA damage. *J Biol Chem.* **284**: 6809-6817.
- Dong Z, 2002. The molecular mechanisms of arsenic-induced cell transformation and apoptosis. *Environ Health Perspect.* **110** Suppl: 757-759.
- Drobná Z, FS. Walton, DS. Paul, W. Xing, DJ. Thomas, et al. 2010. Metabolism of arsenic in human liver: the role of membrane transporters. *Arch Toxicol.* **84**: 3-16.
- Dröge W, 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* **82**: 47-95.
- Duker AA, EJM. Carranza, M. Hale, 2005. Arsenic geochemistry and health. *Enviro Int.* **31**: 631-641.
- Ebert F, A. Weiss, M. Bültemeyer, I. Hamann, A. Hartwig, et al. 2011. Arsenicals affect base excision repair by several mechanisms. *Mutat Res.* **715**: 32-41.

- Eblin KE, TG. Bredfeldt, S. Buffington, AJ. Gandolfi, 2007. Mitogenic signal transduction caused by monomethylarsonous acid in human bladder cells: role in arsenic-induced carcinogenesis. *Toxicol Sci.* **95**: 321-330.
- Emsley J, 2001. Nature's building blocks: An A-Z guide to the elements. *Oxford University Press*.
- EPA, US Environmental Protection Agency. 1998. Locating and estimating air emissions from sources of arsenic and arsenic compounds.
- Epe B, 2002. Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol Chem.* **383**: 467-375
- Erickson PF, LN. Minier, RS. Lasher, 1982. Quantitative electrophoretic transfer of polypeptides from SDS polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: a method for their re-use in immunoautoradiographic detection of antigens. *J Immun Meth.* **51**: 241-249.
- Faita F, L. Cori, F. Bianchi, MG. Andreassi, 2013. Arsenic-induced genotoxicity and genetic susceptibility to arsenic-related pathologies. *Int J Environ Res Public Health* **10**: 1527-1546.
- Falasca M, C. Raimondi, T. Maffucci, 2011. Boyden chamber. *Meth Mol Biol.* **769**: 87-95.
- Fenton HJH, 1894. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc Trans.* **65**: 899.
- Ferreccio C, AH. Smith, V. Durán, T. Barlaro, H. Benítez, et al. 2013. Case-control study of arsenic in drinking water and kidney cancer in uniquely exposed Northern Chile. *Am J Epidemiol.* **178**: 813-818.
- Flora SJS, 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Rad Biol Med.* **51**: 257-281.
- Flora SJS, S. Chouhan, GM. Kannan, M. Mittal, Hn Swarnkar, 2008. Combined administration of taurine and monoisoamyl DMSA protects arsenic induced oxidative injury in rats. *Oxid Med Cell Long.* **1**: 39-45.
- Fraser B, 2012. Cancer cluster in Chile linked to arsenic contamination. *Lancet* **379**: 603.
- Freeman WM, SJ. Walker, KE. Vrana, 1999. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *BioTechniques* **26**: 112-122.
- Fujihara J, M. Soejima, T. Yasuda, Y. Koda, T. Kunito, et al. 2011. Polymorphic trial in oxidative damage of arsenic exposed vietnamese. *Toxicol Appl Pharmacol.* **256**: 174-178.
- Geissmann Q, 2013. OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects. *PLoS One* **8**: e54072.
- Grobe JW, 1977. Expert-testimony and therapeutic findings and observations in wine-dressers of the mosel-region with late sequelae of arsenic intoxication. *Berufs-Dermatosen* **25**: 124-130.
- Guo HR, HS. Chiang, H. Hu, SR. Lipsitz, RR. Monson, 1997. arsenic in drinking water and incidence of urinary cancers. *Epidemiology* **8**: 545-550.
- Haber F, J. Weiss, 1932. Über die katalyse des hydroperoxydes. *Naturwis.* **20**: 948-950.
- Haber DA, NS. Gray, J. Baselga, 2011. The evolving war on cancer. *Cell* **145**:19-24.
- Hailer MK, PG. Slade, BD. Martin, TA. Rosenquist, K.D. Sugden, 2005. Recognition of the oxidized lesions spiroimino dihydantoin and guanidino dihydantoin in DNA by the mammalian base excision repair glycosylases NEIL1 and NEIL2. *DNA Repair* **4**: 41-50.
- Halem DV, 2009. Arsenic in drinking water: not just a problem for Bangladesh. *Drink. Water Eng Sci Disc.* **2**: 51-64.
- Hall B, A. Limaye, AB. Kulkarni, 2010. Overview: generation of gene knockout in mice. *Curr Protoc Cell Biol.* 1-23.

- Hamburger AW, SE. Salmon, 1977. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**: 461-463.
- Hanahan D, RA. Weinberg, 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**: 646-674.
- Hartwig A, UD. Groblichhoff, D. Beyersmann, AT. Natarajan, R. Filon, 1997. Interaction of arsenic(III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis* **18**: 399-405.
- Hashiguchi K, JA. Stuart, NC. de Souza-Pinto, VA. Bohr, 2004. the C-terminal alpha helix of human OGG1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: the mitochondrial beta-OGG1 lacks this domain and does not have glycosylase activity. *Nucleic Acids Res.* **32**: 5596-5608.
- Hayakawa T, Y. Kobayashi, X. Cui, S. Hirano, 2005. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch Toxicol.* **79**: 183-191.
- Heussen C, EB. Dowdle, 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem.* **102**: 196-202.
- Hill JW, MK. Evans, 2006. Dimerization and opposite base-dependent catalytic impairment of polymorphic S326C OGG1 glycosylase. *Nucleic Acids Res.* **34**: 1620-1632.
- Hirano T, 2008. Repair system of 7, 8-dihydro-8-oxoguanine as a defense line against carcinogenesis. *J Radiat Res.* **49**: 329-340.
- Hopenhayn-Rich C, ML. Biggs, AH. Smith, 1998. Lung and kidney cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Córdoba, Argentina. *Int J Epidemiol.* **27**: 561-569.
- Huff J, P. Chan, A. Nyska, 2000. Is the human carcinogen arsenic carcinogenic to laboratory animals? *Toxicol Sci.* **55**: 17-23.
- Hughes MF, 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett.* **133**: 1-16.
- Hughes MF, 2006. Biomarkers of exposure: a case study with inorganic arsenic. *Environ Health Perspect.* **114**: 1790-1796.
- Hughes MF., BD. Beck, Y. Chen, AS. Lewis, DJ. Thomas, 2011. Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicol Sci* **123**: 305-332.
- Hutchinson J, 1911. Salvarsan ('606') and arsenic cancer. *Brit Med J.* **1**: 976-977.
- Hung RJ., J. Hall, P. Brennan, P. Boffetta, 2005. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: A HuGE review. *Am J Epidemiol.* **162**: 925-942.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, 1980. Arsenic and arsenic compounds. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 23. *International Agency for Research on Cancer*, Lyon.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, 2004. Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 84. *International Agency for Research on Cancer*, Lyon.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, 2012. Arsenic, metals, fibres, and dusts. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 100. *International Agency for Research on Cancer*, Lyon.
- Ishinishi N, Y. Kodama, K. Nobutomo, A. Hisanaga, 1977. Preliminary experimental study on carcinogenicity of arsenic trioxide in rat lung. *Environ Health Perspect.* **19**: 191-196.
- Islam FS, AG. Gault, C. Boothman, DA. Polya, JM. Charnock, et al. 2004. Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments. *Nature* **430**: 68-71.

- Jiang T, Z. Huang, JY. Chan, DD. Zhang, 2009. Nrf2 protects against As(iii)-induced damage in mouse liver and bladder. *Toxicol Appl Pharmacol.* **240**: 8-14
- Jiang R, Y. Li, Y. Xu, Y. Zhou, Y. Pang, et al. 2013. EMT and CSC-like properties mediated by the IKK β /I κ B α /RelA signal pathway via the transcriptional regulator, Snail, are involved in the arsenite-induced neoplastic transformation of human keratinocytes. *Arch Toxicol.* **87**: 991-1000.
- Jomova K, Z. Jenisova, M. Feszterova, S. Baros, J. Liska, et al. 2011. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol.* **31**: 95-107.
- Jones FT, 2007. A broad view of arsenic. *Poultry Sci.* **86**: 2-14.
- Kalluri, R, M. Zeisberg, 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* **6**: 392-401.
- Kasai H, S. Nishimura, 1984. Hydroxylation of deoxy guanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion. *Gan.* **75**: 565-566.
- Kessenbrock K, V. Plaks, Z. Werb, 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141**: 52-67.
- Kim K-W, P. Chanpiwat, HT. Hanh, K. Phan, S. Sthiannopkao, 2011. Arsenic geochemistry of groundwater in Southeast Asia. *Front Med.* **5**: 420-433.
- Kim H-G, DJ. Kim, S. Li, KY. Lee, X. Li, et al. 2012. Polycomb (PcG) proteins, BMI1 and SUZ12, regulate arsenic-induced cell transformation. *J Biol Chem.* **287**: 31920-31928.
- Kinoshita A, H. Wanibuchi, K. Morimura, M. Wei, D. Nakae, et al. 2007. Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in Ogg1-deficient mice. *Cancer Sci.* **98**: 803-814.
- Kitchin KT, R. Conolly, 2010. Arsenic-induced carcinogenesis -oxidative stress as a possible mode of action and future research needs for more biologically based risk assessment. *Chem Res Toxicol.* **23**: 327-335.
- Klungland A, S. Bjelland, 2007. Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1. *DNA Repair (Amst)* **6**: 481-488.
- Klungland A, I. Rosewell, S. Hollenbach, E. Larsen, G. Daly, et al. 1999. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *PNAS USA* **96**: 13300-13305.
- Kobayashi A, M-I. Kang, , Y. Watai, KI. Tong, T. Shibata, et al. 2006. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol.* **26**: 221-229.
- Kojima C, DC. Ramirez, E. J. Tokar, S. Himeno, Z. Drobná, et al. 2009. Requirement of Arsenic Biomethylation for Oxidative DNA Damage. *J Nat Cancer Inst.* **101**: 1670-1681.
- Kothari AN, Z. Mi, M. Zapf, PC. Kuo, 2014. Novel clinical therapeutics targeting the epithelial to mesenchymal transition. *Clin Transl Med.* **3**: 1-14.
- Kowalski LA, SS. Tsang, AJ. Davison, 1996. Arsenic and chromium enhance transformation of bovine papillomavirus DNA-transfected C3H/10T1/2 cells. *Cancer Lett.* **103**: 65-69.
- Kramer N, A. Walzl, C. Unger, M. Rosner, G. Krupitza, et al. 2013. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res.* **752**: 10-24.
- Kumagai Y, D. Sumi, 2007. Arsenic: signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* **47**: 243-262.
- Kurzius-Spencer M, RB. Harris, V. Hartz, J. Roberge, C-H. Hsu, 2015. Relation of dietary inorganic arsenic to serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) at different threshold concentrations of tap water arsenic. *J Expo Sci Environ Epidemiol.*

- Lau A, SA. Whitman, MC. Jaramillo, DD. Zhang, 2013. Arsenic-mediated activation of the NRF2-KEAP1 antioxidant pathway. *J Biochem Mol Toxicol.* **27**: 99-105.
- Le Page F, A. Klungland, DE. Barnes, A. Sarasin, S. Boiteux. 2000. Transcription coupled repair of 8-oxoguanine in murine cells: the ogg1 protein is required for repair in nontranscribed sequences but not in transcribed sequences. *PNAS USA* **97**: 8397-8402.
- Lengfelder E, W-K. Hofmann, D. Nowak, 2013. Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: clinical results and open questions. *Exp Rev Anticancer Ther.* **13**: 1035-1043.
- Leslie EM, 2012. Arsenic-glutathione conjugate transport by the human multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs). *J Inorg Biochem.* **108**: 141-149.
- Li D, K. Morimoto, T. Takeshita, Y. Lu, 2001. Arsenic induces DNA damage via reactive oxygen species in human cells. *Environ Health Prev Med.* **6**: 27-32.
- Li G, K. Yuan, C. Yan, J. Fox, M. Gaid, et al. 2012. 8-Oxoguanine-DNA glycosylase 1 deficiency modifies allergic airway inflammation by regulating stat6 and il-4 in cells and in mice. *Free Rad Biol Med.* **52**: 392-401.
- Li G, L-S. Lee, M. Li, S-W. Tsao, J-F. Chiu, 2011. molecular changes during arsenic-induced cell transformation. *J Cell Physiol.* **226**: 3225-3232.
- Li JH, TG. Rossman, 1989. Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Mol Toxicol.* **2**: 1-9.
- Liao J, DN. Seril, GG. Lu, M. Zhang, S. Toyokuni, et al., 2008. Increased susceptibility of chronic ulcerative colitis-induced carcinoma development in DNA repair enzyme ogg1 deficient mice. *Mol Carcinog.* **47**: 638-646.
- Liao C-M, H-H. Shen, C-L. Chen, L-I. Hsu, T-L. Lin, et al. 2009. Risk assessment of arsenic-induced internal cancer at long-term low dose exposure. *J Hazard Mater.* **165**: 652-663.
- Lim KT, MY. Shukor, H. Wasoh. 2014. Physical, chemical, and biological methods for the removal of arsenic compounds. *BioMed Res Int.* 2014: 503784.
- Lin S, Q. Shi, FB. Nix, M. Stýblo, MA. Beck, et al. 2002. A novel S-adenosyl-L-methionine:arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol. *J Biol Chem.* **277**: 10795-10803.
- Lin T-S, C-C. Wu, J-D. Wu, C-H. Wei, 2012. Oxidative DNA damage estimated by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and arsenic in glass production workers. *Toxicol Ind Health* **28**: 513-521.
- Ling M, Y. Li, Y. Xu, Y. Pang, L. Shen, et al. 2012. Regulation of miRNA-21 by reactive oxygen species-activated ERK/NF- κ B in arsenite-induced cell transformation. *Free Rad Biol Med.* **52**: 1508-1518.
- Liochev SI, I. Fridovich, 1994. The role of O²⁻ in the production of HO[•] in vitro and in vivo. *Free Rad Biol Med.* **16**: 29-33.
- Lisanti MP, UE. Martinez-Outschoorn, F. Sotgia, 2013. Oncogenes induce the cancer-associated fibroblast phenotype: metabolic symbiosis and 'fibroblast addiction' are new therapeutic targets for drug discovery. *Cell Cycle* **12**: 2723-2732.
- Liu Y, JM. Hock, RJ. Van Beneden, X. Li, 2014. Aberrant overexpression of FOXM1 transcription factor plays a critical role in lung carcinogenesis induced by low doses of arsenic. *Mol Carcinogen.* **53**: 380-391.
- Liu, J, L. Benbrahim-Tallaa, X. Qian, L. Yu, Y. Xie, et al. 2006. Further studies on aberrant gene expression associated with arsenic-induced malignant transformation in rat liver TRL1215 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* **216**: 407-415.

- Loft, S, P. Danielsen, M. Løhr, K. Jantzen, JG. Hemmingsen, et al. 2012. Urinary excretion of 8-Oxo-7,8-dihydroguanine as biomarker of oxidative damage to DNA. *Arch Biochem Biophys.* **518**: 142-150.
- Lynn, S, HT. Lai, JR. Gurr, KY. Jan, 1997. Arsenite retards DNA break rejoining by inhibiting DNA ligation. *Mutagenesis* **12**: 353-358.
- Madar S, I. Goldstein, V. Rotter, 2013. Cancer associated fibroblasts' -more than meets the eye. *Trends Mol Med.* **19**: 447-453.
- Mandal BK, KT. Suzuki, 2002. Arsenic round the world: A review. *Talanta* **58**: 201-235.
- Martinez VD, E. Vucic, M. Adonis, L. Gil, WL. Lam, 2011. Arsenic biotransformation as a cancer promoting factor by inducing DNA damage and disruption of repair mechanisms. *Mol Biol Int.* **2011**:718974.
- Mascolo MG, S. Perdichizzi, F. Rotondo, E. Morandi, A. Guerrini, et al. 2010. BALB/c 3T3 cell transformation assay for the prediction of carcinogenic potential of chemicals and environmental mixtures. *Toxicol In Vitro* **24**: 1292-1300.
- Mathieu J, Z. Zhang, W. Zhou, AJ. Wang, JM. Heddleston, 2012. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res.* **71**: 4640-4652.
- Mead MN, 2005. Arsenic: in search of an antidote to a global poison. *Environ Health Perspect.* **113**: 378-386.
- Melak D, C. Ferreccio, D. Kalman, R. Parra, J. Acevedo, et al. 2014. Arsenic methylation and lung and bladder cancer in a case-control study in Northern Chile. *Toxicol Appl Pharmacol.* **274**: 225-231.
- Mimeault, M, SK. Batra, 2014. Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **23**: 234-254.
- Minowa O, T. Arai, M. Hirano, Y. Monden, S. Nakai, et al. 2000. Mmh/ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *PNAS USA* **97**: 4156-4261.
- Mishra D, A. Mehta, SJS. Flora, 2008. Reversal of arsenic-induced hepatic apoptosis with combined administration of DMSA and its analogues in guinea pigs: role of glutathione and linked enzymes. *Chem Res Toxicol.* **21**: 400-407.
- Mizoi M, F. Takabayashi, M. Nakano, Y. An, Y. Sagesaka, et al. 2005. The role of trivalent dimethylated arsenic in dimethylarsinic acid-promoted skin and lung tumorigenesis in mice: tumor-promoting action through the induction of oxidative stress. *Toxicol Lett.* **158**: 87-94.
- Mo J, Y. Xia, TJ. Wade, M. Schmitt, XC. Le, et al. 2006. Chronic arsenic exposure and oxidative stress: OGG1 expression and arsenic exposure, nail selenium, and skin hyperkeratosis in Inner Mongolia. *Environ Health Perspect.* **114**: 835-841.
- Motiwale L, AD. Ingle, KVK. Rao, 2005. Mouse skin tumor promotion by sodium arsenate is associated with enhanced PCNA expression. *Cancer Lett.* **223**: 27-35.
- Moutasim KA, ML. Nystrom, GJ. Thomas, 2011. Cell migration and invasion assays. *Meth Mol Biol.* **731**: 333-343.
- Mukherjee A, MK. Sengupta, MA. Hossain, S. Ahamed, B. Das, et al. 2006. Arsenic contamination in groundwater: a global perspective with emphasis on the Asian scenario. *J Health Population Nutr.* **24**: 142-163.
- Nachman KE, PA. Baron, G. Raber, KA. Francesconi, A. Navas-Acien, et al. 2013. Roxarsone, inorganic arsenic, and other arsenic species in chicken: a U.S.-based market basket sample. *Environ Health Perspect.* **121**: 818-824.

- Naranmandura H, N. Suzuki, KT. Suzuki, 2006. Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation. *Chem Res Toxicol.* **19**: 1010-1018.
- Ngalame NNO, EJ. Tokar, RJ. Person, Y. Xu, MP. Waalkes, 2014. Aberrant microRNA expression likely controls RAS oncogene activation during malignant transformation of human prostate epithelial and stem cells by arsenic. *Toxicol Sci.* **138**: 268-277.
- Nickson CM, JL. Parsons, 2014. Monitoring regulation of DNA repair activities of cultured cells in-gel using the comet assay. *Front Genet.* **5**: 232.
- Ninomiya M, T. Kajiguchi, K.Yamamoto, T. Kinoshita, N. Emi, et al. 2006. Increased oxidative DNA products in patients with acute promyelocytic leukemia during arsenic therapy. *Haematologica* **91**: 1571-1572.
- Nishioka K, T. Ohtsubo, H. Oda, T. Fujiwara, D. Kang, K. Sugimachi, Y. Nakabeppu, 1999. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol Biol Cell.* **10**: 1637-1652.
- Nollen M, F. Ebert, J. Moser, LHF. Mullenders, A. Hartwig, 2009. Impact of arsenic on nucleotide excision repair: XPC function, protein level, and gene expression. *Mol Nutr Food Res.* **53**: 572-582.
- Noren Hooten N, K. Kompaniez, J. Barnes, A. Lohani, MK. Evans, 2011. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-Oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1). *J Biol Chem.* **286**: 44679-44690.
- Notario V, JA. DiPaolo, 1998. Molecular aspects of neoplasia of syrian hamster cells transformed *in vitro* by chemical carcinogens. *Toxicol Lett.* **96-97**: 221-330.
- NRC, National Research Council (US) Committee on medical and biological effects of environmental pollutants. 1977. Arsenic: medical and biologic effects of environmental pollutants. Washington (DC), *National Academies Press*.
- Ondovcik SL, L. Tamblyn, JP. McPherson, PG. Wells, 2013. Sensitivity to methylmercury toxicity is enhanced in oxoguanine glycosylase 1 knockout murine embryonic fibroblasts and is dependent on cellular proliferation capacity. *Toxicol Appl Pharmacol.* **270**: 23-30.
- Orihuela R, C. Kojima, , EJ. Tokar, RJ. Person, Y. Xu, et al. 2013. Oxidative DNA damage after acute exposure to arsenite and monomethylarsonous acid in biomethylation-deficient human cells. *Toxicol Mech Meth.* **23**: 389-395.
- Pei Q, N. Ma, J. Zhang, W. Xu, Y. Li, , et al. 2013. Oxidative DNA damage of peripheral blood polymorphonuclear leukocytes, selectively induced by chronic arsenic exposure, is associated with extent of arsenic-related skin lesions. *Toxicol Appl Pharmacol.* **266**: 143-149.
- Peremarti J, F. Ramos, R. Marcos, A. Hernández, 2014. Arsenic exposure disrupts the normal function of the FA/BRCA repair pathway. *Toxicol Sci.* **142**: 93-104.
- Pi J, BA. Diwan, Y. Sun, J. Liu, W. Qu, et al. 2008. Arsenic-induced malignant transformation of human keratinocytes: involvement of Nrf2. *Free Radic Biol Med.* **45**: 651-658.
- Piatek K, T. Schwerdtle, A. Hartwig, W. Bal, 2008. Monomethylarsonous acid destroys a tetrathiolate zinc finger much more efficiently than inorganic arsenite: mechanistic considerations and consequences for DNA repair inhibition. *Chem Res Toxicol.* **21**: 600-606.
- Qi Y, M. Zhang, H. Li, JA. Frank, L. Dai, et al. 2014. Autophagy inhibition by sustained overproduction of IL6 contributes to arsenic carcinogenesis. *Cancer Res.* **74**: 3740-3752.

- Qin X-J, LG. Hudson, W. Liu, GS. Timmins, KJ. Liu, 2008. Low concentration of arsenite exacerbates UVR-induced DNA strand breaks by inhibiting PARP-1 activity. *Toxicol Appl Pharmacol.* **232**: 41-50.
- Qin X-J, W. Liu, Y-N. Li, X. Sun, C-X. Hai, et al. 2012. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition by arsenite promotes the survival of cells with unrepaired DNA lesions induced by UV exposure. *Toxicol Sci.* **127**: 120-129.
- Rasband W, T. Ferreira, 2014. *ImageJ user Guide* 198.
- Rehman K, H. Naranmandura, 2012. Arsenic metabolism and thioarsenicals. *Metallomics* **4**: 881-892.
- Robertson B, A. Klungland, T. Rognes, I. Leiros. 2009. DNA repair in mammalian cells: base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci.* **66**: 981-993.
- Rosen BP, 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* **529**: 86-92.
- Rosenfeldt MT, KM. Ryan, 2011. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis* **32**: 955-963.
- Rossmann TG, AN. Uddin, FJ. Burns, MC. Bosland, 2002. Arsenite cocarcinogenesis: an animal model derived from genetic toxicology studies. *Environ Health Perspect.* **110** Suppl: 749-752.
- Rossmann, TG, AN. Uddin, FJ. Burns 2004. Evidence that arsenite acts as a cocarcinogen in skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* **198**: 394-404.
- Sainio EL, R. Jolanki, E. Hakala, L. Kanerva. 2000. Metals and arsenic in eye shadows. *Cont Dermat.* **42**: 5-10.
- Sakai A, Y. Iwase, Y. Nakamura, K. Sasaki, N. Tanaka, et al. 2002. Use of a cell transformation assay with established cell lines, and a metabolic cooperation assay with V79 cells for the detection of tumour promoters: a review. *ATLA* **30**: 33-59.
- Salim EI, H. Wanibuchi, K. Morimura, M. Wei, M. Mitsuhashi, et al. 2003. Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in p53 heterozygous knockout and wild-type C57BL/6J mice there is abundant epidemiological evidence that arsenic is an environmental carcinogen related to human cancers of the skin, lung, liver and urinary bladder. *Carcinogenesis* **24**: 335-342.
- Sampath H, 2014. Oxidative DNA damage in disease -insights gained from base excision repair glycosylase-deficient mouse models. *Environ Mol Mutagen.* **55**: 689-703.
- Sampath H, V. Vartanian, MR. Rollins, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, et al. 2012. 8-Oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) deficiency increases susceptibility to obesity and metabolic dysfunction. *PLoS One* **7**: e51697.
- Schoenhals M, A. Kassambara, J. De Vos, D. Hose, J. Moreaux, B. Klein, 2009. Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* **383**: 157-162.
- Schmidt CW, 2014. Low-dose arsenic: in search of a risk threshold. *Environ Health Perspect.* **122**: 130-134.
- Sens DA, S. Park, V. Gurel, MA. Sens, SH. Garrett, et al. 2004. Inorganic cadmium- and arsenite-induced malignant transformation of human bladder urothelial cells. *Toxicol Sci.* **79**: 56-63.
- Severson PL, EJ. Tokar, L. Vrba, MP. Waalkes, BW. Futscher, 2013. Coordinate H3K9 and DNA methylation silencing of ZNFs in toxicant-induced malignant transformation. *Epigenetics* **8**: 1080-1088.
- Siegel R, D. Naishadham, A. Jemal, 2013. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* **63**: 11-30.
- Singh KP, R. Kumari, J. Treas, JW. DuMond, 2011. Chronic exposure to arsenic causes increased cell survival, DNA damage, and increased expression of mitochondrial transcription factor a (MTTFA) in human prostate epithelial cells. *Chem Res Toxicol.* **24**: 340-349.

- Sinha D, S. Roy, M. Roy, 2010. Antioxidant potential of tea reduces arsenite induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Food Chem Toxicol.* **48**: 1032-1039.
- Sinha D, J. Biswas, A. Bishayee, 2013. Nrf2-mediated redox signaling in arsenic carcinogenesis: a review. *Arch Toxicol.* **87**: 383-396.
- Shen S, X-F. Li, WR. Cullen, M. Weinfeld, XC. Le, 2013. Arsenic binding to proteins. *Chem Rev.* **113**: 7769-7792.
- Somji S, CS. Bathula, XD. Zhou, MA. Sens, DA. Sens, et al. 2008. Transformation of human urothelial cells (UROtsa) by As and Cd induces the expression of keratin 6a. *Environ Health Perspect.* **116**: 434-440.
- Soto-Reyes E, LM. Del Razo, M. Valverde, E. Rojas, 2005. Role of the alkali labile sites, reactive oxygen species and antioxidants in DNA damage induced by methylated trivalent metabolites of inorganic arsenic. *Biometals* **18**: 493-506.
- Smith AH., EO. Lingas, M. Rahman, 2000. Contamination of Drinking-Water by Arsenic in Bangladesh: A Public Health Emergency. *Bull. WHO* **78**: 1093-1103.
- Snoek-van Beurden PAM, JW. Von den Hoff, 2005. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques* **38**: 73-83.
- Springman EB, EL. Angleton, H. Birkedal-Hansen, HE. Van Wart, 1990. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a 'cysteine switch' mechanism for activation. *PNAS USA* **87**: 364-368.
- Steinmaus C, Y. Yuan, D. Kalman, OA. Rey, CF. Skibola, et al. 2010. Individual differences in arsenic metabolism and lung cancer in a case-control study in Cordoba, Argentina. *Toxicol Appl Pharmacol* **247**: 138-145.
- Steinmaus C, C. Ferreccio, J. Acevedo, Y. Yuan, J. Liaw, et al. 2014. Increased lung and bladder cancer incidence in adults after in utero and early-life arsenic exposure. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* **23**: 1529-1538.
- Stýblo M, LM. Del Razo, L. Vega, DR. Germolec, EL. LeCluyse, et al. 2000. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch Toxicol.* **74**: 289-99.
- Subbarayan PR, B. Ardalan, 2014. In the war against solid tumors arsenic trioxide need partners. *J Gastrointest Cancer* **45**: 363-371.
- Sugden KD, KM. Rigby, BD. Martin. 2004. Oxidative activation of the human carcinogen chromate by arsenite: a model for synergistic metal activation leading to oxidative DNA damage. *Toxicol In Vitro* **18**: 741-748.
- Sung J-S, B. Demple, 2006. Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. *FEBS J.* **273**: 1620-1629.
- Sun Y, C. Kojima, C. Chignell, R. Mason, MP. Waalkes, 2011. Arsenic transformation predisposes human skin keratinocytes to UV-induced DNA damage yet enhances their survival apparently by diminishing oxidant response. *Toxicol Appl Pharmacol.* **255**: 242-250.
- Takahashi M, JC. Barrett, T. Tsutsui. 2002. Transformation by inorganic arsenic compounds of normal syrian hamster embryo cells into a neoplastic state in which they become anchorage-independent and cause tumors in newborn hamsters. *Int J Cancer* **99**: 629-634.
- Takumi S, Y. Aoki, T. Sano, T. Suzuki, T. Nohmi, et al. 2014. In vivo mutagenicity of arsenite in the livers of Gpt delta transgenic mice. *Mutat Res. GTEM* **760**: 42-47.
- Tokar EJ, W. Qu, J. Liu, W. Liu, M. Webber, 2010. Arsenic-specific stem cell selection during malignant transformation. *J Natl Cancer Inst.* **102**: 638-649.

- Tokar EJ, BA. Diwan, JM. Ward, DA. Delker, MP. Waalkes, 2011a. Carcinogenic effects of 'whole-life' exposure to inorganic arsenic in CD1 mice. *Toxicol Sci.* **119**: 73-83.
- Tokar EJ, W. Qu, MP. Waalkes, 2011b. Arsenic, Stem Cells, and the Developmental Basis of Adult Cancer. *Toxicol Sci.* **120** Suppl: S192-203.
- Tokar EJ, RJ. Person, Y. Sun, AO. Perantoni, MP. Waalkes, 2013. Chronic exposure of renal stem cells to inorganic arsenic induces a cancer phenotype. *Chem Res Toxicol.* **26**: 96-105.
- Tokar EJ, C. Kojima, MP. Waalkes, 2014. Methylarsonous acid causes oxidative DNA damage in cells independent of the ability to biomethylate inorganic arsenic. *Arch Toxicol.* **88**: 249-261.
- Tsuchiya, T, T. Tanaka-Kagawa, H. Jinno, H. Tokunaga, K. Sakimoto, et al. 2005. Inorganic arsenic compounds and methylated metabolites induce morphological transformation in two-stage BALB/c 3T3 cell assay and inhibit metabolic cooperation in V79 cell assay. *Toxicol Sci.* **84**: 344-351.
- Vahter M, TW. Clarkson, L. Friberg, GF. Nordberg, P. Sager, 1988. Arsenic. *In Biological Monitoring of Toxic Metals.*
- Valko M, D. Leibfritz, J. Moncol, MTD. Cronin, M. Mazur, et al. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **39**: 44-84.
- Van der Kemp PA, D. Thomas, R. Barbey, R. de Oliveira, S. Boiteux, 1996. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the ogg1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DN glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-n-methylformamidopyrimidine. *PNAS USA* **93**: 5197-5202.
- Van Loon B, E. Markkanen, U. Hübscher, 2010. Oxygen as a friend and enemy: how to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair* **9**: 604-616.
- Visse R, H. Nagase, 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Res.* **92**: 827-839.
- Waalkes MP, JM. Ward, BA. Diwan, 2004. Induction of tumors of the liver, lung, ovary and adrenal in adult mice after brief maternal gestational exposure to inorganic arsenic: promotional effects of postnatal phorbol ester exposure on hepatic and pulmonary, but not dermal cancers. *Carcinogenesis* **25**: 133-141.
- Waalkes MP, J. Liu, JM. Ward, DA. Powell, BA. Diwan, 2006. Urogenital carcinogenesis in female CD1 mice induced by in utero arsenic exposure is exacerbated by postnatal diethylstilbestrol treatment. *Cancer Res.* **66**: 1337-1345.
- Waalkes MP, J. Liu, BA. Diwan, 2007. Transplacental Arsenic Carcinogenesis in Mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* **222**: 271-280.
- Waalkes MP, W. Qu, EJ. Tokar, GE. Kissling, D. Dixon, 2014. Lung tumors in mice induced by 'whole-life' inorganic arsenic exposure at human-relevant doses. *Arch Toxicol.* **88**: 2063-2065.
- Wallace SS., DL. Murphy, JB. Sweasy, 2013. Base excision repair and cancer. *Cancer Lett.* **327**: 73-89.
- Wang Z, J. Zhou, X. Lu, Z. Gong, XC. Le, 2004. Arsenic speciation in urine from acute promyelocytic leukemia patients undergoing arsenic trioxide treatment. *Chem Res Toxicol.* **17**: 95-103.
- Wang T-C, K-Y. Jan, ASS. Wang, J-R. Gurr, 2007. Trivalent arsenicals induce lipid peroxidation, protein carbonylation, and oxidative DNA damage in human urothelial cells. *Mutat Res.* **615**: 75-86.

- Wang H-H, M-M. Wu, MWY. Chan, Y-S. Pu, C-J. Chen, et al. 2014. Long-term low-dose exposure of human urothelial cells to sodium arsenite activates lipocalin-2 via promoter hypomethylation. *Arch Toxicol.* **88**: 1549-1559.
- Wang Z, Y. Zhao, E. Smith, GJ. Goodall, PA. Drew, 2011. Reversal and prevention of arsenic-induced human bronchial epithelial cell malignant transformation by microRNA-200b. *Toxicol Sci.* **121**: 110-122.
- Watanabe T, S. Hirano, 2013. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Arch Toxicol.* **87**: 969-979.
- Wei B, Y. Zhou, Z. Xu, B. Xi, H. Cheng, et al. 2011. The effect of hOGG1 Ser326Cys polymorphism on cancer risk: evidence from a meta-analysis. *PLoS One* **6**: e27545.
- Wen G, GM. Calaf, MA. Partridge, C. Echiburú-Chau, Y. Zhao, et al. 2008. Neoplastic transformation of human small airway epithelial cells induced by arsenic. *Mol Med.* **14**: 2-10.
- WHO, World Health Organization 2011. Arsenic in drinking water. *WHO Guidelines for drinking-water quality*, pp. 1-24.
- Wilkesman J, L. Kurz, 2012. Advances in zymography techniques and patents regarding protease analysis. *Recent Pat Biotechnol.* **6**: 106-114.
- Witkiewicz-Kucharczyk A, W. Bal 2006. Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicol Lett.* **162**: 29-42.
- Wnek SM, TJ. Jensen, PL. Severson, BW. Futscher, AJ. Gandolfi, 2010. Monomethylarsonous acid produces irreversible events resulting in malignant transformation of a human bladder cell line following 12 weeks of low-level exposure. *Toxicol Sci.* **116**: 44-57.
- Xu Y, EJ. Tokar, MP. Waalkes, 2014. Arsenic-induced cancer cell phenotype in human breast epithelia is estrogen receptor-independent but involves aromatase activation. *Arch Toxicol.* **88**: 263-74.
- Yager JW, JK. Wiencke, 1997. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase by arsenite. *Mutat Res.* **386**: 345-351.
- Yamamoto S, Y. Konishi, T. Matsuda, S. Vaniamolo, T. Murai, et al. 1995. Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in F344/DUCRJ rats after pretreatment with five carcinogens. *Cancer Res.* **55**: 1271-1276.
- Yamanaka K, K. Ohtsubo, A. Hasegawa, H. Hayashi, H. Ohji, et al. 1996. Exposure to dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, strongly promotes tumorigenesis initiated by 4-nitroquinoline 1-oxide in the lungs of mice. *Carcinogenesis* **17**: 767-770.
- Yogianti F, M. Kunisada, R. Ono, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, et al. 2012. Skin tumours induced by narrowband UVB have higher frequency of p53 mutations than tumours induced by broadband UVB independent of ogg1 genotype. *Mutagenesis* **27**: 637-643.
- Yuzefovych LV, AM. Schuler, J. Chen, DF. Alvarez, L. Eide, et al. 2013. Alteration of mitochondrial function and insulin sensitivity in primary mouse skeletal muscle cells isolated from transgenic and knockout mice: role of ogg1. *Endocrinology* **154**: 2640-2649.
- Zakharyan RA, A. Sampayo-Reyes, SM. Healy, G. Tsaprailis, PG. Board, DC. Liebler, HV. Aposhian, 2001. Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem Res Toxicol.* **14**: 1051-1057.
- Zhao CQ, MR. Young, BA. Diwan, TP. Coogan, MP. Waalkes, 1997. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *PNAS USA* **94**: 10907-10912.

