Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Efectos del arsénico sobre la adenohipófisis. Mecanismos de acción

Ronchetti, Sonia Alejandra

2014-12-15

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Ronchetti, Sonia Alejandra. (2014-12-15). Efectos del arsénico sobre la adenohipófisis. Mecanismos de acción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Ronchetti, Sonia Alejandra. "Efectos del arsénico sobre la adenohipófisis. Mecanismos de acción". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-12-15.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Efectos del arsénico sobre la adenohipófisis Mecanismos de acción

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas.

Lic. Sonia Alejandra Ronchetti

Directora de Tesis: Dra. Beatriz Haydeé Duvilanski.

Consejero de estudios: Dr. Dante Agustín Paz.

Lugar de Trabajo: Cátedra de Química Biológica Patológica. Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2014

Efectos del arsénico sobre la adenohipófisis
Mecanismos de acción

RESUMEN

Introducción:

El arsénico es un metaloide ampliamente distribuido en el ambiente el cual presenta potentes efectos tóxicos. La contaminación provocada por arsénico inorgánico (iAs) es uno de los mayores problemas sanitarios a nivel mundial. Si bien se han reportado efectos adversos del iAs sobre la función reproductiva, poco se conoce de sus acciones sobre la liberación hormonal y la fisiología adenohipofisaria.

Objetivos:

1) Estudiar el efecto citotóxico del iAs sobre la fisiología adenohipofisaria y caracterizar los mecanismos de acción.

2) Investigar el papel del iAs como agente xenoestrogénico en la adenohipófisis y el útero.

Resultados:

1) La exposición al iAs, a través del agua de bebida en diferentes concentraciones (5, 25 o 100 ppm) durante 30 días en ratas machos, disminuyó los niveles plasmáticos de prolactina (PRL) en forma dosis dependiente, mientas que la hormona luteinizante (LH) se vio afectada sólo con la máxima concentración utilizada. La administración del metaloide *in vivo* alteró la expresión del ARNm de genes de respuesta al estrés oxidativo en la adenohipófisis sugiriendo que, en estas condiciones, el iAs induce estrés oxidativo en la glándula. Confirmando los resultados *in vivo*, el iAs, en concentraciones micromolares, disminuyó la liberación de PRL en forma

tiempo-dependiente sin afectar la de LH en cultivos primarios de células adenohipofisarias. Además, el iAs redujo la viabilidad celular adenohipofisaria, efecto debido principalmente a la inducción de apoptosis. Este proceso se caracterizó por un incremento de las especies reactivas del oxígeno, la despolarización del potencial de la membrana mitocondrial y un aumento en la expresión del ARNm de MT-1 y HO-1. El tratamiento con el antioxidante N-acetilcisteína previno el efecto citotóxico y la inhibición de la liberación de PRL inducida por iAs.

2) La administración del iAs a dosis bajas (0,1 ppm) durante 30 días a ratas hembras ovariectomizadas (OVX) indujo la aparición de proestros y estros respecto al control OVX. En la adenohipófisis, se observó un estímulo en la proliferación celular, especialmente de los lactotropos y un incremento en la secreción de PRL. Este metaloide también reguló la expresión proteica del REα y de su variante truncada. En el útero, la exposición al metaloide causó modificaciones citoestructurales mostrando un incremento del área glandular y de la altura del epitelio. Además, el iAs alteró la expresión del REα en las células epiteliales y en el estroma.

Conclusiones:

El iAs es un disruptor endocrino cuyos efectos varían con la dosis y el tiempo de exposición. A concentraciones micromolares, el iAs induce apoptosis e inhibe la secreción de prolactina. La generación de estrés oxidativo parece ser el principal mediador de los efectos tóxicos del metaloide. Por otro lado, a concentraciones más bajas, el iAs reproduce las acciones del estrógeno, estimulando la proliferación celular en tejidos hormona-dependientes.

Palabras claves: arsénico, adenohipófisis, prolactina, estrés oxidativo, disruptor endocrino, xenoestrógeno.

Effects of arsenic on anterior pituitary gland Mechanisms of action

ABSTRACT

Introduction:

Arsenic is a metalloid ubiquitously present in the environment with potent toxic effects. Inorganic arsenic (iAs) contamination is considered one of the top environmental health threats worldwide. Many reports have shown that iAs affects reproductive system, however, little is known about the effect of iAs on hormone release and anterior pituitary physiology.

Objectives:

1) To study the cytotoxic effect of iAs on anterior pituitary physiology and describe its mechanisms.

2) To investigate iAs xenoestrogenic role on anterior pituitary and uterus.

Results:

1) iAs exposure (5, 25 or 100 ppm) to male rats through drinking water for 30 days decreased prolactin (PRL) serum levels in a dose-dependent manner whereas luteinizing hormone (LH) levels were affected only at the highest concentration used. *In vivo* iAs administration increased mRNA expression of several oxidative stress-responsive genes in anterior pituitary gland, suggesting that this metalloid induces oxidative stress in pituitary gland. iAs, at micromolar concentrations, significantly decreased PRL release in a time-dependent fashion whereas LH levels remained unaltered in anterior pituitary cells in culture. Besides, iAs reduced cell viability mainly by apoptosis. This

process is characterized by increased levels of reactive oxygen species, early depolarization of mitochondrial membrane potential and augmented expression of some key oxidative stress-responsive genes such as HO-1 and MT-1. The antioxidant N-acetylcysteine prevented iAs-induced cytotoxic effects and prolactin release inhibition.

2) iAs administration at lower doses (0,1 ppm) to female ovariectomized rats (OVX) for 30 days induced the apparition of proestrus and estrus. In the pituitary gland iAs stimulated cell proliferation, especially of lactotroph and increased PRL secretion. This metalloid also regulated protein expression of ERα and its truncated variant. In uterus, iAs exposure caused cytoarchitectural changes by increasing both glandular area and uterine epithelium height. Besides, iAs altered ERα expression in epithelial cells and stroma.

Conclusions:

iAs is an endocrine disruptor whose effects vary with dose and exposure time. At micromolar concentrations iAs induces apoptosis and inhibits PRL secretion. Oxidative stress generation seems to be the main mediator of the metalloid's toxic effects. On the other hand, at lower concentrations, iAs mimics estrogen actions by stimulating cell proliferation on hormone-dependent tissues.

Key words: arsenic, pituitary gland, prolactin, oxidative stress, endocrine disruptor, xenoestrogen.

AGRADECIMIENTOS

A Beatriz, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por confiar en mí. Por empujarme siempre a seguir hacia adelante. Por su apoyo en lo profesional y en lo personal. Por haberme dejado crecer y aprender durante todos estos años, no sólo de ciencia sino también de cómo hacerme más fuerte y más madura.

A mis compañeras de laboratorio:
A Jime, por acompañarme y guiarme durante todo mi doctorado. Por enseñarme TODO y más. Por su inmensa generosidad y comprensión. Por escucharme, aconsejarme y alentarme siempre. Por compartir los momentos difíciles y también los divertidos donde nos reimos hasta no dar más. Por su trato de igual a igual más allá de ser tan grosa!.
A Yani y a Gise por llegar al laboratorio y hacer que los días de trabajo fueran mucho mejores. Por su gran voluntad y compañía. Por aportar nuevas ideas y compartir las risas.

A mis antiguos compañeros de la cátedra de QBP. Especialmente a Fer y a Marité por su ayuda en mis primeros años. Por tantos momentos divertidos en el cuarto de cultivo y por su gran colaboración.

A mis compañeros del INBIOMED:
A los investigadores, becarios, docentes y no docentes de la cátedra. A Mercedes por su ayuda en el bioterio. A la Lic. Cristina Deparci y a la Dra. Melisa Crocco por su asistencia y colaboración en los experimentos histológicos.

A la Dras. María E. Gonsebatt y Silvana I. Nudler por su colaboración en el inicio de este proyecto.

A la Universidad de Buenos Aires, por mi formación académica.

A CONICET, por otorgarme las becas que me permitieron realizar este trabajo.

A mis amigas de la facu, Clari, Delfi, Lu, Ceci, Lucy y Flor. Por estar siempre. Por sus consejos, por nuestras entrañables meriendas. Por compartir tantos momentos desde los primeros años y crecer juntas en este proceso.

A mi querido grupo de Le Parc, Lore, Gianni, July, Grace, Gilda y Patrick. Por su buena onda y los momentos divertidos que tanto ayudaron a despejarme del estudio y el trabajo.

A mi familia.
A mi hermano Pablo.
A mis padres, Ricardo y María Luisa. GRACIAS POR TODO. Por su confianza en mí. Por enseñarme que la perseverancia es la clave del éxito. Por ser mí respaldo fundamental e indispensable. Por su inmensa ayuda y tanto cariño.

A Gastón, por ser mi cable a tierra durante estos años. Por su apoyo y su paciencia. Por ayudarme a superar los momentos difíciles sin dejarme bajar los brazos nunca. Por estar siempre atento y cuidar de mí. Por acompañarme tantas veces al laboratorio (sábados, domingos, feriados y hasta a cualquier hora). Por darme tanto impulso y hacerme tan feliz. Porque sin tu compañía nada de esto hubiera sido posible.

A mis padres

A Gastón

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Pág. 1

2. OBJETIVOS Pág. 31

3. ESTUDIO DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL ARSÉNICO

3.1. OBJETIVO I Pág. 32
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS I Pág. 33
3.3. RESULTADOS I Pág. 46
3.4. DISCUSIÓN I Pág. 71

4. ESTUDIO DEL ARSÉNICO COMO AGENTE XENOESTRÓGENICO

4.1. OBJETIVO II Pág. 84
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS II Pág. 85
4.3. RESULTADOS II Pág. 92
4.4. DISCUSIÓN II Pág. 111

5. CONCLUSIONES Pág. 121

6. REFERENCIAS Pág. 124

APÉNDICE: Abreviaturas Pág. 145

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El Arsénico

Consideraciones históricas

El arsénico (As) ha sido uno de los elementos más tristemente mencionados durante la Edad Media e incluso Moderna, aunque fuera conocido antes por los chinos, romanos y griegos. El nombre de *arsenikon*, que se dio al elemento en la Edad Media, es de raíz griega y significa potente, viril, aunque también puede derivar del persa *az-zarnikh*, que significa amarillo u oro.

Los compuestos del As y azufre, oropimente y rejalgar, también conocidos como arsénico amarillo y rojo, respectivamente, se conocen desde la antigüedad. Los egipcios, asirios, griegos y romanos los emplearon como pigmentos en pinturas y cosméticos, mientras que el color amarillo brillante del oropimente hizo de este mineral un atractivo candidato a ser transmutado en oro, objetivo perseguido por los alquimistas a lo largo de los siglos.

A pesar de sus conocidas propiedades tóxicas, los compuestos del As también se han empleado con fines terapéuticos. Hipócrates utilizó las sales del As para "curar" varias aflicciones, incluyendo el cáncer, úlceras, reumatismo, tuberculosis, asma y enfermedades venéreas, dándole una curiosa ironía a su juramento: "Antes que nada, no hay que hacer daño". Los tónicos de As tales como las soluciones de Fowler, De Valagin y Donovan fueron inventadas en los años 1700s para curar un amplio espectro de dolencias, el uso de las cuales continuó hasta comienzos del siglo XX.

El As ha sido universalmente conocido por considerarse el veneno más famoso de la historia. Este elemento fue uno de los más utilizados desde que el ser humano inició el *noble arte de envenenar*. Tanta fue su popularidad, que entre los años 1600 y 1700, el 80% de los envenenamientos en Francia fueron causados por el As o sus combinaciones químicas. Así es que fue llamado "Polvo de

sucesión", por ser el instrumento utilizado para adquirir una herencia o alcanzar un puesto.

En el tiempo de Nerón, siglo I, una mujer gala, llamada Locusta, era la experta proveedora de la realeza de las dosis de As necesarias para eliminar a quien la estorbara. De esta manera, Nerón se deshizo de Británico, el heredero legítimo al trono, y de muchos más. El número de envenenados fue tan grande, que el siguiente emperador, Galba, mandó a matar a Locusta.

En el renacimiento italiano, quien recibía una invitación a la mesa de la familia del papa Alejandro VI, o de su hijo César Borgia, tenía gran probabilidad de no seguir vivo al día siguiente. Los Borgias empleaban un veneno a base de As llamado "Cantarella" por los gritos, lamentos y convulsiones que emitían los envenenados en su fase final. Así, en la cima de la corrupción del poder, eliminaron a cuanto enemigo obstaculizara sus proyectos.

Durante la primera mitad del siglo XIX el As formó parte de un tinte verde, inventado por el químico sueco Carl Scheele (verde de Scheele), que se utilizó profusamente para teñir ropas, forros de muebles y un papel pintado muy de moda en la época victoriana que mató literalmente a miles de personas, incluyendo al mismísimo Napoleón en su exilio en Santa Elena.

Las dificultades para comprobar el envenenamiento por As, explicaban en gran medida la popularidad de su uso entre los envenenadores. En 1836, el químico inglés James Marsh, ayudante de Michael Faraday, desarrolló un método analítico eficaz y preciso que permitió detectar cantidades pequeñas de este elemento en los cadáveres. Este hecho dio inicio a la química forense y redujo la impunidad de los envenenadores.

Características físico-químicas

El As es un elemento natural ampliamente distribuido en el ambiente. En la tabla periódica se encuentra formando parte del grupo VA, compartiendo características con el nitrógeno, el fósforo y el bismuto. Su número atómico es 33 y posee una masa atómica de 74,92.

El As es un metaloide pues tiene propiedades intermedias entre los metales y los no metales; característica que le permite formar aleaciones con metales, y también enlaces covalentes con carbono, hidrógeno y oxígeno (WHO, 1981; Yip y Dart, 2001).

Este elemento se puede encontrar en la naturaleza tanto en formas químicas orgánicas como inorgánicas, así como en diferentes estados de oxidación: elemental (0), trivalente (+3 o -3) o pentavalente (+5), dependiendo de las condiciones ambientales. Las formas más frecuentes de As inorgánico (iAs), el arsenito (iAs^{3+}) y el arsenato (iAs^{5+}), se encuentran mayoritariamente en el ambiente, en especial en el agua, y su estabilidad depende de su valencia y de la naturaleza del medio; en un ambiente básico y oxigenado se favorece la formación del arsenato mientras que, en un medio ácido, se favorece la formación del arsenito (Wildfang, 2000; Duker, 2005).

Distribución del As en el mundo y fuentes de liberación al ambiente

El origen del As varía de acuerdo con la zona que se considere. Se han reportado áreas endémicas, con un alto contenido de este metaloide en el agua de bebida, en múltiples lugares del mundo tales como Argentina, Bangladesh, Bolivia, Chile, China, India, México, USA y Taiwán entre otros (**Figura 1**), donde han sido observados muchos signos y síntomas de arsenicismo (Epidemiología del Hidroarsenicismo, 2006; Kuladip y col., 2006; Abernathy y col., 1999). En América, a excepción de algunos pocos casos, el origen del As es

natural y está relacionado con el vulcanismo y la actividad hidrotermal asociada a la cordillera que se extiende desde Alaska a Tierra del Fuego.

Particularmente en la Argentina, las regiones afectadas por As comprenden parte de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, La Pampa, Santiago del Estero, Chaco, Formosa, Salta, Jujuy, entre otras (Epidemiología del Hidroarsenicismo, 2006).

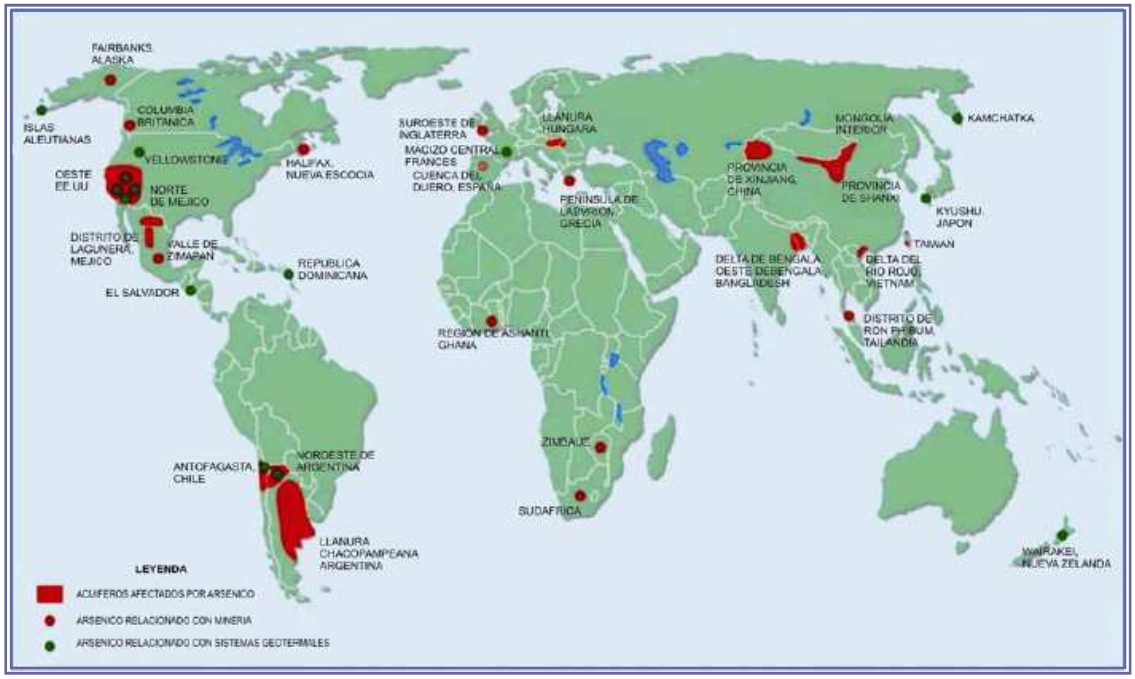


Figura 1. Distribución mundial de acuíferos con alto contenido de As (Adaptada de Smedley y Kinniburgh, 2002.)

La liberación del As al ambiente es el resultado tanto de las actividades naturales como de las actividades humanas. Entre las fuentes naturales más importantes se encuentran las erupciones volcánicas y la erosión de las rocas. Luego el As se dispersa tanto por las aguas subterráneas como por las superficiales, las cuales constituyen la principal vía de distribución de este metaloide en el ambiente y aun en sitios muy alejados de su fuente primaria.

Dentro de las fuentes antropogénicas, el As puede liberarse al ambiente como resultado del proceso de fundición de minerales como el cobalto, el níquel, el plomo y el zinc. Otra fuente importante de contaminación es la utilización del As en la elaboración de numerosos insecticidas y herbicidas, en

la conservación de la madera, en la manufactura del vidrio y en la industria electrónica como componente de los semiconductores (ATSDR, 2007).

Rutas de exposición

La principal fuente de exposición al As es el consumo de agua y/o alimentos contaminados (**Figura 2**). La contaminación del agua con iAs puede ocurrir por la erosión de minerales, la descarga de efluentes industriales o la sedimentación atmosférica. El As se encuentra generalmente como iAs en el agua y el grado de oxidación depende de la exposición que el agua haya tenido con el aire: mientras que en las superficiales se encuentra mayoritariamente la forma pentavalente, en las subterráneas predominan las formas trivalentes (Basu y col., 2001).

Debido al uso de plaguicidas que contienen As como ingrediente activo, o al contacto con aguas de riego contaminadas, ciertos alimentos de origen animal o vegetal tienen la capacidad de acumular As de manera que el consumo de los mismos es una posible fuente de intoxicación (Morgan, 2001). También los peces, bivalvos y crustáceos tienen la capacidad de acumular formas orgánicas del As como la arsenobetania o arsenocolina que no se consideran tóxicas y son excretadas en la orina 48 h después de haber sido ingeridas (ATSDR, 2007).

En zonas industriales donde se produce el refinamiento de ciertos metales, el As se libera al ambiente en pequeñas partículas, que pueden ser inhaladas o absorbidas por la piel, causando así la intoxicación de los trabajadores (intoxicación ocupacional) y de los residentes de la zona (Morgan, 2001).

La exposición al As también puede ocurrir por contacto dérmico debido al uso de preservantes de la madera que contienen As en su composición. La exposición dérmica puede provocar el desarrollo de enfermedades pero en una proporción menor que la causada por la ingesta o la inhalación (ATSDR, 2007).

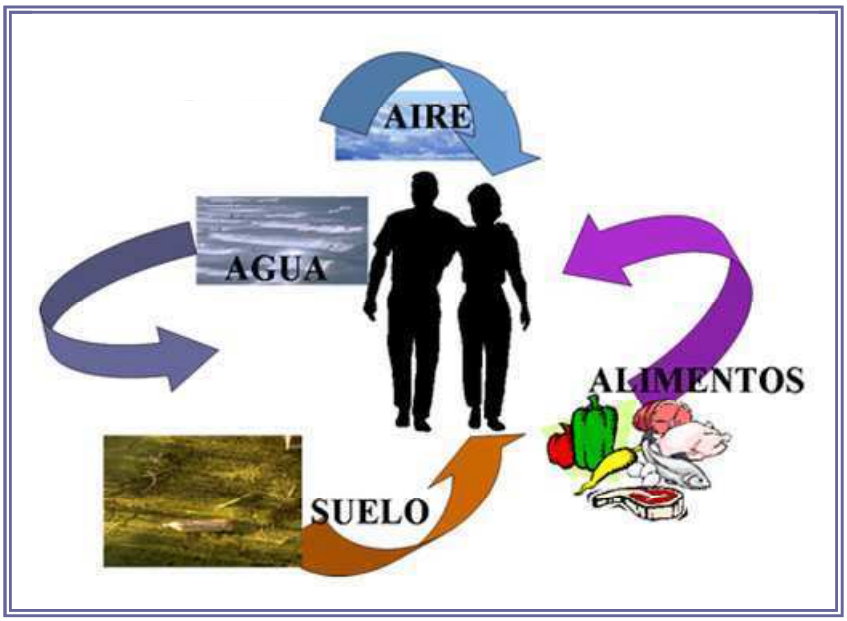


Figura 2. Principales rutas de exposición al As

Destino biológico del As en el organismo y metabolización

En los humanos entre el 60-80% del As ingerido es rápidamente absorbido por el tracto gastrointestinal (Rossman, 2007) y luego es distribuido por todo el cuerpo a través del torrente sanguíneo. La distribución del As en el organismo es altamente dependiente de su forma química, de la dosis ingerida, de la vía de administración y de la especie en estudio (Wildfang y col., 2000). La vida media del As en los humanos es de aproximadamente 10 h (Rossman, 2007). La excreción de este metaloide ocurre principalmente a través de la orina, pero también puede ser eliminado en menor proporción por otras rutas como las heces, el sudor y la descamación de la piel. Después de 2 a 4 semanas del cese de la exposición, la mayor parte del As que se encuentra en el organismo corresponde a formas trivalentes que se acumulan en tejidos ricos en queratina como la piel, el pelo y las uñas (Lansdown, 1995). Es así como los niveles de As encontrados en orina son indicadores de exposición reciente, mientras que los encontrados en el pelo y las uñas se consideran marcadores de exposición crónica (Jones, 2007).

El mecanismo por el cual el As ingresa a las células depende de su grado de oxidación. Las formas trivalentes utilizan los canales multifuncionales de acuagliceroporinas (Liu y col., 2002), mientras que las formas pentavalentes ingresan a través del transportador no específico de aniones y de otros sistemas de transporte de fosfatos y sulfatos (Andrew y col., 2003).

La biometilación es el principal mecanismo de metabolización del As en los seres humanos. Este proceso es catalizado por la enzima arsénico 3-metiltransferasa (AS3MT) y se caracteriza por dos tipos de reacciones: la primera consiste en una reducción que permite el paso del As pentavalente a As trivalente y la segunda reacción es la metilación en la cual la AS3MT, utilizando la S-adenosilmetionina como dador de grupos metilo y la forma reducida del glutatión (GSH) como cofactor, cataliza la transferencia de grupos metilo al As trivalente generando secuencialmente productos mono-, bi- o trimetilados (**Figura 3**). La AS3MT es una enzima citosólica altamente conservada a lo largo de la escala zoológica, lo cual denota la importancia del proceso de biometeliación del As. El hígado es el órgano metabolizador del As por excelencia aunque también puede suceder en otros tejidos en menor medida (Thomas, 2007).

Las formas metiladas del As son más fácilmente excretadas que las formas inorgánicas, por lo que durante mucho tiempo se ha considerado a este proceso como una ruta de detoxificación. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las formas intermedias metiladas de As trivalente son mucho más toxicas que el iAs (Styblo y col., 2000; Kligerman y col., 2005). Estos datos sugieren que la metabolización podría ser un proceso de bioactivación más que un proceso de detoxificación.

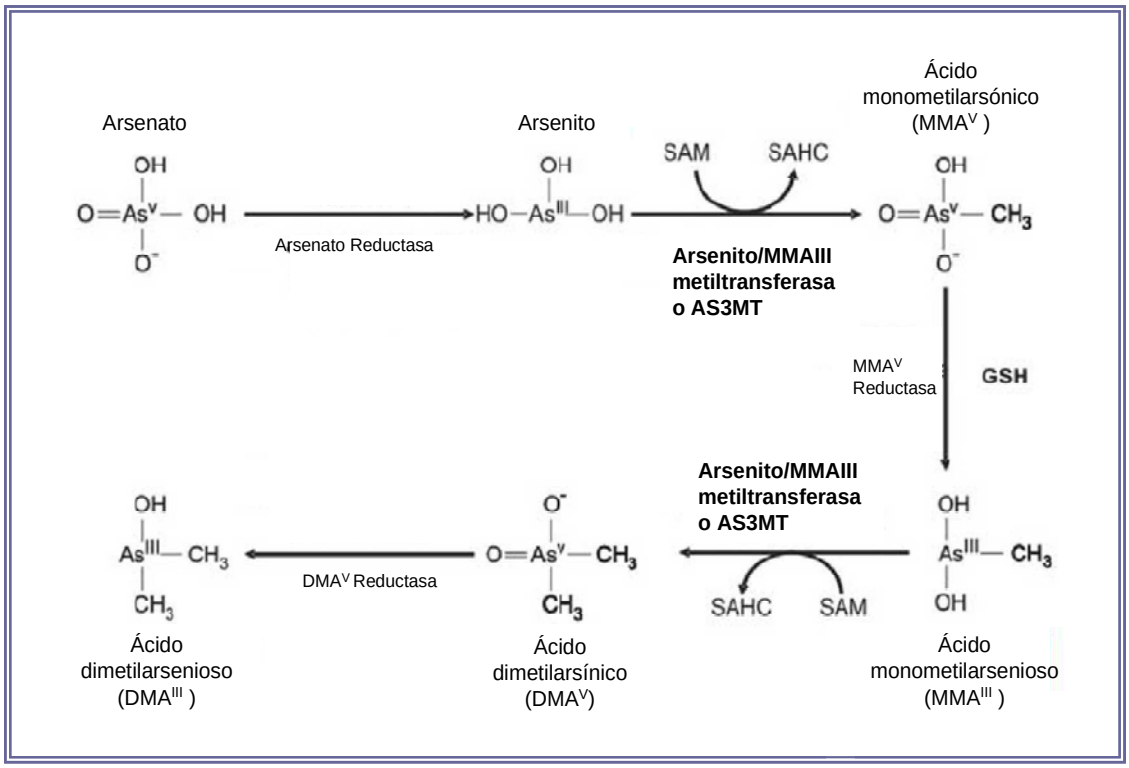


Figura 3. Esquema de la biometilación del As (Adaptada de Marnell y col., 2003.)

Efectos del As sobre la salud

La mayoría de los compuestos del As son altamente tóxicos y son causantes de diversas enfermedades (Basu y col., 2001). La IARC (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer) consideró que existían suficientes evidencias para clasificar al As dentro del Grupo I, integrado por los carcinógenos humanos (IARC, 1987). El As afecta prácticamente a casi todos los órganos del cuerpo humano, ya que interfiere con una variedad muy amplia de reacciones enzimáticas celulares.

El grado de toxicidad del As y el riesgo para la salud humana se encuentra asociado a la especie química, a la concentración y al tipo y tiempo de exposición al metaloide (Morgan, 2001).

Las consecuencias de una intoxicación aguda (dosis altas durante un tiempo corto) frecuentemente se detectan a las pocas horas de exposición y se manifiestan como un síndrome gastrointestinal severo con diarreas que

continúa con edema pulmonar, orina sanguinolenta, convulsiones y problemas cardíacos, pudiendo llegar al shock con coma y a la muerte (Morgan, 2001).

Los efectos de una intoxicación crónica suelen manifestarse entre los 5 y 20 años y difieren dependiendo de la concentración. La exposición a dosis bajas durante un tiempo prolongado causa un malestar general que incluye pérdida del peso corporal, cólicos, diarreas, mialgias y, en otros casos de mayor gravedad, dermatitis exfoliativas.

El *hidroarsenicismo* es el resultado de la exposición crónica a través del consumo de agua contaminada con concentraciones mayores a 10 ppb de As. El hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE) es una enfermedad que se caracteriza por presentar lesiones en la piel y alteraciones sistémicas cancerosas y no cancerosas. Los síntomas más frecuentes comprenden: lesiones en la piel (hiperhidrosis palmoplantar, hiperqueratosis palmoplantar, dermatitis alérgicas, melanodermia, etc.), desordenes cardiovasculares e hipertensión, disfunciones hepáticas y cambios hematológicos (Andersen y col., 1999; Brown, 1999; Rahman y col., 2001). Además de los efectos dérmicos se ha descripto la enfermedad del pie negro (*blackfoot disease*), grave enfermedad vascular periférica que conduce a la gangrena de las extremidades inferiores (Brown y Fan, 1994). Esta enfermedad se ha reportado entre los habitantes de Taiwán y se cree está relacionada con el consumo de agua contaminada con altos niveles de As y la mala nutrición poblacional de la zona. El HACRE se ha relacionado con un aumento en la incidencia de cáncer de piel, de pulmón y de vejiga entre otros (Hughes, 2002; Wang y col., 2002). Además, otros efectos no cancerígenos incluyen enfermedades neurológicas, conductuales y cognitivas así como también reproductivas, diabetes tipo II y problemas del desarrollo (NRC, 1999; Calderon y col., 2001; ATSDR, 2007).

La contaminación de agua con As es un serio problema de salud pública a nivel nacional y mundial debido al poder carcinógeno y neurotóxico de este elemento. Dada la gravedad de estos efectos, los niveles ambientales del As son objeto de diversas regulaciones con el fin de reducir las exposiciones consideradas peligrosas para la salud. Estas preocupaciones impulsaron a la

Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA U.S.) a reducir los niveles máximos permitidos de As en el agua potable de 50 a 10 ppb (0,67 a 0,13 μM). Sin embargo, teniendo en cuenta que concentraciones mucho más bajas que las permitidas también implican efectos nocivos para la salud, la EPA propone reducir la presencia de este metaloide a niveles aún menores en las aguas de consumo (WHO, 2001).

El eje hipotálamo-hipofisario

El eje hipotálamo-hipofisario juega un rol fundamental en la homeostasis y la supervivencia del organismo. Esta unidad regula funciones fisiológicas básicas como el crecimiento, el metabolismo, la reproducción y el comportamiento. El eje hipotálamo-hipofisario es un punto de encuentro entre los sistemas nervioso y endocrino.

El hipotálamo es una estructura nerviosa situada en la base del encéfalo que procede del diencéfalo primitivo. Este sitio actúa como un centro integrador que coordina mensajes del entorno, ritmos, patrones de desarrollo endógenos y señales corporales para evocar respuestas autonómicas y endocrinas.

La hipófisis es una glándula situada bajo el piso del diencéfalo, que se encuentra en íntima relación con el hipotálamo a través de la eminencia media y el tallo pituitario (Page, 1994). Está constituida por la adenohipófisis (hipófisis anterior) y la neurohipófisis (hipófisis posterior) (**Figura 4**). La adenohipófisis es principalmente glandular y presenta una composición celular heterogénea en la que se pueden identificar varios tipos celulares que pueden ser clasificados en células secretoras y no secretoras. Existen cinco tipos de células secretoras caracterizadas de acuerdo al tipo de hormona almacenada en sus gránulos de secreción: los lactotropos (prolactina, PRL), los somatotropos (hormona de crecimiento, GH), los gonadotropos (hormona folículo estimulante, FSH y hormona luteinizante, LH), los corticotropos (adrenocorticotrofina, ACTH) y los tirotropos (hormona estimulante de la tiroides, TSH). Además, esta glándula posee un tipo celular no secretor, las células folículo estrelladas, que mantienen uniones comunicantes con las células secretoras y comparten algunas características con las células fagocíticas mononucleares (Vankelecom y col., 1992; Page, 1994). Las células secretoras se encuentran en diferentes proporciones que dependen del sexo, de la edad y del estado fisiológico del individuo. En ratas hembras, alrededor de un 40-50% de la adenohipófisis está compuesta por lactotropos (Chen, 1987), aproximadamente un 20% por

somatotropos (Dada y col., 1984), un 5-10% por gonadotropos (Dada y col., 1983), un 3% por corticotropos y un 3% por tirotropos (Dada y col., 1984). En ratas machos estas proporciones se modifican ligeramente, siendo algo mayor la de somatotropos (Dada y col., 1984).

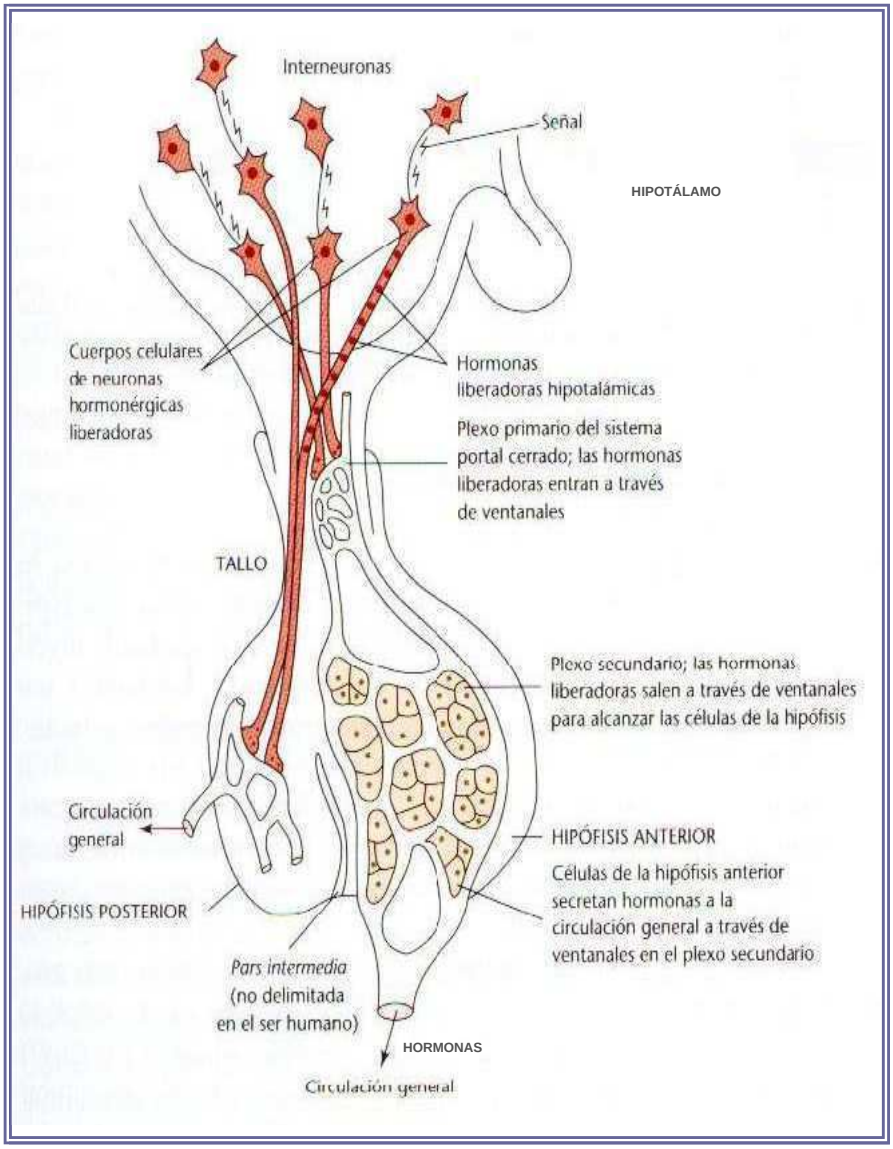


Figura 4: Conexión hipotálamo-hipófisis. La hipófisis, constituida por la adenohipófisis (hipófisis anterior) y la neurohipófisis (hipófisis posterior), está conectada con el hipotálamo a través de la eminencia media y el tallo pituitario.

Regulación de la secreción hormonal adenohipofisaria

A partir de la información proveniente de diversos tejidos tanto centrales como periféricos, el hipotálamo regula la liberación de las distintas hormonas adenohipofisarias, que a su vez, controlan el funcionamiento de tejidos y glándulas periféricas tales como la glándula tiroides, la glándula adrenal y las gónadas. Asimismo, la adenohipófisis y el hipotálamo son controlados por las hormonas de los órganos blancos a través de mecanismos de retroalimentación (**Figura 5**).

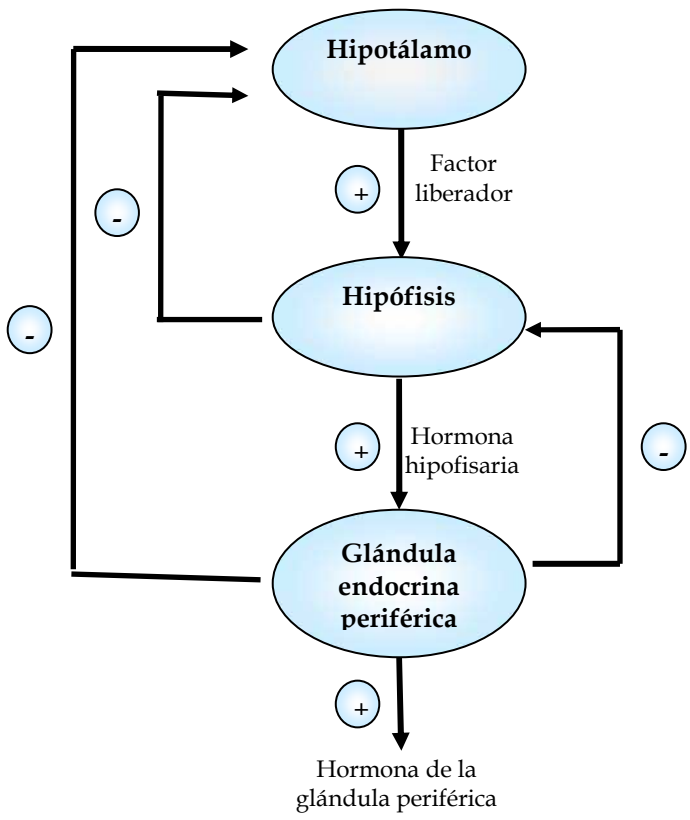


Figura 5: Esquema de los caminos clásicos de señalización en el eje hipotálamo-hipófisis-glándula periférica. Las células de la adenohipófisis responden a factores liberadores hipotalámicos secretando la hormona correspondiente hacia la circulación general. Esta hormona ejerce su efecto en una glándula periférica blanco y puede actuar también sobre el hipotálamo generando un circuito inhibitorio y reduciendo la liberación del factor estimulador. La glándula periférica responde secretando su propia hormona, que tiene efecto sobre otros tejidos y forma otro circuito inhibitorio reduciendo la secreción de la hormona adenohipofisaria al actuar tanto a nivel de la hipófisis como del hipotálamo.

El proceso de secreción hormonal en la adenohipófisis ha sido extensamente estudiado. De los cinco tipos de células endocrinas que integran la adenohipófisis, cuatro de ellos responden a un factor liberador hipotalámico específico que actúa como secretagogo y a la vez como factor trófico. La hormona liberadora de GH (GHRH) es el regulador más importante de la

fisiología de los somatotropos (Mayo y col., 2000), la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) lo es para los gonadotropos (Conn y col., 1987), así como la hormona liberadora de TSH (TRH) ejerce su efecto sobre los tirotropos (Gershengorn, 1986) y la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) sobre los corticotropos (Turnbull y Rivier 1997).

Los lactotropos, por el contrario, son el único tipo celular adenohipofisario que no posee un factor hipotalámico específico que se comporte como estimulador de la secreción de PRL y a la vez como factor trófico (Freeman y col., 2000). Este tipo celular, a diferencia de los otros, posee una actividad secretora espontánea alta y dicha secreción se encuentra bajo un control tónico inhibitorio ejercido desde hipotálamo (Langer y col., 1978). El principal factor hipotalámico inhibidor de la secreción de PRL es la dopamina. Le siguen, con diferente potencia inhibidora, factores hipotalámicos e intrahipofisarios tales como el GABA (ácido γ-aminobutírico), la serotonina, la acetilcolina, la somatostatina, el óxido nítrico y la propia PRL (Racagni y col., 1979; Matsushita y col., 1983; Duvilanski y col., 1985; Duvilanski y col., 1995; Freeman y col., 2000; Ben-Jonathan y Hnasko, 2001).

Respecto a los factores estimuladores de la secreción de PRL existe una gran variedad los cuales actúan directamente sobre los lactotropos. Éstos son sintetizados a nivel hipotalámico, en la hipófisis o en tejidos periféricos. Entre los más estudiados se encuentran: estrógenos, TRH, oxitocina, vasopresina, péptido intestinal vasoactivo, angiotensina II, sustancia P, neurokinina A, neurotensina y péptido liberador de PRL (Freeman y col., 2000; Kawamata y col., 2000). Los lactotropos expresan receptores específicos para cada uno de estos factores u hormonas estimuladoras, los cuales están acoplados a distintas vías de segundos mensajeros que llevarán en última instancia a un aumento de la concentración intracelular de calcio y a la secreción de PRL. De los factores nombrados anteriormente, los estrógenos cumplen un papel preponderante ya que además estimulan la proliferación de los lactotropos (Freeman y col., 2000).

La secreción hormonal adenohipofisaria también es regulada por otros factores u hormonas periféricas e intrahipofisarias, así como por factores

circadianos y ambientales (Neill y col., 1971; Terkel y col., 1972; Lamberts y Macleod, 1990).

Efectos de las hormonas adenohipofisarias sobre las gónadas

La PRL es una hormona vital que participa en múltiples procesos fisiológicos, tales como el crecimiento y el desarrollo, la reproducción y la lactancia, el funcionamiento del sistema inmune, la respuesta al estrés y la conducta (Freeman y col., 2000). Su función más conocida es aquella relacionada al desarrollo y crecimiento de la glándula mamaria. En el ovario, la PRL estimula la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo, pero también está involucrada junto a otros factores en la atrofia del mismo (Bachelot y Binart, 2007). En machos, estimula la función testicular. En las células de Leydig, la PRL se encuentra involucrada en el mantenimiento de la morfología celular, en el incremento del número de receptores de LH y, junto con la LH, incrementa la esteroideogénesis y la producción de andrógenos (Aragona y col., 1977; Bex y col., 1978; McNeilly y col., 1979). Sobre la próstata, sus efectos se relacionan al aumento del peso de este órgano, estimulación de la proliferación y secreción del epitelio prostático e incremento en los niveles de andrógenos (Harkonen 2003; Robertson y col., 2003).

Las hormonas gonadotrópicas, FSH y LH, inducen y favorecen la maduración gonadal y la esteroideogénesis. En la hembra, la FSH estimula el crecimiento folicular y la secreción de estrógenos. En el macho, promueve la espermatogénesis y también favorece la aparición de receptores de LH en las células de Leydig (Kumar y col., 1997; Holdcraft y Braun, 2004). Por su parte, la LH regula la producción de esteroides gonadales. En hembras, desencadena la ruptura y luteinización del folículo, el cual inicia la secreción de progesterona. En machos, estimula la secreción de testosterona en las células de Leydig, contribuyendo de esta manera a la espermatogénesis (Themmen y Huhtaniemi, 2000; Nussey y Whitehead, 2001; Kumar, 2007).

Mecanismos de acción del arsénico

Los efectos del iAs a nivel celular pueden variar con la dosis, el tiempo de exposición y el tipo celular. Este metaloide, al igual que muchos otros agentes tóxicos, ejerce efectos no monotónicos. El iAs, a concentraciones micromolares, se comporta como un agente citotóxico alterando el equilibrio natural de oxidación-reducción de la célula a través de varios mecanismos que pueden llevar a la muerte celular (Ercal y col., 2001). Por otro lado, estudios recientes muestran que el iAs a concentraciones nanomolares es capaz de actuar como un disruptor endocrino y estimular la proliferación celular. Estos efectos han sido observados en células de la línea tumoral de mama hormona-dependiente MCF-7 (Stoica y col., 2000).

El iAs como agente citotóxico

Existen numerosos trabajos que describen los mecanismos de acción por los cuales el iAs genera daño celular. En diversos estudios se ha visto que el iAs causa muerte celular por la inducción de la apoptosis en distintos tipos celulares (Khan y col., 2011; Shi y col., 2010). Sin embargo, también se ha demostrado que el iAs puede inducir otros tipos de muerte celular tales como la necrosis y la autofagia (Bolt y col., 2010). Los principales mecanismos por los cuales el iAs induce apoptosis incluyen la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), la disrupción del potencial de la membrana mitocondrial, la inducción de caspasas y la activación de las vías de señalización de p53 y de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Bode y Dong, 2001; Pulido y Parrish, 2003). La toxicidad de los compuestos del iAs depende de su estado de oxidación, siendo las formas trivalentes más tóxicas que las formas pentavalentes. Las formas trivalentes del iAs presentan una elevada afinidad por los grupos tioles de las proteínas (especialmente grupos –SH) (Naranmandura y col., 2006). Esta alta reactividad afecta la estructura y la función de numerosas enzimas implicadas en diversos procesos como el

metabolismo, la respiración, la señalización celular y la reparación y metilación del ADN.

Por otro lado las formas pentavalentes del iAs actúan sustituyendo al fosfato en compuestos de alta energía como el ATP. El reemplazo del anión fósforo por el iAs pentavalente genera una rápida hidrólisis de los enlaces de alta energía provocando el desacople de la fosforilación oxidativa durante la respiración celular (Miller y col., 2002; Jones, 2007).

El estrés oxidativo es actualmente el mecanismo más estudiado y aceptado para explicar la citotoxicidad del iAs (Ercal y col., 2001). Este proceso tiene lugar cuando ocurre una ruptura del equilibrio entre la producción de ROS y la respuesta de los sistemas de defensa antioxidantes (Scandalios, 2005). La acumulación de ROS puede conducir a la oxidación de distintas macromoléculas. Estas especies causan el daño oxidativo de los lípidos en un proceso conocido como "peroxidación lipídica", el cual genera alteraciones en las membranas biológicas. Además, las ROS provocan la oxidación de proteínas lo cual conduce a la pérdida o modificación de su función. Las ROS pueden causar daño al ADN actuando de manera directa, produciendo roturas simples o de doble cadena o causar sitios AP (apurínicos o apirimidínicos) y de manera indirecta afectando la apoptosis, las rutas de señalización y la proliferación celular (**Figura 6**).

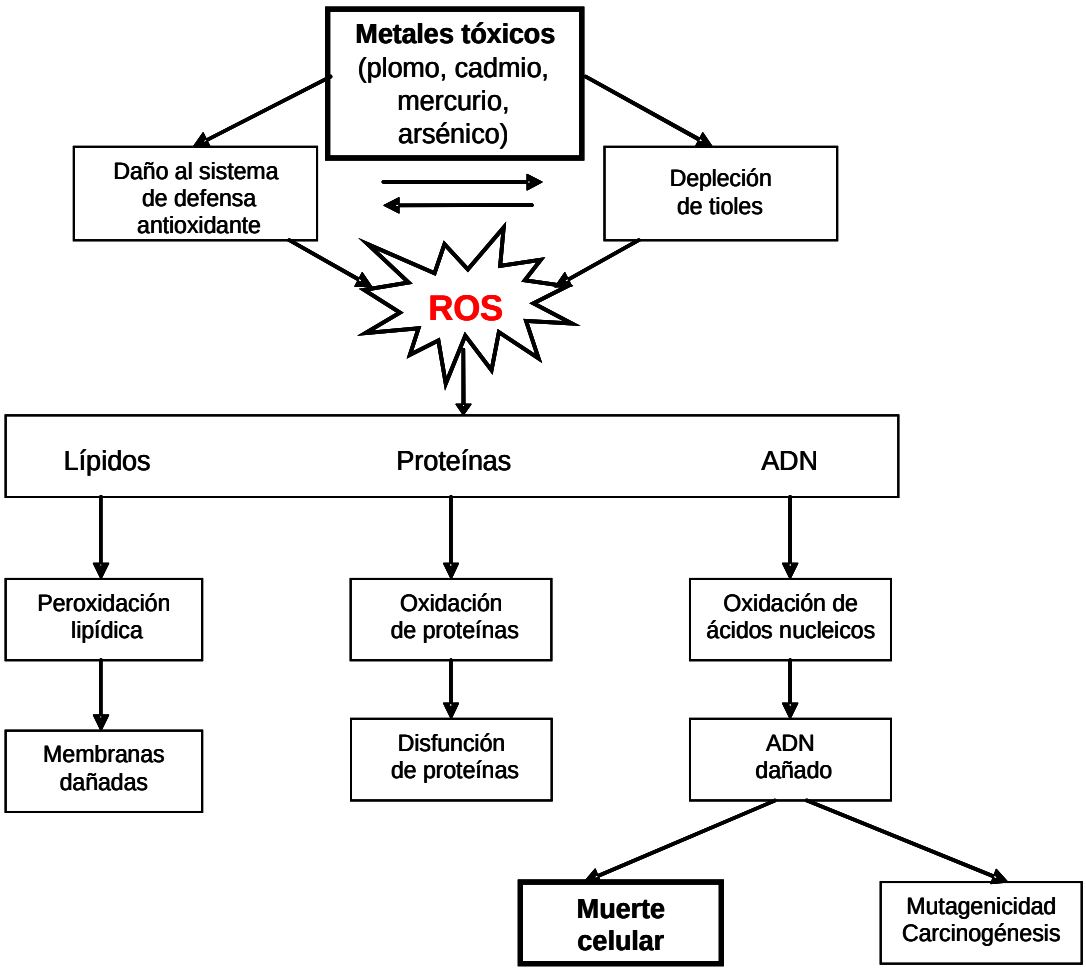


Figura 6. Efectos celulares del estrés oxidativo inducido por metales tóxicos (Adaptada de Ercal y col., 2001.)

Las especies reactivas del nitrógeno (RNS) como el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) también cumplen un rol importante en la generación del estrés oxidativo inducido por el iAs (Rossman, 2003; Hei y Filipic, 2004).

La mitocondria es una de las fuentes más importantes de la producción de ROS. Existen evidencias que indican que el aumento de ROS inducido por el iAs afecta directamente el potencial de la membrana interna de la mitocondria y altera su permeabilidad. Como consecuencia de ello se produce la liberación del citocromo *c* al citoplasma y la consiguiente activación de la vía de las caspasas, convergiendo en la apoptosis (Larochette y col., 1999).

Otra fuente de generación de ROS es la metabolización del iAs y la oxidación del arsenito a arsenato, lo cual lleva principalmente a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales libres como los aniones superóxido ($O_2^{\cdot -}$), hidroxilo ($OH^{\cdot}$) y peroxilo (ROO^-).

Los sistemas de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos de los organismos tienen como función impedir y contrarrestar el daño oxidativo generado por un exceso en la producción de las ROS. Tanto en el citosol como en algunas organelas se encuentran presentes enzimas cuya función es la detoxificación de las ROS. Dentro de las más importantes se encuentran: la superóxido dismutasa (SOD) que detoxifica el $O_2^{\cdot -}$ y genera H_2O_2; la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), encargadas de la eliminación del H_2O_2 y la glutatión reductasa (GR), cuya función se encuentra asociada a la GPx, ya que se encarga de la regeneración del glutatión (GSH) que utiliza esta enzima para lo cual requiere la presencia del NADPH.

Se ha descripto que el iAs afecta la actividad de estas enzimas antioxidantes. Generalmente la exposición al iAs a concentraciones micromolares y durante un tiempo corto causa un incremento en la actividad de estas enzimas, mientras que la exposición al iAs durante tiempos prolongados genera una reducción en la actividad de las mismas (Shi y col., 2004).

Dentro de las defensas antioxidantes no enzimáticas el componente más importante y de mayor abundancia es el GSH. Este tripéptido, formado por glutamato, cisteína y glicina, se localiza en el citoplasma en concentraciones micromolares (O'Brien y col., 2003). Además de actuar como cofactor de varias enzimas, el GSH está involucrado en el mantenimiento del estado redox celular y posee una importante capacidad antioxidante *per se* ya que puede reaccionar directamente con las ROS. Durante este proceso, el GSH es transformado a glutatión oxidado (GSSG) el cual es posteriormente regenerado a GSH por la enzima GR.

Se ha observado que la exposición crónica al iAs causa la depleción del contenido de GSH en ratas (Maiti y Chatterjee, 2001). Este efecto puede

explicarse por la utilización del GSH durante el proceso de metabolización del iAs o bien por la unión directa del iAs a los grupos tioles presentes en esta molécula. Por otro lado, la exposición al iAs durante cortos períodos de tiempo puede inducir un incremento en los niveles de GSH facilitando la biosíntesis *de novo* de esta molécula a través de la estimulación de la expresión génica de la enzima glutamato-cisteína ligasa (Thompson y col., 2009).

Marcadores de estrés oxidativo

La restauración de la homeostasis celular frente a un daño oxidativo involucra la utilización de herramientas preexistentes y simultáneamente la activación o el silenciamiento de diferentes genes. Estos genes codifican para factores de transcripción, proteínas de fase aguda, enzimas y proteínas estructurales que desencadenan la respuesta antioxidante específica y persistente (Müller y col., 1997; Dalton y col., 1999). Estos factores y enzimas que participan en la respuesta celular primaria son conocidos como "marcadores de estrés oxidativo". Entre ellos podemos nombrar el factor nuclear eritroide 2- factor derivado 2 (Nrf2), la hemooxigenasa-1 (HO-1), las metalotioneínas (MTs) y la tiorredoxina- 1 (TRX-1).

El Nrf2 es un factor de transcripción que cumple un papel trascendental en la activación transcripcional de diversos genes involucrados en el sistema de defensa celular. En respuesta a un insulto oxidativo esta proteína es capaz de traslocarse al núcleo donde se une al elemento de respuesta a antioxidantes (ARE) presente en las regiones promotoras de numerosos genes tales como la HO-1 (Motohashi y Yamamoto, 2004). Se ha reportado que el Nrf2 está involucrado en la respuesta celular contra la generación de estrés oxidativo provocada por el iAs (Pi y col., 2008; Du y col., 2008).

Otra de las respuestas iniciales frente a un estímulo oxidativo es la inducción de la enzima HO-1. Esta proteína de 32 kDa forma parte de la maquinaria antioxidante de las células y cumple un papel citoprotector en numerosos tejidos (Morse y Choi, 2002; Otterbein y col., 2003; Poon y col., 2004).

La HO-1 cataliza el paso limitante de la degradación del grupo hemo generando monóxido de carbono, hierro libre y biliverdina, siendo esta última un importante agente citoprotector con capacidad antioxidante (Bauer y Bauer, 2002). Se ha demostrado que la exposición al iAs, tanto *in vitro* como *in vivo*, incrementa los niveles de expresión de la HO-1 en células de diferentes tejidos (Otterbein y Choi, 2000; Liu y col., 2001; Li y col., 2013).

Las MTs son proteínas de bajo peso molecular, ricas en residuos de cisteínas que poseen una alta afinidad por los metales pesados y metaloides. Además de unirse a los metales, las MTs tienen la capacidad de secuestrar las ROS contribuyendo así a la protección celular frente al estrés oxidativo (Theocharis y col., 2003). Existen varias isoformas de MTs que protegen a las células de los distintos agentes oxidantes. Las MT-1 y MT-2 se expresan prácticamente en todos los tejidos del organismo y son inducibles por metales pesados/metaloides, hormonas y en situaciones de inflamación y estrés. Por el contrario, las MT-3 y MT-4 presentan una distribución mucho más restringida, localizándose fundamentalmente en el sistema nervioso central y el epitelio escamoso estratificado respectivamente (Cherian y col., 2003; Quaife y col., 1994). Debido al efecto protector que ejercen las MTs contra los metales contaminantes, se ha propuesto el uso de estas proteínas como potenciales biomarcadores de exposición a metales tóxicos (Liu y col., 2007). Diversos estudios han mostrado que la exposición al iAs estimula la expresión de las MTs (Albores y col., 1992; Zhou y col., 2006; Falnoga y col., 2012).

Las TRX constituyen otro tipo de proteínas que están involucradas en el mantenimiento del ambiente redox celular. Estas enzimas de bajo peso molecular se caracterizan por presentar en su secuencia de aminoácidos dos cisteínas vecinas formando un motivo CXXC altamente conservado. La TRX-1 actúa como antioxidante facilitando la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro en las cisteínas. En este proceso, la TRX-1 es oxidada y subsecuentemente restaurada a su estado reducido por la enzima tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH (Arnér y Holmgren, 2000). Además de su función como antioxidante, la TRX-1 estimula el crecimiento

celular y posee actividad antiapoptótica (Tian y col., 2008). Existe evidencia de que el iAs afecta al sistema TRX. Lin y col. han demostrado que el iAs y sus metabolitos metilados inhiben la actividad de la tiorredoxina reductasa en cultivos de hepatocitos (Lin y col., 2001). Por otro lado, el grupo de Snow y col. ha mostrado que la exposición aguda al iAs en fibroblastos humanos es capaz de activar las vías de señalización de NFκB y AP-1 mediante la estimulación de la transcripción del gen de TRX-1 (Hu y col., 2002).

La constitución lipídica de las membranas celulares hace de ellas un sitio muy sensible y de respuesta rápida al estrés oxidativo. Como se mencionó previamente, la peroxidación lipídica es el proceso por el cual los lípidos de las membranas celulares se dañan por acción de las ROS. Los ácidos grasos poliinsaturados presentan mayor susceptibilidad al daño oxidativo y generan productos peroxidados cuyos niveles pueden ser utilizados como indicadores indirectos de la generación de estrés oxidativo (Wirtitsch y col., 2009). Existen numerosas evidencias de que la exposición al iAs incrementa la peroxidación lipídica en diferentes tejidos (Allen y Rana, 2003; García-Chávez y col., 2006) por lo que el estudio de este proceso es considerado un marcador clásico del daño oxidativo provocado por el metaloide.

El iAs como disruptor endocrino

Disruptores endocrinos

En los últimos años se ha alcanzado un consentimiento global en relación a los efectos adversos que resultan de la exposición a químicos que poseen actividad hormonal y pueden interferir con el sistema endocrino. Se ha sugerido como hipótesis que determinados efectos adversos sobre la salud humana y de poblaciones animales, como el incremento de algunas neoplasias, malformaciones y disfunciones reproductivas, algunas formas de neurotoxicidad o el fracaso de la respuesta inmune, podrían deberse a la exposición a este tipo de sustancias llamadas *disruptores endocrinos* (DEs).

Los disruptores endocrinos (DEs) son agentes químicos naturales o sintéticos que interfieren con la biosíntesis, el metabolismo o la acción de las hormonas endógenas, alterando la homeostasis y por lo tanto, provocando variaciones en la reproducción y en el desarrollo del organismo y/o de su progenie (Diamanti-Kandarakis y col., 2009). Estas sustancias tienen actividad hormonal o antihormonal debido a que pueden actuar como agonistas o antagonistas de los receptores hormonales específicos (Colborn y col., 1992; Olea y col., 2002). Los DEs, por lo tanto, son capaces de imitar la actividad de las hormonas uniéndose a los receptores celulares y producir efectos equivalentes, pueden bloquear la actividad normal de las hormonas al competir por la unión a los receptores específicos o modificar la concentración fisiológica de las mismas ya sea por actuar sobre los mecanismos reguladores de su secreción o por alterar su biodisponibilidad al unirse a proteínas transportadoras en la sangre (Waring y Harris, 2005). Dentro del grupo de moléculas clasificadas como DEs se encuentran químicos sintéticos utilizados como solventes/lubricantes industriales y sus productos derivados (bifenilos policlorados, bifenilos policromados, dioxinas), plásticos (bisfenol A, BPA), plastificantes (ftalatos), pesticidas (diclorodifeniltricloroetano, DDT), fungicidas (vinclozolina) y agentes farmacéuticos (dietilestilbestrol). Además, pertenecen a

este grupo químicos naturales como los fitoestrógenos (genisteína y cumestrol) y algunos metales y metaloides, tales como cadmio, mercurio, plomo, uranio y arsénico (Stoica et al., 2000; Diamanti-Kandarakis y col., 2009; Iavicoli y col., 2009).

Los ''xenoestrógenos'' son un grupo particular de DEs que no poseen una estructura similar a las hormonas esteroides naturales y tienen la capacidad de reproducir las acciones de los estrógenos y/o interferir con sus vías de señalización.

Los estrógenos

Los estrógenos son una familia de hormonas esteroideas sintetizadas principalmente por los ovarios durante la edad reproductiva y en menores cantidades por las glándulas adrenales y otros tejidos. Con respecto a la reproducción, su función más importante es promover el crecimiento y la diferenciación de los órganos sexuales y de otros tejidos relacionados. En la naturaleza los estrógenos existen en diferentes formas. En mujeres con ciclos menstruales activos, los ovarios producen entre 70 y 500 μg diarios de 17β-estradiol, el cual es convertido a estrona y en menor medida a estriol. Estos metabolitos del E2 son agonistas mucho más débiles del receptor de estrógenos (RE), a pesar de unirse con alta afinidad (Kuiper y col., 1997). Los estrógenos ejercen sus efectos mediante la activación de múltiples vías de señalización tanto genómicas como no genómicas (**Figura 7**) (Heldring y col., 2007; Shanle y Xu, 2010; Shanle y Xu, 2011). Las acciones de estas hormonas están mediadas por dos receptores específicos (REα y REβ), los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas/tiroideas que pueden actuar como factores de transcripción nuclear (Drummond y col. 1999; Rousseau y col., 2002; Adamson y col., 2008). El REα está compuesto por 5 dominios funcionales: un dominio de unión al ADN, una región bisagra, un dominio de unión a hormona y dos dominios de trans-activación (AF-1 y AF-2). Luego de la unión del ligando, el receptor dimeriza y en el núcleo se une a una

secuencia consenso en el ADN, denominada elemento de respuesta a estrógeno (ERE), y altera la transcripción genética (Parker y col., 1993; Katzenellenbogen y col., 1996). Se han identificado tres isoformas del REα: la isoforma de longitud completa de 66 kDa (REα66) y las variantes de *splicing* o isoformas truncadas (TERPs) detectadas inicialmente en la hipófisis de 46 kDa (REα46) y 36 kDa (REα36) (Mitchner y col., 1998).

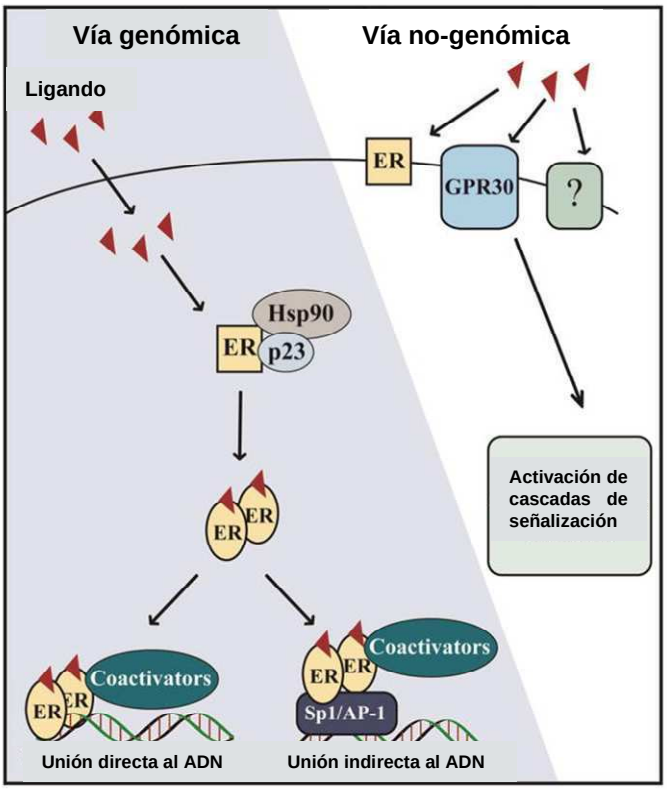


Figura 7: Vías de señalización del RE. Las vías genómicas ocurren cuando los ligandos entran a la célula, se unen al RE e inducen su dimerización. Los dímeros se unen directamente a las secuencias ERE en el ADN o indirectamente a través de otros factores de transcripción como Sp1 o AP-1. Las vías no genómicas ocurren cuando los ligandos se unen a los receptores de membrana, activando la señalización vía diferentes cascadas de quinasas. (Adaptada de Shanle y Xu, 2011).

El ciclo celular

El ciclo celular es una secuencia de procesos finamente regulados por los cuales una célula duplica su contenido de ADN y se divide en dos células hijas. Clásicamente se distinguen cuatro fases denominadas G1, S, G2 y M. Durante las fases G1 y G2 (Gap o intervalos) las células transcriben genes, sintetizan proteínas y crecen en tamaño preparándose para la fase siguiente. La fase S (síntesis) consiste en la duplicación del material genético de la célula (replicación del ADN). Por último la fase M (mitosis) comprende la división

nuclear y concluye con la citocinesis o división citoplasmática (**Figura 8 A**) (Tood y col., 2002). La progresión a través de las diferentes fases del ciclo celular está estrictamente regulada por diferentes proteínas tales como las ciclinas (A, B, D y E), que están asociadas a las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs 1, 2, 4, 6) (Sánchez y Dynlacht, 2005) (**Figura 8 B**).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es otra de las proteínas involucradas en el control del ciclo celular. El PCNA se localiza en el núcleo y favorece la síntesis del ADN actuando como un cofactor de la ADN polimerasa delta (Zhang y col., 1999).

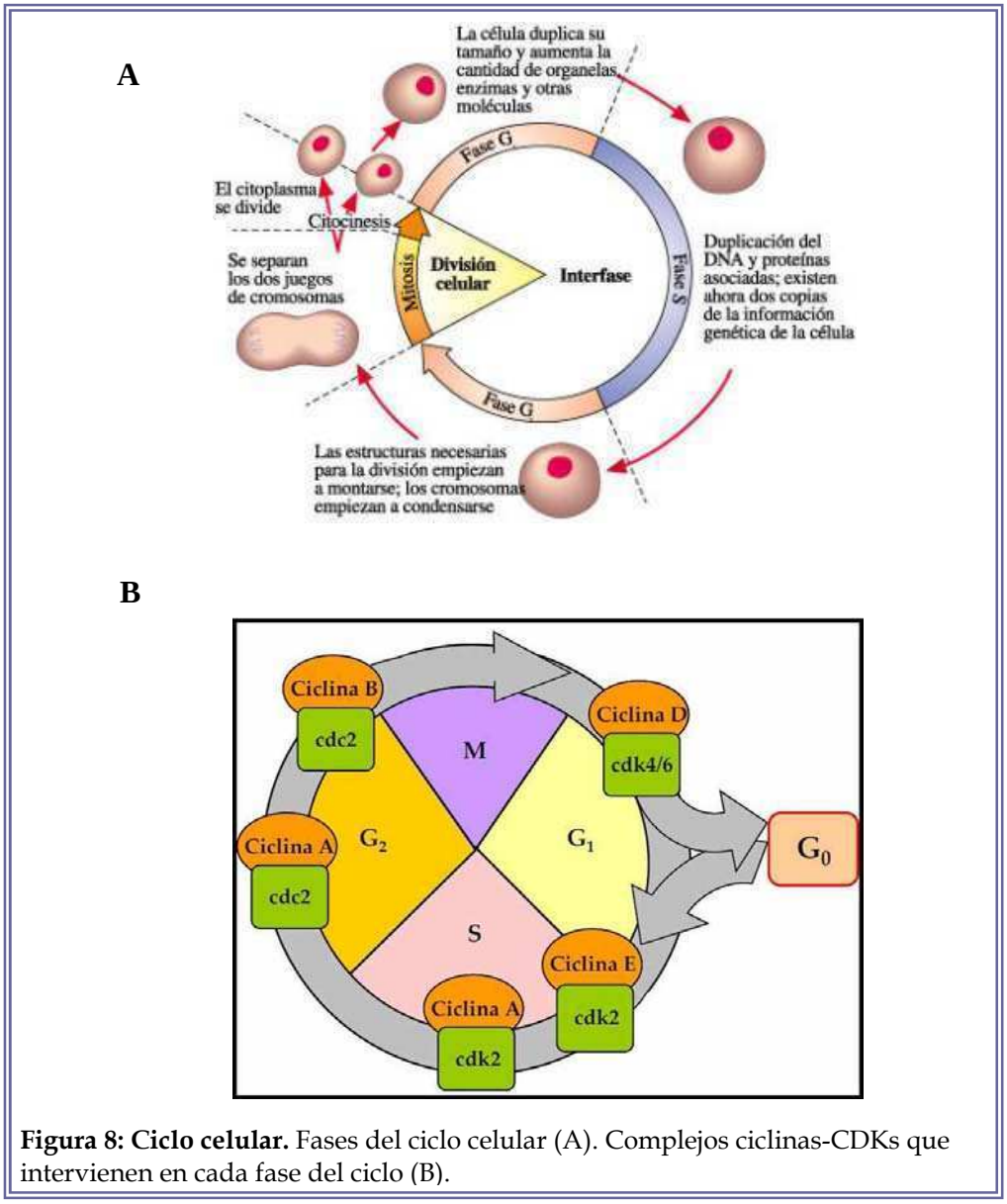


Figura 8: Ciclo celular. Fases del ciclo celular (A). Complejos ciclinas-CDKs que intervienen en cada fase del ciclo (B).

Xenoestrógenos y Metaloestrógenos

Estudios epidemiológicos realizados durante las últimas décadas han registrado un aumento en la incidencia de enfermedades a nivel del sistema reproductor, así como también un incremento en la incidencia de cánceres hormona-dependientes, tanto en humanos como en otros animales. Diversas investigaciones sugieren que éstas y otras patologías relacionadas son consecuencia de la exposición a contaminantes ambientales. Entre ellos, los xenoestrógenos (XEs) parecen jugar un papel importante en el desencadenamiento y desarrollo de dichas enfermedades (Jones y col., 1995). Los XEs (o estrógenos ambientales) interfieren con las acciones de los estrógenos en los diferentes tejidos efectores. Muchos de los XEs son capaces de unirse a los receptores de estrógenos (Varayoud y col., 2008; Sosić-Jurjević y col., 2010; Rivera y col., 2011) y de esta forma, alterar los niveles de las hormonas endógenas, ya sea por provocar cambios en la síntesis, el metabolismo o el transporte de las mismas (Sonnenschein y Soto, 1998). La potencia estrogénica de estos compuestos es muy variable y abarca desde mimetizadores tan potentes como el mismo 17β-estradiol hasta débiles agonistas con actividad parcial sólo manifestable a concentraciones muy altas.

Los XEs interfieren negativamente en la homeostasis endocrina de los organismos generando distintos trastornos hormonales tales como la feminización de machos (Kloas y col., 1999), malformaciones en el tracto reproductivo y endometriosis (Gotz y col., 2001), desorganización del sistema nervioso central (Laessig y col., 1999), cáncer de mama y ovario (Brown y Lamartiniere, 1995), entre otros.

Entre los XEs, que afectan el eje hipotálamo-hipofisario, podemos mencionar a los fitoestrógenos como la genisteína que se encuentra principalmente en la soja y en el trébol rojo (Boue y col., 2003; Burger, 2003; Sosić-Jurjević y col., 2010); los polifenoles clorados como el BPA utilizado en la fabricación de plásticos de policarbonato, gomas, estabilizantes y selladores dentales (Ben-Jonathan y col., 1998; Takahashi y Oishi, 2000; Suzuki y col., 2002;

Susiarjo y col., 2007; Rivera y col., 2011; Cardoso y col., 2012); los pesticidas órgano clorados como el hexaclorobenceno, las dioxinas, el endosulfano y el clordano (Nordberg y col., 1994; Hunter y col., 1999; Rousseau y col., 2002).

La mayoría de los países han prohibido la utilización de muchos de estos compuestos luego de haberse revelado sus efectos adversos sobre la salud, sin embargo debido a su persistencia en la naturaleza pueden encontrarse aún hoy en día incluso en individuos no expuestos de manera directa.

Otra clase de XEs son los conocidos como "metaloestrógenos". Este grupo está constituido por dos subclases: los oxianiones, que incluyen al arsenito, antimonio, nitrito, selenito y vanadato y los cationes divalentes tales como el cadmio, cromo, mercurio, plomo, uranio, estaño y níquel entre otros (García-Morales y col., 1994; Stoica y col., 2000; Martin y col., 2003; Iavicoli y col., 2009). Martin y col. demostraron que, en forma similar al E2, muchos de estos metales estimulan la proliferación de la línea celular de mama MCF-7 y además, inducen la expresión de genes regulados por estrógenos como el receptor de progesterona y el pS2 (García-Morales y col., 1994; Martin y col., 2003).

Efectos del iAs como disruptor endocrino

Debido a la amplia contaminación con iAs y a sus efectos adversos sobre el sistema reproductivo, en los últimos años se ha prestado particular atención al estudio del papel que cumple el iAs como disruptor endocrino y a sus efectos sobre los receptores de hormonas. Muchos de los efectos adversos sobre la salud humana provocados por la exposición al iAs podrían explicarse por las acciones del metaloide sobre el sistema endocrino. Numerosos trabajos han postulado que el iAs actúa como un DE alterando la actividad transcripcional de los receptores de hormonas esteroideas. Kaltreider y col. han demostrado que la exposición al iAs en concentraciones no citotóxicas (0,3-3,3 µM) inhibe la actividad transcripcional del receptor de glucocorticoides (RG) en la línea

celular de hígado, H4IIE (Kaltreider y col., 2001). Por otro lado, en otro estudio se ha reportado que concentraciones bajas de iAs (0,05-1 μM) estimulan la transcripción génica mediada por el RG en la línea celular de hígado, EDR3 mientras que a altas concentraciones se observa un efecto opuesto (Bodwell y col., 2004). Este tipo de respuestas de tipo bifásicas del iAs también fueron observadas para el receptor de mineralocorticoides, el receptor de andrógenos y el receptor de progesterona (Bodwell y col., 2006; Davey y col., 2007).

El grupo de Martin y col. ha estudiado la interacción del iAs con el REα en la línea celular de mama MCF-7. En este trabajo, se ha observado que la exposición al iAs en concentraciones de 0,1, 1, o 5 μM durante 24 h disminuye la expresión del ARNm y de la proteína del REα e incrementa la expresión del receptor de progesterona en forma similar a como lo hace el E2. Más aún, estos autores observaron que el metaloide estimula la proliferación celular y activa la actividad transcripcional del REα. Los efectos xenoestrogénicos del iAs fueron inhibidos por el antiestrógeno ICI 182,780 indicando que dichos efectos son mediados por el REα (Stoica y col., 2000). A través de ensayos de transfecciones con variantes mutantes del REα, estos autores postularon que el iAs es capaz de unirse y activar al REα formando un complejo de alta afinidad con el dominio de unión al ligando. La interacción del iAs con el receptor involucra varios aminoácidos del sitio de unión a la hormona entre los cuales se han identificado los sitios C381, C447, H524 y N532 (Stoica y col., 2000). El iAs tiene una alta afinidad por el REα y es capaz de competir con el E2 por la unión al receptor, sugiriendo que este metaloide posee una potencia estrogénica superior a la mayoría de los estrógenos ambientales más conocidos.

Los efectos del iAs como disruptor endocrino también han sido estudiados en modelos *in vivo*. Waalkes y col. fueron los primeros en demostrar que la administración intravenosa múltiple de iAs a ratones machos y hembras incrementa el número de lesiones proliferativas en el útero, los testículos y el hígado. En este estudio los animales fueron tratados semanalmente con inyecciones intravenosas de iAs (0,5 mg/kg) durante 20 semanas. En las hembras, el iAs indujo un marcado incremento en la incidencia y severidad de

la hiperplasia quística del útero. El aumento en la proliferación del área glandular y del epitelio uterino fue acompañado por un incremento en la expresión del REα y de la ciclina D1. En los machos, el metaloide aumentó la incidencia de la hiperplasia intersticial del testículo además de inducir lesiones proliferativas en el hígado (Waalkes y col., 2000). Es sabido que la exposición prolongada al E2, entre otros factores, está relacionada con el desarrollo de patologías proliferativas y preneoplásicas en la glándula mamaria, el útero, el hígado y los testículos (Schuppler y Günzel, 1979; Moolgavkar, 1986; Newbold y col., 1987; Clemons y Goss, 2001; Spink y col., 2009). Por lo tanto, teniendo en cuenta la respuesta observada al metaloide en estos tejidos sensibles al E2, en conjunto, estos resultados sugieren que el iAs podría actuar como agente xenoestrogénico *in vivo*.

Resultados similares han sido observados en otros estudios que indican que la descendencia femenina que ha sido expuesta *in utero* al iAs, experimenta un aumento en el número de lesiones proliferativas en el útero y en el hígado junto con un incremento en los niveles de expresión del ARNm del REα y de la ciclina D1 (Waalkes y col., 2003; Waalkes y col., 2004).

En cuanto a los efectos adversos del iAs sobre la salud reproductiva humana, se ha documentado que este metaloide es capaz de inducir una disminución en el contenido y la calidad del semen y un incremento en el número de células germinales testiculares (Balabanič y col., 2011). En mujeres, se ha observado que la exposición al iAs genera numerosos trastornos en el sistema reproductivo tales como la endometriosis, irregularidades en el ciclo menstrual e infertilidad (Balabanič y col., 2011; Apostoli y Catalani, 2011). En mujeres embarazadas, la exposición al iAs desde las etapas tempranas de la gestación provoca un retraso en el crecimiento fetal intrauterino, malformaciones y una mayor incidencia de abortos espontáneos (Chakraborti y col., 2003; Hopenhayn y col., 2003; Apostoli y Catalani, 2011).

2. OBJETIVOS

Diversos estudios han demostrado que el iAs afecta el sistema reproductivo, principalmente a través de sus efectos directos sobre las gónadas. El iAs, dependiendo de la concentración puede actuar como un agente citotóxico o como un disruptor endocrino.

Las hormonas adenohipofisarias son de fundamental importancia en la fisiología reproductiva. Hasta el momento poco es lo que se conoce acerca de los efectos del iAs sobre la liberación hormonal adenohipofisaria y no se han realizado estudios para investigar los posibles mecanismos de acción del mismo en la glándula. La generación de estrés oxidativo parece ser el principal mecanismo responsable de los efectos tóxicos del metaloide. Por lo tanto el objetivo de la primera parte de este trabajo de tesis fue:

- Estudiar el efecto citotóxico del iAs sobre la fisiología adenohipofisaria y caracterizar los mecanismos de acción.

Los estrógenos cumplen un papel fundamental en la proliferación celular de tejidos hormona-dependientes. Resultados previos indican que el iAs actúa como un disruptor endocrino imitando los efectos de esta hormona en una línea tumoral de mama. Sin embargo, hasta el momento estas acciones *in vivo* son poco conocidas en otros tejidos. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de la segunda parte de este trabajo fue:

- Investigar el papel del iAs como agente xenoestrogénico en la adenohipófisis y el útero.

3. ESTUDIO DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL ARSÉNICO

3.1. OBJETIVO I

Estudiar el efecto citotóxico del iAs sobre la fisiología adenohipofisaria y caracterizar los mecanismos de acción.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS I

Drogas y reactivos

El arsénico inorgánico (iAs) utilizado en este estudio fue provisto como sodio (meta) arsenito ($NaAsO_2$) con pureza > 99% por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los medios y los reactivos para los cultivos celulares fueron provistos por Invitrogen o Gibco (Carlsbad, CA, USA) a excepción del suero fetal bovino obtenido de GenSA (Buenos Aires, Argentina). La leupeptina, pepstatina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y el ditiotreitol (DTT) fueron provistos por Alexis-US Biological (Swampscott, MA, USA). Los reactivos para extracción del ARN y la RT-PCR fueron provistos por Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) y por Promega (Madison, WI, USA). El material descartable estéril fue provisto por ETC International (Buenos Aires, Argentina). El material plástico no estéril fue provisto por Chemit e Instrumental Pasteur (Buenos Aires, Argentina). Las hormonas estándares y los anticuerpos utilizados en la determinación de las hormonas adenohipofisarias para radioinmunoensayos específicos así como también en los estudios inmunocitoquímicos, fueron provistos por el Dr. Parlow (National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA, USA) y por la Dra. Victoria Lux-Lantos (IBYME-CONICET, Argentina).

Todos los demás anticuerpos y reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Animales

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (Res. (CD) Nro. 2831/10).

Los animales fueron provistos por el Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica y por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias

Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de 180-200 g de peso. En todos los casos, los animales se mantuvieron a 21-24 °C con un fotoperíodo de 12 horas (07:00-19:00), con libre acceso al agua y alimento balanceado (Cooperación, Buenos Aires, Argentina). Los animales fueron mantenidos de acuerdo con la "Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio" del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH) (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences, 1996).

Los animales fueron sacrificados por decapitación y las adenohipófisis (libres de las neurohipófisis) fueron rápidamente removidas y colocadas en recipientes estériles. Las adenohipófisis fueron utilizadas enteras en los experimentos diseñados para los estudios *in vivo*, o dispersadas para la obtención de cultivos primarios en los experimentos diseñados para los estudios *in vitro*.

Tratamientos *in vivo* de los animales

Las ratas (seis por jaula) fueron expuestas al iAs como $NaAsO_2$ en el agua de bebida en una concentración de 5, 25, o 100 ppm durante treinta días. Se utilizó como control a un grupo de animales que recibieron el agua de bebida sin el agregado del metaloide. En todos los casos se utilizó agua de red purificada a través de un filtro PSA Senior (PSA, Buenos Aires, Argentina). A fin de evitar la oxidación del iAs, la solución de tratamiento se descartó diariamente y se la reemplazó por solución recién hecha. Los animales fueron pesados una vez por semana y el consumo de agua fue monitoreado diariamente.

Finalizado el período de tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación y las adenohipófisis fueron extraídas y congeladas rápidamente. La sangre troncal fue colectada para la determinación de las hormonas hipofisarias en el suero, mediante radioinmunoensayo (RIA).

Cultivos primarios de adenohipófisis

Las adenohipófisis fueron extraídas y colocadas en un tubo estéril conteniendo 5-10 mL de medio Dulbecco Mínimo Eagle modificado (DMEM), suplementado con L-glutamina 2 mM, aminoácidos mínimos esenciales (MEM-aa) 10 µg/mL, penicilina/estreptomicina 1%, anfotericina B 5,6 µg/mL, pH 7,35-7,40 (DMEM-S) y seroalbúmina bovina (BSA) 0,3%. Las adenohipófisis fueron lavadas tres veces con el mismo medio y cortadas en trozos de 1 mm^3 aproximadamente. Los fragmentos obtenidos fueron tratados sucesivamente con tripsina 0,25% por 20 min en condiciones de gaseo con CO_2 al 5% (a 37 ^oC con agitaciones periódicas), suero fetal bovino 10% por 8 min y desoxirribonucleasa tipo I 45 U/µL por 8 min. Posteriormente, los fragmentos fueron lavados en tres pasos sucesivos con una solución de EDTA 2 mM en buffer Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) libre de Ca^{2+} y de Mg^{2+} pH 7,2-7,3 (KRB-CMF), con una solución de EDTA 1 mM y con buffer solo sin EDTA. Cada uno de estos lavados fue seguido por una centrifugación a 800 rpm durante 3 min a temperatura ambiente. Las células fueron dispersadas mecánicamente por el pasaje de los fragmentos a través de una pipeta Pasteur siliconada hasta que los mismos no fuesen visibles. Las células monodispersas fueron centrifugadas a 1000 × *g* durante 10 min y luego resuspendidas en medio DMEM-S suplementado con 5% suero fetal bovino (a fin de minimizar el acomplejamiento del iAs con las proteínas del suero) antes de ser sembradas en las placas de cultivo correspondientes. El número de células obtenidas se determinó por recuento en una cámara de Neubauer y la viabilidad por el método de exclusión utilizando azul de Trypan. La viabilidad de las células utilizadas en los cultivos fue siempre mayor al 90%. En todos los casos las células fueron cultivadas durante dos días (37 °C, 5% CO_2) a fin de lograr su estabilización antes de realizar los tratamientos correspondientes.

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos (0,1 x 10^6 células/pocillo) para los experimentos espectrofotométricos; sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos (0,1 x 10^6 células/pocillo) para los de

microscopía de fluorescencia y en placas de 24 pocillos (0,5 x 10^6 células/pocillo) para los de citometría de flujo.

Tratamiento de las células en cultivo

Luego del período de estabilización (48 h), el medio fue descartado y reemplazado por medio fresco DMEM-S suplementado con 5% suero fetal bovino fresco con o sin (células control) el agregado de iAs como $NaAsO_2$ y/o las diferentes drogas utilizadas según el estudio correspondiente. Las soluciones de iAs se prepararon con agua destilada justo al comienzo de cada experimento. Las concentraciones finales utilizadas abarcaron el rango de 1 a 50 μM.

En los experimentos en que se estudió el tiempo de reversibilidad del efecto del iAs, una vez finalizado el período de incubación con el metaloide el medio fue retirado y reemplazado por medio fresco sin iAs hasta completar un período de incubación total de 24 h.

En aquellos casos en que las drogas fueron disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO), el medio de las células control contuvo una concentración de DMSO similar a la de los pocillos tratados con la droga. La concentración final de DMSO en ningún caso fue mayor al 0,05%, concentración que no afecta la actividad celular en estos cultivos primarios.

Ensayo de actividad celular (MTT)

Los ensayos de actividad celular fueron realizados en las células sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos (0,1 x 10^6 células/pocillo en 200 μL). Los tratamientos de las células se realizaron por columna (8 pocillos) de manera tal de tener ocho replicados para cada condición. Finalizados los tratamientos, el medio fue descartado, las células fueron lavadas dos veces con 100 μL de buffer KRB y se agregaron 110 μL/pocillo de una solución de metil-tiazol-tetrazolio (MTT) 5 mg/11 mL en buffer KRB. Las placas se incubaron

durante 3 h (37ºC, 5% CO_2) para permitir la formación de los cristales de formazán. Al término del período de incubación, se retiraron cuidadosamente 90 µL de la solución de MTT y se agregaron 100 µL de HCl 0,01 N en isopropanol. Las placas se agitaron durante al menos 3 min hasta la solubilización total de los cristales de formazán. Una vez desarrollado el color, se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Biotrak II, Amersham Biosciences, USA).

La actividad celular fue tomada como índice de la viabilidad celular (Newton y col., 2005) y los resultados fueron expresados como porcentaje de la absorbancia obtenida en las células control.

Análisis de la morfología nuclear

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos circulares (Fisherband 12 mm, Fisher Scientific, USA) ubicados dentro de placas de cultivo de 24 pocillos (0,1 x 10^6 células/cubreobjeto en 500 µL). Al término de los tratamientos, las células adheridas a los cubreobjetos fueron lavadas con PBS 1X (300 µL/pocillo) a 4º C e inmediatamente fijadas con formaldehído 4% en PBS durante 30 min a 4º C. Las células fijadas fueron lavadas tres veces con PBS y luego una vez con agua bidestilada. Los núcleos celulares se tiñeron con una solución de 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 1 µg/mL en 1,4 diazabiciclooctano (DABCO) 23,3 mg/mL y 20 mM Tris-HCl (pH 8) en glicerol y la suspensión celular se montó sobre un portaobjetos.

La morfología nuclear fue observada y cuantificada en un microscopio de fluorescencia Olympus BX50. Se contaron al menos 500 núcleos por cubreobjetos en campos elegidos al azar, en muestras por triplicado de tres experimentos independientes. El recuento fue realizado por dos observadores distintos. Los datos fueron expresados como: (nº de núcleos fragmentados/nº total de núcleos) x 100.

Ensayos de la tinción con Anexina V-FITC / Ioduro de Propidio

Para evaluar el tipo de muerte celular y el grado de la apoptosis, se realizó la tinción simultánea de las células con el compuesto Anexina V acoplado a fluoresceína (FITC) y el colorante ioduro de propidio (IP). Se utilizó un kit comercial (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Este ensayo permite detectar células que están entrando en apoptosis así como también células en los últimos estadíos del proceso y células que mueren por necrosis (Vermes et al. 1995). Resumidamente, al finalizar los tratamientos las células fueron lavadas con KRB-CMF, tripsinizadas en el mismo buffer y centrifugadas a 1000 x *g* durante 10 min. Los pellets obtenidos (conteniendo 0,5 x 10^6 células) fueron resuspendidos en 250 µL del buffer de unión a anexina. Luego se adicionaron 5 µL de una solución de anexina V conjugada al fluoróforo fluoresceína (FITC). Las células fueron incubadas durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad y luego se les adicionó 10 µL de una solución de ioduro de propidio (IP) 10 µg/mL. La fluorescencia fue cuantificada en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScalibur (San José, CA, USA). Un mínimo de 10.000 eventos fueron medidos para cada muestra en estudio. El registro de fluorescencia de la Anexina V-FITC se realizó en el canal FL1 (535nm) y el IP se hizo en el canal FL2 (585nm). El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el programa WinMDI 2.8. Las células que resultaron positivas para Anexina V y negativas para IP fueron consideradas como apoptóticas tempranas, las células Anexina V negativas y positivas para IP, necróticas y las que resultaron positivas para ambos marcadores fueron consideradas apoptóticas tardías y/o necróticas.

Citometría de flujo para la medición con sondas fluorescentes

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos (0,5 x 10^6 células/pocillo en 500 µL) y los tratamientos fueron realizados por triplicado. Las sondas fueron añadidas directamente a los medios de cultivo 30 min antes

de finalizar los tratamientos para permitir su incorporación en las células. Al término del período de incubación, el medio fue descartado y las células fueron lavadas dos veces con KRB-CMF para eliminar los restos de sonda que no hubieran sido incorporados. Las células fueron resuspendidas por tripsinización y se transfirieron a tubos de citometría. A cada tubo se le agregaron 10 µg/mL de ioduro de propidio (IP) para detectar las células inviables. La fluorescencia se midió en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScalibur (San José, CA, USA). Se analizaron 10.000 células por tubo. El registro de fluorescencia de todas las sondas se realizó en el canal FL1 (535nm) y el IP se hizo en el canal FL2 (585nm). En el control, las células positivas para IP fueron siempre menos del 5%. Las células positivas para IP no fueron utilizadas para los análisis subsiguientes, por lo que los datos presentados corresponden solamente a células viables.

Los datos obtenidos en el citómetro de flujo fueron analizados utilizando el programa WinMDI 2.8. Los valores de fluorescencia obtenida en cada tratamiento fueron expresados como porcentaje de la fluorescencia en las células control.

-Determinación del potencial de la membrana mitocondrial

El potencial de la membrana mitocondrial interna (PMM) fue determinado mediante la utilización del compuesto ioduro de 3,3'-dihexil-oxocarbocianina (DiOC6), una sonda fluorescente sensible al PMM. Este compuesto es un colorante catiónico que se intercala dentro de la membrana mitocondrial interna según el valor de su potencial electroquímico y al hallarse en un entorno lipídico se vuelve fluorescente (Rottenberg y Wu, 1998). A mayor potencial, mayor cantidad de sonda se intercalará en la membrana y mayor será la fluorescencia emitida. Contrariamente, una disminución en el PMM implicará una reducción en la captación del colorante.

-Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Los niveles intracelulares de las especies reactivas del oxígeno (ROS) se midieron mediante la sonda lipofílica dihidrorodamina 123 (DHR123), un compuesto lipofílico que difunde rápidamente a través de las membranas celulares (Crow, 1997; Walrand y col., 2003). Una vez en el citoplasma, la sonda DHR123 es oxidada al compuesto fluorescente rodamina, el cual se internaliza dentro de la mitocondria. Se ha reportado que esta sonda es específicamente oxidada por peróxido de hidrógeno y por peroxinitrito (Crow, 1997).

Radioinmunoensayo (RIA)

Los niveles hormonales fueron determinados mediante un radioinmunoensayo (RIA) de doble anticuerpo (Niswender y col., 1969). Las determinaciones se realizaron en muestras del medio de incubación de los cultivos (experimentos *in vitro*) o de suero obtenidas a partir de la sangre troncal (experimentos *in vivo*).

Como diluyente de las muestras, del estándar y de las hormonas radioactivas, se utilizó PBS-BSA 1% pH 7,6 para la prolactina (PRL) y PBS-Albúmina de huevo pH 7,2 para la hormona luteinizante (LH). Como diluyente del primer anticuerpo se utilizó PBS-EDTA 25 mM con suero normal de conejo (SNC) al 1%. El volumen final del ensayo fue de 400 µL incluyendo 200 µL de la dilución apropiada de la muestra, del estándar o de PBS-BSA 1%; 100 µL del primer anticuerpo y 100 µL de la hormona marcada (12.000-15.000 cpm). Esta mezcla fue mantenida durante 48 h a 4 ºC y la reacción fue detenida mediante el agregado de 100 µL del segundo anticuerpo, una solución de suero de cabra antigammaglobulina de conejo (1:20) en PBS pH 7,6 (2 h a temperatura ambiente). Las muestras fueron coprecipitadas con 1 mL de una solución de polietilenglicol al 6% (4000 de peso molecular promedio) durante 1 h a 4º C y centrifugadas durante 30 min a 2500 rpm. La radioactividad del pellet fue cuantificada con un contador Gamma. Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron menores al 10%.

La sensibilidad del ensayo fue de 0,1 ng/mL. Los niveles de PRL en el medio control fueron de 1430,5 ± 168,1 ng/mL y los de LH fueron 5,1 ± 0,5 ng/mL (medidos a las 24 h).

RT-PCR semicuantitativa

Para la cuantificación de los niveles de ARNm por RT-PCR (transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa) semicuantitativa, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos (1 x 10^6 células/pocillo en 1 mL). Una vez finalizados los tratamientos, el medio fue descartado y se procedió al aislamiento del ARN total. En el caso de los tratamientos *in vivo,* la extracción de la adenohipófisis fue realizada en condiciones asépticas y con material de cirugía esterilizado.

Se utilizaron elementos descartables y agua (tratada con dietilpirocarbonato) libres de ARNasa y ADNasa. La mesada de trabajo y el resto de los materiales utilizados fueron limpiados exhaustivamente con etanol 70%.

Extracción de ARN

En los experimentos *in vitro*, una vez finalizados los tratamientos y extraído el medio, se agregaron 177 µL de Trizol por pocillo. Se juntaron las suspensiones de las células provenientes de 4 pocillos bajo el mismo tratamiento. En el caso de los experimentos *in vivo*, los tejidos se homogeneizaron en 1 mL de Trizol con un homogeneizador de vidrio estéril. La suspensión proveniente de los pocillos o de los tejidos se colocó en un tubo Eppendorf. En ambos casos, se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µL de cloroformo en cada tubo, se agitó vigorosamente durante 15 seg, se incubó 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó 10 min a 12000 x *g* a 4 °C. La fase acuosa obtenida fue traspasada a un tubo Eppendorf nuevo y se agregaron 500 µL de isopropanol. Se incubó 10 min a temperatura ambiente y

se centrifugó 10 min a 12.000 x *g* a 4 °C. Se descartó el sobrenadante por inversión y el pellet se resuspendió en 1 mL de etanol 75%. Los tubos se agitaron vigorosamente durante 15 seg y se centrifugaron 5 min a 7500 x *g* a 4 °C. Se descartó el sobrenadante por inversión, se dejó secar el pellet al aire por unos minutos y se resuspendió en 20 µL de agua bidestilada estéril. Los tubos se incubaron a 55-60 °C durante 10 min para permitir la resuspensión del ARN aislado. Finalizada la incubación los mismos se colocaron inmediatamente en hielo.

El contenido de ARN de cada tubo se cuantificó a partir de una alícuota en un espectrofotómetro Shimatzu UV-265 (Kioto, Japón) midiendo la absorbancia a 260 nm y la relación Abs_{260}/Abs_{280}= 1,8-2 la cual permite confirmar la ausencia de contaminación con proteínas. El ARN aislado fue guardado a -70 °C hasta realizar la retrotranscripción y obtener el ADN copia (ADNc).

Síntesis de ADNc para la retrotranscripción

El ARN total (5 µg) fue incubado por 5 min a 65 °C con 1 µL de primers al azar (*random primers*) 250 ng/µL, 1 µL de dNTP mix 10 mM y agua libre de ARNsa c.s.p. 13 µL. La retrotranscripción se realizó a 37 °C durante 50 min en 20 µL de la siguiente mezcla de reacción: 13 µL de la mezcla anterior, 4 µL de buffer de síntesis de la primera cadena (*first-strand buffer*) 5X, 2 µL de DTT 5,5 mM y 1 µL de transcriptasa reversa de virus de leucemia murina (MMLV, 3,125 U). La enzima fue inactivada por calentamiento a 70 °C 15 min. Los tubos fueron guardados a -20 °C hasta realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

PCR semicuantitativa

La amplificación del ADNc se realizó en un termociclador Mastercycler Eppendorf (Hamburg, Alemania). La reacción de PCR contuvo: 2 µL de ADNc,

10 µL buffer Go Taq 5X, 1 µL de dNTP mix 10 mM, 1 µL de cada primer 10 µM (**Tabla 1**), 0.25 µL Go Taq (0,625 U) y agua estéril c.s.p. 50 µL.

Los primers específicos para los genes estudiados se diseñaron basados en secuencias previamente publicadas (Billiet y col., 2005; Miler y col., 2010). Las secuencias de los primers y el tamaño de los productos de amplificación se muestran en la **Tabla 1.**

Gen	Primer sentido (5′→3′)	Primer antisentido (5′→3′)	Tamaño del prod. (pb)
HO-1	TGCTCGCATGAACACTCTG	TCCTCTGTCAGCAGTGCC	123
MT-1	GAATTCCGTTGCTCCAGATTCACCAGATC	GAATTCTCACATGCTCGGTAGAAAACG	327
TRX-1	AGGAAGCTTTTCAGGAGGCC	CACGTGGCAGAGAAGTCCACT	69
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTA	GGATGCAGGGATGATGTTC	176

Tabla 1. Pares de primers utilizados.

La técnica de RT-PCR semicuantitativa permite detectar cambios relativos en la expresión del ARNm. Por tal motivo, las primeras reacciones de PCR para todos los genes se llevaron a cabo con un número de ciclos de amplificación variables (20 – 40) de modo tal de encontrar un número de ciclo en el cual comienza a aparecer el producto de amplificación y asegurar que se esté dentro del rango lineal de amplificación.

La aparición del producto varió en cuanto al número de ciclos entre los amplicones de interés, por lo tanto las reacciones de PCR fueron realizadas en las siguientes condiciones:

- **HO-1:** 2 min a 94 °C para la activación de la ADN polimerasa, seguidos por 40 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C y 45 seg a 72 °C, y un último ciclo de elongación de 10 min a 72 °C.
- **MT-1:** 2 min a 94 °C seguidos por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 seg a 60 °C y 30 seg a 72 °C, y un último ciclo de elongación de 10 min a 72 °C.

- **TRX-1:** 2 min a 94 °C, seguidos por 30 ciclos de 45 seg a 94 °C, 1 min a 58 °C y 45 seg a 72 °C, y un último ciclo de elongación de 10 min a 72 °C.

Como control de expresión se utilizó el gen constitutivo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, ver primers en la **Tabla 1**). En todos los casos, la PCR de GAPDH se realizó previamente a las otras PCRs a fin de verificar la integridad del ADNc sintetizado y la ausencia de contaminación con ADN genómico. La reacción de PCR fue realizada en las siguientes condiciones: 2 min a 94 °C seguidos por 30 ciclos de 30 seg a 94 °C, 1 min a 55 °C y 45 seg a 72 °C, y un último ciclo de elongación de 10 min a 72 °C.

Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa 2% con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas fueron visualizadas en el Foto/Analyst Investigador-PC Foto/Eclipse y la densitometría de las mismas fue realizada con el programa Gel Pro Analyzer 3.1 (Media Cybernetics, LP, USA).

Con el fin de realizar la comparación estadística, los resultados de la densitometría de los genes en estudio fueron normalizados a los valores de densitometría de GAPDH para dicha muestra. Los resultados fueron expresados como porcentaje de las células control.

En todos los casos, los primers fueron diseñados utilizando el software Primer3 del instituto Whitehead (http://primer3.ut.ee/). Para confirmar la especificidad de los primers, éstos fueron analizados frente a una base no redundante de secuencias génicas de rata empleando la aplicación BLAST del National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media ± error estándar de la media (SE) y evaluados mediante análisis de la varianza de un factor (ANOVA) seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, prueba

de Dunnett o por la prueba '*t*' de Student según el diseño experimental (Sokal y Rohlf, 1995).

Las distintas pruebas estadísticas fueron realizadas utilizando el software Graphpad Instat (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). Las diferencias entre los grupos fueron consideradas significativas cuando *P* fue menor a 0,05. Los datos fueron confirmados mediante la realización de por lo menos tres experimentos independientes.

3.3. RESULTADOS I

3.3.1. Estudios *in vivo* de los efectos del iAs sobre la fisiología adenohipofisaria.

Existen evidencias que indican que el iAs ejerce numerosos efectos adversos sobre el sistema reproductivo y endocrino (Liu y col., 2006; Chattopadhyay y Ghosh, 2010; Li y col., 2012), y que este metaloide se acumula en la glándula hipofisaria (Sánchez-Peña y col., 2010). Considerando la importancia de esta glándula en la reproducción nuestro primer objetivo fue investigar si el iAs podía afectar la fisiología de la adenohipófisis.

Con este fin, examinamos el efecto de la exposición *in vivo* al iAs sobre la glándula adenohipofisaria y la liberación hormonal. Para ello, se realizó un experimento en el cual los animales recibieron 5, 25 o 100 ppm de iAs en el agua de bebida durante un periodo de 30 días. Cabe señalar que al finalizar el tratamiento los animales expuestos a las distintas concentraciones de iAs no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles en cuanto al consumo de agua y a la evolución del peso corporal en el tiempo. Teniendo en cuenta el agua consumida y el peso, los animales del grupo de 5 ppm, 25 ppm y 100 ppm de iAs recibieron 0,5 mg iAs/kg/día, 2,5 mg iAs/kg/día y 10 mg iAs/kg/día respectivamente.

La exposición al iAs incrementa la expresión del ARNm de marcadores de respuesta al estrés oxidativo y afecta la liberación hormonal.

Como un indicador de estrés oxidativo se midió la expresión del ARNm de algunos genes de respuesta al estrés tales como la metalotioneína-1 (MT-1), tiorredoxina-1 (TRX-1) y hemooxigenasa-1 (HO-1).

La MT-1 es una pequeña proteína caracterizada por poseer un abundante contenido de cisteínas lo cual le permite unirse a metaloides y metales

divalentes. Las MTs constituyen una familia de proteínas cuya transcripción génica es rápidamente inducida por estrés oxidativo (Andrews, 2000). Estas proteínas son conocidas como secuestradoras (*scavengers*) de radicales libres y metales (Nath y col., 1988; Vallee, 1995; Ebadi y col., 1996).

La TRX-1 es una enzima óxido-reductasa de 12 kDa que contiene un sitio activo ditiol-disulfuro dentro de una secuencia de aminoácidos altamente conservada (Nordberg y Arnér, 2001). Las TRXs tienen la capacidad de reducir a otras proteínas y juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis del estado redox celular, el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis (Tian y col., 2008).

La HO-1 es la enzima responsable de la degradación del grupo hemo en hierro libre, biliverdina y monóxido de carbono (Morse y Choi, 2002). Esta enzima forma parte de la batería antioxidante de las células y es fuertemente inducida durante la generación de estrés oxidativo por lo cual se la utiliza con frecuencia como un marcador de esta condición (Otterbein y col., 2003; Poon y col., 2004).

Los niveles de ARNm de los distintos genes fueron medidos mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. La exposición al iAs aumentó la expresión de MT-1 y TRX-1 a partir de la concentración de 5 ppm, mientras que los niveles de expresión de HO-1 se incrementaron a partir de la concentración de iAs de 25 ppm (**Figura 9**).

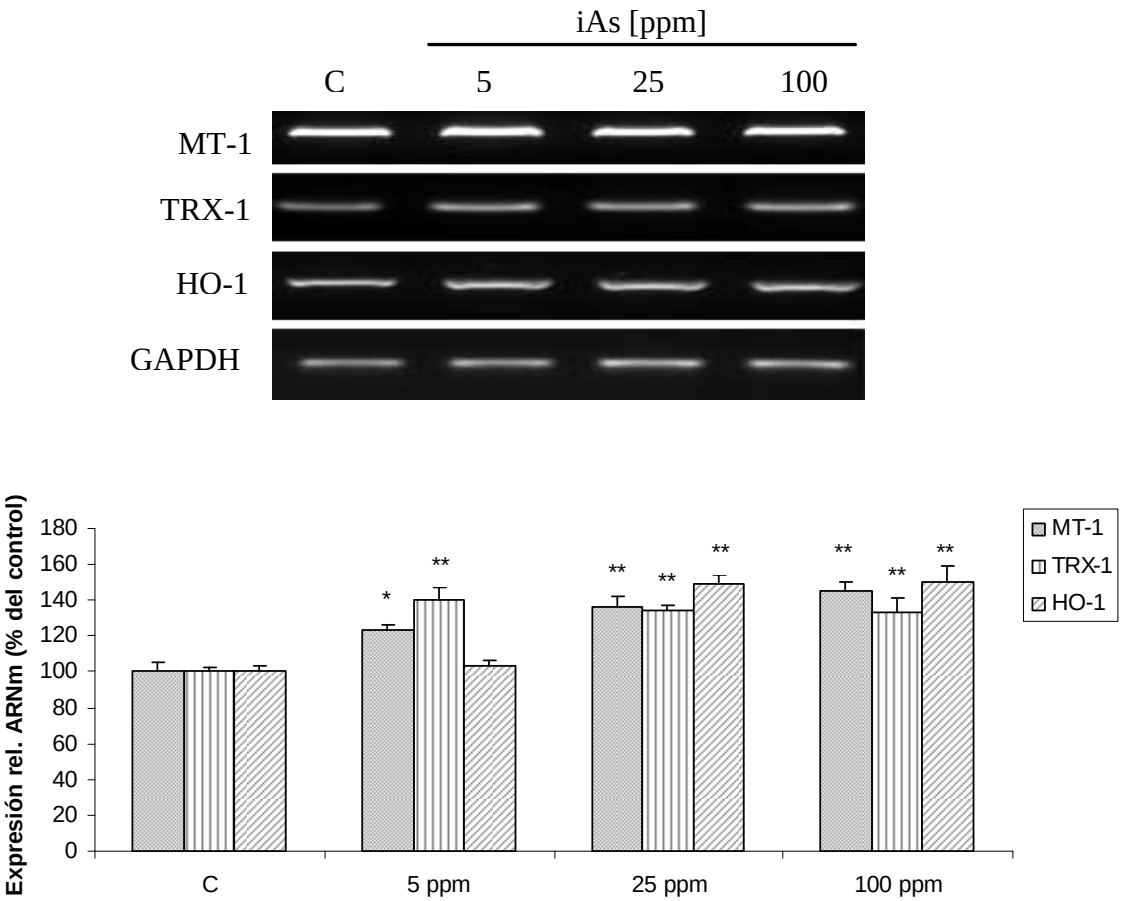


Figura 9. El tratamiento *in vivo* con iAs aumenta la expresión del ARNm de genes de respuesta al estrés oxidativo en adenohipófisis.
Los niveles de ARNm de la metalotioneína-1 (MT-1), tiorredoxina-1 (TRX-1) y hemooxigenasa-1 (HO-1) se determinaron por RT-PCR en la adenohipófisis de ratas controles o tratadas con 5 ppm, 25 ppm o 100 ppm de iAs en el agua de bebida durante 30 días. El panel superior muestra una RT-PCR semicuantitativa representativa. Los resultados representan la media ± SE de los niveles densitométricos para cada gen en relación a la expresión de GAPDH y están expresados como porcentaje del control (n=6). ANOVA seguido de test de Dunnett, *p<0,05; **p< 0,01 vs.

En relación a las hormonas, se observó que el tratamiento con iAs disminuyó los niveles plasmáticos de PRL en forma dosis dependiente, mientras que los niveles de LH se vieron afectados sólo con la máxima concentración de iAs utilizada (100 ppm) (**Figura 10**).

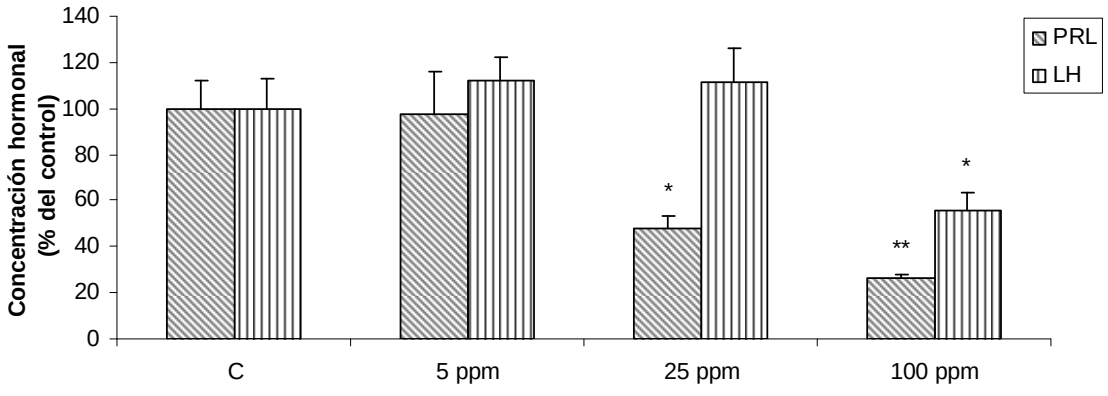


Figura 10. El tratamiento *in vivo* con iAs disminuye los niveles plasmáticos de PRL y LH. La liberación de hormonas en plasma se determinó por RIA en ratas controles o tratadas con 5 ppm, 25 ppm o 100 ppm de iAs en el agua de bebida durante 30 días. Los resultados representan la media de la concentración de hormonas en plasma (ng/mL) ± SE y están expresados como porcentaje del control (n=6). ANOVA seguido de test de Dunnett, *p<0,05; **p< 0,01 vs. control.

Los resultados hasta aquí presentados muestran que la exposición al iAs *in vivo* afecta la fisiología adenohipofisaria incrementado la expresión de marcadores de respuesta al estrés oxidativo y alterando la liberación hormonal.

3.3.2. Estudios *in vitro* de los efectos del iAs sobre las células adenohipofisarias

Teniendo en cuenta los resultados que muestran que la exposición al iAs *in vivo* induce estrés oxidativo y afecta la liberación hormonal adenohipofisaria, el siguiente objetivo fue investigar los mecanismos por los cuales este metaloide ejerce dichos efectos. Para ello realizamos experimentos *in vitro* utilizando cultivos primarios de células adenohipofisarias.

3.3.2.1. El iAs afecta la viabilidad celular y disminuye la liberación de PRL

Como primer paso, investigamos los efectos de la exposición al iAs sobre la viabilidad celular adenohipofisaria y la liberación hormonal. Para esto, las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de iAs durante 24 h y luego se determinaron la actividad celular, como un índice de la viabilidad celular, y la liberación de PRL al medio de cultivo.

Las concentraciones de iAs de 1 y 10 µM no tuvieron efecto sobre la viabilidad celular, mientras que el iAs 25 µM afectó significativamente la viabilidad celular provocando una disminución cercana al 40% (**Figura 11 A**). Simultáneamente se midió la liberación de PRL al medio. En la **figura 11 B** se observa que la exposición al iAs durante 24 h disminuyó la liberación de PRL en forma dosis dependiente. Es interesante destacar que la reducción en los niveles de la hormona se produjo aún en concentraciones en las cuales la viabilidad celular no se vio afectada, lo cual indica un posible efecto directo del iAs sobre la liberación hormonal independiente de su acción citotóxica.

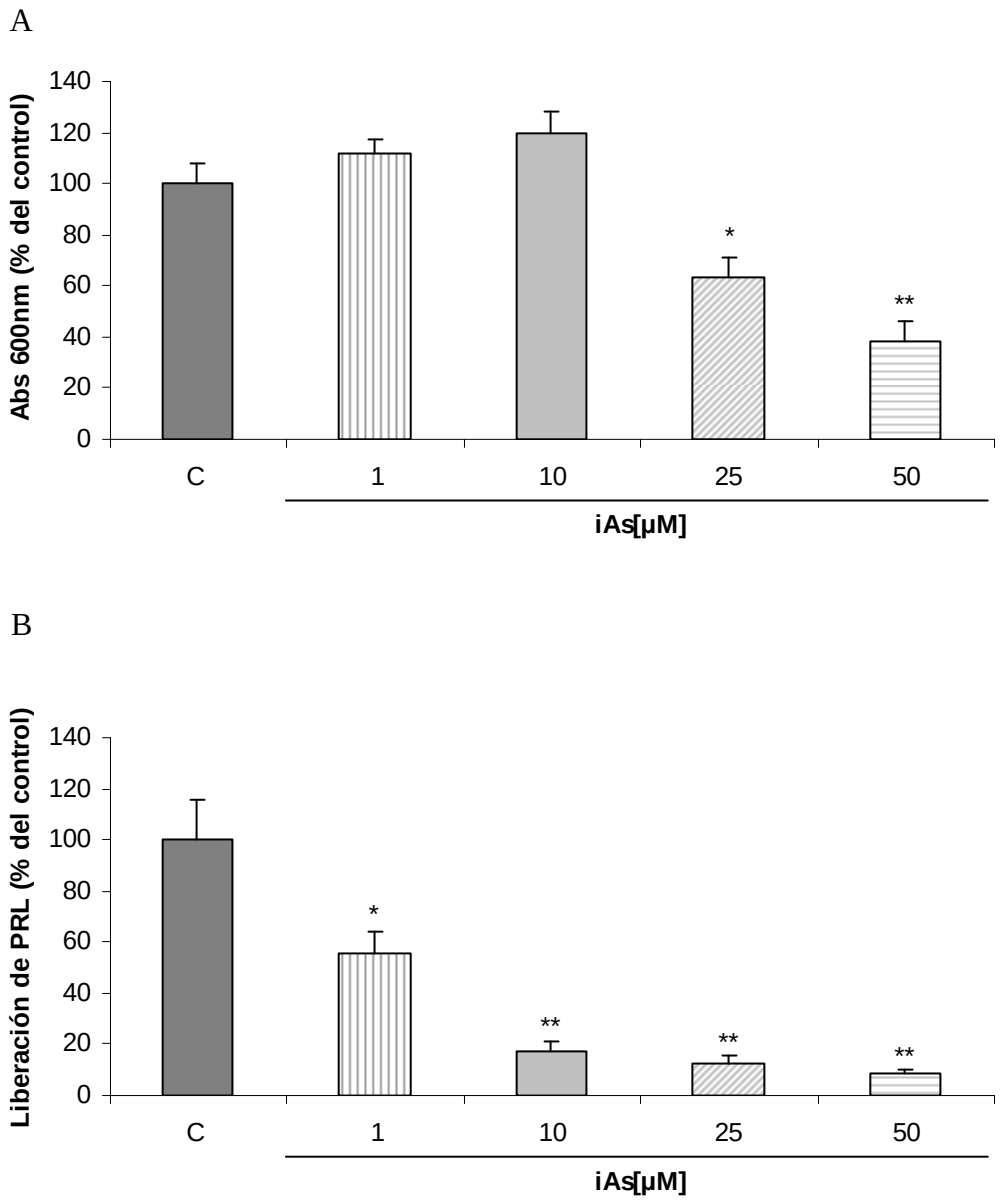


Figura 11. El iAs afecta la viabilidad celular (A) y disminuye la liberación de PRL (B).
Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de iAs (1 a 50 µM) o vehículo (control) durante 24 h. La actividad celular, como un índice de viabilidad celular, se determinó por la técnica de MTT. La liberación de PRL en el medio se determinó por RIA. Los resultados representan la media ± SE de la absorbancia a 600 nm (A) y de la concentración de PRL en ng/mL (B) y fueron expresados como porcentaje del control (n=3). ANOVA seguido de test de Tukey-Kramer. *$p < 0,05$; **$p < 0,01$ vs. control.

En base a los resultados obtenidos y con el fin de estudiar los efectos citotóxicos del iAs, se seleccionó 25 µM como la concentración de trabajo para los siguientes experimentos ya que ésta fue suficiente para afectar la liberación de PRL y producir una reducción en la viabilidad celular de aproximadamente un 40% luego de 24 h de exposición.

A continuación, evaluamos el efecto del iAs sobre la viabilidad celular y la liberación hormonal en función del tiempo. Para ello, las células fueron incubadas con el metaloide durante distintos períodos de tiempo luego de los cuales se midieron la actividad celular y las concentraciones de PRL y LH en el medio.

El tratamiento con iAs disminuyó significativamente la viabilidad celular luego de 9 h de incubación (**Figura 12 A**).

Con respecto a la liberación hormonal, los niveles de PRL disminuyeron a partir de las 6 h y continuaron descendiendo en función del tiempo, mientras que los niveles de LH no se modificaron en ninguno de los tiempos analizados (**Figura 12 B**).

En conjunto estos resultados muestran que el iAs afecta de manera directa la liberación de PRL y la viabilidad celular independientemente de la acción de factores hipotalámicos o extrahipofisarios. De las hormonas en estudio, la liberación de PRL parece ser más sensible que la LH a los efectos del iAs.

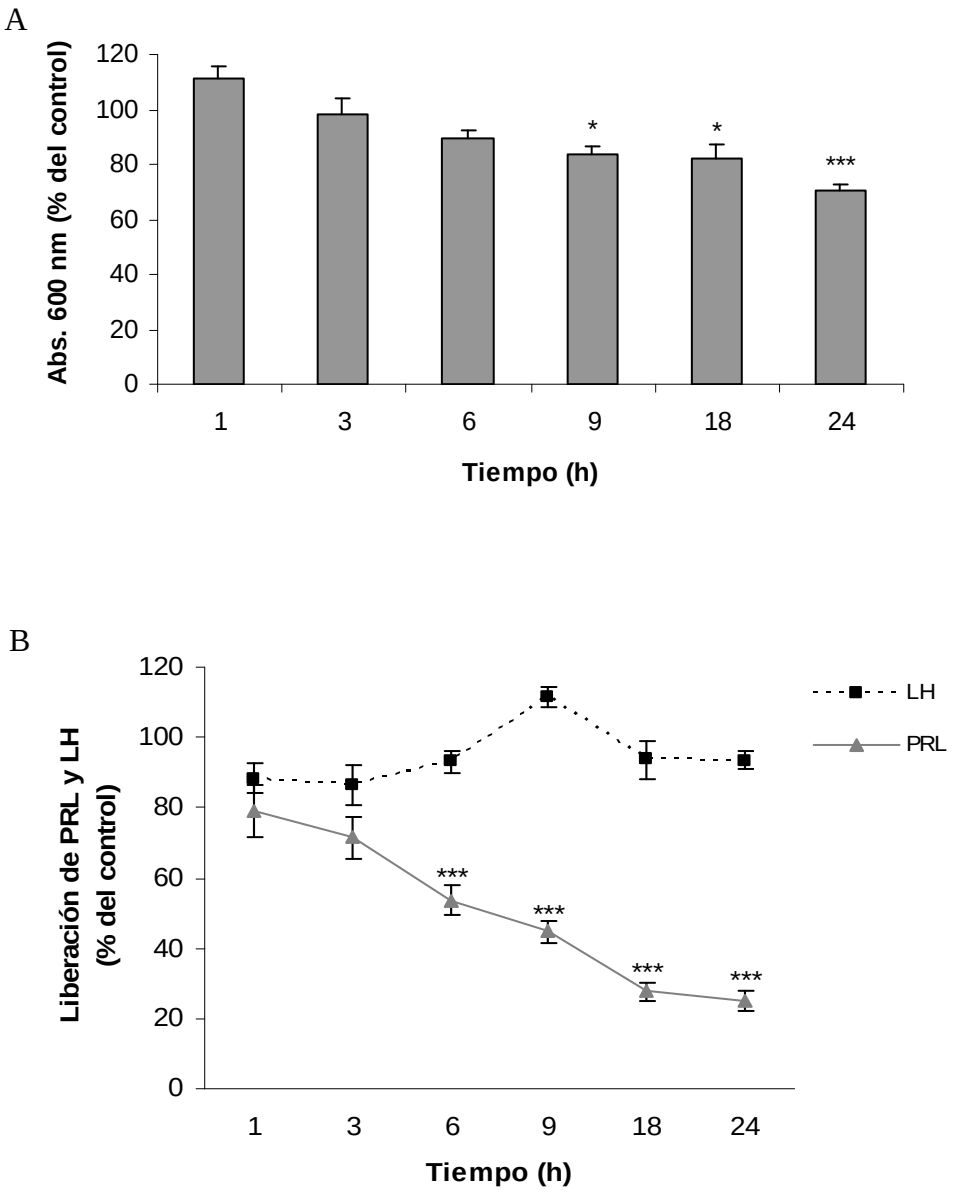


Figura 12. El iAs afecta la viabilidad celular (A) y disminuye la liberación de PRL sin afectar la de LH (B) en función del tiempo.
Las células fueron incubadas con iAs 25 µM o vehículo (control) durante diferentes tiempos. La viabilidad celular se determinó por la técnica de MTT. La liberación de PRL y de LH en el medio se determinó por RIA. Los resultados representan la media ± SE de la absorbancia a 600 nm (A) y de la concentración de PRL y de LH en ng/mL (B) y fueron expresados como porcentaje del control respectivo para cada tiempo (n=3). ANOVA seguido de test de Tukey-Kramer. *p< 0,05; ***p< 0,001 vs. control respectivo.

3.3.2.2. El iAs afecta la viabilidad celular y la liberación de PRL de manera irreversible.

Con el objetivo de conocer el momento preciso a partir del cual el efecto del metaloide sobre la viabilidad celular y la liberación hormonal se hace irreversible, las células fueron expuestas al iAs durante diferentes tiempos luego de los cuales el medio fue remplazado por medio fresco sin iAs y se prosiguió con la incubación hasta completar 24 h totales, momento en el cual se determinaron la viabilidad celular y la concentración de PRL acumulada en el medio. En estas condiciones, observamos que el tratamiento con iAs durante 9 h fue suficiente para reducir la viabilidad celular medida a las 24 h, indicando que la exposición al iAs por 9 h afecta de manera irreversible la viabilidad celular (**Figura 13 A**).

Con respecto a la liberación hormonal, los niveles de PRL se vieron afectados más tempranamente ya que se observó que el tratamiento con iAs durante 3 h fue suficiente para disminuir de forma irreversible los niveles de la hormona (**Figura 13 B**).

Estos resultados muestran que 9 h de exposición al metaloide son suficientes para inducir irreversiblemente la muerte de las células adenohipofisarias y que la liberación de PRL disminuye tempranamente aun antes de que sea afectada la viabilidad celular sugiriendo que ambos efectos del iAs son temporalmente independientes.

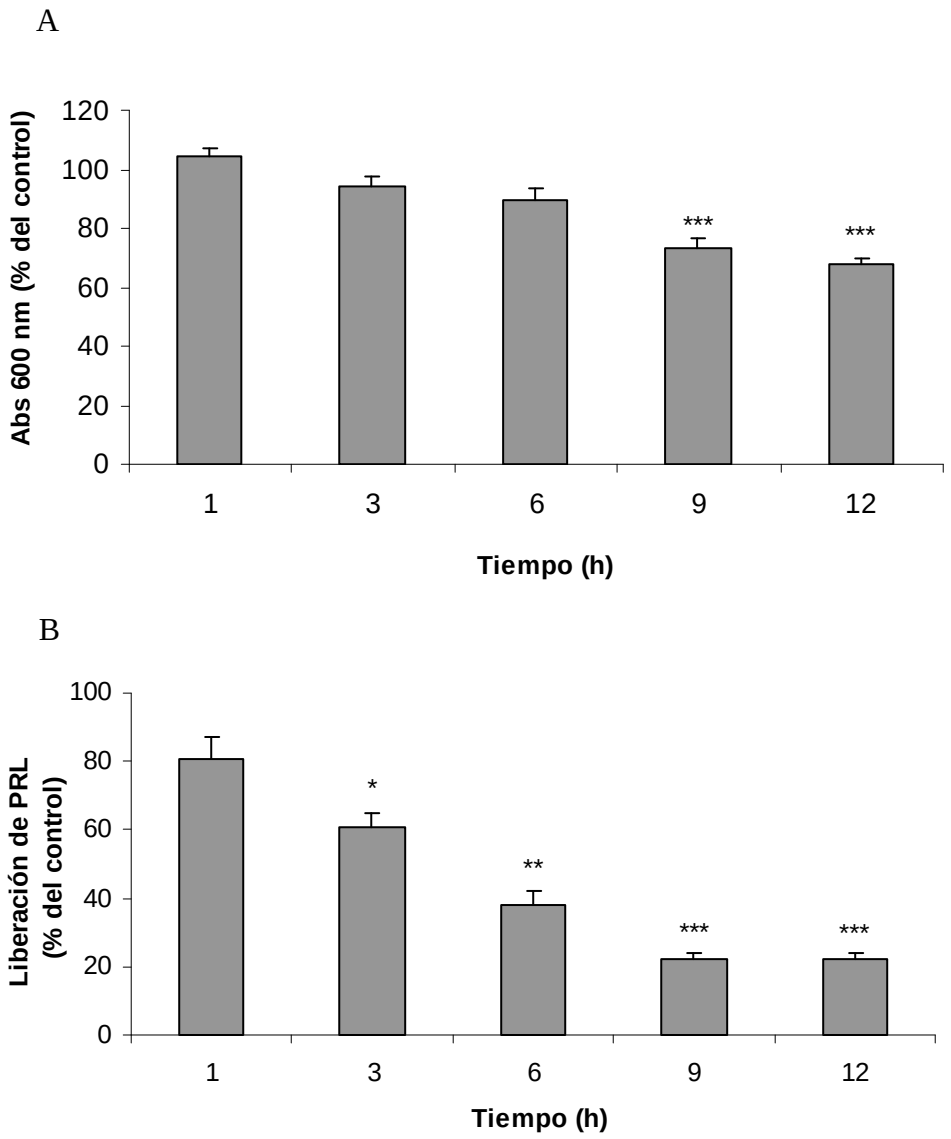


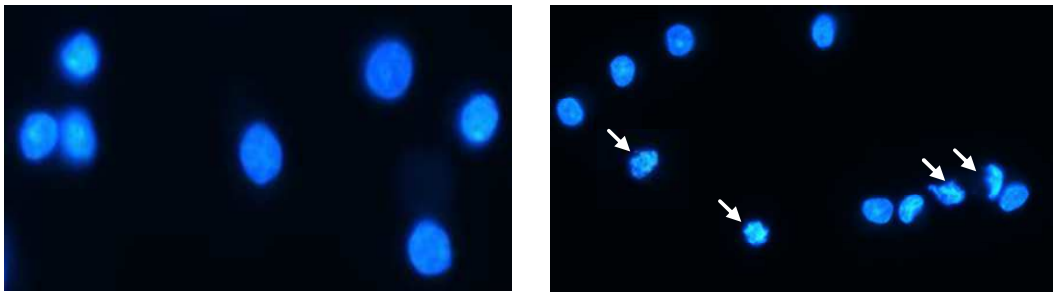
Figura 13. El iAs afecta la viabilidad celular de manera irreversible (A) y disminuye tempranamente la liberación de PRL (B).
Las células fueron incubadas con iAs 25 µM o vehículo (control) durante diferentes períodos de tiempo. Posteriormente, el medio fue reemplazado con medio fresco sin iAs y se prosiguió con la incubación hasta completar las 24 h, momento en el cual se determinó la viabilidad celular por la técnica de MTT y la liberación de PRL acumulada en el medio por RIA. Los resultados representan la media ± SE de la absorbancia a 600 nm (A) y de la concentración de PRL en ng/mL (B) y fueron expresados como porcentaje del control respectivo para cada tiempo (n=3). ANOVA seguido de test de Tukey-Kramer. *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001 vs. control respectivo.

3.3.2.3. El iAs induce apoptosis en las células adenohipofisarias

Diversas evidencias indican que el iAs en concentraciones micromolares induce muerte celular por apoptosis en diferentes tipos celulares (Datta y col., 2009; Cheng y col., 2010; Han y col., 2010).

La presencia de núcleos fragmentados y con cromatina condensada es un marcador morfológico característico de la apoptosis. Con el fin de averiguar el tipo de muerte celular inducido por este metaloide examinamos la morfología nuclear de las células expuestas al iAs durante diferentes tiempos. El iAs produjo un aumento en el número de núcleos apoptóticos a partir de las 9 h de tratamiento y este efecto se incrementó a las 18 y 24 h (**Figura 14**).

A Control iAs



B

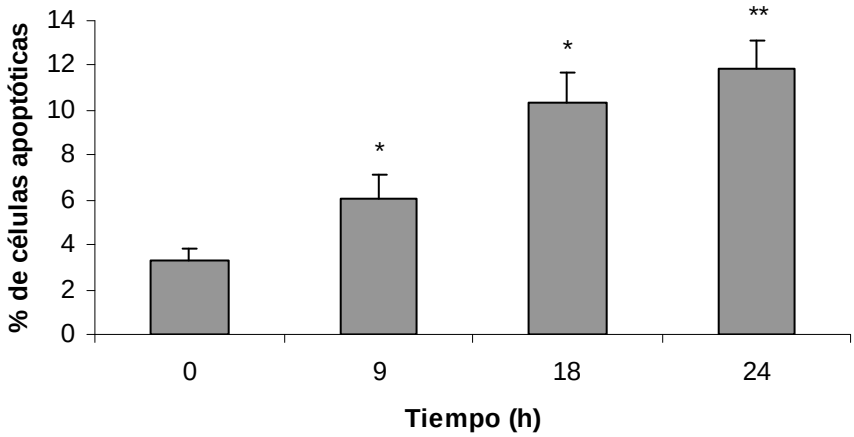


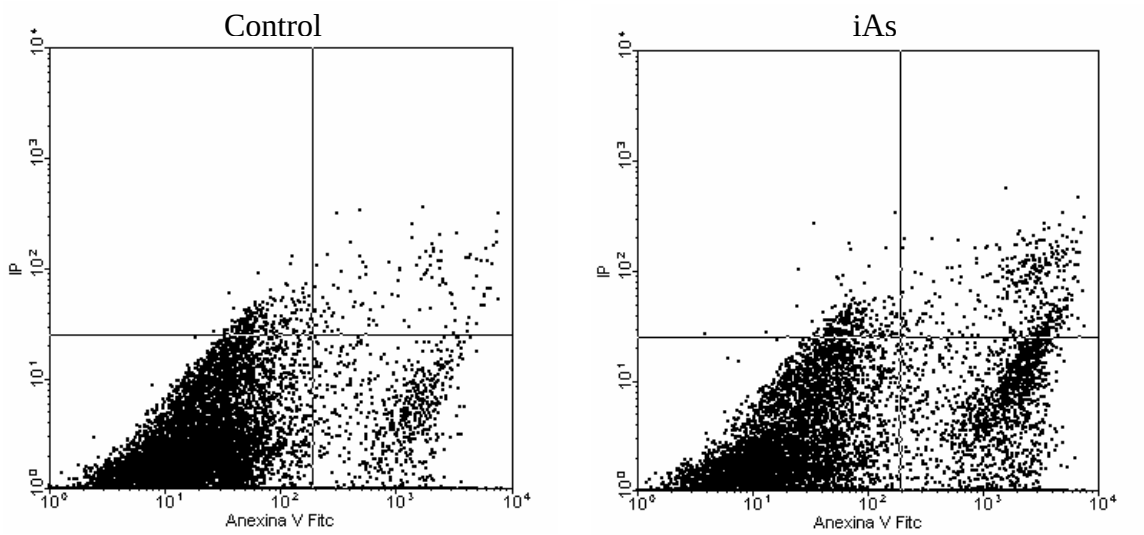
Figura 14. El iAs causa fragmentación nuclear y condensación de la cromatina en las células adenohipofisarias.
Las células fueron incubadas con iAs 25 µM o vehículo (control) durante diferentes tiempos. Finalizados los tratamientos, las células fueron fijadas y teñidas con el colorante DAPI para observar su morfología nuclear. (A) Imágenes de las células controles (izq) o expuestas al iAs (der). (B) Los resultados representan la media ± SE y fueron expresados como porcentaje de núcleos fragmentados respecto al n° total de núcleos. (n=3). ANOVA seguido de test de Dunnett, *p<0,05; **p<0,01 vs. control.

Para confirmar las observaciones morfológicas, la apoptosis fue determinada por citometría de flujo mediante la tinción con Anexina V-FITC e ioduro de propidio (IP).

Durante las primeras etapas de la apoptosis ocurre la externalización de la fosfatidilserina. Este fosfolípido es traslocado desde la cara interna de la membrana plasmática a la cara externa quedando totalmente expuesto. La Anexina V es una molécula con alta afinidad por la fosfatidilserina por lo cual la marcación de las células con Anexina V-FITC permite detectar aquellas en las primeras etapas de la apoptosis. A medida que avanza la apoptosis en el tiempo, se pierde la integridad de la membrana plasmática y colorantes vitales como el IP pueden entonces ingresar a la célula. La tinción con ambos colorantes permite diferenciar células que se encuentran en etapas iniciales de la apoptosis (Anexina V positivas; IP negativas) de células en etapas tardías del proceso o necróticas (Anexina V positivas; IP positivas). Como puede observarse en la **figura 15**, el tratamiento con iAs durante 18 h produjo un aumento en el porcentaje de células apoptóticas tempranas. Estas células son Anexina V positivas, IP negativas. Cabe destacar que también se observó un aumento pequeño en el porcentaje de células Anexina V positivas, IP positivas correspondiente a células apoptóticas tardías y necróticas.

Ambos estudios muestran que la muerte celular inducida por el iAs, en las células adenohipofisarias, sucede principalmente por un mecanismo de tipo apoptótico.

A



B

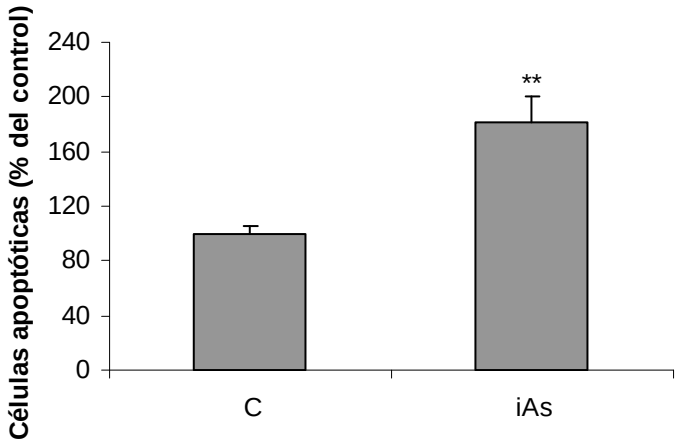


Figura 15. El tratamiento con iAs induce apoptosis de las células adenohipofisarias.
Las células fueron incubadas con iAs 25 µM o vehículo (control) durante 18 h. (A) Gráfico del análisis de la citometría correspondiente a un experimento representativo de 3 experimentos independientes, eje *y*: IP, eje *x*: Anexina V-FITC. Cuadrante inferior izquierdo: células vivas (An -; IP -); cuadrante inferior derecho: apoptóticas tempranas (An +, IP -); cuadrante superior derecho: apoptóticas tardías y necróticas (An +, IP +); cuadrante superior izquierdo: necróticas (An -; IP +). (B) Los resultados representan la media ± SE del porcentaje de células apoptóticas tempranas y están expresados como porcentaje del control, (n=3). Test "*t*" de Student, ** $p<0,01$

3.3.2.4. El iAs produce una despolarización temprana del potencial de membrana mitocondrial.

Otro de los eventos iniciales que se producen en la vía apoptótica intrínseca o vía mitocondrial es la disrupción del potencial de la membrana mitocondrial interna (PMM), provocada por la acción de diversos estímulos apoptóticos (Susin y col., 1999). Una disminución de este potencial se correlaciona con un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo cual provoca la liberación de citocromo *c*. Éste, junto a otros factores mitocondriales y citoplasmáticos, lleva a la activación de la caspasa 9 que a su vez activa a la caspasa 3, desencadenante del proceso final que lleva a la muerte celular (Stennicke y Salvesen, 2000; Harada y Grant, 2003; Garrido y Kroemer, 2004).

Con el objetivo de investigar el mecanismo por el cual el iAs induce apoptosis de las células adenohipofisarias se estudió el efecto del metaloide sobre el PMM. Para ello las células fueron incubadas con iAs durante diferentes tiempos luego de los cuales se midió el PMM por citometría de flujo utilizando la sonda DiOC6. El iAs indujo una despolarización de la membrana mitocondrial luego de 6 h de exposición, efecto que se incrementó marcadamente a las 24 h (**Figura 16**).

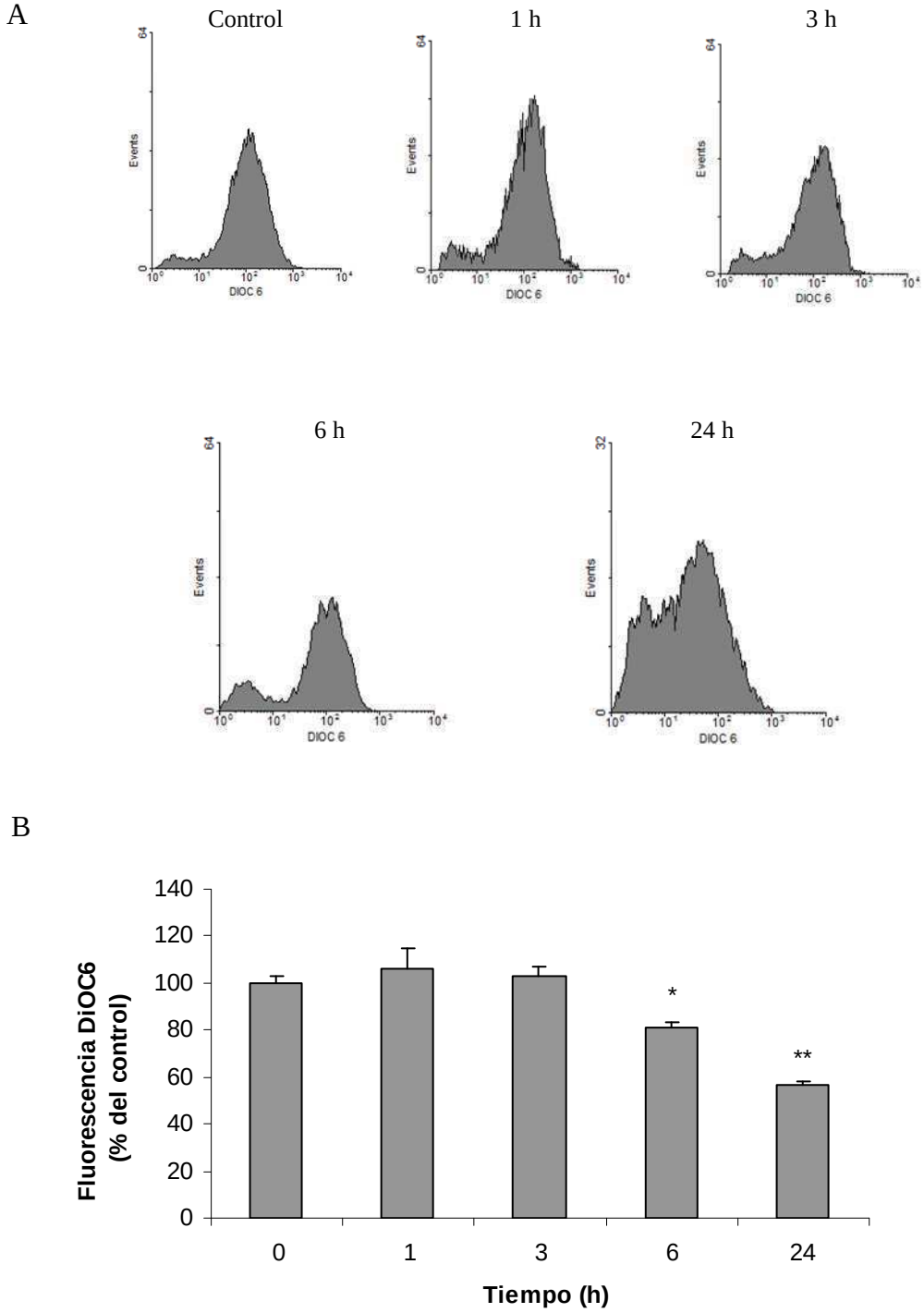


Figura 16. El iAs produce una despolarización temprana del potencial de la membrana mitocondrial.
Las células fueron incubadas con iAs 25 µM o vehículo (control) durante los tiempos indicados y cargadas con DiOC6 30 nM 30 min antes de finalizar los tratamientos. La fluorescencia fue determinada por citometría de flujo. (A) Gráfico del análisis de citometría correspondiente a un experimento, eje *y*: número de células, eje *x*: intensidad de fluorescencia. (B) Los resultados representan la media ± SE de la intensidad de fluorescencia y están expresados como porcentaje del control (n=3). ANOVA seguido de test de Dunnett, *p<0,05; **p<0,01 vs. control.

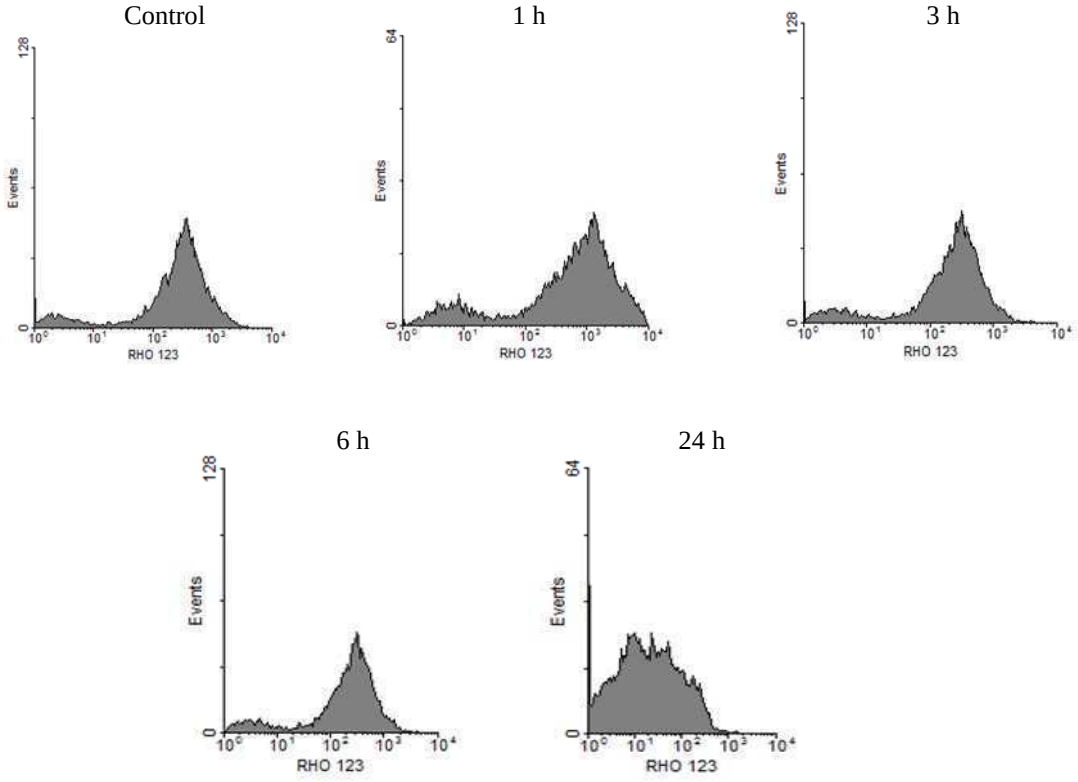
3.3.2.5. El iAs induce un incremento temprano de ROS.

Las ROS son importantes mediadoras de diversas cascadas de señales en varios procesos biológicos (Lander, 1997; Sen, 2000; Voeikov, 2006). Un aumento en la concentración de ROS puede actuar sobre distintos componentes celulares y desencadenar la activación de vías de señalización que conduzcan tanto a la proliferación como a la muerte celular. Numerosos estudios han demostrado que el tratamiento con iAs genera un incremento en la producción de ROS en diferentes tipos celulares (Liu y col., 2001; Shi y col., 2004).

Teniendo en cuenta estos antecedentes examinamos si el iAs es capaz de producir cambios en los niveles intracelulares de ROS en las células adenohipofisarias. Para ello, las células se incubaron con iAs durante diferentes tiempos y los niveles de ROS se determinaron por citometría de flujo utilizando la sonda DHR123.

La exposición de las células al iAs provocó un incremento temprano y transitorio de los niveles de ROS. Estos aumentaron durante las tres primeras horas de incubación y luego disminuyeron progresivamente, retornando a los niveles basales hacia las 6 h y a niveles aun inferiores al control a las 24 h (**Figura 17**).

A



B

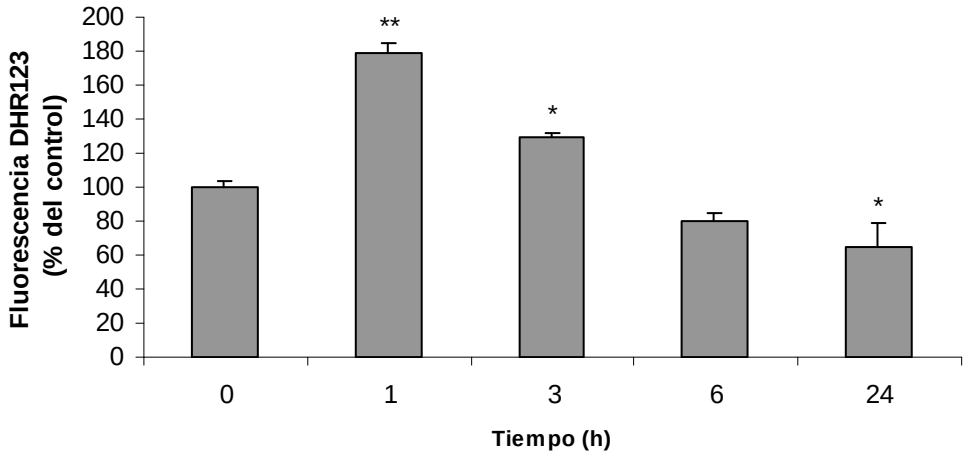


Figura 17. El iAs induce un incremento temprano de ROS.
Las células fueron incubadas con iAs 25 µM o vehículo (control) durante los tiempos indicados y cargadas con DHR123 30 µM 30 min antes de finalizar los tratamientos. La fluorescencia fue determinada por citometría de flujo. (A) Gráfico del análisis de citometría correspondiente a un experimento, eje *y*: número de células, eje *x*: intensidad de fluorescencia. (B) Los resultados representan la media ± SE de la intensidad de fluorescencia y están expresados como porcentaje del control (n=3). ANOVA seguido de test de Dunnett, *p<0,05; **p<0,01 vs. control.

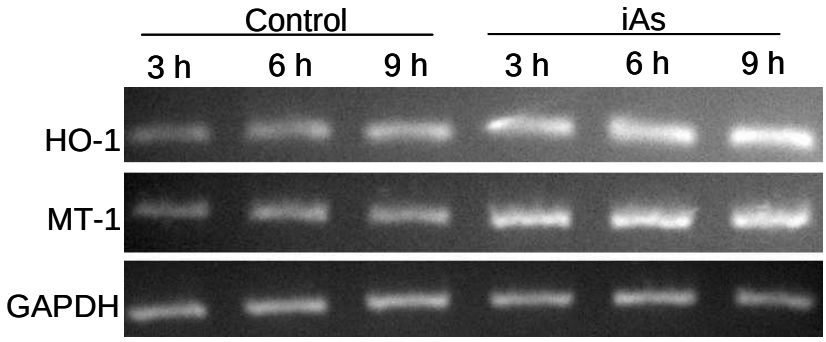
Un aumento de los niveles intracelulares de ROS puede darse por un incremento en su producción y/o por una alteración en el sistema antioxidante celular.

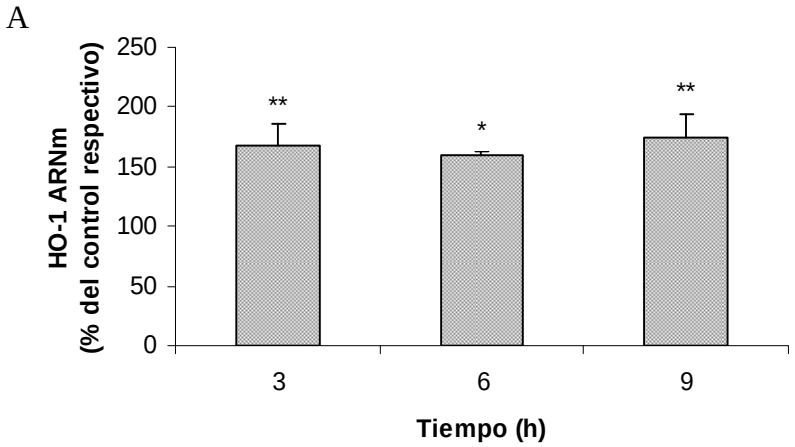
Como se describe en la introducción, el sistema antioxidante de la célula está formado por componentes enzimáticos y no enzimáticos que mantienen el balance redox previniendo los efectos tóxicos causados por un exceso de ROS. Una de las primeras respuestas que posee la célula frente a un estímulo oxidativo es la inducción de la expresión de diferentes factores de transcripción y enzimas que a su vez desencadenan la respuesta antioxidante específica y persistente. Entre ellos podemos nombrar la expresión del factor nuclear (derivado de eritroide 2) tipo 2 (Nrf2) y de la tiorredoxina (TRX), la expresión de la hemooxigensa-1 (HO-1) y de las metalotioneínas (MTs).

3.3.2.6. El iAs altera la expresión de genes de respuesta al estrés oxidativo.

Teniendo en vista los resultados obtenidos *in vivo* estudiamos el efecto de la exposición al metaloide sobre la expresión de genes de respuesta al estrés oxidativo tales como la HO-1 y la MT-1. Para ello las células fueron incubadas con iAs por diferentes tiempos y luego se determinaron los niveles de expresión del ARNm de los distintos genes mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa.

El iAs produjo un incremento en la expresión de los ARNm de HO-1 (**Figura 18 A**) y MT-1 (**Figura 18 B**) desde las primeras horas de incubación y el mismo se mantuvo a lo largo de todos los tiempos analizados.





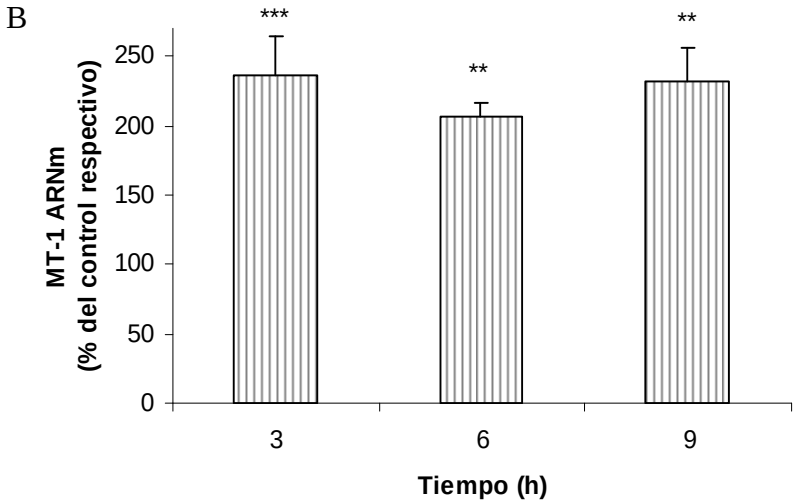


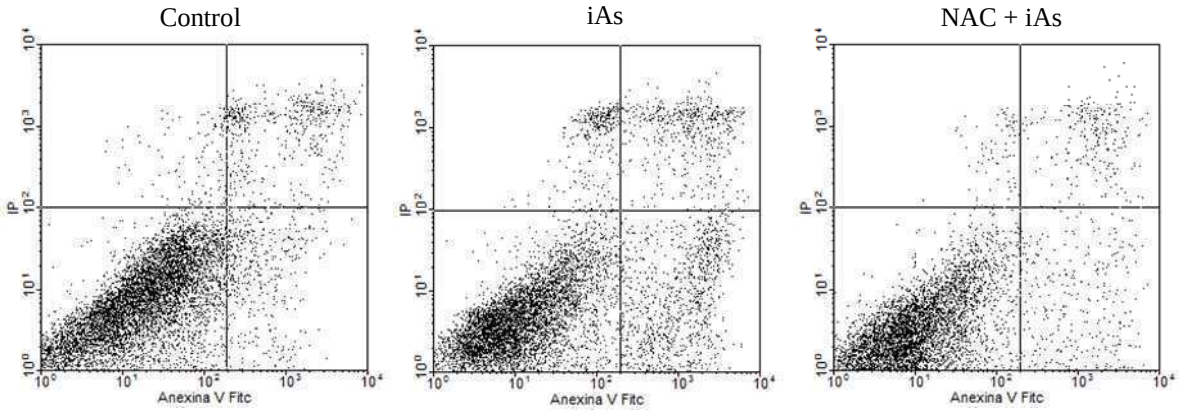
Figura 18. El iAs altera la expresión del ARNm de genes de respuesta al estrés oxidativo. Las células fueron incubadas con iAs 25 µM o vehículo (control) durante los tiempos indicados. Los niveles de ARNm de hemooxigenasa-1 (HO-1), (A) y de metalotioneína-1 (MT-1), (B) fueron determinados por RT-PCR. El panel superior muestra una RT-PCR semicuantitativa representativa. Los resultados representan la media ± SE de los niveles densitométricos para cada gen en relación a la expresión de GAPDH y están expresados como porcentaje del control respectivo (n=3). ANOVA seguido de test de Tukey-Kramer, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. control respectivo.

3.3.2.7. El estrés oxidativo está involucrado en el mecanismo apoptótico del iAs.

Existen numerosas evidencias que demuestran que la generación de estrés oxidativo es un evento clave en el mecanismo de toxicidad del iAs en distintos tipos celulares (Flora, 2011). Teniendo en cuenta los resultados antes descriptos que muestran que este metaloide causa un aumento temprano de los niveles de ROS, es posible que el efecto citotóxico del iAs sea una consecuencia de la inducción de estrés oxidativo.

Con el fin de evaluar el papel de las ROS en el efecto apoptótico del iAs, las células fueron incubadas con N-acetilcisteína (NAC) -un precursor del glutatión con capacidad antioxidante *per se*-. El NAC es una molécula con numerosos grupos tioles capaces de secuestrar al iAs, por lo tanto para confirmar que el efecto del antioxidante se debía a su capacidad de protección y no simplemente al secuestro del metaloide en el ambiente extracelular (lo cual conduciría a una menor entrada del mismo a las células) el experimento se realizó preincubando a las células con NAC 2 mM durante 2 h y luego estas fueron expuestas al iAs (en ausencia de NAC) durante 24 h. La inducción de apoptosis fue determinada por citometría de flujo utilizando Anexina V-FITC e IP. El tratamiento con NAC fue capaz de reducir el efecto apoptótico del iAs sobre las células adenohipofisarias. Cabe destacar que el antioxidante también produjo una reducción en el porcentaje de células apoptóticas tardías y necróticas (**Figura 19**).

A



B

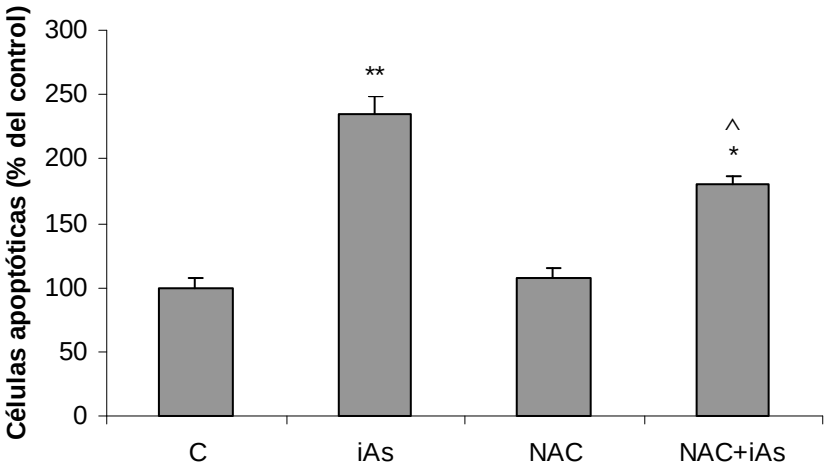


Figura 19. El NAC previene parcialmente el efecto apoptótico del iAs sobre las células adenohipofisarias.

Las células fueron tratadas con NAC 2 mM durante 2 h y luego incubadas o no (control) con iAs 25 µM (sin NAC) durante 24 h. La apoptosis fue determinada por citometría de flujo utilizando Anexina V-FITC e IP. (A) Gráfico del análisis de la citometría correspondiente a un experimento representativo de 3 experimentos independientes, eje *y*: IP, eje *x*: Anexina V-FITC. Cuadrante inferior izquierdo: células vivas (An -; IP -); cuadrante inferior derecho: apoptóticas tempranas (An +, IP -); cuadrante superior derecho: apoptóticas tardías y necróticas (An +, IP +); cuadrante superior izquierdo: necróticas (An -; IP +). (B) Los resultados representan la media ± SE del porcentaje de células apoptóticas tempranas de los distintos tratamientos y están expresados como porcentaje del control, (n=3). ANOVA seguido de test de Tukey-Kramer, *$p<0,05$; **$p<0,01$ vs. control, ^$p<0,05$ vs. iAs.

3.3.2.8. El NAC reduce el efecto del iAs sobre la expresión del ARNm de HO-1 y MT-1

La reducción por NAC de la citotoxicidad del iAs sugiere que este efecto se debe principalmente a la capacidad del metaloide de inducir estrés oxidativo. Para corroborar este hecho se evaluó el efecto del NAC sobre el aumento en los niveles del ARNm de HO-1 y MT-1 generados por el metaloide. Las células fueron preincubadas con NAC 2mM durante 2 h y luego expuestas al iAs (en ausencia de NAC) durante 6 h (tiempo en el cual habíamos observado los cambios en la expresión de estos marcadores). Los resultados presentados en la **figura 20** muestran que el tratamiento con NAC previno totalmente el incremento en los niveles del ARNm de HO-1 y MT-1 causado por el iAs.

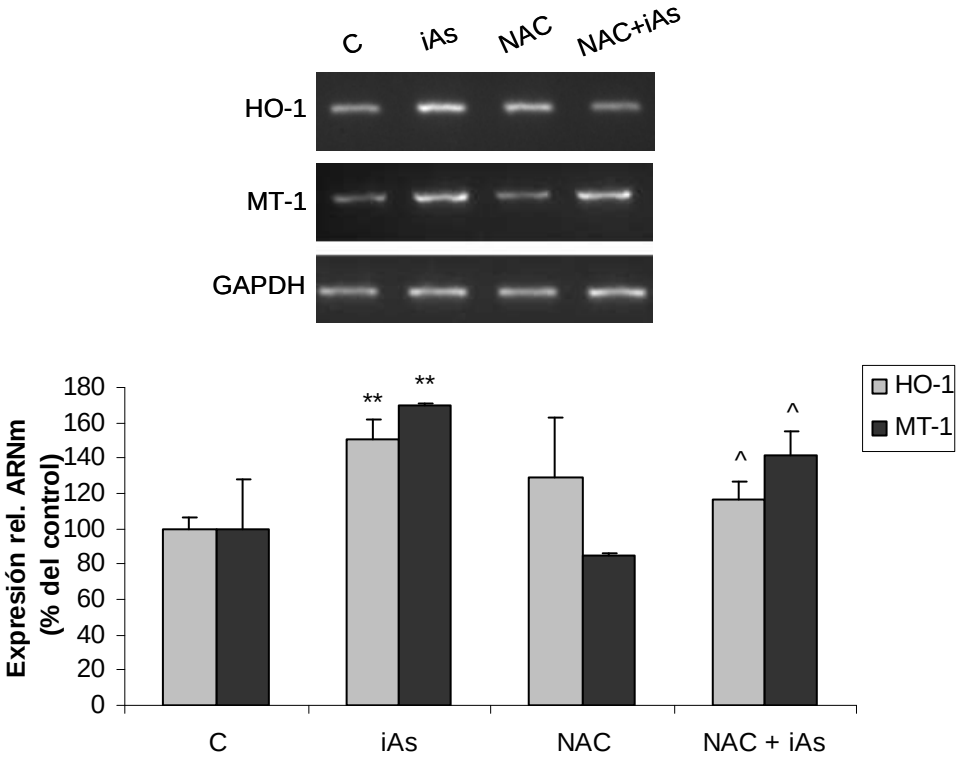


Figura 20. El NAC reduce el aumento de los ARNm de genes de respuesta al estrés oxidativo inducido por el iAs.
Las células fueron tratadas con NAC 2 mM durante 2 h y luego incubadas o no (control) con iAs 25 µM (sin NAC) durante 6 h. Los niveles de ARNm de hemooxigenasa-1 (HO-1) y de metalotioneína-1 (MT-1) fueron determinados por RT-PCR. El panel superior muestra una RT-PCR semicuantitativa representativa. Los resultados representan la media ± SE de los niveles densitométricos para cada gen en relación a la expresión de GAPDH y están expresados como porcentaje del control (n=3). ANOVA seguido de test de Tukey-Kramer, **p<0,01 vs. control, ^p<0,05 vs. iAs

3.3.2.9. El NAC previene el efecto inhibitorio del iAs sobre la liberación de PRL.

Previamente mostramos que la incubación con iAs durante 9 h fue suficiente para desencadenar de manera irreversible la muerte celular, mientras que la inhibición sobre la liberación de PRL se produjo a partir de las 3 h de incubación con el metaloide (**Figura 13 B**). Por otro lado, observamos que el iAs incrementó tempranamente la producción de ROS (**Figura 15**). Como el incremento en los niveles de ROS, generado por el iAs, precede a la inhibición de la liberación de PRL, a continuación decidimos averiguar si existía una relación entre ambos hechos.

Con el fin de determinar la relevancia de las ROS en el efecto inhibitorio del iAs sobre la liberación de PRL, las células fueron preincubadas con NAC 2 mM durante 2 h y luego incubadas con iAs (en ausencia de NAC) durante 3 h. Finalizado este tiempo, el medio fue reemplazado por medio fresco (sin iAs) y se prosiguió con la incubación hasta completar 24 h totales, momento en el cual se determinó la concentración de PRL en el medio. El tratamiento con NAC previno totalmente el efecto inhibitorio del iAs sobre la liberación de PRL, indicando que el estrés oxidativo está involucrado en las acciones del iAs sobre la liberación de PRL (**Figura 21**).

Estos resultados indican que la generación de estrés oxidativo podría ser un evento temprano involucrado en la acciones del iAs sobre la liberación de prolactina y la viabilidad celular.

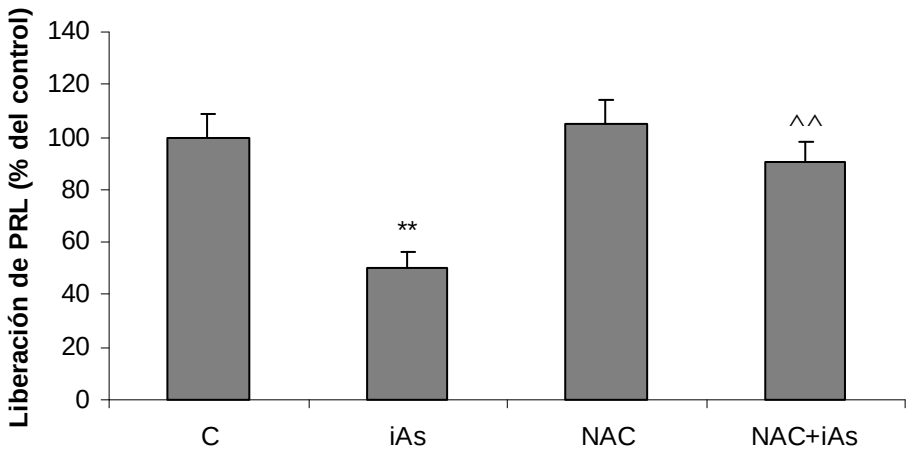


Figura 21. El NAC previene totalmente la inhibición de la liberación de prolactina inducida por el iAs.
Las células fueron tratadas con NAC 2 mM y luego incubadas con iAs 25 µM (sin NAC) durante 3 h. Luego de este tiempo el medio fue reemplazado por medio libre de iAs hasta completar 24 h totales. La liberación de PRL al medio fue determinada por RIA. Los resultados representan la media de la concentración de PRL ± SE, (n=3). ANOVA seguido de test de Tukey-Kramer, **p<0,01 vs. control, ^^p<0,01 vs. iAs

3.4 DISCUSIÓN I

I. Efectos de la administración *in vivo* del iAs en la adenohipófisis

La contaminación del agua con iAs es un problema de salud pública muy serio y de importancia a nivel nacional y mundial debido al poder carcinógeno y neurotóxico de este elemento. Este metaloide se haya ampliamente distribuido en el ambiente en especial como resultado de la disolución de minerales, la erosión, la desintegración de rocas y la deposición atmosférica (Epidemiología del Hidroarsenicismo, 2006).

Millones de personas en el mundo están en riesgo de padecer los efectos adversos de la exposición al iAs. Se calcula que más de 140 millones de personas son afectadas en 70 países de todos los continentes (Ravenscroft y col., 2009).

El mayor riesgo proviene del consumo de agua extraída de pozos excavados en zonas con sedimentos ricos en iAs. Sin embargo, la ingesta del iAs a través de los alimentos y la inhalación de aire contaminado constituyen también una importante fuente de exposición (ATSDR, 2007). La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera al iAs como una de las 10 sustancias químicas más preocupantes para la salud humana. Dada la fuerte evidencia existente de los efectos tóxicos provocados por la exposición crónica al agua contaminada con iAs, la OMS ha reducido el límite recomendado para la concentración de iAs en el agua potable de 50 µg/L a 10 µg/L (WHO, 1993). Sin embargo, debido a los conocimientos actuales del tema, esta reducción aún no es suficiente.

Muchos de los estudios *in vivo* sobre los efectos adversos del iAs se han realizado mediante la administración del metaloide en una o varias inyecciones intraperitoneales (Maiti, 2000; Sarkar y col., 2003; Pal y Chatterjee, 2004; Haider y Najar, 2008). Por otro lado sus efectos también han sido estudiados utilizando sondas intragástricas como vías de administración (Rodríguez y col., 2001; Dhar y col., 2005). En este trabajo, teniendo en cuenta que el consumo de agua y

alimentos contaminados son la principal fuente de exposición en la población, la administración del iAs (como arsenito de sodio) se realizó a través del agua de bebida. Este tipo de exposición permite semejar una condición que podría suceder de forma natural. Los estudios en los cuales este metaloide se administra a través del agua de bebida utilizan un amplio rango de concentraciones que van desde 1 ppm hasta 200 ppm durante períodos de 30 hasta 180 días (Delgado y col., 2000; Suzuki y col., 2010; Whittaker y col., 2011; Sankar y col., 2014).

Nuestro trabajo se realizó utilizando concentraciones de 5, 25 y 100 ppm administradas en el agua de bebida durante 30 días. Si bien estas concentraciones están por encima de los niveles de contaminación más comunes presentes en las aguas de consumo, permiten estudiar los efectos deletéreos del iAs en tiempos relativamente cortos. Cabe destacar que ninguna de las concentraciones empleadas en este estudio alteró la tasa de crecimiento ni el consumo diario de agua de los animales, lo que permite suponer que nuestras condiciones experimentales no fueron muy severas.

Efectos del iAs sobre la expresión de marcadores de estrés oxidativo

Aunque existen antecedentes que indican que el iAs es capaz de acumularse en la glándula hipofisaria y afectar la regulación del eje hipotálamo-hipofisario (Jana y col., 2006; Sánchez-Peña y col., 2010; Goggin y col., 2012), hasta el momento no se ha registrado un posible efecto directo del metaloide sobre esta glándula. Es por ello que en esta primera etapa se estudió el efecto del iAs *in vivo* a nivel de la adenohipófisis como inductor de estrés oxidativo y sobre la concentración plasmática de algunas hormonas adenohipofisarias.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con iAs produjo estrés oxidativo en la adenohipófisis. Esto fue comprobado mediante el estudio de la expresión de tres marcadores clásicos de estrés oxidativo como HO-1, MT-1 y TRX-1.

Como detallamos previamente, los marcadores de estrés oxidativo son factores de transcripción y enzimas cuya expresión es inducida en respuesta a un daño o agente oxidante.

La enzima inducible HO-1 es un marcador clásico de estrés oxidativo regulada en gran medida por el estado redox de la célula (Otterbein y col., 2003; Poon y col., 2004). Su expresión es coordinada por el factor de transcripción Nrf2 (Kensler y col., 2007; Liu y col., 2009), que responde a xenobióticos específicos como varios metales pesados y metaloides.

Las MTs ejercen un papel protector contra los efectos oxidantes de diferentes metales (Nordberg y col., 1994). La alta afinidad de la MT-1 por los metales y su capacidad de detoxificar ROS contribuye a disminuir los niveles circulantes de los mismos atenuando su toxicidad (Volm y col., 2002; Theocharis y col., 2003). El iAs es capaz de inducir la expresión de MT-1 al estimular al factor de trascripción de respuesta a metales (MTF-1). Esta proteína regula la expresión génica de las MTs en respuesta a un estímulo oxidante (Kreppel y col., 1993; Andrews, 2000).

Las TRX constituyen otro tipo de proteínas que pueden regular el estado redox celular frente a metales tóxicos y estrés oxidativo. La TRX-1 participa en la regulación de la muerte celular por apoptosis y la sensibilidad a diferentes drogas (Tobiume y col., 2001). Previamente se ha demostrado que un incremento en la expresión de TRX-1 inhibe la apoptosis inducida por iAs en la línea tumoral de hígado Hep G2 (Tian y col., 2008).

En este trabajo observamos que el tratamiento con 5, 25 o 100 ppm de iAs incrementó la expresión del ARNm de MT-1 y TRX-1, mientras que los niveles de HO-1 aumentaron a partir de la concentración de 25 ppm. Los resultados obtenidos para MT-1 y HO-1 coinciden con los reportados por el grupo de Waalkes y col. en el hígado (Liu y col., 2001). Estos autores mostraron que la administración aguda del iAs *in vivo* incrementa la expresión de MT-1 y HO-1 junto con otras proteínas que responden al estrés oxidativo inducido por iAs. Con respecto a la MT-1, Albores y col. observaron que el iAs *in vivo* aumenta la expresión del ARNm y de la proteína de MT-1 y MT-2 en hígado mientras que

no obtuvieron cambios en el riñon ni en el páncreas (Albores y col., 1992). En cuanto a la TRX-1, Tajima y col. demostraron un aumento en la expresión del ARNm de esta proteína en el pulmón como resultado de la exposición combinada al iAs y al Cr VI en ratones machos (Tajima y col., 2010). Otro estudio realizado en humanos expuestos a diferentes concentraciones de iAs a través del agua de bebida mostró una correlación positiva entre los niveles séricos de TRX-1 y el contenido total de iAs ingerido. Más aun, los cambios en la expresión de TRX-1 fueron detectados antes de la visualización de los síntomas dermatológicos clásicos inducidos por la exposición al metaloide sugiriendo que la TRX-1 podría ser un marcador temprano de los efectos adversos del iAs (Li y col., 2012).

Efectos del iAs sobre los niveles séricos de hormonas adenohipofisarias

Desde el punto de vista endocrinológico, se sabe que la exposición al iAs afecta los niveles plasmáticos de algunas hormonas adenohipofisarias tanto en humanos como en animales de laboratorio (Delgado y col., 2000; Sarkar y col., 2003; Jana y col., 2006; Meeker y col., 2009; Chattopadhyay y Ghosh, 2010). Nuestros resultados mostraron que la administración crónica del iAs provocó una disminución en los niveles séricos de PRL en forma dosis dependiente, mientas que los de la LH sólo se vieron afectados con la máxima concentración utilizada (iAs 100 ppm). Con respecto a la PRL, existen muy pocos trabajos que hayan estudiado el efecto del iAs sobre la secreción de esta hormona. Resultados similares a los presentados en esta tesis han sido obtenidos por Jahan y col. quienes utilizaron ratas hembras expuestas a 100 y 200 ppm de iAs durante 28 días. En este modelo se observó que la administración del metaloide disminuyó los niveles séricos de PRL, así como también de estradiol y produjo alteraciones morfológicas en la glándula mamaria (Jahan y col., 2012). Otro estudio poblacional en humanos ha demostrado que los niveles plasmáticos de

iAs y PRL poseen una correlación negativa, mientras que con los niveles de TSH se observa una correlación positiva (Meeker y col., 2009).

En cuanto a la LH, numerosos trabajos han mostrado que la exposición crónica a dosis de iAs similares a las estudiadas en el presente trabajo, inhibe la secreción de esta hormona (Sarkar y col., 1991; Chattopadhyay y col., 1999; Chatterjee y Chatterji, 2010).

Es interesante destacar que nosotros observamos que la PRL disminuye a partir de la concentración de 25 ppm de iAs mientras que la LH sólo se ve afectada con la máxima dosis utilizada. Estos resultados podrían indicar una posible acción preferencial del iAs sobre los lactotropos o una mayor sensibilidad de estas células al metaloide, lo cual se discutirá más adelante en los estudios realizados *in vitro.*

Si bien se conoce que el iAs afecta la liberación de distintas hormonas adenohipofisarias, su mecanismo de acción permanece aún sin ser establecido. La regulación de la secreción hormonal de la glándula hipofisaria depende de la acción concertada de varios factores provenientes tanto del hipotálamo como de los tejidos periféricos o de las propias células adenohipofisarias (Page, 1994). Por lo tanto una alteración en cualquiera de los niveles extrahipofisarios podría modificar indirectamente la secreción de las hormonas adenohipofisarias sin afectar de manera directa a la glándula. En este sentido, es posible que un descenso en los niveles de estradiol inducido por la exposición al iAs (Akram y col., 2010) pueda influir en la reducción de los niveles de PRL, dado que los estrógenos son los principales estimuladores de la secreción de esta hormona. Con respecto a la regulación de la PRL desde el hipotálamo, la dopamina constituye el principal regulador inhibitorio de la liberación de esta hormona. Existen antecedentes bibliográficos que indican que el iAs disminuye los niveles de dopamina en el hipotálamo (Delgado y col., 2000; Jana y col., 2006; Bardullas y col., 2009). Por lo tanto, si el efecto del iAs sobre la secreción de PRL estuviera mediado sólo por su acción a nivel hipotalámico, nuestros resultados deberían mostrar un incremento en los niveles séricos de PRL. Sin embargo, el iAs redujo los niveles de esta hormona, lo cual hace pensar que este metaloide podría

actuar directamente a nivel adenohipofisario, hecho que hemos comprobado en los estudios con cultivos de células adenohipofisarias.

Los resultados presentados en este trabajo tienen una marcada relevancia ya que muestran por primera vez que la adenohipófisis es un tejido blanco de los efectos tóxicos del iAs. Este metaloide genera estrés oxidativo y altera la secreción de PRL y LH contribuyendo así a incrementar sus efectos adversos sobre la fisiología gonadal y por ende, sobre la reproducción.

II. Efectos de la exposición *in vitro* al iAs en las células adenohipofisarias

Efecto del iAs sobre la viabilidad celular adenohipofisaria y la liberación hormonal

Numerosos trabajos han demostrado que el iAs ejerce efectos citotóxicos en distintos tipos celulares (Datta y col., 2009; Cheng y col., 2010; Han y col., 2010; Dodmane y col., 2013), sin embargo hasta el momento no existen datos bibliográficos que describan los efectos de este metaloide sobre las células adenohipofisarias.

Nuestros resultados muestran por primera vez que el iAs afecta de manera directa la viabilidad celular adenohipofisaria y la liberación de PRL. En primer lugar demostramos que el efecto del iAs sobre la viabilidad celular es dependiente de la dosis y del tiempo. En nuestras condiciones experimentales la citotoxicidad del metaloide se hizo evidente con concentraciones iguales o mayores a 25 µM. Concentraciones menores (1 y 10 µM) no produjeron cambios en la actividad celular en el tiempo estudiado, aunque no podemos descartar que pudieran ocurrir con tiempos más prolongados de exposición. Teniendo en cuenta estos resultados la concentración de iAs 25 µM resultó ser la de elección para llevar a cabo los estudios subsiguientes ya que ésta fue capaz de producir una reducción en la viabilidad celular cercana al 40%.

El efecto citotóxico del iAs sobre las células adenohipofisarias se hizo irreversible a partir de las 9 h de exposición con el metaloide.

Con respecto a la liberación hormonal, el iAs disminuyó la liberación de PRL en forma dosis y tiempo dependiente. Este efecto parece ser independiente de la acción citotóxica del metaloide ya que se manifiestó a concentraciones y tiempos en los cuales no se afectó la viabilidad celular (Figuras 11-13). La reducción en la liberación de PRL podría ser consecuencia de un efecto directo del iAs sobre los mecanismos propios de liberación hormonal o ser un marcador temprano del daño celular causado por el metaloide. Esta última

hipótesis parece ser la explicación de la disminución de la hormona, ya que, como discutiremos más adelante, el tratamiento con el antioxidante, que revierte los efectos citotóxicos del iAs, también redujo el efecto inhibitorio sobre la liberación de la hormona. En contraste, la liberación basal de LH al medio no fue afectada por la exposición al iAs en los tiempos estudiados. Esta diferencia en el efecto del metaloide sobre la liberación hormonal podría deberse a un efecto específico sobre la secreción de cada hormona o a una mayor susceptibilidad de los lactotropos a los efectos del iAs. En apoyo a esta última hipótesis, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que tanto el Cd como el Cr VI inhiben la liberación de PRL sin modificar la liberación de LH y dicho efecto se debe a una mayor sensibilidad de los lactotropos a los efectos citotóxicos de estos metales pesados (Poliandri y col., 2003; Quinteros y col., 2007).

Es importante destacar que este mismo efecto diferencial del iAs sobre la liberación hormonal también lo hemos observado en los estudios *in vivo* en los cuales los niveles séricos de PRL disminuyen en forma dosis dependiente, mientras que los de LH sólo son afectados con la máxima concentración utilizada. La correlación entre ambos modelos de experimentación apoya la validez de los resultados obtenidos.

Mecanismos de acción del iAs en la adenohipófisis

-Tipo de muerte celular

Como se describe en la bibliografía existen dos grandes tipos de muerte celular: la necrosis y la apoptosis. La necrosis es un proceso agudo que se produce como consecuencia de una lesión celular masiva. En cambio, la apoptosis es un mecanismo más ordenado que no genera inflamación. Esta forma de muerte está genéticamente programada y es inducida por diferentes

factores que producen un desbalance de la homeostasis celular (Hetts, 1998; Malhi y col., 2006).

Conocer el tipo de muerte que una toxina causa sobre las células de un tejido es de fundamental importancia ya sea desde el punto de vista de las consecuencias patológicas que ésta produce o para poder delinear un tratamiento.

Nuestros resultados muestran que el iAs induce apoptosis en cultivos primarios de células adenohipofisarias. Esto fue demostrado mediante el estudio de dos técnicas que permiten diferenciar entre ambos tipos de muerte: la observación de la morfología nuclear característica con la formación de cuerpos apoptóticos (Robertson y col., 2000) y el ensayo de externalización de la fosfatidilserina de la membrana plasmática (Vermes y col., 1995). Además, pudimos observar que el iAs también causa muerte por necrosis aunque en menor medida (Figura 15).

Existen evidencias de que la apoptosis es el principal mecanismo de muerte producido por el iAs en diferentes tipos celulares (Namgung y Xia, 2001; Shi y col., 2010; Khan y col., 2012), sin embargo en otros estudios se ha observado que este metaloide es capaz de inducir la muerte celular por necrosis (Vernhet y col., 2008; Calatayud y col., 2013). Las diferentes condiciones experimentales y las dosis empleadas pueden explicar estas diferencias.

-Papel de las mitocondrias

De acuerdo con el tipo de estímulo proapoptótico existen dos vías principales por las cuales se puede iniciar la apoptosis (Fumarola y Guidotti, 2004; Garrido y Kroemer, 2004). La vía apoptótica extrínseca es desencadenada por la unión de un ligando específico, tal como una citoquina, a su receptor de membrana. La vía apoptótica intrínseca, en cambio, no depende de receptores y es inducida por agentes químicos o físicos que alteran la homeostasis celular afectando, por ejemplo, el estado redox de la célula, los niveles intracelulares de calcio, la integridad del ADN, etc. (Fumarola y Guidotti, 2004).

Las mitocondrias son sensores del estrés intracelular y están comúnmente involucradas en la vía apoptótica intrínseca (Susin y col., 1999; Harada y Grant, 2003). Diversos estudios han postulado que el evento disparador de esta vía es la disminución del potencial de la membrana mitocondrial interna (PMM) (Desagher y Martinou 2000; Harada y Grant 2003). El modelo establecido más contundente que explica esta disminución se basa en la formación de un canal transmembrana denominado "poro de permeabilidad transitoria" (PPT). Generalmente la apertura del PPT es inducida por efectores fisiológicos como el calcio, las ROS o cambios de pH. La apertura de este poro causa un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, provocando la disipación del potencial. Este aumento de permeabilidad facilita la salida del citocromo *c* al citosol, que junto con otros factores proapoptóticos, promueven la activación de la caspasa 9 y consecuentemente la activación de la caspasa 3 (Stennicke y Salvesen 2000; Harada y Grant 2003; Garrido y Kroemer 2004).

Nuestros resultados muestran que el iAs reduce el PMM en las células adenohipofisarias, efecto que se hizo evidente luego de 6 h de incubación y fue muy marcado a las 24 h. Considerando que para el momento en que se produce la caída del PMM no se observan cambios en la viabilidad celular, es probable que la despolarización del potencial de membrana sea un evento temprano en el proceso apoptótico desencadenado por el iAs. En concordancia con nuestros datos, otros trabajos en los cuales se ha estudiado el efecto del iAs sobre la mitocondria han encontrado que el tratamiento con el metaloide produce una despolarización del PMM y un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, lo cual conduce finalmente a la apoptosis de las células (Peraza y col., 2006; Singh y col., 2010; Rocha y col., 2011; Lu y col., 2014).

-Generación de estrés oxidativo

Es conocido que la inducción de estrés oxidativo es uno de los factores que puede desencadenar la activación de la vía apoptótica intrínseca (Han y col., 2004; Le y col., 2005). Un aumento en los niveles de ROS puede alterar la fisiología mitocondrial, lo cual lleva posteriormente a la activación de las caspasas (Castedo y col., 2002; Le y col., 2005). En relación con esto, se ha observado que la sobreproducción de ROS es un evento central en la apoptosis inducida por el iAs en diferentes tejidos (Shi y col., 2004; Roy y col., 2009; Han y col., 2010; Lu y col., 2011).

En nuestro sistema, la exposición al iAs provocó un aumento temprano y transitorio de los niveles intracelulares de ROS, mientras que luego de 24 h de tratamiento con el metaloide se produjo una marcada disminución de los mismos. Es importante señalar la coincidencia temporal que existe entre la disminución en los niveles de ROS, la modificación del PMM y el momento en el que las células son comprometidas a seguir la vía apoptótica. De este modo, podemos sugerir la siguiente secuencia de eventos que conducen al proceso apoptótico durante el tratamiento con el metaloide:

1º) aumento en la producción de ROS

2º) daño a la membrana de la mitocondria

3º) activación de caspasas

4º) muerte celular.

Se ha sugerido que la cadena respiratoria mitocondrial constituye una de las principales fuentes de producción de ROS generada por el iAs. En este sentido, Corsini y col. han demostrado que la incubación con un inhibidor del complejo I de la cadena de transporte de electrones (CTE) impide la producción de ROS inducida por el iAs, indicando que la CTE está involucrada en este proceso (Corsini y col., 1999). Los cambios en el PMM y en los niveles intracelulares de ROS podrían estar relacionados, ya que ambos eventos dependen de los efectos directos del metaloide sobre la CTE.

El iAs podría reducir el PMM a través de su efecto directo sobre la CTE, que es responsable de la generación y mantenimiento del potencial o de manera indirecta, a través del aumento en los niveles de ROS. Estas especies pueden atacar a las proteínas que forman los complejos de la CTE y alterar la fluidez de la membrana por oxidación de sus lípidos (Gabbita y col., 1998; Le y col., 2005), hechos que afectarían el PMM.

En relación con la disminución en los niveles de ROS observada a las 24 h es posible que sea consecuencia del efecto deletéreo de las ROS sobre la funcionalidad de los complejos de la CTE.

Por otro lado, es importante no descartar que esta caída de ROS pueda ser también consecuencia de la actividad del sistema de defensa antioxidante intracelular. En este sentido, coincidiendo con los resultados previamente observados *in vivo*, la exposición al iAs en las células adenohipofisarias durante 3, 6 y 9 h incrementó la expresión del ARNm de HO-1 y MT-1, dos proteínas capaces de actuar como antioxidantes involucradas en el proceso de detoxificación de las ROS.

Los efectos del iAs sobre la inducción de estrés oxidativo, la liberación de PRL y la viabilidad celular fueron reducidos por el tratamiento con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC). En conjunto, estos resultados señalan la participación de las ROS en las acciones citotóxicas del metaloide.

El antioxidante, NAC, previno totalmente el aumento en los niveles del ARNm de HO-1 y MT-1 y la inhibición sobre la liberación de PRL. Sin embargo, el efecto apoptótico del iAs fue reducido parcialmente sugiriendo que algún otro mecanismo, además de la generación de ROS, podría estar involucrado en el desencadenamiento de la muerte celular inducido por el metaloide. En relación con esto, Morales y col. han demostrado que el tratamiento con inhibidores específicos de la generación de ROS no revierte la muerte celular inducida por iAs en la línea celular de mieloma múltiple humano (Morales y col., 2009).

Hasta aquí se han discutido algunos de los mecanismos por los cuales el iAs puede afectar la viabilidad celular y la liberación hormonal adenohipofisaria. A continuación se han esquematizado estos mecanismos con el fin de brindar un resumen de lo expuesto.

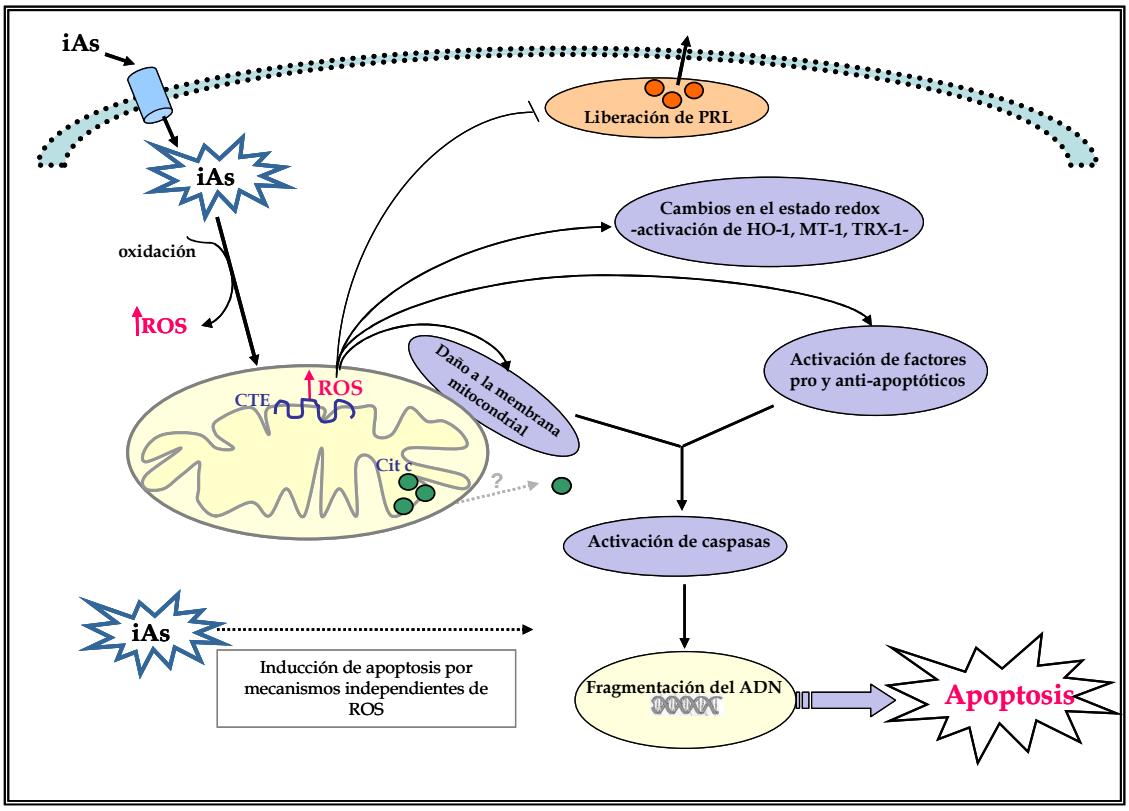


Figura 22. Resumen esquemático de los mecanismos por los cuales el iAs induce apoptosis y afecta la liberación hormonal de las células adenohipofisarias.
Durante las primeras horas, el iAs actúa sobre los componentes de la CTE favoreciendo a corto plazo la formación de ROS. Este aumento constituye uno de los primeros eventos desencadenantes de la cascada apoptótica y genera la activación de factores pro y anti-apotóticos y la disrupción del PMM llevando finalmente a la activación de las caspasas y la inducción de la apoptosis. Paralelamente, el iAs inhibe la liberación de PRL y estimula la expresión de distintos genes que participan del sistema de defensa antioxidante celular como mecanismo de respuesta al estrés oxidativo. Conjuntamente a la inducción de estas vías descriptas, otros mecanismos apoptóticos, independientes de la generación de ROS, serían inducidos por el iAs.

4. ESTUDIO DEL ARSÉNICO COMO AGENTE XENOESTROGÉNICO

4.1. OBJETIVO II

Investigar el papel del iAs como agente xenoestrogénico en la adenohipófisis y el útero.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS II

Drogas y reactivos

La leupeptina, la pepstatina, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y el ditiotreitol (DTT) fueron provistos por Alexis-US Biological (Swampscott, MA, USA). El reactivo de Bradford fue suministrado por Bio-Rad (Hercules, CA, USA) y el 17 β-estradiol (E2) por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El material descartable estéril fue provisto por ETC Internacional (Buenos Aires, Argentina) y TNT (Buenos Aires, Argentina). El material plástico no estéril fue provisto por Chemit (Buenos Aires, Argentina) e Instrumental Pasteur (Buenos Aires, Argentina). Las hormonas estándares y los anticuerpos primarios utilizados en la determinación de las hormonas adenohipofisarias por radioinmunoensayo o por inmunohistoquímica, fueron provistos por el Dr. Parlow, National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA, USA. Los anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de western blot e inmunohistoquímica fueron obtenidos en Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y Millipore (Billerica, MA, USA). Los anticuerpos secundarios utilizados en los radioinmunoensayos, estudios inmunohistoquímicos y western blot fueron provistos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Jackson Immuno Research (PA, USA) y Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Animales

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (Res. (CD) Nro. 2831/10). En esta segunda parte del trabajo de tesis se utilizaron ratas hembras jóvenes-adultas ovariectomizadas (OVX).

Las ratas hembras jóvenes-adultas de la cepa Wistar (180-200 g de peso) fueron provistas por el Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (21-24 ºC) y luz (ciclo de luz/oscuridad de 12 h), con libre acceso al agua y alimento, de acuerdo a las condiciones establecidas en la "Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio" del NIH (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences, 1996).

Ovariectomía

Las ratas fueron sometidas a la ovariectomía, una intervención quirúrgica en la que los ovarios son extraídos con el fin de eliminar la fuente principal de producción de estrógenos. Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal conteniendo 75 mg/kg de ketamina (Holliday-Scott, Buenos Aires, Argentina) y 10 mg/kg de xilacina (Konig, Buenos Aires, Argentina). El procedimiento quirúrgico se llevó a cabo en condiciones asépticas. Al finalizar la operación y al día siguiente a la misma se administró a los animales una inyección intraperitoneal de ketoprofeno 1% (Vetonco, Buenos Aires, Argentina), el cual fue utilizado como agente antiinflamatorio y analgésico.

Tratamientos in vivo de los animales

Las ratas fueron divididas al azar en 4 grupos (seis por jaula) y recibieron durante 30 días los siguientes tratamientos:

- **Grupo 1 (control)**: animales con libre acceso al agua de bebida sin el agregado del metaloide.
- **Grupo 2 (iAs 0,1 ppm)**: animales expuestos al iAs como $NaAsO_2$ en el agua de bebida en una concentración de 0,1 ppm.

- **Grupo 3 (iAs 1 ppm)**: animales expuestos al iAs como $NaAsO_2$ en el agua de bebida en una concentración de 1 ppm.
- **Grupo 4 (E2, control positivo)**: animales con libre acceso al agua de bebida sin el agregado del metaloide, que inmediatamente luego de la ovariectomía fueron implantados subcutáneamente con una cápsula de silicona conteniendo 500 µg de E2.

Los animales fueron pesados semanalmente y el consumo de agua fue monitoreado diariamente. Se tomaron muestras diarias del flujo vaginal para evaluar el estadío del ciclo estral. Finalizado el período de tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación y las adenohipófisis y los úteros fueron extraídos, pesados y congelados rápidamente en nitrógeno líquido o fijados para el posterior análisis.

Histología

Para los estudios histológicos, luego de su extracción, los úteros fueron fijados en solución Bouin (ácido pícrico 75%, ácido acético 5%, formol 20%) y las adenohipófisis fueron fijadas en formol 4% en PBS durante 20 h a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de fijación los tejidos fueron deshidratados en una serie creciente de alcoholes (etanol: 70% 24 h; 96% 24 h; 100% 5-6 h) y finalmente clarificados con xilol. La inclusión de las muestras en tacos de parafina fue realizada en la estufa a 60 ºC. Posteriormente se realizaron cortes de 5 µm de espesor utilizando un micrótomo de deslizamiento (Reichert, USA). Los cortes histológicos fueron montados sobre portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropiltrietoxi-xileno como sustancia adherente y tenidos con Hematoxilina-Eosina (H-E) o procesados para los estudios inmunohistoquímicos.

Inmunohistoquímica (IHQ)

-IHQ en cortes de tejido uterino

Para la desparafinización los cortes histológicos fueron colocados en la estufa a 60 ºC durante toda la noche y posteriormente tratados con xilol 5 min a temperatura ambiente en agitación suave. Luego las muestras fueron rehidratadas mediante la incubación con una serie decreciente de alcoholes (etanol: 100-96-90-70-40%) y finalmente agua destilada (5 min cada vez a temperatura ambiente y en agitación suave). Para la exposición del antígeno los cortes fueron sumergidos en Buffer citrato 10 mM y llevados al microondas previamente humidificado. Las muestras fueron calentadas dos veces por 3 min, a potencia máxima. El bloqueo de la actividad de peroxidasas endógenas fue realizado incubando las muestras con una solución de H_2O_2 3% en etanol 70% durante 10 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. Luego de tres lavados con PBS-Tritón 0,1% pH 7,4 los cortes fueron incubados con solución de bloqueo conteniendo PBS-BSA 2% y 10% del suero de la especie del segundo anticuerpo durante 90 min a temperatura ambiente. A continuación las muestras fueron incubadas durante toda la noche a 4 ºC en cámara húmeda con el primer anticuerpo (anti REα hecho en conejo, 1/100) diluido en PBS-Tritón 0,1% y 1% de la especie del segundo anticuerpo. Cumplido este tiempo, los cortes fueron lavados tres veces con PBS-Tritón 0,1% pH 7,4 e incubados 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa hecho en cabra, 1/400) diluido en PBS-Tritón 0,1% y 1% de suero normal de cabra. Luego de tres lavados con PBS pH 7,4 las muestras fueron incubadas con solución de revelado Kit DAB (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) conteniendo agua destilada 92%, buffer stock 2,4%, diaminobenzidina 2,9% y H_2O_2 2,3%, la reacción fue monitoreada bajo la observación al microscopio durante 5-10 min según el antígeno y fue detenida mediante la inmersión de los cortes en agua destilada. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas en una serie creciente de alcoholes (etanol 90% 20 seg; etanol 100% 1 min) y finalmente tratadas con xilol durante 5 min. Los

cortes fueron montados utilizando DPX como medio de montaje sintético no acuoso.

-IHQ en cortes de tejido adenohipofisario

Para los estudios inmunohistoquímicos en cortes histológicos de adenohipófisis, se procedió de igual forma que con los cortes de tejido uterino a excepción del paso del bloqueo de la actividad de peroxidasas endógenas. Los anticuerpos primarios específicos utilizados para cada una de las hormonas adenohipofisarias estudiadas fueron: anti-PRL (1/250) y anti-LH (1/250) hechos en cobayo. El anticuerpo secundario utilizado fue: FITC-anti-IgG (cobayo) (1/400) hecho en conejo. Para marcar las células totales, al finalizar las incubaciones con los anticuerpos las muestras fueron lavadas tres veces con PBS pH 7,4 y luego montadas con solución Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) conteniendo 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los cortes fueron visualizados y fotografiados en un microscopio de fluorescencia Olympus BX50 (Japón). El recuento fue realizado por tres observadores distintos. Los datos fueron expresados como: (nº de células inmunopositivas para un tipo de hormona/nº de células totales) x 100.

Western blot

Obtención de la muestra proteica

Para los ensayos de western blot las adenohipófisis fueron resuspendidas en 100 µL de buffer de lisis (Hepes 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,1%, pepstatina 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL y PMSF 1 mM), homogeneizadas en un sonicador Branson Sonifier (VWR Scientific) a potencia 4, 2 pulsos de 5 seg en hielo, y luego centrifugadas durante 20 min a 10000 x *g* a 4 ºC. Una alícuota de 10 µL del sobrenadante fue utilizada para la cuantificación de proteínas en la muestra. El resto del sobrenadante fue guardado a -20 ºC hasta su uso.

Separación de las proteínas e inmunodetección

Un total de 50 - 80 µg de proteína por muestra fue incubado en buffer Laemmli (Tris-HCl 0,25 M, SDS 8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% y β-mercaptoetanol 4%, pH 6,8) durante 5 min en bloque seco a 100 ºC y sembrado en un gel desnaturalizante de acrilamida-bisacrilamida 15%. La electroforesis se realizó a 120 V durante 1,5 - 2 h. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (Immobilion-P) y bloqueadas durante 1,5 h a temperatura ambiente con agitación en 50 mL de solución de bloqueo (5% leche descremada en buffer TBS-Tween-20 0,05% (T-TBS)). Luego las membranas fueron incubadas con 5 – 10 mL de anticuerpo primario, diluido en solución de bloqueo, toda la noche a 4 ºC. Las membranas fueron lavadas 3 veces (10 min cada vez) con buffer T-TBS e incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa diluidos en buffer T-TBS durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. La inmunodetección se realizó con una solución de diaminobenzidina conteniendo H_2O_2 0,01 %.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

- anticuerpo monoclonal anti-PCNA hecho en ratón en una dilución final de 1/1000.
- anticuerpo policlonal anti-Cyc D3 hecho en conejo en una dilución final de 1/500.
- anticuerpo policlonal anti-PRL hecho en conejo en una dilución final de 1/25000.
- anticuerpo policlonal anti-REα hecho en conejo en una dilución final de 1/500.
- anticuerpo anti-β-actina hecho en conejo en una dilución final de 1/1000.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:

-anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado a peroxidasa (1/5000).

-anti-IgG de ratón hecho en cabra conjugado a peroxidasa (1/2000).

Las membranas reveladas se escanearon y la imagen digital de las bandas se densitometró con el programa Gel Pro Analyzer 3.1 (Media Cybernetics, LP, Silver Spring, MD, USA). Los resultados de la densitometría de las distintas proteínas estudiadas en cada muestra fueron normalizados con

aquellos de la β-actina correspondiente a dicha muestra y fueron expresados como porcentaje del control.

Determinación de proteínas

El dosaje de proteínas en las muestras fue realizado por el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media ± error estándar de la media (SE) y evaluados mediante análisis de la varianza de un factor (ANOVA) seguido por la por la prueba de Dunnett (Sokal y Rohlf, 1995).

Las diferencias entre los grupos fueron consideradas significativas cuando *P* fue menor a 0,05. Las distintas pruebas estadísticas fueron realizadas utilizando el software Graphpad Instat (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

4.3 RESULTADOS II

4.3.1 Estudios *in vivo* de los efectos del iAs como agente xenoestrogénico.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados en la introducción que indican que el iAs, en concentraciones submicromolares, es capaz de interactuar con el REα y reproducir los efectos del E2 induciendo la proliferación celular de la línea tumoral de mama MCF-7, el objetivo de la segunda parte de este trabajo de tesis fue evaluar el papel xenoestrogénico del iAs *in vivo* sobre dos tejidos sensibles a los efectos del E2 como la adenohipófisis y el útero.

Para ello se utilizaron ratas hembras OVX con el fin de remover la principal fuente de producción del E2, las cuales fueron divididas en cuatro grupos. Los grupos "iAs 0,1 ppm" y "iAs 1 ppm" fueron expuestos al iAs en el agua de bebida en las concentraciones de 0,1 y 1 ppm, respectivamente, durante 30 días. El grupo estrogenizado o grupo "E2" fue implantado subcutaneamente con cápsulas de silicona conteniendo 500 μg de E2. Tanto el grupo "Control" como el grupo E2 tuvieron libre acceso al agua sin el agregado del metaloide.

Cabe destacar que durante todo el período de estudio no se observaron diferencias en el consumo de agua ni en la evolución del peso corporal entre los animales tratados con iAs o con E2 respecto a los controles.

4.3.1.1. Efecto de la exposición al iAs sobre los estadíos del ciclo estral

Durante el ciclo estral, la pared vaginal sufre cambios morfológicos que se corresponden con los cambios del ciclo del endometrio uterino. El E2 juega un papel clave en la evolución del ciclo estral. Las hormonas sexuales, E2 y progesterona (P4), son las principales responsables de los procesos de proliferación, diferenciación y exfoliación de las células de la mucosa vaginal

(Gorski y col., 1975). El ciclo estral de la rata puede dividirse en cuatro etapas, identificables a través de las células descamadas en un frotis vaginal: **proestro** (gran cantidad de células epiteliales nucleadas y pocos leucocitos); **estro** (gran cantidad de células epiteliales queratinizadas sin núcleo visible); **metaestro** (leucocitos y pocas células queratinizadas); **diestro** (gran cantidad de leucocitos y pocas células queratinizadas) (Montes y Luque, 1988).

Con el fin de evaluar si el iAs puede producir cambios en el patrón del ciclo estral, imitando las acciones del E2, los animales fueron ciclados durante todo el tratamiento. Como puede observarse en la **figura 23**, las ratas OVX control se hallaron en un estadío permanente de diestro como consecuencia de la remoción de los esteroides gonadales, mientras que los animales tratados crónicamente con E2 se encontraron en un estadío de estro persistente. La exposición al metaloide en ambas concentraciones (0,1 y 1 ppm) provocó la aparición de estadíos de proestro y estro con respecto al grupo control.

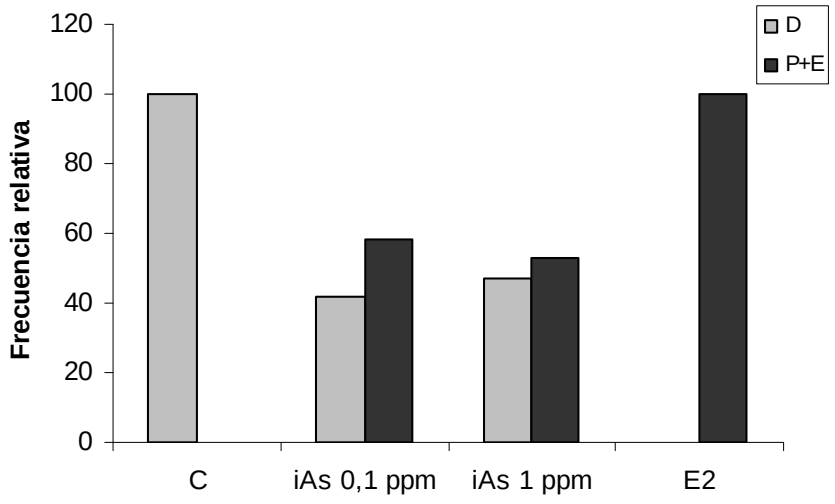


Figura 23. La exposición al iAs genera la aparición de los estadíos de proestro y estro.
El ciclo estral de las ratas OVX controles o expuestas al iAs (0,1 y 1 ppm en el agua de bebida) durante 30 días fue monitoreado durante todo el experimento. Las barras expresan el número de muestras de proestro + estro (P+E) o diestro (D) respecto del número total de muestras por tratamiento x 100.

4.3.1.2. Efecto de la exposición al iAs sobre el peso fresco de la adenohipófisis y el útero.

El E2 regula el desarrollo y el crecimiento de numerosos tejidos de respuesta a esta hormona. Finalizado el tiempo de tratamiento, evaluamos el efecto del iAs sobre el peso fresco de la adenohipófisis y el útero. Los resultados presentados en la **Tabla 2** muestran que la administración del iAs en ambas concentraciones (0,1 y 1 ppm) aumenta significativamente el peso fresco de la adenohipófisis y del útero, sugiriendo que este metaloide ejerce un efecto trófico sobre estos tejidos de manera similar al E2.

Tratamiento	Adenohipófisis (mg tejido/mg peso corporal)	Útero (mg tejido/mg peso corporal)
Control	0,037 ± 0,002	0,15 ± 0,01
iAs 0,1 ppm	0,07 ± 0,01*	0,38 ± 0,06*
iAs 1 ppm	0,058 ± 0,006*	0,29 ± 0,05*
E2	0,137 ± 0,008**	0,72 ± 0,09**

Tabla 2. El iAs incrementa el peso fresco de la adenohipófisis y el útero.
Las adenohipófisis y secciones de 3 cm de los úteros de ratas controles o expuestas al iAs (0,1 o 1 ppm en el agua de bebida) o tratadas con E2 (cápsula conteniendo 500 µg) durante 30 días fueron cuidadosamente removidas y pesadas. Los resultados representan la media ± SE de las unidades relativas correspondientes al peso fresco de la adenohipófisis o el útero normalizadas respecto al peso corporal (n=6). ANOVA seguido de test de Dunnett, *p< 0,05; ** p<0,01 vs. Control

En base a los resultados observados hasta el momento, la concentración de 0,1 ppm de iAs fue seleccionada para continuar con el resto de los estudios ya que ésta mostró ser la mínima concentración de las estudiadas capaz de producir un efecto de tipo xenoestrogénico.

4.3.2. Efecto del iAs como xenoestrógeno a nivel adenohipofisario.

Los estrógenos intervienen en los procesos de proliferación y muerte celular controlando la expresión y la actividad de determinadas proteínas directamente involucradas en la regulación del ciclo celular (Altucci y col., 1996; Dinda y col., 1997). Teniendo en cuenta que la exposición al iAs produjo un aumento del peso de la adenohipófisis investigamos si dicho efecto es consecuencia de un aumento en la proliferación celular. Para ello estudiamos la expresión de algunos elementos reguladores que participan en el control del ciclo celular.

4.3.2.1. El iAs incrementa los niveles de expresión de PCNA en la adenohipófisis.

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína nuclear de 35 kDa que se encuentra asociada al control del ciclo celular. Es detectable durante las fases G1, S, G2 y fase M. Esta proteína participa en la regulación de la ADN-polimerasa delta, enzima responsable de la duplicación del ADN (Ogata y col., 1987). Evaluamos la expresión de PCNA mediante western blot. Como puede observarse en la **figura 24**, la exposición al iAs aumentó significativamente los niveles de expresión de la proteína PCNA en una forma similar al E2.

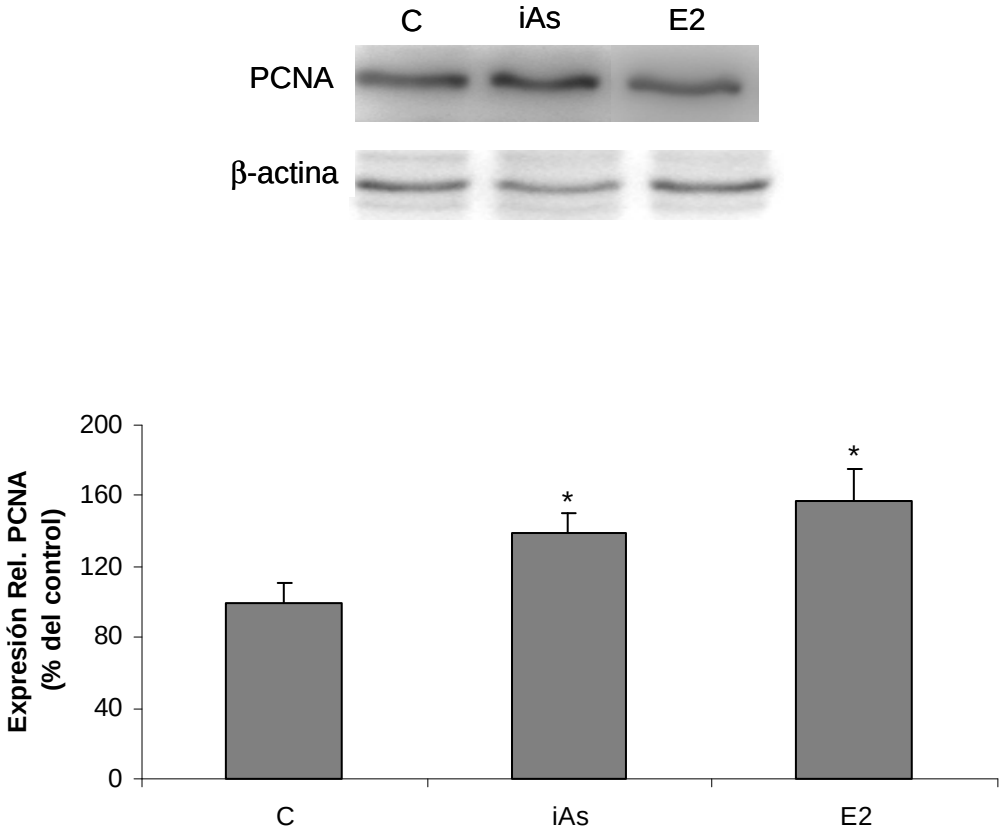


Figura 24. La exposición al iAs aumenta la expresión de la proteína PCNA en la adenohipófisis.
Los niveles de la proteína PCNA se determinaron por western blot en las adenohipófisis de ratas controles o expuestas al iAs (0,1 ppm en el agua de bebida) o tratadas con E2 (cápsula conteniendo 500 µg) durante 30 días. El panel superior muestra un western blot representativo de un experimento. Las barras representan la media ± SE de los niveles densitométricos de PCNA normalizados respecto de β-actina, expresados como porcentaje del control (n=6). ANOVA seguido de test de Dunnett, *$p<0.05$ vs. control.

4.3.2.2. El iAs aumenta la expresión proteica de Cyc D3 en la adenohipófisis.

Las ciclinas son una familia de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular. Existen varios tipos de ciclinas que se activan en las distintas fases del mismo. Particularmente, las ciclinas D se expresan en la etapa G1 temprana y regulan la progresión del ciclo celular (Qian y col., 1998; Kawashima y col., 2002). Aunque la expresión de las ciclinas es un evento temprano del proceso de proliferación, éste persiste en presencia de un estímulo mitogénico. Evaluamos la expresión proteica de la ciclina D3 (Cyc D3) mediante western blot. La exposición al iAs, en forma similar al E2, aumentó los niveles de expresión de la proteína Cyc D3 (**Figura 25**).

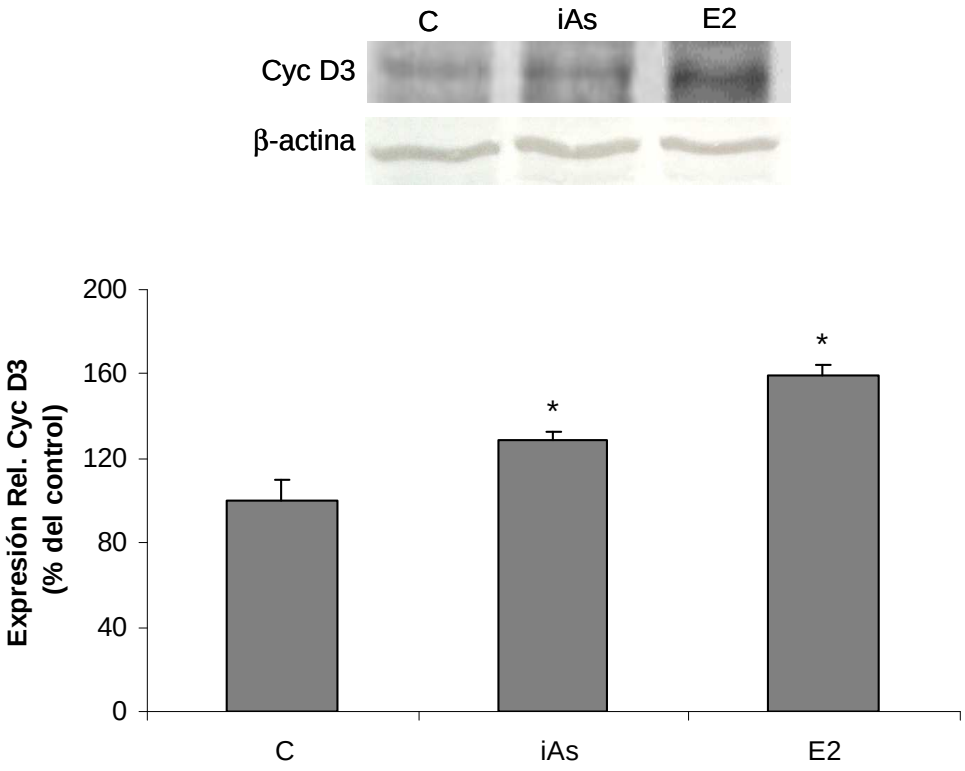


Figura 25. La exposición al iAs aumenta la expresión de la proteína Cyc D3 en la adenohipófisis.
Los niveles de la proteína Cyc D3 se determinaron por western blot en las adenohipófisis de ratas controles o expuestas al iAs (0,1 ppm en el agua de bebida) o tratadas con E2 (cápsula conteniendo 500 µg) durante 30 días. El panel superior muestra un western blot representativo de un experimento. Las barras representan la media ± SE de los niveles densitométricos de Cyc D3 normalizados respecto de β-actina, expresados como porcentaje del control (n=6). ANOVA seguido de test de Dunnett, *$p<0.05$ vs. control.

4.3.2.3. El iAs estimula la población celular de los lactotropos sin afectar a los gonadotropos.

Los lactotropos constituyen la población celular predominante de la adenohipófisis de las ratas hembras y son los blancos principales de las acciones del E2. Asimismo, el E2 también actúa sobre los gonadotropos regulando la secreción hormonal a través de mecanismos de retroalimentación. Con el objetivo de investigar los efectos xenoestrogénicos del iAs sobre estas poblaciones celulares, realizamos estudios inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos específicos para la identificación de los tipos celulares según la hormona sintetizada (PRL, LH).

Nuestros resultados muestran que la exposición al iAs incrementó el número de células inmunoreactivas para PRL de forma similar al E2 (**Figura 26**). Los gonadotropos no fueron afectados por la exposición al metaloide (**Figura 27**) mientras que el tratamiento prolongado con E2 redujo muy marcadamente la expresión de estas células.

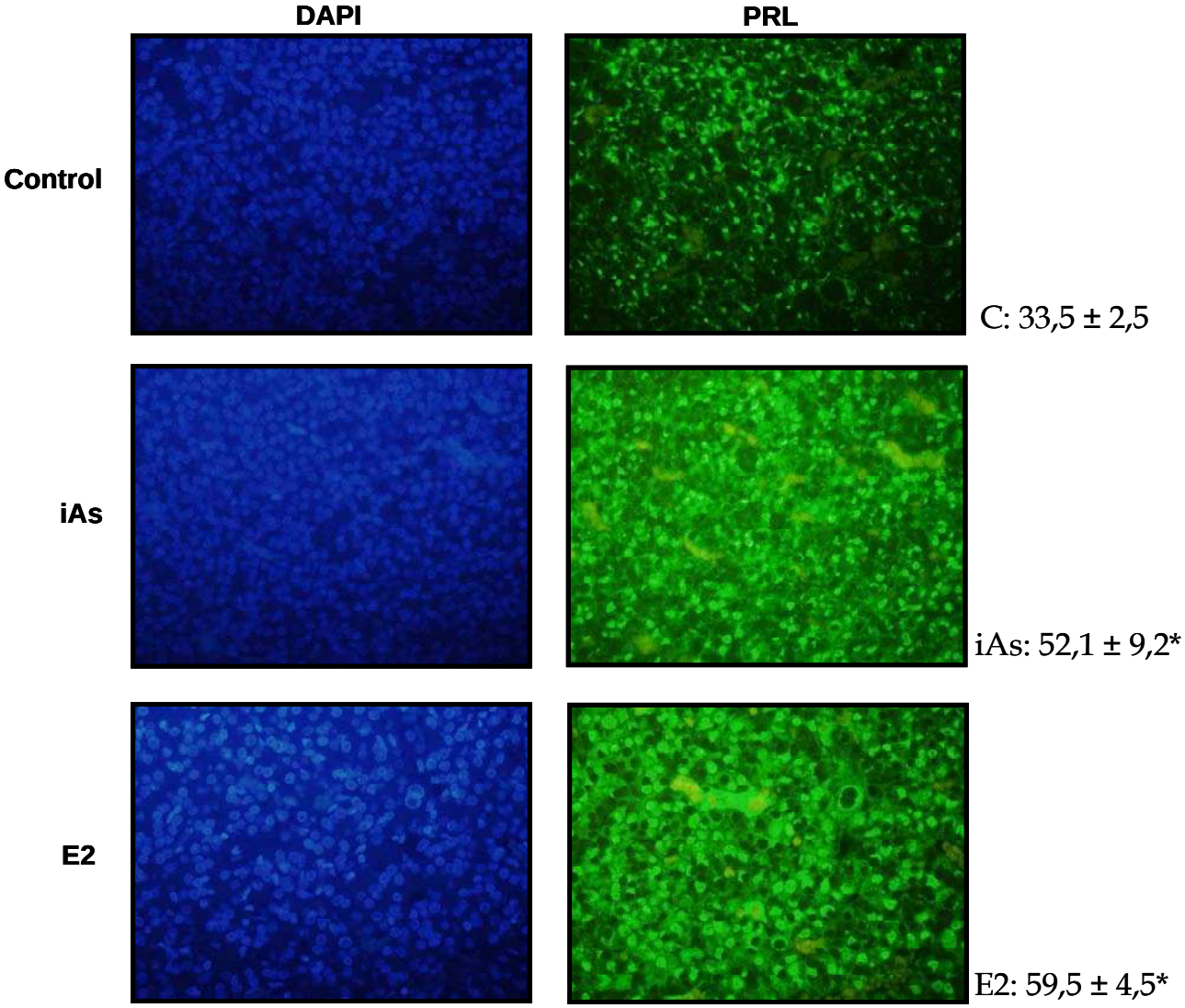


Figura 26. La exposición al iAs estimula la densidad de células inmunoreactivas para PRL. Los cortes de tejido adenohipofisario de ratas controles o expuestas al iAs (0,1 ppm en el agua de bebida) o tratadas con E2 (cápsula conteniendo 500 µg) durante 30 días fueron procesados para la marcación IHQ. Los lactotropos fueron identificados utilizando un anticuerpo primario específico anti-PRL y luego un anticuerpo secundario conjugado a FITC. Las células totales fueron marcadas mediante la tinción nuclear con DAPI. Los datos representan la media ± SE del número de lactotropos expresados como (nº de células inmunopositivas para PRL/ nº de células totales x 100) (n=3). ANOVA seguido de test de Dunnett, *p< 0,05 vs. control.

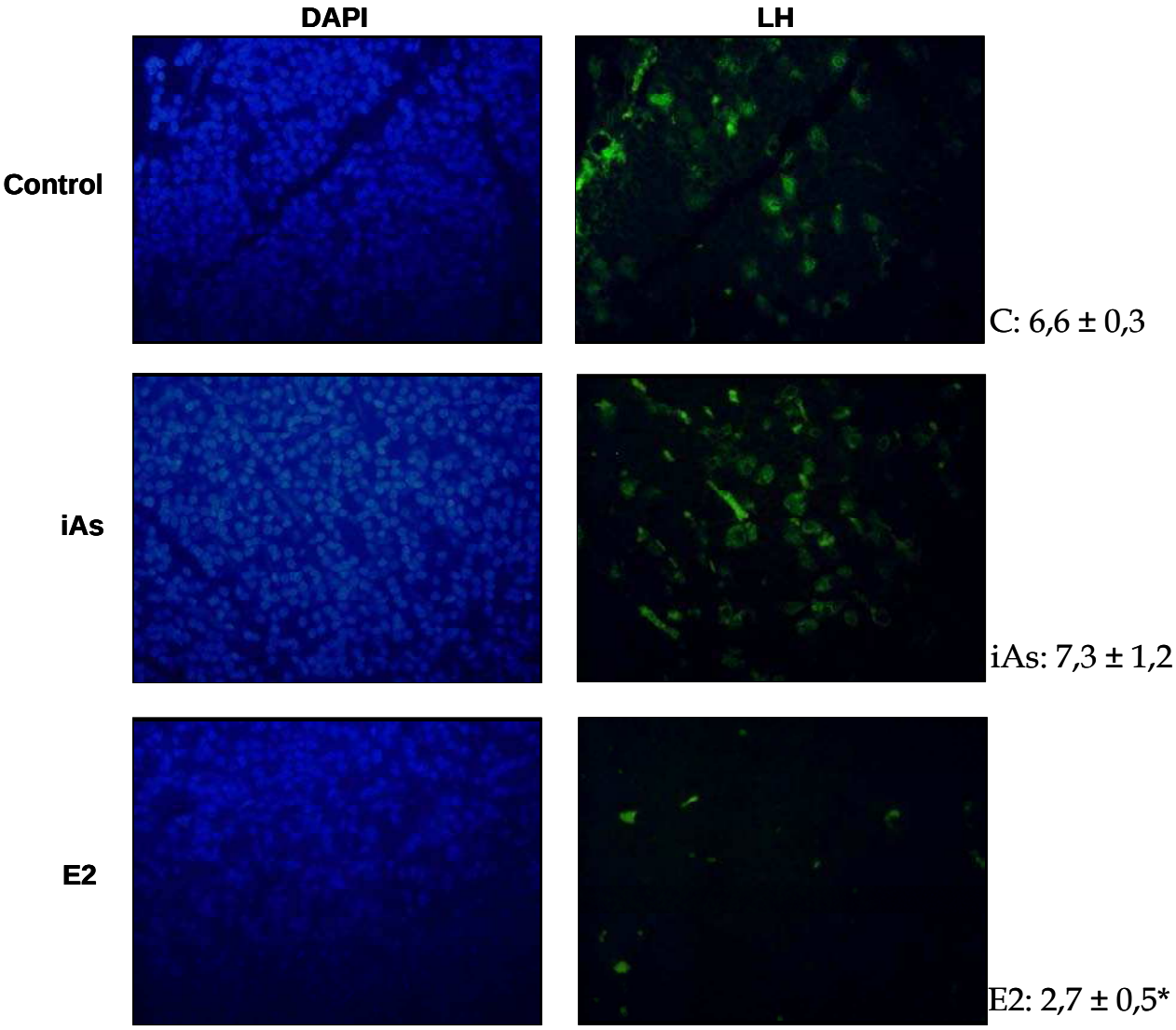


Figura 27. La exposición al iAs no modifica la población celular de los gonadotropos.
Los cortes de tejido adenohipofisario de ratas controles o expuestas al iAs (0,1 ppm en el agua de bebida) o tratadas con E2 (cápsula conteniendo 500 ug) durante 30 días fueron procesados para la marcación IHQ. Los gonadotropos fueron identificados utilizando un anticuerpo primario específico anti-LH y luego un anticuerpo secundario conjugado a FITC. Las células totales fueron marcadas mediante la tinción nuclear con DAPI. Los datos representan la media ± SE del número de gonadotropos expresados como (nº de células inmunopositivas para LH/ nº de células totales x 100) (n=3). ANOVA seguido de test de Dunnett, *p< 0,05 vs. control.

4.3.2.4. El iAs estimula la secreción de PRL pero no afecta la liberación de LH.

Como mencionamos en la introducción, las hormonas adenohipofisarias PRL y LH cumplen un papel sumamente importante en la reproducción. Se sabe que la regulación de la secreción de PRL y LH se encuentra bajo el control del E2. Con el objetivo de investigar si el iAs es capaz de modificar la liberación de estas hormonas imitando el efecto del E2, determinamos los niveles de las mismas en el suero de los animales, por RIA. Es conocido que las ratas hembras OVX, como consecuencia de la fata de la regulación del E2, muestran un incremento marcado de la secreción de LH así como una reducción en los niveles de PRL. La exposición al iAs revirtió el efecto de la OVX sobre la secreción de PRL incrementando los niveles séricos de esta hormona, mientras que no modificó los niveles de LH (**Figura 28**). Como era de esperar, el tratamiento prolongado con E2 produjo un aumento muy marcado en los niveles de PRL así como una caída en los niveles de LH como resultado de los mecanismos de regulación que ejerce esta hormona esteroidea a nivel del eje hipotálamo-hipofisario.

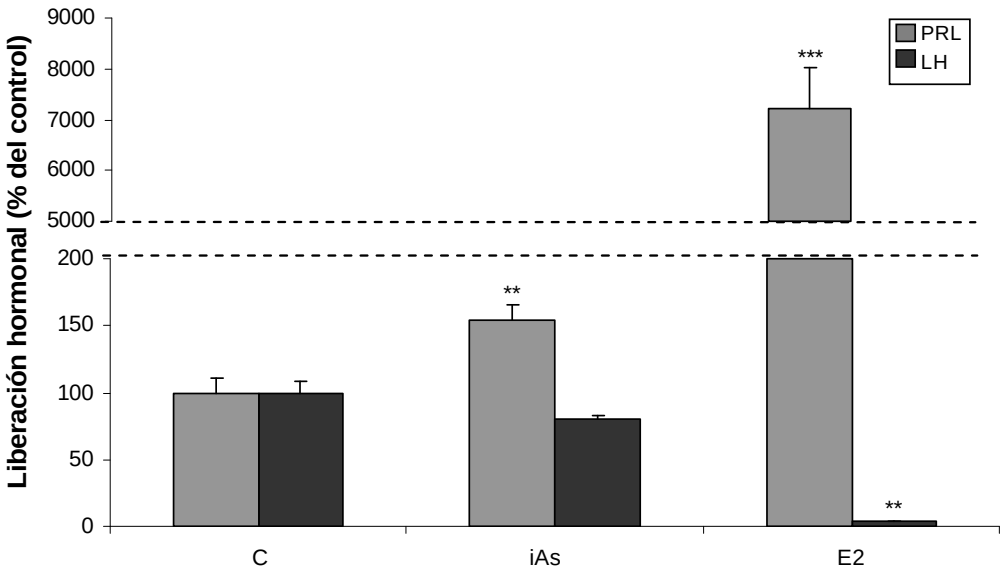


Figura 28. La exposición al iAs incrementa la liberación de PRL y no modifica la liberación de LH.
La liberación de hormonas en el suero se determinó por RIA en ratas controles o expuestas al iAs (0,1 ppm en el agua de bebida) o tratadas con E2 (cápsula conteniendo 500 µg) durante 30 días. Los resultados representan la media de la concentración de hormonas en el suero (ng/mL) ± SE y están expresados como porcentaje del control (n=6). ANOVA seguido de test de Dunnett, **p< 0,01; *** p<0,001 vs. control.

4.3.2.5. El iAs incrementa la expresión proteica de PRL en la adenohipófisis.

La PRL es una hormona hipofisaria que participa en múltiples procesos fisiológicos (Freeman y col., 2000). Entre sus funciones más conocidas se encuentran el desarrollo y el crecimiento de la glándula mamaria y de las gónadas y el control del ciclo estral. Como mencionamos previamente la síntesis y la liberación de PRL son reguladas por el E2 (Rhode y Gorski, 1991).

Teniendo en cuenta los resultados informados más arriba donde mostramos que el iAs incrementa la densidad celular de los lactotropos y los niveles séricos de PRL (**Figuras 26 y 28**) a continuación investigamos si este metaloide es capaz de estimular la síntesis de esta hormona en la glándula adenohipofisaria. Para ello, determinamos la expresión proteica de la PRL mediante western blot. La exposición al metaloide incrementó los niveles de expresión de la proteína PRL (**Figura 29**) indicando que el iAs es capaz de estimular la síntesis de esta hormona de forma similar al E2.

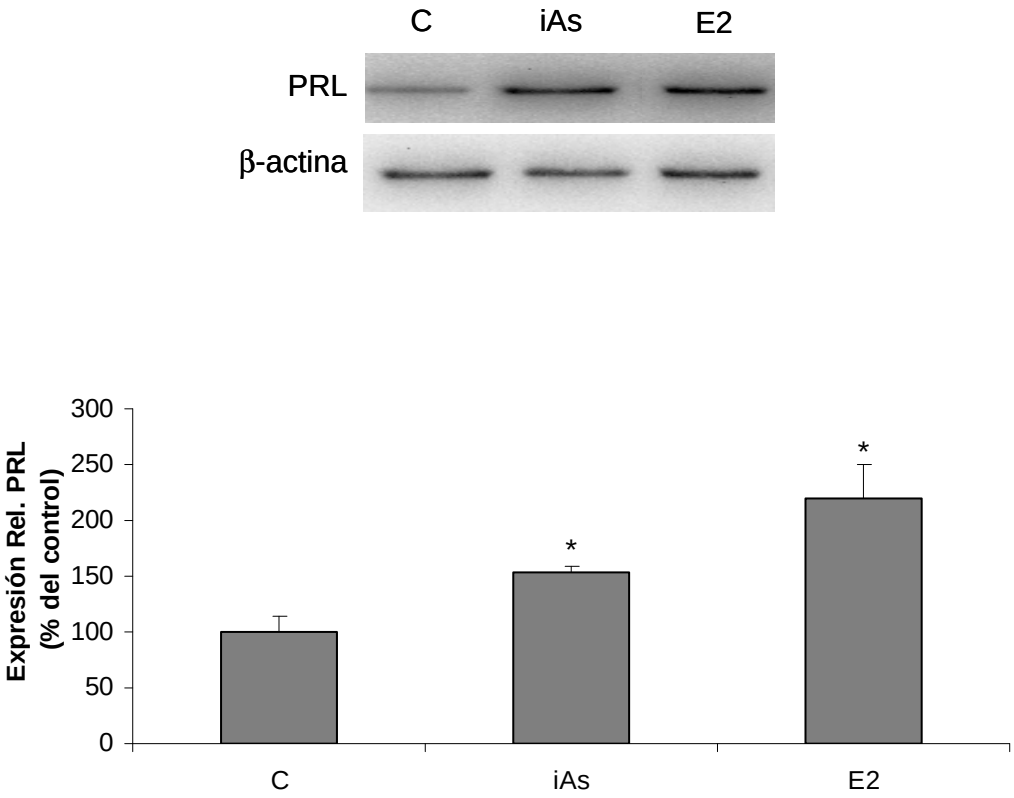


Figura 29. La exposición al iAs incrementa la expresión de la proteína PRL en la adenohipófisis.
Los niveles de la proteína PRL se determinaron por western blot en las adenohipófisis de ratas controles o expuestas a iAs (0,1 ppm en el agua de bebida) o tratadas con E2 (cápsula conteniendo 500 µg) durante 30 días. El panel superior muestra un western blot representativo de un experimento. Las barras representan la media ± SE de los niveles densitométricos de PRL normalizados respecto de β-actina, expresados como porcentaje del control (n=6). ANOVA seguido de test de Dunnett, *$p<0.05$ vs. control.

Los resultados presentados hasta el momento muestran que el iAs 0,1 ppm promueve la proliferación celular adenohipofisaria, siendo los lactotropos el tipo celular más susceptible a las acciones del metaloide. Además el iAs, al igual que el E2, estimula la síntesis y la liberación de PRL.

4.3.2.6. El iAs estimula la expresión proteica de la isoforma REα66 y de la variante REα46 en la adenohipofisis.

El E2 actúa principalmente a través de la activación de los receptores REα y REβ. Estos receptores pueden translocarse al núcleo y actuar como factores de transcripción dependientes de ligando. Las acciones proliferativas y reguladoras de la secreción hormonal que ejerce el E2 en la adenohipófisis están mediadas a través del REα.

Como se mencionó en la introducción, las células adenohipofisarias expresan, además de la isoforma de longitud completa REα66, dos variantes de *splicing* o truncadas (REα46 y REα36). El E2 regula la síntesis de sus propios receptores, tanto de la isoforma de longitud completa así como también de sus variantes truncadas (Mitchner, 1998; Shupnik, 2002). Por lo tanto el iAs, en su carácter de agente xenoestrogénico, podría modificar la expresión de estos receptores. Para evaluar esta posibilidad examinamos su efecto sobre la expresión proteica del REα y de sus variantes mediante western blot. Como puede observarse en la **figura 30**, la exposición al iAs aumentó la expresión proteica de la isoforma REα66 y de la variante truncada REα46. El tratamiento crónico con E2, en cambio no modificó la expresión de la isoforma de longitud completa pero causó un incremento en la expresión del REα46.

La banda correspondiente a la expresión proteica de la variante truncada REα36 fue muy tenue y difícil de cuantificar por lo que fue excluída de nuestro análisis.

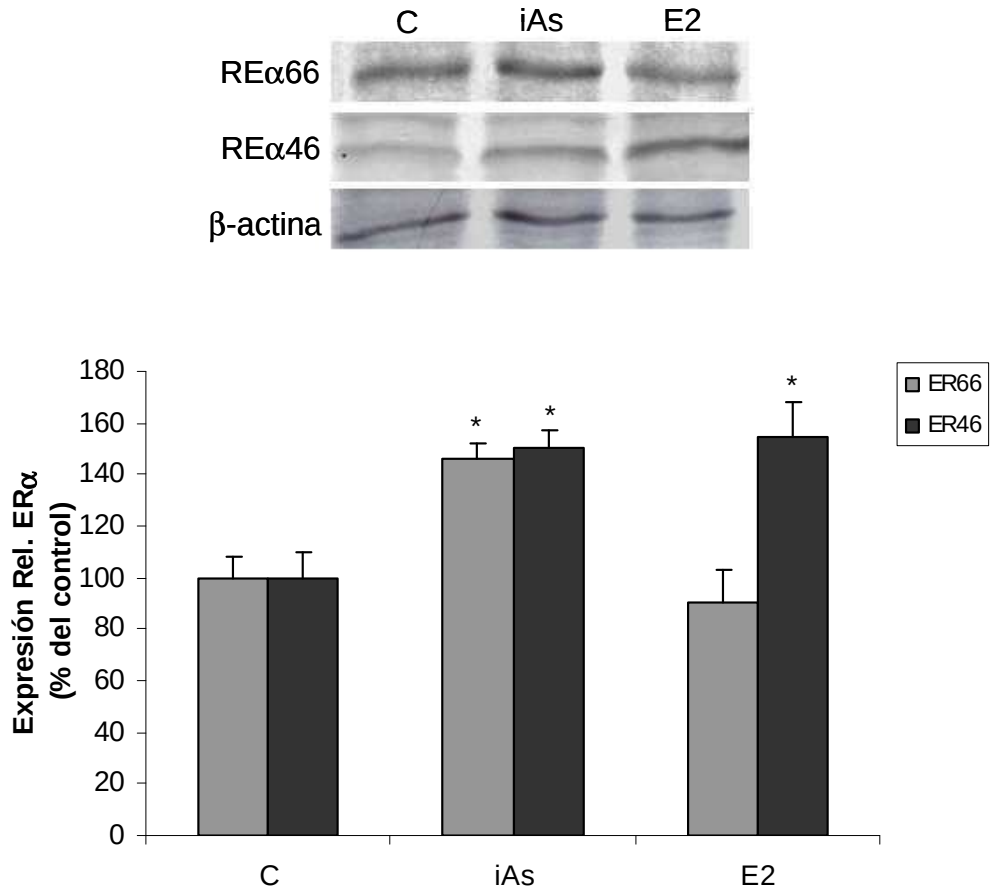


Figura 30. La exposición al iAs incrementa la expresión de la proteína REα66 y de la variante truncada REα46 en la adenohipófisis.
Los niveles de las proteínas REα66 y REα46 se determinaron por western blot en las adenohipófisis de ratas controles o expuestas al iAs (0,1 ppm en el agua de bebida) o tratadas con E2 (cápsula conteniendo 500 µg) durante 30 días. El panel superior muestra un western blot representativo de un experimento. Las barras representan la media ± SE de los niveles densitométricos de REα66 o REα46 normalizados respecto de β-actina, expresados como porcentaje del control (n=6). ANOVA seguido de test de Dunnett, *$p<0.05$ vs. control.

4.3.3. Efecto del iAs como xenoestrógeno a nivel uterino.

4.3.3.1. La exposición al iAs induce cambios morfológicos en el útero.

Histológicamente, el útero de la rata está formado por tres capas: el endometrio, el miometrio y el perimetrio. El endometrio está constituido por un epitelio luminal de tipo cúbico y/o cilíndrico simple que reviste el lumen del útero y una lámina propia, estroma, de tejido conjuntivo laxo. La lámina propia contiene las glándulas endometriales, que son glándulas tubulares simples que se originan a partir de invaginaciones del epitelio luminal y se extienden hacia el miometrio. En el endometrio se pueden distinguir dos zonas que difieren tanto en la estructura como en la función: la zona funcional (capa superficial) que degenera total o parcialmente durante el ciclo estral y la zona basal (capa profunda) que persiste durante todo el ciclo. El miometrio está constituido por dos capas de músculo liso, una capa interna orientada circularmente y una más externa dispuesta longitudinalmente. El perimetrio está constituido por tejido conjuntivo laxo, recubierto por el mesotelio, el cual presenta gran cantidad de vasos linfáticos, sanguíneos y fibras nerviosas (Priedkalns, 1993; Samuelson, 2007).

El E2 y la P4 son los principales reguladores de los cambios cíclicos del crecimiento y la degeneración del endometrio uterino (Groothuis y col., 2007).

Teniendo en cuenta que el iAs se comporta como un agente xenoestrogénico en la adenohipófisis, y además es capaz de incrementar el peso fresco del útero, nuestro siguiente objetivo fue evaluar si este metaloide podía reproducir algunos de los efectos que ejerce el E2 sobre este tejido.

El estudio histológico del útero mostró que la exposición al iAs incrementó el área glandular (aumento en el número y tamaño de las glándulas del endometrio) y la altura del epitelio luminal con respecto al control (**Figura 31**). El tratamiento crónico con E2, en concordancia con lo reportado ampliamente en la bibliografía, causó una hiperplasia e hipertrofia del área

glandular y del epitelio. Además se observaron vacuolas subnucleares, característica de un epitelio secretorio muy estimulado.

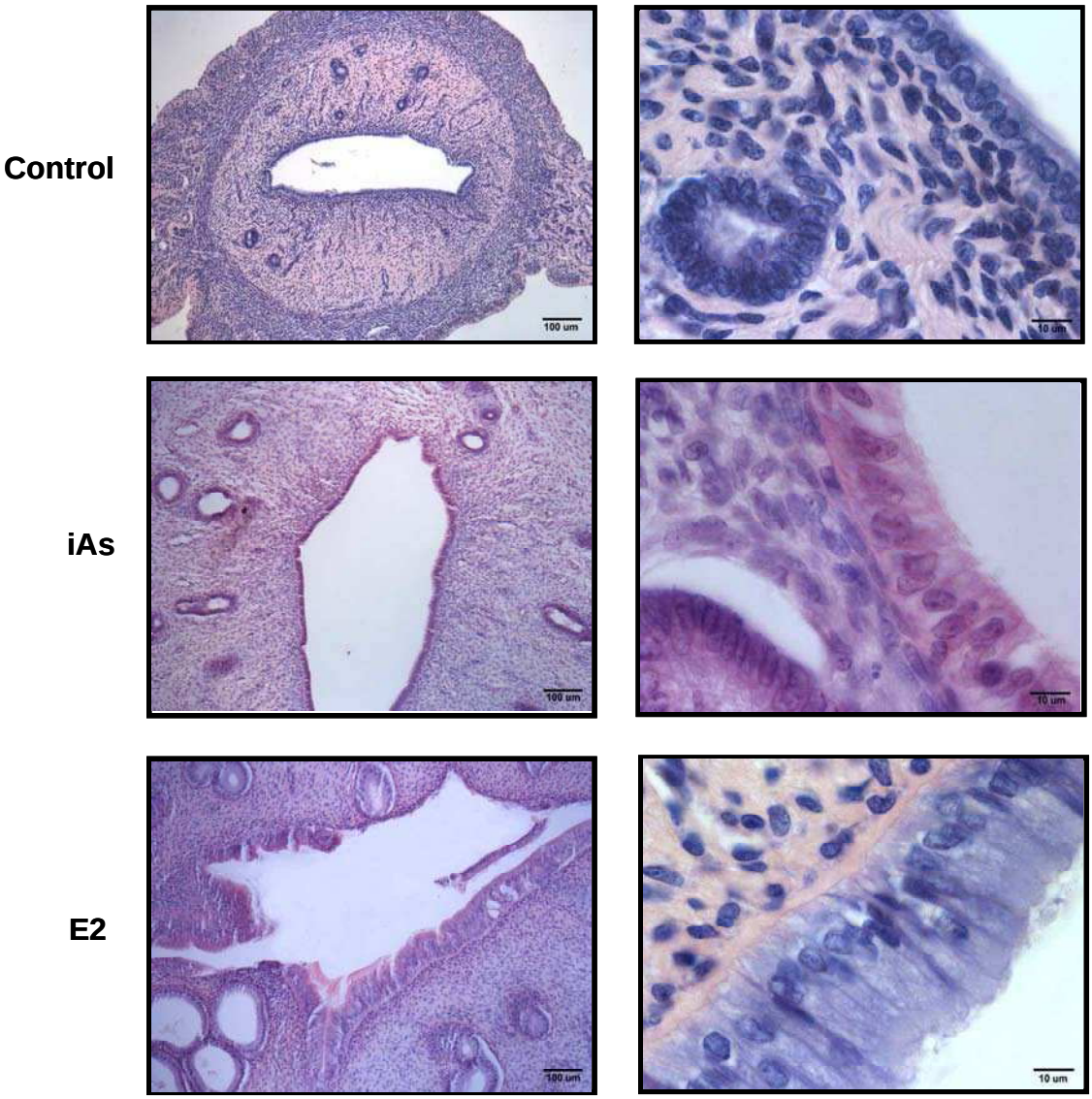


Figura 31. El iAs incrementa el área glandular y la altura del epitelio uterino.
Los cortes histológicos de tejido uterino de ratas control o expuestas al iAs (0,1 ppm en el agua de bebida) o tratadas con E2 (cápsula conteniendo 500 µg) fueron teñidos con H-E. (Izq) Vista general y del área glandular (10X); (Der) Altura y detalle del epitelio uterino (100X).

4.3.3.2. El iAs modifica la expresión del REα en las células epiteliales y el estroma uterino.

Las acciones fisiológicas que desempeña el E2 en el útero se encuentran mediadas por sus receptores REα y REβ (Katzenellenbogen y Korach, 1997; Pettersson y Gustafsson, 2001). Aunque el papel específico de cada una de estas isoformas en este tejido se conoce sólo parcialmente, estudios previos han revelado que la mayoría de los efectos proliferativos del E2 están mediados por los REα (Frasor y col., 2003).

Teniendo en cuenta que el iAs es capaz de alterar la expresión del REα en la adenohipófisis, en forma similar a los efectos producidos por su ligando natural, a continuación investigamos si este metaloide puede además modificar la expresión del REα en el útero.

En los cortes de tejido uterino de los animales control se observó una marca leve a moderada del REα localizada en el núcleo de las células del epitelio luminal (EL) y glandular (EG). Por otra parte, en las células del estroma (Est) la tinción para el REα resultó muy débil.

La exposición al iAs modificó levemente la intensidad de la marca del REα en las células del EL o EG, sin embargo causó un incremento en la intensidad de la marca del receptor en las células del Est con respecto al control (**Figura 32**).

En los cortes de tejido de los animales tratados crónicamente con E2, la intensidad de la marca en el estroma resultó similar a la observada tras la exposición al iAs. Además se detectó un notable aumento en la inmunoreactividad del receptor en el citoplasma de las células epiteliales.

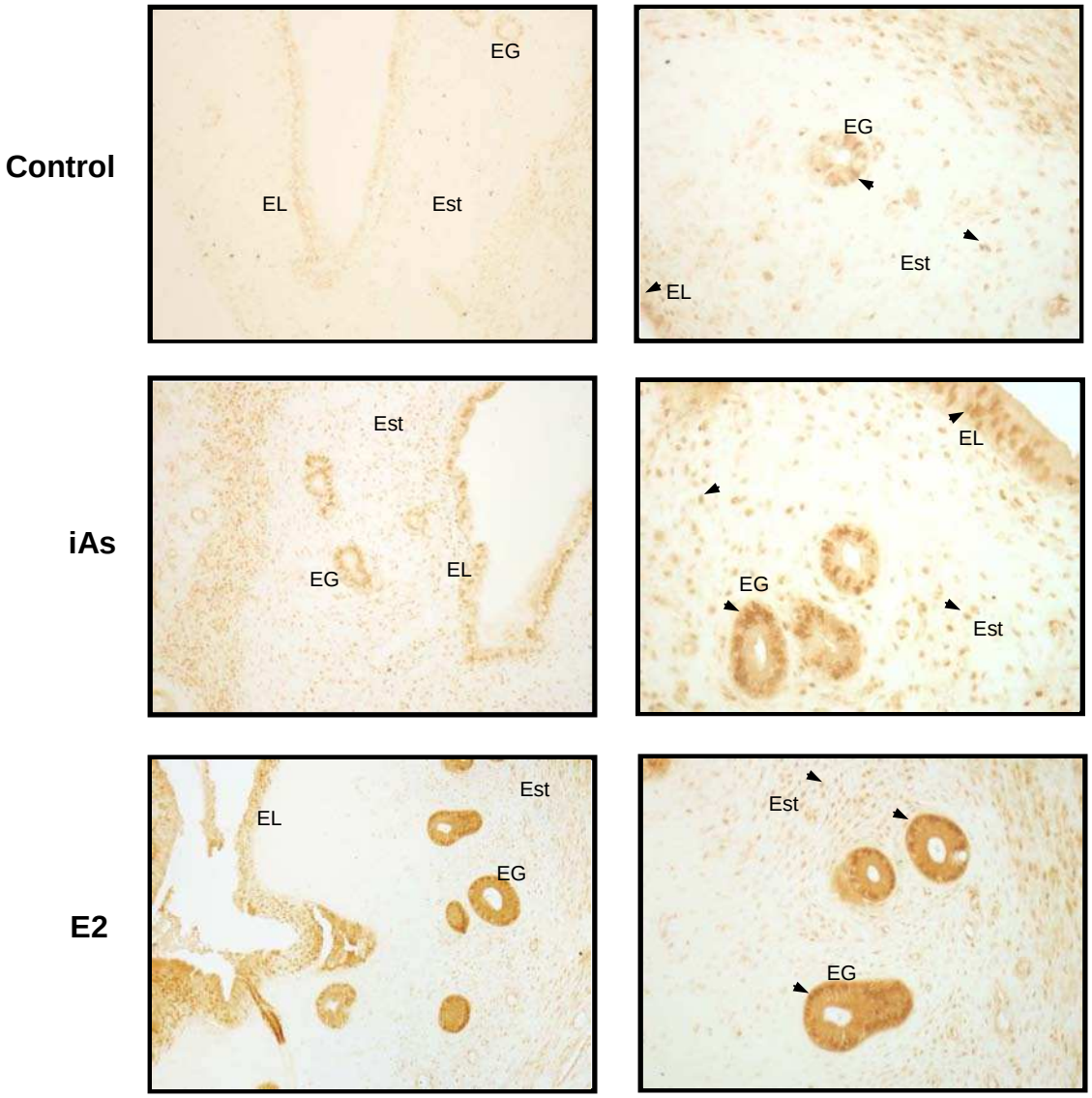


Figura 32. El iAs estimula la expresión del REα en las células epiteliales y el estroma uterino. Cortes histológicos de tejido uterino de ratas control o expuestas al iAs (0,1 ppm) o tratadas con E2 (cápsula conteniendo 500 µg) fueron procesados para la marcación IHQ. EL: epitelio luminal; EG: epitelio glandular; Est: estroma. El REα fue identificado utilizando un anticuerpo primario especifico anti-REα y luego un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. (Izq) Vista general (10X); (Der) Detalle (40X).

4.4 DISCUSIÓN II

Durante las últimas décadas ha aumentado notablemente la incidencia de manifestaciones adversas del sistema endocrino que resultan de la exposición a químicos sintéticos utilizados tanto en la agricultura como en la industria. Muchos de estos compuestos han sido identificados como XEs o estrógenos ambientales por su capacidad de interferir con las acciones de los estrógenos en diferentes tejidos (Jones y col., 1995).

El iAs es un DE que altera la actividad transcripcional de los receptores de hormonas esteroideas (Bodwell y col., 2006; Davey y col., 2007). Existen evidencias de que el iAs actúa como un XE estimulando la proliferación de la línea tumoral de mama MCF-7 (Stoica y col., 2000). Sin embargo, hasta el momento exiten muy pocos antecedentes de un posible efecto xenoestrogénico de este metaloide en otros tejidos de respuesta al E2.

El eje hipotálamo-hipofisario es el centro responsable de la coordinación del sistema endocrino. Esta unidad regula funciones fisiológicas básicas como el crecimiento, la reproducción y el metabolismo, así como también la adaptación a cambios del medio externo y al estrés. El E2 es el principal regulador del crecimiento, la diferenciación y la funcionalidad de numerosos tejidos del sistema reproductivo femenino.

En la segunda parte de este trabajo de tesis investigamos el papel xenoestrogénico del iAs *in vivo* sobre dos tejidos sensibles a los efectos del E2 como la adenohipófisis y el útero. Nuestros resultados muestran por primera vez que el iAs, a dosis bajas, es capaz de afectar la secreción hormonal adenohipofisaria e imitar las acciones proliferativas del E2 en estos tejidos.

I. Ciclo estral

Las ratas son animales poliestrales que presentan un ciclo reproductor o estral de 4-5 días de duración. Este proceso se divide en cuatro fases perfectamente identificables mediante un frotis vaginal: estro, metaestro, diestro y proestro.

El estudio del ciclo estral es uno de los ensayos que se realizan para evaluar la capacidad estrogénica de un compuesto *in vivo* (Allen y Doisy, 1923). Las ratas OVX, libres del influjo estrogénico, permanecen en un estadío de diestro. En nuestro estudio demostramos que la administración del iAs a dosis bajas (0,1 y 1 ppm) a través del agua de bebida durante 30 días es capaz de inducir la aparición de proestros y estros en las ratas OVX. De forma similar, estudios previos han mostrado que una amplia variedad de DEs que presentan actividad xenoestrogénica, tales como el metoxicloro, el nonilfenol, la genisteína, el octilfenol y el BPA, provocan modificaciones en la citología vaginal -induciendo la cornificación de células epiteliales- lo cual lleva a la generación de estadíos de estro persistentes y cortos períodos de diestro (Blake y Ashiru, 1997; Chapin y col., 1997; Laws y col., 1999; Timms y col., 2005). Algunos de estos compuestos también causaron un adelanto en el inicio de la pubertad caracterizado por una apertura vaginal temprana (Lamartiniere y col., 1998; Nikaido y col., 2004; Durando y col., 2007).

II. Proliferación celular y secreción hormonal adenohipofisaria

Teniendo en cuenta que la exposición al iAs provocó un aumento en el peso fresco de la adenohipófisis y el útero, investigamos si este metaloide es capaz de estimular la proliferación celular.

La progresión del ciclo celular está estrictamente controlada a través de la expresión y la fosforilación de diferentes proteínas que regulan cada uno de sus pasos (Montanari y col., 2006). Entre ellas, las ciclinas D (Cyc D) modulan la

progresión de la transición G1/S (Qian y col., 1998; Kawashima y col., 2002). El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es otra de las proteínas asociadas al control del ciclo celular que participa en la regulación de la duplicación del ADN (Ogata y col., 1987). Es sabido que los efectos proliferativos del E2, mediados a través del REα, involucran la estimulación de la expresión de estas proteínas (Matsuo y col., 1999; Teng y col., 2008).

La exposición al iAs, de forma similar al E2, aumentó la expresión de las proteínas Cyc D3 y PCNA en la adenohipófisis, apoyando su papel como inductor de la proliferación celular adenohipofisaria. En concordancia con nuestros resultados, otros autores han demostrado que la exposición al iAs, en concentraciones subtóxicas, incrementa la expresión de otras Cyc D tales como la Cyc D1 en diferentes tejidos tanto *in vivo* como *in vitro* (Waalkes y col., 2004; Li y col., 2011; Liu y col., 2011).

En cuanto al PCNA, se ha mostrado que el tratamiento con este metaloide incrementa los niveles del ARNm de PCNA en la línea celular derivada de testículo TM3 (DuMond y Singh, 2007). De igual forma, se ha reportado un aumento en la expresión de este antígeno junto con un incremento en la proliferación celular en el hígado y la vejiga de ratas expuestas crónicamente al iAs y a sus metabolitos metilados (Kinoshita y col., 2007).

El papel de las hormonas adenohipofisarias PRL y LH es de fundamental importancia en la funcionalidad y el desarrollo del sistema reproductivo.

La PRL secretada por los lactotropos participa en numerosos procesos fisiológicos (Freeman y col., 2000). Sus funciones más conocidas están relacionadas al desarrollo y crecimiento de la glándula mamaria y al control del ciclo estral. Se sabe que variaciones en sus niveles pueden traer consecuencias serias para el individuo (Bole-Feysot y col., 1998). Por su parte, las hormonas gonadotrópicas, FSH y LH, cumplen un papel crucial en la esteroidogénesis y la maduración gonadal (Holdcraft y Braun, 2004; Kumar, 2007).

Muchas de las funciones de los lactotropos y gonadotropos están reguladas por el E2. En los lactotropos, el E2 estimula la proliferación celular y aumenta el número de gránulos secretores, la expresión y la liberación de PRL (Kiino y Dannies, 1981; Shull y Gorski, 1984; Maurer y col., 1990). En los gonadotropos, estas hormonas regulan la secreción de LH y FSH principalmente por su acción sobre la liberación de GnRH a nivel hipotalámico a través de mecanismos de retroalimentación estimulatorios y/o inhibitorios (Freeman, 1988; Levine, 1997).

Nuestros resultados muestran por primera vez que la administración del iAs, a través del agua de bebida, incrementa la densidad de células inmunoreactivas para PRL, mientras que la población celular de los gonadotropos no se vio alterada por efecto del metaloide. En este sentido, resultados previos de nuestro grupo de laboratorio han mostrado que la exposición a concentraciones nanomolares de Cd (metal pesado con probada actividad xenoestrogénica) estimula la proliferación celular de los lactotropos pero no modifica a los gonadotropos ni a los somatotropos (Ronchetti y col., 2013).

Teniendo en cuenta que en las ratas hembras los lactotropos constituyen la población celular preponderante en la glándula (aproximadamente el 40 a 50% del total de células) y que la exposición al iAs provocó un aumento de la misma, es muy posible que el incremento en la expresión de los indicadores de proliferación observado en la adenohipófisis total sea aportado mayormente por este tipo celular en particular, dado que en estas condiciones resultaría difícil enmascarar su respuesta. Sin embargo, no podemos descartar que también pueda estimularse la proliferación de algún otro tipo celular adenohipofisario no incluido en el presente estudio.

El efecto del iAs sobre los lactotropos y los gonadotropos fue confirmado determinando los niveles de PRL y LH en el suero de los animales. El iAs aumentó significativamente los niveles séricos de PRL sin modificar los niveles de LH. Es importante destacar que este patrón diferencial en la secreción hormonal también fue observado en los estudios de los efectos citotóxicos del

iAs detallados en la primera parte de este trabajo de tesis. Aunque el iAs como XE estimula la secreción de PRL mientras que como citotóxico la disminuye su acción es principalmente sobre los lactotropos. Esta similitud en los resultados apoya nuestra hipótesis que sostiene que el iAs ejerce un efecto preferencial sobre la población celular de los lactotropos.

Es importante destacar que la exposición al iAs no solo aumenta los niveles séricos de PRL, índice de una mayor liberación, sino que también incrementa la expresión proteica de esta hormona en la glándula. De esta forma demostramos por primera vez la acción xenoestrogénica de este metaloide sobre la síntesis y liberación de PRL.

Relativamente pocos estudios han investigado los efectos xenoestrogénicos de los contaminantes ambientales sobre la secreción hormonal y aún así existe una gran disparidad de resultados, posiblemente debido a varios factores como la potencia del compuesto, la dosis, el tiempo de exposición, etc. Wade y col. reportaron que el endosulfano (pesticida órgano clorado) no altera la liberación de PRL *in vivo* (Wade y col., 1997), mientras que Rousseau y col. postularon que dicho XE, al igual que el clordano (otro pesticida órgano clorado), aumentan la expresión de su ARNm en la línea celular GH3 (Rousseau y col., 2002). El BPA (compuesto utilizado en la fabricación de plásticos de policarbonato, resinas y selladores dentales) presenta una potente actividad xenoestrogénica y, en forma similar al iAs, modula la liberación de PRL tanto *in vitro* como *in vivo*, además de inducir la proliferación celular de los lactotropos (Steinmetz y col., 1997; Goloubkova y col., 2000).

En cuanto a la LH, los resultados son aún más disímiles. Se ha demostrado que la exposición postnatal al BPA en ratas es capaz de reducir los niveles séricos de esta hormona así como también la expresión de su ARNm en la adenohipófisis (Akingbemi y col., 2004). Por otro lado, Yadetie y Male han demostrado que el nonilfenol (alquilfenol utilizado en la fabricación de detergentes) incrementa la expresión del ARNm de la subunidad β de la LH, mientras que no altera la expresión del ARNm de otras hormonas adenohipofisarias como PRL y GH (Yadetie y Male, 2002).

III. Expresión del REα en la adenohipófisis

Como mencionamos más arriba, el E2 es capaz de modular la expresión de su propio receptor en diferentes tejidos. En la adenohipófisis se expresan tanto la isoforma de longitud completa del REα (REα66), como las dos variantes truncadas (REα46 y REα36).

Nuestros resultados muestran por primera vez que la exposición al iAs aumenta los niveles proteicos de la isoforma del receptor REα66 y de su variante truncada REα46 en la adenohipófisis.

El tratamiento con E2 no alteró la expresión del REα66 pero produjo efectos similares a los del iAs en los niveles de expresión del REα46. Mitchner y col. han demostrado que el tratamiento con E2 no altera la expresión del ARNm de REα o el REβ pero incrementa la expresión de los ARNm de ambas variantes truncadas en la adenohipófisis de ratas ovariectomizadas (Mitchner y. col., 1998). Otros autores también han observado que el E2 induce la expresión de la variante REα46 y causa un leve incremento de la isoforma REα66 en cultivos de macrófagos humanos (Murphy y col., 2009).

Las diferencias en cuanto a los niveles de expresión de las distintas isoformas de REα, encontrados por el tratamiento con iAs o E2, es muy posible que se deban a la potencia estrogénica de cada uno de ellos y a las dosis empleadas en el tratamiento crónico.

Muchos XEs tienen la capacidad de unirse y activar al REα, sin embargo sus efectos sobre la expresión de las distintas isorformas de este receptor son poco conocidos. Resultados previos de nuestro grupo de trabajo han mostrado que la exposición al Cd 10 nM, al igual que el E2, aumenta la expresión proteica tanto de la isoforma REα66 como de su variante truncada REα46 en cultivos de células adenohipofisarias (Ronchetti y col., 2013). En el mismo sentido, recientemente el grupo de Gonzales y col. ha reportado que el tratamiento con genisteína (fitoestrógeno con estructura similar al E2) incrementa la expresión del REα46 en la corteza cerebral de ratas ovariectomizadas (Morán y col., 2013).

Las variantes truncadas del REα cumplirían un papel en la regulación de las vías de señalización del E2 modulando negativamente la respuesta de esta hormona. Se ha postulado que el REα46 es capaz de formar homodímeros así como también heterodímeros con el REα66 y el REβ que presentan alta afinidad por los elementos ERE presentes en las regiones promotoras de los genes de respuesta a E2. De esta forma, estos complejos, al bloquear la unión de los dímeros del REα66 actuarían como dominantes negativos regulando la actividad transcripcional del receptor (Denger y col., 2001; Penot y col., 2005).

Las evidencias hasta aquí presentadas muestran por primera vez que el iAs es capaz de actuar como un xenoestrógeno en la adenohipófisis. El iAs induce la proliferación celular adenohipofisaria, en especial incrementando la población de los lactotropos. La administración del metaloide también aumenta la síntesis y liberación de PRL y modula la expresión del REα y de su variante truncada imitando los efectos del E2 en la glándula.

IV. Cambios citoestructurales en el útero

El útero es uno de los principales tejidos sensibles a los efectos del E2. Durante las distintas fases del ciclo estral, los diferentes tejidos que constituyen el útero sufren cambios morfológicos y funcionales que dependen principalmente de las acciones de las hormonas ováricas, E2 y P4. El E2 induce la proliferación celular en el epitelio luminal y glandular del endometrio (Martin y col., 1973; Quarmby y Korach, 1984). Por el contrario, la P4 inhibe la proliferación celular inducida por el E2 en el epitelio pero la estimula en el estroma (Clark, 1971; Tachi y col., 1972).

El ensayo uterotrófico *in vivo* es uno de los estudios más confiables que se utilizan para detectar la actividad estrogénica potencial de los contaminantes ambientales (Kanno y col., 2003; Rise y col., 2003).

Teniendo en cuenta el carácter xenoestrogénico del iAs en la adenohipófisis y la sensibilidad del útero al E2 investigamos los efectos de la exposición a este metaloide sobre dicho órgano. Nuestros resultados muestran que la administración del iAs incrementa el peso fresco del útero y produce cambios citoestructurales en el endometrio. El metaloide incrementa el area glandular (número y tamaño de las glándulas endometriales) y la altura del epitelio luminal, siendo estos cambios similares a los observados con el tratamiento con E2.

En apoyo a nuestros resultados, múltiples trabajos han demostrado que el tratamiento con distintos XEs induce cambios morfológicos similares en la estructura del útero de ratas ovariectomizadas (Steinmetz y col., 1998; Andersen y col., 2005; Rimoldi y col., 2007; Höfer y col., 2009; Okuda y col., 2010).

V. Expresión del REα en el útero

Los efectos del E2 en el útero están mediados por la unión a sus receptores REα y REβ. Previamente se ha reportado que el REα es la isoforma dominante que se expresa en el útero y los efectos proliferativos del E2 son mediados por su activación (Frasor y col., 2003). Estudios inmunohistoquímicos han localizado la expresión de estos receptores en el miometrio, el estroma y el epitelio luminal y glandular del útero de la rata (Li y col., 1992; Nephew y col., 2000).

En este trabajo de tesis mostramos, por primera vez, que la administración del iAs es capaz de inducir cambios en la expresión del REα en el útero. La exposición al iAs produjo un marcado incremento en la intensidad de la marca en el estroma endometrial, mientras que la expresión del REα aumentó levemente en las células del epitelio luminal y glandular.

En los animales tratados crónicamente con E2, la tinción en el estroma fue similar a la observada en el grupo expuesto al iAs, aunque también se observó una fuerte inmunoreactividad en el citoplasma de las células epiteliales. Dado que el anticuerpo utilizado en nuestro estudio detecta todas las isoformas del REα, no podemos descartar que esta mayor intensidad de la marca en el citoplasma pueda deberse a un aumento en la expresión de la isoforma completa del receptor así como también a un aumento en la expresión de otras variantes truncadas que, al actuar como dominantes negativas, participen en la autolimitación de los efectos del E2 (Pasqualini y col., 2001; Varayoud y col., 2005). Futuros estudios son necesarios para determinar si este incremento se traduce en un aumento o una disminución en la actividad del receptor.

Existen evidencias de que la respuesta proliferativa del E2 en el epitelio uterino está mediada indirectamente por sus acciones sobre las células del estroma. Se ha demostrado que el E2 es incapaz de inducir la proliferación de las células epiteliales en tejidos uterinos recombiantes que expresan el REα sólo en las células epiteliales pero no en las células del estroma (Cooke y col., 1997).

Estos autores han postulado un modelo a partir del cual el E2 se une al REα de las células estromales y dispara la producción de factores paracrinos que actúan sobre las células epiteliales estimulando la proliferación.
En este contexto, el hecho de que el iAs estimule la expresión del REα en el estroma apoya no sólo ésta hipótesis, sino también el caracter xenoestrogénico de este metaloide.

La información bibliográfica referente a la regulación del REα por el E2 en el útero es variable. Algunos autores han mostrado que la administración subcutánea de una dosis fisiológica de E2 a ratas OVX de la cepa Sprague-Dawley disminuye la expresión del REα en el epitelio glandular y no genera cambios en los niveles del estroma luego de 24 h (Wang y col., 1999). Contrariamente, otros autores han observado que el tratamiento con E2 (inyección subcutánea de 4 µg/kg) incrementa la expresión del REα en el epitelio luminal y glandular y no modifica sus niveles en el estroma luego de 24 h (Nephew y col., 2000). Más aun, estudios previos han demostrado que el E2 ejerce efectos positivos y negativos sobre la expresión del ERα en el útero dependiendo del tipo celular en el cual el receptor es expresado (Tibbetts y col., 1998).

Sin embargo, estos trabajos no pueden ser directamente comparados con nuestros resultados debido a las diferencias en cuanto a la cepa de ratas utilizada, la dosis y vía de administración del E2 y el tiempo de estudio.

En conjunto, estos resultados indican que el iAs es capaz de imitar los efectos del E2 sobre el útero de ratas ovariectomizadas. La exposición al metaloide incrementa el peso uterino e induce cambios citoestructurales en el endometrio propios de la etapa proliferativa de este tejido. Además, el iAs, de forma similar al E2, altera la expresión del REα en las células epiteliales y el estroma.

5. CONCLUSIONES

El iAs es un contaminante ambiental cuyos efectos tóxicos se han observado en múltiples órganos. El consumo de agua y alimentos contaminados con iAs es uno de los mayores problemas sanitarios a nivel regional y mundial. Diversas evidencias indican que el iAs produce efectos adversos sobre el sistema reproductivo. Las hormonas adenohipofisarias cumplen un papel fundamental en la regulación de este sistema. Sin embargo, pocos son los trabajos que han estudiado los efectos de la exposición al iAs sobre los niveles séricos de las hormonas adenohipofisarias y hasta el momento no existen datos bibliográficos relativos a una acción directa del metaloide sobre esta glándula. El iAs es un disruptor endocrino cuyos efectos pueden variar con la dosis, el tiempo de exposición y el tipo celular.

❖ Nuestro primer objetivo fue investigar el efecto citotóxico del iAs sobre la fisiología adenohipofisaria y caracterizar sus mecanismos de acción.

Nuestros resultados muestran, por primera vez, que el iAs afecta de manera directa a la adenohipófisis tanto *in vivo* como *in vitro*.

Mediante los estudios *in vivo*, comprobamos que la exposición al iAs, a través del agua de bebida en diferentes concentraciones (5, 25 o 100 ppm) durante 30 días en ratas machos es capaz de generar estrés oxidativo en la glándula. Este evento fue confirmado por la alteración en la expresión del ARNm de genes clásicos de respuesta al estrés oxidativo tales como la HO-1, MT-1 y TRX-1.

Mediante los estudios *in vitro* mostramos que el iAs disminuye la viabilidad de las células adenohipofisarias principalmente como consecuencia de la inducción de la apoptosis. Entre los mecanismos involucrados en el proceso apoptótico generado por el iAs podemos mencionar:

- Un incremento temprano en los niveles de ROS.
- La despolarización del potencial de la membrana interna mitocondrial

- Un incremento en la expresión de algunas de las enzimas del sistema de defensa antioxidante celular.

En este estudio, demostramos que la administración del iAs *in vivo* produjo una disminución en la secreción de PRL en forma dosis dependiente, mientras que la LH solo se vió afectada con la máxima concentración utilizada. En concordancia, la exposición al iAs en las células adenohipofisarias disminuyó la liberación de PRL al medio de cultivo sin alterar los niveles de la LH. Este efecto diferencial del iAs sobre la liberación hormonal se debería a una mayor susceptibilidad de los lactotropos a los efectos tóxicos del metaloide.

El tratamiento *in vitro* con el antioxidante N-acetilcisteína previno el efecto citotóxico y la inhibición de la liberación de PRL, sugiriendo que la generación de estrés oxidativo constituye un mecanismo clave en las acciones del iAs sobre las células adenohipofisarias.

Considerando que la PRL cumple un papel fundamental en la fisiología reproductiva, es probable que el efecto del iAs sobre la secreción de esta hormona contribuya ampliamente a las alteraciones reproductivas que se observan como consecuencia de la exposición al metaloide.

En resumen, los resultados obtenidos en esta primera parte de la tesis son relevantes ya que describen por primera vez que el iAs actúa de manera directa sobre la adenohipófisis pudiendo contribuir a los efectos tóxicos observados a nivel reproductivo.

❖ Nuestro segundo objetivo fue investigar el papel del iAs como agente xenoestrogénico sobre la adenohipófisis y el útero.

Nuestros resultados muestran por primera vez que el iAs, en dosis bajas (0,1 ppm), posee una potente actividad xenoestrogénica en ambos tejidos. La administración de iAs es capaz de estimular la proliferación celular en la adenohipófisis y dentro de los tipos celulares estudiados, los lactotropos resultaron ser los más sensibles a sus efectos. Además, este metaloide, de forma

similar al E2, estimula la síntesis y liberación de PRL y modula la expresión del REα y de sus variantes truncadas. En el útero, el iAs, al igual que el E2, causa cambios citoestructurales en el endometrio y altera la expresión del REα en el estroma y en el epitelio.

En resumen, los datos presentados en la segunda parte de esta tesis indican que el iAs, a dosis bajas, es capaz de regular la secreción de PRL y reproducir las acciones proliferativas del E2 en la adenohipófisis y el útero.

El iAs, tanto en su carácter citotóxico como xenoestrogénico, puede alterar el delicado balance hormonal que regula la fisiología reproductiva, lo cual podría favorecer el desarrollo de patologías preneoplásicas o neoplásicas en tejidos hormona-dependientes.

El estudio de algunos mecanismos involucrados en la toxicidad del iAs permite comprender con mayor claridad las vías por las cuales actúa este metaloide y brindan información importante para el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas orientadas a disminuir o contrarrestar sus efectos adversos sobre la salud.

6. REFERENCIAS

Abernathy CO, Liu YP, Longfellow D, Aposhian HV, Beck B, Fowler B, Goyer R, Menzer R, Rossman T, Thompson C and Waalkes M, 1999. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues Environ Health Perspect 9: 593–597.

Adamson A D, Friedrichsen S, Semprini S, Harper C V, Mullins J J, White M R H andDavis J R E, 2008. Human prolactin gene promoter regulation by estrogen:Convergence with tumor necrosis factor-α signaling. Endocrinology 149(2): 687–694.

Akingbemi B T, Sottas C M, Koulova A I, Klinefelter G R and Hardy M P, 2004. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. Endocrinology. 145(2): 592-603.

Akram Z, Jalali S, Shami S A, Ahmad L, Batool S and Kalsoom O, 2009. Adverse effects of arsenic exposure on uterine function and structure in female rat. Exp Toxicol Pathol. (4): 451-459.

Albores A, Koropatnick J, Cherian M G and Zelazowski A J, 1992. Arsenic induces and enhances rat hepatic metallothionein production *in vivo*. Chem Biol Interact. 85(23): 127-140.

Allen E and Doisy E A, 1923. Landmark article Sept 8, 1923. An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. By Edgar Allen and Edward A. Doisy. JAMA. 250(19): 2681-2683.

Allen T and Rana S V, 2003. Oxidative stress by inorganic arsenic: modulation by thyroid hormones in rat. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 135(2): 157-162.

Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, Dauvois S, Parker M G, Truss M, Beato M, Sica V, Bresciani F and Weisz A, 1996. 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1–p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. Oncogene 12: 2315–2324.

Andersen H R, Bonefeld-Jørgensen E C, Nielsen F, Jarfeldt K, Jayatissa M N, and Vinggaard A M, 2005. Estrogenic effects in vitro and in vivo of the fungicide fenarimol. Toxicol Lett. 163(2):142-152.

Andersen M E, Clewell H J, Snow E T and Yager J W, 1999. Mode of actions tedies for assessing carcinogenic risks posed by inorganic arsenic. Arsenic Exposure and Health Effects. Chapell W R, Abernathy C O, Calderon R L (Eds). Elsevier Science, USA 397-406.

Andrew A S, Warren AJ, Barchowsky A, Temple KA, Klei L, Soucy NV, O'Hara K A and Hamilton J W, 2003. Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in human lung cells.Environ Health Perspect. 111(6): 825-835.

Andrews G K, 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. Biochem Pharmacol 59: 95–104.

Apostoli P and Catalani S, 2011. Metal ions affecting reproduction and development. Met Ions Life Sci. 8: 263-303.

Aragona C, Bohnet H G, and Friesen H G, 1977. Localization of prolactin binding in prostate and testis: The rol of serum prolactin concentration on the testicular LH receptor. ActaEndocrinol 84: 402-409.

Arnér E and Holmgren A, 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur. J Biochem.267(20): 6102–6109.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2007. Toxicological Profile for Arsenic. SUDHHS, PHS, Washington, DC, USA.

Bachelot A and Binart N, 2007. Reproductive rol of prolactin. Reproduction 133: 361-369.

Balabanič D1, Rupnik M and Klemenčič AK, 2011. Negative impact of endocrine- disrupting compounds on human reproductive health. Reprod Fertil Dev. 2011;23(3): 403-416.

Bardullas U, Limón-Pacheco J H, Giordano M, Carrizales L, Mendoza-Trejo M S, Rodríguez V M, 2009. Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. Toxicol Appl Pharmacol. 239(2): 169-177.

Basu A, Ghosh P, Das J K, Banerjee A, Ray K and Giri A K, 2004. Micronuclei as biomarkers of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: a comparative study in three cell types. Cancer Epidemiol. Biomarkers 13: 820-827.

Basu A, Mahata J, Gupta S and Giri A K, 2001. Genetic toxicology of paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. Mutat. Res 488: 171-194.

Bauer M and Bauer I, 2002. Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. Antioxid Redox Signal. 4(5): 749-758.

Ben-Jonathan N and Steinmetz R, 1998. Xenoestrogens: The emerging story of bisphenol A. Trends Endocrinol Metab 9(3): 124-128.

Ben-Jonathan N and Hnasko R, 2001. Dopamine as a prolactin inhibitor. Endocrine Reviews 22: 724-763.

Bex F, Bartke A, Goldman B D and Dalterio S, 1978. Prolactin, growth hormone, luteinizing hormone receptors and seasonal changes in testicular activity in the golden hamster. Endocrinology 103: 2069-2080.

Billiet L, Furman C, Larigauderie G, Copin C, Brand K, Fruchart J C and Rouis M, 2005. Extracellular human thioredoxin-1 inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta expression in human monocyte-derived macrophages. J Biol Chem. 280(48): 40310-40318.

Blake C A and Ashiru O A, 1997. Disruption of rat estrous cyclicity by the environmental estrogen 4-tert-octylphenol. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 216: 446–451.

Bode A M and Dong Z, 2002. The paradox of arsenic: molecular mechanisms of cell transformation and chemotherapeutic effects. Crit Rev Oncol Hematol. 42(1): 5-24.

Bodwell J E, Gosse J A, Nomikos A P, and Hamilton J W, 2006. Arsenic disruption of steroid receptor gene activation: Complex dose-response effects are shared by several steroid receptors. Chem. Res. Toxicol. 19: 1619–1629.

Bodwell J E, Kingsley L A, and Hamilton J W, 2004. Arsenic at very low concentrations alters glucocorticoid receptor (GR)-mediated gene activation but not GR-mediated gene repression: Complex dose-response effects are closely correlated with levels of activated GR and require a functional GR DNA binding domain. Chem. Res. Toxicol. 17: 1064–1076.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N and Kelly P A, 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. Endocr Rev 19(3): 225-268.

Bolt AM, Byrd R M and Klimecki W T, 2010.Autophagy is the predominant process induced by arsenite in human lymphoblastoid cell lines. Toxicol Appl Pharmacol. 244(3): 366-373.

Boue S M, Wiese T E, Nehls S, Burow M E, Elliott S, Carter-Wientjes C H, Shih B Y, McLachlan J A and Cleveland T E, 2003. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. J Agric Food Chem 51(8): 2193–2199.

Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248–254.

Brown K G, 1999. Observations on arsenic exposure and Health effects. Arsenic Exposure and Health Effects. Chapell W R, Abernathy C O, Calderon R L (Eds). Elsevier Science, USA 407-413.

Brown M E and Fan A M, 1994. Arsenic: Risk assessment for California drinking wáter standards. J. Hazardous Matter 39: 149-159.

Brown N M and Lamartiniere C A, 1995. Xenoestrogens alter mammary gland differentiation and cell proliferation in the rat. Environ Health Perspect 103: 708–713.

Burger H, 2003. Hormone replacement therapy in the post-Women's Health Initiative era. Report a meeting held in Funchal, Madeira, February 24–25. Climacteric 6(1): 11–36.

Calatayud M, Devesa V and Vélez D, 2013. Differential toxicity and gene expression in Caco-2 cells exposed to arsenic species. Toxicol Lett. 218(1): 70-80.

Calderón J, Navarro M E, Jimenez-Capdeville M E, Santos-Diaz M A, Golden A, Rodriguez-Leyva I, Borja-Aburto V and Díaz-Barriga F, 2001. Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. Environ Res 85(2): 69-76.

Cardoso N, Pandolfi M, Ponzo O, Carbone S, Szwarcfarb B, Scacchi P and Reynoso R, 2012. Evidence to suggest glutamic acid involvement in bisphenol A effect at the hypothalamic level in prepubertal male rats. Neuro Endocrinol Lett 31(4): 512-516.

Castedo M, Ferri K, Roumier T, Metivier D, Zamzami N and Kroemer G, 2002. Quantitation of Mitochondrial Alterations Associated With Apoptosis. J Immunol. Methods. 265[1-2]: 39-47

Chakraborti D, Mukherjee S C, Pati S, Sengupta M K, Rahman M M, Chowdhury U K, Lodh D, Chanda C R, Chakraborti A K and Basu G K, 2003. Arsenic groundwater contamination in Middle Ganga Plain, Bihar, India: A future danger?.Environ. Health Perspect. 111: 1194–2201.

Chapin R E, Harris M W, Davis B J, Ward S M, Wilson R E, Mauney M A, Lockhart A C, Smialowicz R J, Moser V C, Burka L T and Collins B J, 1997. The effects of perinatal/juvenile methoxychlor exposure on adult rat nervous, immune and reproductive system function. Fundam. Appl Toxicol. 40: 138–157.

Chatterjee A K and Pal S, 2005. Prospective protective role of melatonin against arsenic-induced metabolic toxicity in Wistar rats. Toxicology 208: 25–33.

Chattopadhyay S and Ghosh D, 2010. The involvement of hypophyseal-gonadal and hypophyseal-adrenal axes in arsenic-mediated ovarian and uterine toxicity: modulation by hCG. J Biochem Mol Toxicol. 24(1): 29-41.

Chen H T, 1987. Postnatal development of pituitary lactotropes in the rat measured by reverse hemolytic plaque assay. Endocrinology 120(1): 247-253.

Cheng B, Yang X, An L, Gao B and Liu X, 2010. Arsenic trioxide-induced apoptosis of Hep-2 cell line through modulating intracellular glutathione (GSH) level. Auris Nasus Larynx. 37(1): 89-94.

Cherian M G, Jayasurya A and Bay B H, 2003. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. Mutat Res. 533(1-2): 201-209.

Clark B F, 1971. The effects of oestrogen and progesterone on uterine cell division and epithelial morphology in spayed, adrenalectomized rats. J Endocrinol. 50(3): 527-528.

Clemons M and Goss P, 2001. Estrogen and the risk of breast cancer. N Engl J Med 344 (4): 276–285.

Colborn T and Clement C, 1992. "Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/Human Connection". Princenton Scientific Publishing, Princenton, N J.

Conn P M, Mc Ardle, C A, Andrews, W V and Huckle W R, 1987. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action in the pituitary gonadotrope. Biol Reprod 36(1): 17-35.

Corsini E, Asti L, Viviani B, Marinovich M and Galli C L, 1999. Sodium arsenate induces overproduction of interleukin-1alpha in murine keratinocytes: role of mitochondria. J. Invest. Dermatol. 113: 760-765.

Crow J P, 1997. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. Nitric Oxide 1: 145–157.

Dada M O, Campbell G T and Blake C A, 1983. A quantitative immunocytochemical study of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone cells in the adenohypophysis of adult male rats and adult female rats throughout the estrous cycle. Endocrinology 113(3): 970-984.

Dada M O, Campbell G T and Blake C A, 1984. Parsdistalis cell quantification in normal adult male and female rats. J Endocrinol 101(1): 87-94.

Dalton T P, Shertzer H G and Puga A, 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 39: 67-101.

Datta S, Mazumder S, Ghosh D, Dey S and Bhattacharya S, 2009. Low concentration of arsenic could induce caspase-3 mediated head kidney macrophage apoptosis with JNK-p38 activation in Clarias batrachus. Toxicol Appl Pharmacol. 241(3): 329-338.

Davey J C, Bodwell J E, Gosse J A and Hamilton J W, 2007. Arsenic as an endocrine disruptor: Effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture. Toxicol. Sci. 98:75–86.

Delgado J M, Dufour L, Grimaldo J I, Carrizales L, Rodríguez V M, Jiménez-Capdeville and M E, 2000. Effects of arsenite on central monoamines and plasmatic levels of adrenocorticotropic hormone (ACTH) in mice. Toxicol Lett. 117(1-2): 61-67.

Denger S, Reid G, Kos M, Flouriot G, Parsch D, Brand H, Korach K S, Sonntag-Buck V and Gannon F, 2001. ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. Mol Endocrinol. 15(12): 2064-2077.

Desagher S and Martinou J C, 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. Trends Cell Biol. 10(9): 369-377.

Dhar P , Jaitley M, Kalaivani M and Mehra R D, 2005. Preliminary morphological and histochemical changes in rat spinal cord neurons following arsenic ingestion. Neurotoxicology. 26(3): 309-320.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J P, Giudice L C, Hauser R, Prins G S, Soto A M, Zoeller R T and Gore AC, 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. Endocr Rev.30(4): 293-342.

Dinda S, Kodali-Gali S, Sevilla L, Burkley M, Hurd C and Moudgil V K, 1997. Inhibition of proliferation of T47D human breast cancer cells: Alterations in progesterone receptor and p53 tumor suppressor protein. Mol Cel Biochem 175: 81–89.

Dodmane P R, Arnold L L, Kakiuchi-Kiyota S, Qiu F, Liu X, Rennard S I and Cohen S M, 2013. Cytotoxicity and gene expression changes induced by inorganic and organic trivalent arsenicals in human cells. Toxicology. 312: 18-29.

Drummond A E, Baillie A J and Findlay J K, 1999. Ovarian estrogen receptor α and β mRNA expression: impact of development and estrogen. Mol Cell Endocrinol 149: 153–161.

Du Y, Villeneuve F, Wang X J, Sun Z, Chen W, Li J, Lou H, Wong P K and Zhang D D, 2008. Oridonin confers protection against arsenic-induced toxicity through activation of the Nrf2-mediated defensive response. Environ. Health Perspect. 116: 1154–1161.

Duker A A, Carranza E J and Hale M, 2005. Arsenic geochemistry and health. Environ Int 31(5):631-41.

DuMond J W, Singh K P, 2007. Gene expression changes and induction of cell proliferation by chronic exposure to arsenic of mouse testicular Leydig cells. J Toxicol Environ Health A. 70(13): 1150-1154.

Durando M, Kass L, Piva J, Sonnenschein C, Soto A M, Luque E H and Muñoz-de-Toro M, 2007. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. Environ Health Perspect. 115(1): 80-86.

Duvilanski B H, Seilicovich A, Díaz M C, Muñoz Maines V, Lasaga M and Debéljuk L, 1985. Effect of GABA-T inhibitors on prolactin secretion in vitro. Eur J Pharmacol. 115(1): 65-69.

Duvilanski B H, Zambruno C, Seilicovich A, Pisera D, Lasaga M, Diaz M C, Belova N, Rettori V and McCann S M, 1995. Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohypophysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 92(1): 170-174.

Ebadi M, Leuschen M P, El Refaey H, Hamada F M and Rojas P, 1996. The antioxidant properties of zinc and metallothionein. Neurochem Int 29: 159–166.

Epidemiología del Hidroarsenicismo crónico regional endémico en la República Argentina. Estudio colaborativo multicéntrico. Ministerio de Salud de la Nación. Asociación Toxicológica Argentina. Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable. 2006.

Ercal N, Gurer-Orhan H and Aykin-Burns N, 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. Curr Top Med Chem. 1(6): 529-539.

Falnoga I, Zelenik Pevec A, Šlejkovec Z, Žnidarič M T, Zajc I, Mlakar S J and Marc J, 2012. Arsenic trioxide (ATO) influences the gene expression of metallothioneins in human glioblastoma cells. Biol. Trace Elem. Res. 149(3): 331-339.

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

Frasor J, Barnett D H, Danes J M, Hess R, Parlow A F and Katzenellenbogen B S, 2003. Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus. Endocrinology. 144(7): 3159-3166.

Freeman M E, Kanyicska B, Lerant A and Nagy G, 2000. Prolactin: Structure, function and regulation of secretion. PhysiolRev 80(4): 1523-1631.

Freeman M.E, 1988. The ovarian cycle of the rat. En: The Physiology of Reproduction. Knobil E. & Nelly J.D (Eds.) Raven Press, págs 1893-1928.

Fumarola C and Guidotti G G, 2004. Stress-Induced Apoptosis: Toward a Symmetry With Receptor-Mediated Cell Death. 9(1): 77-82.

García-Chávez E, Jiménez I, Segura B and Del Razo L M, 2006. Lipid oxidative damage and distribution of inorganic arsenic and its metabolites in the rat nervous system after arsenite exposure: influence of alpha tocopherol supplementation. Neurotoxicology. 27(6): 1024-1031.

García-Morales P, Saceda M, Kenney N, Salomon D S, Kim N, Salomon D S, Gottardis M M, Solomon H B, Sholler P F, Jordan V C and Martin M B, 1994.Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. J Biol Chem 269:16896–16901.

Garrido C and Kroemer G, 2004. Life's Smile, Death's Grin: Vital Functions of Apoptosis-Executing Proteins. Current Opinion in Cell Biology : 639-646.

Gershengorn M C, 1986. Mechanism of thyrotropin releasing hormone stimulation of pituitary hormone secretion. Annu Rev Physiol 48: 515-526.

Goggin S L, Labrecque M T and Allan A M, 2012. Perinatal exposure to 50 ppb sodium arsenate induces hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in male C57BL/6 mice. Neurotoxicology. 33(5): 1338-1345.

Goloubkova T, Ribeiro M F, Rodrigues L P, Cecconello A L and Spritzer P M, 2000. Effects of xenoestrogen bisphenol A on uterine and pituitary weight, serum prolactin levels and immunoreactiveprolactin cells in ovariectomized Wistar rats. Arch Toxicol. 74(2): 92-98.

Gorski R A, Mennin S P and Kubo K, 1975. The neural and hormonal bases of the reproductive cycle of the rat. Adv Exp Med Biol. 54: 115-153.

Gotz F, Thieme S and Dorner G, 2001. Female infertility—effect of perinatal xenoestrogen exposure on reproductive functions in animals and humans. Folia Histochem Cytobiol 39(2):40–43.

Groothuis P G, Dassen H H, Romano A and Punyadeera C, 2007. Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. Hum Reprod Update. 13(4): 405-417.

Haider S S and Najar M S, 2008. Arsenic induces oxidative stress, sphingolipidosis, depletes proteins and some antioxidants in various regions of rat brain. Kathmandu Univ Med J (KUMJ). 6(1): 60-69.

Han H, Long H, Wang H, Wang J, Zhang Y and Wang Z, 2004. Progressive apoptotic cell death triggered by transient oxidative insult in H9c2 rat ventricular cells: a novel pattern of apoptosis and the mechanisms. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology 286: H2169-H2182.

Han Y H, Moon H J, You B R, Kim S Z, Kim S H, Park W H, 2010. Effects of arsenic trioxide on cell death, reactive oxygen species and glutathione levels in different cell types. Int J Mol Med. 25(1): 121-128.

Harada H and Grant S, 2003. Apoptosis Regulators. Reviews in Clinical and Experimental Hematology 7: 117-138.

Harkonen P, 2003. Paracrine prolactin may cause prostatic problems. Endocrinology 144: 2266-2268.

Hei T K and Filipic M, 2004. Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. Free RadicBiol Med. 37(5): 574-581.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, StromA, Treuter E, Warner M and Gustafsson J A, 2007. Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. Physiol Rev 87: 905–931.

Hetts S W, 1998. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. JAMA. 279(4): 300-307.

Höfer N, Diel P, Wittsiepe J, Wilhelm M and Degen G H, 2009. Dose- and route-dependent hormonal activity of the metalloestrogen cadmium in the rat uterus. Toxicol Lett. 191(2-3):123-131.

Holdcraft R W and Braun R E, 2004. Hormonal regulation of spermatogenesis. Int J Androl 27: 91-95.

Hopenhayn C, Ferreccio C, Browning S R, Huang B, Peralta C, Gibb H, Hertz-Picciotto, I, 2003. Arsenic exposure from drinking water and birth weight. Epidemiology. 14: 593–602.

Hu Y, Jin X and Snow E T, 2002. Effect of arsenic on transcription factor AP-1 and NF-kappaB DNA binding activity and related gene expression. Toxicol Lett. 133(1): 33-45.

Hughes MF, 2002. Arsenic toxicity and potencial mechanisms of action. Toxicol Lett. 133(1):1-16.

Hunter D S, Hodges L C, Vonier P M, Fuchs-Young R, Gottardis M M and Walker C L, 1999. Estrogen receptor activation via activation function 2 predicts agonism of xenoestrogens in normal and neoplastic cells of the uterinemyometrium. Cancer Res 59: 3090–3099.

IARC (1987). Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Arsenic and its compounds. IARC (International Agency for Research on Cancer), Lyon, Francia.

Iavicoli I, Fontana L and Bergamaschi A, 2009. The effects of metals as endocrine disruptors. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 12(3):206-223.

Jahan S, Ahmed S, Razzaq S and Ahmed H, 2012. Adverse effects of arsenic exposure on the mamary glands of adult female rats. Pakistan J. Zool 44(3): 691-697.

Jana K, Jana S and Samanta P K, 2006. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. Reprod Biol Endocrinol. 16: 4-9.

Jones S B, King L B, 1995. Plasma phosphoprotein as an indicator of estrogen induced vitellogenin production in brook trout. International Congress of toxicology VII 6-P20.

Jones F T, 2007. A broad view of arsenic. PoultSci 86: 2-14.

Kaltreider R C, Davis A M, Lariviere J P and Hamilton J W, 2001. Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. Environ. Health Perspect. 109: 245–251.

Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E and Owens W, 2003. The OECD program to validate the rat uterotrophic. Bioassay Phase 2: Coded single-dose studies. Environ. Health. Perspectives. 111-112.

Katzenellenbogen B S and Korach K S, 1997. A new actor in the estrogen receptor drama--enter ER-beta. Endocrinology. 138(3): 861-862.

Katzenellenbogen J A, O´Malley B W and Katzenellenbogen B S, 1996. Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as basis for the cell-and promoter-specific action of these hormones. Molecular endocrinology 10: 119-131.

Kawamata Y, Fujii R, Fukusumi S, Habata Y, Hosoya M, Hinuma S, Kitada C, Onda H, Nishimura O &Fujino M, 2000. Analyses for susceptibility of rat anterior pituitary cells to prolactin-releasing peptide. Endocrine 12: 215-221

Kawashima K, Yamakawa K, Takahashi W, Takizawa S, Yin P, Sugiyama N, Kanba S and Arita J, 2002. The estrogen-occupied estrogen receptor functions as a negative regulator to inhibit cell proliferation induced by Insulin/IGF-1: A cell context-specific antimitogenic action of estradiol on rat lactotrophs in culture. Endocrinology 143(7): 2750–2758.

Kensler T W, Wakabayashi N and Biswal S, 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. Annu Rev Pharmacol Toxicol 47: 89−116.

Khan S, Vala J A, Nabi S U, Gupta G, Kumar D, Telang A G and Malik J K, 2012. Protective effect of curcumin against arsenic-induced apoptosis in murine splenocytes in vitro. J Immunotoxicol. 9(2): 148-159.

Kiino D R and Dannies P S, 1981. Insulin and 17β-estradiol increase the intracellular prolactin content of GH4C1 cells. Endocrinology 109: 1264–1269.

Kinoshita A, Wanibuchi H, Wei M, Yunoki T and Fukushima S, 2007. Elevation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell proliferation via generation of oxidative stress by organic arsenicals contributes to their carcinogenicity in the rat liver and bladder. Toxicol Appl Pharmacol. 221(3): 295-305.

Kligerman A D, Doerr C L and Tennant A H, 2005. Oxidation and methylation status determine the effects of arsenic on the mitotic apparatus. Mol Cell Biochem 279: 113-121.

Kloas W, Lutz I and Einspanier R, 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. Sci Total Environ 225: 59–68.

Kreppel H, Bauman J W, Liu J, McKim J M, Jr. and Klaassen C D, 1993. Induction of metallothionein by arsenicals in mice. Fundam. Appl. Toxicol. 20: 184–189.

Kuiper G G, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S and Gustafsson J A, 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology. 138(3): 863-870.

Kuladip J, Subarna J andPrabhat K S, 2006. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action.Reproductive Biology and Endocrinology 4-9.

Kumar T R, 2007. Functional analysis of LHb knockout mice. Molecular and Cellular Endocrinology 269: 81-84.

Kumar T R, Wang Y, Lu N and Matzuk M M, 1997. Follicle stimulating is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. Nat Genet 15: 201-204.

Laessig S A, McCarthy M M and Silbergeld E K, 1999. Neurotoxic effects of endocrine disruptors. Curr Opin Neurol 12: 745–751.

Lamartiniere C A, Zhang J X and Cotroneo M S, 1998. Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity. Am J Clin Nutr. 68(6 Suppl): 1400S-1405S.

Lamberts S W J and MacLeod R M, 1990. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. Physiological Reviews 70: 279-318.

Lander H M, 1997. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. FASEB Journal 11: 118-124.

Langer G, Ferin M and Sachar E J, 1978. Effect of haloperidol and L-dopa on plasmaprolactin in stalk-sectioned and intact monkeys. Endocrinology 102: 367-370.

Lansdown A B, 1995. Physiological and toxicological changes in the skin resulting from the action and interaction of metal ions. Cri Rev Toxicol 25: 397-462.

Larochette N, Decaudin D, Jacotot E, Brenner C, Marzo I, Susin S A, Zamzami N, Xie Z, Reed J and Kroemer G, 1999. Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore.Exp Cell Res. 249(2): 413-421.

Laws S C, Carey S A, Ferrell J M, Bodman G J and Cooper R L, 1999. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. Toxicol Sci. 54(1): 154-167.

Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S & Brenner C, 2005. Reactive Oxygen Species and the Mitochondrial Signaling Pathway of Cell Death. Histology and Histopathology 20: 205-219.

Levine J E, 1997. New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. Biol Reprod. 56(2): 293-302.

Li B, Li X, Zhu B, Zhang X, Wang Y, Xu Y, Wang H, Hou Y, Zheng Q and Sun G, 2013. Sodium arsenite induced reactive oxygen species generation, nuclear factor (erythroid-2 related) factor 2 activation, heme oxygenase-1 expression, and glutathione elevation in Chang human hepatocytes. Environ Toxicol. 28(7): 401-410.

Li W, Boomsma R A and Verhage H G, 1992. Immunocytochemical analysis of estrogen and progestin receptors in uteri of steroid-treated and pregnant cats. Biol Reprod. 47(6): 1073-1081.

Li Y, Gao Y, Zhao L, Wei Y, Feng H, Wang C, Wei W, Ding Y and Sun D, 2012. Changes in serum thioredoxin among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. Toxicol. Appl. Pharmacol. 259(1): 124-132.

Li Y, Shen L, Xu H, Pang Y, Xu Y, Ling M, Zhou J, Wang X and Liu Q, 2011. Up-regulation of cyclin D1 by JNK1/c-Jun is involved in tumorigenesis of human embryo lung fibroblast cells induced by a low concentration of arsenite. Toxicol Lett. 206(2): 113-120.

Li Y, Wang M, Piao F and Wang X, 2012. Subchronic exposure to arsenic inhibits spermatogenesis and downregulates the expression of ddx3y in testis and epididymis of mice. Toxicol Sci. 128(2):482-489.

Lin S, Del Razo L M, Styblo M, Wang C, Cullen W R and Thomas D J, 2001. Arsenicals inhibit thioredoxin reductase in cultured rat hepatocytes. Chem Res Toxicol. 14(3): 305-311.

Liu F J, Wang J S and Theodorakis C W, 2006. Thyrotoxicity of sodium arsenate, sodium perchlorate, and their mixture in zebrafish Danio rerio. Environ Sci Technol. 40(10): 3429-3436.

Liu J, Cheng M L, Yang Q, Shan K R, Shen J, Zhou Y, Zhang X, Dill A L and Waalkes M P, 2007. Blood metallothionein transcript as a biomarker for metal sensitivity: low blood metallothionein transcripts in arsenicosis patients from Guizhou, China Environ Health Perspect. 115(7): 1101-1106.

Liu J, Kadiiska M B, Liu Y, Lu T, Qu W and Waalkes M P, 2001. Stress-related gene expression in mice treated with inorganic arsenicals. Toxicol Sci. 61(2): 314-320.

Liu S X, Liu S X, Athar M, Lippai I, Waldren C, and Hei T K, 2001. Induction of oxyradicals by arsenic: Implication for mechanism of genotoxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98: 1643–1648.

Liu S, Gonzalez J, Hwang B J and Steinberg M L, 2011. Induction of cyclin D1 by arsenite and UVB-irradiation in human keratinocytes. J Health Care Poor Underserved. 22(4 Suppl): 110-121.

Liu Z, Shen J, Carbrey JM,Mukhopadhyay R, Agre P and Rosen B P, 2002. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. Proc Natl Acad Sci 99(9):6053-6058.

Lu T H, Su C C, Chen Y W, Yang C Y, Wu C C, Hung D Z, Chen C H, Cheng P W, Liu S H and Huang C F, 2011. Arsenic induces pancreatic β-cell apoptosis via the oxidative stress-regulated mitochondria-dependent and endoplasmic reticulum stress-triggered signaling pathways. Toxicol Lett. 201(1): 15-26.

Lu T H, Tseng T J, Su C C, Tang F C, Yen C C, Liu Y Y, Yang C Y, Wu C C, Chen K L, Hung D Z and Chen Y W, 2014. Arsenic induces reactive oxygen species-caused neuronal cell apoptosis through JNK/ERK-mediated mitochondria-dependent and GRP 78/CHOP-regulated pathways. Toxicol Lett. 2014 Jan 3;224(1): 130-140.

Maiti S and Chatterjee A K, 2001. Effects on levels of glutathione and some related enzymes in tissues after an acute arsenic exposure in rats and their relationship to dietary protein deficiency. Arch Toxicol. 75(9):531-537.

Maiti S and Chatterjee AK, 2000. Differential response of cellular antioxidant mechanism of liver and kidney to arsenic exposure and its relation to dietary protein deficiency. Environ. Toxicol. and Pharmacol. 8: 227–235.

Malhi H, Gores G J and Lemasters J J, 2006. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? Hepatology. 43(2 Suppl 1): S31-44.

Marnell L L, Garcia-Vargas G G, Chowdhury U K, Zakharyan R A, Walsh B, Avram M D, Kopplin M J, Cebrián M E, Silbergeld E K and Aposhian H V, 2003. Polymorphisms in the human monomethylarsonic acid (MMA V) reductase/hGSTO1 gene and changes in urinary arsenic profiles. Chem Res Toxicol. 16(12): 1507-1513.

Martin L, Finn C A and Trinder G, 1973. Hypertrophy and hyperplasia in the mouse uterus after oestrogen treatment: an autoradiographic study. J Endocrinol. 56(1): 133-144.

Martin M B, Reiter R, Pham T, Avellanet Y R, Camara J, Lahm M, Pentecost E, Pratap K, Gilmore B A, Diverakar S, Dagata R S, Bull J L and Stoica A, 2003. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. Endocrinology 144: 2425–2436.

Matsuo H, Kurachi O, Shimomura Y, Samoto T and Maruo T, 1999. Molecular bases for the actions of ovarian sex steroids in the regulation of proliferation and apoptosis of human uterine leiomyoma. Oncology. 57 Suppl 2: 49-58.

Matsushita N, Kato Y, Shimatsu A, Katakami H, Yanaihara N and Imura H, 1983. Effects of VIP, TRH, GABA and dopamine on prolactin release from superfused rat anterior pituitary cells. Life Sci 32(11): 1263-1269.

Matsuura H, Nishitoh H, Takeda K, Matsuzawa A, Amagasa T, Ito M, Yoshioka K and Ichijo H, 2002. Phosphorylation-dependent scaffolding role of JSAP1/JIP3 in the ASK1-JNK signaling pathway. A new mode of regulation of the MAP kinase cascade. J Biol Chem. 277(43): 40703-40709.

Maurer R A, Kim K E, Day R N and Notides A C, 1990. Regulation of prolactin gene expression by estradiol. In: Sato G, Stevens JL (eds) Molecular Endocrinology and Steroid Hormone Action. Liss, New York, 159–169.

Mayo K E, Miller T, De Almeida V, Godfrey P, Zheng J and Cunha S R, 2000. Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor. Recent Prog Horm Res 55: 237-267.

McNeilly A S, de Kretser D M and Sharpe R M, 1979. Modulation of prolactin, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone secretion by LHRH and bromocriptine (CB154) in the hypophysectomised pituitary-grafted male rat and its effects on testicular LH receptors and testosterone output. BiolReprod 21: 141-147.

Miler E A, Nudler S I, Quinteros F A, Cabilla J P, Ronchetti S A and Duvilanski B H, 2010. Cadmium induced-oxidative stress in pituitary gland is reversed by removing the contamination source. Hum Exp Toxicol 29(10): 873-880.

Miller W H Jr, Schipper H M, Lee J S, Singer J and Waxman S, 2002. Mechanisms of action of arsenic trioxide. Cancer Res. 62(14): 3893-3903.

Mitchner N A, Garlick C and Ben-Jonathan N, 1998. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors α and β in the rat pituitary gland. Endocrinology 139: 3976-3983.

Montanari M, Macaluso M, Cittadini A and Giordano A, 2006. Role of geminin: from normal control of DNA replication to cancer formation and progression? Cell Death Differ. 13(7): 1052-1056.

Montes G S and Luque E H, 1988. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. Acta Anat (Basel) 133(3): 192-199.

Moolgavkar S H, 1986. Hormones and multistage carcinogenesis. Cancer Surv. 5(3): 635-648.

Morales A A, Gutman D, Cejas P J, Lee K P and Boise L H, 2009. Reactive oxygen species are not required for an arsenic trioxide-induced antioxidant response or apoptosis. J Biol Chem. 284(19): 12886-12895.

Morán J, Garrido P, Alonso A, Cabello E and González C, 2013. 17β-Estradiol and genistein acute treatments improve some cerebral cortex homeostasis aspects deteriorated by aging in female rats. Exp Gerontol. 48(4): 414-421.

Morgan A, 2001. Arsenic exposure and health effects. Office of wáter, office of science and tecnology. Health and EcologicalCriteriaDivision. Washington, DC, USA.

Morse D and Choi A M, 2002. Heme oxygenase-1: The "emerging molecule" has arrived. Am J Respir Cell Mol Biol 27(1): 8-16.

Motohashi H and Yamamoto M, 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. Trends Mol Med. 10(11): 549-557.

Müller J M, Rupec R A and Baeuerle P A, 1997. Study of gene regulation by NF-kappa B and AP-1 in response to reactive oxygen intermediates. Methods. 11(3): 301-312.

Murphy A J, Guyre P M, Wira C R and Pioli P A, 2009. Estradiol regulates expression of estrogen receptor ERα46 in human macrophages. PLoS One 4(5): e5539.

Namgung U and Xia Z, 2001. Arsenic induces apoptosis in rat cerebellar neurons via activation of JNK3 and p38 MAP kinases. Toxicol. Appl. Pharmacol. 174: 130-138.

Naranmandura H, Suzuki N and Suzuki K T, 2006. Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation. Chem Res Toxicol. 19(8): 1010-1018.

Nath R, Kambadur R, Gulati S, Paliwal V K and Sharma M, 1988. Molecular aspects, physiological function, and clinical significance of metallothioneins. Crit Rev Food Nutr 27: 41–85.

Neill JD, 1970. Effect of “stress” on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. Endocrinology 87: 1192-1197.

Nephew K P, Long X, Osborne E, Burke K A, Ahluwalia A and Bigsby R M, 2000. Effect of estradiol on estrogen receptor expression in rat uterine cell types. Biol Reprod. 62(1): 168-177.

Nephew K P, Long X, Osborne E, Burke K A, Ahluwalia A and Bigsby R M, 2000. Effect of estradiol on estrogen receptor expression in rat uterine cell types. Biol Reprod. 62(1): 168-177.

Newbold R R, Bullock B C and McLachlan J A, 1987. Testicular tumors in mice exposed in utero to diethylstilbestrol. J Urol. 138(6): 1446-1450.

Newton C J, Bilko D, Tichomirowa M, Renner U and Stalla G K, 2005. The Role of Poly (Adenosine 5'-Diphosphate-Ribose) Polymerase in the Response of Pituitary Tumor Cells to Reactive Oxygen Species. Endocrinology 146: 1119-1127.

Nikaido Y, Yoshizawa K, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N and Tsubura A, 2004. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. Reprod Toxicol. 18(6): 803-811.

Niswender G D, Chen C L, Midgley A R Jr, Meites J and Ellis S, 1969. Radioimmunoassay for rat prolactin. Proc Soc Exp Biol Med. 130(3): 793-797.

Nordberg G, Jin T and Nordberg M, 1994. Sub-cellular targets of cadmium nephrotoxicity: cadmium binding to renal membrane proteins in animals with or without protective metallothionein synthesis. Environ Health Perspect 102: 191–194.

Nordberg J and Arnér E S, 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med. 31(11): 1287-1312.

NRC. National Research Council;, 1999. Arsenic in drinking water. Washington D.C.

Nussey S S and Whitehead S A, 2001. The gonads. In Endocrinology: An integrated Approach (A. Bosher, Ed) BIOS Scientific Publishers Ltd, Londres.

O'Brien T J, Ceryak S and Patierno S R, 2003. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. Mutat Res. 533(1-2): 3-36.

Ogata K, Ogata Y, Takasaki Y and Tan E M, 1987. Epitopes on proliferating cell nuclear antigen recognized by human lupus autoantibody and murine monoclonal antibody. J Immunol. 139(9): 2942-2946.

Okuda K, Takiguchi M and Yoshihara S, 2010. In vivo estrogenic potential of 4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene, an active metabolite of bisphenol A, in uterus of ovariectomized rat. Toxicol Lett. 197(1): 7-11.

Olea N, Fernández M F, Araque P, Olea Serrano F, 2002. Perspectivas en disrupción endocrina. GacSanit. 16: 261-267.

Otterbein L E and Choi A M, 2000. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. Am J Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 279(6): L1029-1037.

Otterbein L E, Soares M P, Yamashita K, Bach F H, 2003. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. Trends Immunol. 24(8): 449-455.

Page R, 1994. The anatomy of hipothalamus-hipophysial complex. Ed. Knobil E and Neill J. The phisiology of reproduction 2nd edition. Raven Press, New York.

Parker M G, Arbuckle N, Dauvois S, Danielian P and White R, 1993. Structure and function of the estrogen receptor. Annual New York Academy of Science 684: 119-126.

Pasqualini C, Guivarc'h D, Barnier J V, Guibert B, Vincent J D and Vernier P, 2001. Differential subcellular distribution and transcriptional activity of sigma E3, sigma E4, and sigma E3-4 isoforms of the rat estrogen receptor-alpha. Mol Endocrinol. 15(6): 894-908.

Penot G, Le Péron C, Mérot Y, Grimaud-Fanouillère E, Ferrière F, Boujrad N, Kah O, Saligaut C, Ducouret B, Métivier R and Flouriot G, 2005. The human estrogen receptor-alpha isoform hERalpha46 antagonizes the proliferative influence of hERalpha66 in MCF7 breast cancer cells. Endocrinology. 146(12): 5474-5484.

Peraza M A, Cromey D W, Carolus B, Carter D E and Gandolfi A J, 2006. Morphological and functional alterations in human proximal tubular cell line induced by low level inorganic arsenic: evidence for targeting of mitochondria and initiated apoptosis. J Appl Toxicol. 26(4): 356-367.

Pettersson K and Gustafsson J A, 2001. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. Annu Rev Physiol. 63: 165-192.

Pi J, Diwan B A, Sun Y, Liu J, Qu W, He Y, Styblo M and Waalkes M P, 2008. Arsenic-induced malignant transformation of human keratinocytes: involvement of Nrf2. Free Radic. Biol. Med. 45: 651–658.

Poliandri A, Cabilla P, Velardez M, Bodo C and Duvilanski, 2003. Cadmium induces apoptosis in anterior pituitary cells that can be reversed by treatment with antioxidants. Toxicol Appl Pharmacol 190: 17-24.

Poon H F, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield D A, 2004. Free radicals: key to brain aging and hemeoxygenase as a cellular response to oxidative stress. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 59(5): 478-493.

Priedkalns J, 1993. Sistema Reproductor Femenino. Histología Veterinaria. D. Dellmann, ed. Acribia, Zaragoza, España. 282-283.

Pulido M D and Parrish A R, 2003. Metals and apoptosis: Recent developments. Mutation Research 533: 227–241.

Qian X, Kulig E, Jin L and Lloyd R, 1998. Expression of D-type cyclins in normal and neoplastic rat pituitary. Endocrinology 139(4): 2058-2067.

Quaife C J, Findley S D, Erickson J C, Froelick G J, Kelly E J, Zambrowicz B P and Palmiter R D, 1994. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. Biochemistry. 33(23): 7250-7259.

Quarmby V E and Korach K S, 1984. The influence of 17 beta-estradiol on patterns of cell division in the uterus. Endocrinology. 114(3): 694-702

Quinteros F A, Poliandri A H, Machiavelli L I, Cabilla J P and Duvilanski B H, 2007. In vivo and in vitro effects of chromium VI on anterior pituitary hormone release and cell viability. Toxicol Appl Pharmacol. 2007 Jan 1;218(1): 79-87.

Racagni G, Apud J A, Locatelli V, Cocchi D, Nistico G, di Giorgio R M and Muller E E, 1979. GABA of CNS origin in the rat anterior pituitary inhibits prolactin secretion. Nature 281(5732): 575-578.

Rahman M M, Chowdhury U K, Mukherjee S C, Mondal B K, Paul K, Lodh D, Biswas B K, Chanda C R, Basu G K, Saha K C, Roy S, Das R, Palit S K, Quamruzzaman Q and Chakraborti D, 2001. Chronicarsenictoxicity in Bangladesh and West Bengal, India--a review and commentary. J Toxicol Clin Toxicol. 39(7): 683-700.

Ravenscroft P, Brammer H and Richards K, 2009. Arsenic Pollution: a global synthesis. Oxford: Wiley-Blackwell.

Rhode P R and Gorski J, 1991. Inhibitory effects of serum and stimulatory effects of estrogen on prolactin mRNA levels in GH3 rat pituitary tumor cells. Mol Cell Endocrinol 82(1): 1-9.

Rice C, Birnbaum L S, Cogliano J, Mahaffey K, Needham L, Rogan W J and Vom Saal F S, 2003. Exposure Assessment for Endocrine Disruptors: Some Considerations in the Design of Studies. Mini-Monograph. Environmental Health Perspectives 111, 1683.

Rimoldi G, Christoffel J, Seidlova-Wuttke D, Jarry H and Wuttke W, 2007. Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina. Environ Health Perspect. 115 Suppl 1:62-68.

Rivera O E, Varayoud J, Rodríguez H A, Muñoz-de-Toro M and Luque E H, 2011. Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb. Reprod Toxicol. 32(3): 304-312.

Robertson F G, Harris J, Naylor M, Oakes S R, Kindblom J, Dillner K, Wennbo H, Tornell J, Kelly P A, Green J and Ormandy C J, 2003. Prostate development and carcinogenesis in prolactin receptor knockout mice. Endocrinology 144: 3196-3205.

Rocha R A, Gimeno-Alcañiz J V, Martín-Ibañez R, Canals J M, Vélez D and Devesa V, 2011. Arsenic and fluoride induce neural progenitor cell apoptosis. Toxicol Lett. 203(3): 237-44.

Rodríguez V M, Carrizales L, Jiménez-Capdeville M E, Dufour L and Giordano M, 2001. The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat. Brain Res Bull. 55(2): 301-308.

Ronchetti S A, Miler E A, Duvilanski B H and Cabilla J P, 2013. Cadmium mimics estrogen-driven cell proliferation and prolactin secretion from anterior pituitary cells. PLoS One. 8(11): e81101.

Rossman T G, 2003. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. Mutat Res. 533(1-2):37-65.

Rossman T, 2007. Arsenic. In: Rom W and Markowitz S eds. Environmental and Occupational Medicine, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins. 1006-1017.

Rottenberg H and Wu S, 1998. Quantitative Assay by Flow Cytometry of the Mitochondrial Membrane Potential in Intact Cells. Biochimica and Biophysica Acta 1404: 393-404.

Rousseau J, Cossette L, Grenier S and Martinoli M G, 2002. Modulation of prolactin expression by xenoestrogens. Gen Comp Endocrinol 126(2): 175-182.

Roy A, Manna P and Sil P C, 2009. Prophylactic role of taurine on arsenic mediated oxidative renal dysfunction via MAPKs/ NF-kappaB and mitochondria dependent pathways. Free Radic Res. 43(10): 995-1007.

Samuelson D A, 2007. Tratado de Histologia Veterinária. El sevier, Rio de Janeiro.

Sánchez I and Dynlacht B D, 2005. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. Semin Cell Dev Biol 16(3): 311-321.

Sánchez-Peña LC, Petrosyan P, Morales M, González N B, Gutiérrez-Ospina G, Del Razo LM and Gonsebatt M E, 2010. Arsenic species, AS3MT amount, and AS3MT gene expression in different brain regions of mouse exposed to arsenite. Environ Res. 110(5): 428-434.

Sankar P, Telang A G, Ramya K, Vijayakaran K, Kesavan M and Sarkar S N, 2014. Protective action of curcumin and nano-curcumin against arsenic-induced genotoxicity in rats in vivo. Mol Biol Rep. 41(11): 7413-7422.

Sarkar M, Chaudhuri G R, Chattopadhyay A and Biswas N M, 2003. Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats. Asian J Androl. 5(1): 27-31.

Scandalios J G, 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses.Braz J Med Biol Res. 38(7): 995-1014.

Schuppler J and Günzel P, 1979. Liver tumors and steroid hormones in rats and mice. Arch Toxicol Suppl. (2): 181-195.

Sen C K, 2000. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. Current Topics in Cellular Regulation 36: 1-30.

Shanle E K and Xu W, 2010. Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. Adv Drug Deliv Rev 62(13): 1265-1276.

Shanle E K and Xu W, 2011. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action. Chem Res Toxicol 24: 6–19.

Shi H, Shi X and Liu KJ, 2004. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. Mol Cell Biochem. 255(1-2): 67-78.

Shi Y, Wei Y, Qu S, Wang Y, Li Y and Li R, 2010. Arsenic induces apoptosis of human umbilical vein endothelial cells through mitochondrial pathways. Cardiovasc. Toxicol. 10(3): 153-160.

Shull J D and Gorski J, 1984. Estrogen stimulates prolactin gene transcription by a mechanism independent of pituitary protein synthesis. Endocrinology 114: 1550–1557.

Shupnik M A, 2002. Oestrogen receptors, receptor variants and oestrogen actions in thehypothalamic-pituitary axis. J Neuroendocrinol 14: 85-94.

Singh S, Greene R M and Pisano M M, 2010. Arsenate-induced apoptosis in murine embryonic maxillary mesenchymal cells via mitochondrial-mediated oxidative injury. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 88(1): 25-34.

Smedley P L and Kinninburgh D G, 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. Applied Geochemistry, 17: 517-568.

Sokal R R and Rohlf F J, 1995. Biometry, 3rd edition, WH Freeman, New York.

Sonnenschein C and Soto A M, 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. J Steroid Biochem Mol Biol 65: 143–150.

Sosić-Jurjević B, Filipović B, Ajdzanović V, Savin S, Nestorović N, Milosević V and Sekulić M, 2010. Suppressive effects of genistein and daidzein on pituitary-thyroid axis in orchidectomized middle-aged rats. Exp Biol Med 235(5): 590-598.

Spink B C, Bennett J A, Pentecost B T, Lostritto N, Englert N A, Benn G K, Goodenough A K, Turesky R J and Spink D C, 2009. Long-term estrogen exposure promotes carcinogen bioactivation, induces persistent changes in gene expression, and enhances the tumorigenicity of MCF-7 human breast cancer cells. Toxicol Appl Pharmacol 240 (3): 355-366.

Steinmetz R, Brown N G, Allen D L, Bigsby R M and Ben-Jonathan N, 1997. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. Endocrinology. 138(5): 1780-1786.

Steinmetz R, Mitchner N A, Grant A, Allen D L, Bigsby R M and Ben-Jonathan N, 1998. The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract. Endocrinology. 139(6): 2741-2747.

Stennicke H R and Salvesen G S, 2000. Caspases-Controlling Intracellular Signals by Protease Zymogen Activation. Biochimica and Biophysica Acta 1477: 299-306.

Stoica A, Pentecost E, and Martin M B, 2000. Effects of arsenite on estrogen receptor-alpha expression and activity in MCF-7 breast cancer cells. Endocrinology 141: 3595–3602.

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

Susiarjo M, Hassold T J, Freeman E and Hunt P A, 2007. Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. PLoS Genet 3:e5.

Susin S A, Lorenzo H K, Zamzami N, Marzo I, Snow B E, Brothers G M, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett D R, Aebersold R, Siderovski D P, Penninger J M and Kroemer G, 1999. Molecular Characterization of Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor. Nature 397: 441-446.

Suzuki A, Sugihara A, Uchida K, Sato T, Ohta Y, Katsu Y, Watanabe H and Iguchi T, 2002. Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. Reprod Toxicol 16: 107–116.

Tachi C, Tachi S and Lindner H R, 1972. Modification by progesterone of oestradiol-induced cell proliferation, RNA synthesis and oestradiol distribution in the rat uterus. J Reprod Fertil. 31(1): 59-76.

Takahashi O and Oishi S, 2000. Disposition of orally administered 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl) propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. Environ Health Perspect. 108(10): 931-935.

Teng J, Wang Z Y, Jarrard D F and Bjorling D E, 2008. Roles of estrogen receptor alpha and beta in modulating urothelial cell proliferation. Endocr Relat Cancer 15: 351-364.

Terkel J, Blake CA & Sawyer CH, 1972. Serum prolactin levels in lactating rats after suckling or exposure to ether. Endocrinology 91: 49-53.

Themmen A P N and Huhtaniemi I T, 2000. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. EndocrRev 21: 551-583.

Theocharis S E, Margeli A P and Koutselinis A, 2003. Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer. Int J Biol Markers. 18(3): 162-169.

Thomas D J, 2007. Molecular processes in cellular arsenic metabolism. Toxicol Appl Pharmacol. 222(3): 365-373.

Thompson J A, White C C, Cox D P, Chan J Y, Kavanagh T J, Fausto N and Franklin C C, 2009. Distinct Nrf1/2-independent mechanisms mediate As 3+-induced glutamate-cysteine ligase subunit gene expression in murine hepatocytes. Free Radic Biol Med. 46(12): 1614-1625.

Tian C, Gao P, Zheng Y, Yue W, Wang X, Jin H and Chen Q, 2008. Redox status of thioredoxin-1 (TRX1) determines the sensitivity of human liver carcinoma cells (HepG2) to arsenic trioxide-induced cell death. Cell Res. 18(4): 458-471.

Tibbetts T A, Mendoza-Meneses M, O'Malley B W and Conneely O M, 1998. Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. Biol Reprod. 59(5): 1143-1152.

Timms B G, Howdeshell K L, Barton L, Bradley S, Richter C A and vom Saal F S, 2005. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(19): 7014-7019.

Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T and Ichijo H, 2001. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. EMBO Rep. 2(3): 222-228.

Tood R, Hinds P W, Munger K, Rustgi A K, Opitz O G, Suliman Y and Wong D T, 2002. Cell cycle dysregulation in oral cancer. Crit Rev Oral Biol Med 13(1): 51-61.

Turnbull A V and Rivier C, 1997. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. Proc Soc Exp Biol Med 215(1): 1-10.

Vankelecom H, Andries M, Billiau A and Denef C, 1992. Evidence that folliculo-stellate cells mediate the inhibitory effect of interferon-gamma on hormone secretion in rat anterior pituitary cell cultures. Endocrinology 130(6):3537-46.

Vallee B L, 1995. The function of metallothionein. NeurochemInt 27: 23–33.

Varayoud J, Monje L, Bernhardt T, Muñoz-de-Toro M, Luque E H and Ramos J G, 2008. Endosulfan modulates estrogen-dependent genes like a non-uterotrophic dose of 17beta-estradiol. Reprod Toxicol. 26(2): 138-145.

Varayoud J, Ramos J G, Monje L, Bosquiazzo V, Muñoz-de-Toro M and Luque E H, 2005. The estrogen receptor alpha sigma3 mRNA splicing variant is differentially regulated by estrogen and progesterone in the rat uterus. J Endocrinol. 186(1): 51-60.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C, 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidiylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labbelled Anexin V. Journal Immunological Methods 184: 39-51.

Vernhet L, Morzadec C, van Grevenynghe J, Bareau B, Corolleur M, Fest T and Fardel O, 2008. Inorganic arsenic induces necrosis of human CD34-positive haematopoietic stem cells. Environ Toxicol. 23(2): 263-268.

Voeikov V L, 2006. Reactive oxygen species--(ROS) pathogens or sources of vital energy? Part 1. ROS in normal and pathologic physiology of living systems. Journal of Alternative and Complementary Medicine 12:111-118.

Volm M, Koomagi R, Mattern J and Efferth T, 2002 Br. J. Cancer 87: 251–257

Waalkes M P, Keefer L K and Diwan B A, 2000. Induction of proliferative lesions of the uterus, testes, and liver in swiss mice given repeated injections of sodium arsenate: possible estrogenic mode of action. Toxicol Appl Pharmacol. 166(1): 24-35.

Waalkes M P, Liu J, Chen H, Xie Y, Achanzar W E, Zhou Y S, Cheng M L, Diwan B A, 2004. Estrogen signaling in livers of male mice with hepatocellular carcinoma induced by exposure to arsenic in utero. J Natl Cancer Inst. 96(6): 466-474.

Waalkes M P1, Ward J M, Liu J and Diwan B A, 2003. Transplacental carcinogenicity of inorganic arsenic in the drinking water: induction of hepatic, ovarian, pulmonary, and adrenal tumors in mice. Toxicol Appl Pharmacol. 186(1): 7-17.

Wade M G, Desaulniers D, Leingartner K and Foster W G, 1997. Interactions between endosulfan and dieldrin on estrogen-mediated processes in vitro and in vivo. Reprod Toxicol 11: 791–798.

Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J and Vasson M P, 2003. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three Xuorescent probes. Clinica Chimica Acta 331: 103–110.

Wang J P, Qi L, Moore M R and Ng J C, 2002. A review of animal models for the study of arsenic carcinogenesis.Toxicol Lett. 133(1): 17-31.

Waring R H and Harris R M, 2005. Endocrine disrupters: a human risk?. Mol Cell Endocrinol. 244(1-2): 2-9.

Whittaker M H, Wang G, Chen X Q, Lipsky M, Smith D, Gwiazda R and Fowler B A, 2011. Exposure to Pb, Cd, and As mixtures potentiates the production of oxidative stress precursors: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats. Toxicol Appl Pharmacol. 254(2): 154-166.

WHO (1981). Arsenic. Environmental Health Criteria 18. WHO (World Health Organization), Ginebra, Suiza.

WHO (1993). Arsenic. Guidelines for drinking-water quality Vol.1. WHO (World Health Organization), Ginebra, Suiza.

WHO (2001). Arsenic and Arsenic Compounds. Environmental Health Criteria 224, 2nd ed. WHO (World Health Organization, International Programme on Chemical Safety), Ginebra, Suiza.

Wildfang E, Healy S and Aposhian H V, 2000. Arsenic. Molecular Biology and Toxicology of Metals. Zalupsand Merces R (Ed.) Univesity School of Medicine, Macon, GA, USA and Koopatonick J, London Cancer Center. London, Ontario, Canadá.

Wirtitsch M, Roth E, Bachleitner-Hofmall T, Wessner D and Sturlal S, 2009. Omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids enhance arsenic trioxide efficacy in arsenic trioxide resistant leukemic and solid tumor cells. Oncol. Res. 18: 83–94.

Yadetie F and Male R, 2002. Effects of 4-nonylphenol on gene expression of pituitary hormones in juvenile Atlantic salmon (Salmo salar). Aquat Toxicol. 58(1-2): 113-129.

Yip L and Dart R C, 2001. Arsenic. En: Sullivan J B, Krieger G R, editors. Clinical environmental health and toxic exposures. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins, 858-866.

Zhang P, Mo J Y, Perez A, Leon A, Liu L, Mazloum N, Xu H and Lee M Y, 1999. Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the p125 catalytic subunit of mammalian DNA polymerase delta. J Biol Chem. 274(38): 26647-26653.

Zhou X D, Sens D A, Sens M A, Namburi V B, Singh R K, Garrett S H, and Somji S, 2006. Metallothionein-1 and -2 expression in cadmium- or arsenic-derived human malignant urothelial cells and tumor heterotransplants and as a prognostic indicator in human bladder cancer. Toxicol Sci. 91(2): 467-475.

APÉNDICE: Abreviaturas

ACTH	Adrenocorticotrofina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ANOVA	Análisis de la varianza
ARE	Elemento de respuesta a antioxidantes
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
As	Arsénico
AS3MT	Arsénico 3-metiltransferasa
ATP	Adenosina trifosfato
BPA	Bisfenol-A
BSA	Seroalbúmina bovina
CAT	Catalasa
Ca^{2+}	Calcio
Cd	Cadmio
CDKs	Quinasas dependientes de ciclinas
CRH	Hormona liberadora de corticotrofina
CTE	Cadena de transporte de electrones
Cyc	Ciclina
Cyc D1/ Cyc D3	Ciclina D1/ Ciclina D3
DABCO	1,4 diazabicicloocta no
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DE/DEs	Disruptor/es endocrino/s
DMEM	Medio mínimo esencial de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DHR123	Dihidrorodamina 123
DiOC6	3,3-dihexiloxacarbocianina iodada
DTT	Ditiotreitol
E_2	17β–Estradiol
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
EG/EL	Epitelio glandular/luminal
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
Est	Estroma uterino
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FSH	Hormona folículoestimulante
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GH	Hormona de crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de GH

GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas (FSH, LH)
GPx	Glutatión peroxidasa
GR	Glutatión reductasa
GSH	Glutatión
GSSG	Glutatión oxidado
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
HACRE	Hidroarsenisismo Crónico Regional Endémico
HCl	Ácido clorhídrico
H-E	Hematoxilina-Eosina
HEPES	N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico]
HO-1	Hemo-oxigenasa-1
IARC	Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer
iAs	Arsénico inorgánico
iAs^{3+}/ iAs^{5+}	Arsenito/Arsenato
ICI 182,780	7α,17β-[9[(4,4,5,5,5-pentafluoropentil)sulfinil] nonil]estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol
IHQ	Inmunohistoquímica
IP	Ioduro de propidio
KRB	Buffer Krebs-Ringer-bicarbonato
KRB-CMF	Buffer Krebs-Ringer-bicarbonato libre de Ca^{2+} y Mg^{2+}
LH	Hormona luteinizante
Mg^{2+}	Magnesio
M-MLV RT	Transcriptasa reversa del virus de leucemia murina Moloney
MT/MTs	Metalotioneína/s
MTT	Metil-tiazol-tetrazolio
NAC	N-acetil-cisteína
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2-factor derivado 2
NRS	Suero normal de conejo
O_2	Oxígeno molecular
$O_2^{\cdot -}$	Anión superóxido
OH·	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
$ONOO^-$	Peroxinitrito
P4	Progesterona
Pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PEG	Polietilenglicol
PMM	Potencial de la membrana mitocondrial
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoruro

PPT	Poro de permeabilidad transitoria
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
PRL	Prolactina
RE/REα/REβ	Receptor de estrógenos α ó β
REα66	Isoforma de 66 kDa del REα
REα36/REα46	Variantes truncadas del REα de 36 y 46 kDa
RG	Receptor de glucocorticoides
RIA	Radioinmunoensayo
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas del oxígeno
ROO^-	Radical peroxilo
RT-PCR	Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SE	Error estándar
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Suero normal de conejo
SOD	Superóxido dismutasa
TBE	Buffer tris-borato-EDTA
TRH	Hormona liberadora de TSH
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
TRH	Hormona liberadora de TSH
TRX-1	Tiorreoxina-1
TSH	Hormona estimulante de tiroides
XE/XEs	Xenoestrógeno/xenoestrógenos