

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



CAMPUS GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE EL ADN EN CÉLULAS HEK-293 COEXPUESTAS *in vitro* A ARSÉNICO Y FLUORURO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MONTSERRAT ORTIZ ROA

GUANAJUATO, GUANAJUATO, MÉXICO. MAYO 2019



Universidad
de Guanajuato

**ASUNTO: AUTORIZACIÓN PARA
TRÁMITE DE TITULACIÓN**

Guanajuato, Gto., a 03 de abril de 2019

**Q.F.B. ALFONSO TRUJILLO VALDIVIA
SECRETARIO ACADÉMICO DE LA DNCE
P R E S E N T E**

Estimado Q.F.B. Alfonso,
Por este conducto informo a usted que el trabajo de tesis de licenciatura titulado **"DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA Y EL NÚMERO DE COPIAS DE ADN MITOCONDRIAL EN CÉLULAS HEK293 COEXPUESTAS in vitro A ARSÉNICO Y FLUORURO"**, fue culminado satisfactoriamente por la pasante de Q.F.B. MONTSERRAT ORTIZ ROA, bajo la dirección de un servidor. Por lo anterior brindo mi **AUTORIZACIÓN** para que la Srita. Montserrat realice los trámites correspondientes para obtener dicho título.

Agradeciendo de antemano la atención brindada, me despido de usted enviándole un cordial saludo.

ATENTAMENTE,

"LA VERDAD OS HARÁ LIBRES"

**DR. JORGE ALEJANDRO ALEGRÍA TORRES
DEPARTAMENTO DE FARMACIA DE LA DCNE**

Trabajo de Tesis presentado el día 31 de mayo del 2019 en la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, para optar por el grado académico de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, ante los siguientes miembros del sínodo:

Dr. Gustavo Cruz Jiménez

Presidente

Dra. Yolanda Alcaraz Contreras

Secretario

Dra. Diana

Vocal

Dra. Clara Alba Betancourt

Sinodal Suplente

El presente trabajo de tesis de Licenciatura se realizó en el Departamento de Farmacia de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato bajo la dirección del Dr. Jorge Alejandro Alegría Torres fungiendo como codirectores la Dra. Minerva Martínez Alfaro y el Dr. Ricardo Espinosa Tanguma, con el apoyo económico de la Universidad de Guanajuato (Subsidio: CIIC 145/2018). **Montserrat Ortiz Roa** agradece la beca otorgada por la Universidad de Guanajuato para la realización de este trabajo.

Agradecimientos

A la Universidad de Guanajuato por brindarme las herramientas necesarias para cumplir mi perfil profesional durante toda la trayectoria.



UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y al Laboratorio de Investigación Molecular en Nutrición de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por la apertura para el uso de su infraestructura y el gran apoyo por parte de todo el personal.



UASLP

Universidad Autónoma
de San Luis Potosí



LIMÓN
LABORATORIO DE
INVESTIGACIÓN
MOLECULAR
EN NUTRICIÓN

UNIVERSIDAD DEL CENTRO DE MÉXICO

Dedicatoria:

El presente trabajo de tesis lo dedico a todas a esas personas que estuvieron en mi camino y a mi lado en la realización del proyecto, sin su grandioso apoyo y palabras aliento esto no hubiese sido posible, muchas gracias a todos ellos.

A mis padres, Ave y Arturo, les agradezco todo el apoyo, las palabras de aliento y sus grandes deseos que siempre han puesto sobre mí, gracias a ustedes todo ese sueño que comencé hoy ve el fruto de poder culminar una etapa muy importante, fueron el motor para seguir adelante, fueron las personas que nunca se rindieron, gracias por todo. A mi familia entera, Ana, Arturo, José Arturo, Lupita, a todos ustedes gracias por darme los ánimos para seguir adelante, por ayudarme siempre que lo necesite y por ser esa alegría que me esperaba siempre en casa. A mis sobrinos, Nanito, Aurora y Constanza, gracias por ser siempre esa sonrisa que me mantuvo a flote, a todos ustedes, los amo.

A ti mi compañero, amigo y esposo Guillermo Gerardo, por volverte en esa fuerza, aliento y cordura para cumplir con este objetivo, gracias por viajar tan lejos para estar a mi lado, por compartir esta historia, por no dejarme sola, por recorrer nuevos sitios a mi lado y por ayudarme en todo este recorrido y proyecto. Gracias por no solo mantenerme fuerte sino ayudarme a cumplir mis más grandes sueños, por alentarme a seguir adelante y siempre tener las mejores palabras de apoyo. Gracias por todos tus consejos, correcciones y darme toda esta felicidad. Te amo.

A mis amigos Daniel y Alberto, fueron la clave de todo esto, la compañía, las risas y mis mejores momentos de la Universidad. Los Gordis que se volvieron mi familia y mis mejores amigos, a ustedes les agradezco el siempre estar ahí para mí y por hacer este camino más sencillo y por ser parte de mi vida.

A mi director de tesis y profesor, el Dr. Jorge Alejandro Alegría Torres por permitirme la oportunidad de realizar este proyecto, por su paciencia y amabilidad, pero sobre todo por enseñarme muchas cosas que desconocía gustarme y llegar a disfrutar, gracias por ser una persona maravillosa.

Agradezco de igual manera a todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Fisiología que tuve durante mi estancia en la Universidad Autonoma de San Luis Potosí, Al Dr. Ricardo Espinosa Tanguma por ser un asesor del que me permitió adquirir nuevos conocimientos y ser muy paciente conmigo; agradezco también a mis compañeras de laboratorio Alejandra, Coraima, Anita, Montse y Angi por todas sus enseñanzas, su amistad y por hacer mi tiempo a su lado muy divertido, a todos ustedes le agradezco darme la oportunidad de ser su amiga.

Gracias a todos por formar parte de este proyecto y de mi vida.

“... Por eso, la etapa inicial del origen de la vida debió ser la formación de las sustancias orgánicas, la producción del material básico que más tarde habría de servir para la formación de todos los seres vivos.”

-Aleksandr Oparin

Contenido

Índice de Figuras	X
Índice de Anexos	XII
Abreviaturas	XIII
1. Resumen	1
2. Antecedentes	2
2.1 Arsénico y Flúor	2
2.1.1 Arsénico	2
2.1.2 Fluoruro	3
2.1.3 Vías de Eliminación	4
2.2 Fuentes de Arsénico y Fluoruro	5
2.2.1 Arsénico	5
2.2.2 Fluoruro	5
2.3 Normativa del Agua	6
2.3.1 Límites Permisibles Internacionales	6
2.3.2 Límites Permisibles Nacionales	6
2.4 Contaminación por Arsénico y Fluoruro en Latinoamérica	6
2.4.1 Contaminación en México	7
2.4.1.1 Estudios Realizados en México	7
2.4.1.2 Arsénico y Flúor en México	8
2.4.2 Guanajuato	9
2.5 Efectos en la Salud	10
2.6 Efecto del Arsénico y Flúor sobre el ADN	11
2.6.1 Estudios <i>in vivo</i>	12
2.6.2 Estudios <i>in vitro</i>	13
2.7 Modelos de Estudio de Exposición combinada a Arsénico y Fluoruro	14
3. Justificación	16
4. Objetivo	16
4.1 Objetivo General	16
4.2 Objetivos Específicos	16
5. Hipótesis	17

6. Metodología	18
6.1 Materiales	18
6.1.1 Células	18
6.1.2 Medio de Cultivo	18
6.1.3 Meta-arsenito de Sodio	19
6.1.4 Fluoruro de Sodio	19
6.1.5 Kit Ensayo MTT	19
6.1.6 Extracción de ADN	20
6.2 Métodos	20
6.2.1. Metodología General	20
6.2.2 Cultivo Celular	22
6.2.3 Pasaje Celular	23
6.2.4 Congelado de Células	23
6.2.5 Mantenimiento Celular	23
6.2.6 Ensayo de Viabilidad	23
6.2.6.1 Curva Dosis-Respuesta	24
6.2.7 Extracción de ADN	24
6.2.8 Evaluación de Estabilidad Genómica	24
6.2.9 Análisis Estadístico	26
7. Resultados	27
7.1 Cultivo de las Células HEK-293	27
7.2 Viabilidad	29
7.3 Evaluación Genómica	36
8. Discusión	42
9. Conclusión	46
10. Perspectivas	47
11. Referencias	48
12. Anexos	59

Índice Figuras

- Fig. 1** Mecanismo Molecular de carcinogenicidad inducida por Arsénico inorgánico
- Fig. 2** Posibles mecanismos inducidos por fluoruro basados en estudios *in vitro* e *in vivo*
- Fig. 3** Células HEK-293, registro de la ATCC
- Fig. 4** Metodología General
- Fig. 5** Pasaje Celular
- Fig. 6** Congelado Celular
- Fig. 7** Electroforesis
- Fig. 8** Células HEK-293 en medio DMEM. Objetivo 20x
- Fig. 9** Células HEK-293 en medio DMEM adicionado con 2.0µM de meta-arsenito de sodio por 24 horas. Objetivo 20x.
- Fig. 10** Células HEK-293 en medio DMEM adicionado con 25 mg/L de fluoruro de sodio por 24 horas. Objetivo 20x.
- Fig. 11** Toxicidad del Metaarsenito de sodio en células HEK-293 a las 24 horas de exposición
- Fig. 12** Toxicidad del meta-arsenito de sodio en células HEK-293 a las 24 horas de exposición en presencia de NAC
- Fig. 13** Comparación de la viabilidad de las células HEK-293 con los tratamientos de meta-arsenito de sodio y N-Acetil cisteína
- Fig. 14** Toxicidad del Fluoruro de sodio en células HEK-293 a las 24 horas de exposición
- Fig. 15** Toxicidad del fluoruro de sodio sobre las células HEK-293 a las 24 horas de exposición en presencia de NAC
- Fig. 16** Comparación de la viabilidad de las células HEK-293 con el tratamiento de fluoruro de sodio en presencia y ausencia de N-acetil cisteína.
- Fig. 17** Toxicidad del arsénico y el fluoruro en células HEK-293 a las 24 horas de exposición
- Fig. 18** Toxicidad de la co-exposición de arsénico y fluoruro en células HEK-293 a las 24 horas de exposición, en presencia de NAC

- Fig. 19** Comparación de la viabilidad entre los tratamientos de co-exposición arsénico-fluoruro en presencia y ausencia de N-acetil cisteína
- Fig. 20** Curva de amplificación del fragmento para mitocondria de células HEK-293 expuestas a arsénico y/o fluoruro por 24 horas.
- Fig. 21** Obtención de la recta del fragmento para mitocondria de células HEK-293 expuestas a arsénico y/o fluoruro por 24 horas.
- Fig. 22** Determinación relativa del número de copias de ADN mitocondrial en células HEK-293 expuestas a meta-arsenito de sodio por 24 horas en presencia y ausencia de N-acetil
- Fig. 23** Determinación relativa del número de copias de ADN mitocondrial en células HEK-293 expuestas a fluoruro de sodio en presencia y ausencia de N-acetil cisteína
- Fig. 24** Determinación relativa del número de copias de ADN mitocondrial en células HEK-293 co-expuestas a meta-arsenito de sodio y fluoruro de sodio en presencia y ausencia de N-acetil
- Fig. 25** Determinación de la longitud telomérica en células HEK-293 co-expuestas por 24 horas a meta-arsenito de sodio y fluoruro de sodio en presencia y ausencia de N-acetil

Índice Anexos

- 12.1 12.1. Protocolos
 - 12.1.1 12.1.1 Preparación de Reactivos
 - 12.1.1.1 12.1.1.1 Medio DMEM
 - 12.1.1.2 12.1.1.2 PBS
 - 12.1.1.3 12.1.1.3 Tripsina
 - 12.1.1.4 12.1.1.4 Soluciones de Meta-arsenito de Sodio
 - 12.1.1.5 12.1.1.5 Soluciones de Fluoruro de Sodio
 - 12.1.1.6 12.1.1.6 Solución de NAC
 - 12.1.1.7 12.1.1.7 Colección de Absorbancias de ADN de células HEK-293
 - 12.1.2 12.1.2 Protocolos de Trabajo
 - 12.1.2.1 12.1.2.1 Protocolo para Pasaje de Células
 - 12.1.2.2 12.1.2.2 Protocolo para Congelado Celular
 - 12.1.2.3 12.1.2.3 Protocolo para Descongelado de Células
 - 12.1.2.4 12.1.2.4 Protocolo para Sembrado Celular con Soluciones de Metaarsenito de Sodio y Fluoruro de Sodio.
 - 12.1.2.5 12.1.2.5 Protocolo de Electroforesis
 - 12.1.2.6 12.1.2.6 Protocolo de Purificación de ADN Genómico Wizard
 - 12.1.3 12.1.3 Imágenes
 - 12.1.3.1 12.1.3.1 Electroforesis
 - 12.1.3.2 12.1.3.2 Nanodrop

ABREVIATURAS

ADNmt: ADN mitocondrial

ANOVA: Análisis de la Varianza

ATP: Adenosin Trifosfato

cnADNmt: Número de copias de ADN mitocondrial

DMA: Ácido dimetilarsenoso

DMEM: Dulbecco's Modification of Eagle Medium

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno

LOAEL: Lowest Observed Adverse Effect Level (Nivel más bajo de efecto adverso observado)

LT: Longitud Telomérica

MMA: Ácido monometilarsónico

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NAC: N-Acetil Cisteína

Ppb: Partes por billón

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa)

SBF: Suero Bovino Fetal

1. Resumen

El arsénico es un elemento muy común en la corteza terrestre, se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente, el aire, el agua y el suelo. Por otra parte, el fluoruro está presente en la mayoría de las fuentes de agua o en cultivos que lo absorben a través del riego con agua contaminada. Por lo tanto, los humanos corremos el riesgo de estar expuestos al arsénico (As) y fluoruro (F), a través del consumo de agua y alimentos contaminados.

En América Latina el riesgo a estar expuesto a estos elementos es debido principalmente a la naturaleza geológica. Como fuente principal se ha identificado el vidrio volcánico y, en menor medida, minerales hidrotermales. En los climas áridos y semiáridos es típico las altas tasas de evaporación y erosión química, las cuales generan aguas subterráneas salinas y un pH básico, dando por resultado aguas ricas en As y F (Alarcón-Herrera et al., 2013).

En México, el agua subterránea representa la única fuente disponible para muchas zonas que son áridas y semiáridas. Existen regiones donde el agua contiene concentraciones de As y F que exceden los niveles permisibles actuales establecidos por la Norma Mexicana NOM-127-SSA1-1994 de agua para uso y consumo humano (25 µg/L para As y 1.5 mg/L para F, González-Horta et al., 2015; Armienta & Segovia, 2008).

En lo que respecta al Estado de Guanajuato, este se encuentra en una región minera además de ser una zona con una sobre explotación de pozos, lo cual favorece la presencia de varios elementos químicos en su agua subterránea, teniendo como contaminante principal al As (Arroyo et al., 2013). Asimismo, existen otros reportes de la presencia de F⁻ en aguas subterráneas del territorio del estado (del Carmen, Javier & Aline, 2016). Es por ello que la población de Guanajuato se encuentra en riesgo de exposición a estos contaminantes, además de las actividades antropogénicas que incrementan el uso del recurso hídrico, como son: agricultura, minería, curtiduría e industria automotriz.

Poco se han estudiado los efectos combinados tanto *in vivo* como *in vitro* y se han vinculado con daño renal (Zheng et al., 2014). Como ha sido reportado, el F⁻ tiene efectos nefrotóxicos al igual que el arsénico (Jiménez-Córdova et al., 2018). Sin embargo, aún se requieren más estudios para conocer los mecanismos de nefrotoxicidad por coexposición a As y F⁻.

2. 2. Antecedentes

2.1. Arsénico y Flúor.

Millones de personas sufren los efectos tóxicos del arsénico y flúor en muchas partes del mundo. Estos dos elementos son reconocidos como los contaminantes inorgánicos más graves presentes en el agua potable (Shankar, Shanker & Shikha, 2014; Jha et al., 2013). En lugares como India, China, Argentina, Bangladesh y México es común la intoxicación severa debido a estos dos elementos. La ingestión de agua contaminada con altas concentraciones de As y F⁻ es la principal vía de exposición humana ambiental en el mundo (Chouhan & Flora, 2010).

2.1.1. Arsénico

El arsénico es un elemento ampliamente distribuido en la corteza terrestre, ocupa el vigésimo lugar en abundancia en relación con los otros elementos (OMS, 2018); se encuentra aproximadamente en 320 formas minerales en las rocas y puede entrar en ambientes terrestres y acuáticos a través de procesos geológicos naturales y actividades antropogénicas (Flora, 2015). Su uso es principalmente como insecticida y herbicida o como conservante para la madera debido a su poder germicida y su resistencia a la descomposición (Chung, Yu & Hong, 2014).

El arsénico está presente en 4 tipos de estados de oxidación, -3,0, ±3 y ±5, siendo el arseniato el más predominante en el agua, con un estado de oxidación ±5. En el

ambiente, el arsénico generalmente se encuentra combinado con otros elementos como por ejemplo oxígeno, cloro y azufre, combinado con estos elementos se conoce como arsénico inorgánico, mientras que el combinado con carbono e hidrógeno se conoce como arsénico orgánico.

Las formas inorgánicas del arsénico [arsenito (As +3) y el arseniato (As +5)] representan las más tóxicas para la salud.

Por su amplia distribución se encuentra presente en todo el ambiente, como por ejemplo en el aire, el agua y la tierra; por esto que la población se expone a niveles altos de arsénico inorgánico a través del consumo de agua proveniente de abastecimiento subterráneas, alimentos preparados con dicha agua y cultivos irrigados con agua de alto contenido de arsénico (ATSDR, 2018).

2.1.2. Fluoruro

El flúor es el treceavo elemento más abundante en la corteza terrestre, no puede ser destruido en el ambiente, solamente puede cambiar de forma, inmediatamente se combina con otras sustancias para convertirse en fluoruro (Chouhan & Flora, 2010).

Los fluoruros se encuentran naturalmente en rocas en el suelo, y en carbón y arcilla en la corteza terrestre, se liberan al aire en polvo que levanta el viento. En el agua, su presencia está estrechamente relacionada con la abundancia y solubilidad de minerales que contienen flúor, como la fluorita. Los fluoruros asocian con varios elementos presentes como con el aluminio en agua dulce y con calcio y magnesio en agua de mar. Se depositan en el sedimento en donde se adhieren fuertemente. Cuando se depositan en el suelo, los fluoruros son retenidos firmemente formando fuertes asociaciones con los componentes del suelo (ATSDR, 2018)

2.1.3 Metabolismo y Vías de Eliminación

El arsénico inorgánico, un carcinógeno humano, es metilado en el cuerpo alternando la reducción de arsénico pentavalente a trivalente y la adición de un grupo metilo de S-adenosilmetionina, esto se da por la biotransformación que sucede en el organismo, el proceso mediante el cual una sustancia se convierte (transforma) en otro producto químico por una reacción química en el organismo. El glutatión, y posiblemente otros tioles, sirven como agentes reductores. El sitio más importante de la metilación del arsénico es el hígado, pero la mayoría de los órganos muestran actividad de metilación. El resultado final son los metabolitos, el ácido monometilarsónico (MMA) y el ácido dimetilarsenoso (DMA), estos metabolitos son menos reactivos con los constituyentes de los tejidos que el arsénico inorgánico y se excretan fácilmente en la orina. Tanto la forma inorgánica como la forma orgánica abandonan el cuerpo por la orina. En su mayoría el arsénico se excreta, pero una pequeña parte se queda dentro del cuerpo y puede durar días o meses (Vahter, 2002).

Cerca de la mitad del fluoruro abandona el organismo rápidamente por la orina, generalmente dentro de 24 horas, la mayor parte permanece en el cuerpo siendo almacenado en los huesos y los dientes. Después de la ingestión, los niveles de fluoruro en plasma aumentan rápidamente debido a la eficiente absorción del estómago, esto depende del pH y de que es capaz de distinguir al fluoruro de otros halógenos y la mayoría de las otras sustancias. La mayoría del fluoruro se absorbe desde el intestino delgado, donde la absorción no depende del pH. El flúor no absorbido se excreta en las heces. Las concentraciones máximas de fluoruro en plasma se alcanzan en 20-60 minutos después de la ingestión. Los niveles comienzan a disminuir a partir de entonces debido a dos razones principales: la captación en los tejidos calcificados y la excreción en la orina. Los niveles de fluoruro en plasma no están regulados homeostáticamente y varían de acuerdo con los niveles de ingesta, deposición en tejidos duros y excreción de fluoruro (Buzalaf & Whitford, 2011).

Tanto el arsénico como el fluoruro son eliminados principalmente por vía renal. Aproximadamente el 60% de fluoruro es absorbido, filtrado y excretado diariamente en la orina (Buzalaf y Whitford, 2011). Al igual se han detectado productos del metabolismo del arsénico en la orina, con una prevalencia del 60-80% (DMA) y un 5-20% (MMA), esto después de una exposición con arsénico inorgánico (Drobna, Styblo & Thomas, 2009).

2.2. Fuentes de Arsénico y Fluoruro

2.2.1. Arsénico

El arsénico se encuentra naturalmente en el suelo y en minerales por lo que puede entrar al aire, al agua y al suelo en polvo que levanta el viento. Las erupciones volcánicas constituyen otra fuente natural.

Se encuentra asociado con minerales que se utilizan para extraer metales, como por ejemplo cobre y plomo, y es posible que entre al ambiente cuando se extraen o funden estos minerales. También se pueden liberar a la atmósfera cantidades pequeñas de arsénico desde plantas de carbón y desde incineradores porque a menudo el carbón y los productos de desecho contienen arsénico.

Las principales fuentes de exposición en humanos son el aire, la comida y el agua (Chung, Yu & Hong, 2014), siendo esta última la más común.

2.2.2. Fluoruro

El fluoruro es un componente natural de la corteza terrestre y del suelo. El agua, el aire, las plantas y los animales contienen pequeñas cantidades de fluoruros. Al igual se han identificado 3 fuentes de contaminación antropogénica: fertilizantes, carbón quemado y desechos industriales (Farooqi, Masuda, Siddiqui & Naseem, 2009).

El fluoruro es agregado frecuentemente a los suministros de agua, a las pastas dentales y enjuagues bucales, esto como una medida de prevención de caries.

2.3. Normativa del Agua

El abastecimiento de agua para uso y consumo humano con calidad adecuada es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades, para lo cual se establecen límites permisibles en cuanto a sus características bacteriológicas, físicas, organolépticas, químicas y radiactivas.

Con el fin de asegurar y preservar la calidad del agua en los sistemas, hasta la entrega al consumidor, se debe someter a tratamientos de potabilización.

2.3.1. Límites permisibles internacionales

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció para arsénico y fluoruro el límite recomendado en el agua potable de 10 µg/L y 1.5 mg/L respectivamente.

2.3.2. Límites permisibles nacionales

En México se estableció la NOM-127-SSA1-1994, modificada en el 2005, la cual establece los límites de contaminantes en el agua permisibles para Arsénico de 25 µg/L y para Fluoruro de 1.5 mg/L.

2.4. Contaminación por Arsénico y Fluoruro en Latinoamérica

Se ha estimado que al menos 4.5 millones de personas en América Latina están expuestas crónicamente a altos niveles de As (> 50µg/L; World Health

Organization), algunas de ellas hasta 2000 µg/L, 200 veces más que el valor de referencia que establece la OMS (McClintock et al., 2012). Para el caso del F en la mayoría de las regiones no es considerado como un factor de riesgo, sin embargo, se han detectado lugares donde los niveles sobrepasan el valor establecido de la OMS (≥ 1.5 mg/L) (Alarcón-Herrera et al., 2013).

2.4.1. Contaminación en México

En lo que respecta a México se han detectado concentraciones de arsénico y/o fluoruro por arriba de los límites permisibles de la calidad del agua en acuíferos de los estados de Aguascalientes, Coahuila, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, San Luis Potosí, Sonora y Zacatecas. (Navarro, González, Júnez-Ferreira, Bautista & Cardona, 2017; Alarcón-Herrera et al., 2013; Vega Gleason, 2002).

Actualmente no existe una estimación de la población expuesta a arsénico en el agua de consumo; sin embargo, se estima que la población expuesta a arsénico inorgánico vía consumo de agua de las fuentes de abastecimiento, es de aproximadamente 2.0 millones de habitantes, con concentraciones que van en algunas regiones de 0.030 a 0.590 mg/L (Límite permisible en México 0.025 mg/L) (Alarcón Herrera, Leal Quezada, Martín Domínguez, Miranda Navarro & Benavides Montoya, 2013).

2.4.1.1. Estudios realizados en México

Se han realizado estudios donde se ha demostrado que una exposición crónica al arsénico en el agua potable se asocia con lesiones cutáneas premalignas y malignas, genotoxicidad, un rendimiento cognitivo deficiente en niños escolares, efectos cardiovasculares, diabetes y cáncer de mama (Méndez-Gómez et al., 2008; Osorio-Yáñez et al., 2013; López-Carrillo et al., 2014; Osorio-Yáñez et al., 2015).

En lo que respecta al fluoruro, pese a no ser considerado un elemento de riesgo, se ha reportado en el país incidentes de fluorosis dental y pérdida de esmalte por las altas concentraciones en el agua consumible (Molina-Frecherro et al., 2017; Irigoyen-Camacho, García Pérez, Mejía González & Huizar Alvarez, 2016; Jarquín-Yañez et al., 2015; García-Pérez, Irigoyen-Camacho & Borges-Yañez, 2013).

Sin embargo, en lo que respecta a una coexposición de estos dos elementos teniendo como fuente principal el agua, no existen muchas evidencias reportadas en la literatura del efecto que pueden tener a la salud.

2.4.1.2. Arsénico y Flúor en México

Se han descrito tres ambientes hidrogeológicos que provocan altas concentraciones de As y F⁻ en México: áreas de actividad geotermal (Centro y norte de México), acuíferos aluviales (norte de México) y áreas de actividad minera (Norte-centro de México) (Alarcón-Herrera et al., 2013; Navarro, González, Júnez-Ferreira, Bautista & Cardona, 2017). La compleja geología de México con rocas ígneas, sedimentarias y metamórficas y un entorno tectónico activo predispone al ambiente a una contaminación natural de las aguas subterráneas.

México se ha convertido en uno de los principales productores de fluorita, y se destaca también la abundancia que existe del arsénico y fluoruro en el subsuelo del país (Anuario de la minería mexicana, 2016, 2017). En los estados de Coahuila, Durango y San Luis Potosí la fluorita es uno de los principales elementos minerales no metálicos explotados en México, recibiendo en el 2003 el segundo lugar a nivel mundial en su producción.

Sin embargo, en 1958 ya se habían descrito los efectos adversos a causa de los altos niveles de arsénico en el agua potable para la salud en la "Comarca Lagunera" (Cebrian, Albores, Aguilar & Blakely, 1983). Por otro lado, se encontraron pozos con niveles de fluoruro de 0,5 a 3,7 mg/L, encontrándose los más elevados en los que también están contaminados por arsénico (Del Razo et al. 1993) dando lugar a problemas de fluorosis dental.

Se ha reportado contaminación de aguas subterráneas por fluoruro en los estados de San Luis Potosí y Aguascalientes teniendo concentraciones de estos elementos por encima de los límites permisibles. San Luis Potosí se caracteriza por ser una zona minera, siendo susceptible a contaminación por arsénico en su agua subterránea, la cual es usada para el riego contaminando así sus cultivos (Armienta & Segovia, 2008).

En los Azufres, Michoacán, una zona que se caracteriza por ser parte del Cinturón Volcánico de México, se mostró una contaminación de los acuíferos de poca profundidad y de las aguas superficiales por estos dos elementos (Birkle & Merkel, 2000); en la región de Puebla también fue evaluado el nivel de arsénico siendo este hasta de 73.6 mg/L (González-Partida et al. 2001).

Existen algunas zonas donde la fuente de arsénico y fluoruro no se ha podido determinar con claridad, tal es el caso del estado de Guanajuato.

2.4.2. Guanajuato

El estado de Guanajuato se encuentra dentro de tres grandes provincias fisiográficas: la Mesa del Centro, la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico. Predominan cuatro tipos de clima: Semicálido subhúmedo con lluvias en verano, templado subhúmedo con lluvias en verano, semiseco templado y semiseco semicálido. El estado se caracteriza por su actividad minera, de donde se destaca: plata, azufre, agregados pétreos, arena, basalto y tezontle (Anuario estadístico y geográfico de Guanajuato 2017, 2017)

En Guanajuato se han reportado casos de fluorosis dental (del Carmen, Javier & Aline, 2016), niveles elevados de fluoruro (Morales-Arredondo, Armienta & Rodríguez, 2018) y arsénico según la norma en el agua potable (Bundschuh, Bhattacharya & Chandrasekharam, 2004) (Serafín Muñoz et al., 2016)

2.5. Efectos en la Salud

Desde la antigüedad se sabe que el arsénico es un veneno para el ser humano, y que en dosis altas (más de 60,000 ppb en el agua) pueden ser fatales. Si llega a consumir niveles de arsénico más bajos (entre 300 y 30,000 ppb en el agua) se puede sufrir irritación del estómago y los intestinos, acompañado de dolor de estómago, náusea, vómitos y diarrea.

Los efectos en la salud humana a causa de una intoxicación crónica por arsénico derivan en manifestaciones dermatológicas (hiperpigmentación, hipopigmentación e hiperqueratosis), enfermedad en el hígado, vías respiratorias, gastrointestinales, cardiovasculares y del sistema nervioso central, al igual se tienen efectos hematológicos, diabetes y diferentes tipos de cáncer (cáncer de piel, de vejiga urinaria, de pulmón, etc.) (Flora, 2015). En estudios realizados *in vivo* e *in vitro* se ha encontrado que produce daño el ADN, el estrés oxidativo que genera puede afectar al genoma y este puede ser evaluado a través de la cuantificación del número de copias de ADN mitocondrial (Partridge, Huang, Hernandez-Rosa, Davidson & Hei, 2007; Liu et al., 2005) y de la longitud del telómero (Gao et al., 2015; Borghini et al., 2016; Ferrario et al., 2009).

El fluoruro se ha usado por muchos años para reducir las caries dentales y la osteoporosis, en una suplementación adecuada incrementa la densidad ósea y promueve la re-mineralización del esmalte (Kanduti, Sterbenk & Artnik, 2016); sin embargo, también un exceso posee efectos negativos tales como fluorosis esquelética y dental, la decoloración del esmalte (DenBesten & Li, 2011) y en altas concentraciones es capaz de penetrar la barrera hematoencefálica (Zuo et al., 2018).

2.6. Efecto del Arsénico y Flúor sobre el ADN

El efecto genotóxico del arsénico se debe a la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno, esto puede causar roturas de la cadena de ADN, mutaciones por delección, formación de micronúcleos, reticulación de la proteína ADN, intercambio de cromátidas hermanas e inhibición de la reparación del ADN (Kumar, Lalit & Thakur, 2015).

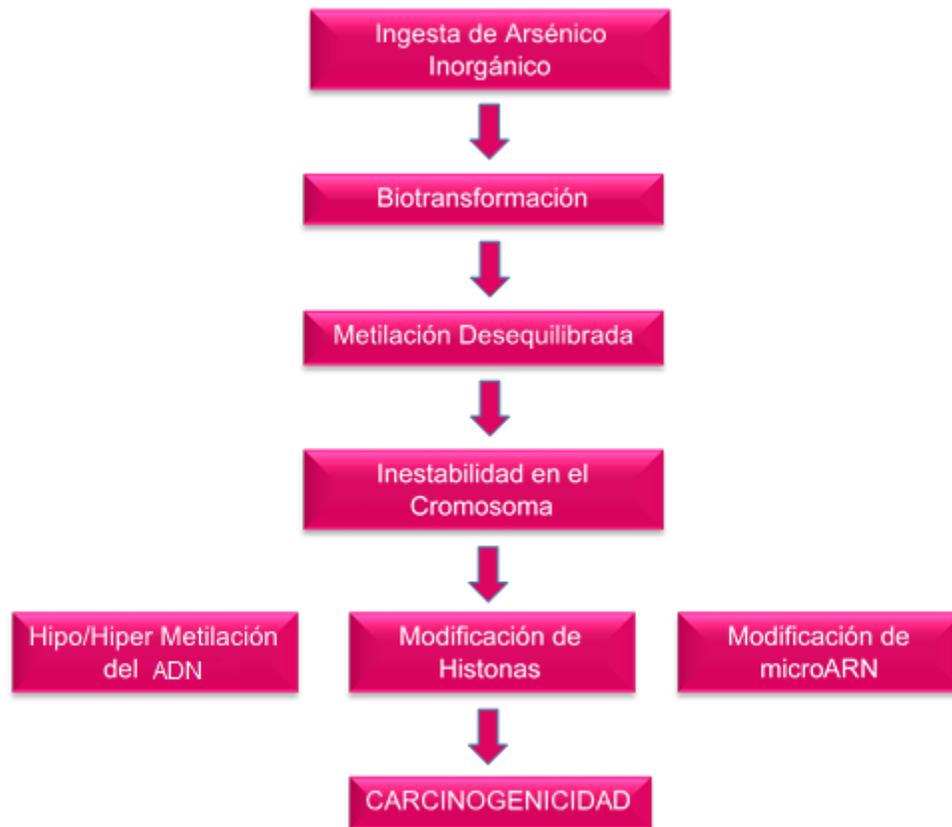


Fig. 1. Mecanismo Molecular de carcinogenicidad inducida por Arsénico inorgánico (Valeri et al. 2009; Brocato and Costa 2015).

La genotoxicidad del fluoruro se ha mostrado que causa daño mitocondrial y estrés oxidativo, lo que lleva a la activación de caspasas pro-apoptóticas (3, 9 y otras) o necrosis (Fig. 2).

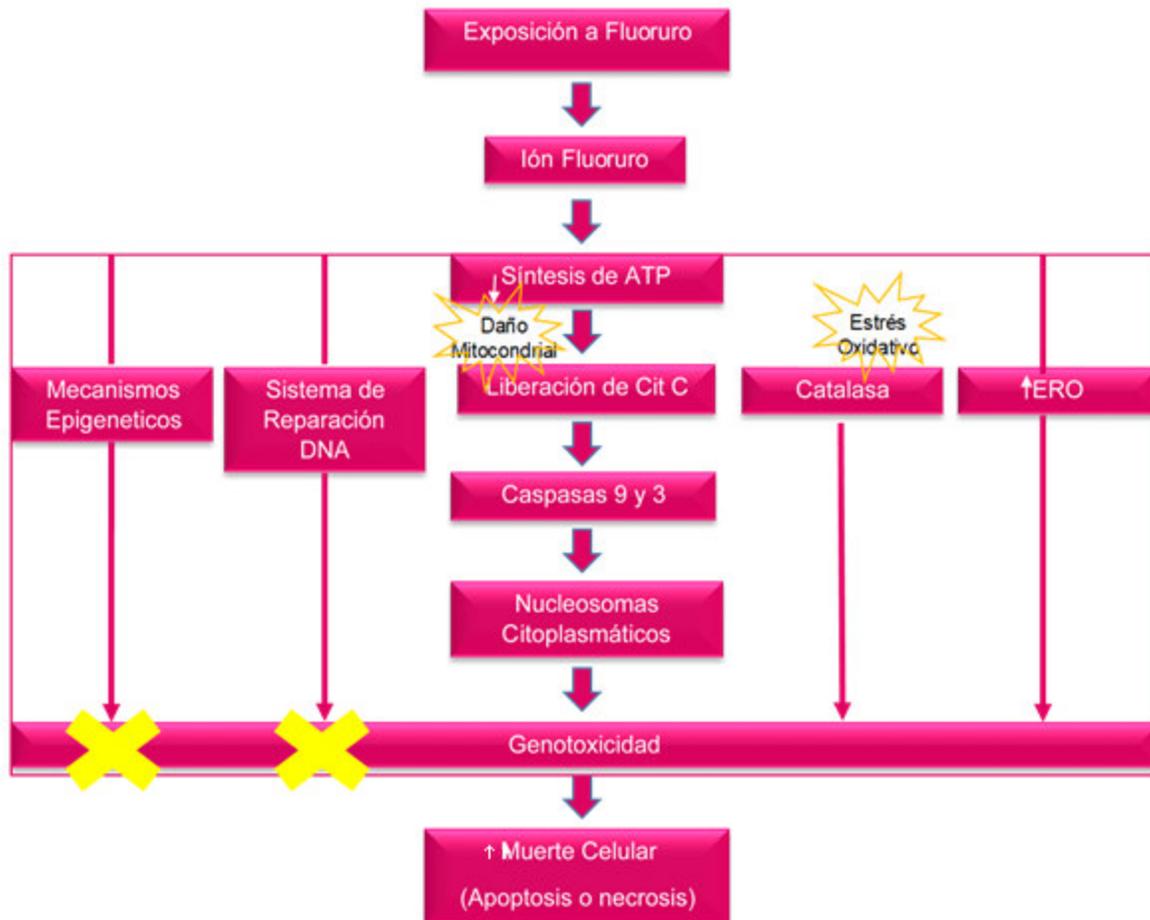


Fig. 2. Posibles mecanismos inducidos por fluoruro basados en estudios *in vitro* e *in vivo* (Ribeiro et al., 2017).

2.6.1. Estudios *in vivo*

En los estudios *in vivo* relacionados con el arsénico y fluoruro es importante el uso de modelos animales experimentales los cuales tienen una capacidad similar de biotransformación a los humanos.

Se ha demostrado que el arsénico causa hipometilación del ADN y acumulación en el hígado, esto en ratones. En ratas el administrar Na_3AsO_3 (metaarsenito de sodio)

dio lugar a una sobre estimulación de micronúcleos en el tejido ovárico esto de manera dependiente de la dosis (Akram et al., 2009).

De igual manera, en las células branquiales de peces cebras y en eritrocitos de peces al igual fue mayor la cantidad de micronúcleos en comparación con el control negativo (Kumar, Kesari & Khan, 2013).

En niños de una región minera en San Luis Potosí se observó que a una baja exposición a arsénico hubo un desequilibrio epigenético, esto medido por cambios en el porcentaje de metilación global en el ADN (Alegría-Torres et al., 2016), pudiendo inducir también una hipermetilación de regiones CpG específicas del genoma (Cárdenas et al., 2015).

Con respecto al fluoruro en células de la médula ósea de ratón se incrementó la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos y provocó aberraciones estructurales de cromosomas, al igual que daño al ADN en células de la médula, hígado, riñones y bazo del ratón (J, Sinha, Ghosh & Mukherjee, 2013), además se ha observado un decremento en el número de copias de ADN mitocondrial al estar expuestos a dosis superiores a los 100 mg/L de NaF (Sun, Xue, Zhang, Niu & Wang, 2017).

En células del hueso de ratas se vio inducida la apoptosis celular de los osteoblastos a partir de una acumulación de fluoruro y la expresión de chaperonas de estrés del retículo endoplásmico (Liu, Zhang, Gu, Zhang & Ma, 2014).

En el bazo de los ratones también se ha observado estrés del retículo endoplásmico causando apoptosis celular (Deng et al., 2016).

2.6.2. Estudios *in vitro*

En células epiteliales de próstata humana se ha observado que el arsénico es mutagénico al ADN mitocondrial y puede potencialmente inducir daño en el ADN nuclear activando las ERO mitocondriales (Singh, Kumari, Treas & DuMond, 2011).

En células de colon HT-29 bajo tratamiento con As_2O_3 causó un daño severo al ADN dependiente de la dosis debido a un aumento de las ERO (Ali, Alkahtani, Siddiqui, Alarifi & Ali, 2013). De igual manera, en células de leucemia promielocítica se reportó un aumento significativo dependiente de la dosis de este mismo tratamiento en el daño del ADN (Yedjou & Tchounwou, 2007).

En células uretrales humanas se demostró que el arsénico inorgánico es capaz de causar modificaciones a las histonas, esto debido a que genera una disminución de la histona 4 lisina 16 acetiltransferasa (H4K16ac) lo que conlleva a una toxicidad en estas células. También se demostró que en células epiteliales de la vejiga humana el ácido monometilarsonoso (MMA^{III}) y el arsénico inorgánico causan una disminución en la acetilación de la H4K16 dependiendo de la dosis y el tiempo, lo que lleva a una carcinogénesis de la vejiga (Jo et al., 2009).

Por otra parte, el fluoruro de sodio (NaF) en concentraciones mínimas demostró causar estrés oxidativo en células de linfocitos humanos lo que llevó a la muerte celular (Jothiramajayam et al., 2014).

En células de ratón (LS8) derivadas de ameloblastos, el fluoruro de sodio genera una inducción de las ERO lo que causa daño mitocondrial tal como la liberación de citocromo-c, disminución de la síntesis de ATP y la fosforilación de H2AX (γ H2AX), que es un marcador de daño en el ADN (Suzuki, Bandoski & Bartlett, 2015).

2.7. Modelos de estudio de exposición combinada a Arsénico y Fluoruro

La exposición al arsénico o al fluoruro en ratones de cepa albinos suizos condujo a un agotamiento significativo de la actividad delta-aminolevulínica deshidratasa (ALAD) en sangre y el nivel de glutatión (GSH), acompañado de un aumento de las ERO en sangre y tejidos. Se observó un aumento del ácido tiobarbitúrico en hígado y riñón al igual que una disminución del superóxido dismutada (SOD). Estos efectos fueron más pronunciados en la exposición a arsénico que a fluoruro, sin embargo, en la co-exposición de estos compuestos los efectos fueron menos pronunciados

que en la exposición individual a ellos. También se observaron efectos antagónicos en la co-exposición, esto se observó en una recuperación significativa en el nivel de GSH de los tejidos en comparación con los animales expuestos a arsénico solo, por lo que se puede concluir que la coexposición arsénico-fluoruro es menos tóxica que los compuestos individuales (Mittal & Flora, 2006).

En otro estudio realizado en ratones de cepa suiza, la exposición al arsénico y al fluoruro disminuyó significativamente los niveles de aminas biogénicas del cerebro, aumentaron las ERO; las actividades de la acetilcolinesterasa y de la monoaminoxidasa (MAO) se vieron aumentadas en presencia de fluoruro, estas no se vieron alteradas con la exposición a arsénico. En la co-exposición se observó efectos más pronunciados en la toxicidad en las actividades de acetilcolinoesterasa, monoaminoxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, sin embargo, no significo que fueran más tóxicos, se observó antagonismo (Flora, Mittal & Mishra, 2009).

En Ratas Sprague-Dawley se midió la capacidad de aprendizaje y memoria mediante la expresión de mRNA y mGluR1 y mGluR5 en el hipocampo y la corteza detectándose mediante RT-PCR y Western blot. Los niveles de glutamato disminuyeron en el hipocampo y la corteza de las ratas expuestas al fluoruro y en la coexposición, y en la corteza de las ratas expuestas al arsénico. La co-exposición de arsénico-fluoruro disminuyó la expresión del ARNm de mGluR5 en la corteza y la expresión de proteínas en el hipocampo, lo que sugiere un efecto sinérgico del arsénico y el fluoruro. Estos datos indican que el arsénico y el fluoruro, ya sea solos o co-expuestos, pueden disminuir la capacidad de aprendizaje y memoria en ratas (Jiang et al., 2014).

Se analizaron las células mononucleares de sangre periférica de niños de una comunidad de San Luis Potosí expuestos crónicamente a arsénico y fluoruro mediante el agua potable; esta exposición mostró efectos de una disminución de la expresión superficial de genes (CD25, CD40, c IAP-1, ENA-78) y proteínas (CD25, CD40), pero no se observaron cambios en la activación de los linfocitos (CD25, CD69, CD95) en las células mononucleares de sangre periférica expuestos a altas concentraciones de As y F. Las disminuciones observadas en la expresión de genes

y proteínas podrían contribuir a una disminución de la respuesta inmune a los estímulos inflamatorios (agentes infecciosos) y / o al desarrollo de la autoinmunidad en esta población infantil (Estrada-Capetillo et al., 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

La exposición a Arsénico y Fluoruro es un problema de salud mundial debido a los efectos adversos que causa a la salud. Se conocen estos efectos de forma individual; sin embargo, no se ha estudiado la interacción toxicológica arsénico-fluoruro haciendo uso del número de copias de ADNmt y la longitud telomérica, los cuales son biomarcadores de efecto temprano relacionados con la estabilidad del genoma.

En este proyecto se buscó evaluar el efecto tóxico de la combinación de arsénico y fluoruro en cultivos celulares de la línea HEK-293, la cual corresponde a una línea celular derivada de células de riñón embrionario humano, órgano que se ve afectado por la presencia de estos contaminantes dado que es la vía principal de eliminación.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo General

Evaluar la estabilidad genómica de las células HEK-293 co-expuestas *in vitro* a arsénico y fluoruro.

4.2 Objetivos Específicos

- Realizar curvas dosis-respuesta para las células HEK-293 expuestas a arsénico, a fluoruro y a ambos, para establecer las concentraciones de exposición *in vitro*.

- Determinar el número de copias de ADN mitocondrial por PCR en tiempo real, en células HEK-293 expuestas a un gradiente de concentración conocida de sales de arsénico y fluoruro, en presencia y ausencia del antioxidante N-acetil cisteína.
- Proponer mecanismos de interacción toxicológica del arsénico y el fluoruro sobre la línea celular HEK-293.

5. HIPÓTESIS

La co-exposición a arsénico y fluoruro en cultivo de células HEK-293 tendrá un efecto sobre la estabilidad genómica, medido como el número de copias de ADNmt, mismo que será contrarrestado por el antioxidante N-acetil cisteína.

6. METODOLOGÍA

6.1. Materiales

6.1.1. Células

Las células usadas corresponden a la línea celular HEK-293 (ATCC CRL-1573), estas son derivadas de células embrionarias de riñón humano (figura 3).

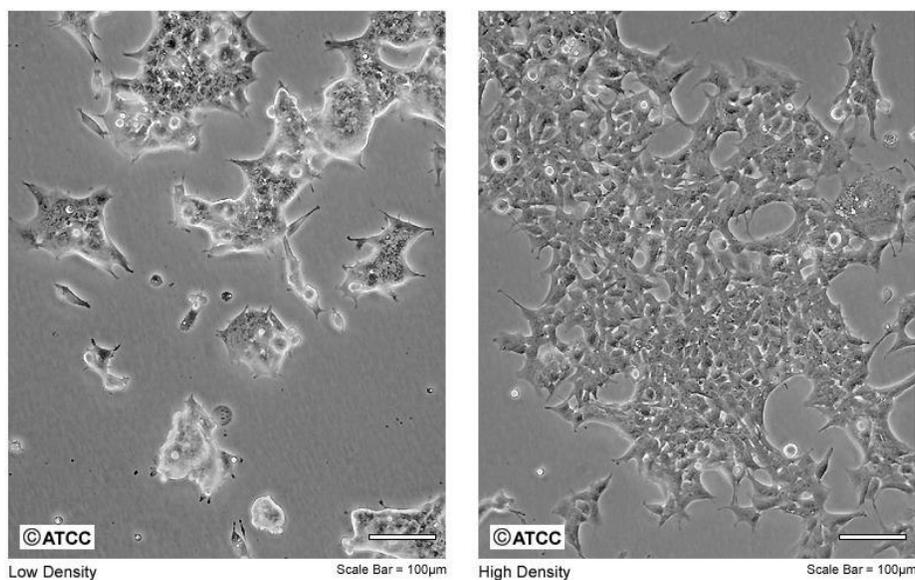


Fig.3. Células HEK-293, registro de la ATCC.

6.1.2. Medio de Cultivo

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (10%) enriquecido con suero bovino fetal (SBF). Adicionado con Bicarbonato de Sodio, 10 000 U/mL de penicilina y 10 mg/mL de estreptomina.

Se ajustó el pH del medio a 7.4 haciendo uso de HCl 0.01 M o NaOH según sea el caso.

Compuesto	Concentración	Marca
DMEM	9.9 [g/L]	Gibco
Bicarbonato de Sodio	3.7 [g/L]	Sigma
Suero Bovino Fetal	10% [v/v]	Gibco
Penicilina/Estreptomina	10 000 [U/mL] / 10 [mg/mL]	Sigma

6.1.3. Meta-arsenito de Sodio

El Metaarsenito de Sodio (NaAsO_2) se disolvió en medio DMEM y se ajustó el pH a 7.4. Éste se filtró con poro de 0.4 μm para mantener su esterilidad. Se generaron concentraciones de: 0.5 μM , 1 μM , 1.5 μM , 2.0 μM , 2.5 μM y 3 μM .

Compuesto	Marca	No. de Catálogo
Metaarsenito de Sodio (NaAsO_2)	Sigma	S7400

6.1.4. Fluoruro de Sodio

El Fluoruro de Sodio (NaF) se disolvió en medio DMEM y se ajustó el pH a 7.4. Éste se filtró con poro de 0.4 μm para mantener su esterilidad. Se prepararon concentraciones de: 10 mg/L, 15 mg/l, 20 mg/l, 25 mg/l, 30 mg/l, 35 mg/l y 40 mg/l.

Compuesto	Marca	No. de Catálogo
Fluoruro de Sodio (NaF)	Sigma	S6776

6.1.5. Kit Ensayo MTT

Compuesto	Marca	No. de Catálogo
Bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio	Sigma	11 465 007 001

6.1.6. Extracción de ADN

Wizard® Genomic ADN Purification Kit

6.2. Métodos

6.2.1. Metodología General

La metodología general seguida fue la siguiente, trabajando siempre en condiciones de estricta esterilidad:

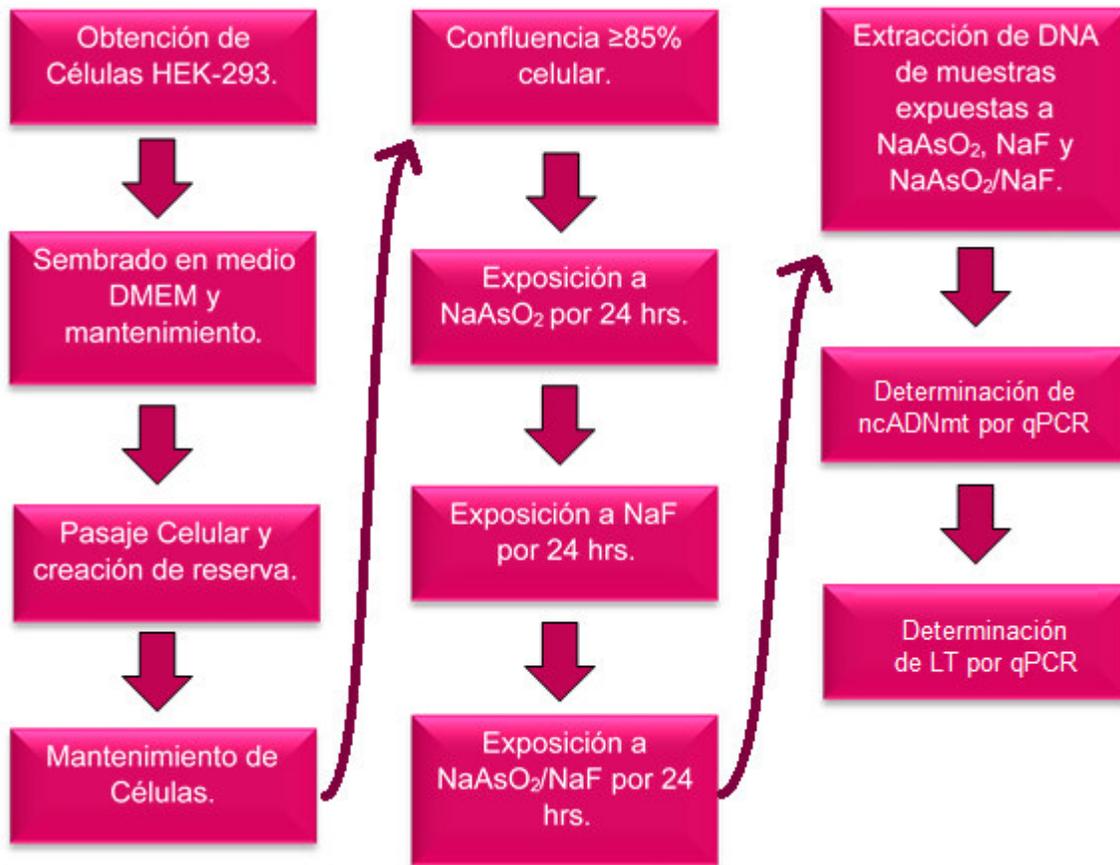


Fig. 4. Metodología General

Se obtuvo la línea celular HEK-293 descongelada y se procedió a cultivarlas en medio DMEM enriquecido con SBF al 10% en caja de Petri de 10 cm. Se incubaron a 37 °C a 5% de CO₂ y se mantuvieron hasta una confluencia menor a 1 x 10⁶ células/mL. Se les realizó cambio de medio cada 8 días.

Para mantener una confluencia adecuada se realizaron pasajes celulares (Fig. 5) cada 8 días y se creó una reserva celular de estas células por medio de congelación almacenadas en nitrógeno líquido. Las células HEK-293 pierden viabilidad al ser congeladas a -70 °C por un tiempo prolongado, por lo que se recomienda mantenerlas en nitrógeno líquido.

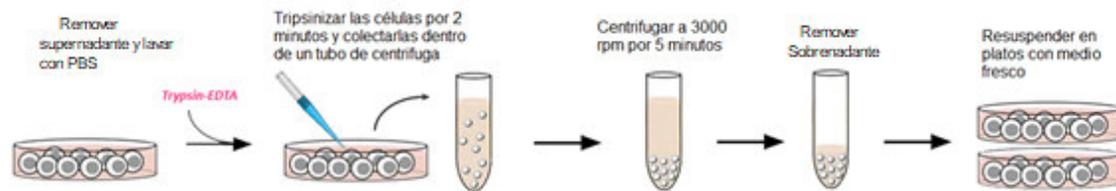


Fig. 5. Pasaje Celular. Modificado de <https://www.abmgood.com/Prigrow-Cryopreservation-Medium-TM024.html>

Cuando fue necesario extraer células para su uso, estas fueron descongeladas, sembradas e incubadas en medio nuevo en una caja de Petri de 10 cm.

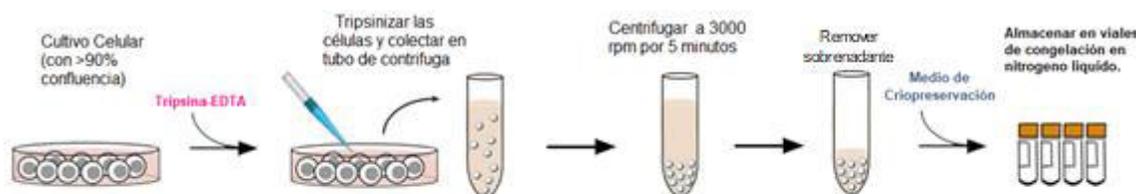


Fig. 6. Congelado Celular. Modificado de <https://www.abmgood.com/Trypsin-EDTA-TM050.html>

Se obtuvo una cantidad abundante de células para proceder a realizar los ensayos de viabilidad, no sobrepasando 1×10^6 células por ml.

Se hicieron soluciones de NaAsO_2 con una concentración de $0.5 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $1.5 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$, $2.5 \mu\text{M}$ y $3 \mu\text{M}$, las cuales se probaron inicialmente a 24 h por triplicado, para comprobar su viabilidad estas se analizaron con el ensayo MTT y se leyeron a 562 nm, generando una curva estándar dosis-respuesta.

Al igual se hicieron soluciones para NaF con una concentración de 10 mg/L, 15 mg/l, 20 mg/l, 25 mg/l, 30 mg/l, 35 mg/l y 40 mg/l, se probaron a 24 hrs por triplicado y se

evaluó su viabilidad por ensayo MTT, se leyeron a 562 nm. Se generó una curva dosis-respuesta.

El ensayo de viabilidad se realizó para los dos tipos de sales y una mezcla de ambas, por otro lado, se hizo uso de un antioxidante sintético la N-acetil cisteína (NAC), la cual se probó al mismo tiempo en una concentración de 15 mM sobre las células expuestas.

Se usaron sólo las concentraciones que no excedieran la LOAEL (lowest observed adverse effect level) para el resto del estudio, siendo estas para Metaarsenito de Sodio: 0.5 μ M, 1 μ M, 1.5 μ M y 2 μ M; y para Fluoruro de Sodio: 10 mg/l, 15 mg/l, 20 mg/l y 25 mg/l.

Se extrajo el ADN total de las células con los distintos tratamientos usando el kit de purificación The Wizard® Genomic de Promega y se cuantificó usando el NANODROP.

La estabilidad genómica se evaluó realizando qPCR, con la cuantificación del número de copias de ADN mitocondrial y la longitud telomérica.

6.2.2. Cultivo Celular

Obtenida la línea celular HEK293 se sembró en una caja de Petri de 10 cm estéril la cual contenía 10 ml de Medio DMEM enriquecido y se incubó a 37 °C con 5% de CO₂.

6.2.3. Pasaje Celular

Al observar en microscopio invertido una confluencia $\geq 85\%$ se realizó el primer pasaje celular (anexo 12.1.2.1). Las células se conservaron cambiando el medio y realizando pasajes para evitar una concentración celular mayor a 1×10^6 células/mL.

6.2.4. Congelado de células

Se seleccionó una caja con células y se realizó el procedimiento de congelado celular (anexo 12.1.2.2). Estas células sirvieron de reserva celular.

6.2.5. Ensayo de Viabilidad

Se realizaron ensayos de viabilidad para establecer las concentraciones de exposición a metaarsenito de sodio, a fluoruro de sodio y a una mezcla de ambos.

En placas de 96 pocillos de ELISA se sembró un volumen de 100 μL de células suspendidas en la concentración correspondiente (Metaarsenito de sodio: 0.5 μM , 1 μM , 1.5 μM , 2.0 μM , 2.5 μM y 3 μM y Fluoruro de Sodio: de 10 mg/L, 15 mg/l, 20 mg/l, 25 mg/l, 30 mg/l, 35 mg/l y 40 mg/l y una mezcla de ambas) y se expusieron durante 24 horas (12.1.2.4). Pasado el tiempo de exposición se adicionó 10 μL de Reactivo MTT a cada pocillo y se dejó reaccionar por 2 hrs a 37°C, posteriormente se retiró el medio con el reactivo y se agregó 100 ml de Reactivo solubilizante a cada pocillo y se dejó actuar por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación orbital, en algunos casos fue necesario pipetear suavemente para deshacer los cristales de formazán. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 562 nm en lector de ELISA IMARK BIO-RAD.

La viabilidad se describió como porcentaje, considerando a las células no tratadas con sales de arsénico y fluoruro como el 100% de viabilidad (células control).

A la par se probó en las células expuestas (Metaarsenito de sodio: 0.5 μM , 1 μM , 1.5 μM y 2 μM y Fluoruro de Sodio: 10 mg/l, 15 mg/l, 20 mg/l y 25 mg/l y una mezcla de ambas) a una concentración de 15 mM de N-acetil cisteína a los diferentes tratamientos. Se midió de igual forma la viabilidad celular.

6.2.5.1. Curva dosis-respuesta

Se generaron curvas dosis-respuesta de las diferentes concentraciones a los distintos tiempos de exposición.

6.2.6. Extracción de ADN

Se extrajo el ADN total de los diferentes tratamientos haciendo uso del kit de purificación The Wizard® Genomic de Promega siguiendo el protocolo establecido (anexo 12.1.2.6), después de exponer las células HEK293 a un gradiente de concentración de meta-arsenito de sodio, a otro de fluoruro de sodio y a un gradiente de ambos en concentraciones inversamente proporcionales (0.5 μM -25 mg/L, 1.0 μM -20 mg/L, 1.5 μM - 15 mg/L y 2.0 μM -10 mg/L arsénico-fluoruro respectivamente). La integridad del ADN se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1% (figura 6) (anexo 12.1.1.7; 12.1.3.1) y se midió espectrofotométricamente a 260 y 280 nm para determinar su calidad y ser cuantificado en el equipo NanoDrop™ 2000/2000c (anexo 12.1.3.2). Se realizaron alícuotas a una concentración final de 21 ng/ μL y se formó un pool con el conjunto de todas las muestras, llevándolo a la concentración de 50 ng/ μL (anexo 12.1.1.8).



Fig. 7. Electroforesis

6.2.7. Evaluación de Estabilidad Genómica

El número de copias de ADNmt y la longitud telomérica se determinaron de forma relativa por PCR en tiempo real. Se calculó la relación fragmento mitocondrial del gen ND1/fragmento del gen de beta-Globina (Mt/S), y fragmento telomérico/fragmento del gel beta-globina (T/S), a partir de la curva estándar obtenida de las diluciones seriadas de ADN de concentración conocida. Los cocientes Mt/S y T/S se calcularon para cada condición de concentración y tiempo de exposición en el cultivo, expresada como el valor de Cq derivado de la curva estándar. Para la mezcla de reacción se utilizaron 2 μL de SuperMix SsoFast

EvaGreen (Bio-Rad), 3 μ L de ADN (21 ng/ μ L) y oligonucleótidos a una concentración final de 400 nM para telómero y de 500 nM para el gen ND1 mitocondrial y el gen de beta-Globina.

La secuencia de oligos para telómero fue:

(F)	5'-ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT-3'
(R)	5'-TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA-3'

para el gen mitocondrial ND1 fue:

(F)	5'-CACCCAAGAACAGGGTTTGT-3'
(R)	5'-TGGCCATGGGTATGTTGTTA-3'

y para beta-Globina fue:

(F)	5'-GCTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC-3'
(R)	5'-CACCAACTTCATCCACGTTTACC 3'

Todas las reacciones se realizaron en el equipo CFX96 Touch Real-time PCR detection system (Bio-Rad), las condiciones de amplificación para la longitud telomérica fueron:

1 ciclo a 95°C por 15 seg; 1 ciclo a 49°C por 15 seg; 15 ciclos a 95°C por 15 seg; y cuatro ciclos subsecuentes a 49°C por 15 seg, 95°C por 75 seg, 62°C por 10 seg, y 74°C por 15 seg.

Las condiciones de amplificación para el gen mitocondrial ND1 y para el gen de beta-Globina fueron: 1 ciclo a 95°C por 3 min; 35 ciclos a 98°C por 15 seg; y 3 ciclos subsecuentes a 58°C por 60 seg, 95°C por 15 seg, 60°C por 15 seg, and 45°C por 15 seg.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se consideraron aceptables valores de desviación estándar iguales o menores a 0.25 y coeficientes de variación iguales o menores al 2% (Alegría-Torres et al., 2016).

6.2.8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se calcularon las medias y desviaciones estándar para cada tipo de variable. Se analizó mediante ANOVA y prueba post hoc Dunnet. Se compararon los resultados usando la prueba t-student. Para su análisis se hizo uso del programa Sigma Plot 12.0.

7. RESULTADOS

7.1. Cultivo de las Células HEK-293

Después de cultivar las células HEK-293 en medio DMEM por 24 horas, se observaron al microscopio óptico. La densidad celular en el cultivo se vio notablemente reducida al incubar las células por 24 horas con los compuestos citotóxicos en comparación con la densidad observada en las células control. (Fig. 8, 9 y 10).

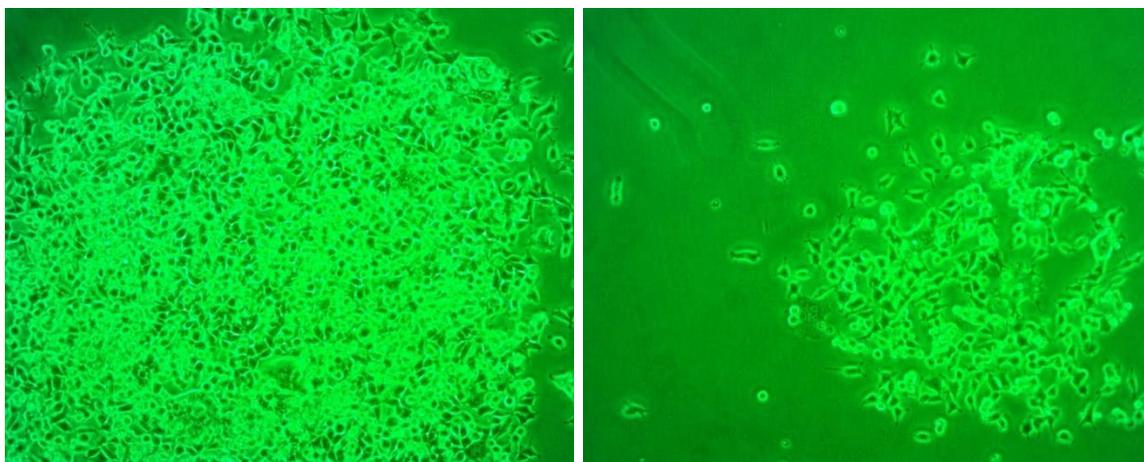


Fig. 8. Células HEK-293 en medio DMEM. Objetivo 20x

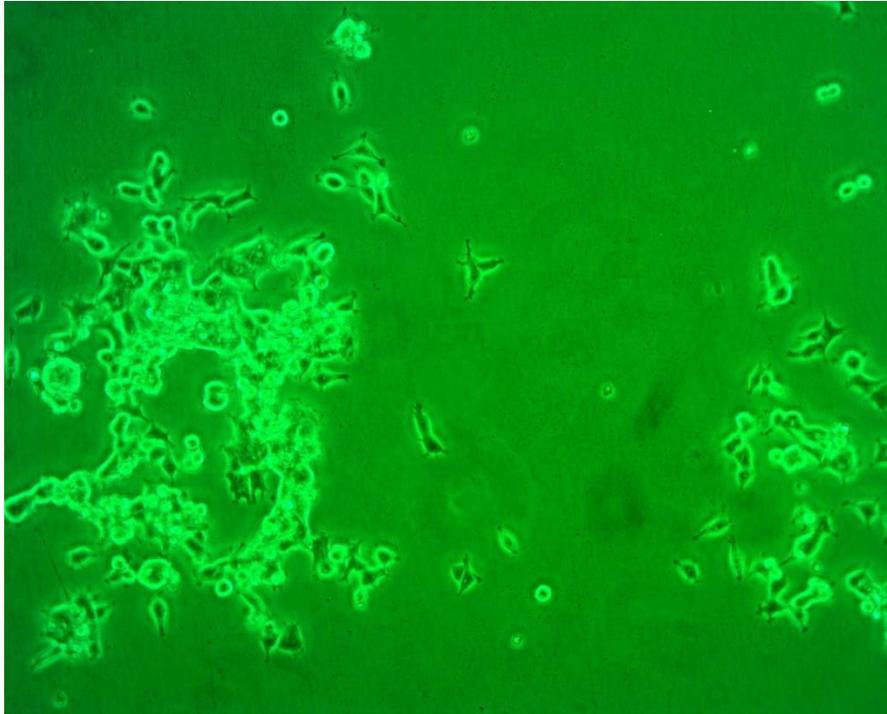


Fig. 9. Células HEK-293 en medio DMEM adicionado con 2.0 μ M de meta-arsenito de sodio por 24 horas. Objetivo 20x.

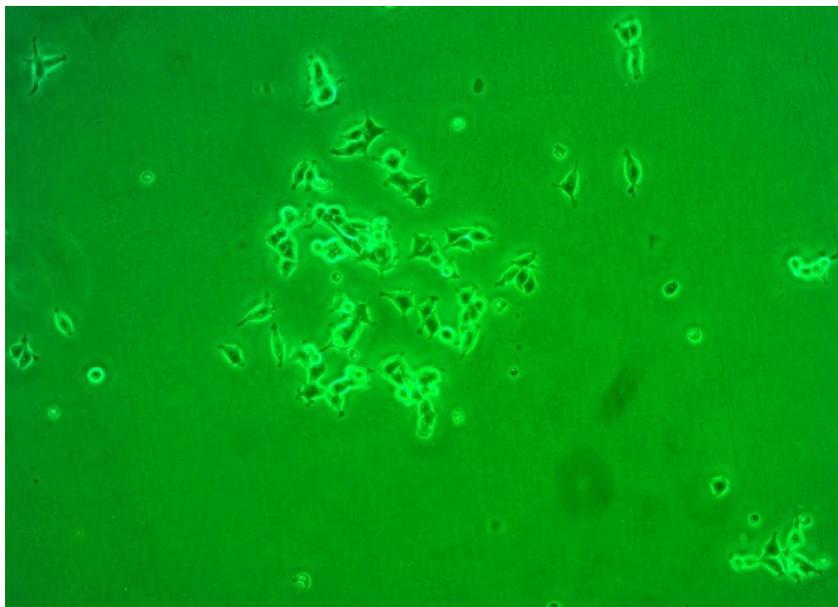


Fig. 10. Células HEK-293 en medio DMEM adicionado con 25 mg/L de fluoruro de sodio por 24 horas. Objetivo 20x.

7.2. Viabilidad Celular

Meta-arsenito de Sodio

Al incubar las células por 24 horas en presencia de meta-arsenito de sodio se observó una respuesta dependiente de la dosis, como se observa en la figura 11, presentándose una disminución gradual en la viabilidad de las células HEK-293 con dosis crecientes de meta-arsenito de sodio. En presencia de NAC se observó un efecto positivo que contrasta el citotóxico, pero sólo a la concentración más baja probada del meta-arsenito de sodio. (Figura 12).

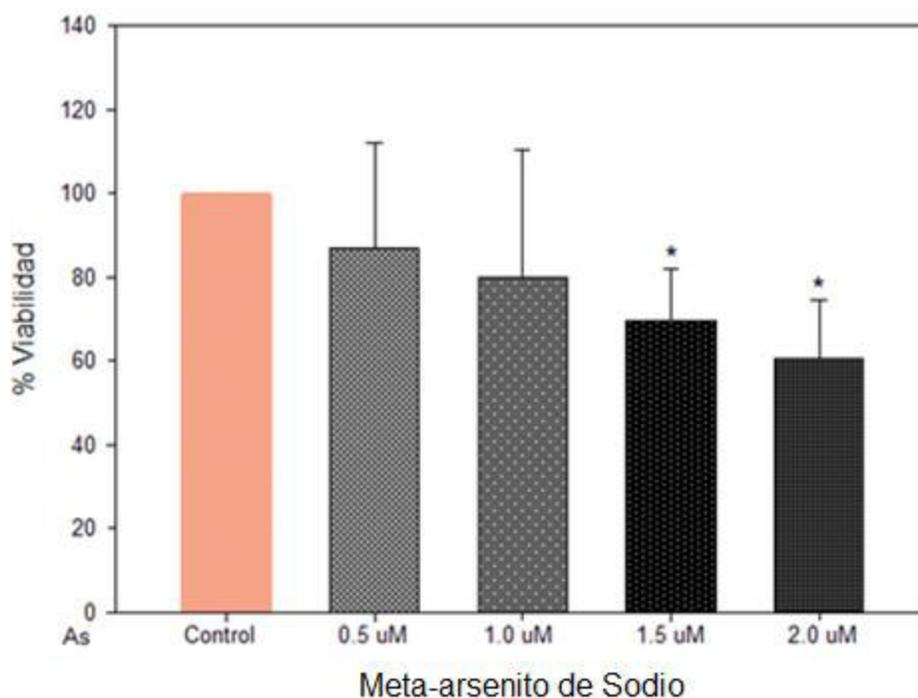


Fig. 11. Toxicidad del Metaarsenito de sodio en células HEK-293 a las 24 horas de exposición. Media \pm desviación estándar. $*(P < 0.05)$ con respecto al control.

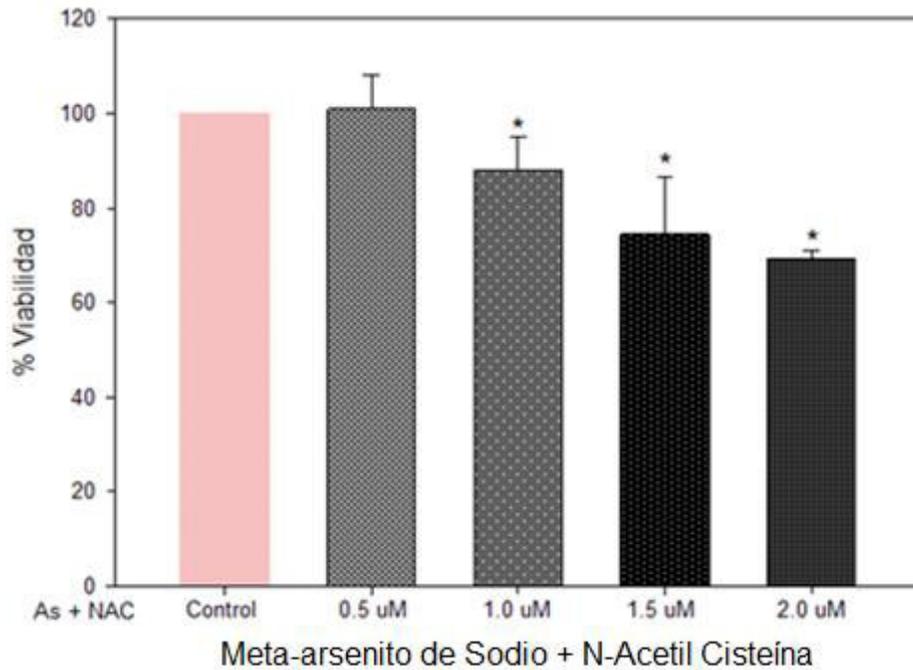


Fig. 12. Toxicidad del meta-arsenito de sodio en células HEK-293 a las 24 horas de exposición en presencia de NAC. Media \pm desviación estándar. * ($P < 0.05$) con respecto al control.

En la figura 13 se muestra una comparación de los tratamientos con arsenito de sodio en presencia y ausencia de NAC. Aunque hay una tendencia de recuperación en el porcentaje de células viables, esta diferencia no fue estadísticamente significativa para ninguna de las concentraciones probadas.

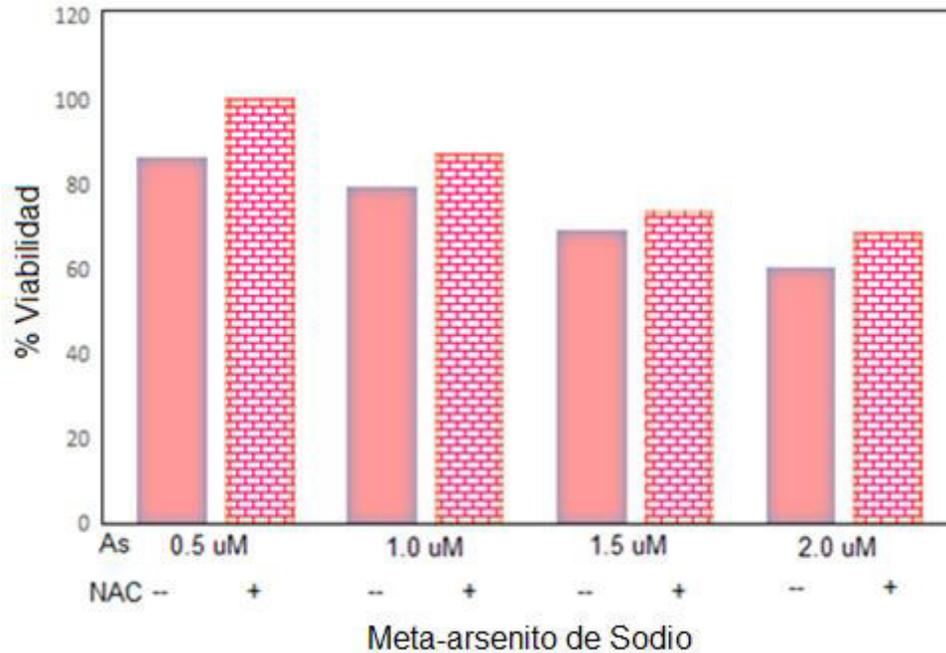


Fig. 13. Comparación de la viabilidad de las células HEK-293 con los tratamientos de meta-arsenito de sodio y N-Acetil cisteína.

Fluoruro de Sodio

En la figura 14, se puede observar el efecto del fluoruro de sodio sobre las células HEK-293 a las 24 horas de exposición observándose una tendencia de disminución en la viabilidad con dosis crecientes de fluoruro de sodio, pero siendo estadísticamente significativo este decremento solamente a la concentración de 25mg/L; el efecto antioxidante del NAC también mejoró la viabilidad celular, tal como se puede ver en la figura 15.

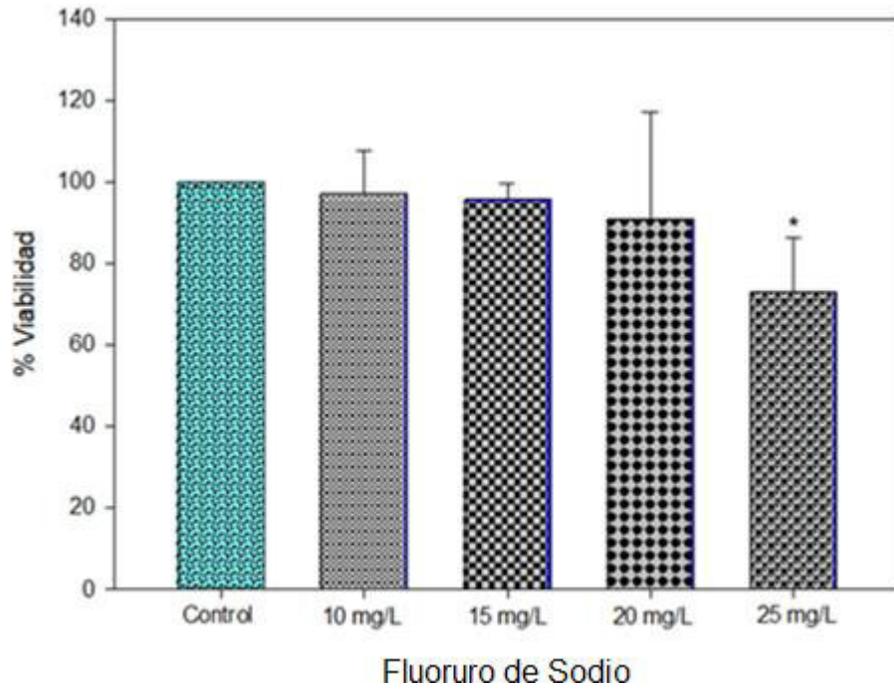


Fig. 14. Toxicidad del Fluoruro de sodio en células HEK-293 a las 24 horas de exposición. Media \pm desviación estándar. $*(P < 0.05)$ con respecto al control.

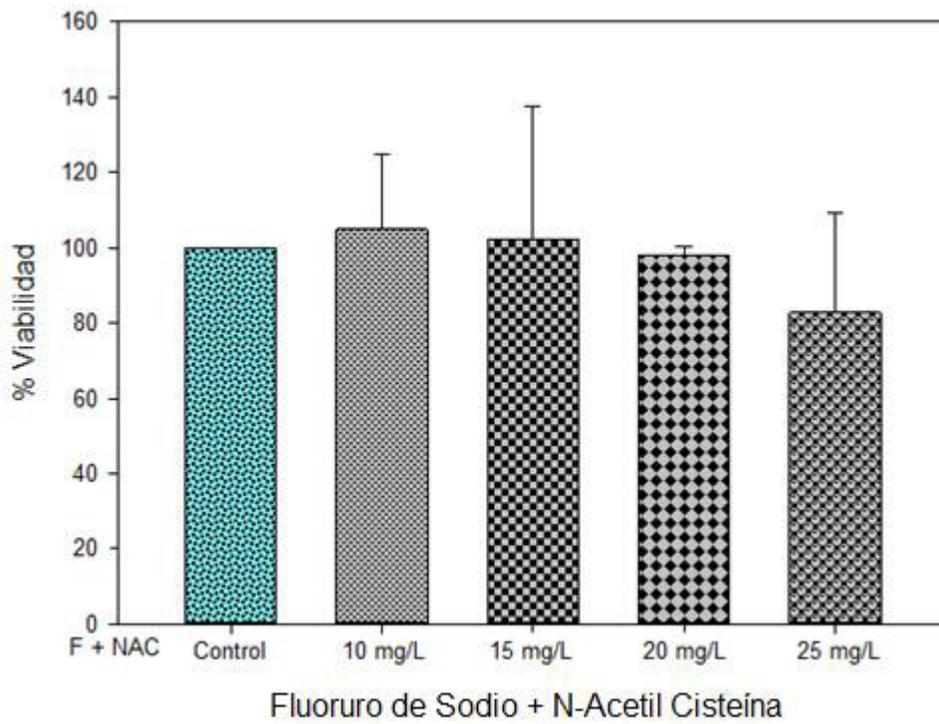


Fig.15. Toxicidad del fluoruro de sodio sobre las células HEK-293 a las 24 horas de exposición en presencia de NAC. Sin diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($P>0.05$).

En la figura 16 se compara la viabilidad de las células HEK-293 tratadas con fluoruro de sodio en presencia y ausencia de NAC.

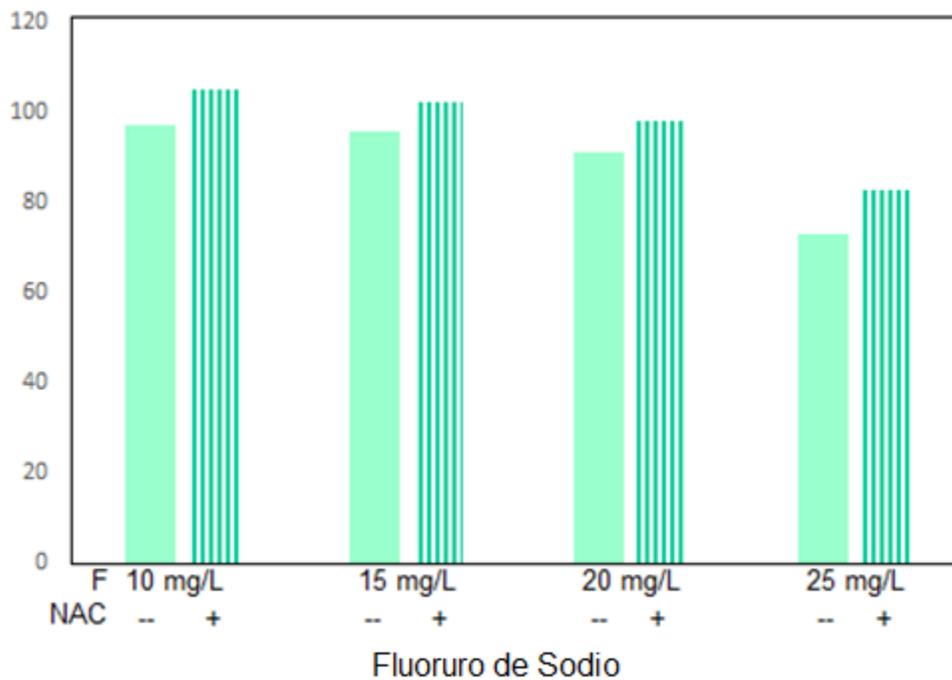


Fig. 16. Comparación de la viabilidad de las células HEK-293 con el tratamiento de fluoruro de sodio en presencia y ausencia de N-acetil cisteína. Sin diferencias estadísticamente significativas entre cada tratamiento en presencia y ausencia de NAC ($P>0.05$).

Co-exposición arsénico-fluoruro

La combinación de sales de arsénico y fluoruro sobre las células HEK-293 tiene un efecto citotóxico antagónico sobre la viabilidad celular; en altas concentraciones de arsénico y bajas de flúor se recupera la viabilidad.

Como se muestra en la figura 17, hay una disminución gradual en la viabilidad de las células HEK-293 en la co-exposición con dosis crecientes de metaarsenito de sodio y dosis decrecientes de fluoruro de sodio, pero este efecto se revierte a altas concentraciones de arsénico, pero bajas en flúor. En presencia de NAC favorece la viabilidad celular, tal como se puede ver en la figura 18.

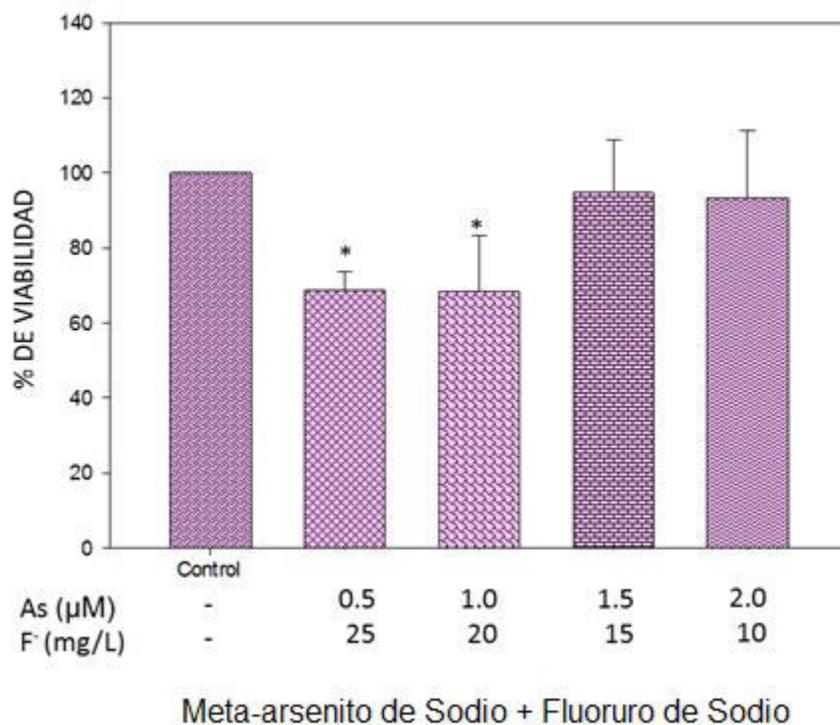
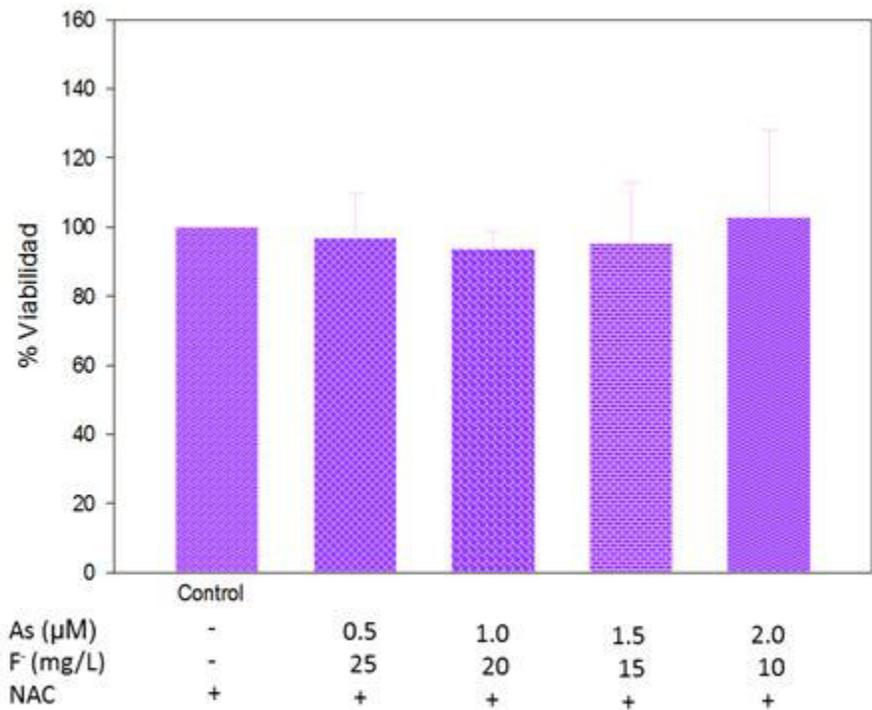


Fig. 17. Toxicidad del arsénico y el fluoruro en células HEK-293 a las 24 horas de exposición. Media \pm desviación estándar. $*(P < 0.05)$ con respecto al control



Meta-arsenito de Sodio + Fluoruro de Sodio + N-Acetil Cisteína

Fig. 18. Toxicidad de la co-exposición de arsénico y fluoruro en células HEK-293 a las 24 horas de exposición, en presencia de NAC. Media \pm desviación estándar. Sin diferencias estadísticamente significativas entre cada tratamiento en presencia de NAC ($P > 0.05$).

En la figura 19 se muestra una comparación de ambos tratamientos en presencia y ausencia de NAC, observándose una diferencia significativa en las concentraciones de 0.5 μM -25 mg/L y 1.0 μM -20 mg/L arsenito-fluoruro, con respecto a los tratamientos con el antioxidante.

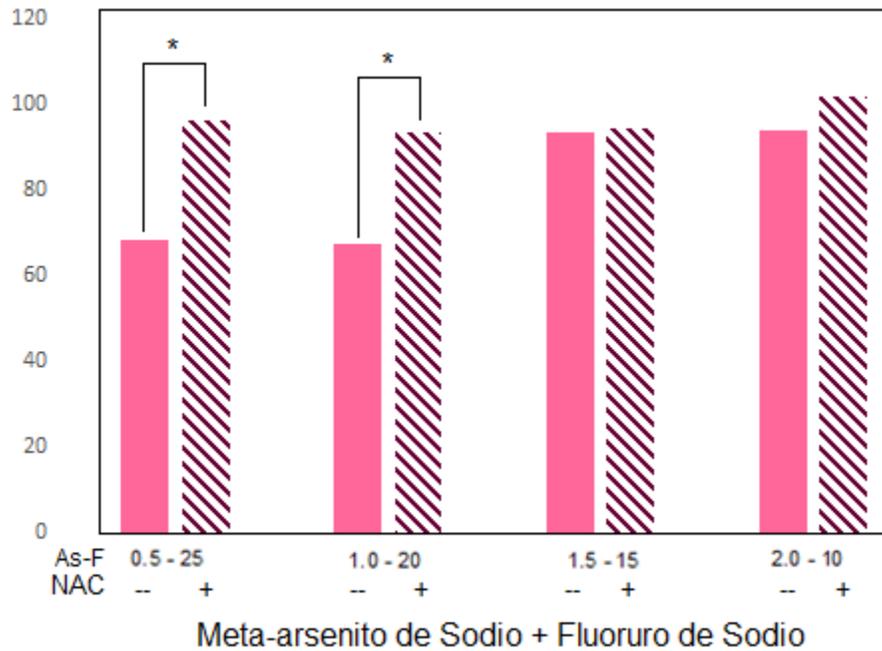


Fig. 19. Comparación de la viabilidad entre los tratamientos de co-exposición arsénico-fluoruro en presencia y ausencia de N-acetil cisteína. $*(P < 0.05)$.

7.3 Evaluación de la Estabilidad Genómica

Para evaluar la estabilidad genómica se realizó la amplificación de los fragmentos de mitocondria y telómero. En la figura 20 se muestra la curva de amplificación del fragmento para mitocondria, mientras que en la figura 21 se muestra la obtención de la recta para el fragmento de mitocondria con los respectivos parámetros que sirvieron como criterio de calidad, estos parámetros fueron: $E \leq 110\%$, $r^2 = 0.99$ y pendiente cercana a -3.2.

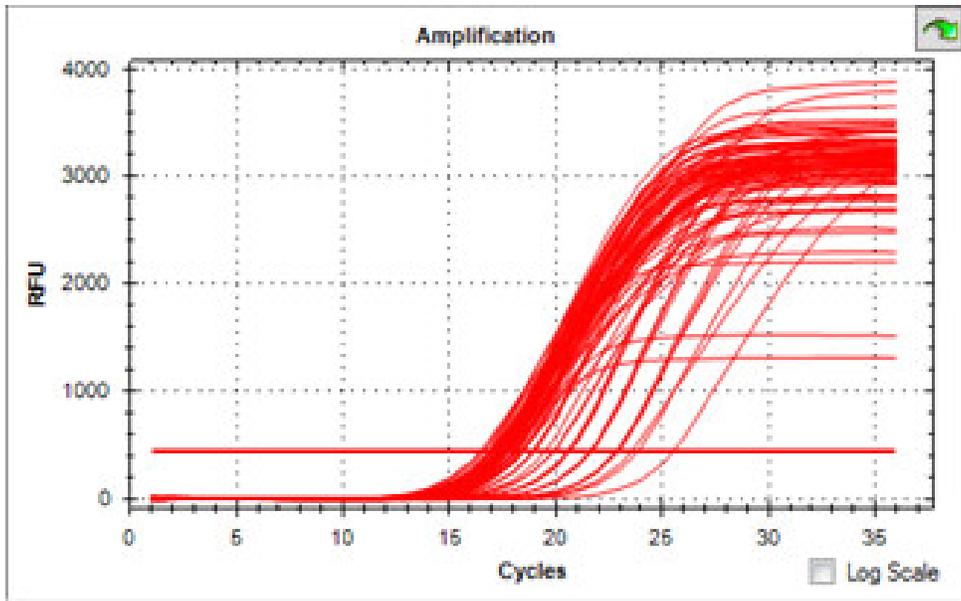


Fig. 20. Curva de amplificación del fragmento para mitocondria de células HEK-293 expuestas a arsénico y/o fluoruro por 24 horas.

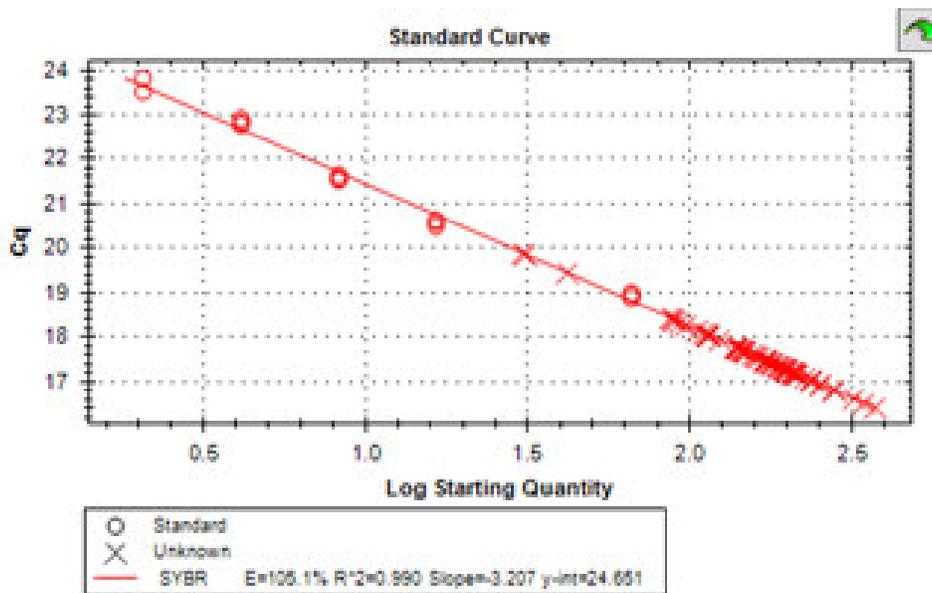


Fig. 21. Obtención de la recta del fragmento para mitocondria de células HEK-293 expuestas a arsénico y/o fluoruro por 24 horas.

Número de copias de ADN mitocondrial (mtDNAcn)

Como puede observarse en la figura 22, el número de copias de ADN mitocondrial se mantiene constante conforme se incrementa la concentración de meta-arsenito de sodio en las células HEK-293 a las 24 horas de exposición. Sin embargo, en presencia del antioxidante NAC se observa un incremento a la concentración más baja de arsenito (0.5 μ M) probada. Interesantemente, el mtDNAcn se ve reducido en presencia de NAC a la concentración de 1,5 μ M de meta-arsenito de sodio.

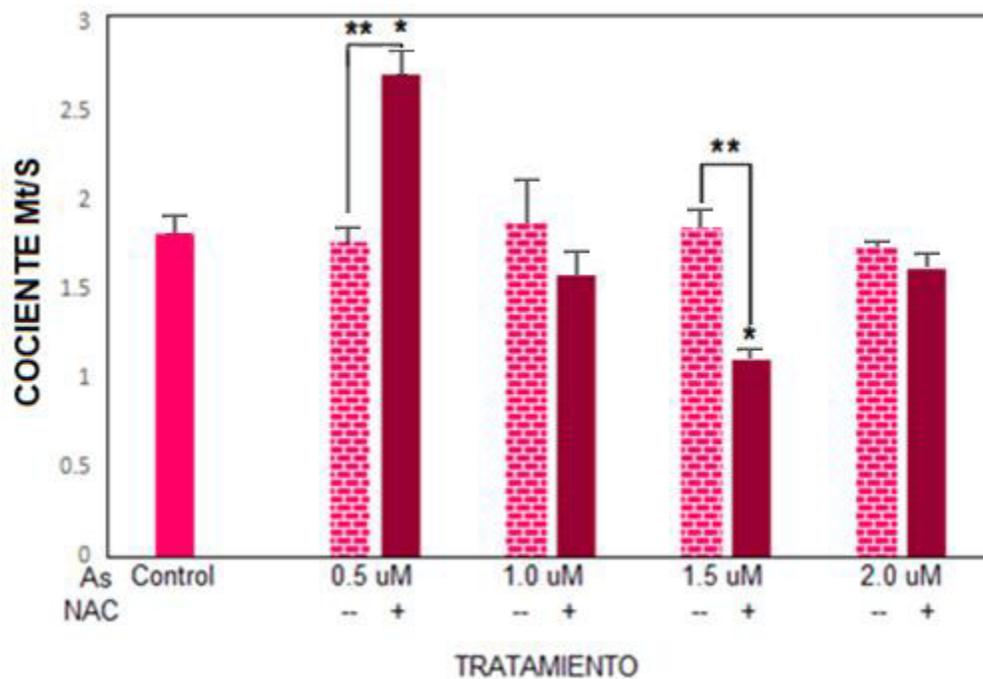


Fig. 22. Determinación relativa del número de copias de ADN mitocondrial en células HEK-293 expuestas a meta-arsenito de sodio por 24 horas en presencia y ausencia de N-acetil. *Significativamente diferente con respecto al control ($P < 0.05$; ANOVA). **Significativamente diferente ($P < 0.05$; t de student).

Por otro lado, al probar el fluoruro de sodio se observaron diferencias significativas en el número relativo de copias de ADN mitocondrial, el NAC incrementó el valor

relativo de copias a la concentración de fluoruro de sodio de 15 mg/L y 25 mg/L. Esto se puede apreciar en la figura 23.

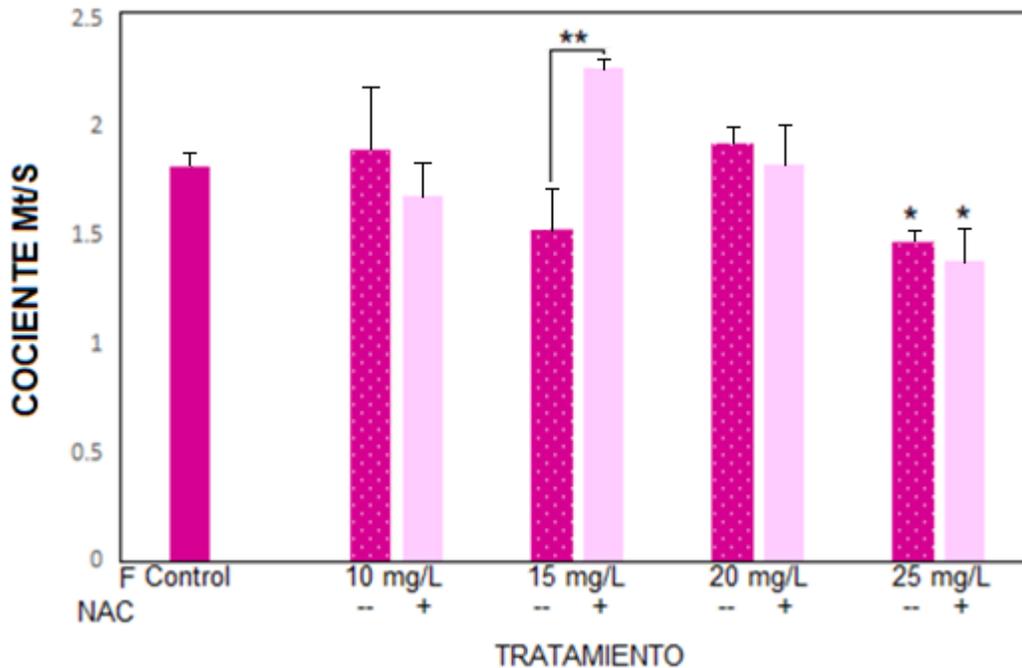


Fig. 23. Determinación relativa del número de copias de ADN mitocondrial en células HEK-293 expuestas a fluoruro de sodio en presencia y ausencia de N-acetil cisteína. *Significativamente diferente ($P < 0.05$ con respecto al control; ANOVA). ** Significativamente diferente ($P < 0.05$; t de student).

En lo que corresponde a la coexposición a arsénico y fluoruro se observa una reducción estadísticamente significativa en el cociente Mt/S en la combinación meta-arsenito 1.5 μM y fluoruro 15 mg/L, y este efecto se vio contrarrestado con el antioxidante NAC, tal como se observa en la figura 24.

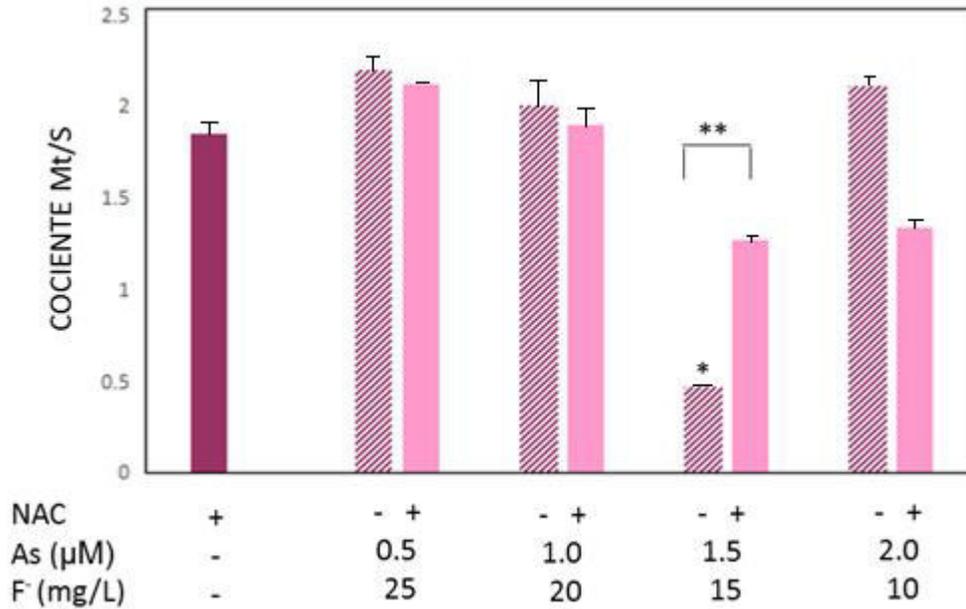


Fig. 24. Determinación relativa del número de copias de ADN mitocondrial en células HEK-293 co-expuestas a meta-arsenito de sodio y fluoruro de sodio en presencia y ausencia de N-acetil. *Significativamente diferente ($P < 0.05$ con respecto al control; ANOVA). ** ($P < 0.05$; t de student).

Longitud Telomérica

Respecto a la longitud telomérica, solamente se obtuvieron resultados de la coexposición a arsénico y fluoruro a las concentraciones de 0.5 y 1.5 μM de meta-arsenito de sodio y de 15 y 25 mg/L de fluoruro de sodio, en presencia y ausencia de NAC. En este caso se observó un aparente incremento con arsénico a 0.5 μM combinado con 25 mg/L de fluoruro de sodio y sin NAC, pero este resultado no fue estadísticamente significativo (figura 25).

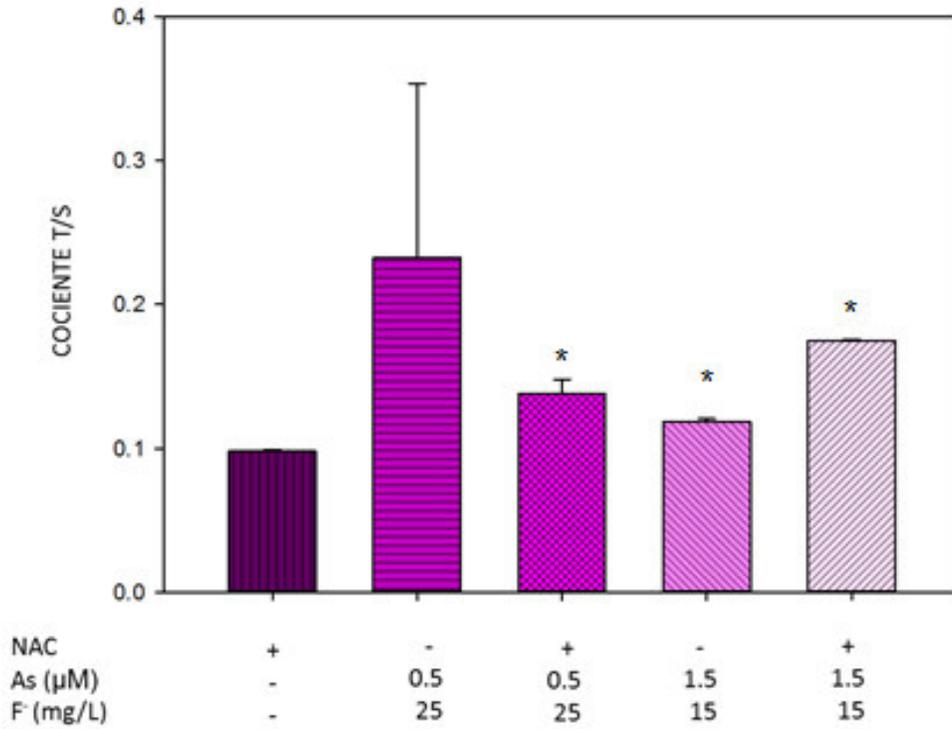


Fig. 25. Determinación de la longitud telomérica en células HEK-293 co-expuestas por 24 horas a meta-arsenito de sodio y fluoruro de sodio en presencia y ausencia de N-acetil. *Significativamente diferente ($P < 0.05$ del grupo de control; ANOVA).

8. DISCUSIÓN

La citotoxicidad puede ser definida como la capacidad de un compuesto químico para generar daño celular, independientemente del mecanismo. Se ha reportado previamente que tanto el arsénico como el fluoruro tienen propiedades citotóxicas *in vitro* (Yedjou & Tchounwou, 2007; Kim et al., 2014; MENG et al., 2013), tal como se comprobó con los ensayos realizados en este estudio en donde tanto el arsénico como el fluoruro redujeron la viabilidad celular dependiente de la concentración a un corto tiempo de exposición (24 horas).

El meta-arsenito de sodio redujo la viabilidad celular a un nivel estadísticamente significativo a partir de la concentración de 1.5 μM , mientras que la de fluoruro la redujo a una concentración de 25 mg/L con respecto al control (100% de viabilidad). Sin embargo, en presencia del antioxidante N-acetil cisteína se apreció una recuperación de la viabilidad celular al exponerlas a los compuestos citotóxicos, aunque sin igualar los niveles del control. Por estos resultados podemos sugerir que el mecanismo de citotoxicidad es mediante la generación de estrés oxidativo, ya que las células expuestas a los compuestos citotóxicos al estar en presencia de una sustancia antioxidante, como el N-acetil cisteína, se ven protegidas. Este mecanismo ya ha sido reportado, por ejemplo, en células de cáncer de próstata humano (LNCaP y CWR22RV1) y glóbulos rojos, el meta-arsenito de sodio incrementa el estrés oxidativo, mientras que en células de osteosarcoma humano y osteoblastos de ratón el fluoruro de sodio tiene este mismo efecto de estrés oxidativo sobre estas células (Wang et al., 2011; Kim et al., 2014; Gandhi, Naoghare, Bafana, Kannan & Sivanesan, 2016; Maheshwari, Khan & Mahmood, 2017).

Con respecto a la coexposición arsénico-fluoruro, se observó que el arsénico tuvo un efecto inhibitorio del crecimiento celular a partir de 0.5 μM ; sin embargo, este efecto fue contrarrestado por el fluoruro a las concentraciones de 15 y 10 mg/L. Este efecto antagónico ya se ha observado, en células mononucleares de sangre periférica, así como en ratones (Mittal y Flora, 2006; Flora et al., 2009; Flora et al.,

2012; Estrada-Capetillo et al., 2014; Ma et al., 2017). Con la presencia del antioxidante NAC se observó una inhibición de la citotoxicidad la cual fue estadísticamente significativa, en las concentraciones de 0.5 μ M-25 mg/L y 1.0 μ M-20 mg/L arsénico-fluoruro, las que muestran un mayor efecto sobre la viabilidad celular de manera significativa.

En cuanto a la evaluación de los efectos, en este estudio se analizó la genotoxicidad e inestabilidad genómica por estrés oxidativo, realizando dos determinaciones, el número relativo de copias de ADN mitocondrial y la longitud telomérica, considerando que tanto el arsénico como el fluoruro dañan al ADN mediante varios mecanismos, entre los cuales tenemos producción de especies reactivas de oxígeno en exceso, como aniones superóxido (O_2^\bullet) y radicales hidroxilo, peroxidación lipídica, la cual eleva los niveles de malondialdehído, activación de la cascada de caspasas (3 y 9) y estrés del retículo endoplásmico. Estos mecanismos pueden causar alteración en el número de copias de ADN mitocondrial, aberraciones cromosómicas, aneuploidía, mutaciones por delección, formación de micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas. (Singh, Kumari, Treas & DuMond et. al 2011; Suzuki, Bandoski & Bartlett et. al 2015; Kumar, Lalit & Thakur et al 2015; Ribeiro et al., 2017).

Las mitocondrias son los organelos que generan la energía celular por medio de la cadena transportadora de electrones lo cual la vuelve una fuente rica de especies reactivas de oxígeno (ERO). Esto sugiere un mecanismo potencial para la genotoxicidad causada por arsénico y el fluoruro, un aumento de las ERO intracelular lleva a una posterior inducción de especies reactivas de nitrógeno y esto a su vez a un mayor potencial mutagénico al ADN. El ADN mitocondrial (ADN mt) es extra-nuclear, el cual carece de histonas, posee un sistema de reparación susceptible a varios errores y se encuentra en un ambiente con alto contenido mutagénico, lo que lleva a ser más susceptible a acumular daño en su estructura en comparación con el ADN nuclear (ADNn); un aumento en la carga de ERO inducida por la exposición al arsénico y fluoruro llevaría a una disminución del número de copias de ADNmt, pérdida de la integridad molecular y una alta tasa de mutaciones

deletéreas, el cual está asociado con el desarrollo de tumores. (Suzuki, Bandoski & Bartlett, 2015, Partridge, Huang, Hernandez-Rosa, Davidson & Hei, 2007).

En este trabajo se encontró que al exponer las células HEK-293 a meta-arsenito de sodio a diferentes concentraciones por 24 horas, no se observó un efecto sobre el cociente Mt/S, el cual es un valor relativo para estimar el número de copias de ADN mitocondrial; sin embargo, en las concentraciones de 0.5 y 1.5 μM en presencia de NAC se pudo observar un incremento en el ncADNmt, demostrando el efecto protector antioxidante de esta sustancia.

El cociente Mt/S fue estadísticamente diferente cuando las células HEK-293 se expusieron a fluoruro de sodio en presencia y ausencia de NAC. A las concentraciones de 15 y 25 mg/L de fluoruro, se observó un incremento en el ncADNmt, siendo mayor el número de copias de ADNmt en presencia de NAC, lo que demuestra el efecto protector de esta sustancia.

En la coexposición de arsénico-fluoruro se obtuvo un efecto significativo al observarse un decremento marcado en el cociente Mt/S en la combinación meta-arsenito 1.5 μM y fluoruro 15 mg/L, y este efecto se ve contrarrestado con la presencia del antioxidante NAC, sugiriendo un daño al ADN mitocondrial por estrés oxidativo inducido por la exposición a arsénico y fluoruro y el efecto protector del antioxidante NAC.

En cuanto a la medición de la longitud de los telómeros, éste se considera como un biomarcador potencial del envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad. Diferentes estudios de cohortes han reportado que el alargamiento telomérico se asocia con un mayor riesgo para desarrollar diferentes cánceres, tales como: melanoma, carcinoma de células basales (BCC), cáncer de pulmón, gliomas, linfoma y neoplasias de vejiga (Srinivas et al., 2018).

En cuanto a este estudio, a pesar de que por limitaciones técnicas no fue posible evaluar el efecto del arsénico y el fluoruro por separado sobre la longitud telomérica, se analizó el efecto combinado de arsénico y fluoruro a las 24 horas de exposición sobre las células HEK-293 en presencia y ausencia de NAC, pero utilizando

solamente concentraciones de 1.0 μM -20 mg/L, 1.5 μM -15 mg/L y 2.0-10 mg/L de As-F, observando un incremento en la longitud telomérica de forma significativa; sin embargo, este efecto se vio inhibido con la presencia del antioxidante N-acetil cisteína.

El arsénico ha demostrado ser genotóxico en diversos estudios, pero solo hay pocos estudios que aborden la influencia del arsénico en el ncADNmt y la longitud telomérica. En células híbridas de hámster-humano AL y células CHOK1 se reportó la alteración de la función mitocondrial, esto al disminuir la función del citocromo c oxidasa, lo cual se correlaciona con la disminución del número de copias de ADNmt (Partridge, Huang, Hernandez-Rosa, Davidson & Hei, 2007). En un estudio *in vivo*, realizado a la población de los Andes y Chaco, se reportó un aumento en el número de copias de ADN mitocondrial y en la longitud telomérica, esto a altas concentraciones de arsénico ($\sim 200 \mu\text{g/L}$) (Ameer et al., 2016).

Los efectos genotóxicos del fluoruro en diferentes tejidos no ha sido extensamente investigado y existe poca evidencia acerca de la influencia de este sobre el ncADNmt. Un estudio realizado en ratones determinó que a altas dosis de fluoruro de sodio (100 mg/L) se aumentó significativamente el número de copias de ADN mitocondrial (Sun, Xue, Zhang, Niu & Wang, 2017).

Aunque, hay pocos informes que sugieran los efectos de la exposición individual al arsénico o el fluoruro sobre el daño al ADN; se sabe relativamente poco sobre los efectos de su exposición combinada de estos sobre diversos tejidos. Los resultados de estos estudios señalan un aparente antagonismo en la coexposición a arsénico-fluoruro, se encontró que la exposición concomitante de estos disminuye la concentración de arsénico o fluoruro en la sangre y los tejidos blandos, lo que sugiere cierto antagonismo entre ellos (Flora, Mittal & Mishra, 2009; Flora, Mittal, Pachauri & Dwivedi, 2012).

El arsénico y el flúor se han reconocido a nivel mundial como importantes contaminantes ambientales del agua potable y una amenaza para la salud. Tanto el arsénico como el fluoruro se están ampliamente estudiando individualmente por sus efectos tóxicos y las implicaciones a la salud en la exposición aguda y crónica. Sin

embargo, pocos informes recientes muestran que el envenenamiento por fluoruro y arsénico coexiste en ciertas áreas del mundo.

La co-exposición del arsénico y fluoruro es frecuente en el agua potable de muchas regiones del mundo, muchos pozos excavados en esta área tienen una gran cantidad de fluoruro y arsénico, por lo que existe una urgencia por descubrir el efecto de su exposición combinada en los órganos principales, siendo el riñón uno de los más importantes por ser la principal vía de eliminación de estos compuestos.

9. CONCLUSIÓN

El metaarsenito de sodio y el fluoruro de sodio son citotóxicos sobre las células HEK-293 de forma dependiente de la concentración, a las 24 de exposición, de forma separada, así como combinados. Este efecto citotóxico fue contrarrestado en presencia de 15 mM de NAC, lo cual demuestra que el efecto citotóxico de ambos es por estrés oxidativo.

Aunque el número de copias relativas de ADNmt y la longitud telomérica, en las células HEK-293 no fue estadísticamente significativa con respecto al control cuando se probaron meta-arsenito de sodio y fluoruro de sodio solos y combinados, sí se observó un aumento de estos parámetros en presencia de NAC, lo cual permite sugerir que el impacto sobre el genoma nuclear y mitocondrial puede ocurrir por estrés oxidativo.

10. PERSPECTIVAS

El presente estudio representó una primera aproximación de la coexposición a arsénico y fluoruro en un ensayo *in vitro* utilizando el número de copias de ADN mitocondrial y de la longitud telomérica como biomarcadores de estabilidad genómica. Por lo que es necesario analizar posteriormente los mismos ensayos a un mayor tiempo de exposición, por ejemplo 48 y 72 horas, para evaluar de este modo los efectos que ejercen sobre la línea celular HEK-293 de manera dependiente del tiempo y generar mayor evidencia de los efectos generados por la co-exposición del arsénico y el fluoruro.

De la misma manera, es necesario ampliar las muestras de estudio para el ensayo de longitud telomérica, enfocándonos en el fluoruro, dado que de este no existe evidencia de su evaluación.

11. REFERENCIAS

1. Akram, Z., Jalali, S., Shami, S., Ahmad, L., Batool, S., & Kalsoom, O. (2009). Genotoxicity of sodium arsenite and DNA fragmentation in ovarian cells of rat. *Toxicology Letters*, 190(1), 81-85. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.07.003
2. Alarcón Herrera, M., Leal Quezada, L., Martín Domínguez, I., Miranda Navarro, S., & Benavides Montoya, A. (2013). *Arsénico en Agua* (1st ed., pp. 10-17). México: CIMAV.
3. Alarcón-Herrera, M., Bundschuh, J., Nath, B., Nicolli, H., Gutierrez, M., & Reyes-Gomez, V. et al. (2013). Co-occurrence of arsenic and fluoride in groundwater of semi-arid regions in Latin America: Genesis, mobility and remediation. *Journal Of Hazardous Materials*, 262, 960-969. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.08.005
4. Alegría-Torres, J., Carrizales-Yáñez, L., Díaz-Barriga, F., Rosso-Camacho, F., Motta, V., Tarantini, L., & Bollati, V. (2016). DNA methylation changes in Mexican children exposed to arsenic from two historic mining areas in San Luis potosí. *Environmental And Molecular Mutagenesis*, 57(9), 717-723. doi: 10.1002/em.22062
5. Ali, D., Alkahtani, S., Siddiqui, M., Alarifi, S., & Ali, B. (2013). Arsenic trioxide-mediated oxidative stress and genotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncotargets And Therapy*, 6, 75-84. doi: 10.2147/ott.s38227
6. Ameer, S., Xu, Y., Engström, K., Li, H., Tallving, P., & Nermell, B. et al. (2016). Exposure to Inorganic Arsenic Is Associated with Increased Mitochondrial DNA Copy Number and Longer Telomere Length in Peripheral Blood. *Frontiers In Cell And Developmental Biology*, 4. doi: 10.3389/fcell.2016.00087
7. Armienta, M., & Segovia, N. (2008). Arsenic and fluoride in the groundwater of Mexico. *Environmental Geochemistry and Health*, 30(4), 345-353. doi: 10.1007/s10653-008-9167-8

8. OMS. Arsenic in drinking-water. (2018). Retrieved from http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/arsenic.pdf?ua=1
9. Arroyo, Y., Muñoz, A., Barrientos, E., Huerta, I., Wrobel, K., & Wrobel, K. (2013). Natural Decrease of Dissolved Arsenic in a Small Stream Receiving Drainages of Abandoned Silver Mines in Guanajuato, Mexico. *Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology*, 91(5), 539-544. doi: 10.1007/s00128-013-1091-7
10. ATSDR, E. (2018). Resumen de Salud Pública: Arsénico (Arsenic) | PHS | ATSDR. Retrieved from https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs2.html
11. ATSDR, E. (2018). Resumen de Salud Pública: Fluoruros, fluoruro de hidrógeno y flúor (Fluorides, Hydrogen Fluoride and Fluorine) | PHA | ATSDR. Retrieved from https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs11.html
12. Birkle, P., & Merkel, B. (2000). Environmental Impact by Spill of Geothermal Fluids at the Geothermal Field of Los Azufres, Michoacán, Mexico. *Water, Air, And Soil Pollution*, 124(3-4), 371-410.
13. Borghini, A., Faita, F., Mercuri, A., Minichilli, F., Bustaffa, E., Bianchi, F., & Andreassi, M. (2016). Arsenic exposure, genetic susceptibility and leukocyte telomere length in an Italian young adult population. *Mutagenesis*, 31(5), 539-546. doi: 10.1093/mutage/gew017
14. Brocato, J., & Costa, M. (2015). 10th NTES conference: Nickel and arsenic compounds alter the epigenome of peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31, 209–213.
15. Bundschuh, J., Bhattacharya, P., & Chandrasekharam, D. (2004). *Natural Arsenic in Groundwater* (1st ed., p. 8). Londres: CRC Press.

16. Buzalaf M.A., Whitford G.M. (2011). Fluoride metabolism. *Monographs in Oral Science*, pp. 20-36, 10.1159/000325107
17. Cardenas, A., Koestler, D., Houseman, E., Jackson, B., Kile, M., Karagas, M., & Marsit, C. (2015). Differential DNA methylation in umbilical cord blood of infants exposed to mercury and arsenic in utero. *Epigenetics*, 10(6), 508-515. doi: 10.1080/15592294.2015.1046026
18. Cebrian, M., Albores, A., Aguilar, M., & Blakely, E. (1983). Chronic Arsenic Poisoning in the North of Mexico. *Human Toxicology*, 2(1), 121-133. doi: 10.1177/096032718300200110
19. Chung, J., Yu, S., & Hong, Y. (2014). Environmental Source of Arsenic Exposure. *Journal Of Preventive Medicine And Public Health*, 47(5), 253-257. doi: 10.3961/jpmph.14.036
20. Chouhan, S., & Flora, S. (2010). Arsenic and Fluoride: Two major ground water pollutants. *Indian Journal Of Experimental Biology*, 48, 666-678.
21. del Carmen, A., Javier, d., & Aline, C. (2016). Dental fluorosis, fluoride in urine, and nutritional status in adolescent students living in the rural areas of Guanajuato, Mexico. *Journal Of International Society Of Preventive And Community Dentistry*, 6(6), 517. doi: 10.4103/2231-0762.195510
22. Del Razo, L. M., Corona, J. C., García-Vargas, G., Albores, A., & Cebrián, M. E. (1993). Fluoride levels in well-water from a chronic arsenic area of northern Mexico. *Environmental Pollution*, 80, 91–94.
23. DenBesten, P., & Li, W. (2011). Chronic Fluoride Toxicity: Dental Fluorosis. *Monographs In Oral Science*, 22, 81-96. doi: 10.1159/000327028
24. Deng, H., Kuang, P., Cui, H., Chen, L., Luo, Q., & Fang, J. et al. (2016). Sodium fluoride (NaF) induces the splenic apo-ptosis via endoplasmic reticulum (ER)

stress pathway in vivo and in vitro. *Aging* (Albany NY), 8(12), 3552–3567. doi: 10.18632/aging.101150

25. Drobna, Z., Styblo, M., & Thomas, D. (2009). An Overview of Arsenic Metabolism and Toxicity. *Current Protocols In Toxicology*. doi: 10.1002/0471140856.tx0431s42
26. Estrada-Capetillo, B., Ortiz-Pérez, M., Salgado-Bustamante, M., Calderón-Aranda, E., Rodríguez-Pinal, C., & Reynaga-Hernández, E. et al. (2014). Arsenic and fluoride co-exposure affects the expression of apoptotic and inflammatory genes and proteins in mononuclear cells from children. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, 761, 27-34. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.01.006
27. Farooqi, A., Masuda, H., Siddiqui, R., & Naseem, M. (2009). Sources of Arsenic and Fluoride in Highly Contaminated Soils Causing Groundwater Contamination in Punjab, Pakistan. *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*, 56(4), 693-706. doi: 10.1007/s00244-008-9239-x
28. Ferrario, D., Collotta, A., Carfi, M., Bowe, G., Vahter, M., Hartung, T., & Gribaldo, L. (2009). Arsenic induces telomerase expression and maintains telomere length in human cord blood cells. *Toxicology*, 260(1-3), 132-141. doi: 10.1016/j.tox.2009.03.019
29. Flora, S., Mittal, M., & Mishra, D. (2009). Co-exposure to arsenic and fluoride on oxidative stress, glutathione linked enzymes, biogenic amines and DNA damage in mouse brain. *Journal Of The Neurological Sciences*, 285(1-2), 198-205. doi: 10.1016/j.jns.2009.07.001
30. Flora, S., Mittal, M., Pachauri, V., & Dwivedi, N. (2012). A possible mechanism for combined arsenic and fluoride induced cellular and DNA damage in mice. *Metallomics*, 4(1), 78-90. doi: 10.1039/c1mt00118c
31. Flora, S. (2015). *Handbook of arsenic toxicology* (pp. 1-49) (pp. 137-169). London: Academic Press, an imprint of Elsevier Science.

32. Gandhi, D., Naoghare, P., Bafana, A., Kannan, K., & Sivanesan, S. (2016). Fluoride-Induced Oxidative and Inflammatory Stress in Osteosarcoma Cells: Does It Affect Bone Development Pathway?. *Biological Trace Element Research*, 175(1), 103-111. doi: 10.1007/s12011-016-0756-6
33. Gao, J., Roy, S., Tong, L., Argos, M., Jasmine, F., & Rahaman, R. et al. (2015). Arsenic exposure, telomere length, and expression of telomere-related genes among Bangladeshi individuals. *Environmental Research*, 136, 462-469. doi: 10.1016/j.envres.2014.09.040
34. García-Pérez, A., Irigoyen-Camacho, M., & Borges-Yáñez, A. (2013). Fluorosis and Dental Caries in Mexican Schoolchildren Residing in Areas with Different Water Fluoride Concentrations and Receiving Fluoridated Salt. *Caries Research*, 47(4), 299-308. doi: 10.1159/000346616
35. González-Horta, C., Ballinas-Casarrubias, L., Sánchez-Ramírez, B., Ishida, M., Barrera-Hernández, A., & Gutiérrez-Torres, D. et al. (2015). A Concurrent Exposure to Arsenic and Fluoride from Drinking Water in Chihuahua, Mexico. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 12(5), 4587-4601. doi: 10.3390/ijerph120504587
36. González-Partida, E., Hinojosa, T. E., & Verma, M. P. (2001). Interacción agua geotérmica-manantiales en el campo geotérmico de Los Humeros, Puebla, México. *Ingeniería Hidráulica en México*, XVI, 185–194.
37. Irigoyen-Camacho, M., García Pérez, A., Mejía González, A., & Huizar Alvarez, R. (2016). Nutritional status and dental fluorosis among schoolchildren in communities with different drinking water fluoride concentrations in a central region in Mexico. *Science Of The Total Environment*, 541, 512-519. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.09.085
38. J, M., Sinha, S., Ghosh, M., & Mukherjee, A. (2013). Evaluation of multi-endpoint assay to detect genotoxicity and oxidative stress in mice exposed to

sodium fluoride. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, 751(1), 59-65. doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.11.006

39. Jarquín-Yañez, L., Mejía-Saavedra, J., Molina-Frechero, N., Gaona, E., Rocha-Amador, D., López-Guzmán, O., & Bologna-Molina, R. (2015). Association between Urine Fluoride and Dental Fluorosis as a Toxicity Factor in a Rural Community in the State of San Luis Potosi. *The Scientific World Journal*, 2015, 1-5. doi: 10.1155/2015/647184
40. Jha, S., Singh, R., Damodaran, T., Mishra, V., Sharma, D., & Rai, D. (2013). Fluoride in Groundwater: Toxicological Exposure and Remedies. *Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part B*, 16(1), 52-66. doi: 10.1080/10937404.2013.769420
41. Jiang, S., Su, J., Yao, S., Zhang, Y., Cao, F., & Wang, F. et al. (2014). Fluoride and Arsenic Exposure Impairs Learning and Memory and Decreases mGluR5 Expression in the Hippocampus and Cortex in Rats. *PLOS ONE*, 9(4), e96041. doi: 10.1371/journal.pone.0096041
42. Jothiramajayam, M., Sinha, S., Ghosh, M., Nag, A., Jana, A., & Mukherjee, A. (2014). Sodium Fluoride Promotes Apoptosis by Generation of Reactive Oxygen Species in Human Lymphocytes. *Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part A*, 77(21), 1269-1280. doi: 10.1080/15287394.2014.928658
43. Jo, W., Ren, X., Chu, F., Aleshin, M., Wintz, H., & Burlingame, A. et al. (2009). Acetylated H4K16 by MYST1 protects UROtsa cells from arsenic toxicity and is decreased following chronic arsenic exposure. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 241(3), 294-302. doi: 10.1016/j.taap.2009.08.027
44. Johnson, A., & Bader, H. (2015). *Geogenic contamination handbook* (pp. 20-21). Dündendorf: Eawag.
45. Kanduti, D., Sterbenk, P., & Artnik, a. (2016). Fluoride: a Review of Use and Effects on Health. *Materia Socio Medica*, 28(2), 133. doi: 10.5455/msm.2016.28.133-137

46. Kumar, A., Kesari, V., & Khan, P. (2013). Fish micronucleus assay to assess genotoxic potential of arsenic at its guideline exposure in aquatic environment. *Biometals*, 26(2), 337-346. doi: 10.1007/s10534-013-9620-8
47. Kumar, M., Lalit, M., & Thakur, R. (2015). Natural Antioxidants Against Arsenic-Induced Genotoxicity. *Biological Trace Element Research*, 170(1), 84-93. doi: 10.1007/s12011-015-0448-7
48. Liu, L., Zhang, Y., Gu, H., Zhang, K., & Ma, L. (2014). Fluorosis Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Osteoblasts In Vivo. *Biological Trace Element Research*, 164(1), 64-71. doi: 10.1007/s12011-014-0192-4
49. Liu, S., Davidson, M., Tang, X., Walker, W., Athar, M., Ivanov, V., & Hei, T. (2005). Mitochondrial Damage Mediates Genotoxicity of Arsenic in Mammalian Cells. *Cancer Research*, 65(8), 3236-3242. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-0424
50. López-Carrillo, L., Hernández-Ramírez, R., Gandolfi, A., Ornelas-Aguirre, J., Torres-Sánchez, L., & Cebrian, M. (2014). Arsenic methylation capacity is associated with breast cancer in northern Mexico. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 280(1), 53-59. doi: 10.1016/j.taap.2014.07.013
51. Ma, Y., Ma, Z., Yin, S., Yan, X., & Wang, J. (2017). Arsenic and fluoride induce apoptosis, inflammation and oxidative stress in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chemosphere*, 167, 454-461. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.025
52. Maheshwari, N., Khan, F., & Mahmood, R. (2017). Sodium meta-arsenite induced reactive oxygen species in human red blood cells: impaired antioxidant and membrane redox systems, haemoglobin oxidation, and morphological changes. *Free Radical Research*, 51(5), 483-497. doi: 10.1080/10715762.2017.1327714

53. McClintock, T., Chen, Y., Bundschuh, J., Oliver, J., Navoni, J., & Olmos, V. et al. (2012). Arsenic exposure in Latin America: Biomarkers, risk assessments and related health effects. *Science Of The Total Environment*, 429, 76-91. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.08.051
54. Méndez-Gómez, J., García-Vargas, G., López-Carrillo, L., Calderón-Aranda, E., Gómez, A., & Vera, E. et al. (2008). Genotoxic Effects of Environmental Exposure to Arsenic and Lead on Children in Region Lagunera, Mexico. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1140(1), 358-367. doi: 10.1196/annals.1454.027
55. Mittal, M., & Flora, S. (2006). Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice. *Chemico-Biological Interactions*, 162(2), 128-139. doi: 10.1016/j.cbi.2006.05.018
56. Molina-Frechero, N., Nevarez-Rascón, M., Nevarez-Rascón, A., González-González, R., Irigoyen-Camacho, M., & Sánchez-Pérez, L. et al. (2017). Impact of Dental Fluorosis, Socioeconomic Status and Self-Perception in Adolescents Exposed to a High Level of Fluoride in Water. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 14(1), 73. doi: 10.3390/ijerph14010073
57. Monroy-Torres, R., Macías, A., Gallaga-Solorzano, J., Santiago-García, E., & Hernández, I. (2009). Arsenic in Mexican Children Exposed to Contaminated Well Water. *Ecology Of Food And Nutrition*, 48(1), 59-75. doi: 10.1080/03670240802575519
58. Morales-Arredondo, J., Armienta, M., & Rodríguez, R. (2018). Estimación de la exposición a elevados contenidos de fluoruro en agua potable en distintas comunidades de Guanajuato, México. *Tecnología Y Ciencias Del Agua*, 09(3), 156-179. doi: 10.24850/j-tyca-2018-03-07
59. Navarro, O., González, J., Júnez-Ferreira, H., Bautista, C., & Cardona, A. (2017). Correlation of Arsenic and Fluoride in the Groundwater for Human Consumption in a Semiarid Region of Mexico. *Procedia Engineering*, 186, 333-340. doi: 10.1016/j.proeng.2017.03.259

60. Osorio-Yáñez, C., Ayllon-Vergara, J., Arreola-Mendoza, L., Aguilar-Madrid, G., Hernández-Castellanos, E., Sánchez-Peña, L., & Del Razo, L. (2015). Blood Pressure, Left Ventricular Geometry, and Systolic Function in Children Exposed to Inorganic Arsenic. *Environmental Health Perspectives*, 123(6), 629-635. doi: 10.1289/ehp.1307327
61. Osorio-Yáñez, C., Ayllon-Vergara, J., Aguilar-Madrid, G., Arreola-Mendoza, L., Hernández-Castellanos, E., & Barrera-Hernández, A. et al. (2013). Carotid Intima-Media Thickness and Plasma Asymmetric Dimethylarginine in Mexican Children Exposed to Inorganic Arsenic. *Environmental Health Perspectives*, 121(9), 1090-1096. doi: 10.1289/ehp.1205994
62. Partridge, M., Huang, S., Hernandez-Rosa, E., Davidson, M., & Hei, T. (2007). Arsenic Induced Mitochondrial DNA Damage and Altered Mitochondrial Oxidative Function: Implications for Genotoxic Mechanisms in Mammalian Cells. *Cancer Research*, 67(11), 5239-5247. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-0074
63. Ribeiro, D., Yujra, V., da Silva, V., Claudio, S., Estadella, D., de Barros Viana, M., & Oshima, C. (2017). Putative mechanisms of genotoxicity induced by fluoride: a comprehensive review. *Environmental Science And Pollution Research*, 24(18), 15254-15259. doi: 10.1007/s11356-017-9105-3
64. Serafín Muñoz, A., Medina García, M., Vido García, F., Noriega Luna, B., Zamorategui Molina, A., Li, Y., & Rodríguez Castrejón, U. (2016). Uso potencial de pellets para el tratamiento de aguas contaminadas con arsénico en comunidades de Xichú, Gto., México. *Acta Universitaria*, 26(NE-2), 22-32. doi: 10.15174/ au.2016.1502
65. SERVICIO GEOLÓGICO MEXICANO. (2017). Anuario de la minería mexicana, 2016 (pp. 115, 441-443). México.
66. Shankar, S., Shanker, U., & Shikha. (2014). Arsenic Contamination of Groundwater: A Review of Sources, Prevalence, Health Risks, and Strategies

for Mitigation. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-18. doi: 10.1155/2014/304524

67. Singh, K., Kumari, R., Treas, J., & DuMond, J. (2011). Chronic Exposure to Arsenic Causes Increased Cell Survival, DNA Damage, and Increased Expression of Mitochondrial Transcription Factor A (mtTFA) in Human Prostate Epithelial Cells. *Chemical Research In Toxicology*, 24(3), 340-349. doi: 10.1021/tx1003112
68. Srinivas, N., Rachakonda, S., Hielscher, T., Calderazzo, S., Rudnai, P., & Gurzau, E. et al. Telomere length, arsenic exposure and risk of basal cell carcinoma of skin. doi: 10.1101/465732
69. Sun, Z., Xue, X., Zhang, Y., Niu, R., & Wang, J. (2017). Effect of sodium fluoride on the sperm mitochondrial DNA in mice. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 492(3), 295-299. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.129
70. Suzuki, M., Bandoski, C., & Bartlett, J. (2015). Fluoride induces oxidative damage and SIRT1/autophagy through ROS-mediated JNK signaling. *Free Radical Biology And Medicine*, 89, 369-378. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.015
71. Vahter, M. (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 181-182, 211-217. doi: 10.1016/s0300-483x(02)00285-8
72. Valeri, N., Vannini, I., Fanini, F., Calore, F., Adair, B., & Fabbri, M. (2009). Epigenetics, miRNAs, and human cancer: A new chapter in human gene regulation. *Mammalian Genome*, 20(9–10), 573–580.
73. Vega Gleason, S. (2002). RIESGO SANITARIO AMBIENTAL POR LA PRESENCIA DE ARSÉNICO Y FLUORUROS EN LOS ACUÍFEROS DE MÉXICO. Comisión Nacional Del Agua. Gerencia De Saneamiento Y Calidad Del Agua, 13.
74. Wang, Z., Yang, X., Yang, S., Ren, G., Ferreri, M., & Su, Y. et al. (2011). Sodium fluoride suppress proliferation and induce apoptosis through

decreased insulin-like growth factor-I expression and oxidative stress in primary cultured mouse osteoblasts. *Archives Of Toxicology*, 85(11), 1407-1417. doi: 10.1007/s00204-011-0697-y

75. Yedjou, C., & Tchounwou, P. (2007). In-vitro cytotoxic and genotoxic effects of arsenic trioxide on human leukemia (HL-60) cells using the MTT and alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assays. *Molecular And Cellular Biochemistry*, 301(1-2), 123-130. doi: 10.1007/s11010-006-9403-4
76. Zheng, L., Kuo, C., Fadrowski, J., Agnew, J., Weaver, V., & Navas-Acien, A. (2014). Arsenic and Chronic Kidney Disease: A Systematic Review. *Current Environmental Health Reports*, 1(3), 192-207. doi: 10.1007/s40572-014-0024-x
77. Zuo, H., Chen, L., Kong, M., Qiu, L., Lü, P., & Wu, P. et al. (2018). Toxic effects of fluoride on organisms. *Life Sciences*, 198, 18-24. doi: 10.1016/j.lfs.2018.02.001.

12. ANEXOS

12.1. Protocolos

12.1.1. Preparación de reactivos

12.1.1.1. Medio DMEM

1. En un vaso de precipitados de 1 L se adicionan 750 mL agua MiliQ y se le agrega:

Polvo DMEM	9.9 g
Bicarbonato de Sodio	3.7 g

2. En agitación se mezclan y se afora a 1 L en matraz aforado de 1L.
3. Calibrar a pH 7.4 haciendo uso de HCl o NaOH según se requiera.
4. Filtrar en un sistema de filtración Corning estéril.
5. Filtrar el Suero Bovino Fetal al 10% (v/v) y se filtra
6. Se adicionan antibióticos 10 000 U/mL de penicilina y 10 mg/mL de estreptomina.
7. Transferir a recipientes de 500 ml previamente autoclavados.
8. Almacenar en refrigeración para su posterior uso.

12.1.1.2. PBS

1. En un vaso de precipitados de 1L se adiciona 750 ml de agua MiliQ y se le agrega:

NaCl	8.7 g
Na ₂ HPO ₄ – 12 H ₂ O	2.7 g
Na ₂ HPO ₄ – 2 H ₂ O	0.4 g

2. Se ajusta el pH a 7.4 haciendo uso de HCl o NaOH según sea necesario.

3. Aforar a 1 L en matraz aforado de 1L.
4. Transferir a recipientes de 500 ml previamente autoclavados.
5. Almacenar en refrigeración para su posterior uso.

12.1.1.3. Tripsina

1. En un vaso de precipitados de 150 mL se adiciona 75 ml de PBS y se agrega:

Tripsina	0.05 g
EDTA	0.02 g

2. Se mantiene en agitación para mezclar.
3. Aforar a 100 mL en matraz aforado de 100 mL con PBS.
4. Transferir a recipientes de 50 ml previamente autoclavados.
5. Almacenar en refrigeración para su posterior uso.

12.1.1.4. Soluciones de Meta-arsenito de Sodio

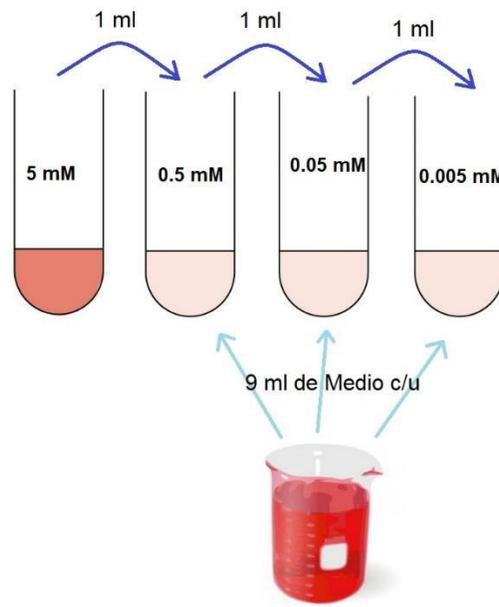
Preparar una solución de 5 mM de NaAsO_2 y realizar las diluciones seriadas correspondientes para las concentraciones deseadas.

Compuesto	Cantidad
NaAsO_2	0.0300 gr

Se disuelve en 50 ml de Medio

Se ajusta pH a 7.4

A partir de la solución de 5 mM de NaAsO_2 , por medio de diluciones seriadas se llega a la concentración $5\mu\text{M}$.



Teniendo la concentración de 5 μM , se generaron las siguientes concentraciones:

Concentración	Volumen de NaAsO ₂ (5 μM)	Volumen de Medio	Volumen Final
2 μM	4 ml	6 ml	10 ml
1.5 μM	3 ml	7 ml	10 ml
1 μM	2 ml	8 ml	10 ml
0.5 μM	1 ml	9 ml	10 ml

12.1.1.5. Soluciones de Fluoruro de Sodio

Preparar una solución de 40mg/L de NaF y realizar las diluciones seriadas correspondientes para las concentraciones deseadas.

Compuesto	Cantidad
NaF	0.0020 gr

Se disuelve en 50 ml de Medio

Se ajusta pH a 7.4

Para las soluciones de las demás concentraciones:

Concentración	Volumen de NaF (40 mg/l)	Volumen de Medio	Volumen Final
35 mg/l	8.75 ml	1.25 ml	10 ml
30 mg/l	7.5 ml	2.5 ml	10 ml
25 mg/l	6.25 ml	3.75 ml	10 ml
20 mg/l	5 ml	5 ml	10 ml
15 mg/l	3.75 ml	6.25 ml	10 ml
10 mg/l	2.5 ml	7.5 ml	10 ml

12.1.1.6. Solución de NAC

Para preparar una solución de 15mM de NAC

Compuesto	Cantidad
N-Acetil Cisteína	0.1224 gr

Se disuelve en 50 ml de Medio

Se ajusta pH a 7.4

12.1.1.7 Colección de absorbancias de ADN de células HEK-293

Tomar 5 μ L de doce muestras de ADN de forma aleatoria para formar un pool

Muestra	Concentración (ng/ μ L)
As-F (1.5 μ L- 15 mg/L)	99

F-NAC (15 mg/L)	74.2
As-F-NAC (1.0µL- 20 mg/L)	97.7
As-NAC (0.5 µL)	123.8
Control	120.1
As (1.0 µL)	105
F-NAC (20 mg/L)	143.2
As-F-NAC (1.5µL- 15 mg/L)	244.7
F-NAC (25 mg/L)	139.9
As-NAC (1.5 µL)	275.9
As-F-NAC (2.0µL- 10 mg/L)	153.4
As (0.5 µL)	188
Total de concentración	$\Sigma = 1764.9$

Llevarlo a una concentración de 50 ng/µL en 50 µL

Muestra (pool)	Agua de grado biológico
1.42 (ng/µL)	48.58 µL

12.1.2. Protocolo de Trabajo

12.1.2.1. Protocolo para Pasaje de Células

1. Observar confluencia de 80%
2. Quitar medio mediante aspiración.
3. Agregar 4 ml de PBS y realizar lavado. Retirar.

4. Agregar 1-2 ml de Tripsina-EDTA agitando gentilmente. No exceder de 2 minutos.
5. Pasar todo el contenido a un tubo de 15 cm Falcon.
6. Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.
7. Adicionar 4 ml de Medio DMEM y pipetear suavemente para dispersar grumos.
8. Agregar 2 ml a cada caja de Petri, la cual ya contenga 8 ml de Medio DMEM.
9. Incubar a 37 °C con 5% de CO₂.

12.1.2.2. Protocolo para Congelado Celular

1. Rotular 6 criotubos (Nombre, Tipo de Célula, Fecha y Número de Pasaje).
2. Se realizan los pasos de 1-5 del pasaje celular de igual manera.
3. Pasar todo el contenido a un tubo de 15 cm Falcon.
4. Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.
5. Decantar (Medio/Tripsina).
6. Resuspender en 6 ml de 10% DMSO pipeteando suavemente.
7. Tomar toda la suspensión celular y agregar 1 ml a cada criotubo
8. Almacenar a -70 °C por 24 horas.
9. Pasar a Nitrógeno líquido.

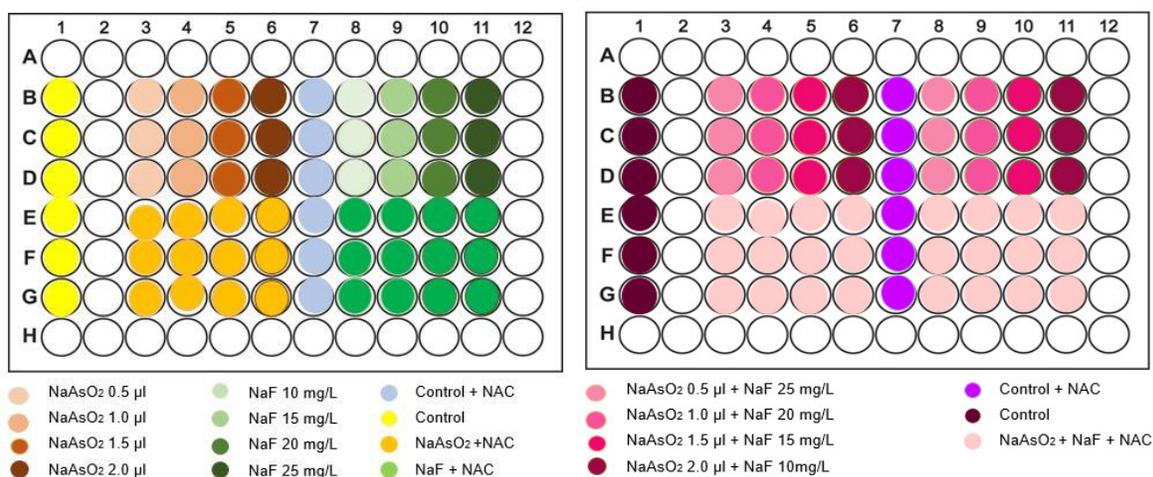
12.1.2.3. Protocolo para Descongelado de Células

1. Preparar tubos Eppendorff estériles.
2. Descongelar criotubos en baño maría a 37 °C.
3. Pasar la suspensión celular al tubo Eppendorff.
4. Centrifugar por 5 minutos.
5. Tirar por decantación el sobrenadante (Medio y DMSO).
6. Resuspender la pastilla e 1 ml de Medio.
7. Pipetear hasta deshacer pastilla con cuidado de no hacer espuma.

8. Pasar a caja de Petri.

12.1.2.4. Protocolo para Sembrado Celular con Soluciones de Metaarsenito de Sodio y Fluoruro de Sodio.

1. Preparar tubos Eppendorff estériles.
2. Observar confluencia de 80% celular.
3. Quitar medio mediante aspiración.
4. Agregar 5 ml de PBS y realizar lavado. Retirar.
5. Agregar 5 ml de Tripsina-EDTA agitando gentilmente. No exceder de 2 minutos.
6. Transferir a 5 tubos Eppendorff y centrifugar por 5 minutos.
7. Decantar la tripsina.
8. Agregar 1 ml de medio DMEM a cada tubo y deshacer los grumos con pipeteo.
9. Sembrar caja de 96 pocillos con 20,000 células/pocillo. Dejar adherir por 24 horas, cambiar el medio por la concentración correspondiente:



12.1.2.5 Protocolo de Electroforesis

Preparación del gel de agarosa

1. Se vierten en un matraz 30 ml del tampón de electroforesis TBE y 0.3 gr de agarosa (1 %).
2. Se funde la solución de agarosa en un microondas o placa calefactora.
3. Se deja enfriar la suspensión hasta que alcance 50 °C aproximadamente.
4. Se sella con cinta adhesiva el soporte donde se va a verter el gel de agarosa y se coloca el peine que servirá para formar los pocillos del gel.
5. Una vez que la solución de agarosa ha alcanzado los 50°C, se le añaden 2 µL de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se mezcla bien.
6. Se vierte la solución de agarosa con bromuro de etidio en el soporte, previamente sellado. Se deja polimerizar durante unos 30 minutos.

Preparación de las muestras de DNA

1. Se cogen 20 µl del DNA plasmídico aislado y se le añaden 5 µl de tampón de carga.

Electroforesis

1. Se quita la cinta adhesiva con la que se ha sellado el soporte del gel y se coloca en la cubeta de electroforesis.
2. Se añade tampón de electroforesis TBE, de forma que cubra bien el gel de agarosa.
3. Se aplican 10 µl de la muestra preparada en los pocillos.
4. Se aplican 10 µl de marcadores de peso molecular en el primer pocillo.
5. Se tapa la cubeta de electroforesis y se conectan los electrodos a la fuente de alimentación.

6. Se programa la fuente a 100 voltios y se comienza a correr la electroforesis que durará unos 30-45 minutos.

7. Una vez acabada la electroforesis se visualizan los fragmentos de DNA mediante luz UV y se realiza una fotografía de la imagen.

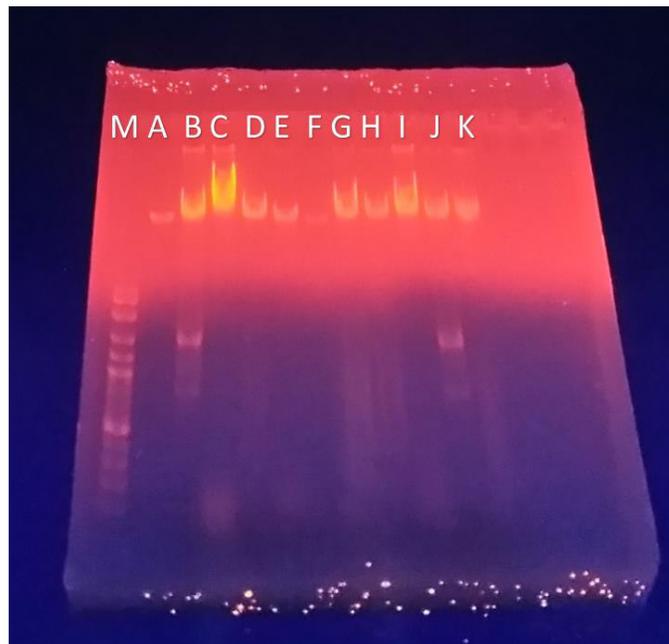
12.1.2.6. Protocolo De Purificación De ADN Genómico Wizard®

1. Levanta las células y transferirlas a un tubo Eppendorff de 1.5 ml.
2. Centrifugar a 15,000 g por 10 segundos.
3. Remover supernadante, dejar 10-50 μ L de líquido residual
4. Agregar 200 μ L de PBS para lavar las células. Centrifugar como en el paso 1 y remover el PBS.
5. Agregar 600 μ L de solución de lisis nuclear. Pipetear para lisar las células.
6. Agregar 200 μ L de solución de precipitación de proteínas y mezclar en el vortex vigorosamente por 20 segundos. Congelar la muestra en hielo por 5 minutos.
7. Centrifugar por 4 minutos a 15,000 g. El precipitado de proteínas tiene forma de un pellet blanco.
8. Con cuidado remover el supernadante que contiene el ADN y transferir a un tubo Eppendorff de 1.5 ml que contenga 600 μ L de isopropanol.
9. Mezclar gentilmente por inversión hasta observar hebras de ADN.
10. Centrifugar por 1 minuto a 15,000 g. El ADN puede ser visible como un pequeño pellet blanco. Decantar con cuidado el supernadante.
11. Agregar 600 μ L de etanol al 70% e invertir gentilmente para lavar el ADN. Centrifugar 1 minuto a 15,000 g.
12. Invertir el tubo en un papel absorbente limpio para secar el pellet por 10-15 minutos.
13. Agregar 50 μ L de solución de ADN rehidratante.
14. Almacenar el ADN a 2-8 °C.

12.1.3. Imágenes

12.1.3.1. Electroforesis

Electroforesis en gel de agarosa 1%, visualización de fragmentos de ADN.



M-Marcador, A- F-NAC 10 mg/L, B- As-NAC 1.5 μ M, C- As-F-NAC 1.5 μ M-15 mg/L, D- As-F-NAC 2 μ M-10 mg/L, E- F-NAC 20 mg/L, F- F 20 mg/L, G- As 1 μ M, H- As-NAC 0.5 μ M, I- As-NAC 1 μ M, J- As 0.5 μ M y K- F-NAC 25 mg/L

12.1.3.2. NANODROP

