

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**"RESPUESTA DE LA RUTA Nrf2-Keap1 A LA PRESENCIA
DE TÓXICOS AMBIENTALES"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

Q.F.B. Mirna Edith Morales Marín

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO
CODIRECTOR DE TESIS: DR. EMILIO JOAQUÍN CÓRDOVA ALARCÓN

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

UACM3 T0V187

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA: Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco

CODIRECTOR: Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón

ASESOR: Dr. Federico Centeno Cruz

ASESORA: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

ASESORA: Dra. Mavil López Casamichana

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Enfermedades Complejas del Instituto Nacional de Medicina Genómica, con financiamiento CONACyT a través del proyecto FOSSIS con registro SALUD-2007-COI-71053.

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el apoyo académico y económico otorgado durante la realización de mis estudios de maestría en el Posgrado de Ciencias Genómicas así como a CONACyT por la beca que me fue otorgada el último semestre.

DEDICATORIA

A MIS PADRES, por todo su apoyo, amor y comprensión.

A MIS HERMANAS, por estar conmigo en todo momento y darme ánimos.

A MI FAMILIA, por tomarme como ejemplo para mis hermanas, primos y sobrinos

A TODOS MIS AMIGOS, por su amistad incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lorena, mi más sincero agradecimiento por ser mi maestra, por todas sus enseñanzas personales y profesionales, por todo su apoyo, por ser un ejemplo para mí, por guiarme en los momentos difíciles y dedicarme un poco de su tiempo.

A los Drs. Emilio y Federico, por ser mis maestros, por todas sus enseñanzas, paciencia, regaños, consejos y buenos momentos, por enseñarme a disfrutar lo que hago y no darme por vencida en los ratos difíciles, por aceptarme como su alumna.

A las Dras. Elisa y Mavil y a todos los profesores del posgrado por su apoyo y por compartir su conocimiento.

A la Dra. Bertha Molina, por todo el apoyo y facilidades otorgadas para la realización del proyecto, por sus enseñanzas, paciencia y buen ánimo siempre.

A mis compañeros y amigos del posgrado, Alma, Ana, Laura, Bertha, Fernando, Helios, Manuel, Emmanuel, Genaro, Enrique, Jaime, Roberto, Marco, David, Olga, Jaqueline, y los demás, que aunque no los mencione saben quiénes son, por los buenos ratos.

Al equipo del laboratorio, los que siguen y los que ya no están, Yolanda, Lupita, Silvia, Rafael, Julián, Humberto G., Humberto G. Malacatt, Juan, Tere Villarreal.

A mis amigos del INMEGEN, Karol, Lyssia, Haideé, Chava, Karla J., José Luis, Tere G., por su apoyo y sus consejos.

INDICE	6
Lista de figuras	8
LISTA DE TABLAS	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	12
Cáncer	12
Factores genéticos.....	13
Cáncer monogénico	14
Cáncer multifactorial.....	16
Factores ambientales.....	17
Arsénico	18
Metabolismo del As.....	19
Nrf2-Keap1-ARE: mecanismo antioxidante	23
Gen <i>NRF2</i> y estructura de Nrf2.....	25
<i>HO-1</i> y <i>NQO1</i>	27
Nrf2 y cáncer	28
Polimorfismos en <i>NRF2</i> y actividad transcripcional	29
JUSTIFICACIÓN.....	31
OBJETIVOS.....	32
Objetivo general.....	32
Objetivos particulares	32
MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
Obtención de muestras	33
Niveles de expresión basal de los genes <i>NRF2</i> , <i>HO-1</i> y <i>NQO1</i> y activación de la ruta Nrf2-Keap1 con arsenito de sodio	33
a) Obtención de la Línea celular NL-1.....	33
Inmortalización celular.....	35
Extracción de RNA	36
Tratamiento con DNAsa.....	37
b) Expresión basal de la ruta Nrf2-Keap1 y su inducción por As. Ensayo tiempo-	

respuesta	37
Evaluación de los niveles de expresión en punto final	38
c) Evaluación de los niveles de expresión por Tiempo Real	40
Extracción de DNA	41
Genotipificación de polimorfismos de la región promotora de <i>NRF2</i>	42
PCR	42
Purificación de los fragmentos de PCR	43
Secuenciación	44
Discriminación alélica por TaqMan	44
RESULTADOS	47
Expresión basal de <i>NRF2</i> , <i>HO-1</i> y <i>NQO1</i>	47
Inducción de la ruta Nrf2-Keap1 por As	47
Determinación de frecuencias genotípicas y alélicas	58
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	77
PERSPECTIVAS	78
BIBLIOGRAFÍA	79

Lista de figuras

Figura 1	Estados de una célula tumoral	15
Figura 2	Metabolismo celular del arsénico	22
Figura 3	Esquema de la ruta antioxidante Nrf2-Keap1	24
Figura 4	Expresión basal de los genes <i>NRF2</i> , <i>HO-1</i> y <i>NQO1</i> en la línea celular NL-1 en geles de agarosa al 2.5%	48
Figura 5	Vista al microscopio de células NL-1 en cámara de Neubauer 10X	49
Figura 6	Gráfico de la viabilidad celular de NL-1 de 2-12 hrs de exposición con As 5 μ M	50
Figura 7	RT-PCR en punto final de la expresión de <i>NRF2</i> , <i>HO-1</i> y <i>NQO1</i> de 2-12 hrs con 5 μ M de As	52
Figura 8	Curvas de disociación para los oligonucleótidos diseñados para los diferentes genes analizados obtenidas después de la PCR en tiempo real	53
Figura 9	Expresión relativa de <i>NRF2</i> , <i>HO-1</i> y <i>NQO1</i> analizados por RT-PCR en tiempo real normalizados con <i>GAPDH</i> en células NL-1 expuestas a 5 μ M de As a intervalos de 4 horas, de 4 a 12 horas	55
Figura 10	Experimento representativo de la expresión relativa de <i>NRF2</i> , <i>HO-1</i> y <i>NQO1</i> analizados por RT-PCR en tiempo real normalizados con <i>GAPDH</i> en células NL-1 con 5 μ M de As en un intervalo de 20 a 120 minutos	56
Figura 11	Comparación de la expresión relativa de <i>NQO1</i> en hepatocitos y de la línea linfocitaria NL-1	57
Figura 12	Viabilidad celular a diferentes tiempos de exposición con As 5 μ M de 20-120 minutos	59
Figura 13	Expresión relativa de <i>NRF2</i> , <i>HO-1</i> y <i>NQO1</i> analizados por RT-PCR en tiempo real en células NL-1 inducidos con 5 μ M de As de 12-24 horas	60
Figura 14	Viabilidad celular de células NL-1 en exposición a 5 μ M de As de 12-24 hrs	61
Figura 15	Discriminación alélica por Taqman del polimorfismo -653	63
Figura 16	Amplificación por PCR de la región promotora de <i>NRF2</i> que contiene a los SNPs en las posiciones -653, -651 y -617	66
Figura 17	Electroferogramas de secuenciación automatizada	67
Figura 18	Modelo propuesto de la activación de la ruta antioxidante Nrf2-Keap1 por As en linfocitos	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs -653, -651 y -617 del gen <i>NRF2</i>	64
Tabla 2	Comparación de las frecuencias alélicas de los SNPs en la región promotora de <i>NRF2</i> en diferentes poblaciones	65
Tabla 3	Muestras colectadas y sus genotipos para los diferentes SNPs localizados en la región promotora de <i>NRF2</i>	68

RESUMEN

El cáncer es un grave problema de salud a nivel mundial y representa una de las principales causas de muerte según la Organización Mundial de la Salud; en México ocupa el segundo lugar en mortalidad, sólo después de las enfermedades cardiovasculares. Esta enfermedad es de origen multifactorial, en donde participan tanto factores genéticos como ambientales en su desarrollo.

De los factores ambientales más comunes son los metaloides como el arsénico (As), el cual se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, en la tierra y en los mantos acuíferos y se ha descrito, por la agencia internacional de investigación en cáncer (IARC), como carcinógeno tipo 1. La exposición crónica a este contaminante se asocia al desarrollo de diferentes tipos de cáncer como el de pulmón, riñones, vejiga, hígado y piel. Se ha propuesto que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es el principal mecanismo a través del cual el As daña diversas macromoléculas celulares como el DNA, proteínas y fosfolípidos. Uno de los principales sistemas detoxificantes y antioxidantes de la célula es el de la ruta de señalización Nrf2-Keap1. Nrf2 es un factor de transcripción que en condiciones normales es retenido y degradado en el citoplasma por su represor Keap1. Sin embargo, en presencia de estrés oxidativo, Nrf2 se transloca al núcleo donde activa genes de detoxificación y de respuesta al estrés que presentan elementos de respuesta antioxidantes (ARE) como los genes *HO-1*, *NQO1*, *GCS-γ*, *GSTA1*, *MRP2*, entre otros. Aunque en el ratón la activación de *nrf2* es capaz de inducir la transcripción de su propio mensajero, se desconoce si en el humano existe un sistema auto-regulatorio semejante. Recientemente, se han identificado tres polimorfismos (-653G/A, -651G/A y -617C/A) en la región promotora de *NRF2* y se ha establecido el efecto de su presencia sobre la activación de la vía.

Se utilizaron células B inmortalizadas (NL-1), tratadas a distintos tiempos con arsenito de sodio. El RNA total se extrajo con el reactivo de Trizol. La expresión génica fue determinada por RT-PCR en tiempo real, mediante la utilización de oligonucleótidos específicos y SybrGreen. Las células NL-1 fueron tratadas con dosis subletales de As (5µM) a tiempos cortos (20-120 min), intermedios (4-12 hrs) y largos (12-24 hrs). La viabilidad celular se determinó por el método de azul tripano. La activación de la ruta fue medida por medio de los niveles de mRNA de los genes *NRF2*, *HO-1* y *NQO1*. En todos los casos se realizaron dos ensayos independientes, cada uno de ellos por duplicado. El nivel de expresión de GAPDH fue utilizado como control interno de normalización.

En este trabajo, se documenta la activación de la ruta Nrf2-Keap1 en respuesta a la inducción con As en las células derivadas de linfocitos mediante un aumento en la expresión de *HO-1* y aparentemente de *NRF2*, pero no de *NQO1*. Por otra parte, se estima la frecuencia de los SNPs mencionados en una muestra de la población mexicana y se establece un modelo celular para que, en un futuro, se logre establecer el efecto de los polimorfismos de *NRF2* sobre la activación de la ruta. Al analizar los niveles de RNAm de

HO-1 y *NQO1*, se observó que la exposición de las células B al arsénico indujo la activación de la ruta Nrf2-Keap1 desde tiempos tan tempranos como 20 min y hasta al menos 24 hrs de incubación. La expresión de *HO-1* fue 5 veces mayor que la de *NQO1* (Fig. 1), lo cual sugiere la presencia de una expresión diferencial de ambos genes por parte del As. A diferencia de lo reportado en otros tipos celulares, los niveles de RNAm de NRF2 se incrementaron en respuesta a la exposición a As. Nuestros resultados muestran por primera vez la activación de la ruta Nrf2-Keap1 en respuesta a la exposición a As en células linfocitarias. Además, se identificó la expresión diferencial de los genes *HO-1* y *NQO1*. Finalmente, nuestros datos sugieren que el As es capaz de encender un sistema de autorregulación en la expresión de NRF2.

La frecuencia del alelo menos frecuente fue -653 43.1%, -651 4.7% y -617 26.1%. Por otro lado, se ha generado un banco de células linfocitarias inmortalizadas, de las cuales se conoce el genotipo.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública y México no es la excepción. A nivel mundial más de 22 millones de personas se encuentran afectadas por algún tipo de neoplasia, cada año se detectan al menos 10 millones de nuevos casos y anualmente más de 7 millones de personas mueren por esta causa. El cáncer representa un conjunto de enfermedades que tienen en común un proceso patológico que involucra alteraciones en la proliferación, diferenciación y muerte celular. Los mecanismos normales de regulación permiten que las células sólo proliferen cuando son requeridas durante el desarrollo embrionario, la reparación de heridas y en el recambio natural en los tejidos. Sin embargo, en el cáncer la pérdida de esta regulación da como resultado una proliferación celular exacerbada, lo que se manifiesta en la formación de tumores en diversos tejidos, que cuando adquieren la capacidad de invadir otros tejidos, se denominan neoplasias malignas o cáncer.

El proceso carcinogénico ocurre en múltiples etapas, representado típicamente la acumulación sucesiva de alteraciones en genes claves reguladores en la proliferación y muerte celular, así como del mantenimiento de la integridad del genoma. Inicialmente, las diferentes etapas de la carcinogénesis fueron descritas en cáncer de colon y tienen correspondencia con los distintos estados histológicos y alteraciones genéticas. Los estados de la carcinogénesis se designan: i) “iniciación”, en la cual la célula sufre un daño y la proliferación inicial disemina la alteración que promueve la proliferación de manera irreversible en la progenie celular; ii) “promoción” caracterizada por múltiples rondas de

replicación y la transición gradual hacia la transformación celular y iii) “progresión” en la que las células cancerosas se diseminan y generan múltiples sitios de crecimiento tumoral. Se considera que un tumor maligno tiene un origen monoclonal y el proceso de transformación implica la activación de proto-oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores (Yu y Hahn, 2004). La extensa duración del proceso en algunos tipos de cáncer ha hecho reconsiderar a algunos autores sobre el origen monoclonal de un tumor maligno. Durante el proceso carcinogénico la célula adquiere una serie de características celulares como auto suficiencia proliferativa, insensibilidad a señales antiproliferativas, evasión de la apoptosis (figura 1). La adquisición de estas características se debe a la mutación de diferentes genes a causa de diversos factores propios de la célula y externos.

Factores genéticos

El cáncer es considerado una enfermedad multifactorial debido a la participación de factores genéticos y ambientales. Los factores genéticos juegan un papel importante en la carcinogénesis y pueden observarse a dos niveles. En primer lugar, la adquisición de alteraciones genéticas en su genoma que no se encuentran en las células circundantes de tejido sano y consisten en alteraciones somáticas que modifican la estructura y/o expresión de oncogenes y genes supresores de tumores. Por otra parte, existen varios estudios que han demostrado que la predisposición a padecer diversos tipos de cáncer es heredable, entre los que destaca el cáncer de mama y el retinoblastoma (Soussi *et al*, 1993).

Cáncer monogénico

Se estima que el 5% de las neoplasias se originan a partir de mutaciones monogénicas que pueden ser heredadas en forma mendeliana o adquiridas “de novo” en las células germinales por lo tanto, están presentes en todas las células del individuo (Brinkman *et al*, 2006).

El retinoblastoma es uno de los mejores ejemplos, se conocen dos tipos: el hereditario y el esporádico o no hereditario. En 1971, Knudson analizando pacientes afectados con retinoblastoma propuso que este tipo de cáncer era generado por dos eventos de mutación, en el caso de retinoblastoma hereditario la primera mutación se generaba en las células germinales y la segunda en los retinoblastos; mientras que en el retinoblastoma no hereditario, ambas mutaciones ocurrían en las células de la retina (Knudson, 1971). Posteriormente, esta hipótesis fue corroborada por otros investigadores, cuando observaron que el retinoblastoma es producido por mutaciones en el gen supresor de tumor *RBI*.

El estudio de los diversos tipos de cáncer mendeliano permitió la identificación genes específicos y de las alteraciones responsables de la enfermedad. Ahora se sabe que generalmente los genes involucrados en las neoplasias monogénicas como el retinoblastoma, neuroblastoma, cáncer de colon por poliposis adenomatosa familiar y el síndrome de Li-Fraumeni son genes supresores de tumores. La penetrancia (fracción de

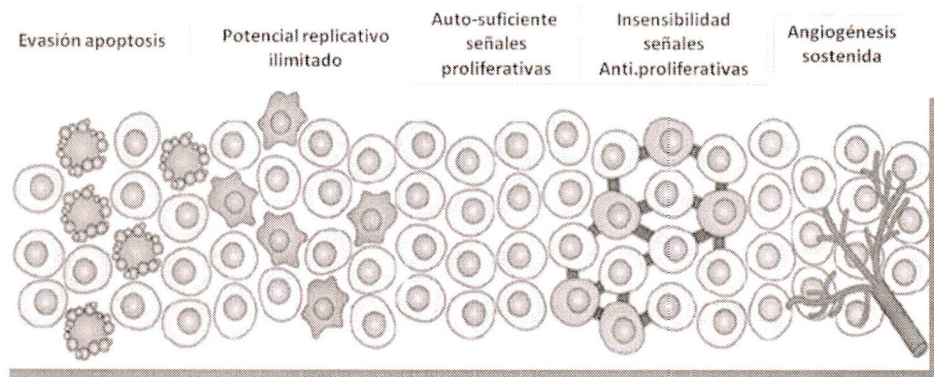


Figura 1. Estados de una célula tumoral.

individuos que portan una mutación y manifiestan la enfermedad) de las mutaciones en estos genes es variable, por ejemplo, las mujeres que portan la versión mutada del gen *BRCA1*, tienen un riesgo del 70% de desarrollar cáncer de mama u ovario (Palma *et al*, 2008), mientras que aquellos casos que porten una mutación en el gen *RB1*, tienen un riesgo del 90% para padecer retinoblastoma. Aunque la frecuencia de las mutaciones en estos genes es muy baja en la población general (1/1000 para el caso de *BRCA1*), estas frecuencias varían en las distintas poblaciones, como sucede en poblaciones judías para la presencia donde la frecuencia de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* es muy alta y se estima que son responsables del 40% de los cánceres de ovario y 20% de los casos de cáncer de mama (Edlich *et al*, 2005).

Aunque no se conoce a detalle la función de todos los genes involucrados en la susceptibilidad a los diversos tipos de cáncer, muchos de ellos participan en la regulación del ciclo celular, la muerte celular programada y en la reparación o detección del daño al DNA.

Cáncer multifactorial

El 95% de los cánceres presentan un carácter multifactorial y se deben a alteraciones somáticas adquiridas en algún momento de la vida de un individuo; estos son “esporádicos”, aunque existe agregación familiar.

La completa secuenciación del genoma humano ha impulsado la investigación sobre la participación de variantes génicas más frecuentes y su asociación con la predisposición a padecer padecimientos multifactoriales, entre los que destaca el cáncer. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) son el tipo de variación más frecuente en el genoma humano,

constituyen el 90% de las variantes genéticas y se encuentran aproximadamente 12 millones de ellas en todo el genoma con una distribución aproximada de cada 300 pares de bases (Kim y Misra, 2007). Existen diversos estudios que han asociado la presencia de polimorfismos en genes específicos como los oncogenes y los genes supresores de tumor, con el riesgo a padecer diversos tipos de cáncer. Esto podría explicar la observación de las diferencias interindividuales en la respuesta a los diversos factores ambientales y son un excelente ejemplo de la interacción gen-ambiente. La presencia de mutaciones de diversa naturaleza en los oncogenes y los genes supresores de tumor también se han asociado con el riesgo a padecer cáncer multifactorial. Estos genes van desde los involucrados en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la activación transcripcional hasta aquellos involucrados en la inducción de la muerte celular (Chen y Hunter, 2005). Otro tipo de genes que se han asociado con cáncer son los que regulan la respuesta al daño celular.

Factores ambientales

En distintos estados del proceso carcinogénico, las alteraciones celulares inherentes a la transformación maligna pueden producirse por agentes externos. Los agentes que tienen la capacidad de ocasionar cáncer en modelos animales, son denominados carcinógenos (Morita *et al*, 1997). La gran mayoría de los carcinógenos causan daño al DNA en las células o tejidos expuestos a dicho agente por lo que se consideran genotóxicos en tanto que aquellas carcinógenos asociadas al desarrollo de neoplasias incapaces de dañar al DNA, son consideradas no genotóxicas. Muchos de los carcinógenos genotóxicos pueden considerarse iniciadores del proceso oncogénico al participar en eventos tempranos del mecanismo de carcinogénesis. Por otra parte, el desarrollo de tumores puede facilitarse en modelos animales expuestos a agentes no genotóxicos capaces de estimular la

proliferación celular y otro tipo de daño en los tejidos expuestos a dichos agentes, los cuales se consideran “promotores” del proceso carcinogénico. La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha acumulado información de un número creciente de agentes evaluados para la actividad carcinogénica, basándose en datos epidemiológicos y en distintos resultados experimentales, que incluyen modelos animales. La IARC ha establecido un sistema de clasificación de los carcinógenos en tres niveles: tipo I, carcinógeno comprobado en humano; tipo II, probable carcinógeno en humano; tipo III, posible carcinógeno. Los más importantes de éstos, son aquellos agentes genotóxicos clásicos que pertenecen al nivel I, como la radiación ionizante o sustancias del tabaco como el benzopireno, así como agentes biológicos como el virus del papiloma humano y la bacteria *Helicobacter pylori*. Dentro de este nivel también se han incluido sustancias cuya actividad genotóxica y mecanismo molecular de acción aún no se comprenden en su totalidad, pero que existe evidencia suficiente, sobre todo epidemiológica, para considerarlos carcinógenos (Luch, 2005). Dentro de estas últimas destaca el arsénico, que en diferentes estudios se le ha asociado al desarrollo de diversos tipos de cáncer, como los de piel, vejiga, pulmón e hígado.

Arsénico

El As es un elemento que se encuentra en concentraciones traza en todos los ambientes naturales. Sin embargo en algunas zonas del planeta su concentración en suelo y agua es muy alta, sobre todo debido a las características geoquímicas de la región, aunque algunas actividades humanas como la minería, incrementan considerablemente la concentración ambiental (IARC). En las poblaciones expuestas a niveles altos de As se han reportado diversos daños a la salud, lo que ha ocasionado un incremento en el interés por entender a

detalle los mecanismos de la toxicidad del As.

El As como elemento no es soluble en agua, pero sus sales tienen un amplio espectro de solventes dependiendo del pH del medio. Este genotóxico se encuentra en raras ocasiones en estado puro, generalmente está combinado con metales y azufre. Así, puede encontrarse como elemento inorgánico cuando está en combinación con algunos metales como el cobre, el plomo, el zinc o el oro y, en forma de elemento orgánico cuando se encuentra en combinación con carbono e hidrógeno. El As puro tiene una coloración gris metálico y en la mayoría de los compuestos orgánicos e inorgánicos de As tienen una coloración blanca o incolora, no tiene olor ni sabor, por lo que su presencia en la comida, en el agua o en el aire pasa desapercibida. Puede estar en cuatro formas dependiendo de su valencia: -3, 0, +3 y +5. En condiciones reductoras, su estado dominante es con valencia +3 como arsenito (AsIII), el estado +5 es el arsenato (AsV) que es más estable en condiciones oxidantes. Algunas de las especies identificadas en el agua son en menor cantidad el ácido monometil As (MMA) y el ácido dimetil As (DMA). La estabilidad de los compuestos inorgánicos de As depende de su valencia y de la naturaleza del medio; en un ambiente básico y oxigenado se favorece la formación de As pentavalente mientras que, en un medio ácido, se favorece la formación de As trivalente. Las formas más frecuentes de As inorgánico ($As^{(i)}$) son el arsenito (As^{+3}) y el arsenato (As^{+5}) y las formas orgánicas más frecuentes son el ácido monometilarsónico (MMA), el ácido dimetilarsínico (DMA) y el óxido de trimetilarsina (TMAO) (IARC, 2008).

Metabolismo del As

El mecanismo más común utilizado por los organismos para eliminar los tóxicos ambientales es la biotransformación, la cual consiste en convertir los xenobióticos no

polares en compuestos solubles en agua. En algunos casos, la biotransformación resulta en la producción de un metabolito más tóxico que el compuesto original, a este proceso se le denomina bioactivación. Si estos metabolitos se acumulan pueden producir una respuesta tóxica. Las reacciones de biotransformación se agrupan en dos conjuntos de vías metabólicas: las reacciones de Fase I o de funcionalización y las reacciones de Fase II o de conjugación.

La biotransformación de Fase I comprende un conjunto de reacciones de las que la oxidación a nivel microsomal es la reducción y la hidrólisis. Como resultado a las reacciones de la fase I se forman metabolitos que en general son más hidrófilos y que pueden ser transformados en las reacciones de Fase II.

Las reacciones de Fase II, de las cuales la glucurono-conjugación es la más característica, están catalizadas por un conjunto de enzimas, la mayoría de ellas localizadas en citoplasma. Las reacciones consisten en agregar un grupo polar de tamaño relativamente grande a los productos de las reacciones de la Fase I o a los xenobióticos originales que contienen los grupos funcionales apropiados para ser sustratos de las reacciones de conjugación. El resultado que se logra con estas reacciones es un aumento en la solubilidad en agua del xenobiótico o metabolito, lo que facilita su eliminación del organismo.

El modelo actual sobre el metabolismo del As se caracteriza por dos tipos de reacciones en células de mamífero. El primero es una biotransformación de Fase I, consistente en una oxidación/reducción que cambia el estado de valencia del As, permitiendo el paso de As^{+5} a As^{+3} . El segundo tipo de reacción es la metilación a productos mono-, bi- o trimetilados de As trivalentes por la S-adenosilmetionina (SAM) como donador de grupos metilo y la forma reducida del glutatión (GSH) como cofactor esencial (Morgan et al., 2001).

Los mecanismos mediante los cuales el As se asocia al proceso carcinogénico, aun no

están completamente dilucidados (Gomez *et al*, 2005). Sin embargo, se ha propuesto la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el daño al DNA y la modificación de señalización intracelular como posibles efectos.

La generación de ROS debido a metales se ha asociado con daño al DNA a través de la formación de dímeros, rompimientos de cadena sencilla, formación de enlaces covalentes con proteínas, hidroxilación y mutaciones. En la generación de ROS se producen especies de vida media corta como O_2^- , H_2O_2 , OH y singulete de oxígeno, entre otros (Pi *et al*, 2003). En el 2004, Shi y cols. (Shi *et al*, 2004), demostraron que el As es capaz de ocasionar daño a keratinocitos a través del estrés oxidativo mediante la generación de ROS específicas (O_2^- , H_2O_2 y OH) al ser incubadas con el metaloide.

En la célula, el estrés oxidativo induce la vía Nrf2-Keap1 y promueve la expresión de enzimas de fase II, como SAM y GSTA, por lo que esta vía podría ser considerada como un mecanismo de defensa ante el estrés oxidativo (figura 2).

Recientemente, se ha reportado que la activación de la vía de Nrf2 confiere protección contra los efectos tóxicos inducidos por arsenito de sodio [As(III)] y ácido monometilarsenoso [MMA(III)] (Pi *et al*, 2003).

Nrf2-Keap1-ARE: mecanismo antioxidante

Con la finalidad de disminuir el efecto nocivo del estrés oxidativo, la célula ha desarrollado diferentes mecanismos antioxidantes, entre los que destaca el regulado por la ruta de señalización Nrf2-Keap1. Nrf2 (del inglés nuclear factor erythroid 2-related factor 2) es un

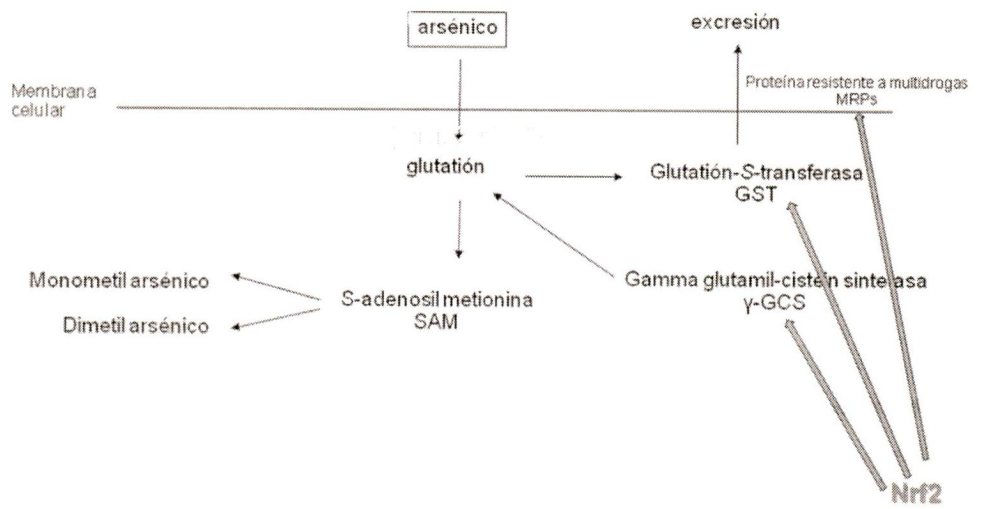


Figura 2. Metabolismo celular del arsénico.

factor de transcripción de la familia de las proteínas con “zipper” de leucinas que regula la expresión de diversas enzimas antioxidantes y detoxificantes, a través de su unión a sitios ARE (elemento de respuesta antioxidante), las cuales están conformadas por la secuencia consenso 5'-tgcTGA(G/C)tcaGCA-3' (figura 3). Bajo condiciones normales, Nrf2 es retenido en el citoplasma donde se induce su degradación a través de la interacción con su proteína represora Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Sin embargo, en presencia del estrés oxidativo, Nrf2 es fosforilada y se libera de Keap1 lo que promueve su translocación al núcleo donde forma heterodímeros con proteínas de la familia small-Maf (MafF, MafG y MafK) e induce la expresión de una batería de genes antioxidantes y detoxificantes que contienen sitios ARE (Zhang y Gordon, 2004; Chen y Kong, 2005).

La activación de los sistemas de defensa endógenos mantiene la homeostasis celular redox y varias de las enzimas que son activadas en respuesta a estrés oxidativo contienen en sus promotores a secuencias ARE. Los antioxidantes clásicos como CAT y GPx directamente neutralizan e inactivan reacciones mediadas por ROS, por ejemplo GPx emplea el glutatión producido por la GSR para mantener el balance redox. Entre los genes regulados por Nrf2 se encuentran diversas enzimas del metabolismo de fármacos como la glutatión *S*-transferasa (GST), proteínas transportadoras como la proteína multirresistente a drogas 2 (MRP2) y enzimas antioxidantes como la NAD(P)H:quinona oxidoreductasa-1 (NQO1), la hemoxygenasa 1 (*HO-1*) y la γ -glutamil cisteína sintetasa (γ -GCS).

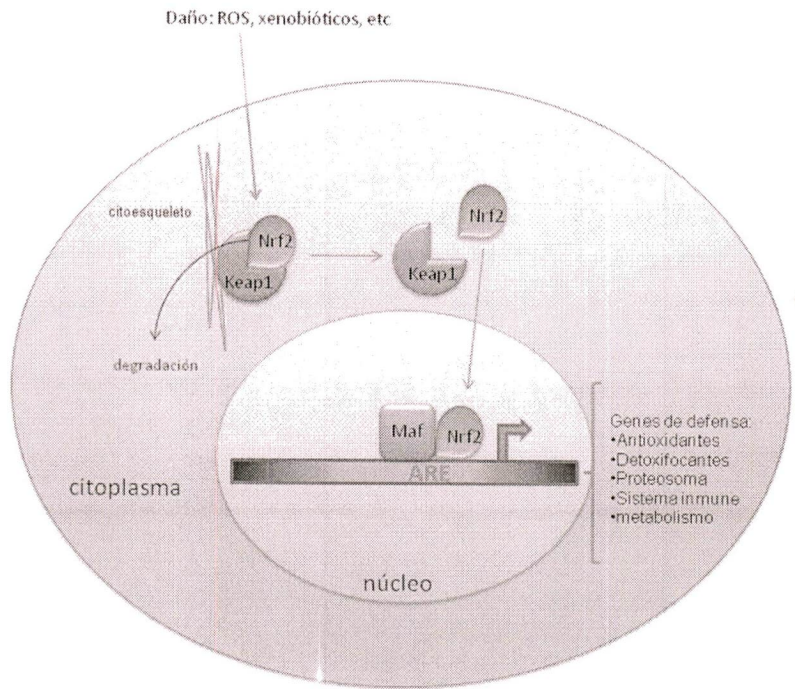


Figura 3. Esquema general de la ruta antioxidante Nrf2-Keap1.

La ruta de señalización protege a la célula contra diversos agentes oxidantes y carcinógenos, incluyendo el As. Experimentos realizados con células de epitelio de vejiga (UROtsa) mostraron que el silenciamiento de Nrf2 con RNA de interferencia, incrementaba la toxicidad del As y de uno de sus metabolitos, el MMA (He *et al.*, 2006). En este mismo trabajo se demostró que la activación de la ruta con sustancias quimiopreventoras tert-butil hidroquinona (tBHQ) y sulforafán (SF) disminuían la citotoxicidad a As(III) y MMA(III).

Gen NRF2 y estructura de Nrf2

La proteína Nrf2 está codificada por el gen *NRF2*, que se encuentra en el cromosoma 2 (2q31) y está constituido por 5 exones y 4 intrones (Yamamoto *et al.*, 2004). La expresión del gen ocurre en prácticamente todos los tejidos, aunque es particularmente abundante en mucosa gástrica y pulmón, donde permanentemente hay generación de daño por estrés oxidativo (Zhang, 2006). Se ha reportado que en el ratón, los niveles del mensajero de *nrf2* pueden incrementarse levemente en condiciones de estrés oxidativo en algunos tipos celulares y estos se debe a una secuencia ARE en el promotor, lo que ocasiona una autorregulación positiva. En el humano se localiza una secuencia similar a ARE (ARE-like) que no se ha analizado por completo y aunque se considera a la regulación postraduccional de Nrf2 como la principal regulación de la vía, la inducción con diversos xenobióticos genera incrementos consistentes (aunque moderados) de los niveles del mensajero de *NRF2* (Yamamoto *et al.*, 2004).

Nrf2 es una proteína que comparte la estructura modular con otros factores de transcripción, con un dominio de transactivación y un dominio de unión al DNA que regulan su actividad transcripcional. Los dominios de transactivación Neh4 y Neh5 interactúan con la maquinaria de transcripción basal y adicionalmente con el coactivador

CBP para promover la activación transcripcional. El dominio Neh6 está considerado el dominio de degradación; en condiciones de estrés oxidativo este dominio no es sensible al estado redox de la célula. El dominio de amino-terminal Neh2 funciona como el dominio de interacción con Keap1, que retiene a Nrf2 en el citoplasma bajo condiciones de homeostasis, mientras que el dominio Neh3 contiene la señal de localización nuclear requerida para el reclutamiento de Nrf2 al núcleo durante el estrés oxidativo. Cerca del carboxilo-terminal se encuentran los dominios “cap and collar” (CNC) y de “zipper” de leucinas, los cuáles son lo dominio de dimerización con proteínas Maf y de unión a la secuencia ARE (Bloom y Jaiswal, 2003).

Nrf2 puede ser degradado por dos mecanismos; la degradación proteosomal durante la homeostasis y la degradación independiente de Keap1 en el núcleo en condiciones de estrés oxidativo. Ambos tipos de degradación requieren de la interacción con el dominio Neh6 de Nrf2. Recientemente se ha descrito un arreglo de leucinas en una estructura hélice alfa del dominio Neh2 amino-terminal de Nrf2, el cuál es necesario para el marcaje con ubiquitina mediada por Keap1 en el citoplasma. Las mutaciones en estos residuos disminuyen la afinidad de Nrf2 por el dominio Kelch de Keap1. La degradación independiente de Keap1 es activada a través del dominio Neh6 de Nrf2, que regula la degradación de la proteína en el núcleo en condiciones de estrés oxidativo. Esta degradación de Keap1 ocurre exclusivamente en el núcleo, ya que en este compartimento se encuentra restringida la ubiquitin-ligasa necesaria (Pi *et al*, 2007).

La activación de la vía de Nrf2 involucra mecanismos que interfieren con el complejo Keap1-Nrf2 y puede incluir modificaciones postraduccionales que afectan la afinidad de unión entre los dominios Kelch de Keap1 y Neh2 de Nrf2 o la interacción con las proteínas Maf o con la maquinaria de transcripción basal. La estabilidad intracelular está determinada

por la tasa de degradación por ubiquitinación y puede regular la estabilidad de Nrf2 y su actividad transcripcional. Nrf2 tiene una vida media de 10 a 30 minutos. Los niveles basales de Nrf2 son mantenidos por una tasa constante de síntesis y degradación y se cree que la fosforilación de la proteína constituye un mecanismo de regulación de la estabilidad de la proteína, que se considera el más importante de la vía.

HO-1 y NQO1

La expresión de diversas enzimas que participan en las síntesis, metabolismo y exportación de glutatión son finamente reguladas por secuencias ARE para mantener en orden distintas funciones celulares como la apoptosis, el metabolismo, la proliferación y la transcripción. Por otra parte, los antioxidantes facilitan la conversión de metabolitos de especies reactivas, como quinonas, peróxidos y aldehídos a especies reducidas mediante reacciones de conjugación/reducción. Dos de los genes blanco más estudiados de Nrf2, son los genes *HO-1* y *NQO1*, que participan en procesos antioxidantes. De esta forma, *NQO1* convierte las semiquinonas e hidroquinonas en productos menos reactivos, por medio de reacciones de reducción por transferencia de electrones, protegiendo a las membranas celulares de la peroxidación (Nioi y Hayes, 2004). La inducción de *NQO1* ocurre a través de un elemento de respuesta a xenobióticos (XRE) o del elemento ARE. La secuencia ARE (TGACTCA) de *NQO1* se activa por estrés oxidativo y se ha empleado ampliamente en promotores heterólogos para evaluar respuesta celular a este tipo de daño. Proteínas que responden a estrés como *HO-1* también protegen de las agresiones por estrés oxidativo y contribuyen a mantener el balance redox. HO-1 cataliza la degradación oxidativa del grupo hemo,

liberando biliverdina, CO y el ión hierro como productos antioxidantes. Convencionalmente HO-1 es inducida por el grupo hemo, existen numerosos reportes que señalan la inducción de la expresión de HO-1 por hiperoxia y diversos xenobióticos, como el As, que generan estrés oxidativo en varios tipos celulares con efectos protectores.

Nrf2 y cáncer

La respuesta celular al daño a través de la vía Nrf2-Keap1 juega un papel importante en el desarrollo de diversas enfermedades, entre las que destaca el cáncer. En modelos animales se ha demostrado que la delección germinal del gen que codifica para nrf2, incrementa el riesgo para desarrollar diversos tipos de tumores después de su exposición a una amplia gama de carcinógenos. Por otro lado, la capacidad anti-carcinogénica de algunos quimiopreventores derivados de la dieta, como el oltipraz y el sulforafán, depende por completo de la funcionalidad de la ruta Nrf2-Keap1 (Iida *et al*, 2004; Chen y Li, 2006; Xu *et al*, 2006). Estos hallazgos han llevado a proponer a la vía Nrf2-Keap-1 como un sistema quimiopreventor del cáncer. Sin embargo, se ha reportado la sobre-expresión de Nrf2 en biopsias de tumor de cuello y cabeza y la presencia de mutaciones inactivadoras en Keap-1, tanto en biopsias de tumor de pulmón como en líneas celulares derivadas de la misma neoplasia (Singh *et al*, 2006), por lo que se ha propuesto que la vía Nrf2-Keap1 podría desempeñar un papel dual en el desarrollo del cáncer, dependiendo del momento de su activación. De esta forma, la activación de la ruta en células normales evitaría el efecto carcinogénico del estrés oxidativo y en células neoplásicas su activación constitutiva podría actuar como protectora contra el ambiente altamente oxidante del tumor y por lo tanto promover su desarrollo. Además, Nrf2 puede inducir la expresión de enzimas que

participan en el metabolismo y excreción de diversos fármacos antineoplásicos, confiriendo resistencia al tumor contra la terapia. En la actualidad aun existen muchos aspectos por entender de la participación de la vía Nrf2-Keap1 en el desarrollo de cáncer, principalmente en lo que respecta al papel que desempeñan distintas variantes genéticas en la activación de la vía.

Polimorfismos en NRF2 y actividad transcripcional

Estudios de clonación posicional en ratón identificaron a *nrf2* como el elemento clave de la activación de enzimas que contienen elemento ARE reguladas en respuesta a la hiperoxia. Reportes subsecuentes demostraron su inducción en respuesta a tBHQ, sulforafán y otros inductores, lo que resulta en la activación de enzimas inducibles por ARE. Los ratones *nrf2*^{-/-} presentan un incremento en la inflamación y daño pulmonar, lo que demuestra la importancia de este factor en la defensa contra el daño por estrés oxidativo (Ramos-Gomez *et al*, 2001).

Se ha demostrado que en al menos en ratón, *nrf2* es capaz de regular su propia transcripción a través de secuencias similares a ARE (ARE-like) localizadas en la región proximal del promotor. De las dos secuencia ARE-like presentes, AREL1 corresponde a la secuencia consenso ARE, mientras que el elemento AREL2 contiene una base adicional antes de la caja GC (-754, TGACTgtGGC). Mutaciones en el núcleo TGAC de la secuencia AREL1 ó AREL2, inhiben la activación del promotor en respuesta al antioxidante fenólico 3H-1,2-dithiol-3-tiona (D3T) en células PE derivadas de queratinocitos de ratón. Además, ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) han demostrado la unión de *nrf2* a una región que incluye a la secuencia AREL2 de su propio promotor. La utilización de promotores

heterólogos con la secuencia AREL2 ha permitido demostrar la activación de esta secuencia en respuesta a D3T. Estos resultados indican que la activación transcripcional del promotor de *nrf2* también juega un papel importante en la activación de la defensa por estrés oxidativo, al menos en ratón. Hasta el momento no existen reportes de la inducción de la expresión de Nrf2 en el humano como respuesta al estrés oxidativo, por lo que se desconoce si esta activación también ocurre en células humanas. El promotor de *NRF2* en el humano presenta un sitio ARE-like que no corresponde al consenso de la secuencia ARE y aunque se ha reportado la presencia de un polimorfismo en dicho elemento, su efecto y el de otros polimorfismos que ocurren en el promotor no se conocen a detalle.

Diversos estudios de re-secuenciación han permitido identificar 14 diferentes polimorfismos en *NRF2* humano, aunque algunos de ellos han sido detectados con frecuencias muy bajas únicamente en población japonesa y sólo tres de ellos se han encontrado en individuos con diferente origen étnico (caucásicos, africanos, asiáticos y amerindios) (Marzec *et al*, 2007). Estos últimos se ubican en la región promotora del gen -617(C/A), -651(G/A) y -653(A/G) y son variantes de un solo nucleótido (SNPs) capaces de afectar la expresión del gen, reduciendo los niveles del RNA mensajero. Estudios de casos y controles han mostrado la asociación del polimorfismo -617 (localizado en la secuencia ARE-like), con un incremento a padecer daño agudo al pulmón y del SNP -653 con un incremento en el riesgo a desarrollar gastritis crónica.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un problema importante de salud pública debido a su alta incidencia, elevada mortalidad y alto costo socioeconómico. Por su parte, el As es uno de los carcinógenos más abundantes en el medio ambiente y está relacionado con el desarrollo de diversas neoplasias como cáncer de pulmón, vejiga, hígado y piel. Este compuesto es altamente citotóxico debido a la generación de ROS intracelular y el consecuente estrés oxidativo. Uno de los mecanismos de defensa más importantes en contra del estrés oxidativo es la vía de señalización Nrf2-Keap1. La activación de esta ruta en células normales participa en la prevención del cáncer al disminuir la presencia del estrés oxidativo y eliminar diversos carcinógenos. Por tal motivo esta vía de señalización ha sido propuesta como una herramienta eficaz en la prevención del cáncer. Particularmente en el caso del As, la ruta Nrf2-Keap1 protege eficazmente a las células contra sus efectos citotóxicos. Actualmente, se ha demostrado la activación de la ruta por As en células de pulmón, piel y vejiga; sin embargo no se conoce su respuesta en linfocitos, uno de los primeros tipos celulares con los que tiene contacto el As al entrar al cuerpo. Así, es necesario determinar si esta vía es capaz de responder a la presencia de genotóxicos como el As.

Por otra parte, es posible que SNPs en la región reguladora de *NRF2* modulen su expresión y respuesta al estrés oxidativo, por lo que es importante determinar su frecuencia en población mexicana para futuros estudios que conduzcan al entendimiento del efecto funcional de estos en la inducción de la ruta.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la participación de la ruta antioxidante Nrf2-Keap1 en la respuesta celular al As en una línea celular de origen linfocitario.

Objetivos particulares

- Determinar los niveles de expresión basal de los genes *NRF2*, *HO-1* y *NQO1* en células linfocitarias.
- Evaluar la inducción de los niveles de expresión de los genes *NRF2*, *HO-1* y *NQO1* por As en la línea celular de origen linfocitario NL-1.
- Determinar la frecuencia de los polimorfismos localizados en el promotor de *NRF2* -653(G/A), -651(G/A) y -617(C/A) en una muestra de población mexicana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Los ácidos nucleicos y la línea celular NL-1 fueron obtenidos a partir de sangre total extraída de 39 donadores voluntarios sanos que acudieron al banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría (INP). Todos los participantes fueron mayores de 18 años y firmaron la carta de consentimiento informado. La muestra estuvo conformada por 12 mujeres y 27 hombres.

Niveles de expresión basal de los genes NRF2, HO-1 y NQO1 y activación de la ruta Nrf2-Keap1 con arsenito de sodio

a) Obtención de la Línea celular NL-1

Extracción de células blancas

La línea celular NL-1 se generó a partir de linfocitos obtenidos de sangre periférica a través de un gradiente de Ficoll (Lymphoprep, Axis Shield) siguiendo las instrucciones del proveedor. Inicialmente se tomaron 10 mL de sangre total y se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 min. Posteriormente, se colectó el botón de leucocitos y se mezcló con un volumen de 5 mL de solución Hanks. Una vez homogenizada la suspensión celular, se vertió cuidadosamente sobre un gradiente de Ficoll. A través de su centrifugación a 2500 rpm durante 30 min, se promovió la formación de tres fases: una fase superior acuosa, la fase intermedia de células blancas y la de eritrocitos en la parte inferior. La capa de células blancas fue retirada cuidadosamente con una pipeta pasteur y transferida a un tubo limpio.

Las células recuperadas fueron lavadas al llevar el volumen obtenido hasta 8 mL con solución Hanks. Después de agitar suavemente las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se repitió el lavado con 8mL de solución Hanks. Finalmente, el botón es resuspendido en 5 mL de solución Hanks para su posterior conteo y determinación de viabilidad celular.

La viabilidad celular se determinó a partir de una alícuota de 450 μL de suspensión celular, a la cual se agregaron 50 μL de azul tripano al 0.4% (p/V). La suspensión celular se colocó en una cámara de Neubauer donde se contaron tanto las células vivas (aquellas capaces de excluir el azul tripano), como las células muertas (aquellas incapaces de excluir el azul tripano y por lo tanto teñidas de azul). El conteo se realizó en cuatro cuadrantes de 0.1 mm^3 * de volumen. Para obtener el número celular por mililitro se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{células / mL} = (\# \text{ de células}) (10^4) (\text{mL totales de suspensión celular})$$

en donde:

de células = promedio de células en los cuadrantes contados

10^4 = factor de conversión del área contada* en mL ($1 \text{ mL} = 1 \text{ cm}^3 = 1000 \text{ mm}^3$)

La viabilidad celular se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ viabilidad} = (\text{células vivas} / \text{células totales}) (100)$$

Una vez obtenido el número total de células, se congelaron en nitrógeno de 5-10 millones / mL en SFB y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO).

Inmortalización celular

Para la inmortalización del cultivo celular, se sembraron 4 millones de células en placas de 24 pozos con 2 mL de medio RPMI suplementado al 15% con SFB, 75% de una solución comercial del virus de Epstein Barr (VEB) (cepa 1492 de ATCC) y 1µg/mL de ciclosporina A para disminuir la citotoxicidad. La solución se resuspendió suavemente y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 hrs. Al término de la incubación se agregó 1mL de medio RPMI fresco suplementado con SFB al 15% y 1µg/mL de ciclosporina A para proseguir su incubación 72 hrs más, momento en el cual el crecimiento celular produjo el viraje del medio a un color amarillo. La inmortalización celular se confirmó al identificar por microscopía de luz la generación de prolongaciones en la membrana de las células y la formación de grandes cúmulos celulares.

Propagación de la línea celular NL-1

La línea celular NL-1 se propagó y se mantuvo a 37°C y 5% de CO₂ en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), el cual fue renovado cada tercer día cultivando de 300-500 mil células por mililitro de medio. La formación de cúmulos y el cambio de pH del medio (cambio de color rosado a amarillo) fue indicador de una buena proliferación. La viabilidad y el conteo se realizaron dos veces por semana para mantener el cultivo en buenas condiciones.

Extracción de RNA

La extracción de RNA a partir de cultivos celulares se realizó con el método de Trizol (INVITROGEN) siguiendo las especificaciones del proveedor. Para la extracción a partir de sangre total se utilizó Trizol LS (INVITROGEN).

Brevemente, se tomó 1mL de sangre total o hasta 10×10^6 células y se centrifugó a 2500 rpm para obtener un botón celular al cual se agregaron 750 μ L del Trizol correspondiente. El lisado celular fue homogenizado suavemente e incubado 5 min a TA para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Posteriormente, se purificó el RNA al añadir 200 μ L de cloroformo. La solución celular se agitó vigorosamente y se incubó 15 min a TA. Después, la mezcla se centrifugó a 11,000 rpm por 15 min a 4°C para generar la formación de una fase acuosa (RNA), una orgánica (fenol-cloroformo) y una interfase (desechos celulares). La fase acuosa se transfirió cuidadosamente a un tubo limpio donde para la precipitación del RNA se agregaron 0.5 mL de isopropanol. La solución se agitó suavemente y se incubó a TA por 10 min. El RNA fue empastillado por centrifugación a 11,000 rpm por 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavó el botón de RNA con 0.75 mL de etanol al 75%. A continuación, la muestra se agitó vigorosamente hasta desprender la pastilla para posteriormente centrifugar a 10000 rpm por 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por decantación y el exceso de etanol fue eliminado por evaporación a TA. Finalmente, la pastilla de RNA fue resuspendida en 30 μ L de agua libre de RNAsas. La concentración de las muestras fue determinada por espectrofotometría y su integridad evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 1%, durante 45 min a 80 volts.

Tratamiento con DNAsa

Para eliminar cualquier traza de DNA remanente, cada una de las muestras de RNA fue tratada con DNAsa (Turbo DNAsa Free, Ambion). Se colocaron 50 µg de ácidos nucleicos por cada 2 U de enzima (2U/µL) y se incubaron en el buffer de reacción a 37°C durante 30 min. Posteriormente se añadió el 10% (vol/vol) del reactivo de inactivación incubando por 2 minutos a TA, para después centrifugar a 10,000 g por 90 seg. La fase acuosa fue transferida cuidadosamente a un tubo limpio evitando tomar el precipitado del reactivo de inactivación. Cada muestra fue cuantificada nuevamente y su integridad fue determinada a través de su corrimiento en geles de agarosa al 1%, durante 45 min a 80 volts.

b) Expresión basal de la ruta Nrf2-Keap1 y su inducción por AS. Ensayo tiempo-respuesta

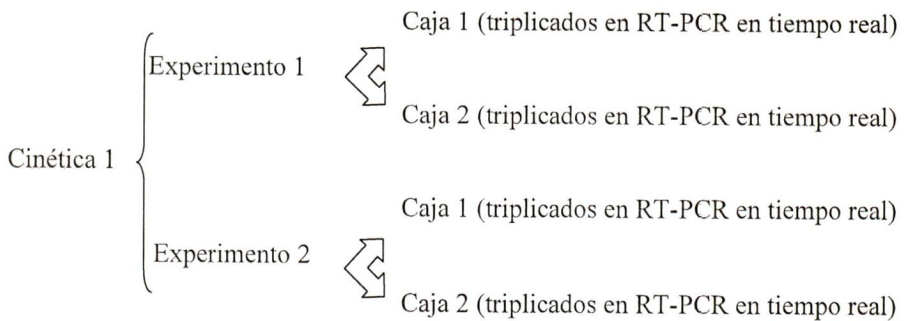
Para estos ensayos se utilizó la línea celular NL-1 derivada de linfocitos humanos, inmortalizada previamente con virus de Epstein Barr (VEB). Para la inducción de la ruta Nrf2-Keap1, se preparó una solución stock de arsenito de sodio 10 mM, se dividieron en alícuotas de 100 µL y se congelaron a -70°C.

La concentración de As utilizada para la inducción de la ruta fue de 5µM, reportada previamente en la literatura (He et al, 2006). En todos los casos se incluyó un cultivo de NL-1 sin As (tiempo 0) para determinar los niveles de expresión basal de los genes *NRF2*, *HO-1* y *NQO1*.

Para cada experimento se utilizaron dos botellas con 2 millones de células para cada tiempo (duplicados), sembradas 24 hrs antes, en 10 mL de medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal.

Los tiempos de exposición al As fueron los siguientes: tiempos cortos en intervalos de 20 min (20-120 min), tiempos intermedios a intervalos de 2 hrs (2-12 hrs) y tiempos largos a intervalos de 4 hrs (12-24 hrs). Una vez cumplidos los tiempos de inducción establecidos en cada experimento, se extrajo el RNA para los ensayos de expresión génica.

Para cada cinética se realizaron dos ensayos independientes en días diferentes (experimentos 1 y 2) y por duplicado para cada tiempo (ver esquema). Al final del experimento se obtuvieron 4 datos independientes de cada tiempo, los cuales, se corrieron por triplicado en los ensayos de expresión.



Evaluación de los niveles de expresión en punto final

Como un primer acercamiento para la evaluación de los niveles de expresión de los genes *NRF2*, *HO-1* y *NQO1* al inducir la ruta Nrf2-Keap1 con As, se realizaron ensayos de RT-PCR en punto final.

Para la obtención del cDNA necesario para los ensayos de expresión génica (tanto de punto final como de tiempo real), se utilizó el kit TaqMan (reverse transcription reagents, de

Applied Biosystems) siguiendo las especificaciones del proveedor. Se colocó 1µg de RNA, 5 pM de oligo dT y agua libre de nucleasas suficiente para un volumen final de 8.7µL y se incubó a 70°C por 5 min (para desnaturalizar las estructuras secundarias que pudiera estar formando el RNA) y se colocó en hielo. Posteriormente se agregaron 2 µL de buffer 10X, 10 mM cloruro de magnesio, 4 mM de dNTPs y 8 U de inhibidor de RNAsa y se incubó 5 min a 37°C, al terminar se colocó en hielo. Después, se agregaron 25 U de enzima MMLV y se incubó a 37°C por 60 min y se guardó a -20°C. El volumen final de la reacción es de 20µL.

Para determinar la expresión génica de cada uno de los genes, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para los genes *GAPDH*, *NRF2*, *HO-1* y *NQO1* con los programas Primer Premier y Primer Express.

GAPDH

(Forward) 5'-CATCTCTGCCCCCTCTGCTGA-3'

(Reverse) 5'-GGATGACCTTGCCCACAGCCT-3'

NRF2

(Forward) 5'-CAGCGACGGAAAGAGTATGAGC-3'

(Reverse) 5'-ATGTGGGCAACCTGGGAGTGAT-3'

HO-1

(Forward) 5'-TCCCGCAGTCAGGCAGAGG-3'

(Reverse) 5'-ACGGGGGCAGAATCTTGAC-3'

NQO1

(Forward) 5'-CATGGTCGGCAGAAGAGCACT-3'

(Reverse) 5'-AGTTCGCAGGGTCCTTCAGTTTAC-3'

El termociclado en los ensayos de punto final fue el siguiente:

temperatura	tiempo	ciclos
94°C	4 min	
94°C	1 min	
60°C *	1 min	25
72°C	45 seg	
60°C	1 min	
72°C	7 min	
4°C	∞	

oligonucleótidos	Temperatura de alineamiento*
GAPDH	60°C
Nrf2	60°C
HO-1	60°C
NQ01	64°C

* La temperatura de alineamiento varió dependiendo del par de oligonucleótidos utilizados en cada reacción de PCR.

El producto de PCR se corrió en geles de agarosa al 2.5% a 80 volts durante 40 min.

c) Evaluación de los niveles de expresión por Tiempo Real

La reacción de amplificación en tiempo real se realizó con el equipo de Applied Biosystems 7900, utilizando Sybr green como fluoróforo y los mismos pares de oligonucleótidos que en la PCR de tiempo final. Para esta reacción se utilizaron 12.5µL del master mix de Sybr green 2X para PCR, 1µM de primer forward, 1µM de primer reverse, 200ng de cDNA y agua suficiente para un volumen final de 25µL. Las reacciones se corrieron en placas de 96

pozos.

El protocolo de amplificación fue el siguiente:

temperatura	tiempo	ciclos
95°C	10 min	
95°C	15 seg	40
60°C	1min	
4°C	∞	

Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó a partir de 10mL de sangre total, utilizando un kit comercial (QIAamp maxi kit de QIAGEN) basado en el uso de columnas de afinidad, siguiendo las especificaciones del proveedor. Brevemente, la muestra sanguínea se centrifugó a 2500 rpm durante 20 min., donde se obtuvieron las siguientes tres fases: una fase superior conformada por el plasma, la fase intermedia de células blancas y una fase inferior de eritrocitos. Posteriormente, el botón de células blancas fue colocado en un tubo nuevo de 50mL donde se agregaron 500 µL de proteasa y se agitó vigorosamente en un vortex. Para permitir la completa lisis celular, se añadieron 12 mL de buffer AL a la suspensión celular y se incubó a 70°C por 10 min. A continuación el homogenizado celular se transfirió a la columna de afinidad y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min. Después de decantar los desechos celulares la columna fue lavada con 5 mL de los amortiguadores AW1 y AW2. En el primer caso las columnas fueron centrifugadas a 5000 rpm por 1min y sin decantar el primer amortiguador, se agregó el segundo para centrifugar las columnas durante 15min. Posteriormente, la columna se transfirió a un tubo nuevo donde el DNA fue

eluido con 1 mL de buffer TE al incubar 5min a temperatura ambiente (TA) y centrifugando 5 min a 5000 rpm. Finalmente, el DNA fue colectado para su posterior cuantificación y dilución en soluciones de trabajo a una concentración de 100 ng/ μ L. Las muestras fueron almacenadas a 4°C.

Genotipificación de polimorfismos de la región promotora de *NRF2*

PCR

La genotipificación de las 39 muestras de DNA obtenidas de sangre total se realizó a través de la secuenciación automatizada de un producto de PCR que amplifica todos los polimorfismos de la región promotora de *NRF2* (-653, -651 y -617). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento (secuencia), fueron diseñados con los programas Primer express y Primer premier y se muestran a continuación:

Forward 5'-TTCCCGTTTTTCTCCCAGC-3'

Reverse 5'-TTCGCAGTCACCCTGAACG-3'

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 μ L con 2.5 μ L de buffer de reacción 10X, 2 mM de MgCl₂, 200mM de dNTPs, oligonucleótidos 100 μ M, 100 ng/ μ L de DNA genómico y 1.25 U de Taq polimerasa (Applied Biosystems). Los ciclos de temperatura utilizados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Termociclado para amplificación por PCR.

temperatura	tiempo	Ciclos
94°C	10 min	
94°C	1 min	
63°C	1 min	30
72°C	45 seg	
72°C	7 min	
4°C	∞	

Los productos de PCR obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2.5% por 40min a 80V.

Purificación de los fragmentos de PCR

Una vez realizada la amplificación y visualizadas en geles de agarosa los productos de PCR, estos fueron purificados por columnas de afinidad a través de un kit comercial, QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) para eliminar los reactivos y productos remanentes en la reacción de amplificación y que puedan interferir en el proceso de secuenciación. La purificación se realizó siguiendo las especificaciones del proveedor. Para permitir la unión del DNA a la columna se agregaron 250 µL de buffer PB por cada 50 µL de producto de PCR. Inmediatamente se transfirió la mezcla a las columnas de afinidad y fueron centrifugadas durante 1 min a 13000 rpm.

Después de decantar el filtrado, se lavó el DNA unido a la membrana de la columna al añadir 0.75 mL de buffer PE a la columna y centrifugar 1 min a 13000 rpm. El filtrado fue decantado nuevamente y la columna fue centrifugada una vez más 1 min a 13000 rpm, sin

agregar reactivo alguno, con la finalidad de retirar cualquier residuo de etanol. Posteriormente, la columna se transfirió a un tubo nuevo y limpio de 1.5 mL y se agregaron 30 μ L de agua a 37°C para eluir el DNA. Las muestras se incubaron 1 min a TA y se centrifugaron 1min a 13000 rpm.

Secuenciación

Las diferentes muestras fueron secuenciadas a través del dGTP Dye Terminator kit (Applied Biosystems) en un secuenciador automático Hitachi Genetic Analyzer 3130x. La reacción de secuenciación es una modificación del método de Sanger, en donde se utilizan dideoxinucleótidos marcados (para las cuatro bases del DNA, cada uno con un fluoróforo diferente) que al incorporarse a la secuencia de DNA por la DNA polimerasa, impiden la unión del siguiente nucleótido. Estos fragmentos corren a través de un polímero especial donde son identificados por el equipo, por su tamaño y por el último nucleótido incorporado en el extremo 5' el cual emite fluorescencia a una determinada longitud de onda. Las secuencias obtenidas se analizaron con el software del instrumento.

Discriminación alélica por TaqMan

Una vez que se sabía que SNPs debíamos buscar por medio del ensayo anterior en las 39 muestras, se genotipificaron 213 muestras de controles sanos por TaqMan.

Los ensayos de discriminación alélica se realizaron a través del uso de sondas específicas para cada uno de los alelos de los polimorfismos analizados. Los oligonucleótidos flanquean la región donde hibrida la sonda. Cada sonda está marcada en el extremo 5' con un fluoróforo distinto, los cuales emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda (VIC

y FAM). En el extremo 3' contienen un quencher (TAMRA) que suprime la emisión de fluorescencia cuando la sonda está intacta. Al llevarse a cabo la reacción de PCR, los oligonucleótidos y la sonda, hibridan con su secuencia complementaria en el DNA templado. Dependiendo del alelo presente en la muestra es la sonda que hibrida. A través de la actividad 5' exonucleasa de la polimerasa, la sonda que hibrida al SNP específico es degradada, por lo tanto el fluoróforo se libera del quencher y la fluorescencia es emitida. De esta forma, es posible discriminar la presencia de los alelos en las muestras y determinar su genotipo. La discriminación de la fluorescencia se realizó en un equipo de tiempo real 7900 de ABI. Tanto las sondas como los oligonucleótidos fueron adquiridos en Applied Biosystems (ABI).

Los oligonucleótidos y las sondas TaqMan utilizadas fueron las siguientes:

SNP -617

Oligonucleótidos

Forward 5'-TCAGGGTGACTGCGAACAC-3'

Reverse 5'-CAGTGGGCCCTGCCTAG-3'

Sondas

VIC 5'-CTGCCGGAGCTGT-3' forward

FAM 5'-CTGCCGGCGCTGT-3' forward

SNP -653

Oligonucleótidos

Forward 5'-GAATGGAGACACGTGGGAGTT-3'

Reverse 5'-AGCTCGTGTTTCGAGTCA-3'

Sondas

VIC 5'- AACGCCCTCCTCTG-3' reverse

FAM 5'- AACGCCCCCCTCTG-3' reverse

RESULTADOS

Expresión basal de NRF2, HO-1 y NQO1

Inicialmente, se evaluó la expresión basal de *NRF2* y dos de sus genes blanco *HO-1* y *NQO1*, en la línea celular inmortalizada de origen linfocitario NL-1 a través de RT-PCR. En la figura 4 se muestra la amplificación por RT-PCR de los genes *NRF2*, *HO-1* y *NQO1* en ensayos realizados por duplicado. Las bandas de *NRF2* y *NQO1* presentan una intensidad similar, mientras que la expresión de *HO-1* es menor, sugiriendo que la expresión de los dos primeros genes es mayor que la de *HO-1* en la línea celular linfocitaria NL-1. La normalización de los niveles de expresión se realizó utilizando como control interno al gen constitutivo *GAPDH*.

Inducción de la ruta Nrf2-Keap1 por As

La evaluación de la activación de la ruta Nrf2-Keap1 en las células NL-1 se realizó mediante la exposición de estas células al As en tres distintos esquemas de tiempo: cortos, de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 min; intermedios de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 hrs y largos de 12, 16, 20 y 24 hrs. En todos los ensayos se determinó la viabilidad celular (figuras 5 y 6) la cual estuvo por arriba del 90%. Es importante resaltar que cada ensayo fue realizado en al menos 2 repeticiones independientes y cada una de ellas por duplicado.

Para determinar si el As es capaz de activar la ruta Nrf2-Keap1 en células linfocitarias, la línea celular NL-1 fue incubada durante 12 hrs con 5 μ M de As. Tanto la concentración como el tiempo de exposición fueron reportados previamente en diferentes tipos celulares. Se analizaron cada 2 hrs los niveles de RNA mensajero de los genes *NRF2*, *HO-1* y *NQO1*.

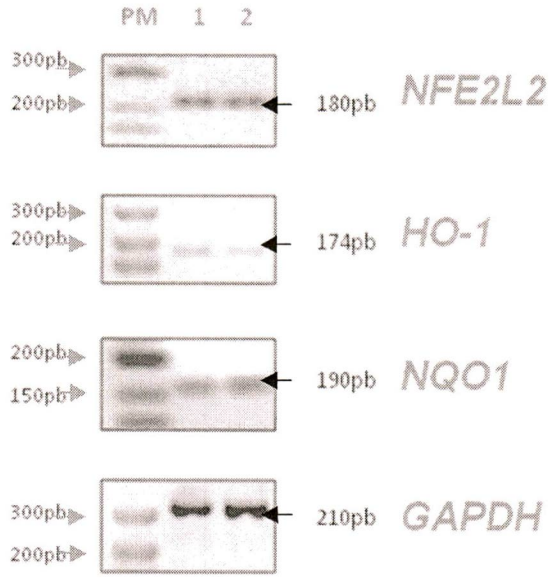
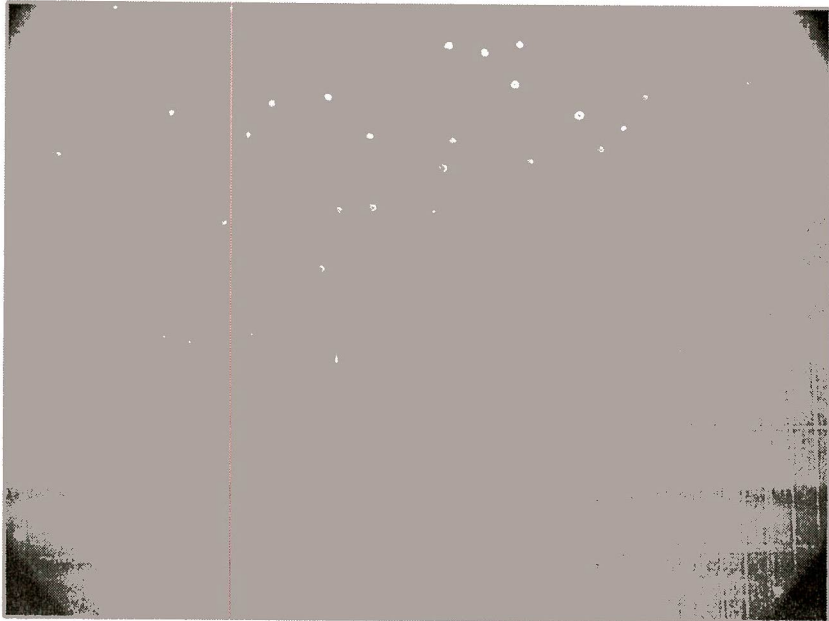


Figura 4. Expresión basal de los genes *NRF2*, *HO-1* y *NQO1* en el cultivo celular NL-1 en geles de agarosa al 2.5% por RT-PCR (carriles 1 y 2) de células NL-1. Los controles de RT- fueron negativos (datos no mostrados). Como control interno se utilizó *GAPDH*.



- Células vivas
- Célula muerta

Figura 5. Viabilidad celular con azul tripano en una cámara de Neubauer, 10X. Suspensión celular con azul tripano al 0.4%. Las células vivas se observan translúcidas con un halo brillante alrededor. Las células muertas se observan de color azul.

Viabilidad celular

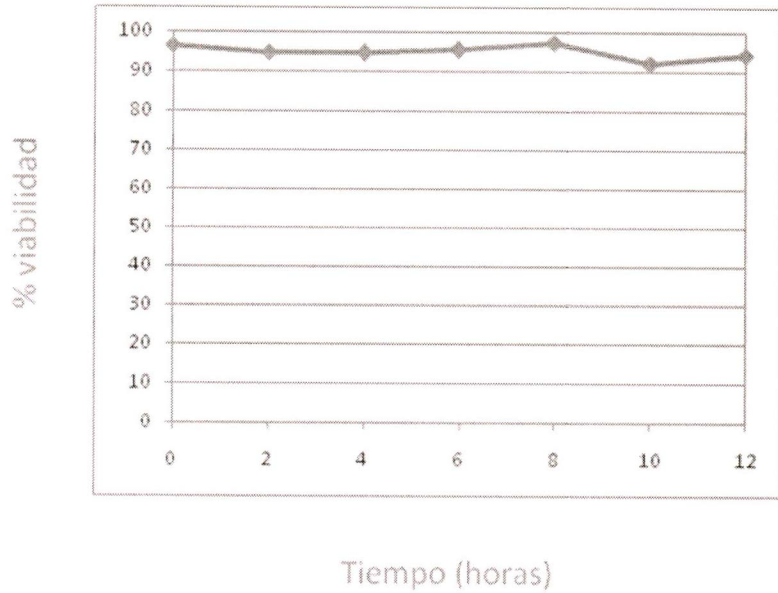


Figura 6. Viabilidad celular a diferentes tiempos de exposición con As 5 μ M por 2, 4, 6, 8, 10 y 12 hrs, 0 es el control sin tratamiento. La viabilidad permanece por arriba del 90% a todos los tiempos.

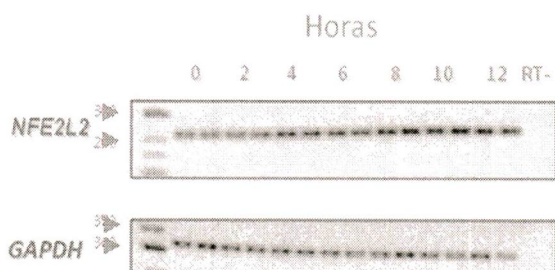
En la figura 7 se observa el incremento gradual en la intensidad de las bandas obtenidas para *NRF2* a partir de las 4 horas con respecto al control sin tratamiento (figura 7a). Estos resultados sugieren un incremento en la expresión de este gen inducido por el As.

En lo concerniente a *HO-1*, algunos autores consideran que la expresión incrementada de este gen es un marcador de exposición al As (Elbirt y Bonkovsky, 1999; Hirano *et al*, 2003). Cabe hacer notar que los niveles de *HO-1* se encuentran elevados con respecto al control desde las 2 hrs de incubación y se mantienen altos al menos hasta las 12 hrs de tratamiento (figura 7b). Estos datos sugieren que la expresión de *HO-1* se induce desde tiempos muy tempranos en respuesta al As y que se mantienen elevados mientras el As esté presente. En el caso de la expresión de *NQO1*, aparentemente no hubo cambio alguno en los tiempos de exposición (figura 7c) como en los otros dos genes. Este primer ensayo sugiere que al menos la expresión de los genes *NRF2* y *HO-1* es inducida con la exposición de As en una línea celular linfocitaria y por primera vez muestra la inducción de la ruta Nrf2-Keap1 en linfocitos.

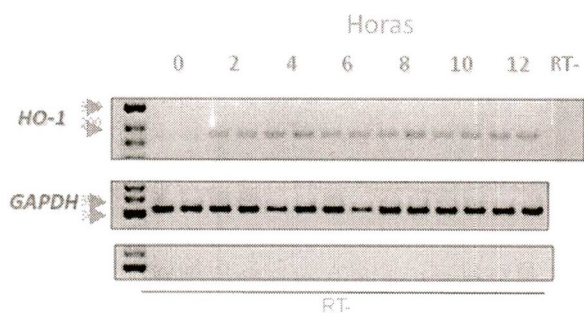
Para poder cuantificar de una forma más precisa las variaciones en la expresión de *NRF2* y sus genes blanco *HO-1* y *NQO1* se realizaron experimentos de RT-PCR en tiempo real en los mismos tiempos de exposición.

Para asegurarse de que los amplificadores obtenidos eran derivados del gen de interés se realizaron curvas de disociación de los oligonucleótidos diseñados (figura 8). Como se puede observar, la disociación de los oligonucleótidos mostraron un pico único, lo que indica la formación de un solo amplicón y que estos reconocen las secuencias específicas deseadas, sin embargo, para confirmar esta observación, el amplicón fue secuenciado y validado comparando con la secuencia reportada en NCBI (secuencia de referencia) para

a)



b)



c)

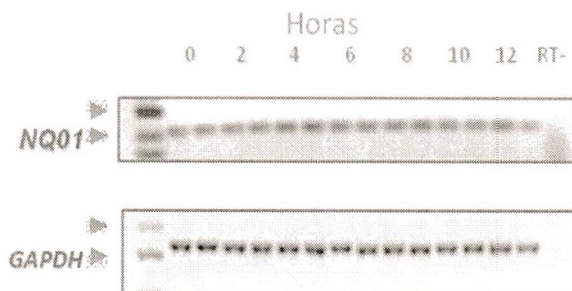


Figura 7. RT-PCR en punto final de la expresión relativa de *NRF2*, *HO-1* y *NQO1* a diferentes tiempos de exposición con As 5 μ M (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 hrs). Electroforesis en geles de agarosa al 2.5 %.

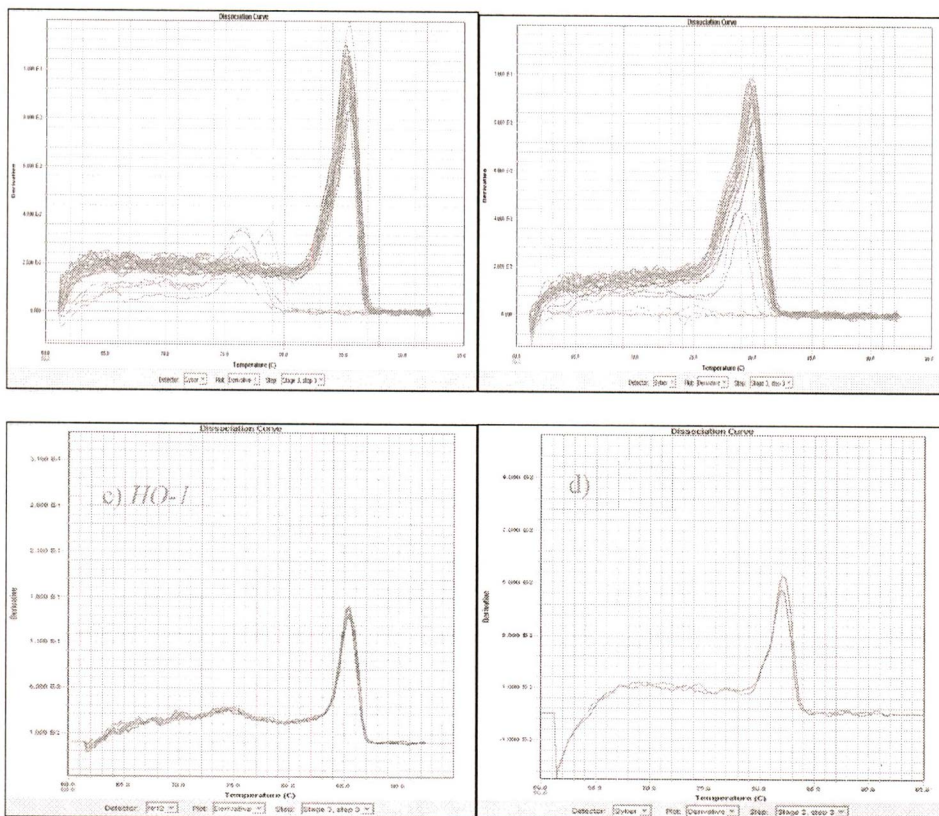


Figura 8. Curvas de disociación para los oligonucleótidos diseñados para los diferentes genes analizados obtenidas después de la PCR en tiempo real. a) *GAPDH*, b) *NRF2*, c) *HO-1* y d) *NQO1*.

corroborar que se trataba de la amplificación de la región génica de interés y no de productos inespecíficos.

Como se puede apreciar en la figura 9, la expresión de *NRF2* aumenta casi al doble de lo observado en el control desde las 4 hrs de incubación, mientras que la de *NQO1* no muestra diferencias significativas con respecto al control sin tratamiento.

De manera interesante la expresión de *HO-1* aumenta 6 veces desde las 4 hrs, alcanzando un incremento de hasta 7 veces mayor que su expresión basal en el último tiempo de la cinética. Es de llamar la atención que el incremento en los niveles de *NQO1* debido a la exposición con As fue muy bajo con respecto a lo reportado previamente. De hecho, al comparar los niveles obtenidos en este trabajo con lo reportado por He y cols., podemos observar que en un tiempo similar de exposición al As 5 μ M (5hrs) en una línea celular derivada de hepatocitos, la inducción alcanza casi 3 veces más que el control, en cambio, en la línea NL-1 utilizada en este trabajo la inducción es casi igual a la del control a 4 hrs de exposición (figura 10).

Debido a que los niveles de RNA de *NRF2* y *NQO1* se encuentran incrementados desde las 2 hrs de exposición al As y se mantienen elevados hasta las 12 hrs, se procedió a identificar su inducción a tiempos más cortos (20-120 min) de exposición utilizando la misma concentración de As (5 μ M).

En la figura 11 se observa un aumento de más de 2.5 veces en la expresión de *HO-1* desde los 20 min después de la exposición a As con un aumento en el paso del tiempo, donde a los 120 min llega a ser de hasta 4 veces más que el control. Los niveles de *NQO1* no sufrieron modificación alguna durante todo el experimento. La viabilidad celular en estos

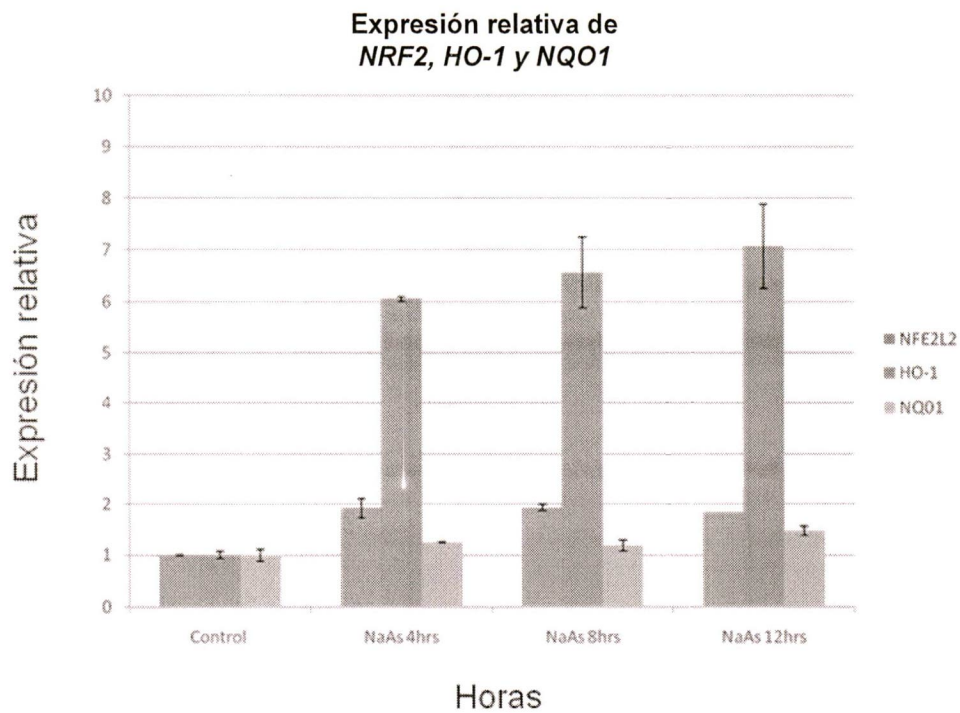


Figura 9. Expresión relativa de *NRF2*, *HO-1* y *NQO1* analizados por RT-PCR en tiempo real normalizados con *GAPDH* en células NL-1 expuestas a $5\mu\text{M}$ de As a intervalos de 4 horas, de 4 a 12 horas.

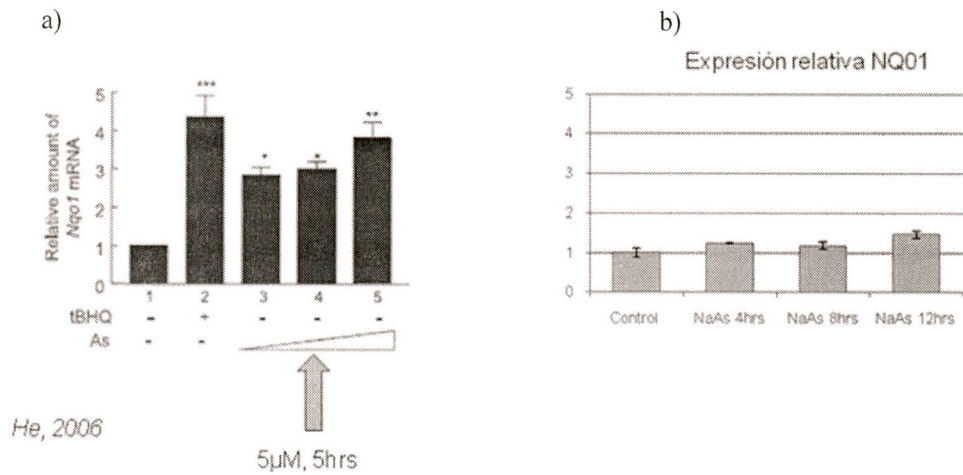


Figura 10. Comparación de la expresión relativa de *NQO1* en hepatocitos (izquierda) (He et al, 2006) y de la línea linfocitaria NL-1 (derecha).

Expresión relativa de
NRF2, *HO-1* y *NQO1*

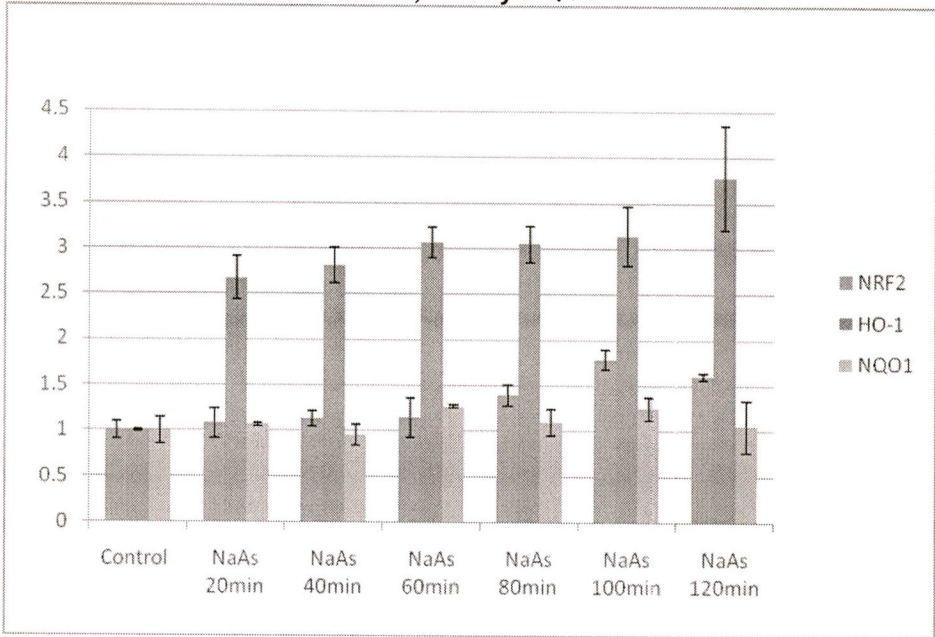


Figura 11. Experimento representativo de la expresión relativa de *NRF2*, *HO-1* y *NQO1* analizados por RT-PCR en tiempo real normalizados con *GAPDH* en células NL-1 con 5 μ M de As en un intervalo de 20 a 120 minutos.

experimentos permaneció por arriba del 90% figura 12. En el caso de *NRF2*, sus niveles de mensajero se elevan ligeramente al final del tratamiento.

En cuanto a los tiempos de exposición largos, la respuesta de Nrf2-Keap1 fue dependiente del tiempo de exposición al As y la inducción de *HO-1* mucho mayor que en *NFR2* y *NQO1*. En el caso de *NRF2* se incrementó casi hasta dos veces más con respecto al control a lo largo de todo el tiempo de exposición figura 13.

La expresión relativa de *HO-1* se eleva más de 7 veces a las 12hrs y sigue incrementando, de tal forma que a las 24 hrs, ésta es más de 15 veces que su expresión basal (tiempo 0). En el caso de *NQO1* se induce la expresión en niveles menores a 2 en todos los tiempos. Es importante señalar que a partir de las 16 hrs de exposición, la viabilidad celular disminuye ostensiblemente respecto al aumento en el tiempo de exposición al As llegando hasta casi el 50% a las 24hrs de tratamiento (figura 14).

Estos resultados sugieren que existe una expresión diferencial de los genes blanco de Nrf2 y metabolismo del As entre células de origen linfocitario y otros tipos celulares como las derivadas de hepatocitos, vejiga y piel.

Determinación de frecuencias genotípicas y alélicas

Debido a que los resultados anteriores sugieren que la ruta Nrf2-Keap1 es inducida en linfocitos por genotóxicos ambientales como el As, es importante investigar la frecuencia de los SNPs -653 G/A, -651 G/A y -617 C/A presentes en la región promotora de *NRF2*, ya que no se conoce el efecto de dichos SNPs en la actividad de la ruta y con el propósito de que en trabajos futuros se pueda evaluar si existe correlación de estos polimorfismos con la

Viabilidad celular

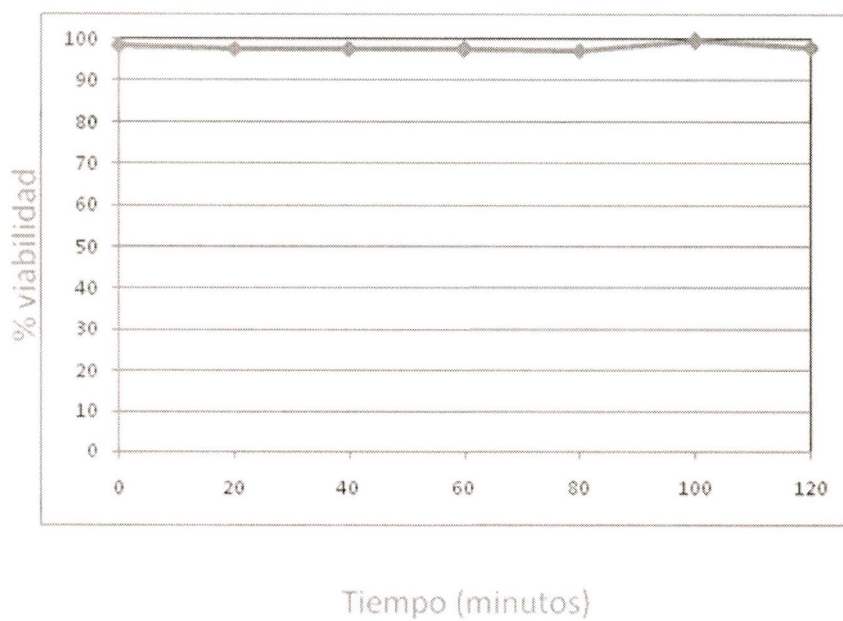


Figura 12. Viabilidad celular a diferentes tiempos (minutos) de exposición con As 5 μ M por 20, 40, 60, 80, 100 y 120 minutos, 0 es el control sin tratamiento.

Expresión relativa de
NRF2, *HO-1* y *NQO1*

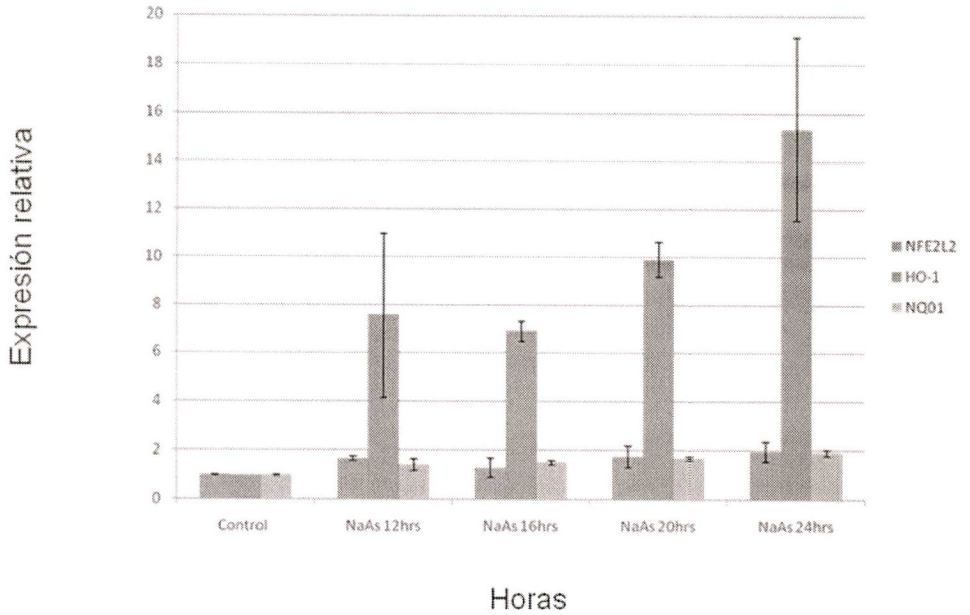


Figura 13. Expresión relativa de *NRF2*, *HO-1* y *NQO1* analizados por RT-PCR en tiempo real normalizados con *GAPDH* en células NL-1 inducidos con 5 μ M de As a intervalos de 4 horas de 12 a 24 horas.

Viabilidad celular

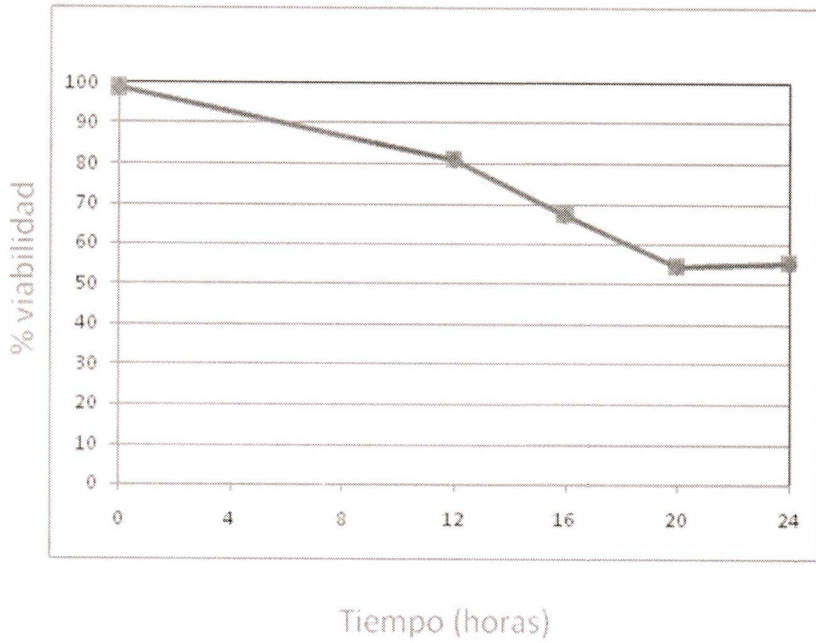


Figura 14. Viabilidad celular de NL-1 en exposición a 5 μ M de As durante 12, 16, 20 y 24 hrs.

capacidad de inducción del As u otros contaminantes en la ruta Nrf2-Keap1 nos dimos a la tarea de genotipificar 231 muestras del banco de DNA previamente establecido en el laboratorio, mediante discriminación alélica por la metodología de TaqMan (figura 15). Las frecuencias genotípicas y alélicas de los diferentes SNPs se determinaron mediante la construcción de tablas en Excel (Microsoft) (tabla 1). Los genotipos más frecuentes fueron: -653 (GG) en 44.6%, -651 (GA) en 92% y -617 (CC) en 54.9%; mientras que los alelos fueron G (59.6%), G (95.3%) y C (74%) respectivamente. Hasta ahora, sólo hay un reporte en población japonesa sana donde los genotipos y los alelos más frecuentes corresponden con lo que hemos descrito en nuestra población (Yamamoto et al, 2004).

Las frecuencias alélicas obtenidas, se compararon con las frecuencias alélicas reportadas en la literatura para otras poblaciones (tabla 2). Hasta el momento este trabajo presenta las frecuencias con la muestra poblacional más grande y hasta ahora las únicas reportadas para población mexicana. Es notable que las frecuencias en la población mexicana son muy parecidas a las de la población japonesa.

Con la finalidad de establecer un banco funcional de líneas celulares linfocitarias para estudios a futuro se colectaron muestras de donadores que acudieron al banco de sangre del INP a las cuales se les extrajo DNA, RNA y leucocitos, y se les determinó su genotipo. Se realizó una PCR convencional para amplificar la región que comprende a los tres polimorfismos localizados en la región promotora de *NRF2* (figura 16). Posteriormente, los genotipos se determinaron por secuenciación automatizada por el principio del método de Sanger (figura 17).

Los genotipos más frecuentes de los SNPs presentes en el promotor de *NRF2* fueron -653. -651, -617 (GG-GG-CC) y -653. -651, -617 (GA-GG-CA) (tabla 3).

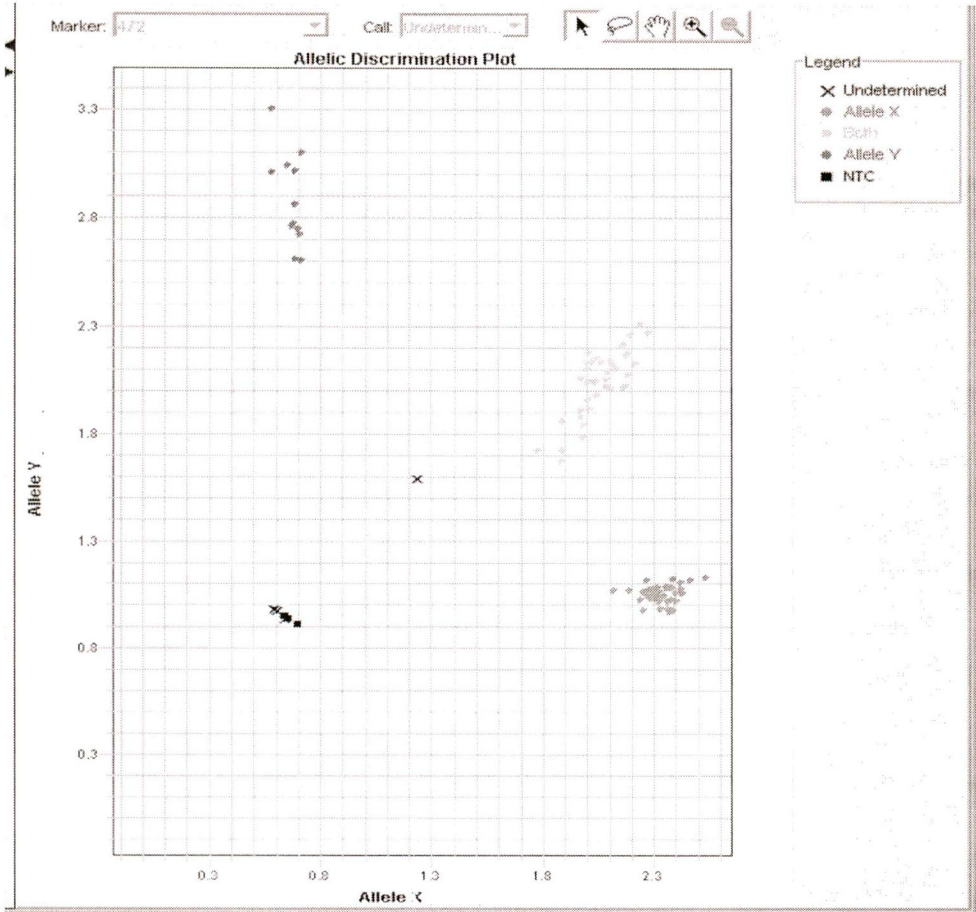


Figura 15. Discriminación alélica por Taqman del polimorfismo -653. En azul se observan los homocigotos para la variante A del SNP -653, con genotipo AA; en verde los heterocigotos con genotipo GA y en rojo los homocigotos para el alelo G, con genotipo GG. En negro se muestran los controles negativos.

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs -653, -651 y -617 presentes en la región promotora de *NRF2* encontradas en una muestra de 231 individuos sanos mestizos mexicanos.

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

-653 (G/A)		-651 (G/A)		-617 (C/A)	
Genotipo	n (%)	Genotipo	n (%)	Genotipo	n (%)
GG	80 (34.6)	GG	69 (92)	CC	127 (54.9)
GA	103 (44.6)	GA	5 (6.6)	CA	88 (38.2)
AA	48 (20.8)	AA	1 (1.4)	AA	16 (6.9)

FRECUENCIAS ALÉLICAS

Alelo	n (%)	Alelo	n (%)	Alelo	n (%)
G	263 (56.9)	G	143 (95.3)	C	342 (74.0)
A	199 (43.1)	A	7 (4.7)	A	120 (26.1)

Tabla 2. Comparación de las frecuencias alélicas de los SNPs en la región promotora de *NRF2* en diferentes poblaciones. ND= no descrito

Alelo	*Europeos	*Africanos	*Americanos	*Asiáticos	+Japoneses	Mexicanos
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
-617 A	20.0 (20)	10.0 (20)	55 (20)	40.0 (20)	31.5(162)	26.1 (462)
-651 A	10.0 (20)	5.0 (20)	ND	ND	4.3(162)	4.7(150)
-653 G	25.0 (20)	10.0 (20)	40.0 (20)	60 (20)	38.9(162)	43.1 (462)

+Yamamoto *et al*, 2004;

*Marzec *et al*, 2007.

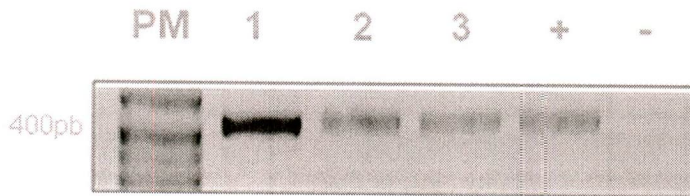


Figura 16. Amplificación por PCR de la región promotora de *NRF2* que contiene a los SNPs en las posiciones -653, -651 y -617. Electroforesis de tres muestras por separado (carriles 2,3 y 4) en geles de agarosa al 2.5%, marcador de peso molecular (carril 1), controles positivo y negativo (carriles 5 y 6).

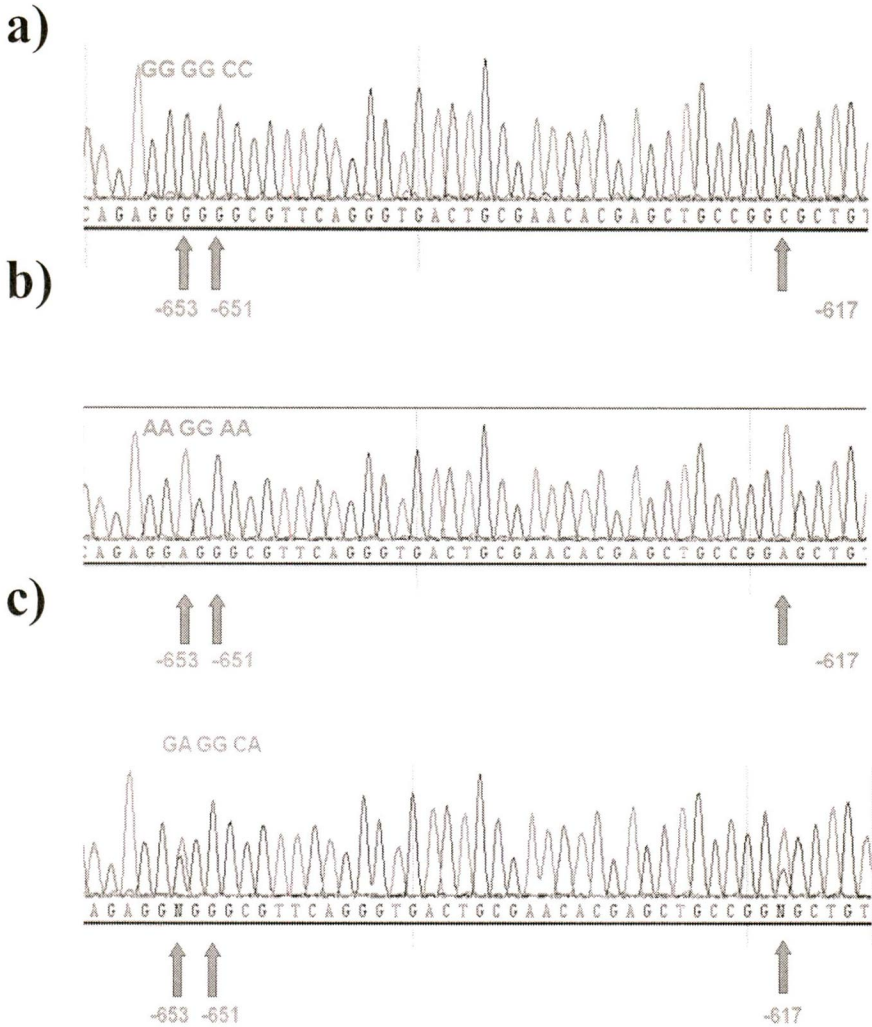


Figura 17. Electroferogramas de secuenciación automatizada. En a) secuencia forward de una muestra con genotipo GG GG CC, donde sólo se observa un pico en las posiciones -653, -651 y -617, el color negro corresponde a la base G, el verde a la base A, el azul a la base C y el rosa a la base T; b) secuencia forward de un homocigoto para los alelos -653 y -617; c) heterocigotos para los alelos -653 y -617, donde se presentan dos picos encimados que corresponden a las 2 bases presentes en la secuencia y por lo tanto la presencia de un SNP.

Tabla 3. Muestras colectadas y sus genotipos para los diferentes SNPs localizados en la región promotora de *NRF2*.

Genotipo			Número
-653	-651	-617	de muestras
GG	GG	CC	10
GA	GG	CC	6
GA	GG	CA	10
GA	GA	CC	3
AA	GG	CC	3
AA	GG	CA	3
AA	GG	AA	3
AA	GA	CC	1
Total			39

DISCUSIÓN

El As es uno de los contaminantes ambientales más ampliamente distribuidos en la naturaleza y sus altos niveles en el agua de beber en zonas endémicas alrededor del mundo lo convierten en un importante problema de salud pública, ya que la exposición crónica al As se manifiesta con el desarrollo de diferentes padecimientos entre los que destaca el cáncer (Smith *et al*, 1992). Aunque se conoce poco acerca de los mecanismos por el cual el As produce sus efectos citotóxicos, uno de los más importantes es la generación de estrés oxidativo a través de la producción de ROS (Xu *et al*, 2008). Recientemente, se ha propuesto que la ruta antioxidante Nrf2-Keap1, uno de los principales mecanismos antioxidantes y detoxificantes celulares, juega un papel clave en la protección contra el As a través de la activación de genes como *HO-1* (Farombi y Surh, 2006) y *NQO1* (Massrieh *et al*, 2006). Considerando que muchos de los efectos citotóxicos del As dependen de algunos de sus metabolitos, todos los estudios sobre la activación de la ruta Nrf2-Keap1 por este metaloide, se han llevado a cabo en modelos celulares que contienen los sistemas enzimáticos necesarios para su metabolismo, como las derivadas de piel, hígado y vejiga (Pi *et al*, 2003; He *et al*, 2006; Wang *et al*, 2007). Sin embargo, a pesar de que los linfocitos son uno de los tipos celulares más afectados por la exposición crónica al As, el efecto de éste no se ha realizado en células de origen linfocitario, las cuales carecen de las enzimas necesarias para su metabolismo y excreción (Andrew *et al*, 2008; Biswas *et al*, 2008; Ghosh *et al*, 2008). Por lo tanto, es importante determinar si la vía de señalización antioxidante Nrf2-Keap1 es capaz de responder a la presencia del As, en ausencia de sus metabolitos.

En este trabajo se evaluó la activación de la ruta de señalización Nrf2-Keap1 en respuesta a

dosis subletales de As en linfocitos B, a través de la determinación de los niveles de los transcritos de *NRF2* y dos de sus genes blanco, *HO-1* y *NQO1*. La determinación de los niveles basales de RNA de los genes *NRF2*, *HO-1* y *NQO1* en linfocitos corroboraron lo descrito en otros tipos celulares como los derivados de hígado y vejiga, confirmando la participación de estos genes en la respuesta al estrés oxidativo y su inducción en presencia de xenobióticos. Los tres genes analizados presentaron niveles basales de RNA muy bajos, siendo *HO-1* el de menor expresión.

En los ensayos de inducción de *NRF2* se utilizó una dosis de As 5 μ M, la cual ha sido reportada como subletal en diversos tipos celulares a tiempos menores de 24 hrs (Pi *et al*, 2003; Wang *et al*, 2007). Al analizar la viabilidad de las células de origen linfocitario (NL-1) a través del tiempo, ésta disminuyó a un 70% a partir de las 16 hrs de exposición hasta llegar a tan solo el 50% a las 24 hrs de incubación, a diferencia de la reportada en otros tipos celulares, como las uroteliales y hepáticas, donde la viabilidad celular se mantiene por encima del 80% en tiempos posteriores a las 16 hrs a dosis de As tan altas como 50 μ M. La concentración subletal del As ha sido un tema de gran controversia dado que depende tanto del tiempo de exposición como del tipo celular analizado. Estos hallazgos podrían ser explicados porque las células de origen linfocitario carecen de sistemas enzimáticos que participan en el metabolismo y excreción del As, mientras que tanto los hepatocitos como las células uroteliales son excelentes metabolizadoras del metaloide. Es posible que en las células linfoides como la línea celular NL-1, la excreción del As sea más lenta que en las células metabolizadoras, por lo que los linfocitos estarían expuestos durante un período de tiempo más prolongado a niveles altos de As intracelular. Sin embargo, no podemos descartar una mayor susceptibilidad tejido específica a la exposición de As en los

linfocitos, ya que reportes recientes demuestran que algunos de sus metabolitos, como el MMA y el DMA, tienen una toxicidad mayor que el propio As (Pi *et al*, 2003).

Por otra parte, de forma interesante en este trabajo se demostró que dosis subletales de As son capaces de activar la ruta Nrf2-Keap1 en células de origen linfocitario. La activación de esta ruta fue dependiente del tiempo de exposición al xenobiótico. El As también fue capaz de incrementar los niveles de RNA mensajero del propio *NRF2*, particularmente en tiempos tardíos de exposición. Se ha reportado que en células de origen hepático y urotelial la activación de la ruta Nrf2-Keap1 mediada por el As es debida a la inhibición de la degradación de la proteína Nrf2 y no a un aumento en la expresión de su mensajero (Wang *et al*, 2007). Sin embargo, en queratinocitos, al igual que lo observado en este trabajo con la línea linfocitaria NL-1, la exposición a As es capaz de incrementar los niveles de RNA de *Nrf2* y producir la activación de la ruta (Pi *et al*, 2003). Actualmente se desconoce el mecanismo por el cual el As incrementa los niveles de RNA de *NRF2*. Sin embargo el D3T y el TCDD, inductores de la ruta (Kwak *et al*, 2003; Ma *et al*, 2004), son capaces de promover la expresión génica de *NRF2*, a través de la unión de heterodímeros Nrf2-Maf a sitios ARE, presentes en el propio promotor del factor de transcripción. Estos resultados señalan la existencia de un sistema auto-regulatorio en la expresión del gen, lo que sugiere que los linfocitos podrían utilizar un mecanismo semejante para la activación de la expresión de *NRF2*.

Actualmente se sabe que independientemente del tipo de inductor utilizado, la estimulación de la actividad de Nrf2 conlleva a la expresión de *HO-1* y *NQO1*. En este trabajo se observó que en células linfocitarias inducidas por As 5µM el nivel de RNA de *HO-1* es casi 8 veces mayor que la de *NQO1*. La presencia de cuatro sitios ARE en la región promotora de *HO-1* (Elbirt y Bonkovsky, 1999) y sólo uno en *NQO1* (Jaiswal, 2000), trae como

consecuencia que la activación de Nrf2 conduzca a una expresión siempre mayor de *HO-1* que de *NQO1*. Cabe destacar que el incremento en los niveles de RNA de *HO-1* observado en nuestro trabajo es muy semejante a lo descrito en hepatocitos y células uroteliales tratados con la misma concentración de As y con los mismos tiempos de incubación. En controversia, el incremento en los niveles de RNA de *NQO1* inducido por la incubación con As es mucho menor en linfocitos que el observado en otros tipos celulares bajo las mismas condiciones de concentración y tiempo de exposición. Considerando que los linfocitos carecen de las enzimas participantes en el metabolismo del As, los niveles tan pobres de inducción en la acumulación del mensajero de *NQO1*, podrían ser consecuencia de la incapacidad de los linfocitos para producir MMA a partir del As, ya que recientemente, se reportó que este metabolito es un potente inductor de la expresión de *NQO1* mediada por Nrf2 (Wang *et al*, 2008), en tanto que es un pobre inductor de la de *HO-1*. Estos datos sugieren una inducción de la expresión de *NQO1* dependiente de la generación de MMA, mientras la de *HO-1* es dependiente únicamente de la presencia del As. Sin embargo, no podemos excluir que la expresión diferencial de estos genes después de su estimulación por el As pueda deberse a la expresión de factores de transcripción específicos del tipo celular.

Para conocer la cinética de inducción de estos genes regulados por Nrf2 se evaluó la expresión diferencial en la línea linfocitaria NL-1 expuesta a diferentes tiempos con As.

La inducción de *HO-1* inició al menos 20 min después de la alcanzando un pico de acumulación a las 16 hrs, el cual se mantuvo hasta las 24 hrs de incubación. Aunque la acumulación de los niveles de RNA de *NRF2* y *NQO1* se mantuvo hasta las 24 hrs de exposición, el inicio de su inducción difirió con respecto a la de *HO-1*, empezando 80 min y 4 hrs después del tratamiento, respectivamente. Estos datos indican que la función de

trans-activación de Nrf2 es inducida rápidamente por la presencia del As y presenta una activación sostenida durante un largo periodo de tiempo(Wang *et al*, 2008). Sin embargo, la diferencia tan marcada en la cinética de inducción de *HO-1*, *NQO1* y del propio *NRF2*, también sugiere que la regulación diferencial de los genes blanco del factor de transcripción Nrf2, depende del tiempo en la duración de su activación, así como de sus niveles proteicos.

Por otra parte se ha reportado que la apoptosis mediada por p53 inducida por algunos agentes genotóxicos como el cisplatino, requiere de la inhibición de la ruta antioxidante Nrf2 (Faraonio *et al*, 2006). El As es un potente inductor de la actividad de p53 y aunque en este trabajo no se evaluó el nivel de apoptosis dado por el tratamiento de los linfocitos con As, se ha documentado que líneas celulares derivadas de linfocitos expuestas a dosis subletales de As en tiempos largos de exposición tienen capacidad pro-apoptótica (Andrew *et al*, 2008). En este mismo sentido, se ha observado la activación de p53 en líneas celulares derivadas de vejiga, hígado, pulmón y linfocitos expuestas a dosis subletales de As (2-10 μ M) a partir de las 6 hrs y al menos hasta las 24 hrs de incubación (Faraonio *et al*, 2006). En la línea linfocitaria NL-1 la función de trans-activación de Nrf2 se mantuvo elevada a tiempos largos de exposición a As, incluso cuando la viabilidad celular se vio ostensiblemente disminuida, por lo que sería importante analizar en un futuro en nuestro modelo celular el efecto del As sobre la activación de p53 para evaluar si es necesario inhibir la actividad de Nrf2 para el correcto funcionamiento de la apoptosis mediada por p53 y si esta depende del estímulo inicial para desencadenar la muerte celular programada (exposición a As o a cisplatino) y no de la actividad represora de p53 sobre Nrf2.

Nuestros datos y los reportados previamente sugieren la existencia de al menos dos mecanismos, no excluyentes entre sí, a través de los cuales la exposición a As puede

inducir la activación de Nrf2 en distintos tipos celulares (Wang *et al*, 2008). En el primero de ellos, descrito inicialmente en células hepáticas y uroteliales y posteriormente en otros tipos celulares como queratinocitos y linfocitos, el As intracelular es capaz de inhibir la degradación de la proteína Nrf2 a través de su interacción con el dominio rico en cisteínas del represor Keap1. De esta forma se genera una acumulación proteica de Nrf2, lo que promueve la expresión de genes antioxidantes (Del Razo *et al*, 2001). Este sistema permite una rápida respuesta a la presencia del As, dado que involucra únicamente modificaciones post-traduccionales en la regulación de Nrf2. El segundo mecanismo, presente en al menos queratinocitos y linfocitos, implica el aumento en los niveles de RNA de Nrf2 en tiempos tardíos a la exposición con As (Pi *et al*, 2003). Este segundo mecanismo permitiría mantener por un periodo de tiempo más prolongado la acumulación proteica de Nrf2 y por lo tanto la activación de la ruta (Bloom y Jaiswal, 2003). La existencia de este segundo mecanismo en células que carecen de los sistemas enzimáticos requeridos para el metabolismo de As, podría ser un mecanismo de defensa celular contra la presencia prolongada del As, debido a la imposibilidad para metabolizarlo y excretarlo.

Con estos resultados, proponemos un modelo para la actividad de la ruta Nrf2-Keap1 en linfocitos como se ve en la figura 18.

En otro sentido, la expresión de estos genes podría ser modificada por la presencia de variaciones genéticas y esto podría tener un efecto importante en la respuesta a inductores de la ruta. Se ha reportado la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en la región promotora de *NRF2* (-653G/A, -651G/A y -617C/A) (Yamamoto *et al*, 2004; Marzec *et al*, 2007) y al menos uno de ellos es capaz de disminuir la actividad de su promotor (-651G/A) en ensayos funcionales *in vitro*. Además, los SNPs de *NRF2* se han asociado al desarrollo de diversos padecimientos como el daño agudo al pulmón, cáncer

gástrico y mama, entre otros (Kwak *et al*, 2001; Arisawa *et al*, 2007; Fukushima-Uesaka *et al*, 2007). Debido a la importancia que presenta la función de Nrf2 como sistema antioxidante contra diversos genobióticos, en esta tesis se la frecuencia de las variantes génicas de *NRF2* en una muestra de mestizos mexicanos sanos. El conocer la frecuencia de estas variantes y contar con líneas celulares para estudios funcionales permitirá en un futuro evaluar si la presencia de alguna de estas variantes afecta la capacidad de la ruta de señalización en la protección celular contra la exposición crónica a As y permitiría identificar grupos de riesgo dentro de una población sana, lo que podría ayudar en la prevención y diagnóstico temprano de algunas de las enfermedades crónico-degenerativas asociadas al As.

Al analizar la frecuencia de los SNPs de *NRF2* reportadas para poblaciones de diversos orígenes (europeo, africano, asiático y americano) se observaron grandes fluctuaciones entre las diferentes poblaciones. En nuestra población, la frecuencia de cada uno de los polimorfismos estudiados mostró diferencias significativas con respecto a la descrita en las otras poblaciones, incluyendo la de origen amerindio. Los datos obtenidos pueden ser el resultado de la gran heterogeneidad de nuestra población, de acuerdo con el alto grado de mestizaje que la caracteriza (45.4 % europeo, 51% de nativos americanos, 3.7% africano) (Velazquez-Cruz *et al*, 2007).

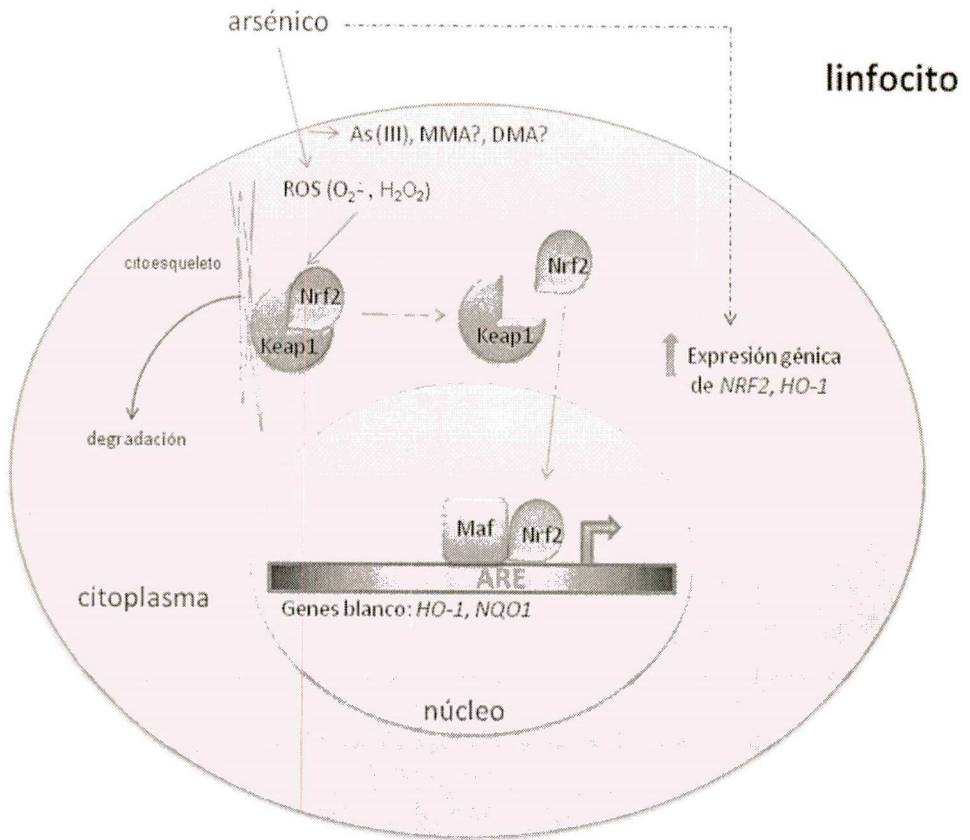


Figura 18. Modelo propuesto de la activación de la ruta antioxidante Nrf2-Keap1 por As en linfocitos.

CONCLUSIONES

1. Este es el primer reporte en donde se documenta la capacidad del As para inducir la ruta Nrf2-Keap1 en una línea celular B-linfoblastoide.
2. El As es capaz de inducir el aumento en la expresión de genes blanco de Nrf2 como *HO-1* y *NQO1*.
3. A diferencia de lo observado en células de origen hepático y urotelial pero similar a lo observado en queratinocitos, la exposición de células de origen linfocitario al As es capaz de incrementar los niveles de expresión de Nrf2.
4. La expresión del gen *HO-1* es más temprana que la mostrada por *NRF2* y *NQO1* empezando al menos 20min después de la exposición al As de las células NL-1, mientras que la expresión de *NRF2* y *NQO1* inicia a los 80 min y 4 hrs respectivamente.
5. Los niveles de expresión de *HO-1* fue significativamente mayor que la de *NQO1* y *NRF2*.
6. Las frecuencias genotípicas y alélicas en la muestra de la población mexicana, muestran que los genotipos más frecuentes son para la posición -653 GA, -651 GG y -617 CC y difieren con lo reportado en otras poblaciones.
7. Hasta el momento, las frecuencias más semejantes a las de los mexicanos son las de los japoneses.

PERSPECTIVAS

- Se continuará con el estudio de la expresión de más genes blanco de Nrf2.
- Es importante determinar si el As es metabolizado dentro de los linfocitos y que especies de As se generan dentro de él.
- Por medio del establecimiento del banco funcional de líneas celulares provenientes de linfocitos conociendo de antemano su genotipo, se podrá determinar si las combinaciones de los diferentes SNPs de la región promotora de *NRF2* tienen influencia en la actividad de la ruta Nrf2-Keap1, al inducirla con sustancias que la activen, como los quimiopreventores y otros carcinógenos además del As.
- Es importante determinar si hay elementos responsables aparte de las regiones ARE presentes en los genes blanco de Nrf2, que estén involucrados en la respuesta a As.
- Se requiere evaluar el efecto del As tanto en otra línea celular de origen linfocitario como en otras diferentes, para ver las diferencias y similitudes en la inducción con As.
- Es importante entender el metabolismo del As en linfocitos ya que este es uno de los principales contaminantes ambientales y se encuentra en altos niveles en el agua de bebida que pasa directamente a torrente sanguíneo, en donde tiene contacto directo con los linfocitos.

BIBLIOGRAFÍA

Andrew AS, Jewell DA, Mason RA, Whitfield ML, Moore JH, Karagas MR (2008). Drinking-water arsenic exposure modulates gene expression in human lymphocytes from a u.s. Population. *Environ Health Perspect* 116 (4):524-531.

Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, Fujita H, Hasegawa S, Takagi T, Wang FY, Hirata I, Nakano H (2007). The relationship between *Helicobacter pylori* infection and promoter polymorphism of the Nrf2 gene in chronic gastritis. *Int J Mol Med* 19 (1):143-148.

Biswas R, Ghosh P, Banerjee N, Das J, Sau T, Banerjee A, Roy S, Ganguly S, Chatterjee M, Mukherjee A, Giri A (2008). Analysis of T-cell proliferation and cytokine secretion in the individuals exposed to arsenic. *Hum Exp Toxicol* 27 (5):381-386.

Bloom DA, Jaiswal AK (2003). Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem* 278 (45):44675-44682.

Brinkman RR, Dube MP, Rouleau GA, Orr AC, Samuels ME (2006). Human monogenic disorders - a source of novel drug targets. *Nat Rev Genet* 7 (4):249-260.

Chen C, Kong AN (2005). Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends Pharmacol Sci* 26 (6):318-326.

Chen PS, Li JH (2006). Chemopreventive effect of punicalagin, a novel tannin component isolated from *Terminalia catappa*, on H-ras-transformed NIH3T3 cells. *Toxicol Lett* 163 (1):44-53.

BIBLIOTECA UACM

Chen YC, Hunter DJ (2005). Molecular epidemiology of cancer. *CA Cancer J Clin* 55 (1):45-54; quiz 57.

Del Razo LM, Quintanilla-Vega B, Brambila-Colombres E, Calderon-Aranda ES, Manno M, Albores A (2001). Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 177 (2):132-148.

Edlich RF, Winters KL, Lin KY (2005). Breast cancer and ovarian cancer genetics. *J Long Term Eff Med Implants* 15 (5):533-545.

Elbirt KK, Bonkovsky HL (1999). Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians* 111 (5):438-447.

Faraonio R, Vergara P, Di Marzo D, Pierantoni MG, Napolitano M, Russo T, Cimino F (2006). p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. *J Biol Chem* 281 (52):39776-39784.

Farombi EO, Surh YJ (2006). Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol* 39 (5):479-491.

Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Kamatani N, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yasuda K, Sawada J (2007). Genetic variations and haplotype structures of transcriptional factor Nrf2 and its cytosolic reservoir protein Keap1 in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet* 22 (3):212-219.

Ghosh P, Basu A, Singh KK, Giri AK (2008). Evaluation of cell types for assessment of cytogenetic damage in arsenic exposed population. *Mol Cancer* 7:45.

Gomez SE, del Razo LM, Munoz Sanchez JL (2005). Induction of DNA damage by free radicals generated either by organic or inorganic arsenic (AsIII, MMAIII, and DMAIII) in cultures of B and T lymphocytes. *Biol Trace Elem Res* 108 (1-3):115-126.

He X, Chen MG, Lin GX, Ma Q (2006). Arsenic induces NAD(P)H-quinone oxidoreductase I by disrupting the Nrf2 x Keap1 x Cul3 complex and recruiting Nrf2 x Maf to the antioxidant response element enhancer. *J Biol Chem* 281 (33):23620-23631.

Hirano S, Cui X, Li S, Kanno S, Kobayashi Y, Hayakawa T, Shraim A (2003). Difference in uptake and toxicity of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in rat heart microvessel endothelial cells. *Arch Toxicol* 77 (6):305-312.

Iida K, Itoh K, Kumagai Y, Oyasu R, Hattori K, Kawai K, Shimazui T, Akaza H, Yamamoto M (2004). Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res* 64 (18):6424-6431.

Jaiswal AK (2000). Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radic Biol Med* 29 (3-4):254-262.

Kim S, Misra A (2007). SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng* 9:289-320.

Knudson AG, Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68 (4):820-823.

Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, Sutter TR, Kensler TW (2001). Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethiole-3-thione. *Mol Med* 7 (2):135-145.

Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 278 (10):8135-8145.

Luch A (2005). Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 5 (2):113-125.

Ma Q, Kinneer K, Bi Y, Chan JY, Kan YW (2004). Induction of murine NAD(P)H:quinone oxidoreductase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires the CNC (cap 'n' collar) basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2): cross-interaction between AhR (aryl hydrocarbon receptor) and Nrf2 signal transduction. *Biochem J* 377 (Pt 1):205-213.

Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, Jedlicka AE, Vuong H, Lancken PN, Aplenc R, Yamamoto T, Yamamoto M, Cho HY, Kleeberger SR (2007). Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. *FASEB J* 21 (9):2237-2246.

Massrieh W, Derjuga A, Blank V (2006). Induction of endogenous Nrf2/small maf heterodimers by arsenic-mediated stress in placental choriocarcinoma cells. *Antioxid Redox Signal* 8 (1-2):53-59.

Morita T, Asano N, Awogi T, Sasaki YF, Sato S, Shimada H, Sutou S, Suzuki T, Wakata A, Sofuni T, Hayashi M (1997). Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (groups 1, 2A and 2B) the summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. Collaborative Study of the Micronucleus Group Test. Mammalian Mutagenicity Study Group. *Mutat Res* 389 (1):3-122.

Nioi P, Hayes JD (2004). Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutat Res* 555 (1-2):149-171.

Palma MD, Domchek SM, Stopfer J, Erlichman J, Siegfried JD, Tigges-Cardwell J, Mason BA, Rebbeck TR, Nathanson KL (2008). The Relative Contribution of Point Mutations and

Genomic Rearrangements in BRCA1 and BRCA2 in High-Risk Breast Cancer Families. *Cancer Res* 68 (17):7006-7014.

Pi J, Qu W, Reece JM, Kumagai Y, Waalkes MP (2003). Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: involvement of hydrogen peroxide. *Exp Cell Res* 290 (2):234-245.

Pi J, Bai Y, Reece JM, Williams J, Liu D, Freeman ML, Fahl WE, Shugar D, Liu J, Qu W, Collins S, Waalkes MP (2007). Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic Biol Med* 42 (12):1797-1806.

Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, Kensler TW (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (6):3410-3415.

Shi H, Hudson LG, Ding W, Wang S, Cooper KL, Liu S, Chen Y, Shi X, Liu KJ (2004). Arsenite causes DNA damage in keratinocytes via generation of hydroxyl radicals. *Chem Res Toxicol* 17 (7):871-878.

Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, Herman JG, Baylin SB, Sidransky D, Gabrielson E, Brock MV, Biswal S (2006). Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med* 3 (10):e420.

Smith AH, Hopenhayn-Rich C, Bates MN, Goeden HM, Hertz-Picciotto I, Duggan HM, Wood R, Kosnett MJ, Smith MT (1992). Cancer risks from arsenic in drinking water. *Environ Health Perspect* 97:259-267.

Soussi T, Leblanc T, Baruchel A, Schaison G (1993). Germline mutations of the p53 tumor-suppressor gene in cancer-prone families: a review. *Nouv Rev Fr Hematol* 35 (1):33-

36.

Velazquez-Cruz R, Orozco L, Espinosa-Rosales F, Carreno-Manjarrez R, Solis-Vallejo E, Lopez-Lara ND, Ruiz-Lopez IK, Rodriguez-Lozano AL, Estrada-Gil JK, Jimenez-Sanchez G, Baca V (2007). Association of PDCD1 polymorphisms with childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet* 15 (3):336-341.

Wang XJ, Sun Z, Chen W, Eblin KE, Gandolfi JA, Zhang DD (2007). Nrf2 protects human bladder urothelial cells from arsenite and monomethylarsonous acid toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 225 (2):206-213.

Wang XJ, Sun Z, Chen W, Li Y, Villeneuve NF, Zhang DD (2008). Activation of Nrf2 by arsenite and monomethylarsonous acid is independent of Keap1-C151: enhanced Keap1-Cul3 interaction. *Toxicol Appl Pharmacol* 230 (3):383-389.

Xu C, Huang MT, Shen G, Yuan X, Lin W, Khor TO, Conney AH, Kong AN (2006). Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. *Cancer Res* 66 (16):8293-8296.

Xu Y, Wang Y, Zheng Q, Li X, Li B, Jin Y, Sun X, Sun G (2008). Association of oxidative stress with arsenic methylation in chronic arsenic-exposed children and adults. *Toxicol Appl Pharmacol*.

Yamamoto T, Yoh K, Kobayashi A, Ishii Y, Kure S, Koyama A, Sakamoto T, Sekizawa K, Motohashi H, Yamamoto M (2004). Identification of polymorphisms in the promoter region of the human NRF2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 321 (1):72-79.

Yu EY, Hahn WC (2004). The origin of cancer. *Cancer Treat Res* 122:1-22.

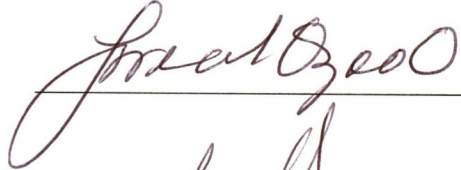
Zhang DD (2006). Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab*

Rev 38 (4):769-789.

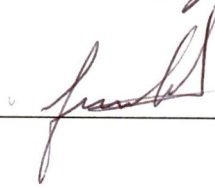
Zhang Y, Gordon GB (2004). A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Mol Cancer Ther* 3 (7):885-893.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 30 de octubre del 2008, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Q.F.B. Mirna Edith Morales Marín

Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco



Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón

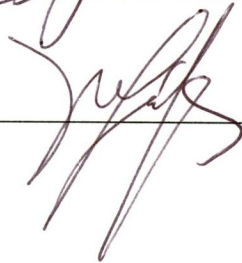


Dr. Federico Centeno Cruz

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga



Dra. Mavil López Casamichana



Coordinación de Certificación y Registro

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno

ESTE DOCUMENTO FUE IMPRESO
Y EMPASTADO EN LOS
TALLERES DE



**"LA SOLUCION A TUS PROBLEMAS
DE CORRECCION E IMPRESION"**
www.mitesis.com.mx

Tel. Directo
 **56-19-43-78**

Te atendemos via telefónica las
24 horas del día de Lun. a Dom.

IUSACELL
04455 **1959-0411**
NEXTEL **1942-1162**

E-MAIL

copilco@mitesis.com.mx
mitesis.martha@gmail.com

solo para Messengers
mitesiscopilco@yahoo.com
mitesis@msn.com