

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DOCTORADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

***Efecto funcional de las variantes génicas de NFE2L2
sobre la actividad antioxidante de la ruta
de señalización Nrf2-Keap1***

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTORA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

M. EN C. MIRNA EDITH MORALES MARÍN

Directora de tesis
Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco

Codirector
Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón

Ciudad de México, a noviembre de 2016.

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.

Este trabajo se desarrolló en el Posgrado de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y en el Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Beca número BM-080530201307, ICyT/179/2011

Financiamiento CONACyT, FOSSIS 71053

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal por todo el apoyo académico y económico otorgado durante la realización de mis estudios de Doctorado en el Posgrado de Ciencias Genómicas.

Agradezco muy especialmente a mi tutora, la Dra. Lorena Orozco, por haberme permitido ser parte de su grupo de trabajo desde la licenciatura, donde recibí los pilares de mi formación académica, los criterios éticos de la investigación, por toda su paciencia y su apoyo, pero sobre todo le agradezco el trato personal que siempre tuvo conmigo, por todos sus consejos y por transmitirme sus enseñanzas y experiencias.

Al Dr. Emilio Córdova, por ser parte fundamental de mi formación científica y académica, por todas sus enseñanzas, por su paciencia y todo el apoyo, por los consejos que me brindó durante el desarrollo de este proyecto, por ser mi guía en el camino de la investigación, y también por sus regaños.

Agradezco también a todos mis asesores, Dr. Federico Centeno, Dra. Elisa Azuara, Dra. Mavil López, Dra. Sara Frías y Dra. Minerva Camacho por todo su apoyo y valiosas aportaciones en este trabajo.

A la Dra. Elizabeth Sánchez y todos los profesores del posgrado.

Quiero hacer un agradecimiento especial a la Dra. Bertha Molina por su valioso apoyo y enseñanzas en el cuarto de cultivo.

También a la Dra. Angélica Martínez por su ayuda con el desarrollo de la metodología para el establecimiento de las líneas celulares inmortalizadas.

M. en C. Angélica Méndez por su participación en los experimentos de tratamiento de las líneas celulares con curcumina.

Al Dr. Humberto Nicolini, por brindarme su confianza y la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y continuar con mi desarrollo profesional en una nueva etapa.

A todos mis amigos, Monse R. y Montse M. (1 y 2), Paco B., Humberto G., Nadia R., Diana C., Angélica M., Miguel C., Humberto M., Liliana M., Alma Lilia, Helios C., Fernando V., Itzel L., Manuel E., Alma Liliana T., Joanna M., y los que me faltan, por hacer del Doctorado una experiencia de vida, por las alegrías y tristezas, por los malos y buenos momentos, por hacer amenos los momentos difíciles y sobre todo por su amistad .

A los compañeros del laboratorio y del posgrado, a Caty, Lulú y Viviana.

A mis amigos del INMEGEN, Karol, Lyssia, Yola, Irma.

DEDICATORIA

En especial a mis abuelos, con todo mi amor, Rufina y Sacramento, Matilde y Simón, sin ellos no estaría aquí, en este mundo, siempre los llevaré mi mente y en mi corazón.

A mis padres Rodolfo y Gloria, a mis hermanas Aura y Anahí, por apoyarme incondicionalmente, por impulsarme y hacerme saber que todo es posible si me lo propongo, a no perder de vista mis objetivos y no darme por vencida, por todo su amor y comprensión, por ser mi inspiración para superarme cada día, por ser mi familia, los amo, sin ustedes no hubiera llegado hasta este momento.

A Poncho, Tina, Chat, Odín, Ciro, Led, Ariel y Xahnat por ser parte de mi familia.

La ciencia no puede resolver el último misterio de la naturaleza. Y eso se debe a que, en última instancia, nosotros mismos somos una parte del misterio que estamos tratando de resolver.
Max Planck

ÍNDICE

Lista de figuras	9
Lista de tablas	10
Lista de abreviaturas	11
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	16
1. Estrés oxidante	16
1.1. Especies reactivas de oxígeno.....	16
1.2. Fuentes endógenas y exógenas de ROS.	16
1.3. Daños celulares causados por ROS.....	18
2. La ruta Nrf2-Keap1 y su regulación	20
2.1. Nrf2.....	23
2.2. Keap1.....	24
2.3. Secuencias ARE.....	27
2.4. Regulación transcripcional de la ruta Nrf2-Keap1.....	27
2.5. Inductores de la ruta Nrf2-Keap1.....	27
2.6. Importancia de la ruta Nrf2-Keap1: modelos animales y celulares.....	31
3. Variantes génicas	32
3.1. Definición.....	32
3.2. Clasificación.....	34
3.3. Importancia de las variantes génicas en el desarrollo de enfermedades.....	35
3.4. Variantes en Nrf2 y su efecto funcional....	35

JUSTIFICACIÓN		38
OBJETIVOS		39
ESTRATEGIA GENERAL		40
MATERIAL Y MÉTODOS		41
	1. Obtención de muestras sanguíneas.....	41
	2. Extracción de linfocitos.....	41
	3. Obtención de líneas celulares.....	42
	4. Propagación y mantenimiento de líneas celulares.....	42
	5. Extracción de DNA.....	43
	6. Genotipificación.....	44
	7. Inducción de la ruta Nrf2-Keap1.....	45
	8. Exposición crónica a arsénico.....	46
	9. Determinación de viabilidad celular.....	47
	10. Extracción de RNA.....	47
	11. Tratamiento con DNAsa.....	48
	12. Síntesis de cDNA.....	48
	13. Determinación de expresión génica por RT-PCR.....	49
	14. Análisis de datos.....	49
RESULTADOS		51
	1. Muestras obtenidas y genotipos encontrados	51
	2. Activación de la ruta Nrf2-Keap1 por quimiopreventores y arsénico.....	54

	3.Influencia de los SNPs -653GA y -617CA en la expresión génica de <i>NFE2L2</i> , <i>HMOX</i> y <i>NQO1</i>	56
	4. Evaluación del efecto de las variantes de <i>NFE2L2</i> sobre la toxicidad del arsénico.....	59
DISCUSIÓN		64
CONCLUSIONES		69
BIBLIOGRAFÍA		70
ARTÍCULO PUBLICADO		81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Principales especies reactivas de oxígeno.....	17
Figura 2.	Ruta antioxidante Nrf2-Keap1.....	22
Figura 3.	Estructura del gen codificante para Nrf2.....	26
Figura 4.	Estructura del gen codificante para Keap1.....	27
Figura 5.	Estudios realizados en ratones ko para Nrf2 correlacionados con patologías en humanos.....	34
Figura 6.	Electroferogramas de secuenciación automática.....	54
Figura 7.	Efecto de los inductores iAs, Sfn y Cur en diferentes condiciones de dosis y tiempo de exposición	57
Figura 8.	Medición de la expresión génica en células en proliferación	59
Figura 9.	Efecto del genotipo sobre la expresión basal de <i>NFE2L2</i>	60
Figura 10.	Efecto del genotipo sobre la expresión génica.....	62
Figura 11.	Medición de la expresión génica dependiente del genotipo.....	63
Figura 12.	Efecto del iAs sobre el crecimiento celular.....	65
Figura 13.	Efecto del genotipo sobre la exposición crónica a iAs.....	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Estructuras químicas de algunos quimiopreventores.....	31
Tabla 2.	Genotipos y frecuencias encontradas en las muestras de donadores mexicanos sanos.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
(AsO ₃) ³⁻	Ion arsenito
(AsO ₄) ³⁻	Ion arseniato
5'UTR	Regiones no traducidas en 5' (5' untranslated region)
8OHdG	8-hidroxi-2'desoxiguanosina
AP-1	Proteína activadora 1 (activator protein 1)
ARE	Elemento de respuesta antioxidante (Antioxidant response element)
As ³⁺ m	Arsénico +3 metil transferasa
BTB	Broad-Complex, Tramtrack, and Bric a` brac
bZip	Cremallera de leucinas (beta leucin zipper)
CBP	CREB-binding protein (proteína de unión a CREB) (cAMP responsive element binding protein 1)
cDNA	ADN de cadena sencilla
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CNC	Cap 'n' Collar
CNVs	Variaciones en el número de copias (Copy number variants)
Cur	Curcumina
CT	Umbral del ciclo (cycle threshold)
D3T	Ditiol-3-tiona
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribolucéico
dNTP	Dinucléidos tri-fosfato
EDTA	Ácido etilen-diamin tetracético
EO	Estrés oxidante
g	Gravedades
GCL	Glutamato cisteín-ligasa
GPx	Glutación peroxidasa

GST	Glutathión S-transferasa
HMOX-1	Hemo oxigenasa 1
hrs	Horas
iAs	Arsénico inorgánico
kDa	Kilo daltones
Keap1	Proteína asociada a Kelch-like 1 (Kelch-like ECH associated protein 1)
Ko	Knock out
MAPK	Protein cinasas activadas por mitógeno
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
MZF	Myeloid zinc finger
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)
Neh	Nrf2 ECH homology
NFE2L2	Nuclear factor eritroyd 2 like 2
ng	Nanogramo
nM	Nanomolar
NQO1	NADPH quinona oxidorreductasa 1
NRF2	nuclear factor erythroid 2 like 2
NTR	Región N terminal
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHA	Fitohemaglutinina
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PKC	Proteína cinasa C

RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species)
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SAM	S-adenosil metionina
seg	Segundos
Sfn	Sulforafán
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (single nucleotide polymorfism)
STRs	Repetidos cortos en tándem (short tandem repeats)
TA	Temperatura ambiente
TE	Tris EDTA
U	Unidades
VEB	Virus de Epstein Barr
VNTRs	Repetidos variables de nucleótidos en tándem (variable nucleotide tandem repeats)
Δ Ct	Delta del umbral de ciclo (delta cycle treshold)
μ L	microlitro

RESUMEN

El estrés oxidante causado por especies reactivas de oxígeno es uno de los principales factores que dañan a las macromoléculas celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Uno de los mecanismos antioxidantes más estudiados de defensa celular es el modulado por la ruta Nrf2-Keap1. Nrf2 es un factor de transcripción codificado por el gen *NFE2L2*, que en condiciones basales se encuentra unido a su represor Keap1, por el contrario, en condiciones inducidas Nrf2 es liberado y translocado al núcleo celular para encender diferentes genes de defensa. En su región promotora se han identificado tres polimorfismos de un solo nucleótido en las posiciones -653 y -617, que al parecer se sitúan en secuencias de unión a ciertos factores de transcripción. Dichos polimorfismos han sido asociados a diferentes patologías en humanos como gastritis, nefritis lúpica, Alzheimer entre otras.

Evidencias de estudios *in silico*, muestran que los SNPs antes mencionados podrían influenciar la expresión de *NFE2L2*, impactando directamente en la actividad de la ruta.

Por lo tanto, en este trabajo evaluamos la influencia de estos polimorfismos sobre la actividad de la ruta antioxidante Nrf2-Keap1 en dos condiciones distintas, basales e inducidas con tres sustancias, arsénico, sulforafán y, curcumina, el primero de ellos carcinógeno y los otros dos quimiopreventores. La realización de ensayos tiempo y dosis respuesta sirvieron para estandarizar las condiciones óptimas subletales de inducción de la ruta. Se determinó la expresión de *NFE2L2* y dos de sus genes blanco, *HMOX-1* y *NQO1* por el método de $\Delta\Delta Ct$. Por otro lado, se determinó si estas mismas variantes eran capaces de modular la capacidad citoprotectora de Nrf2 en una exposición crónica a arsénico en líneas celulares. Para los ensayos se utilizaron líneas celulares B-linfoblastoides establecidas en el laboratorio, utilizando células B de sangre total separadas e inmortalizadas con virus de Epstein Barr de individuos control con los genotipos

de interés, -653 GG/GA y -617 CC/AA. La determinación del genotipo se realizó por secuenciación de Sanger. Los ensayos de expresión se realizaron extrayendo el RNA con la metodología de Trizol y posteriormente sintetizando el cDNA correspondiente. Posteriormente, por medio de RT-PCR se determinaron los Cts para el cálculo de la expresión génica.

Con los ensayos anteriores encontramos una tendencia a la disminución en la expresión basal de *NFE2L2* en presencia de los alelos menores -653 GA y -617 CA en comparación con los homocigotos y heterocigotos. En condiciones inducidas, la presencia de diferentes genotipos al parecer no tiene influencia sobre la expresión génica de *NFE2L2*. En cuanto a la citoprotección en la exposición crónica de iAs, se encontraron diferencias significativas en el crecimiento celular, presentando diferente sensibilidad dependiente del genotipo.

INTRODUCCIÓN

1. *Estrés oxidante*

En los últimos 20 años se ha investigado ampliamente acerca del estrés oxidante (EO), al estudiar diferentes aspectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species), moléculas antioxidantes, y mecanismos generadores de EO, así como distintas estrategias para combatirlo. El EO se define como el rompimiento del equilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno y su detoxificación y es uno de los principales problemas al cual se enfrentan todos los organismos aeróbicos.

1.1 *Especies reactivas de oxígeno (ROS)*

Las ROS son especies químicas producto de una reducción incompleta de oxígeno y presentan una gran reactividad debido a los electrones no apareados que poseen. Dentro de los principales tipos de ROS (ver figura 1) se encuentran el anión superóxido, el peróxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Fruehauf y Meyskens, 2007).

1.2 *Fuentes endógenas y exógenas de ROS*

El principal generador endógeno de ROS es la mitocondria debido a la producción de radicales superóxido a partir de la fosforilación oxidativa del proceso respiratorio, donde se estima que del 1-2% de los electrones forman radicales superóxido. Otra fuente endógena de ROS son los peroxisomas,

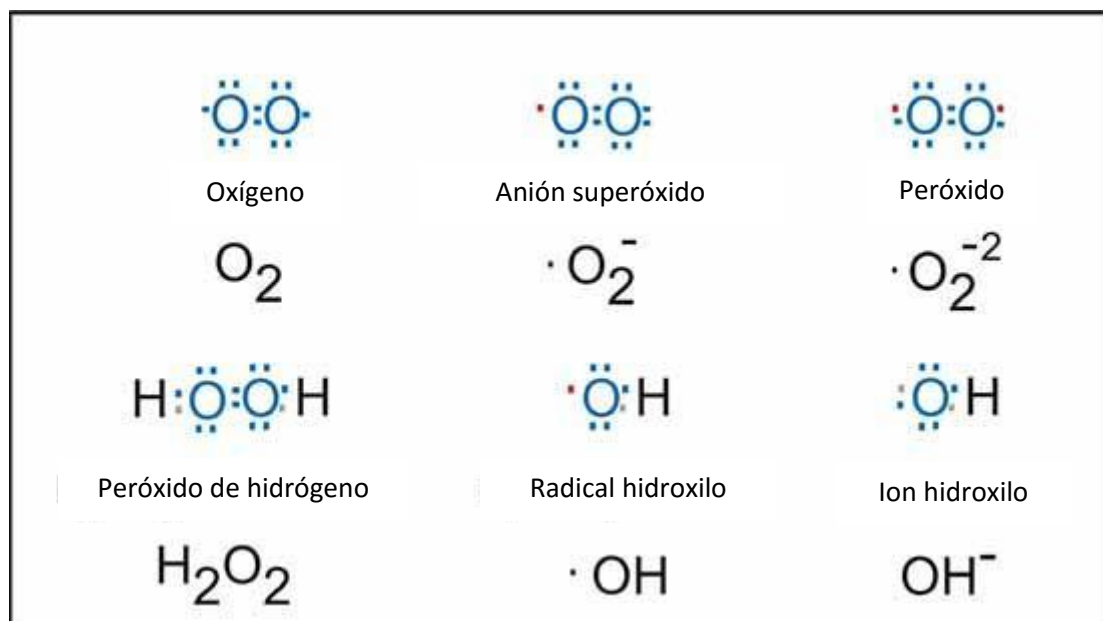


Figura 1. Principales especies reactivas de oxígeno. (Tomado y modificado de www.biotek.com)

organelos intracelulares que utilizan el oxígeno para producir peróxido de hidrógeno o superóxido, de acuerdo al tipo celular. Además, las células inflamatorias como los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos producen ROS después de ser activados por agentes como las bacterias, al generar vesículas donde se almacena O_2^{2-} y superóxido para combatirlas (Czerska et al. 2015).

Dentro de los factores exógenos, la radiación es capaz de generar ROS por medio de la radiólisis de moléculas de agua difundidas rápidamente en el entorno celular. Se ha comprobado que la radiación ionizante es causante de cáncer en múltiples órganos. Por otra parte, los xenobióticos, incluyendo a los contaminantes ambientales generan EO por su procesamiento metabólico en radicales reactivos (Klaunig et al. 2011).

1.3. Daños celulares causados por ROS

Las especies reactivas de oxígeno son capaces de producir daños en macromoléculas celulares como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos; cuando el equilibrio entre la generación de las especies generadas y su eliminación se rompe se produce el EO (Klaunig et al. 2011; Marnett, 2000). En el caso de los lípidos, la peroxidación de ácidos grasos poli-insaturados que contienen más de dos dobles enlaces, ocurre cuando las ROS actúan dando lugar a radicales lípidos peroxilo e hidroperóxidos de lípidos. Una vez que empieza el proceso se ocasiona una reacción en cadena en la membrana fosfolipídica, a consecuencia de la cual se forman aldehídos reactivos como el malondialdehído y el 4-hidroxi-2-nonelal que son capaces de reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos y formar aductos, que frecuentemente producen mutaciones en el ADN (Marnett 2000; Ray et al. 2012).

Con respecto a las proteínas, los radicales libres son capaces de dañar los enlaces peptídicos o las cadenas adyacentes. El ataque por el radical hidroxilo extrae un átomo de hidrógeno del esqueleto del polipéptido formando un radical de carbono. Los daños producidos se traducen en impactos biológicos como

inhibición o estimulación enzimática, daño a proteínas transportadoras de membrana, receptores y alteración en la transducción de señales intracelulares, entre otras (Marnett, 2000).

El daño causado por ROS en el ADN es la principal causa de mutaciones en organismos vivos. Los radicales libres son capaces de atacar a las bases púricas y pirimídicas, además del esqueleto de desoxirribosa. Los daños producidos por las ROS implican rompimientos tanto de cadena doble como sencilla, modificación de bases y entrecruzamientos. Si este daño no es reparado adecuadamente, antes o durante la replicación celular, puede causar muerte celular, mutaciones, inducción de la transcripción, inducción de vías de señalización, errores en la replicación, inestabilidad genómica, entre otros. Estos eventos celulares tienen como consecuencia la generación de inestabilidad genómica, lo cual puede llevar a la muerte celular o si este proceso falla al desarrollo de cáncer (Fruehauf y Meyskens 2007; Marnett, 2000; Mates et al. 2012).

Los radicales libres se pueden definir como moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en los orbitales atómicos, los cuales son altamente reactivos. Los radicales libres derivados del oxígeno representan la clase más importante en sistemas vivos (Valko et al. 2007). El hidroxilo es el radical con más interacción con el ADN, mientras que el peróxido de hidrógeno, precursor del radical hidroxilo es un poco menos reactivo. Se han identificado alrededor de 24 modificaciones en las bases nitrogenadas que conforman al ADN relacionadas con ROS; de éstas la 8-hidroxi-2'desoxiguanosina (8OHdG) es la predominante y se debe a la oxidación de la guanina en la posición C8. Este aducto ha sido encontrado en diferentes tejidos, y su presencia en la orina lo convierte en el principal biomarcador utilizado para medir daño oxidativo al ADN, tanto *in vivo* como *in vitro*. Agentes como la radiación ionizante, el humo del cigarro, metales como el arsénico, hierro y cadmio, químicos como el tetracloruro de carbono y cloroformo elevan los niveles de 8OHdG. En padecimientos como

diabetes, Parkinson, Alzheimer e infección crónica por hepatitis C los niveles de 8OHdG se encuentran elevados (Klaunig et al. 2011; Ziech et al. 2010).

En respuesta al EO, las células han desarrollado diversos mecanismos de defensa, entre los que destaca la ruta antioxidante Nrf2-Keap1 (O'Connell y Hayes, 2015). Al encenderse la vía, estudios de microarreglos de expresión y ChIP muestran la activación de un gran número de genes relacionados con diversos procesos como el metabolismo, genes antioxidantes, detoxificantes y del sistema inmune por mencionar los más consistentes (Córdova et al. 2014; Chorley et al. 2012; Valko et al. 2006; Valko et al. 2007). La primera línea de defensa de las células contra el EO, son los sistemas antioxidantes, conformado por enzimas y proteínas, algunas de ellas activadas a través de Nrf2, como NAD(P)H:quinone oxidoreductasa-1 (NQO1), glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx), hemo oxigenasa-1 (HMOX-1), glutamato cisteín ligasa (GCL), catalasa y tioredoxina.

2. La ruta Nrf2-Keap1 y su regulación

La ruta Nrf2-Keap1 juega un papel clave en la defensa celular contra el EO, pues su activación permite el mantenimiento de la homeostasis redox dentro de la célula (O'Connell y Hayes 2015).

En condiciones basales, el factor de transcripción Nrf2 se encuentra en el citoplasma unido a su inhibidor Keap1, que a su vez está anclado a las fibras de actina del citoesqueleto celular en forma de homodímero. Bajo estas condiciones, Nrf2 es ubiquitinado y posteriormente degradado en el proteosoma 26S de manera constante, acción mediada por Keap1. Dicha molécula funciona como una proteína adaptadora para la Cul3/Rbx1 E3 ubiquitina ligasa. Keap1 contiene un dominio BTB N-terminal que se une a Cul3, y un dominio DGR C-terminal que se une a Nrf2, lo que permite la degradación de Nrf2 (Niture, et al. 2013; Kaspar y Jaiswal 2010) (véase figura 2).

Sin embargo, cuando hay algún estímulo o inductor sobre la ruta, Keap1 actúa como un sensor de estrés a través de numerosos residuos de cisteína localizados en diferentes posiciones de la proteína (principalmente las ubicadas en las posiciones 273 y 288). En presencia del estrés, las cisteínas son reducidas y alteran la conformación de Keap1. Como consecuencia, Nrf2 es liberado de su represor y escapa de la proteólisis, lo que permite el incremento de los niveles proteicos de Nrf2 y su traslocación al núcleo celular. En condiciones basales, la vida media de Nrf2 es de 7-15 min, mientras que en presencia de inductores ésta aumenta en un rango de 30-100 minutos (McMahon et al. 2001; Nguyen et al. 2005).

Nrf2 se une a Keap1 mediante dos dominios, uno de alta afinidad llamado ETGE y uno de baja afinidad llamado DLG. El modelo de “pestillo-bisagra” propone que el sitio de alta afinidad permite la unión entre Nrf2 y Keap1 permitiendo un movimiento libre, mientras que el sitio de unión de baja afinidad impide el movimiento de Nrf2 y posiciona los residuos de lisina dentro de la región Neh2 para su ubiquitinación (Tong et al. 2006; Bryan et al. 2013) (véase figura 2).

La actividad de Nrf2 también puede ser regulada por su fosforilación mediada por diversas cinasas, como las MAP cinasas (MAPK, del inglés Mitogen-activated protein kinases), PI3K/AKT (fosfatidil inositol 3 cinasas), PKC (proteína cinasa C), GSK3B y ERK. Estas proteínas convierten señales extracelulares en respuestas intracelulares a través de cascadas de fosforilaciones en cadena y en consecuencia activación de factores de transcripción. Están involucradas en gran número de procesos como regulación de la proliferación, diferenciación, reducción del estrés y apoptosis (Chang y Karin 2001; Rojo et al. 2012; Bryan et al. 2013).

Una vez situado en el núcleo, Nrf2 se une a con otras moléculas, como las Small-MAF formando heterodímeros que le permiten reconocer secuencias de ADN específicas en sus diversos genes blanco provocando su activación

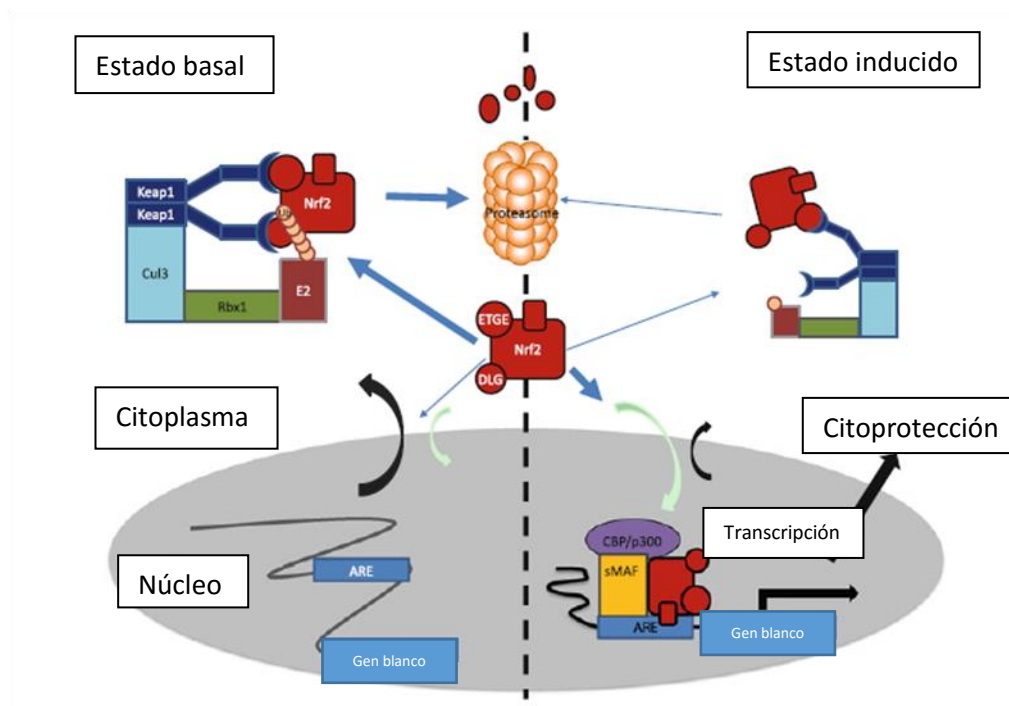


Figura 2. Ruta antioxidante Nrf2-Keap1. En condiciones basales, Nrf2 es reprimido por Keap1 que a su vez está anclado al citoplasma. Nrf2 es degradado en el proteosoma. Al ser la ruta inducida, Nrf2 se libera de Keap1, se transloca al núcleo celular para unirse a secuencias ARE presentes en sus genes blanco promoviendo la transcripción de los mismos. (Tomado y modificado Slocum et al, 2011; Bryan et al 2013).

transcripcional. Estos sitios de unión, llamados ARE (del inglés Antioxidant Response Element), presentan la secuencia consenso TGACnnnGC (Rushmore et al.1991).

En estudios de microarreglos, los genes activados por Nrf2 codifican para proteínas que participan en diferentes procesos celulares, principalmente líneas de defensa antioxidantes, detoxificantes, del proteosoma, del sistema inmune y del metabolismo (Thimmulappa et al. 2002; Cordova et al. 2014; Chorley et al. 2012).

2.1. *Nrf2*

Nrf2 es un factor de transcripción del tipo bZip (del inglés beta leucin zipper), miembro de la familia Cap 'n' Collar (CNC) de proteínas reguladoras, como NF-E2, Nrf1, Nrf3, Bach1 y Bach2 (Motohashi et al. 2002). Esta proteína se encuentra altamente conservada entre especies, y es capaz de modular la respuesta a compuestos electrófilos y oxidantes uniéndose a secuencias promotoras ARE de genes citoprotectores (Cho, 2013). El gen codificante para Nrf2 (*NFE2L2* del inglés nuclear factor erythroid 2 like 2) se localiza en la región cromosómica 2q31.2, consta de 2859pb, y su producto protéico se compone de 605 residuos de aminoácidos con un peso de 67.7 kDa (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg/>). La proteína tiene 6 dominios denominados Neh 1-6 (Nrf2 ECH homology). El dominio Neh1 contiene la región CNC-bZIP, responsable de la unión específica al ADN y la dimerización con otros factores de transcripción. Neh2 es el dominio N-terminal, regulador negativo a través de su interacción con Keap1, contiene siete residuos de lisina que al ser conjugados con la ubiquitina resulta en la degradación de Nrf2 en el proteosoma 26S. Neh3 es indispensable para la activación transcripcional reclutando a un coactivador, CHD6, cuya función no es clara hasta la fecha. Neh4 y Neh5, ricos en residuos ácidos, actúan sinérgicamente para unirse al coactivador CBP (CREB-binding protein) y activar la transcripción. Neh6 contiene numerosos

residuos de serina, pero su función no es clara. Nrf2 principalmente es regulado por su inhibidor Keap1, manteniéndolo en niveles bajos en ausencia de estímulos que desencadenen su liberación (ver figura 3).

2.2. *Keap1*

La proteína Keap1 (Kelch-like ECH associated protein 1) está compuesta por 624 aminoácidos con cinco dominios principales: una región N-terminal (NTR), un dominio BTB de dimerización (Broad-Complex, Tramtrack, and Bric a` brac) evolutivamente conservado que se encuentra en las proteínas de unión a actina y factores de transcripción de dedos de zinc, que participa en la unión a Rbx1 de Cul3 y en la formación de homodímeros; un dominio IVR rico en cisteínas (intervening region) de unión central que participa también en la unión de Rbx1 y Cul3 y un dominio Kelch con seis repetidos a través del cual se une a Nrf2. Keap1 es una proteína rica en cisteínas, con 27 de estos residuos. Al menos 10 de estas cisteínas se han identificado como reactivas en contra de diversas moléculas, por lo que se han propuesto como el mecanismo a través del cual Keap1 censa el ambiente oxidante a su alrededor (figura 4) (Baird and Dinkova-Kostova 2011; Zhao et al. 2010). El gen *KEAP1* se encuentra localizado en el cromosoma 19p13.2, tiene 9 exones y su producto protéico consta de 624 residuos de aminoácidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9817>).

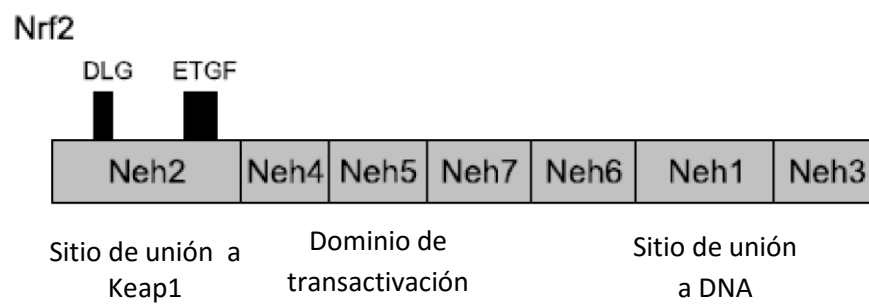


Figura 3. Estructura del gen codificante para Nrf2. El gen posee siete dominios diferentes, el Neh2 es el sitio de unión a Keap1, el Neh5 es el dominio de transactivación y el Neh1 el de unión a DNA. (Tomado y modificado de No et al. 2014).

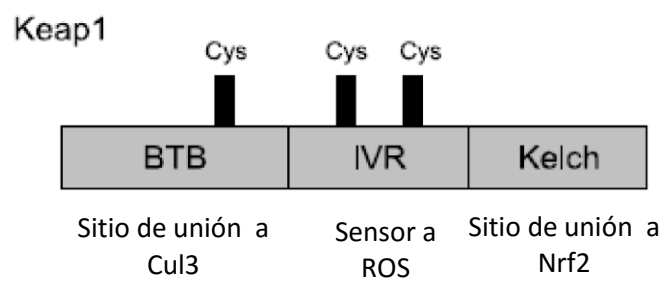


Figura 4. Estructura del gen codificante para Keap1. El gen consta de tres regiones, el BTB que es el responsable de la unión a Cul3, el IVR que es el sensor para las especies reactivas de oxígeno y el Kelch, que es el sitio donde se une a Nrf2. (Tomado y modificado de No et al. 2014).

2.3. Secuencias ARE

La secuencia del elemento de respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en inglés) son sitios de unión específicos para Nrf2, con la secuencia consenso TGACnnnGC, situados en la región promotora de los genes regulados por Nrf2, (Venugopal and Jaiswal 1996). Esta secuencia consenso fue reportada en 1991 por Rushmore y cols. en los genes codificantes para la Glutación-S-transferasa y la NADPH quinona reductasa en ratones, en respuesta a peróxido de hidrógeno y antioxidantes fenólicos, sugiriendo además la activación de genes de respuesta a EO en células eucariotas (Rushmore, Morton, and Pickett 1991). La secuencia ARE media la activación transcripcional de enzimas como por ejemplo las del metabolismo de fase II en respuesta al EO, como GSTA1, NQO1, GCL (Nguyen et al. 2000).

2.4. Regulación transcripcional de la ruta Nrf2-Keap1

Existe una controversia acerca de la regulación transcripcional de Nrf2. En modelos animales se reporta un aumento del mensajero al inducir la ruta con sustancias como D3T y oltipraz (Ramos-Gomez et al. 2001; Kwak et al. 2001), mientras que en células humanas dicho efecto no ha sido evidenciado claramente. Esto habla de la complejidad en el proceso de regulación de este factor de transcripción, es decir, se puede dar a diferentes niveles simultáneamente. Interesantemente, en la región promotora de *NFE2L2* se localizó una secuencia ARE-like, sugiriendo una autorregulación positiva (Kwak et al. 2002).

2.5. Inductores de la ruta Nrf2-Keap1

Uno de los rasgos más importantes de la ruta de señalización Nrf2-Keap1 es su capacidad para responder en presencia de sustancias tóxicas o protectoras. Ejemplificando a los inductores tóxicos tenemos, a los derivados de

benzopirenos, gases de combustión y metales pesados como el arsénico, entre otros.

El arsénico es un metaloide que en su forma inorgánica (iAs) se encuentra en la naturaleza en el agua de diversas regiones en el mundo, y ha sido catalogado como carcinógeno tipo I (sustancia que ha presentado evidencia suficiente de provocar cáncer en seres humanos). El iAs puede presentarse en diferentes estados de oxidación, tri y pentavalente, siendo el primero el más tóxico. En el organismo, las enzimas encargadas de la metilación del iAs para su posterior excreción vía urinaria, son la S-adenosil metionina (SAM) y la metil-transferasa As3m, también conocida como Cyt19 (arsenic +3 metil transferasa) (Walton et al. 2003). Uno de los mecanismos más estudiados por los cuales el iAs causa daño es la generación de ROS, como el anión superóxido, radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno y especies reactivas de nitrógeno (Kessel et al. 2002). El mecanismo por el cual se forman aún no es claro, pero probablemente sea en la oxidación de arsenito (AsO_3^{3-}) a arseniato (AsO_4^{3-}) (Del Razo et al. 2001).

En México, existen reservorios naturales de iAs en la comarca lagunera que abarca los estados de Coahuila y Durango. En diferentes partes del mundo, existen casos reportados de distintos tipos de cáncer como de piel, pulmón, hígado y vejiga en personas que ingieren el agua contaminada con arsénico (Fernandez et al. 2012). La propuesta establecida para la generación de cáncer por este metaloide es mediante la producción de ROS causando estrés oxidativo y por lo tanto daño al ADN, como se mencionó anteriormente. Además hay evidencias del cambio de expresión génica ocasionado por iAs en personas que beben agua contaminada, principalmente en procesos inmunes, crecimiento celular, regulación del ciclo celular y diabetes (Andrew et al. 2008).

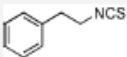
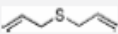
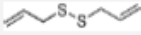
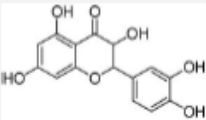
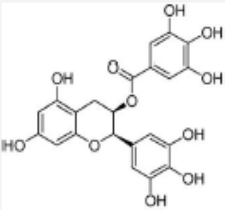
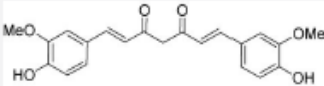
Contrario a los carcinógenos, existen sustancias protectoras que también son capaces de activar a la ruta, pero sin causar daño celular. Estas sustancias son los quimiopreventores, capaces de prevenir, retardar o erradicar en algunos casos el cáncer, por lo cual su estudio ha tenido mucho auge en los últimos años (Hu et al. 2010). Los quimiopreventores pueden ser de origen natural (también

conocidos como fitoquímicos) o sintéticos, los primeros se encuentran en los alimentos. Los quimiopreventores se clasifican en varias categorías de acuerdo a sus grupos químicos funcionales, como los isotiocianatos, ditiolonas, dialilsulfurados y fenólicos (Tabla 1) (Hu et al. 2010; Zhao et al. 2010; Surh et al. 2008). Algunos ejemplos son el sulforafán encontrado en crucíferas y la curcumina en el curry. Estos compuestos pueden proteger contra los efectos nocivos de ciertos carcinógenos, aumentando la viabilidad celular e incluso hay casos de una reversión del cáncer, producto de la capacidad antioxidante, desintoxicante, proapoptótica, de arresto del ciclo celular, entre otros. Algunos quimiopreventores encienden la ruta Nrf2-Keap1, pero sin producir daño. En este tema hay un debate acerca de su efecto, pues al utilizarse en concentraciones altas en experimentos *in vitro* son capaces de ocasionar muerte celular incluso en células normales (Kensler y Wakabayashi 2010).

Entre los quimiopreventores de origen natural el sulforafán y la curcumina son dos de los más estudiados. El sulforafán es un isotiocianato proveniente de vegetales como las crucíferas, con la capacidad de activar enzimas detoxificantes y antioxidantes a través de la vía de Nrf2-Keap1. El sulforafán modula la activación de MAP cinasas y reacciona directamente con las cisteínas sensoras de Keap1, lo que provoca la translocación nuclear de Nrf2 (Hong et al. 2005; Surh et al. 2008).

La curcumina es un quimiopreventor encontrado en las raíces del tubérculo de la *Curcuma longa* utilizado como especia en diferentes tipos de cocina. Al igual que en el caso del sulforafán, las propiedades quimiopreventoras de la curcumina dependen en gran medida de la activación de la ruta Nrf2-Keap1. De esta forma, en modelos animales y celulares, la curcumina modifica los grupos tiol de Keap1 y provoca la liberación de Nrf2, con lo que se incrementan los niveles proteicos de Nrf2, así como su traslocación al núcleo celular. (Shehzad et al. 2010; Zhou et al. 2011).

Tabla 1. Estructuras químicas de algunos quimiopreventores y la fuente de obtención.

Categoría	Producto natural	Estructura	Fuente
Isothio-cyanates	Sulforaphane		Cruciferous vegetables
	Phenethyl isothiocyanate		
Dithiolethiones	3H-1,2-dithiole-3-thione		Garlic and onion
	Diallyl sulfide		
Diallyl sulfides	Diallyl disulfide		
	Diallyl trisulfide		
Phenolic compounds	Quercetin		Onions, apples, tea, broccoli and red wine
	(-)-Epigallocatechin-3-gallate		Green tea
	Curcumin		Tumeric and curry

Tomado y modificado de Zhao et al 2010.

2.6. Importancia de la ruta Nrf2-Keap1: modelos animales y celulares

La ruta Nrf2-Keap1 ha cobrado gran importancia en los últimos años en el estudio de enfermedades causadas por estrés oxidativo. En la última década, tres cepas de ratones deficientes en Nrf2 (KO, por sus siglas en inglés: knock out) han sido desarrolladas por diferentes grupos de investigación, además de 124 líneas celulares, lo que ha contribuido de manera determinante en el conocimiento de esta ruta antioxidante (Chan et al. 1996; Itoh et al. 1997; Martin et al. 1998). En la figura 5 se muestran los estudios en ratones ko para Nrf2, los cuales han ayudado a dilucidar algunos padecimientos en humanos, donde solo en dos trabajos se han encontrado resultados discordantes, aterosclerosis y adenocarcinoma de pulmón (Cho, 2013).

La delección germinal de Nrf2 en ratones confiere un incremento en la susceptibilidad a desarrollar diversas enfermedades. Es importante señalar que los ratones ko para *nrf2* presentan una menor cantidad de enzimas metabolizadoras y genes detoxificantes (Enomoto et al. 2001). Además, al administrar un carcinógeno como el benzopireno y después un quimiopreventor sintético como el oltipraz, el número de tumores gástricos en ratones wild-type disminuye en comparación con los animales ko para *nrf2* con el mismo tratamiento. Dicho estudio señala que en ausencia de *nrf2*, el quimiopreventor no presenta efecto protector alguno contra el carcinógeno, lo cual hace evidente la importancia de la ruta Nrf2-Keap1 para el efecto quimiopreventor del oltipraz (Ramos-Gomez et al. 2001).

En hepatocitos murinos, al activar la ruta con sulforafán previo a la administración de arsénico, la cantidad del metaloide disminuye intracelularmente y la viabilidad es mayor al administrar este quimiopreventor en concentraciones crecientes de iAs (Shinkai et al. 2006).

Es importante hacer notar que la homología del gen que codifica para Nrf2 entre el humano y el chimpancé o el mono Rhesus es del 98-99%, mientras que con el pez zebra es del 49 al 54%. La homología de la proteína entre humanos y

roedores es del 83%, pero las regiones 5'UTR son sustancialmente diferentes (114 pb en humanos, 233 en ratones y 82 en rata) (Cho, 2013).

3. Variantes génicas

El genoma humano está compuesto por cerca de tres billones de bases nucleotídicas que codifican para alrededor de 30 mil genes distintos (International Genome Sequencing Consortium, 2004). A lo largo de su secuencia se han descrito variaciones de diferentes clases, que se describen a continuación.

3.1. Definición

Podemos definir a las variantes génicas como la presencia de un nuevo alelo en la descendencia que está en los progenitores y es potencialmente heredable a la siguiente generación (Twfieg y Teare 2011). Las variantes en una población mayores al 1% se denominan polimorfismos, debajo de ese porcentaje se les llama variantes raras. Aunque la gran mayoría de los polimorfismos se comparten entre poblaciones es evidente que algunos son específicos de cada una dependiendo, por ejemplo, de la región continental de donde sean originarios y/o que compartan historia reciente. Debido a esta característica es posible identificar grupos de marcadores que pueden utilizarse para estudios de mestizaje entre poblaciones. En algunas circunstancias se utilizan para mapear genes que tengan un efecto diferencial en alguna patología en poblaciones distintas (Orr y Chanock 2008).

Existen diferentes tipos de polimorfismos, como los microsatélites (STRs, short tandem repeats), los SNPs (single nucleotide polymorphisms), los VNTRs (variable nucleotide tandem repeats) y los CNVs (copy number variants).

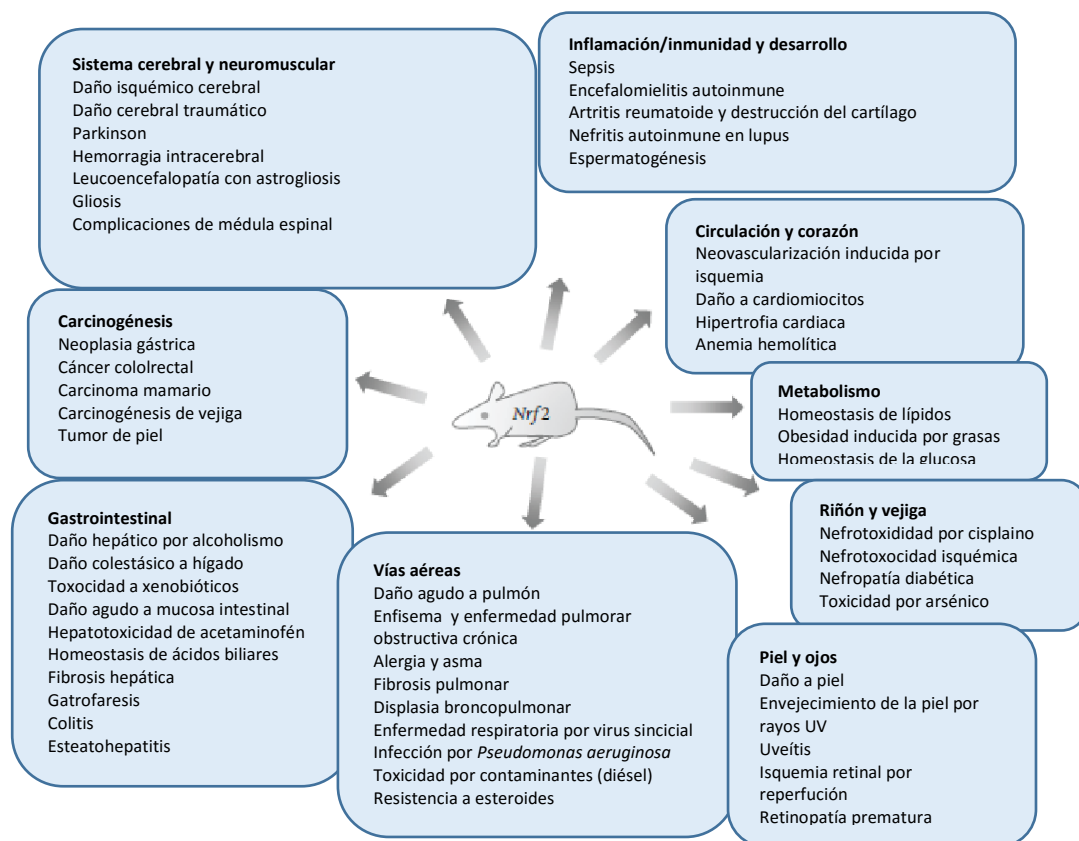


Figura 5. Estudios realizados en ratones ko para Nrf2 correlacionados con patologías en humanos. Tomado y modificado de Cho, 2013.

3.2. Clasificación

Los SNPs por lo general son bialélicos se encuentran en alta densidad a lo largo del genoma y su identificación es relativamente sencilla, razón por la cual son ampliamente utilizados en estudios genéticos y consisten en la sustitución de un solo nucleótido (Twfieg y Teare 2011). El número de SNPs reportados a lo largo del genoma humano es cercano a los 37 millones (Marian, 2012). Las sustituciones de nucleótidos en el genoma tienen el potencial para contribuir directamente en una patología, dependiendo de su posición. Existen diferentes tipos de SNPs dependiendo de la región génica en que se localicen. En el caso de los situados en la región codificante pueden clasificarse en: sinónimos, si el cambio de nucleótido no causa el cambio del aminoácido para la que codifica el triplete de nucleótidos, y no sinónimos, donde el cambio de nucleótido sí produce el cambio del aminoácido. Existen también los SNPs codificantes que pueden alterar la lectura de la secuencia de nucleótidos y por lo tanto producir un cambio en la proteína como el introducir un codón de paro que produzca una proteína truncada. Los SNPs pueden encontrarse también en regiones no codificantes, como en intrones, regiones reguladoras de los genes, en regiones 5' o 3' UTR o en regiones distantes, donde alteran principalmente la regulación génica, como la tasa de transcripción del ARN mensajero y por lo tanto de la cantidad de proteína codificada. En algunos casos, su efecto puede ser de riesgo o protección en algunas patologías.

Los microsatélites o STRs son variaciones de repetidos de 2-4 nucleótidos mientras que los minisatélites o VNTRs constan de 10-100 nucleótidos. Los microsatélites generalmente consisten en repetidos de dos nucleótidos cuyo número varía de individuo a individuo y de ahí su utilidad. Estos polimorfismos son altamente heterogéneos en las poblaciones y se utilizan comúnmente con propósitos de mapeo genético para establecer parentescos (Orr y Chanock 2008; Twfieg y Teare 2011).

Los CNVs son variantes estructurales de un tamaño que va desde las 1000 pares de bases hasta varias megabases. Estas pueden tener delecciones o

duplicaciones que alteran segmentos del genoma diploide. El efecto biológico de un CNV depende del número de copias que presente y la localización en el cromosoma o de los elementos regulatorios que contenga. Dichas variantes pueden comprender genes completos incluyendo sus regiones promotoras, lo que tiene un efecto directo en el fenotipo.

3.3. Importancia en el desarrollo de enfermedades

Como se mencionó anteriormente, los SNPs no sinónimos pueden tener un fuerte impacto en la actividad de la proteína, y por lo tanto desempeñar un papel importante en el desarrollo de diferentes padecimientos humanos. Por otra parte, los SNPs localizados en intrones, regiones reguladoras y sitios distantes del gen también pueden ser importantes en cuanto a la regulación génica. Por ejemplo, el alelo menor de un SNP ubicado en la región 3'UTR del gen codificante para protrombina, incrementa su expresión y los portadores del alelo menor presentan un riesgo mayor para desarrollar trombosis venosa (Poort et al. 1996). Es importante hacer notar que la mayoría de las variantes tipo SNP asociadas con enfermedades en humanos se encuentran en la región promotora del gen.

En el caso de los CNVs, algunas enfermedades asociadas son la esquizofrenia y el autismo en donde alrededor del 5% de las variantes encontradas son de este tipo, en poco menos de 12 sitios genómicos (Cook y Scherer 2008).

3.4. Variantes de Nrf2 y su efecto funcional

Estudios de secuenciación en *NFE2L2* han identificado diversos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) a lo largo del gen (Yamamoto et al. 2004; Marzec et al. 2007). En el caso específico de los SNPs -653GA, -651GA y -617CA, localizados en el promotor de *NFE2L2*, estudios *in vitro* han demostrado su

capacidad para alterar la actividad del promotor en condiciones basales. Estudios *in silico* sugieren que estos SNPs se ubican en sitios de unión para factores de transcripción como AP-1 y MZF, así como para el propio Nrf2, (Marzec et al. 2007).

Recientemente se han realizado estudios de asociación genética con algunos de estos polimorfismos. Por ejemplo, el SNP -617CA se ha asociado con un incremento en el riesgo a padecer daño agudo a pulmón en población europea y Áfrico-Americana (Marzec et al. 2007). En población japonesa, un haplotipo que contiene al SNP -617A se asoció con un decaimiento en el volumen rápido de expiración forzada en personas fumadoras (Masuko et al. 2011). En enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la presencia de un haplotipo con los SNPs -653GA, -651GA y -617CA predispone a un incremento en fallas respiratorias en pacientes de origen alemán (Hua et al. 2010). Otros SNPs en regiones intrónicas de *NFE2L2* han sido asociados con un menor volumen rápido de expiración forzada en un segundo en dos cohortes holandesas en personas que nunca habían fumado (Siedlinski et al. 2009).

Varios estudios en población japonesa han asociado los SNPs -653GA y -617CA con el riesgo a padecer cáncer en relación con infecciones por *Helicobacter pylori* y colitis ulcerativa (Arisawa et al. 2007; Arisawa et al. 2008).

En enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, el SNP -653GA se asoció con nefritis en mujeres mestizas Mexicanas (Cordova et al. 2010). Por otro lado, el polimorfismo -617CA aumenta el riesgo a padecer vitiligo en población asiática de China (Guan et al. 2008).

En un estudio en mujeres postmenopáusicas, el SNP -617CA modifica el riesgo a padecer tromboembolismo venoso ocasionado por la administración de estrógenos orales en mujeres francesas (Bouligand et al. 2011).

Se sabe que en las enfermedades neurodegenerativas, el estrés oxidativo juega un papel importante en el deterioro neuronal. En la enfermedad de Parkinson, se

encontró un haplotipo protector de 5 SNPs que contenían los de la región promotora de *NFE2L2*, -653GA, -651GA y -617CA en población polaca y sueca (von Otter et al. 2010). Este mismo grupo, reportó un haplotipo asociado con un inicio temprano de 2 años en la enfermedad de Alzheimer (von Otter et al. 2010).

JUSTIFICACIÓN

El estrés oxidante generado por especies reactivas de oxígeno es un importante agente causal de daño a moléculas celulares vitales como proteínas, lípidos y ADN; además de asociarse al desarrollo de diversas patologías humanas como el cáncer. La vía de señalización Nrf2-Keap1 es uno de los mecanismos antioxidantes más importantes que poseen las células para combatir al estrés oxidativo. Los SNPs funcionales -653AG y -617CA, ubicados en la región promotora del gen que codifica para Nrf2, disminuyen la actividad del promotor y se asocian a la susceptibilidad para desarrollar padecimientos como gastritis crónica, daño agudo al pulmón, nefritis lúpica, entre otros. Por lo tanto, consideramos importante analizar si la presencia de dichos SNPs en la región promotora de *NFE2L2* afecta los niveles de mRNA de este gen en condiciones basales o inducidas, y si esto influye en la actividad de la ruta y en la citoprotección.

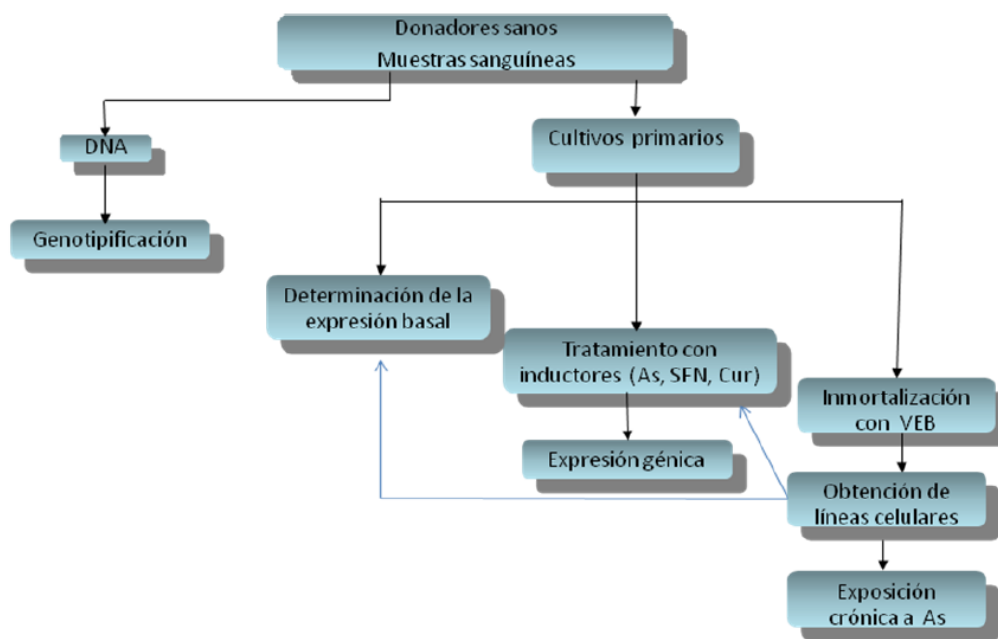
OBJETIVO GENERAL

- Determinar si la activación de la ruta Nrf2-Keap1 inducida por arsénico, sulforafán y curcumina es modulada por la presencia de diferentes polimorfismos en *NFE2L2*

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si los distintos genotipos del gen *NFE2L2* modifican la expresión del mRNA, tanto en sus niveles basales como inducidos
- Identificar el efecto de los distintos genotipos del gen *NFE2L2* sobre la activación de la ruta
- Determinar si los SNPs -653GA y -617CA modulan la capacidad citoprotectora de Nrf2

ESTRATEGIA GENERAL



MATERIAL Y METODOS

1. Obtención de muestras sanguíneas

Se obtuvieron muestras de sangre total de individuos sanos voluntarios provenientes del banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría. La colección se realizó de concentrados leucocitarios con EDTA como anticoagulante. La muestra se dividió en dos partes, una para extracción de linfocitos y la otra para extracción de DNA.

2. Extracción de linfocitos

Los linfocitos fueron extraídos con un gradiente de Ficoll, con una solución comercial, (Lymphoprep, Axis shield) siguiendo las instrucciones del fabricante en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar vertical. Se tomaron 5mL de sangre total y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min para separar a las células blancas, que se aspiraron y se mezclaron con 5ml de solución Hanks. Una vez homogenizada la suspensión celular, se decantó cuidadosamente sobre el Lymphoprep. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 30 min, promoviendo la formación de tres fases: una superior acuosa, la 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 se resuspendió en 5 mL de solución Hanks para su posterior conteo y determinación de viabilidad celular.

3. Obtención de líneas celulares

De los linfocitos extraídos con Lymphoprep, se tomaron 10×10^6 células y se incubaron en medio RPMI suplementado al 15% de suero fetal bovino y se les agregó fitohemaglutinina para inducir la proliferación linfocitaria y sobrenadante viral de Epstein Barr para lograr la obtención de líneas celulares B-linfoblastoides inmortalizadas. Se agregó 75% de una solución comercial del virus de Epstein Barr (VEB) (cepa 1492 de ATCC) y $1 \mu\text{g/mL}$ de ciclosporina A para disminuir la citotoxicidad. La solución se resuspendió suavemente junto con las células y se incubó a 37°C y 5% de CO_2 . Las células se dejaron en estas condiciones por una semana revisándose diariamente, después de este periodo se comenzaron a retirar las células muertas y agregar medio de cultivo al momento en el cual el crecimiento celular produjo el viraje del medio a un color amarillo. La inmortalización fue un proceso largo, aproximadamente de 2-3 meses donde el número celular se disminuyó considerablemente hasta lograr la proliferación de los linfocitos inmortales. La morfología y la proliferación celular son indicadores de una inmortalización exitosa, donde la observación de prolongaciones membranales, el aumento de tamaño, el cambio de pH del medio de cultivo y la formación de cúmulos son indicativos de dicho proceso.

4. Propagación y mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares se propagaron y mantuvieron a 37°C y 5% de CO_2 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 naranja 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. Las células se almacenaron en nitrógeno líquido para su preservación en medio de cultivo y 10% de DMSO a una densidad de 5×10^6 céls/mL.

5. Extracción de DNA

El DNA se extrajo a partir de 5mL de sangre total con un kit comercial de columnas de afinidad siguiendo las indicaciones del fabricante (Qiagen, Foster, California, USA). Brevemente, la muestra sanguínea se centrifugó a 2500 rpm durante 10 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. El botón de células blancas fue colocado en un tubo nuevo de 50mL donde se agregaron 500 μ L de proteasa (proteínasa K) y 12 mL de buffer AL a la suspensión celular agitando vigorosamente en un vortex. Para permitir la completa lisis celular se incubó a 70°C por 10 min. Posteriormente el homogenizado celular se transfirió a la columna de afinidad dentro de un tubo de 50mL y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min. Después de decantar los desechos celulares, la columna fue lavada primeramente con 5 mL de amortiguador AW1 y posteriormente con 5 ml de amortiguador 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 eluído 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 y cuantificado por espectrometría en el instrumento Nanodrop. Se hicieron diluciones de trabajo a una concentración de 100 ng/ μ L. Las diluciones fueron almacenadas a 4°C y los stocks a -80°C.

6. Genotipificación

Para conocer el genotipo de las muestras, a partir del DNA extraído primeramente se realizó una PCR de punto final con oligonucleótidos diseñados para abarcar la región promotora donde se sitúan los SNPs de interés (-617 y -653): For 5'-TTCCCGTTTTTCTCCCAGC-3' y Rev 5'-TTCGCAGTCACCCTGAACG-3'. El protocolo de amplificación fue el siguiente: la reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µL con 2.5 µL de buffer de reacción 10X, 2 mM de MgCl₂, 200mM de dNTPs, oligonucleótidos 100 nM, 100 ng/µL de DNA genómico y 1.25 U de Taq polimerasa (Applied Biosystems). El termociclado fue el siguiente: 94°C/10min; 94°C/1min, 63°C/1min, 72°C/45seg por 30 ciclos, 72°C/7min. Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2.5%. Posteriormente, los amplicones fueron purificados con un kit comercial (Qiagen, Foster Ca., USA) por columnas de afinidad QIAquick (QIAGEN EUA) PCR purification kit, para eliminar los reactivos 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 µL de agua a 37°C para eluir el DNA. Las muestras se incubaron 1 min a temperatura ambiente y se centrifugaron 1min a 13000 rpm.

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 fueron separados por medio de una electroforesis capilar en 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 para conocer el genotipo de las muestras utilizadas.

La densidad celular se calculó de la siguiente manera: se tomó una alícuota de 450 μL de suspensión celular, se adicionaron 50 μL de azul tripano al 0.4% (peso/volumen). Posteriormente, 10 μL de esta mezcla se colocaron 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: células / mL = (# de células) (104) (mL totales de suspensión celular) en donde: # de células = promedio de células en los cuadrantes contados; 104 = factor de conversión del área contada* en mL (1 mL=1 cm^3 =1000 mm^3).

7. Estandarización de condiciones para la inducción de la ruta

Para la estandarización de las condiciones óptimas de inducción, se utilizaron tres sustancias que activan la ruta, arsénico inorgánico (iAs) un carcinógeno, además de sulforafán (Sfn) y curcumina (Cur), dos quimiopreventores. Se tomaron como referencia dosis y tiempos de exposición subletales previamente reportados en la literatura para otros tipos celulares. Se utilizó una línea celular

de origen linfoblastoide previamente establecida en el laboratorio. Para la inducción de la ruta Nrf2-Keap1, se prepararon soluciones stock de arsenito de sodio, Sfn y Cur 100 mM, se dividieron en alícuotas de 10 μ L y se congelaron a -80°C. El primero se diluyó en agua y los otros dos en DMSO. Las soluciones de trabajo se descongelaban y diluían en el momento de realizar los experimentos. Se realizaron ensayos de tiempo y dosis respuesta para determinar las condiciones óptimas de inducción. Se utilizaron en todos los casos controles de células sin tratamiento para las comparaciones respectivas.

Para cada cinética se realizaron dos ensayos independientes en días diferentes por duplicado biológico en cada caso utilizando 2×10^6 céls, sembrándolas 24 hrs antes en 4mL de medio de cultivo suplementado y 10% de SFB. Al final se tuvieron 4 datos independientes de cada ensayo, los cuales se corrieron en triplicados técnicos en los ensayos de expresión. Las dosis utilizadas para los inductores fueron 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 and 10 μ M por 12 hrs inicialmente, después los tiempos de exposición fueron de 3, 6, 12, 18 y 24 hrs a las dosis obtenidas.

8. Exposición crónica a arsénico

Para determinar una concentración subletal donde a 4 días de exposición el 50% de las células permanecieran vivas, se realizaron ensayos de exposición crónica a iAs. Primeramente se hizo una estandarización utilizando una línea celular de origen linfoblastoide previamente establecida en el laboratorio. Se tomaron concentraciones subletales de este metaloide previamente reportadas en la literatura, las cuales fueron 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 μ M. Se construyeron gráficas de tiempo Vs % de viabilidad celular. Una vez determinada dicha concentración, las 6 líneas celulares obtenidas con los genotipos de interés fueron tratadas con la concentración de iAs determinada con estos experimentos. Se sembraron 5×10^5 células por triplicado en placas de 6 pozos tanto para la estandarización como para los ensayos con las líneas celulares.

9. Determinación de la 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% (peso/volumen). La suspensión celular se colocó en una cámara de Neubauer donde se contaron tanto las células vivas como las células. El conteo se realizó en cuatro cuadrantes de 0.1 mm^3 de volumen. La viabilidad celular se calculó de la siguiente manera: % viabilidad = (células vivas / células totales) (100).

10. 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. Se tomaron 10×10^6 células y se centrifugó a 2500 rpm para obtener un botón celular, se desechó el sobrenadante y se agregó 750 μL del Trizol homogenizando con la micropipeta cuidadosamente. Posteriormente se incubó 5 min a TA para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Después, se purificó el RNA al añadir 200 μL 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 μL 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%.

11. 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) siguiendo el protocolo del fabricante. 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 nuevamente en geles de agarosa al 1%, durante 45 min a 80 volts.

12. Síntesis de cDNA

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 fue de 20µL.

13. Determinación de la expresión génica por RT-PCR

Para determinar la expresión génica de *GAPDH*, *NFE2L2*, *HMOX-1* y *NQO1*, se diseñaron oligonucleótidos específicos con ayuda de los software Primer Premier y Primer Express. Los oligonucleótidos fueron los siguientes:

Gen	Forward	Reverse
<i>NFE2L2</i>	5'-CAGCGACGGAAAGAGTATGAGC-3'	5'-ATGTGGGCAACCTGGGAGTGAT-3'
<i>HMOX-1</i>	5'-TCCCGCAGTCAGGCAGAGG-3'	5'-ACGGGGGCAGAATCTTGAC-3'
<i>NQO1</i>	5'-CATGGTCGGCAGAAGAGCACT-3'	5'-AGTTCGAGGGTCCTTCAGTTTAC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-CATCTCTGCCCCCTCTGCTGA-3'	5'-GGATGACCTTGCCACAGCCT-3'

La reacción RT-PCR se realizó con el equipo de Applied Biosystems 7900, utilizando Sybr green como fluoróforo. 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: 95°C/10min; 95°C/15seg, 60°C/1min por 40 ciclos.

14. Análisis de datos

Como una medida relativa de los niveles basales de *NFE2L2*, se calculó el ΔCt como sigue: $\Delta Ct = GAPDH\ Ct - NFE2L2\ Ct$. Se determinó la desviación estándar con tres experimentos independientes. El cálculo de la expresión relativa de los genes inducidos al activar la ruta se determinó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ como se describe a continuación: $2^{-\Delta\Delta Ct} = [(Ct\ gen\ blanco - Ct\ GAPDH)\ control\ sin\ tratamiento] - [(Ct\ gen\ blanco - Ct\ GAPDH)\ muestra\ con\ tratamiento]$ (Scmittgen, 2008).

Para la determinación de la viabilidad celular en la exposición crónica a arsénico, se calcularon el promedio y la desviación estándar para cada línea celular.

La estadística utilizada para determinar las diferencias de expresión relativa y crecimiento celular fue *t de student*, tomando como significancia una $P < 0.05$.

RESULTADOS

1. *Muestras obtenidas y genotipos encontrados*

Inicialmente, las 17 muestras de DNA colectadas de donadores sanos fueron secuenciadas para identificar la frecuencia de los SNPs en la región promotora del gen *NFE2L2*. Tras revisar los electroferogramas (ver figura 6) encontramos 3 muestras con el genotipo homocigoto ancestral GG para el SNP -653GA, 9 para el heterocigoto GA y 5 para el homocigoto menor AA. Para el SNP -617C/A, 10 de las muestras portaban el homocigoto para el alelo ancestral CC, 6 el heterocigoto CA y sólo se encontró una muestra con el genotipo homocigoto para el alelo menor AA. Considerando el genotipo para los dos polimorfismos, en las muestras se encontraron tres individuos homocigotos compuestos GG/CC, 7 con genotipos combinados GA/CC, 4 con genotipo AA/CA, dos heterocigotos GA/CA para ambos SNPs y sólo un sujeto presentó el genotipo homocigoto compuesto para los alelos menores AA/AA. El diplotipo encontrado con mayor frecuencia fue el GA/CC (41.18%), mientras que para los SNPs individuales los genotipos más frecuentes fueron el heterocigoto para el SNP -653GA (52.94%) y el homocigoto ancestral para -617CA (58.82%) (Tabla 2).

Para analizar el efecto de las variantes -653GA y -671CA se generaron 15 líneas celulares a partir de las muestras sanguíneas obtenidas de los donadores sanos, por medio de su inmortalización con el virus de Epstein-Barr. Cada uno de los cultivos inmortalizados mostraron la formación de cúmulos y

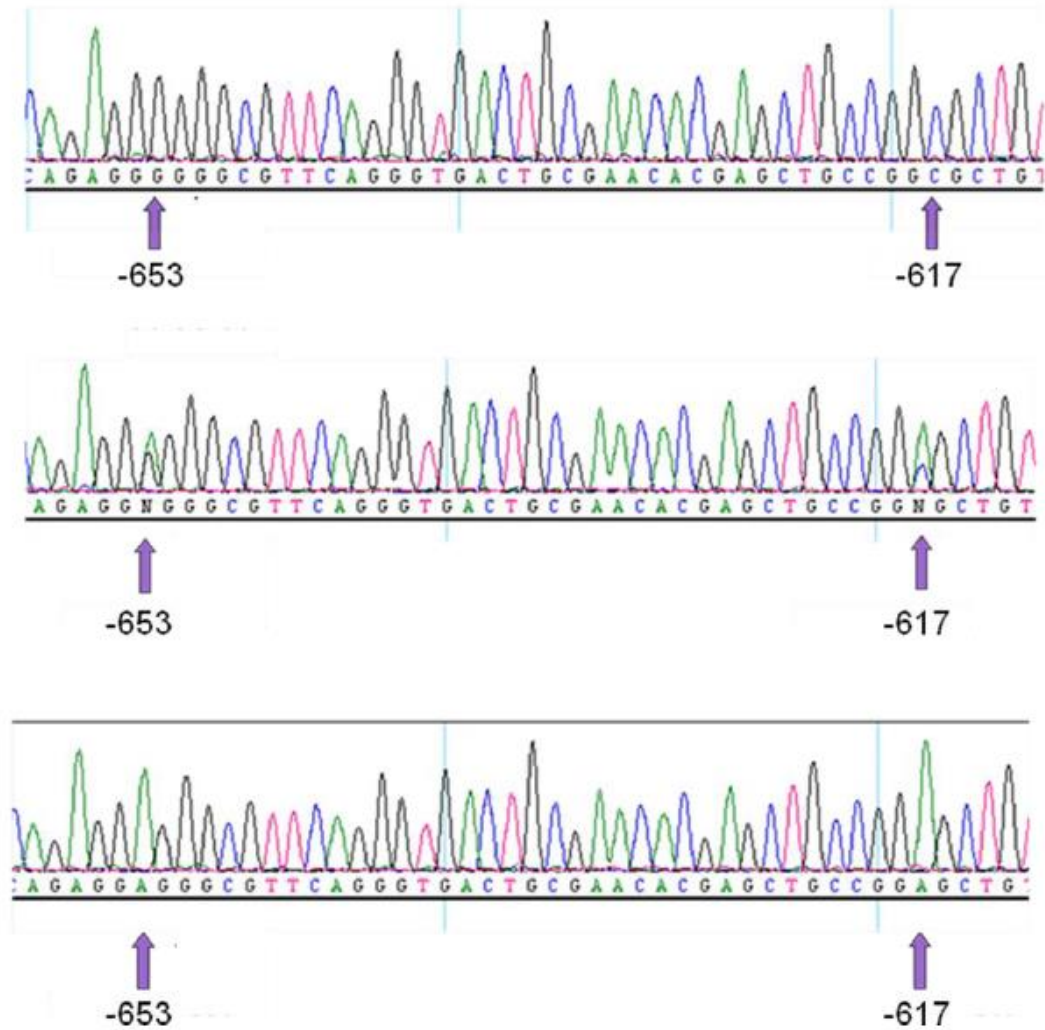


Figura 6. Electroferogramas de secuenciación automática. Panel superior, secuencia *forward* de una muestra con genotipo GG/CC, sólo se observa un pico en las posiciones -653 y -617; panel medio, se muestra una muestra con genotipo heterocigoto para ambos SNPs, dos picos superpuestos muestran dos bases presentes en la secuencia con genotipo GA/CA; parte inferior muestra un homocigoto para los alelos menores AA/AA.

Tabla 2. Genotipos y frecuencias encontradas en las muestras de donadores mexicanos sanos de los SNPs -653 y -617 en la región promotora de *NFE2L2*, agrupados por genotipo combinado genotipos independientes.

SNPs	genotipos	muestras (n=17)	frecuencia (%)
-653 -617	GG CC	3	17.65
	GACA	2	11.76
	GACC	7	41.18
	AA CA	4	23.53
	AA AA	1	5.88
-653	GG	3	17.65
	GA	9	52.94
	AA	5	29.41
-617	CC	10	58.82
	CA	6	35.29
	AA	1	5.88

prolongaciones membranales. Dichas líneas se propagaron hasta alcanzar el número suficiente para congelar 10 viales y tener un banco de respaldo.

De las líneas celulares generadas, 7 tenían los genotipos de interés en las posiciones -653 y -617 respectivamente GG/CC (n = 3), GA/CA (n = 2) y AA/AA (n = 2) que se utilizaron para ensayos posteriores.

2. Activación de la ruta Nrf2-Keap1 por quimiopreventores y arsénico

Para estandarizar las condiciones para inducir la activación de la ruta Nrf2-Keap1 a través del uso de iAs, Sfn y Cur, la línea celular linfoblastoide NL-1, previamente establecida en el laboratorio, fue expuesta a diferentes concentraciones de estos inductores por 24 hrs, tras lo cual se midieron los niveles de mRNA de los genes blanco de Nrf2, *HMOX1* y *NQO1*.

En los ensayos dosis respuesta se observó una inducción dosis-dependiente de ambos genes regulados por Nrf2 con los 3 inductores. Sin embargo, en el caso de la Cur se observó una reducción en los niveles de expresión de *HMOX1* y *NQO1* después de una exposición con 10 μ M del fitoquímico. Es importante señalar que la concentración de 5 μ M para los tres inductores generó la inducción notable de *HMOX1* y en el caso de *NQO1* fue donde se obtuvo el pico más alto de expresión relativa (véanse figuras 7A y 7B).

Como resultado de los ensayos anteriores las pruebas tiempo respuesta de los tres inductores se realizaron con la concentración de 5 μ M. En estos ensayos el RNA de *HMOX1* alcanza su mayor inducción con iAs, Sfn y Cur a las 18, 6 y 12 horas respectivamente, mientras que el mRNA de *NQO1*, alcanza su pico de inducción a las 18 horas de incubación con iAs y Sfn, mientras que con Cur es a las 12 horas (ver figuras 7C y 7D).

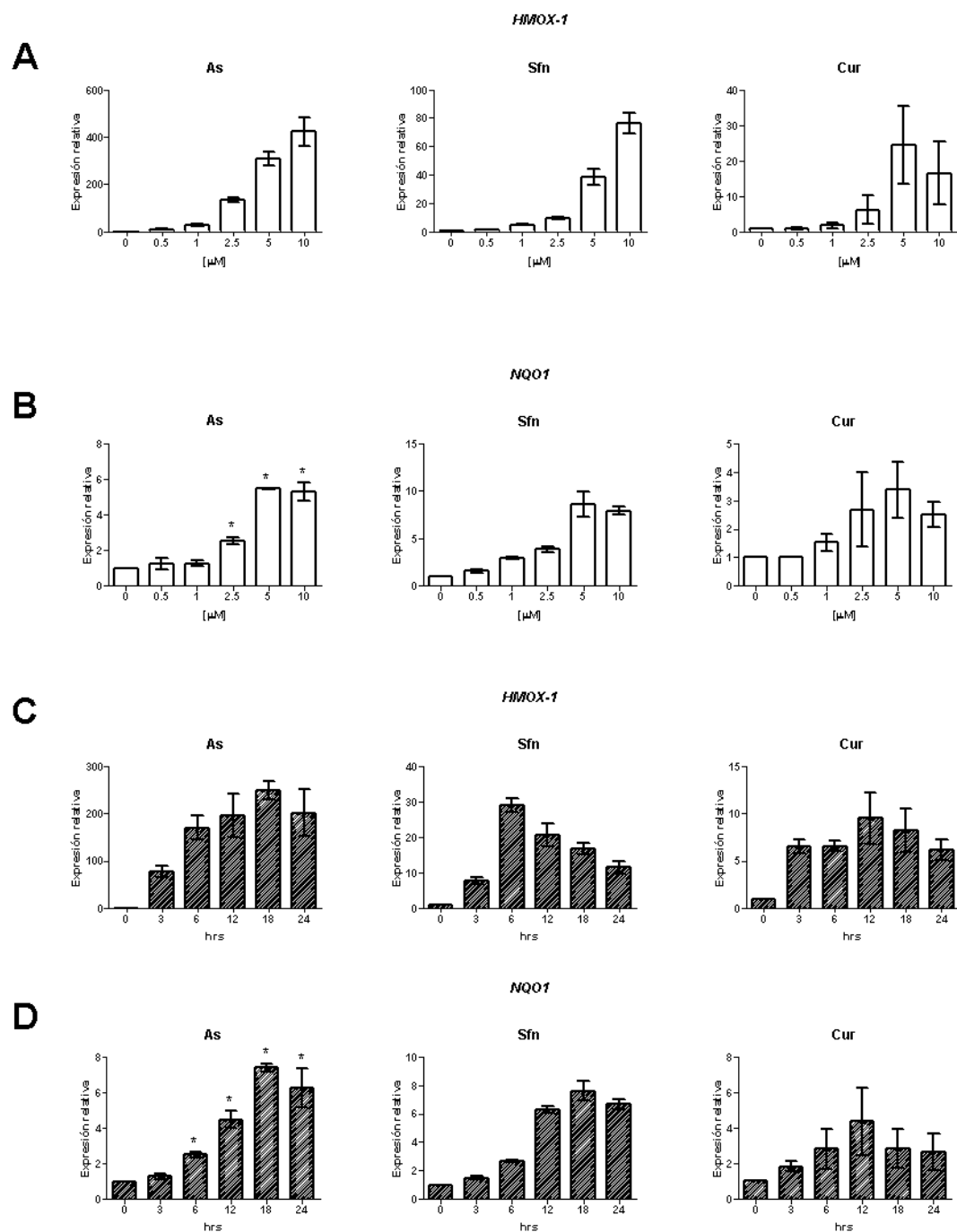


Figura 7. Efecto de los inductores iAs, Sfn y Cur en diferentes condiciones de dosis y tiempo de exposición en una línea celular linfoblastoide. Curvas dosis y tiempo respuesta con arsénico, sulforafán, y curcumina, para la estandarización de condiciones de inducción. A) *HMOX1* dosis-respuesta, B) *NQO1* dosis-respuesta, C) *HMOX1* tiempo-respuesta y D) *NQO1* tiempo-respuesta.

3. Influencia de los SNPs -653GA y -617CA en la expresión de los genes *NFE2L2*, *HMOX-1* y *NQO1*

Para determinar si la inducción de la expresión de *NFE2L2*, *HMOX1* y *NQO1* a nivel de mRNA se ve modificada por la actividad de proliferación se comparó la expresión de estos genes en una línea celular inducida con iAs y Sfn, con y sin fitohemaglutinina (PHA). Los resultados mostraron una diferencia en *HMOX1* con ambos inductores, siendo mayor en los estimulados con PHA. En *NFE2L2* y *NQO1* prácticamente no se observaron diferencias en la expresión (ver figura 8). Con estos resultados, se decidió estimular la proliferación celular de los cultivos primarios con PHA obtenidos posteriormente.

Para determinar el efecto de los SNPs en las posiciones -653GA y -617CA sobre la expresión basal del gen *NFE2L2* se utilizaron los cultivos primarios de linfocitos obtenidos de 17 donadores sanos estimulados con PHA. Al agrupar las muestras de acuerdo a su genotipo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión del mRNA de *NFE2L2*, comparando tanto genotipos como diplotipos (ver figura 9).

Sin embargo, cuando se compara el genotipo GA/CA contra el genotipo ancestral GG/CC se observa una ligera tendencia a la reducción de la expresión del mRNA de *NFE2L2* (figura 9C), al igual que en la comparación sólo con el SNP -617 CC vs. AA (figura 9B).

Con respecto a las líneas celulares linfoblastoides se aprecia una disminución en la expresión basal aparentemente influenciada por el genotipo de los SNPs estudiados, comparando el heterocigoto GA/CA y homocigoto del alelo menor vs. el homocigoto ancestral (figura 10). Esto se puede observar aun cuando no hay diferencias estadísticamente significativas.

Para determinar la activación de la ruta a nivel transcripcional y el efecto de las variantes del promotor de *NFE2L2* se midió la expresión relativa de dos de los principales genes activados por *NFE2L2*, *HMOX1* y *NQO1*, inducidos con iAs,

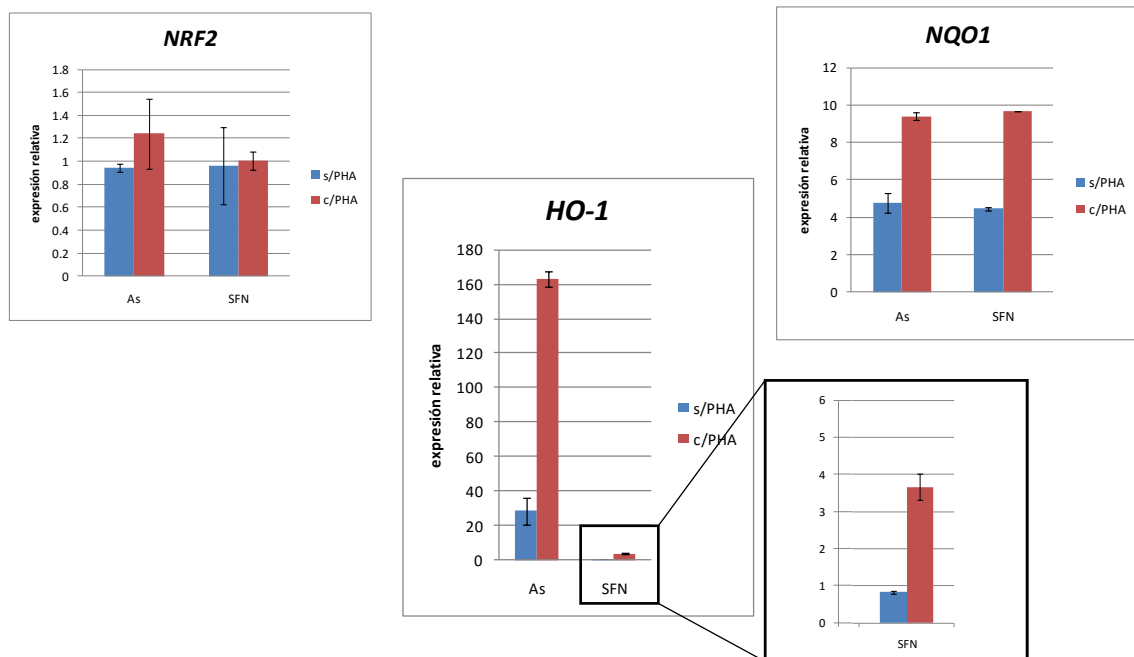


Figura 8. Medición de la expresión génica en células linfoblastoides en proliferación. Expresión inducida relativa de *NFE2L2*, *HMOX1* y *NQO1* en un cultivo primario de linfocitos induciendo la ruta Nrf2-Keap1 con iAs y Sfn. En azul se muestra el cultivo en mantenimiento y en rojo estimulado con PHA.

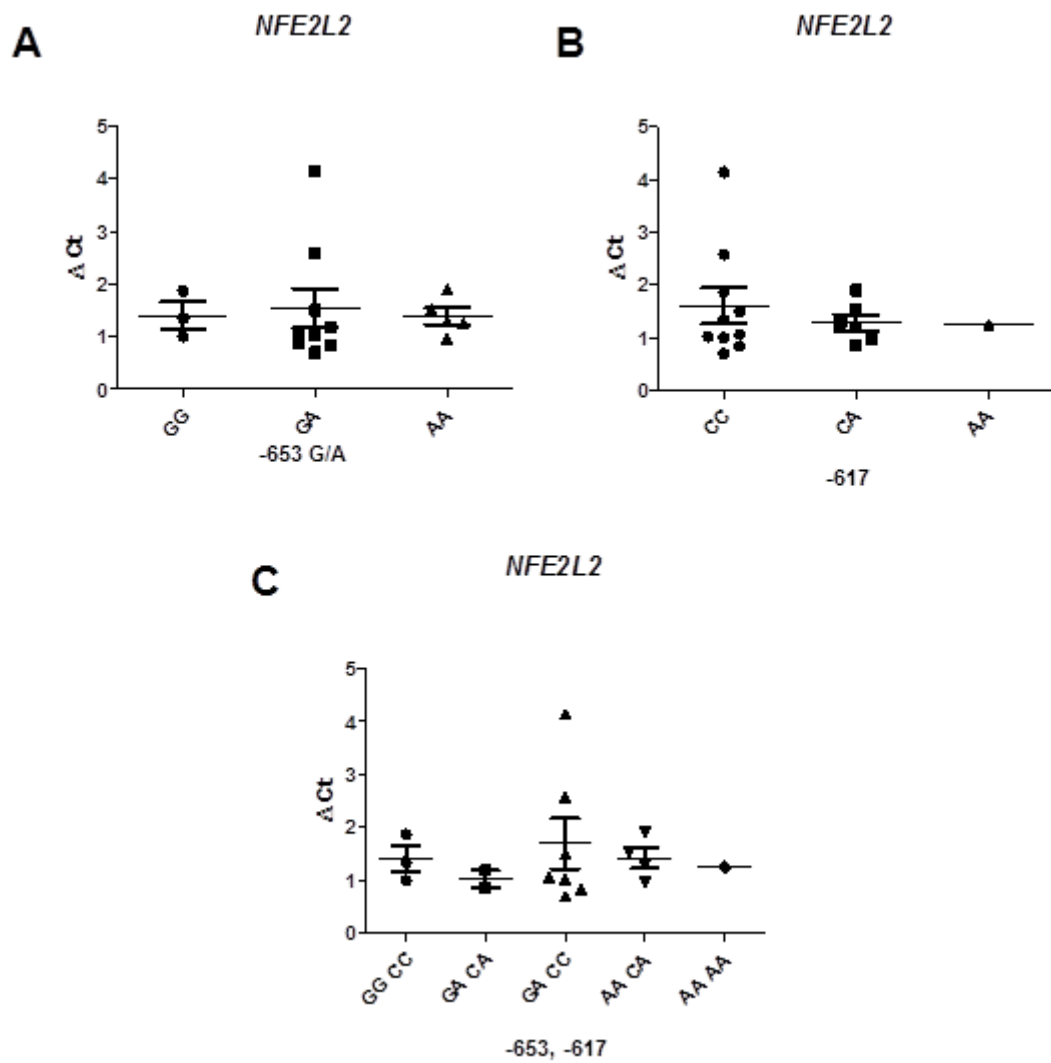


Figura 9. Efecto del genotipo sobre la expresión basal de *NFE2L2*. Determinación de la expresión basal de *NFE2L2* en cultivos primarios de linfocitos agrupados por A) genotipo SNP - 617, B) genotipo SNP -653 y C) diplotipo -653 y -617

Sfn y Cur, determinando el nivel de mRNA de dichos genes en las seis líneas celulares establecidas.

En la figura 11 se observa que la presencia de los SNPs no presenta efecto alguno sobre la expresión relativa de los genes, después de inducir la ruta con cualquiera de los 3 inductores analizados. Sin embargo, puede observarse una tendencia al aumento en la expresión de *NFE2L2* cuando se utiliza Cur, aparentemente correspondiente con el genotipo de las líneas celulares (fig. 11A). Como es de esperarse, los genes blanco de Nrf2 si se inducen con iAs, Sfn y Cur, aunque no hay una correspondencia dependiente del genotipo de *NFE2L2*. Es importante señalar que *HMOX1* presenta una expresión del mRNA más elevada que *NQO1* al término de la exposición con todos los inductores (figura 11).

4. Evaluación del efecto de las variantes sobre la toxicidad del iAs

Para evaluar el efecto de las variantes génicas -653GA y -617CA de *NFE2L2* sobre el efecto citotóxico a la exposición crónica a iAs, primeramente, se expuso a una línea linfoblastoide a diferentes concentraciones de iAs por cuatro días. El iAs mostró efectos citotóxicos dependientes del tiempo de exposición en todas las dosis utilizadas, presentando un efecto mitogénico en la dosis más baja de 1 μ M en el primer día (figura 12).

Después de estos ensayos, se expuso a las líneas celulares con los diferentes genotipos para los SNPs -653GA y -617CA a iAs 1 μ M por 4 días, pues esta dosis no sólo es letal para las células, sino que permitía su proliferación después de 4 días de exposición. Se observó en las líneas portadoras del genotipo homocigoto para los alelos menores de ambos SNPs una tasa de proliferación significativamente menor que la observada en las líneas celulares con el genotipo homocigoto para los alelos ancestrales (figura 13).

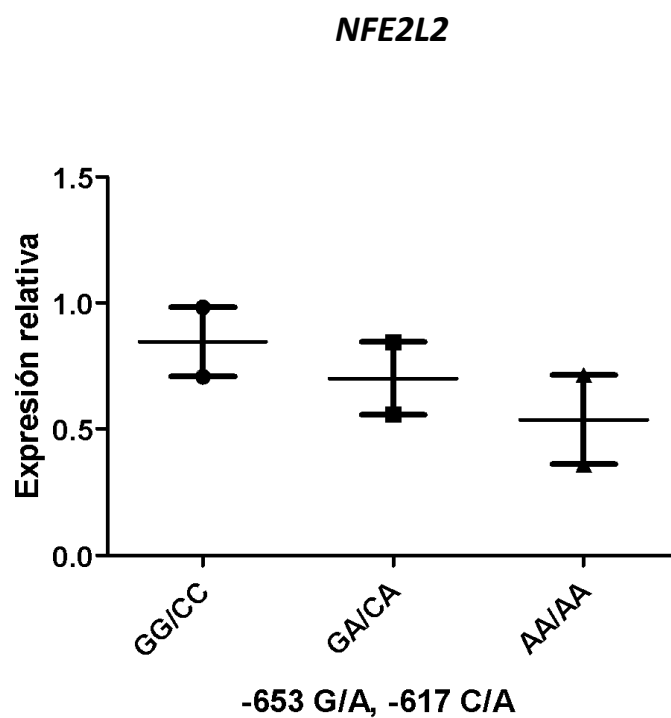


Figura 10. Efecto del genotipo de los SNPs -653 y -617 sobre la expresión génica basal en líneas B-linfoblastoides. Determinación de la expresión basal relativa de *NFE2L2* por el método de $\Delta\Delta C_t$ en 6 líneas celulares linfoblastoides independientes con diferente genotipo. Se calculó el promedio entre líneas con genotipo idéntico y se determinaron las diferencias entre líneas con diferentes genotipos con t de student ($p > 0.05$).

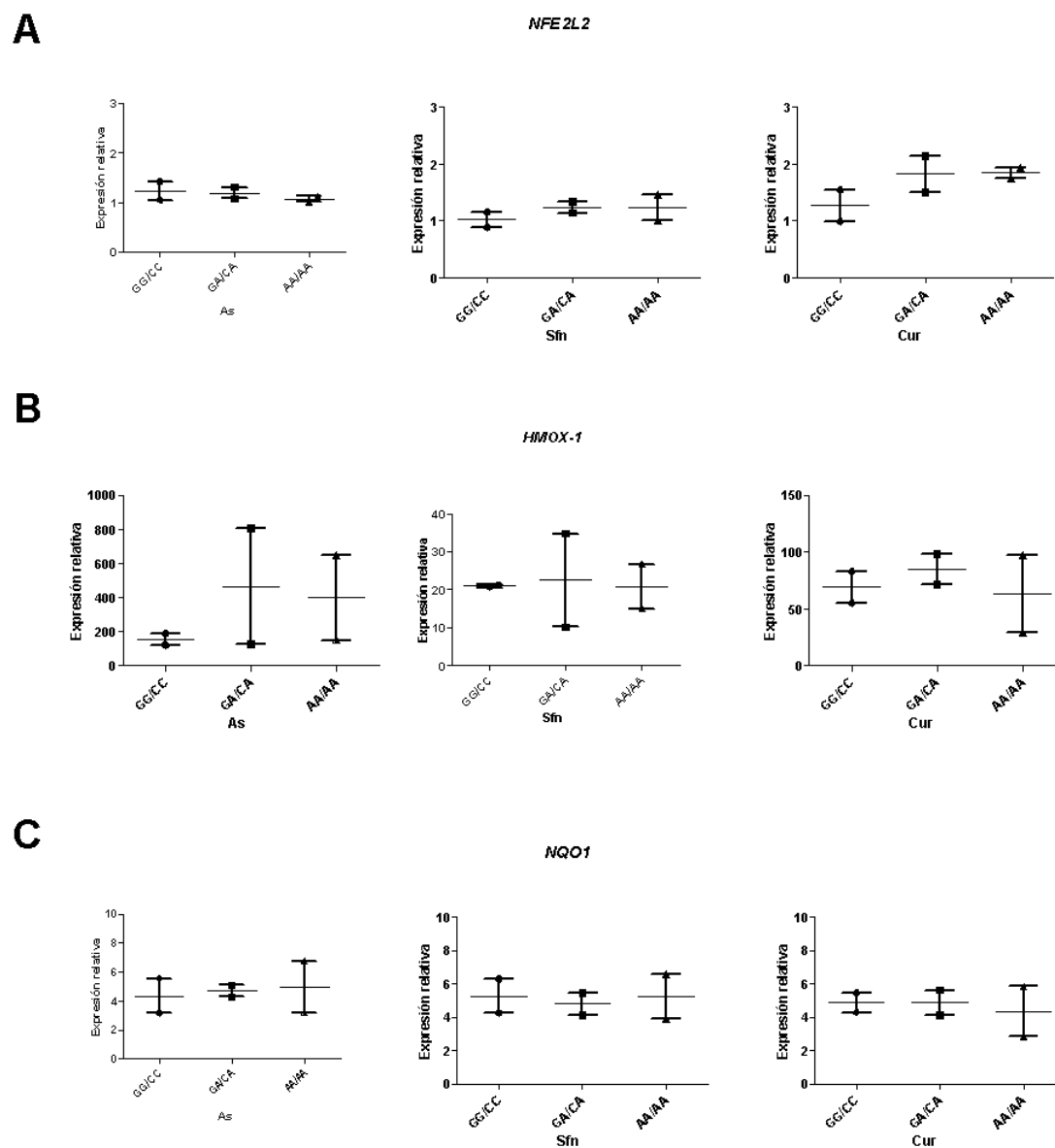


Figura 11. Medición de la expresión génica de *NFE2L2*, *HMOX-1* y *NQO1* dependiente del genotipo en las posiciones -653 y -617 en condiciones inducidas. Determinación de la expresión relativa inducida de 6 líneas linfoblatoideas con diferentes genotipos utilizando iAs, Sfn y Cur 5uM por 12 hrs.

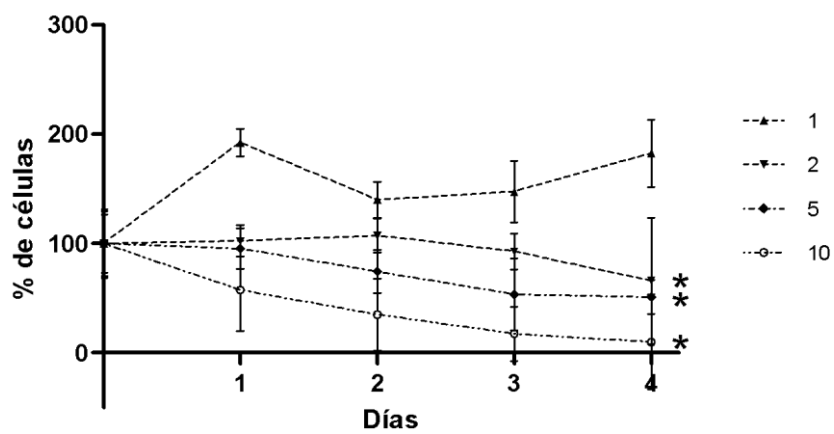


Figura 12. Efecto del iAs sobre el crecimiento celular. Exposición de una línea celular linfoblastoide a diferentes concentraciones de iAs (1, 2, 5 y 10uM) durante 4 días. Porcentajes expresados con respecto al día cero. *P<0.05 respecto al día cero, con la prueba t de student.

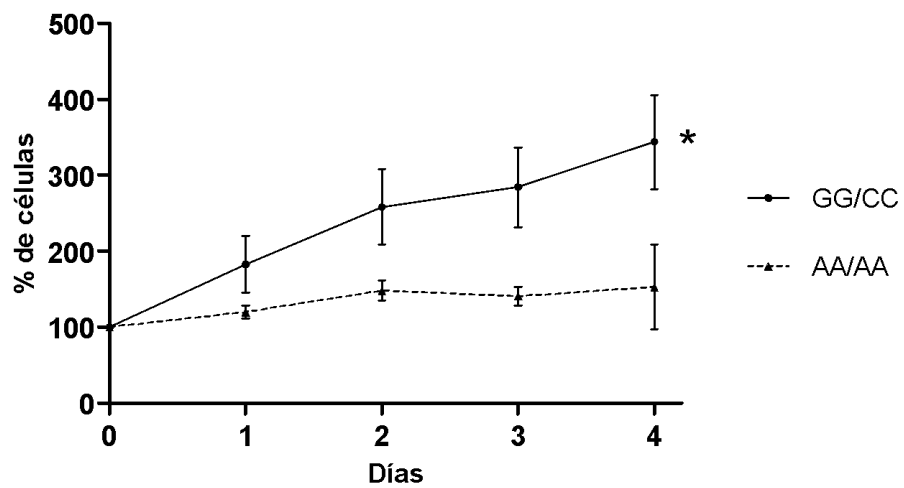


Figura 13. Efecto del genotipo sobre la respuesta a la exposición crónica al iAs. Líneas celulares linfoblastoides con genotipos GG/CC (-653) y AA/AA (-617) expuestas de forma crónica a iAs 1 μ m por 4 días. La diferencia en el crecimiento entre ellas es $P < 0.05$ en el homocigoto del alelo menor con respecto al homocigoto ancestral (prueba de t de student).

DISCUSIÓN

El estrés oxidante generado por las distintas especies reactivas de oxígeno, producidas tanto endógena como exógenamente, es capaz de dañar al ADN, lípidos y proteínas. De manera importante, se encuentra asociado con varias patologías humanas como diabetes, cáncer, obesidad y enfermedades cardiovasculares (Golbidi et al 2012). El factor de transcripción Nrf2 es un regulador clave de los mecanismos celulares que protegen contra el estrés oxidativo. La participación de Nrf2 en la citoprotección mediante la activación transcripcional de un gran número de genes relacionados con diversas funciones celulares, como antioxidantes y desintoxicantes (e.g. *HMOX-1* y *NQO1*) respectivamente está bien documentada. Recientemente, el estudio de esta vía en busca de sus efectos fisiológicos en varias enfermedades humanas, como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, adenocarcinoma de endometrio, tromboembolismo venoso en mujeres posmenopáusicas, cáncer de pulmón en fumadores y espermatogénesis ha cobrado importancia (Canova et al. 2012; Hua et al. 2010; Bouligand et al. 2011; Wang et al. 2010; Yu et al. 2012). Particularmente, los SNPs -653GA y -617CA situados en la región promotora del gen codificante de Nrf2 han sido asociados con varias enfermedades crónico-degenerativas como nefritis lúpica, Alzheimer, Parkinson y gastritis (Cordova et al. 2010; von Otter et al. 2010; Chen et al. 2013; von Otter et al. 2010; Arisawa et al. 2007). Sin embargo, se ha descrito poco sobre el efecto que tienen los SNPs -653GA y -617CA en la regulación de la expresión de Nrf2.

En el presente trabajo encontramos que los niveles basales de mRNA de *NFE2L2* no fueron influenciados por los genotipos de los SNPs -653G/A y -617C/A, tanto en cultivos primarios como en células inmortalizadas provenientes de linfocitos. Contrario a nuestros hallazgos, un trabajo previo mostró, usando ensayos de luciferasa que al menos el alelo menor del SNP -617C/A se asocia con una menor actividad del promotor con respecto a los alelos ancestrales (Marzec et al. 2007). Estos resultados podrían explicarse por el distinto enfoque

experimental que se abordó en ambos trabajos, dado que en el trabajo previo se utilizaron construcciones con el gen reportero de la luciferasa, donde se incluyeron sólo <750 pb de la región promotora de *NFE2L2*; mientras que en nuestro estudio medimos los niveles basales relativos de *NFE2L2* en diecisiete cultivos celulares primarios y seis líneas de celulares linfoblastoides independientes, en donde participa todo el contexto celular, el genoma completo y sus variantes.

En un trabajo previo realizado en líneas celulares linfoblastoides, el genotipo homocigoto menor AA del SNP -617CA presentó una disminución en los niveles basales del mRNA de *NFE2L2* con respecto con el genotipo homocigoto mayor, aunque no se analizó el efecto del SNP el -653GA (Marzec et al. 2007; Suzuki et al. 2013). Por el contrario, en nuestro trabajo no encontramos diferencias significativas en los niveles basales del mRNA de *NFE2L2* en cualquiera de los cultivos utilizados, primarios o inmortalizados que llevan los diferentes genotipos para los SNPs -617C/A y -653G/A. Sin embargo, si logramos observar una tendencia hacia la reducción del mRNA de *NFE2L2* en células que portan el genotipo homocigoto menor, lo que muestra una tendencia muy similar a lo reportado por Suzuki y cols., donde observan una diferencia significativa en la disminución de la expresión del genotipo AA vs. CC, ($P=0.031$) (Suzuki et al. 2013). En líneas celulares portadoras de haplotipos que contienen genotipos tanto menores como ancestrales para los SNPs -653GA y -617CA, Yu y cols. no encontraron diferencias significativas en los niveles basales de mRNA *NFE2L2* (Yu et al. 2012). Esta discrepancia podría ser debido a alguna diferencia en la estructura de haplotipos que dependa de la etnicidad de nuestras muestras. En nuestro trabajo, sólo obtuvimos una muestra en cultivos primarios con el genotipo AA/AA para ambos polimorfismos, pues la frecuencia de este haplotipo en población mexicana es muy baja, por lo cual no pudimos obtener resultados estadísticos con valores significativos. Con respecto a las líneas celulares, obtuvimos dos con genotipo AA/AA y con ellas logramos observar la tendencia a la disminución en la expresión de *NFE2L2*.

La vía antioxidante Nrf2-Keap1 puede ser activada por diferentes sustancias, tanto naturales como sintéticas. En el caso de las carcinogénicas la activación de la ruta permite contrarrestar los efectos tóxicos de sustancias como el arsénico; mientras que en el caso de quimiopreventores el aumento de los niveles proteicos de Nrf2 y sus genes blanco, permite a las células estar preparadas para la presencia de un tóxico ambiental. Se ha demostrado que la regulación de Nrf2 es principalmente postraducciona, por lo que su regulación transcripcional no es clara. En concordancia con lo reportado previamente en otros trabajos, la exposición de células linfoblastoides a los inductores iAs, SFN y Cur produjo la activación de la ruta Nrf2-Keap1 en una forma dosis y tiempo dependiente (Kim et al. 2011; Leiser and Miller; He et al. 2006; Surh, Kundu, and Na 2008). En el caso de *NFE2L2*, la exposición individual a iAs y Sfn no fue capaz de incrementar sus niveles de mRNA, independientemente del genotipo, mientras que la Cur produjo un ligero aumento en los niveles de mRNA de *NFE2L2*. Esto se observó en los cultivos celulares portadores del alelo menor para el SNP -617C/A en comparación con los portadores del alelo ancestral. Aunque hay pocos reportes que muestran niveles mayores de mensajero de *NFE2L2* utilizando la curcumina (Khor et al. 2011; Yang et al. 2009) se puede considerar como un incremento discreto con respecto a los niveles basales porque no exceden un orden de magnitud, similar a lo reportado previamente (Natarajan et al. 2012; Yang et al. 2009). Del mismo modo, el incremento observado en los niveles de mRNA de *HMOX-1* y *NQO1* después del tratamiento también fueron independientes de los genotipos de -653G/A y -617C/A. En el caso de diferentes inductores, es posible que se estén activando diversas vías de señalización, ejerciendo un efecto diferencial dependiendo del inductor (Lee et al. 2013). No debemos olvidar la existencia de otros mecanismos regulatorios, como la regulación postraducciona, pudiendo verse influida por los inductores como acetilación de histonas en respuesta a estrés por arsénico (Sun, Chin, and Zhang 2009). Aunque Nrf2 se expresa en todos los tejidos, existen diferencias entre diversos tipos celulares (McMahon et al. 2001), pudiendo ser una razón de

porque no encontramos diferencias significativas en la expresión del mRNA de *NFE2L2* en linfocitos. Por ejemplo, células derivadas de hígado y piel poseen mecanismos detoxificantes no encontrados en linfocitos, como la transformación de As inorgánico a orgánico por la adición de grupos metilo, lo cual vuelve más eficiente su excreción de la célula (Faita et al. 2013).

Además, aunque hay algunos informes de evaluación de diferentes haplotipos de las variantes en *NFE2L2*, necesitamos ampliar el estudio utilizando un número mayor de muestras para dilucidar el efecto funcional de estos SNPs en la capacidad citoprotectora de Nrf2.

En estudios posteriores, el análisis de los haplotipos encontrados en las muestras de los controles, ayudarían a explicar el efecto de las diferentes combinaciones que hallamos en muestras de mexicanos. En los linfocitos expuestos a sustancias tóxicas como el arsénico se reporta la modificación de diversas poblaciones de células inmunes, de los genes y la respuesta del sistema inmunológico, además de causar daño citogenético (Andrew et al. 2008; Biswas et al. 2008; Ghosh et al. 2008), pero los efectos en las vías de desintoxicación no han sido evaluadas en estos tipos celulares. La vía Nrf2-Keap1 es esencial en el mecanismo citoprotector contra la exposición a EO. Se sabe que las células uroteliales están protegidas contra daños por sustancias generadoras de ROS a través de Nrf2 (Wang et al. 2007). También, la acumulación intracelular de iAs es citotóxico en hepatocitos (Shinkai et al. 2006). Se ha demostrado que las personas expuestas crónicamente a As son más propensas a desarrollar cáncer en diferentes tejidos tales como piel, vejiga y pulmón, para lo cual se propone como un mecanismo de daño del As la generación de estrés oxidante (Hughes 2002). Nuestros resultados muestran un posible efecto de *NFE2L2* en la viabilidad celular dependiendo del genotipo, en donde los que poseen GG/CC tienen mayor viabilidad que los AA/AA después de cuatro días de exposición crónica a iAs. Los mecanismos a través de los cuales estos polimorfismos ejercen un efecto directo sobre la viabilidad celular en exposición crónica a iAs necesitan ser estudiados más a fondo.

Esto es importante porque, probablemente, las personas expuestas crónicamente a este metaloide pueden tener susceptibilidad diferente dependiendo de su origen étnico y por lo tanto, podrían tener un aumento en el riesgo a desarrollar ciertos tipos de cáncer asociado a iAs, pues juega un papel importante en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular (Wang et al. 2012).

Una limitante de nuestro trabajo es el número de líneas celulares obtenidas, por lo cual, para corroborar estos resultados se necesita incrementar el número con los genotipos de interés. Pero esto sienta un buen precedente del efecto que pueden tener los SNPs del promotor de *NFE2L2* en la exposición crónica a este metaloide.

CONCLUSIONES

Con estos resultados se observa que en condiciones basales el genotipo homocigoto para los alelos menores de los SNPs -617CA y -653GA se asocia con una tendencia a niveles de mRNA de *NFE2L2* menores en comparación con los genotipos homocigotos para los alelos mayores y heterocigotos.

En el caso de la inducción de la ruta Nrf2-Keap1 con iAs, Sfn y Cur, los SNPs -617CA y -653GA no parecen alterar la expresión del gen *NFE2L2*.

En la exposición crónica de las células a iAs, los SNPs de *NFE2L2* estudiados en las cuatro líneas celulares, mostraron un efecto diferencial de la protección al metaloide dependiente del genotipo, el ancestral a la alta y el de riesgo a la baja.

Se requiere de estudios adicionales para entender diferencias en los mecanismos moleculares implicados en la activación de la vía Nrf2-Keap1 con diferentes inductores.

BIBLIOGRAFÍA

- Abiko, Y., Y. Shinkai, D. Sumi, and Y. Kumagai. 2010. Reduction of arsenic-induced cytotoxicity through Nrf2/HO-1 signaling in HepG2 cells. *J Toxicol Sci* 35 (3):419-23.
- Andrew, A. S., D. A. Jewell, R. A. Mason, M. L. Whitfield, J. H. Moore, and M. R. Karagas. 2008. Drinking-water arsenic exposure modulates gene expression in human lymphocytes from a U.S. population. *Environ Health Perspect* 116 (4):524-31.
- Arisawa, T., T. Tahara, T. Shibata, M. Nagasaka, M. Nakamura, Y. Kamiya, H. Fujita, D. Yoshioka, Y. Arima, M. Okubo, I. Hirata, and H. Nakano. 2007. Association between promoter polymorphisms of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 gene and peptic ulcer diseases. *Int J Mol Med* 20 (6):849-53.
- Arisawa, T., T. Tahara, T. Shibata, M. Nagasaka, M. Nakamura, Y. Kamiya, H. Fujita, D. Yoshioka, M. Okubo, I. Hirata, and H. Nakano. 2008. Nrf2 gene promoter polymorphism and gastric carcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 55 (82-83):750-4.
- Baird, L., and A. T. Dinkova-Kostova. 2011. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 85 (4):241-72.
- Biswas, R., P. Ghosh, N. Banerjee, J. K. Das, T. Sau, A. Banerjee, S. Roy, S. Ganguly, M. Chatterjee, A. Mukherjee, and A. K. Giri. 2008. Analysis of T-cell proliferation and cytokine secretion in the individuals exposed to arsenic. *Hum Exp Toxicol* 27 (5):381-6.
- Bouligand, J., O. Cabaret, M. Canonico, C. Verstuyft, L. Dubert, L. Becquemont, A. Guiochon-Mantel, and P. Y. Scarabin. 2011. Effect of NFE2L2 genetic polymorphism on the association between oral estrogen therapy and the risk of venous thromboembolism in postmenopausal women. *Clin Pharmacol Ther* 89 (1):60-4.

- Bryan, H. K., A. Olayanju, C. E. Goldring, and B. K. Park. 2013. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol* 85 (6):705-17.
- Canova, C., C. Dunster, F. J. Kelly, C. Minelli, P. L. Shah, C. Caneja, M. K. Tumilty, and P. Burney. 2012. PM10-induced hospital admissions for asthma and chronic obstructive pulmonary disease: the modifying effect of individual characteristics. *Epidemiology* 23 (4):607-15.
- Cook, E. H., Jr., and S. W. Scherer. 2008. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature* 455 (7215):919-23.
- Cordova, E. J., A. Martinez-Hernandez, L. Uribe-Figueroa, F. Centeno, M. Morales-Marin, H. Koneru, M. A. Coleman, and L. Orozco. 2014. The NRF2-KEAP1 pathway is an early responsive gene network in arsenic exposed lymphoblastoid cells. *PLoS One* 9 (2):e88069.
- Cordova, E. J., R. Velazquez-Cruz, F. Centeno, V. Baca, and L. Orozco. 2010. The NRF2 gene variant, -653G/A, is associated with nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Lupus* 19 (10):1237-42.
- Czerska, M., K. Mikolajewska, M. Zielinski, J. Gromadzinska, and W. Wasowicz. 2015. Today's oxidative stress markers. *Med Pr* 66 (3):393-405.
- Chan, K., R. Lu, J. C. Chang, and Y. W. Kan. 1996. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (24):13943-8.
- Chang, L., and M. Karin. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410 (6824):37-40.
- Chen, Y. C., Y. R. Wu, Y. C. Wu, G. J. Lee-Chen, and C. M. Chen. 2013. Genetic analysis of NFE2L2 promoter variation in Taiwanese Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 19 (2):247-50.
- Cho, H. Y. 2013. Genomic structure and variation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. *Oxid Med Cell Longev* 2013:286524.
- Chorley, B. N., M. R. Campbell, X. Wang, M. Karaca, D. Sambandan, F. Bangura, P. Xue, J. Pi, S. R. Kleeberger, and D. A. Bell. 2012. Identification of novel

- NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Res* 40 (15):7416-29.
- Del Razo, L. M., B. Quintanilla-Vega, E. Brambila-Colombres, E. S. Calderon-Aranda, M. Manno, and A. Albores. 2001. Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 177 (2):132-48.
- Enomoto, A., K. Itoh, E. Nagayoshi, J. Haruta, T. Kimura, T. O'Connor, T. Harada, and M. Yamamoto. 2001. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci* 59 (1):169-77.
- Faita, F., L. Cori, F. Bianchi, and M. G. Andreassi. 2013. Arsenic-induced genotoxicity and genetic susceptibility to arsenic-related pathologies. *Int J Environ Res Public Health* 10 (4):1527-46.
- Fernandez, M. I., J. F. Lopez, B. Vivaldi, and F. Coz. 2012. Long-term impact of arsenic in drinking water on bladder cancer health care and mortality rates 20 years after end of exposure. *J Urol* 187 (3):856-61.
- Fruehauf, J. P., and F. L. Meyskens, Jr. 2007. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res* 13 (3):789-94.
- Ghosh, P., A. Basu, K. K. Singh, and A. K. Giri. 2008. Evaluation of cell types for assessment of cytogenetic damage in arsenic exposed population. *Mol Cancer* 7:45.
- Golbidi, S., A. Mesdaghinia, and I. Laher. 2012. Exercise in the metabolic syndrome. *Oxid Med Cell Longev* 2012:349710.
- Guan, C. P., M. N. Zhou, A. E. Xu, K. F. Kang, J. F. Liu, X. D. Wei, Y. W. Li, D. K. Zhao, and W. S. Hong. 2008. The susceptibility to vitiligo is associated with NF-E2-related factor2 (Nrf2) gene polymorphisms: a study on Chinese Han population. *Exp Dermatol* 17 (12):1059-62.
- He, X., M. G. Chen, G. X. Lin, and Q. Ma. 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):23620-31.
- Hong, F., M. L. Freeman, and D. C. Liebler. 2005. Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chem Res Toxicol* 18 (12):1917-26.
- Hu, R., C. L. Saw, R. Yu, and A. N. Kong. 2010. Regulation of NF-E2-related factor 2 signaling for cancer chemoprevention: antioxidant coupled with antiinflammatory. *Antioxid Redox Signal* 13 (11):1679-98.
- Hua, C. C., L. C. Chang, J. C. Tseng, C. M. Chu, Y. C. Liu, and W. B. Shieh. 2010. Functional haplotypes in the promoter region of transcription factor Nrf2 in chronic obstructive pulmonary disease. *Dis Markers* 28 (3):185-93.
- Hughes, M. F. 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 133 (1):1-16.
- Hughes, M. F., B. D. Beck, Y. Chen, A. S. Lewis, and D. J. Thomas. 2011. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol Sci* 123 (2):305-32.
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431 (7011):931-45.
- Itoh, K., T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto, and Y. Nabeshima. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236 (2):313-22.
- Kaspar, J. W., and A. K. Jaiswal. 2010. An autoregulatory loop between Nrf2 and Cul3-Rbx1 controls their cellular abundance. *J Biol Chem* 285 (28):21349-58.
- Kensler, T. W., and N. Wakabayashi. 2010. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis* 31 (1):90-9.

- Kessel, M., S. X. Liu, A. Xu, R. Santella, and T. K. Hei. 2002. Arsenic induces oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mol Cell Biochem* 234-235 (1-2):301-8.
- Khor, T. O., Y. Huang, T. Y. Wu, L. Shu, J. Lee, and A. N. Kong. 2011. Pharmacodynamics of curcumin as DNA hypomethylation agent in restoring the expression of Nrf2 via promoter CpGs demethylation. *Biochem Pharmacol* 82 (9):1073-8.
- Kim, H. J., M. Zheng, S. K. Kim, J. J. Cho, C. H. Shin, Y. Joe, and H. T. Chung. 2011. CO/HO-1 Induces NQO-1 Expression via Nrf2 Activation. *Immune Netw* 11 (6):376-82.
- Klaunig, J. E., Z. Wang, X. Pu, and S. Zhou. 2011. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 254 (2):86-99.
- Kwak, M. K., K. Itoh, M. Yamamoto, and T. W. Kensler. 2002. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol* 22 (9):2883-92.
- Kwak, M. K., K. Itoh, M. Yamamoto, T. R. Sutter, and T. W. Kensler. 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):135-45.
- Lee, J. H., T. O. Khor, L. Shu, Z. Y. Su, F. Fuentes, and A. N. Kong. 2013. Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression. *Pharmacol Ther* 137 (2):153-71.
- Leiser, S. F., and R. A. Miller. Nrf2 signaling, a mechanism for cellular stress resistance in long-lived mice. *Mol Cell Biol* 30 (3):871-84.
- Marian, A. J. 2012. Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Transl Res* 159 (2):64-79.

- Marnett, L. J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21 (3):361-70.
- Martin, F., J. M. van Deursen, R. A. Shivdasani, C. W. Jackson, A. G. Troutman, and P. A. Ney. 1998. Erythroid maturation and globin gene expression in mice with combined deficiency of NF-E2 and nrf-2. *Blood* 91 (9):3459-66.
- Marzec, J. M., J. D. Christie, S. P. Reddy, A. E. Jedlicka, H. Vuong, P. N. Lanken, R. Aplenc, T. Yamamoto, M. Yamamoto, H. Y. Cho, and S. R. Kleeberger. 2007. Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. *FASEB J* 21 (9):2237-46.
- Masuko, H., T. Sakamoto, Y. Kaneko, H. Iijima, T. Naito, E. Noguchi, T. Hirota, M. Tamari, and N. Hizawa. 2011. An interaction between Nrf2 polymorphisms and smoking status affects annual decline in FEV1: a longitudinal retrospective cohort study. *BMC Med Genet* 12:97.
- Mates, J. M., J. A. Segura, F. J. Alonso, and J. Marquez. 2012. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Arch Toxicol* 86 (11):1649-65.
- McMahon, M., K. Itoh, M. Yamamoto, S. A. Chanas, C. J. Henderson, L. I. McLellan, C. R. Wolf, C. Cavin, and J. D. Hayes. 2001. The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res* 61 (8):3299-307.
- Motohashi, H., T. O'Connor, F. Katsuoka, J. D. Engel, and M. Yamamoto. 2002. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* 294 (1-2):1-12.
- Natarajan, V. T., A. Singh, A. A. Kumar, P. Sharma, H. K. Kar, L. Marrot, J. R. Meunier, K. Natarajan, R. Rani, and R. S. Gokhale. 2012. Transcriptional upregulation of Nrf2-dependent phase II detoxification genes in the involved epidermis of vitiligo vulgaris. *J Invest Dermatol* 130 (12):2781-9.

- Nguyen, T., H. C. Huang, and C. B. Pickett. 2000. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J Biol Chem* 275 (20):15466-73.
- Nguyen, T., P. J. Sherratt, P. Nioi, C. S. Yang, and C. B. Pickett. 2005. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem* 280 (37):32485-92.
- Niture, S. K., R. Khatri, and A. K. Jaiswal. 2013. Regulation of Nrf2-an update. *Free Radic Biol Med*.
- O'Connell, M. A., and J. D. Hayes. 2015. The Keap1/Nrf2 pathway in health and disease: from the bench to the clinic. *Biochem Soc Trans* 43 (4):687-9.
- Orr, N., and S. Chanock. 2008. Common genetic variation and human disease. *Adv Genet* 62:1-32.
- Poort, S. R., F. R. Rosendaal, P. H. Reitsma, and R. M. Bertina. 1996. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88 (10):3698-703.
- Ramos-Gomez, M., M. K. Kwak, P. M. Dolan, K. Itoh, M. Yamamoto, P. Talalay, and T. W. Kensler. 2001. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (6):3410-5.
- Ray, P. D., B. W. Huang, and Y. Tsuji. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24 (5):981-90.
- Rojo, A. I., O. N. Medina-Campos, P. Rada, A. Zuniga-Toala, A. Lopez-Gazcon, S. Espada, J. Pedraza-Chaverri, and A. Cuadrado. 2012. Signaling pathways activated by the phytochemical nordihydroguaiaretic acid contribute to a Keap1-independent regulation of Nrf2 stability: Role of glycogen synthase kinase-3. *Free Radic Biol Med* 52 (2):473-87.

- Rushmore, T. H., M. R. Morton, and C. B. Pickett. 1991. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 266 (18):11632-9.
- Shehzad, A., F. Wahid, and Y. S. Lee. 2010. Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. *Arch Pharm (Weinheim)* 343 (9):489-99.
- Shinkai, Y., D. Sumi, I. Fukami, T. Ishii, and Y. Kumagai. 2006. Sulforaphane, an activator of Nrf2, suppresses cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *FEBS Lett* 580 (7):1771-4.
- Siedlinski, M., D. S. Postma, J. M. Boer, G. van der Steege, J. P. Schouten, H. A. Smit, and H. M. Boezen. 2009. Level and course of FEV1 in relation to polymorphisms in NFE2L2 and KEAP1 in the general population. *Respir Res* 10:73.
- Sun, Z., Y. E. Chin, and D. D. Zhang. 2009. Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Mol Cell Biol* 29 (10):2658-72.
- Surh, Y. J., J. K. Kundu, and H. K. Na. 2008. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med* 74 (13):1526-39.
- Suzuki, T., T. Shibata, K. Takaya, K. Shiraishi, T. Kohno, H. Kunitoh, K. Tsuta, K. Furuta, K. Goto, F. Hosoda, H. Sakamoto, H. Motohashi, and M. Yamamoto. 2013. Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol Cell Biol* 33 (12):2402-12.
- Thimmulappa, R. K., K. H. Mai, S. Srisuma, T. W. Kensler, M. Yamamoto, and S. Biswal. 2002. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 62 (18):5196-203.

- Tong, K. I., A. Kobayashi, F. Katsuoka, and M. Yamamoto. 2006. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol Chem* 387 (10-11):1311-20.
- Twfieg, M. E., and M. D. Teare. 2011. Molecular genetics and genetic variation. *Methods Mol Biol* 713:3-12.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, and J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39 (1):44-84.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160 (1):1-40.
- Venugopal, R., and A. K. Jaiswal. 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (25):14960-5.
- von Otter, M. a), S. Landgren, S. Nilsson, D. Celojovic, P. Bergstrom, A. Hakansson, H. Nissbrandt, M. Drozdik, M. Bialecka, M. Kurzawski, K. Blennow, M. Nilsson, O. Hammarsten, and H. Zetterberg. 2010. Association of Nrf2-encoding NFE2L2 haplotypes with Parkinson's disease. *BMC Med Genet* 11:36.
- von Otter, M. b), S. Landgren, S. Nilsson, M. Zetterberg, D. Celojovic, P. Bergstrom, L. Minthon, N. Bogdanovic, N. Andreasen, D. R. Gustafson, I. Skoog, A. Wallin, G. Tasa, K. Blennow, M. Nilsson, O. Hammarsten, and H. Zetterberg. 2010. Nrf2-encoding NFE2L2 haplotypes influence disease progression but not risk in Alzheimer's disease and age-related cataract. *Mech Ageing Dev* 131 (2):105-10.
- Walton, F. S., S. B. Waters, S. L. Jolley, E. L. LeCluyse, D. J. Thomas, and M. Styblo. 2003. Selenium compounds modulate the activity of recombinant rat AsIII-methyltransferase and the methylation of arsenite by rat and human hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 16 (3):261-5.

- Wang, L., M. C. Kou, C. Y. Weng, L. W. Hu, Y. J. Wang, and M. J. Wu. 2012. Arsenic modulates heme oxygenase-1, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells: roles of ROS, NF-kappaB, and MAPK pathways. *Arch Toxicol* 86 (6):879-96.
- Wang, X., B. N. Chorley, G. S. Pittman, S. R. Kleeberger, J. Brothers, 2nd, G. Liu, A. Spira, and D. A. Bell. 2010. Genetic variation and antioxidant response gene expression in the bronchial airway epithelium of smokers at risk for lung cancer. *PLoS One* 5 (8):e11934.
- Wang, X. J., Z. Sun, W. Chen, K. E. Eblin, J. A. Gandolfi, and D. D. Zhang. 2007. Nrf2 protects human bladder urothelial cells from arsenite and monomethylarsonous acid toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 225 (2):206-13.
- Wong, T. F., K. Yoshinaga, Y. Monma, K. Ito, H. Niikura, S. Nagase, M. Yamamoto, and N. Yaegashi. 2011. Association of keap1 and nrf2 genetic mutations and polymorphisms with endometrioid endometrial adenocarcinoma survival. *Int J Gynecol Cancer* 21 (8):1428-35.
- Yamamoto, T., K. Yoh, A. Kobayashi, Y. Ishii, S. Kure, A. Koyama, T. Sakamoto, K. Sekizawa, H. Motohashi, and M. Yamamoto. 2004. Identification of polymorphisms in the promoter region of the human NRF2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 321 (1):72-9.
- Yang, C., X. Zhang, H. Fan, and Y. Liu. 2009. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res* 1282:133-41.
- Yu, B., H. Lin, L. Yang, K. Chen, H. Luo, J. Liu, X. Gao, X. Xia, and Z. Huang. 2012. Genetic variation in the Nrf2 promoter associates with defective spermatogenesis in humans. *J Mol Med (Berl)* 90 (11):1333-42.
- Zhao, C. R., Z. H. Gao, and X. J. Qu. 2010. Nrf2-ARE signaling pathway and natural products for cancer chemoprevention. *Cancer Epidemiol* 34 (5):523-33.

- Zhou, H., C. S. Beevers, and S. Huang. 2011. The targets of curcumin. *Curr Drug Targets* 12 (3):332-47.
- Ziech, D., R. Franco, A. G. Georgakilas, S. Georgakila, V. Malamou-Mitsi, O. Schoneveld, A. Pappa, and M. I. Panayiotidis. 2010. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem Biol Interact* 188 (2):334-9.

NFE2L2 GENE VARIANTS AND ARSENIC SUSCEPTIBILITY: A LYMPHOBLASTOID MODEL

Mirna E. Morales-Marin¹, Emilio J. Cordova², Federico Centeno²,
 Angélica Martínez-Hernández², Angélica Méndez-García²,
 Bertha Molina³, Sara Frías³, Lorena Orozco^{1,2}

¹Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Posgrado en Ciencias Genómicas, Mexico City, Mexico

²Instituto Nacional de Medicina Genómica, Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas, Mexico City, Mexico

³Instituto Nacional de Pediatría, Departamento de Investigación en Genética Humana, Mexico City, Mexico

Arsenic (As) exposure is a major risk for several types of cancer and metabolic diseases such as diabetes. The transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) is a key mediator in the cellular defense against As-induced adverse effects. The –653G/A and –617C/A gene variants modulate expression levels of the Nrf2 coding gene (*NFE2L2*) and are postulated to be associated with several illnesses. In this study the functional effect of these polymorphisms was investigated in the cellular sensitivity to As-mediated effects. Using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) the basal levels of *NFE2L2* mRNA and the induced levels of *NFE2L2* and its target gene *NQO1* were measured in lymphoblastoid cells carrying different genotypes for –653G/A and –617C/A polymorphisms following As exposure. The effects of different *NFE2L2* gene genotypes on cell proliferation were also explored after chronic metal exposure. A tendency toward reduction in basal levels of *NFE2L2* mRNA was noted in the heterozygous (GA/CA) and risk homozygous (AA/AA) genotypes of both polymorphisms in immortalized lymphoblastoid cells. Although the expression of *NFE2L2* and *NQO1* after acute iAs exposure was not markedly influenced by –653G/A and –617C/A genotype, it was found that these single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were correlated with a differential sensitivity to chronic exposure to the metalloid. Further studies are needed to completely understand the role of –653G/A and –617C/A SNPs in regulation of the *NFE2L2* gene.

Inorganic arsenic (iAs) is one of the most widely distributed naturally occurring contaminants worldwide (Hughes et al., 2011). The main source of human exposure to iAs is through drinking water contaminated with the metalloid. Countries such as Bangladesh, Nepal, Argentina, Chile, and Mexico present the highest exposure to iAs through drinking water (Smedley and Kinniburgh, 2013). Chronic exposure to iAs has been associated with development of nonmalignant diseases such as blackfoot disease, hyperkeratosis, and

melanism, as well as different types of cancer, diabetes, and cardiovascular diseases (Lin et al., 1998; Tsai et al., 1998; Bernstam and Nriagu, 2000; Naujokas et al., 2013).

The most common species of iAs found in water are sodium arsenate (As⁵⁺) and sodium arsenite (As³⁺), which are easily absorbed from the gastrointestinal tract (GIT) and metabolized in various tissues, mainly liver (Lin et al., 2002). It is worth noting that arsenite species (iAs³⁺) showed higher toxicity and absorption than arsenate (iAs⁵⁺) (Stybło et al., 2002).

Received 30 September 2014; accepted 31 December 2014.

Address correspondence to Dra. Lorena Orozco, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809, col. Arenal Tepepan C.P. 14610, México City, México. E-mail: lorozco@inmegen.gob.mx

Within the cell, iAs biotransformation is initiated by reduction of pentavalent iAs into trivalent iAs. Reduced iAs is then methylated by As methyltransferase (AS3MT) and sulfadenosylmethionine (SAM) to produce the intermediary metabolites monomethyl arsenic acid ($\text{MMA}^{\text{V(III)}}$) and dimethyl arsenic acid ($\text{DMA}^{\text{V(III)}}$). Finally, MMA and DMA metabolites efflux from the cell through multidrug-associated resistance proteins (MRP) channels (Faita et al., 2013).

The cellular mechanisms underlying the adverse effects of iAs are not fully understood, but data support the generation of oxidative stress as an important event in iAs toxicity (Bernstam and Nriagu, 2000; Flora, 2011). Nevertheless, alterations in signaling pathways related to proliferation and cell death as well as modification of methylation pattern may also be responsible for the adverse effects attributed to iAs (Swaran, 2011). Although diverse mechanisms have been associated with cellular protection against iAs, including the glutathione and methionine systems, as well as the transcription factors p53 and nuclear factor (NF)- κ B, the signaling pathway regulated by nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) was proposed as the predominant cytoprotective mechanism against iAs-mediated effects.

The transcription factor Nrf2 is an essential molecule in cellular protection against various environmental hazards including iAs by regulating expression of a battery of antioxidant and detoxifying genes (Kensler et al., 2007). Accordingly, several studies showed activation of Nrf2 in response to iAs exposure in different cell types (Liu et al., 2013; Cordova et al., 2014). Further, genetic or pharmacological activation of Nrf2 is able to reduce iAs-related cytotoxicity in mouse and cellular models (Gao et al., 2013; Zhao et al., 2013).

Single-nucleotide polymorphisms (SNP) –653G/A, and –617C/A, which regulate the level of expression of Nrf2 encoding gene (*NFE2L2*), have been associated with development of different diseases, including iAs-related skin lesions, as well as lung and gastric cancer

(Arisawa et al., 2007; Cordova et al., 2013; Okano et al., 2013;). However, the effect of these gene variants on cellular response to iAs is unknown. Thus, the aim of this study was to determine the influence of –653G/A and –617C/A SNP on cellular sensitivity to iAs.

MATERIAL AND METHODS

Cell Culture and Reagents

Lymphoblastoid cell lines used in this study were generated, as described elsewhere, from nonrelated healthy donors previously genotyped for –653G/A and –617C/A single-nucleotide polymorphisms (SNPs) (Cordova et al., 2014). This protocol was accepted for the respective research and ethical committees, and all participants signed an informed consent letter. Cells were maintained in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, New York, NY) at 37°C and 5% CO_2 . SNP genotyping was performed by capillary DNA sequence using genomic DNA obtained from whole blood cells (Hitachi Genetic Analyzer 3130x). For iAs, sodium arsenite (iAs^{3+}) purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) was used.

Gene Expression Assay

Cell cultures (1×10^6 cell/ml) were untreated (basal expression) or treated (induced expression) with iAs at concentrations 0, 0.5, 1, 2.5, 5, or 10 μM for 24 h and for time response at 0, 3, 6, 12, 18, or 24 h with 5 μM . Total RNA was extracted from cell cultures using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and reverse transcribed with Taqman Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed on an ABI PRISM 7900HT system with the power SybrGreen kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) using specific primers for *NFE2L2* and *NQO1*, as well as *GAPDH* as endogenous reference gene.

Cell Growth Assays

Immortalized cell lines (1×10^5 cells) carrying the different genotypes for -653G/A and -617C/A SNP were exposed to $1 \mu\text{M}$ of iAs for 4 d and cell number was determined every 24 h by means of trypan blue exclusion using a Neubauer chamber and light microscopy.

Data Analysis

Data represents the average of at least three independent experiments $\pm$ standard deviation. For calculation of relative expression of induced genes, a technical triplicate was performed for each biological assay and the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method was used (Schmittgen and Livak, 2008). The $\Delta\Delta\text{Ct}$ method is based on differences in expression levels between the gene of interest and an endogenous gene and is calculated as follows, where CT is the cycle threshold, which is defined as the number of amplification cycles required for the fluorescent signal to exceeds the background levels.:

1. ΔCT tested gene = CT (tested gene in untreated sample) - CT (tested gene in treated sample).
2. ΔCT control gene = CT (control gene in untreated sample) - CT (control gene in treated sample).
3. $\Delta\Delta\text{CT}$ = ΔCT (tested gene) - ΔCT (control gene).
4. Fold change = $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$.

A *t*-test was performed to determined significant differences between experiments. A value of $p < .05$ was considered significant.

RESULTS

When the effect of -653G/A and -617C/A SNP on gene expression in basal conditions was analyzed, a trend toward reduction was observed in levels of *NFE2L2* mRNA in cells carrying the minor homozygote genotype for both SNP (Figure 1A).

The relationship of -653G/A, and -617C/A SNP with induced expression of

NFE2L2 was also analyzed. Although iAs exposure induced a concentration- and time-dependent rise in mRNA levels of the prototypical Nrf2 target gene *NQO1* (Figures 2A–2C), the expression of *NFE2L2* was not markedly affected at any time or concentration of iAs (Figures 2B–2D). Similarly, the genotype of the -653G/A, and -617C/A SNPs did not significantly influence the levels of mRNA from *NFE2L2* or from *NQO1* in cell lines exposed to iAs (Figure 3).

The influence of *NFE2L2* genotype was also examined on cell growth after exposure to a sublethal concentration of iAs for 4 d. First, it was found that concentrations of iAs below $1 \mu\text{M}$ enabled growth of lymphoblastoid cells, whereas concentrations higher than $5 \mu\text{M}$ inhibited cell growth (Supplemental Figure S1). When cell lines with different genotype for -653G/A and -617C/A were exposed to iAs at $1 \mu\text{M}$ for 4 d, it was found that cell lines carrying both minor alleles (AA/AA) showed a growth inhibition compared with those harboring the ancestral alleles (GG/CC) (Figure 4). These findings suggest that the AA/AA genotype from the -653G/A and -617C/A SNP decreases the cytoprotective property of Nrf2 against chronic exposure to iAs.

DISCUSSION

The Nrf2 transcription factor is a crucial molecule in cellular protection against several environmental hazards. In accordance with the cytoprotective role of Nrf2, the -653G/A and -617C/A SNPs were able to modulate the expression level of the gene and were associated with development of various diseases such as lung adenocarcinoma, lupus-related nephritis, and venous thromboembolism (Cordova et al., 2010; Bouligand et al., 2011; Suzuki et al., 2013). Further, Cordova et al. (2013) previously described a haplotype harboring both SNPs, which was involved in protection against iAs-related skin lesions. However, the effect of -653G/A and -617C/A SNPs on cellular response to iAs remains unknown.

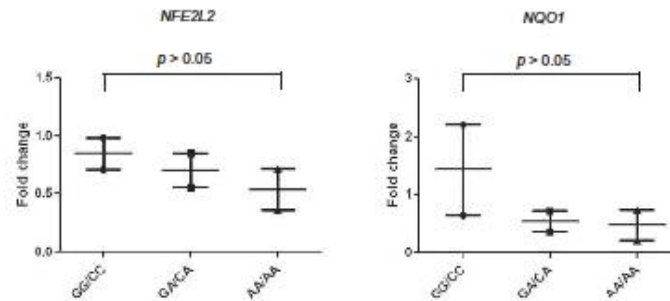


FIGURE 1. Genotype of -653C/A and -617C/A SNP influence basal expression levels of the mRNA. The basal level of *NFE2L2* and *NQO1* mRNA was measured by qRT-PCR in cell lines harboring different indicated genotypes and expressed in fold change. Each point represents an independent cell line. Mean and standard deviation are shown.

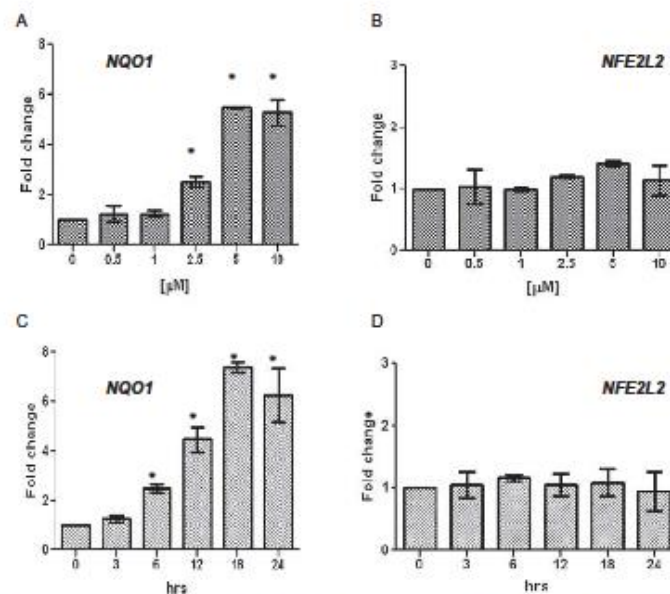


FIGURE 2. Arsenic exposure induced *NQO1* but not *NFE2L2* gene expression. Concentration (A and C) and time (B and D) response assays were performed for *NQO1* and *NFE2L2* genes in a cell line carrying ancestral genotype for both SNP (GG/CC). Relative mRNA expression was measured by qRT-PCR as fold change. Significance: * $p < .05$ compared to zero. Bars represent standard deviation.

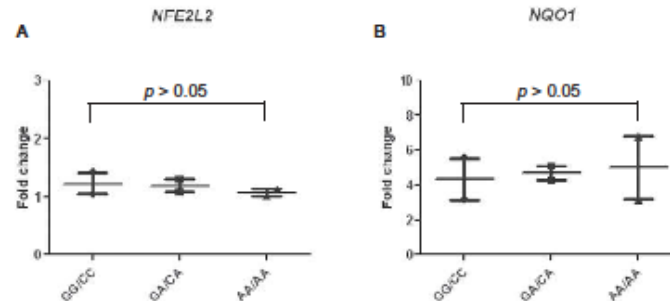


FIGURE 3. iAs-induced expression of *NFE2L2* and *NQO1* genes was not affected by genotype of $-653G/A$, and $-617C/A$ SNP. Cell lines with different *NFE2L2* genotypes were exposed to 5 μM iAs for 12 h. Relative mRNA expression of *NFE2L2* (A) and *NQO1* (B) genes was performed by qRT-PCR and represented as fold change. Each point represents an independent cell line. Differences in mRNA levels of *NFE2L2* and *NQO1* among genotypes were not significant ($p > .05$). Mean and standard deviation are shown.

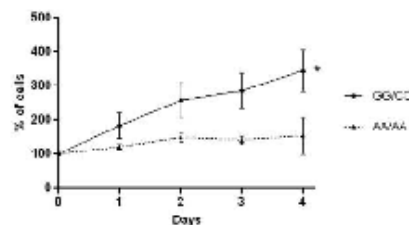


FIGURE 4. *NFE2L2* genotype modify cellular sensitivity to iAs. Cell lines carrying ancestral homozygote genotype for both $-653G/A$ and $-617C/A$ SNPs (GG/CC) or the minor homozygote genotype (AA/AA) were exposed to iAs at 1 μM for 4 d and cell number was evaluated by trypan blue exclusion every 24 h. Cell growth was expressed as percent of cells compared to d 0. Significance: * $p < .05$ between GG/CC and AA/AA cells. Mean and standard deviation are shown.

In this study a reduced level of *NFE2L2* mRNA was found in lymphoblastoid cells carrying the minor homozygote genotype for both $-653G/A$, and $-617C/A$ SNP, which was previously reported in different cell types including spermatozoid and other lymphoblastoid cells (Yu et al., 2012; Suzuki et al., 2013). The influence of $-653G/A$ and $-617C/A$ SNPs on the induction of Nrf2 pathway by iAs was also examined. Although it was possible to determine the expression of the Nrf2-target gene *NQO1* after iAs exposure, no marked change was noted in mRNA levels of *NFE2L2*.

Previous studies in keratinocytes and hepatocytes cell lines showed that despite a weak induction of Nrf2 mRNA levels after iAs exposure, Nrf2 protein and mRNA levels of several Nrf2-targets, including *NQO1*, were efficiently induced (Liu et al., 2013; Pi et al., 2003). Taken together, these findings suggest that iAs promotes Nrf2 activation through a posttranslational mechanism capable of inducing the antioxidant pathway. As indicated previously, keratinocytes and hepatocytes exposed to iAs displayed a rise in mRNA levels of Nrf2, whereas in this study a lack of induction of Nrf2 mRNA levels was noted after iAs exposure. This apparent controversy may be attributed to the fact that lymphocytes are not able to metabolize iAs to MMA and DMA, whereas keratinocytes and hepatocytes are capable of biotransforming iAs (Faita et al., 2013).

The higher sensitivity against iAs exposure shown by cell lines harboring the minor homozygote genotype for $-653G/A$ and $-617C/A$ in comparison with those carrying both ancestral alleles suggests that *NFE2L2* genotype exerts an important effect on the cytoprotective mechanism against chronic exposure to iAs. Although Nrf2 activation is predominantly regulated by posttranslational mechanisms (e.g., Keap1-mediated degradation), Suzuki et al. (2013) demonstrated that mRNA levels of *NFE2L2* exert a significant

impact on the transcriptional activity of Nrf2 protein. This effect may explain the association of haplotypes affecting NFE2L2 expression with susceptibility to develop iAs-related illnesses such as skin lesions in individuals chronically exposed to the metalloid (Cordova et al., 2013). An important limitation of our study is that we cannot rule out participation of molecules other than Nrf2 in providing protection against iAs-mediated effects.

Data suggest that NFE2L2 gene variants are important components in differential protection against toxicity attributed to chronic exposure to iAs, but the mechanism (or mechanisms) underlying this protection through these polymorphisms requires further analysis.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental data for this article can be accessed at <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2015.1004146>

FUNDING

This work was supported by CONACyT FOSSIS 71053 grant to M. E. M. M., by PhD scholarship number BM-080530201307 granted by ICyT-DF agreement ICyT/179/2011 and UACM, México.

REFERENCES

- Arisawa, T., Tahara, T., Shibata, T., Nagasaka, M., Nakamura, M., Kamiya, Y., Fujita, H., Yoshioka, D., Arima, Y., Okubo, M., Hirata, I., and Nakano, H. 2007. Association between promoter polymorphisms of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 gene and peptic ulcer diseases. *Int. J. Mol. Med.* 20: 849–853.
- Bernstam, L., and Nriagu, J. 2000. Molecular aspects of arsenic stress. *J. Toxicol. Environ. Health B* 3: 293–322.
- Bouligand, J., Cabaret, O., Canonico, M., Verstuyft, C., Dubert, L., Becquemont, L., Guiochon-Mantel, A., and Scarabin, P. Y. 2011. Effect of NFE2L2 genetic polymorphism on the association between oral estrogen therapy and the risk of venous thromboembolism in postmenopausal women. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89: 60–64.
- Cordova, E. J., Velazquez-Cruz, R., Centeno, FV., Baca, V., and Orozco, L. 2010. The NRF2 gene variant, –653G/A, is associated with nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Lupus* 19: 1237–1242.
- Cordova, E. J., Martinez-Hernandez, A., Uribe-Figueroa, L., Centeno, F., Morales-Marin, M., Koneru, H., Coleman, M. A. and Orozco, L. 2014. The NRF2-KEAP1 pathway is an early responsive gene network in arsenic exposed lymphoblastoid cells. *PLoS ONE* 9: e88069.
- Cordova, E., Valenzuela, O., Sanchez-Pena, L., Escamilla-Guerrero, GA., Hernandez-Zavala, A., Orozco, L., and Razo, L. D. 2014. Nuclear factor erythroid 2-related factor gene variants and susceptibility of arsenic-related skin lesions. *Hum. Exp. Toxicol.* 33: 582–589.
- Faita, F., Cori, L., Bianchi, F., and Andreassi, M. G. 2013. Arsenic-induced genotoxicity and genetic susceptibility to arsenic-related pathologies. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10: 1427–1546.
- Flora, S. J. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biol. Med.* 51: 257–281.
- Gao, S., Duan, X., Wang, X., Dong, D., Liu, D., Li, X., Sun, G., and Li, B. 2013. Curcumin attenuates arsenic-induced hepatic injuries and oxidative stress in experimental mice through activation of Nrf2 pathway, promotion of arsenic methylation and urinary excretion. *Food Chem. Toxicol.* 59: 739–747.
- Hughes, M. F., Beck, B. D., Chen, Y., Lewis, A. S., and Thomas, D. J. 2011. Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicol. Sci.* 123: 305–332.
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N., and Biswal, S. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47: 89–116.
- Lin, T.-H., Huang, Y.-L., and Wang, M.-Y. 1998. Arsenic species in drinking water, hair, fingernails, and urine of patients with blackfoot

- disease. *J. Toxicol. Environ. Health A* 53: 85–93.
- Lin, S., Shi, Q., Nix, F. B., Styblo, M., Beck, M. A., Herbin-Davis, K. M., Hall, L. L., Simeonsson, J. B., and Thomas, D. J. 2002. A novel S-adenosyl-L-methionine: Arsenic(III)methyltransferase from rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 277: 10795–10803.
- Liu, D., Duan, X., Dong, D., Bai, C., Li, X., Sun, G., and Li, B. 2013. Activation of the Nrf2 pathway by inorganic arsenic in human hepatocytes and the role of transcriptional repressor Bach1. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013: 984546.
- Naujokas, M. E., Anderson, B., Ahsan, H., Aposhian, H. V., Graziano, J. H., Thompson, C., and Suk, W. A. 2013. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: Update on a worldwide public health problem. *Environ. Health Perspect.* 121: 295–302.
- Okano, Y., Nezu, U., Enokida, Y., Lee, M. T., Kinoshita, H., Lezhava, A., Hayashizaki, Y., Morita, S., Taguri, M., Ichikawa, Y., Kaneko, T., Natsumeda, Y., Yokose, T., Nakayama, H., Miyagi, Y., and Ishikawa, Y. 2013. SNP (-617C>A) in ARE-like loci of the NRF2 gene: A new biomarker for prognosis of lung adenocarcinoma in Japanese non-smoking women. *PLoS ONE* 11: e73794.
- Pi, J., Qu, W., Reece, J. M., Kumagai, Y., and Waalkes, M. P. 2003. Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: Involvement of hydrogen peroxide. *Exp Cell Res* 290: 234–245.
- Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3: 1101–1108.
- Smedley, P. L., and Kinniburgh, G. D. 2013. Arsenic in groundwater and the environment. In *Essentials of medical geology: Revised edition*, ed. O. Selinus, 279–304. Oxfordshire, UK: British Geological Survey.
- Styblo M., Drobna, Z., Jaspers, I., Lin, S., and Thomas, D. J. 2002. The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: A research update. *Environ. Health Perspect.* 110: 767–771.
- Suzuki, T., Shibata, T., Takaya, K., Shiraishi, K., Kohno, T., Kunitoh, H., Tsuta, K., Furuta, K., Goto, K., Hosoda, F., Sakamoto, H., Motohashi, H., and Yamamoto, M. 2013. Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol. Cell. Biol.* 33: 2402–2412.
- Swaran, J. F. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Med.* 51: 257–281.
- Tsai, S.-M., Wang, T.-N., and Ko, Y.-C. 1998. Cancer mortality trends in a blackfoot disease endemic community of Taiwan following water source replacement. *J. Toxicol. Environ. Health A* 55: 389–404.
- World Health Organization. 2012. *Air quality guidelines*, 2nd ed. Copenhagen, Denmark: WHO Regional Office for Europe.
- Yu, B., Lin, H., Yang, L., Chen, K., Luo, H., Liu, J., Gao, X., Xia, X., and Huang, Z. 2012. Genetic variation in the Nrf2 promoter associates with defective spermatogenesis in humans. *J Mol Med (Berl)* 90: 1333–1342.
- Zhao, R., Yang, B., Wang, L., Xue, P., Deng, B., Zhang, G., Jiang, S., Zhang, M., Liu, M., Pi, J., and Guan, D. 2013. Curcumin protects human keratinocytes against inorganic arsenite-induced acute cytotoxicity through an NRF2-dependent mechanism. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013: 412576.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 30 de noviembre del 2016, en la Ciudad de México para optar al Grado de Doctora en Ciencias Genómicas, a la M. en C. Mirna Edith Morales Marín.

Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco

Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Dra. Mavil López Casamichana

Dr. José Humberto Nicolini Sánchez



*What you think,
you become.
What you feel,
you attract.
What you imagine,
you create.*

BUDDHA