



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE  
SILENCIAMIENTO Y SOBREEXPRESIÓN DE HO-1  
PARA ANALIZAR SU PAPEL EN LA RESPUESTA  
CELULAR A ARSÉNICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**ELISA MONTSERRAT ROJO DE LA VEGA  
GUINEA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. FEDERICO CENTENO CRUZ**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno.

Rojo de la Vega  
Guinea  
Elisa Montserrat  
5661-9495  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biólogo  
303585105

2. Datos del asesor.

Dr.  
Federico  
Centeno  
Cruz

3. Datos del sinodal 1.

Dra.  
María Alicia  
González  
Manjarrez

4. Datos del sinodal 2.

Dra.  
Lorena Sofía  
Orozco  
Orozco

5. Datos del sinodal 3.

Dra.  
Laura  
Kawasaki  
Watanabe

6. Datos del sinodal 4.

Dra.  
Araceli  
Hernández  
Zavala

7. Datos del trabajo escrito.

Construcción de vectores de silenciamiento y sobreexpresión de HO-1 para analizar su papel en la respuesta celular a arsénico.

55 p  
2010

Para mi abuelo Eloy,  
artista, filósofo e intelectual.

Para mis hermanas,  
que son mi apoyo y mi alegría.

Para mi mamá,  
por su dedicación, perseverancia y cariño,  
todo un ejemplo a seguir.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutor, el Dr. Federico Centeno, mi más sincero agradecimiento por sus infinitas horas de paciencia, por enseñarme tantas cosas, por motivarme a seguir adelante y por su gran amistad. A la Dra. Lorena Orozco, por aceptarme en su laboratorio y por ser un ejemplo a seguir. Al Dr. Emilio Córdova, por introducirme a este campo de estudio, por sus consejos y su apoyo.

A mis amigos de toda la vida: Barbara, María, Alejandro, Yanis, Pita, Beavis, Gabbo, Pozo, Chucho, Ale, Sobe, Lucía y demás banda del Moderno. Han sido mis compañeros, hermanos y maestros. A la gente maravillosa que pude conocer en estos años en la Facultad, en especial a Eleonor, Ana, Moni y Luisa; por todo el aprendizaje, desvelo y diversión. A mis amigos del laboratorio, en especial a Mirna y Humberto Gutiérrez, por ser mis compañeros en interminables horas de trabajo, por todo lo que me enseñaron y por hacer mi estancia más amena. Al resto de los alumnos del laboratorio, los que ya no están y los que siguen. A los demás investigadores del laboratorio: Yola, Irma, Angélica, Rafael, Lupita, Julián y Silvia, por los buenos momentos compartidos.

A mi familia, para quienes no tengo palabras suficientes para agradecer todo su apoyo en los momentos difíciles, por permitirme alejarme del mundo en los momentos de estudio y por compartir conmigo los triunfos.

A la gente del INMEGEN que me ayudó en la realización de mi proyecto. A Karol, Chava y Haydee de la Unidad de Secuenciación. A Laura Uribe y Raúl Mojica de la Unidad Affymetrix. A José Luis Cruz por su apoyo en el cultivo celular. A Juan Pablo Reyes y Nora Gutiérrez de la Unidad de Proteómica. A Valeria Quintanar de la Unidad de Validación de Biomarcadores. Gracias a su apoyo este proyecto se pudo concretar.

A ti que llegaste para alegrar mi vida, por tu cariño, tus consejos y tu tiempo.

*For a gallon of elderberry wine, I take one teaspoon full of arsenic,  
then add half a teaspoon full of strychnine, and then just a pinch of cyanide.*

—Arsenic and Old Lace

## ÍNDICE

Resumen	1
Lista de abreviaturas	2
Lista de figuras y tablas	5
Introducción	6
Estrés oxidativo	6
Mecanismos celulares de protección contra el estrés oxidativo	8
La enzima hemo oxigenasa 1 (HO-1)	9
Regulación de la expresión de HO-1	10
Regulación de la expresión de HO-1 por la ruta Nrf2-Keap1	12
Efecto citoprotector de los productos de degradación del grupo hemo por HO-1	13
Inducción de HO-1 por arsénico	15
Justificación	18
Objetivos	19
Objetivo general	19
Objetivos particulares	19
Material y métodos	20
Diseño de vectores de expresión de RNAi contra HO-1	21
Clonación de oligonucleótidos en el vector pSIREN	23
Extracción y purificación de RNA	23
Síntesis de cDNA	24
Clonación del cDNA de HO-1 en el vector pcDNA3	24
Transformación bacteriana	27
Extracción y purificación de plásmidos a pequeña escala (miniprep)	28
Secuenciación de plásmidos	28
Extracción y purificación de plásmidos a gran escala (maxiprep)	29
Preservación de plásmido en bacterias congeladas en glicerol	29
Cultivo celular	29
Transfección	30
RT-PCR en tiempo real	31
Inmunodetección (Western blot)	32
Medición de la citotoxicidad	33
Medición de la generación de especies reactivas de oxígeno	33
I. Construcción y validación de vectores de silenciamiento de HO-1	35
Obtención de vectores de expresión de RNAi contra HO-1	35
Obtención de líneas estables de expresión de RNAi contra HO-1	36
Validación de los vectores de silenciamiento	37
II. Construcción y validación de un vector de expresión de HO-1	38
Clonación del cDNA de HO-1	38
Generación del vector de sobreexpresión pcDNA3-HO1	40
Validación del vector de expresión de HO-1	41
III. Análisis de la participación de HO-1 en la respuesta celular a arsénico	42
Efecto de HO-1 en la viabilidad de células HepG2 expuestas a arsenito de sodio	42
Contribución de HO-1 en la disminución del estrés oxidativo generado por arsenito de sodio	45
Discusión	46
Conclusiones	51
Referencias	52

## **RESUMEN**

Los organismos aerobios dependen del oxígeno para obtener energía, sin embargo quedan expuestas al daño generado por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Adicionalmente, la exposición a ciertos contaminantes ambientales como el arsénico generan un aumento en la producción de ROS. Las ROS son responsables no sólo de la toxicidad del oxígeno al reaccionar con lípidos, proteínas y el DNA, sino que también son importantes mensajeros intracelulares, por lo cual es necesaria una regulación estricta de sus niveles para mantener la homeostasis. Cuando las especies oxidantes sobrepasan las antioxidantes se genera un estado de estrés oxidativo, el cual se ha asociado al envejecimiento celular y a algunas patologías, como cáncer, enfermedades inflamatorias, cardiovasculares y degenerativas.

Las células cuentan con diversos mecanismos para la eliminación de las ROS, entre las cuales se encuentra la inducción de la enzima hemo oxigenasa 1 (HO-1). HO-1 degrada el grupo hemo para generar CO,  $Fe^{2+}$  y biliverdina, que posteriormente se reduce en bilirrubina, los cuales tienen un fuerte efecto antioxidante, antiinflamatorio y antiproliferativo, por lo que se ha propuesto que HO-1 tiene un papel citoprotector.

En este trabajo se construyeron vectores para silenciar por RNAi y para sobreexpresar HO-1. Con estos vectores se generó un modelo biológico de cultivo celular para el análisis de la participación de HO-1 en la respuesta celular a arsénico. Este modelo creado en células HepG2 es adecuado para estudiar la toxicidad, en células hepáticas, asociada a la exposición a arsénico. Sin embargo, este modelo también puede emplearse en otros estudios en los que el interés principal recaiga en determinar el papel que HO-1 tenga en diversos fenómenos biológicos.

De acuerdo a los resultados de esta investigación, se obtuvo evidencia a favor del papel citoprotector de HO-1 en la respuesta celular a arsénico. Se encontró que el silenciamiento de HO-1 disminuye la viabilidad celular y favorece una mayor generación de ROS. De acuerdo con lo anterior, la sobreexpresión de HO-1 puede proteger a las células de la citotoxicidad del arsénico. Este trabajo contribuye a entender el papel de HO-1 en los mecanismos de respuesta celular al arsénico, lo cual permitirá desarrollar estrategias eficientes para disminuir su toxicidad.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica.
A-MEM	Advanced Modified Eagle's Medium.
AngII	Angiotensina II.
ANP	Péptido atrial natriurético.
AP-1	Proteína activadora 1.
ARE	Elemento de respuesta antioxidante.
As	Arsénico.
As <sup>0</sup>	Arsénico en forma metaloide.
As <sup>III</sup>	Arsenito.
As <sup>V</sup>	Arsenato.
BCIP-T	Sal de <i>p</i> -toluidina 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato.
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool.
BR	Bilirrubina.
BSA	Albúmina sérica bovina.
BV	Biliverdina.
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica.
CAPE	Fenil éster del ácido capéico.
cDNA	DNA complementario.
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica.
CDS	Secuencia codificante del mRNA.
CO	Monóxido de carbono.
CoPPIX	Protoporfirina de cobalto.
CORMs	Moléculas liberadoras de monóxido de carbono.
CREBP	Proteínas de unión a elementos responsivos a cAMP.
Ct	Ciclo umbral ( <i>threshold</i> ).
DCF	Diclorofluoresceína.
DCFDA	Diclorofluoresceína diacetato.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados.
EGCG	Epigallocatequina-3-galato.
Fe <sup>2+</sup>	Fierro.
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa.
GPX	Glutación peroxidasa.
GR	Glutación reductasa.
GRXo	Glutarredoxina oxidada.
GRXr	Glutarredoxina reducida.
GSH	Glutación.
GSHr	Glutación reducido.
GSSG	Glutación oxidado.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno.
HEK293	Línea celular derivada de células embrionarias de riñón humano.
HepG2	Línea celular derivada de un hepatocarcinoma.
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1.
HO <sub>2</sub> <sup>o</sup>	Radical hidroxiperoxilo.
HO	Hemo oxigenasa.
HO-1	Hemo oxigenasa 1.
HO-2	Hemo oxigenasa 2.
HO-3	Hemo oxigenasa 3.
HO1A	Oligonucleótidos de expresión de shRNA contra HO-1 "A".
HO1B	Oligonucleótidos de expresión de shRNA contra HO-1 "B".
HO1C	Oligonucleótidos de expresión de shRNA contra HO-1 "C".
HOCl	Ácido hipoclorico.
HMOX 1	Gen que codifica para la enzima HO-1.

HNO <sub>2</sub>	Ácido nitroso.
HSE	Elemento de respuesta a factores térmicos.
HSF	Factores de estrés térmico.
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer.
IFN- $\alpha$	Interferón alfa.
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible.
kb	Kilobases.
kDa	Kilodaltones.
Keap1	Kelch ECH Associated Protein 1.
LB	Medio de cultivo Luria.
LPS	Lipopolisacárido.
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos.
Mito-CTE	Cadena transportadora de electrones mitocondrial.
MMA <sup>III</sup>	Ácido monometilarsenoso.
MMA <sup>V</sup>	Ácido monometilarsínico.
DMA <sup>III</sup>	Ácido dimetilarsinoso.
DMA <sup>V</sup>	Ácido dimetilarsínico.
MPO	Mieloperoxidasa.
mRNA	RNA mensajero.
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trióxido de dinitrógeno.
N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Tetraóxido de dinitrógeno.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NBT	Cloruro de tetrazolio nitro-azul.
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica, EUA.
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B.
NO <sup>°</sup>	Radical óxido nítrico.
NO <sup>-</sup>	Anión nitroxilo.
NO <sup>+</sup>	Catión nitosilo.
NO <sub>2</sub> <sup>°</sup>	Radical dióxido de nitrógeno.
NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Ión nitrilo.
NO <sub>2</sub> Cl	Cloruro de nitrilo.
NO-ASA	Aspirina donadora de óxido nítrico.
NOX	NADPH oxidasa.
NQO1	Glutación transferasa.
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2.
NSAIDs	Drogas antiinflamatorias no esteroideas.
<sup>1</sup> $\Delta_g$ O <sub>2</sub>	Singulete de oxígeno.
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido.
O <sub>3</sub>	Ozono.
OH	Radical hidroxilo.
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito.
pb	Pares de bases.
PBS	Buffer salino de fosfatos.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PDTC	Pirriliodin ditiocarbamato.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PVDF	Polivinilidenofluoruro.
RE	Retículo endoplásmico.
RNAi	RNA de interferencia.
RNS	Especies reactivas de nitrógeno.
RO <sup>°</sup>	Radical alcóxido.
RO <sub>2</sub> <sup>°</sup>	Radical peróxido.
ROONO	Alquil peroxinitrito.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa.

SAH	S-adenosilhomocisteína.
SAM	S-adenosimetionina.
shRNA	Pequeños RNAs que forman estructuras tallo-asa, del inglés <i>short hairpin RNA</i> .
siRNA	Pequeños RNAs interferentes, del inglés <i>small interfering RNA</i> .
sMaf	Proteínas Maf pequeñas.
SnPPIX	Protoporfirina de estaño.
SOD	Superóxido dismutasa.
tBHQ	<i>Ter</i> -butil hidroquinona.
TBS	Buffer salino de Tris.
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta.
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa.
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol-13-acetato.
TRXo	Tiorredoxina oxidada.
TRXr	Tiorredoxina reducida.
UV	Ultravioleta.
WB	Western blot.
XO	Xantina oxidasa.
ZnMP	Mesoporfirina de cinc.
ZnPPIX	Protoporfirina de cinc.

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	Esquema de la homeostasis redox celular.	8
Figura 2	Esquema de la degradación del grupo hemo.	9
Figura 3	Diagrama del promotor de <i>HMOX1</i> y de los factores de transcripción asociados.	12
Figura 4	Diagrama del metabolismo del arsénico en humano y la generación de radicales libres por sus metabolitos.	16
Figura 5	Diagrama de la estrategia experimental para evaluar el papel de HO-1 en la respuesta celular a arsenito de sodio.	20
Figura 6	Esquema del vector y los oligonucleótidos utilizados para la generación de los vectores de silenciamiento	22
Figura 7	Esquema de los oligonucleótidos diseñados para amplificar el cDNA de HO-1 con los sitios de restricción para clonación.	24
Figura 8	Mapa del vector de clonación para productos de PCR con extremos romos ( <i>blunt</i> ) pJET1.2.	26
Figura 9	Mapa del vector de expresión pcDNA3.1.	27
Figura 10	Diagrama de las regiones blanco de RNAi en el mensajero de HO-1.	35
Figura 11	Electroferograma de la secuencia <i>forward</i> del vector pSIREN-HO1C.	35
Figura 12	Fotografías de células HepG2.	36
Figura 13	Expresión de HO-1 a nivel de mRNA en las líneas de RNAi.	37
Figura 14	Expresión de HO-1 a nivel de proteína en clonas de RNAi.	38
Figura 15	Análisis de la secuencia de la colonia candidato elegida para la extracción de plásmido pJET1.2-HO1.	39
Figura 16	Amplificación del cDNA de HO-1 (887 pb) con la enzima de alta fidelidad Pfx usando como templado el pJET1.2-HO-1 y utilizando los oligonucleótidos con los sitios de restricción ( <i>forward KpnI</i> y <i>reverse XhoI</i> ).	40
Figura 17	Amplificación del cDNA de HO-1 a partir de colonias transformadas con el vector pcDNA3-HO-1.	40
Figura 18	Sobreexpresión de HO-1 con el vector pcDNA3-HO-1 en células HEK293 y HepG2.	41
Figura 19	Curvas de viabilidad de células HepG2 en respuesta a diferentes concentraciones de arsenito de sodio.	42
Figura 20	Efecto del silenciamiento de HO-1 en la viabilidad de células expuestas a arsenito de sodio.	43
Figura 21	Efecto de la sobreexpresión de HO-1 en células expuestas a arsenito de sodio.	44
Figura 22	Efecto del silenciamiento de HO-1 en la generación de ROS.	45
Tabla 1	Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno	7
Tabla 2	Algunos inductores de HO-1	11
Tabla 3	Oligonucleótidos para la expresión de shRNAs en el vector RNAi-Ready pSIREN-RetroQ	22
Tabla 4	Oligonucleótidos utilizados para la evaluación de la expresión de HO-1 por RT-PCR.	31

## INTRODUCCIÓN

### *Estrés oxidativo*

El oxígeno es una molécula esencial para la obtención de energía de todos los organismos aerobios, sin embargo, un riesgo inherente al uso de esta molécula es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de especies reactivas de nitrógeno (RNS). Las ROS incluyen a todos los derivados—radicales o no— de la reducción parcial del oxígeno y muchas veces este término engloba también a las RNS (D'Autréaux y Toledano, 2007) (tabla 1). Los radicales son aquellas especies que contienen al menos un electrón desapareado en su último orbital, mientras que en las especies no radicales no hay electrones desapareados pero sí son químicamente reactivas y pueden llegar a convertirse en especies radicales (Trachootham *et al.*, 2009). Las ROS, además de ser responsables de la toxicidad del oxígeno al reaccionar con lípidos, proteínas y el DNA, también son importantes mensajeros intracelulares, por lo cual es necesaria una regulación estricta de sus niveles para mantener la homeostasis. De acuerdo con la definición de Helmut Sies (1985), cuando las especies oxidantes sobrepasan las antioxidantes se rompe este equilibrio genera un estado de estrés oxidativo. El aumento crónico en la producción de ROS se ha asociado al envejecimiento celular y a diversas patologías, como cáncer, enfermedades inflamatorias, cardiovasculares y degenerativas (Winterbourn, 2008).

Las células de los mamíferos están sometidas a daños oxidativos derivados tanto de fuentes intrínsecas (metabolismo aeróbico y la respuesta inmune) como de fuentes extrínsecas (radiaciones ionizantes y UV; toxinas, xenobióticos y contaminantes) (Königsberg, 2007; Winterbourn, 2008). La principal generación metabólica de ROS proviene de la respiración mitocondrial (Trachootham *et al.*, 2009) (figura 1). Los electrones que escapan de la cadena respiratoria mitocondrial pueden reaccionar con el oxígeno molecular generando superóxido, el cual puede dar origen a otras ROS. Otros organelos celulares generadores de ROS son los peroxisomas durante la  $\beta$ -oxidación y el retículo endoplásmico durante el proceso de plegamiento proteico y formación de puentes disulfuro (Valko *et al.*, 2006). Otros mecanismos intrínsecos de generación de ROS son la oxidación de grupos aromáticos por hemo-proteínas y la interacción con metales de transición. Por otra parte, las ROS también pueden ser generadas por fuentes extrínsecas durante el metabolismo de desintoxicación de drogas y xenobióticos por enzimas como

P450 que producen radicales que reaccionan con el oxígeno molecular. Adicionalmente, la exposición a radiaciones ionizantes o a radiación UV puede generar ROS al incidir sobre lípidos y proteínas. No obstante, la generación de ROS también puede ser un proceso controlado por la célula: enzimas oxidasas (NADPH oxidasa, NOX; xantina oxidasa, XO), peroxidasas (mieloperoxidasa, MPO; peroxidasa eosinofílica) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) son ejemplos de enzimas generadoras de ROS activas durante la respuesta inmune contra patógenos.

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.

	Radicales	No radicales
Especies reactivas de oxígeno (ROS)	Superóxido ( $O_2^{\circ}$ ) Hidroxilo ( $OH^{\circ}$ ) Peroxilo ( $RO_2^{\circ}$ ) Alcoxilo ( $RO^{\circ}$ ) Hidroxiperoxilo ( $HO_2^{\circ}$ )	Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) Ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) Ozono ( $O_3$ ) Singulete de oxígeno ( $^1\Delta gO_2$ ) Peroxinitrito ( $ONOO^-$ )
Especies reactivas de nitrógeno (RNS)	Óxido nítrico ( $NO^{\circ}$ ) Dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\circ}$ )	Ácido nitroso ( $HNO_2$ ) Trióxido/tetraóxido de dinitrógeno ( $N_2O_3/N_2O_4$ ) Ión nitrilo ( $NO_2^+$ ) Anión nitroxilo ( $NO^-$ ) Cation nitrosilo ( $NO^+$ ) Alquil peroxinitrito ( $ROONO$ ) Cloruro de nitrilo ( $NO_2Cl$ )

La generación fisiológica de ROS es de gran importancia en procesos de señalización y regulación. Mientras que algunas ROS podrían funcionar como segundos mensajeros, es claro que la transformación redox de muchos intermediarios con la consecuente formación de ROS, es esencial para la señalización en procesos tales como proliferación, adhesión celular, liberación de citocinas, resistencia al estrés, arresto del ciclo celular y apoptosis (Winterbourn, 2008). Los sensores moleculares del estado redox de una célula suelen ser proteínas con grupos tiol que al ser oxidados pueden activar o inhibir su función, desencadenando la señalización o respuesta pertinente. Sin embargo, una producción patológica de ROS—es decir, un estado de estrés oxidativo—altera las funciones fisiológicas que tienen estas moléculas y sobrepasa los medios de contención que existen (enzimas y antioxidantes no enzimáticos). De esta manera, los mamíferos han evolucionado para generar respuestas protectoras de larga duración o mecanismos de

muerte celular ante el estrés oxidativo, dependiendo de la magnitud del daño (D'Autréaux y Toledano, 2007).

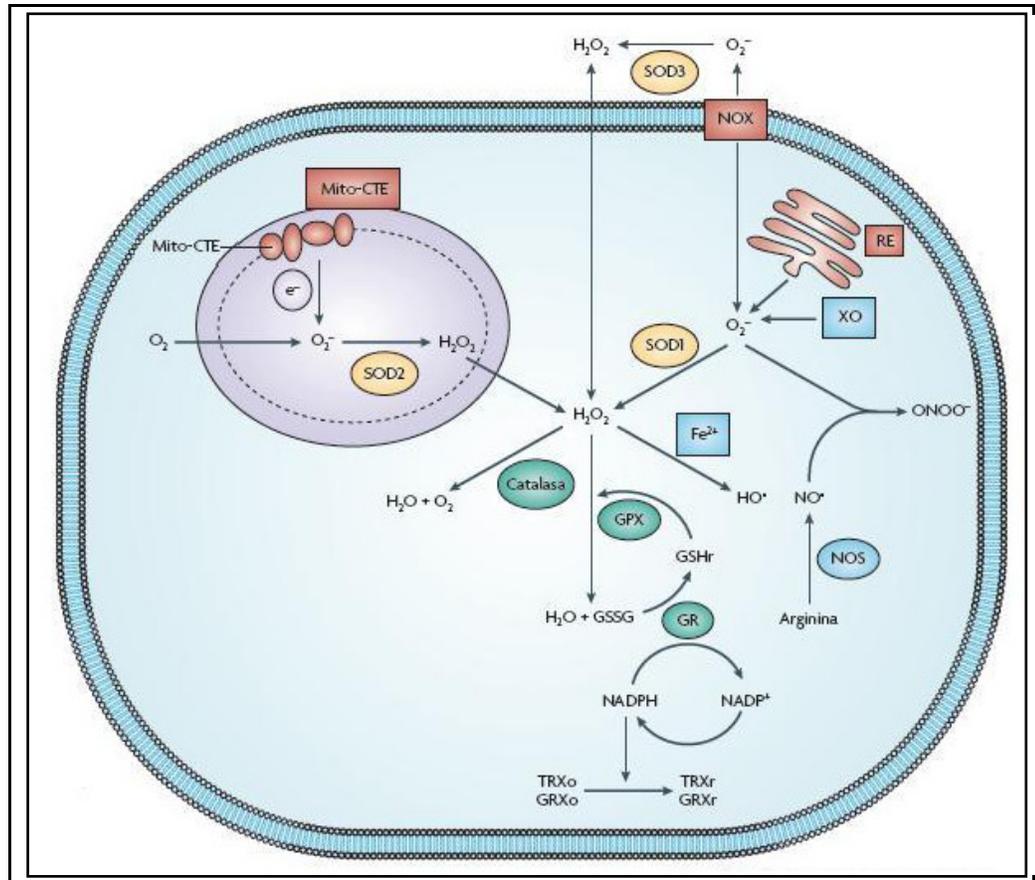


Figura 1. Esquema de la homeostasis redox celular. Los principales sitios de generación de ROS (en rojo) los constituyen la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Mito-CTE), el retículo endoplásmico (RE) y el complejo de la NADPH oxidasa (NOX). El superóxido ( $O_2^-$ ) es el primer radical libre en formarse y se convierte rápidamente en peróxido ( $H_2O_2$ ) por la enzima superóxido dismutasa (SOD). El  $H_2O_2$  puede convertirse en agua por la catalasa o en radicales hidroxilo ( $HO^\bullet$ ) en presencia de metales. El radical óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ) se forma por la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y al reaccionar con el superóxido genera peroxinitrito. Otra parte importante de la respuesta antioxidante está constituida por el ciclo del glutatión. El glutatión reducido (GSHr) se oxida (GSSG) por la enzima glutatión peroxidasa (GPX) para degradar el  $H_2O_2$ . El glutatión se regenera por la enzima glutatión reductasa (GR). Este sistema se acopla a la reducción de la tiorredoxina oxidada (TRXo) y de la glutarredoxina oxidada (GRXo). [Imagen modificada de Trachootham *et al.*, 2009]

### ***Mecanismos celulares de protección contra el estrés oxidativo***

Los mecanismos celulares para la eliminación de las ROS incluyen la inducción de enzimas antioxidantes clásicas (como la catalasa, superóxido dismutasa, tiorredoxina, glutatión peroxidasa y glutarredoxina), las cuales se encuentran distribuidas en las mitocondrias,

peroxisomas y en el citoplasma; las enzimas de fase II (glutatión reductasa; NADPH:quinona oxidoreductasa, NQO1 y glutatión transferasa) y las enzimas antioxidantes no clásicas, como la enzima hemo oxigenasa—de la cual se hablará extensamente. Finalmente, las células cuentan también con antioxidantes no enzimáticos, como el glutatión (GSH), las catequinas y las vitaminas C y E. Todos estos sistemas funcionan para mantener la homeostasis oxidativa y evitar los efectos adversos generados por las ROS (Rigas y Sun, 2008).

### ***La enzima hemo oxigenasa 1 (HO-1)***

Hemo oxigenasa (HO) es la enzima que participa en el paso inicial y limitante de la degradación del grupo hemo. HO oxida el grupo hemo, generando biliverdina (BV), monóxido de carbono (CO) y hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Tenhunen *et al.*, 1969) (figura 2). Esta reacción requiere de oxígeno molecular y de donación de electrones del NADPH, que en retículo endoplásmico proviene de la citocromo P450 reductasa. La BV es posteriormente reducida en bilirrubina (BR) por la enzima biliverdina reductasa. Se han descrito dos isoenzimas de HO, denominadas HO-1 y HO-2, codificadas en genes distintos, con diferencias en estructura primaria, peso molecular y en sus propiedades bioquímicas (Ryter *et al.*, 2006; Pae *et al.*, 2008). HO-1 es la forma inducible y la que confiere la mayor protección contra el estrés oxidativo mientras que HO-2 es una enzima de expresión constitutiva. Adicionalmente, se ha descrito una tercera enzima denominada HO-3—que tiene un alto grado de homología con HO-2—pero sólo se ha descrito en rata (Koizumi, 2007).

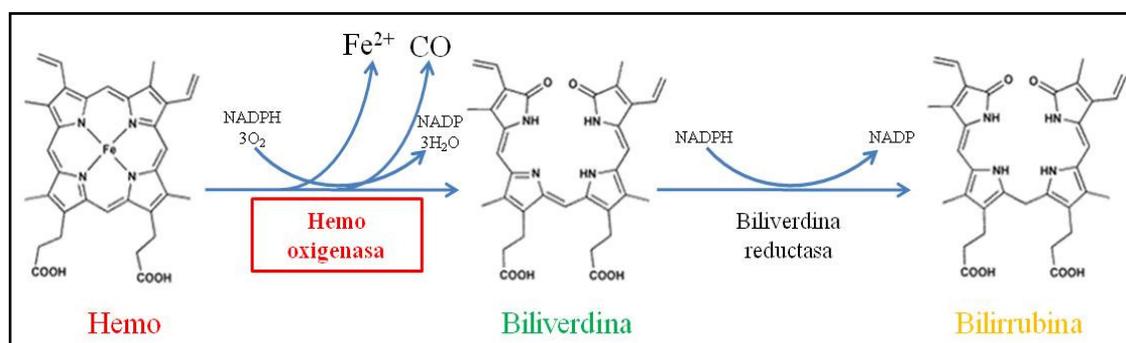


Figura 2. Esquema de la degradación del grupo hemo. El hemo es oxidado por la enzima hemo oxigenasa para generar biliverdina, monóxido de carbono (CO) y hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ). La biliverdina es reducida por la enzima biliverdina reductasa para generar bilirrubina. De esta manera, los metabolitos de la degradación del grupo hemo por la hemo oxigenasa son el CO, el  $\text{Fe}^{2+}$  y la bilirrubina. [Imagen modificada de [http://www-oc.chemie.uni-regensburg.de/amslinger/research/testung\\_e.html](http://www-oc.chemie.uni-regensburg.de/amslinger/research/testung_e.html)].

La enzima hemo oxigenasa 1 fue originalmente descrita como una enzima hepática microsomal encargada de degradar el grupo hemo (Tenhunen *et al.*, 1968). Posteriormente, se definió que HO-1 se asocia al retículo endoplásmico liso como una proteína integral de membrana orientada mayoritariamente hacia el citoplasma. También existe evidencia que indica que HO-1 podría localizarse en caveolas de la membrana celular, en la membrana mitocondrial y dentro del núcleo (Ryter *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007). Sin embargo, falta mucho por definir acerca de las funciones de HO-1 en dichos compartimentos y de las condiciones bajo las cuales se localiza ahí.

La enzima HO-1 está codificada por el gen *HMOXI* localizado en el cromosoma 22q12. El gen abarca unas 14 kb que comprenden una región promotora y 5 exones. Se transcribe un RNA mensajero (mRNA) de 1550 pb, de los cuales 867 pb corresponden a la región codificante (CDS) que se traduce en una proteína de 288 aminoácidos con un peso molecular de 32.8 kDa.

### ***Regulación de la expresión de HO-1***

La regulación de la expresión de HO-1 ocurre principalmente a nivel transcripcional (Ferrándiz y Devesa, 2008). Su expresión se induce por su substrato de degradación, el grupo hemo, así como por otros compuestos y diversas fuentes de estrés, como inflamación y estrés oxidativo (tabla 2). La respuesta ejercida por HO-1 dependerá del agente inductor, la vía de señalización por la cual se induce y del tipo celular.

La expresión de HO-1 se induce rápidamente en los tejidos relacionados con la degradación de eritrocitos senescentes y con alta presencia de hemoglobina, como el bazo, hígado y riñón (Ryter *et al.*, 2006). Se expresa además en células endoteliales, en células troncales hematopoyéticas y en macrófagos. En órganos no relacionados con la degradación de la hemoglobina, como pulmones, corazón, testículos y cerebro, así como en tejido adiposo, también se han detectado altos niveles de HO-1 resultado de la influencia de ciertos estímulos. Así que HO-1 juega un papel crucial bajo dos circunstancias: en el reciclamiento de moléculas de Fe y en el mantenimiento de la homeostasis celular bajo condiciones de estrés (Alam y Cook, 2006).

Tabla 2. Ejemplos de inductores de HO-1. [Modificado de Ryter *et al.*, 2006 y Ferrándiz y Devesa, 2008].

Estrés oxidativo	Generadores de especies reactivas de oxígeno (ROS)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , menadiona, radiación UVA, terapia fotodinámica, arsenito de sodio
	Generadores de especies reactivas de nitrógeno (RNS)	Óxido nítrico gaseoso (NO), donadores de NO, peroxinitrito
Antioxidantes y quimiopreventores	Fitoquímicos	Compuestos fenólicos: curcumina, resveratrol, flavonoides, antocianinas, epigallocatequina-3-galato (EGCG), carnosol, fenil éster del ácido caféico (CAPE) Isotiocianatos: sulforafán
	Sintéticos	Pirriliodin ditiocarbamato (PDTC), <i>ter</i> -butil hidroquinona (tBHQ)
Mediadores endógenos	Lípidos	Prostaglandinas
	Péptidos	Adrenomedulina, péptido atrial natriurético (ANP), angiotensina II (AngII), hormona adrenocorticotrópica (ACTH)
	Citocinas y factores de crecimiento	Interleucinas: IL-1, 6, 10 y 11. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)
Tensión de oxígeno		Hipoxia, isquemia/reperfusión, hiperoxia
Compuestos metálicos	Metaloporfirinas	Hemo, hemina, protoporfirina de cobalto (CoPPIX), protoporfirina de cinc (ZnPPIX), mesoporfirina de cinc (ZnMP)
	Sales de metales pesados	Cadmio, cobalto, estaño, plomo, mercurio
Modificadores de tioles		Dietil maleato (DEM), arsenito de sodio
Otras fuentes de estrés	Estrés de retículo endoplásmico	Por ausencia de glucosa, alteración de la homeostasis del calcio
	Estrés térmico/proteotóxico	Proteínas mal plegadas, $\beta$ -amiloides
	Infección por bacterias gram negativas	Lipopolisacárido (LPS)
Contaminantes diversos		Humo de cigarro, fibras minerales, benceno y bromobenceno, ozono, partículas de combustión
Drogas antiinflamatorias y antiproliferativas		Paclitaxel, rapamicina, probucol, simvastatina, drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAIDs), aspirina donadora de óxido nítrico (NO-ASA), moléculas liberadoras de monóxido de carbono (CORMs)
Carcinógenos		12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)

Los agentes inductores promueven la expresión de HO-1 mediante la activación de diversas cascadas de señalización. Una característica muy particular de *HMOX1* es que es el único gen descrito hasta el momento que responde a los cuatro grandes grupos de factores de transcripción responsivos a estrés: los factores de estrés térmico (HSF), factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) y los factores de la familia de la proteína activadora 1 (AP-1) (Alam y Cook, 2006) (figura 3). Sin embargo, en algunos casos, la evidencia para la inducción procede de análisis de las secuencias o elementos de respuesta identificados en la región promotora de *HMOX1* y requieren de confirmación experimental. Adicionalmente, las cascadas de cinasas activadas por mitógenos (MAPK) participan en la activación de *HMOX1* ante ciertos estímulos particulares. También se le ha atribuido cierto papel, aunque en menor medida, a las

proteínas de unión a elementos responsivos a cAMP (CREBP), a los factores de transcripción de la familia Ets y al factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) (Lee *et al.*, 1997; Ferrándiz y Devesa, 2008; Goven *et al.*, 2010). Este gran grupo de factores de transcripción relacionados con la expresión de HO-1 contribuyen a que éste sea altamente inducible. La evidencia más reciente señala a la vía de Nrf2-Keap1 como la más importante para la regulación de HO-1 (Harada *et al.*, 2008).

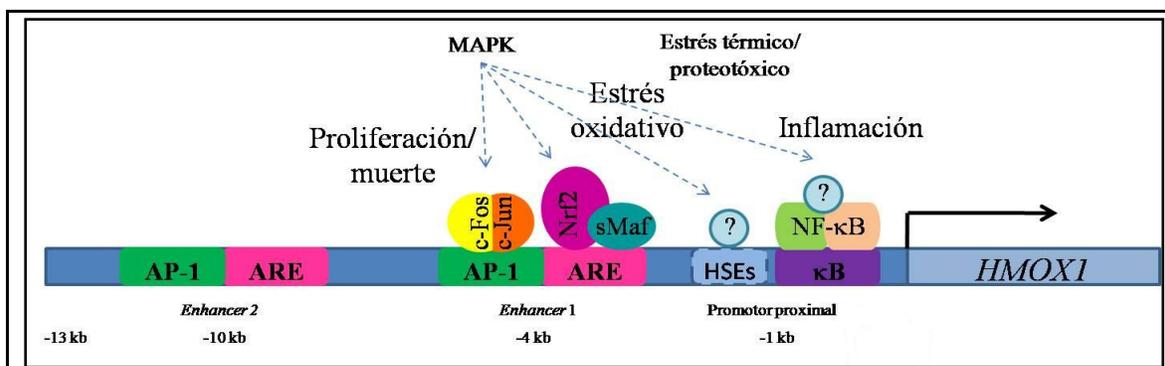


Figura 3. Diagrama del promotor de *HMOX1* y de los factores de transcripción asociados. Diferentes eventos pueden activar la transcripción de HO-1 al unir los factores de transcripción a sus sitios específicos. El factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) se une al sitio  $\kappa$ B del promotor proximal cuando hay inflamación. Los factores de la familia de la proteína activadora 1 (AP-1), ejemplificados por el dímero c-Fos—c-Jun, se unen al sitio AP-1 en respuesta a señales de proliferación o muerte, entre otras. Ante el estrés oxidativo, los dímeros del factor relacionado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) con las proteínas Maf pequeñas (sMaf) se unen a los elementos de respuesta antioxidante (ARE). En el promotor de HO-1 existen varios sitios ARE y AP-1 concentrados en los *enhancers* 1 y 2 del promotor distal. [Modificado de Alam y Cook, 2007].

### ***Regulación de la expresión de HO-1 por la ruta Nrf2-Keap1***

La ruta de señalización Nrf2-Keap1 es el mecanismo principal de respuesta celular contra xenobióticos y agentes estresores intra y extracelulares (Numazawa y Yoshida, 2004). En condiciones basales, el factor de transcripción Nrf2 se encuentra anclado al citoesqueleto de actina mediante la proteína adaptadora Keap1, la cual favorece la degradación de Nrf2 al promover su ubiquitinización. Cuando se activa la ruta, Keap1 libera a Nrf2, que se transloca al núcleo y heterodimeriza con las proteínas Maf pequeñas (sMaf) para promover la transcripción de genes antioxidantes que contienen elementos de respuesta antioxidante (ARE) en su región promotora, como algunos de respuesta antiinflamatoria, antioxidantes, de desintoxicación, mantenimiento del proteoma, transporte y metabolismo de xenobióticos (Jaiswal, 2004; Kensler *et al.*, 2007). Uno de los blancos principales de la ruta Nrf2-Keap1

es HO-1, el cual contiene varios sitios ARE concentrados principalmente en los *enhancers* 1 y 2 (Alam y Cook, 2006; Wang *et al.*, 2007; Copple *et al.*, 2010; Niture *et al.*, 2009). Como Nrf2 también puede ser modificado por cinasas de proteínas—como ERK, JNK y PI3K, entre otras—para favorecer su translocación nuclear (Königsberg, 2007), parte de la inducción de HO-1 puede deberse a una convergencia en la señalización con la ruta Nrf2-Keap1.

Por otra parte, la ruta Nrf2-Keap1 también puede ser inducida mediante quimiopreventores, que son sustancias químicas no tóxicas que pueden bloquear o disminuir la aparición de tumores (Surh, 2003). Algunos quimiopreventores que activan a Nrf2 y promueven la expresión de HO-1 son los isotiocianatos (como el sulforafán, derivado de las plantas crucíferas), la curcumina, el ácido caféico, la capsaicina, quercetina, derivados del té verde y algunas las moléculas sintéticas como el oltipraz y los triterpenoides (Sporn y Liby, 2005; Surh *et al.*, 2008).

Por otro lado, las sMafs también tienen la facultad de formar heterodímeros con la proteína represora Bach1, inhibiendo así la transcripción de los genes blanco de Nrf2 (Motohashi *et al.*, 1997). Cabe destacar que Bach1 contiene seis motivos de unión a hemo (motivos CP) y que la unión de esta molécula disminuye la afinidad de Bach1 por los sitios ARE (Furuyama *et al.*, 2007). De esta manera, el sustrato de HO-1 favorece su des-represión transcripcional.

### ***Efecto citoprotector de los productos de degradación del grupo hemo por HO-1***

El efecto citoprotector de la enzima HO-1 deriva de la degradación del grupo hemo en CO, Fe<sup>2+</sup> y BV/BR, que como ya se ha mencionado tienen un efecto citoprotector por sí mismos, por lo que la actividad antioxidante ejercida por HO-1 es a través de éstos.

El CO es un gas que si bien puede resultar bastante tóxico y causar asfixia por una alta exposición ambiental o por un incremento en la producción endógena del mismo, tiene un efecto antiproliferativo, antiapoptótico, antiinflamatorio y antitrombótico (Ryter *et al.*, 2006). La señalización ocurre mediante dos mecanismos principales. Por una parte, se ha documentado la interacción del CO con la enzima guanilato ciclasa soluble, lo cual resulta en un aumento considerable en la producción de guanosina monofosfato cíclica (cGMP) (Kim *et al.*, 2006). Esta molécula tiene efecto antiproliferativo y vasodilatador, lo cual le

confiere su poder antitrombótico, aunque también se le ha relacionado con la liberación de insulina y glucagon (Galbraith, 1999). Por otro lado, el CO modula la señalización por p38 MAPK, disminuyendo la expresión de citosinas proinflamatorias, regulando la apoptosis y la proliferación (Ryter *et al.*, 2002). Adicionalmente, se ha reportado el efecto neurotransmisor de CO, pero su actividad y regulación se ligan más a HO-2 (que tiene una alta expresión en cerebro); además se ha descrito que el CO puede estar implicado en la regulación de los ciclos circadianos (Kim *et al.*, 2006). La inducción de las vías NF- $\kappa$ B y PI3K/AKT (vía iNOS) por el CO también resulta en una disminución de la apoptosis (Chung *et al.*, 2008).

El Fe<sup>2+</sup> es un potente oxidante, sin embargo, estimula la expresión de la ferritina, la proteína encargada de secuestrarlo y que por tanto tiene efecto antioxidante (Furuyama *et al.*, 2007). Además, el Fe<sup>2+</sup> puede activar a NF- $\kappa$ B y p38, generando así un efecto antiapoptótico (Ryter *et al.*, 2006).

La BV es un pigmento verde hidrosoluble que rápidamente se reduce a BR, pigmento amarillento e hidrofóbico que tiene un fuerte efecto antioxidante directo, ya que es capaz de secuestrar ROS/RNS y reducir su producción (Pae *et al.*, 2008). También se ha descrito que la BR puede inhibir la fosforilación de la proteína Rb e inhibir la expresión de las ciclinas A, D1 y E, así como de la cdk-2 (Jozkowicz *et al.*, 2007). Otros estudios indican que la BR puede inhibir a p38 MAPK y a ERK1/2, bloqueando así la proliferación celular (Jozkowicz *et al.*, 2007). A pesar de que la producción excesiva de BR genera ictericia y daño neuronal, la producción fisiológica confiere el mayor efecto citoprotector ejercido por los metabolitos del grupo hemo (Galbraith, 1999). Aun más, se ha reportado que la BV induce la expresión de interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), citosina proinflamatoria involucrada en la respuesta inmune contra infecciones virales (Lehmann *et al.*, 2010).

Por todos los efectos mencionados de los productos de degradación del grupo hemo por HO-1, a esta enzima se le ha atribuido un papel protector en diversas patologías relacionadas con estrés oxidativo, particularmente en pulmón, cerebro, hígado, sistema cardiovascular y en tejidos sometidos a isquemia y reperfusión (tanto *in vivo* como en tejidos transplantados) (Ryter *et al.*, 2002; Exner *et al.*, 2004; Farombi y Surh, 2006; Fredenburgh *et al.*, 2007; Kirkby y Adin, 2006; Yang *et al.*, 2009). También se ha reportado el papel protector de HO-1 frente a enfermedades relacionadas con inflamación

crónica (tanto por factores endógenos como por infecciones) y autoinmunidad (Ryter *et al.*, 2002; Cuadrado y Rojo, 2008; Nicolai *et al.*, 2009; Pae y Chung, 2009; Lehmann *et al.*, 2010).

De acuerdo a las múltiples evidencias a favor del papel citoprotector de HO-1, existe un gran interés en investigar las diversas formas de inducir su expresión para incrementar la citoprotección tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, dirigido hacia su aplicación clínica. En varios modelos animales se ha visto que al transducir HO-1 con adenovirus se genera un efecto protector ante ciertas enfermedades (Ryter *et al.*, 2002; Fredenburgh *et al.*, 2007). La inducción de HO-1 mediante la activación de Nrf2 por curcumina protege del daño celular por isquemia (Yang *et al.*, 2009). Además, se ha visto que al aplicar BR o CO—ya sea por inhalación o por moléculas liberadoras (CORMs)—se puede imitar el efecto antiinflamatorio de la sobreexpresión de HO-1 (Kirkby y Adin, 2006; Pae *et al.*, 2008), lo cual podría tener una aplicación clínica más factible. En cambio, en ratones *knockout* para HO-1 se observó un aumento en la generación de ROS y disminución de la viabilidad frente a agentes que generan estrés oxidativo, así como inflamación crónica (Koizumi, 2007; Poss y Tonegawa, 1997).

### ***Inducción de HO-1 por arsénico***

El arsénico es un metaloide de distribución ubicua en la naturaleza aunque también se genera como un subproducto en actividades industriales y mineras. La exposición humana a arsénico, principalmente a través de fuentes de agua, es un grave problema de salud en muchos países—incluido México—y se le asocia a patologías como hiperqueratosis, arteroesclerosis, diabetes y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Shi *et al.*, 2004). Adicionalmente, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasifica al arsénico como un carcinógeno humano de tipo I, asociado al desarrollo de cáncer de piel, pulmón, hígado y vejiga, principalmente (IARC Monographs, 2004). Diversos estudios señalan al arsénico y compuestos derivados de él como fuentes de estrés oxidativo (Kitchin, 2001; Pi *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2004).

El arsénico puede encontrarse en varias formas y valencias: las formas inorgánicas ( $\text{As}^0$ , metaloide;  $\text{As}^V$ , arsenato y  $\text{As}^{\text{III}}$ , arsenito) y las formas orgánicas ( $\text{MMA}^{\text{III}}$ , ácido monometilarsenoso;  $\text{MMA}^V$ , ácido monometilarsínico;  $\text{DMA}^{\text{III}}$ , ácido dimetilarsinoso y

DMA<sup>V</sup>, ácido dimetilarsínico). El arsénico trivalente es más tóxico que el pentavalente, así como las formas metiladas son más tóxicas que las inorgánicas (Rossman, 2003). En el cuerpo humano, el principal órgano donde se lleva a cabo el metabolismo del arsénico para su desintoxicación es el hígado. Ahí se llevan a cabo las reacciones de reducción y metilación que facilitan su eliminación por la orina (figura 4). Además, diversos estudios señalan que el metabolismo del arsénico genera ROS, lo cual sugiere que es precisamente el estrés oxidativo el causante de las patologías asociadas. Algunos antioxidantes directos, como el glutatión, son importantes para contener el estrés oxidativo generado por el arsénico. Sin embargo, el glutatión es rápidamente oxidado por el arsenito generando así un desbalance redox (Reichard *et al.*, 2008).

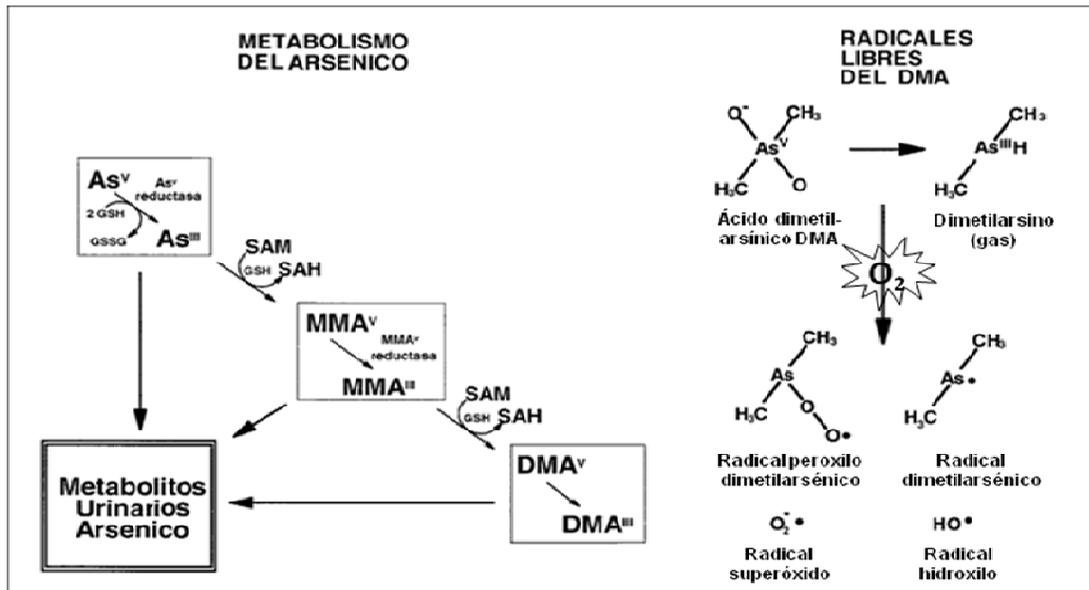


Figura 4. Diagrama del metabolismo del arsénico en humanos y la generación de radicales libres por sus metabolitos. La reducción del arsénico pentavalente a trivalente puede ocurrir no enzimáticamente por medio del glutatión o enzimáticamente. El arsénico se metila primero en monometilarsénico (MMA) y luego en dimetilarsénico (DMA). El ácido dimetilarsínico (DMA<sup>V</sup>) puede reducirse en dimetilarsino, produciendo radicales libres al reaccionar con el oxígeno molecular como el radical dimetilarsénico, el radical peroxilo dimetilarsénico y el superóxido. El radical hidroxilo puede producirse por la interacción del superóxido con Fe u otros metales de transición. SAM, s-adenosilmetionina; SAH, s-adenosilhomocisteína; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado. [Imagen modificada de Kitchin, 2001].

En diversos modelos de estudio se ha visto que HO-1 es fuertemente inducido por el arsénico tanto *in vitro* como *in vivo* (Elbirt *et al.*, 1998; Kitchin, 2001). Adicionalmente, un número creciente de estudios señalan la inducción de Nrf2 así como la inactivación de Bach1 en la respuesta celular al arsénico, lo cual sugiere la participación importante de la

ruta Nrf2-Keap1 y sus genes blanco, entre los que se encuentra HO-1 (Wang *et al.*, 2007; Harada *et al.*, 2008; Reichard *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Recientemente se ha reportado un aumento en la citotoxicidad del arsénico en ratones *knockout* para Nrf2, en los cuales se registró una reducción en los niveles de HO-1 (Jiang *et al.*, 2009). No obstante, el mecanismo preciso por el cual HO-1 protege del daño oxidativo generado por arsénico no está totalmente dilucidado. Por esta razón es necesario realizar estudios para conocer más a detalle cuál es la contribución de HO-1 en la citoprotección al daño oxidativo generado por arsénico.

## **JUSTIFICACIÓN**

El estrés oxidativo es una condición que surge por un aumento crónico en la producción de ROS y ocasiona un desbalance de las especies oxidantes y las especies antioxidantes de la célula. Se le asocia a enfermedades inflamatorias, cardiovasculares y degenerativas, así como al cáncer y al envejecimiento celular. La célula cuenta con diversos mecanismos para contener los daños producidos por las ROS, entre los que se encuentra la enzima HO-1. Esta enzima ejerce un fuerte papel citoprotector a través de los metabolitos de la degradación del grupo hemo, el  $\text{Fe}^{2+}$ , CO y la bilirrubina, que tienen efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiproliferativos.

Por otro lado, el arsénico es un contaminante que genera daño celular principalmente a través de la generación de ROS. La ruta Nrf2-Keap1 se activa en respuesta al arsénico y reduce la citotoxicidad. Nrf2 induce una gran cantidad de genes, de los cuales el más fuertemente inducido es HO-1. Sin embargo, todavía no se conoce bien el mecanismo por medio del cual HO-1 ejerce su efecto citoprotector ante el daño generado por arsénico, por lo que es de gran importancia la generación de modelos celulares derivados de humanos para su estudio. Asimismo, dado el papel citoprotector de HO-1 en la toxicidad generada por arsénico cobra mayor importancia generar modelos que permitan evaluar la protección e incluso la alteración de los niveles de expresión de la enzima en este modelo.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo general***

- Generar un modelo *in vitro* para el análisis de la participación de HO-1 en la respuesta celular a arsénico.

### ***Objetivos particulares***

- Generar vectores de silenciamiento por RNA de interferencia de HO-1.
- Conocer la respuesta celular a arsénico en condiciones de silenciamiento por RNA de interferencia de HO-1.
- Clonar el cDNA de HO-1 humano y generar un vector de expresión para células de mamífero.
- Conocer la respuesta celular a arsénico en condiciones de sobreexpresión de HO-1.
- Evaluar el efecto del arsénico sobre la viabilidad celular en células HepG2 con silenciamiento o sobreexpresión de HO-1.
- Determinar la participación de HO-1 en la contención del estrés oxidativo generado por arsénico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para evaluar *in vitro* el papel que tiene HO-1 en la contención del estrés oxidativo generado por arsenito de sodio se desarrolló un modelo de cultivo celular bajo condiciones de silenciamiento y sobreexpresión de HO-1 (figura 5).

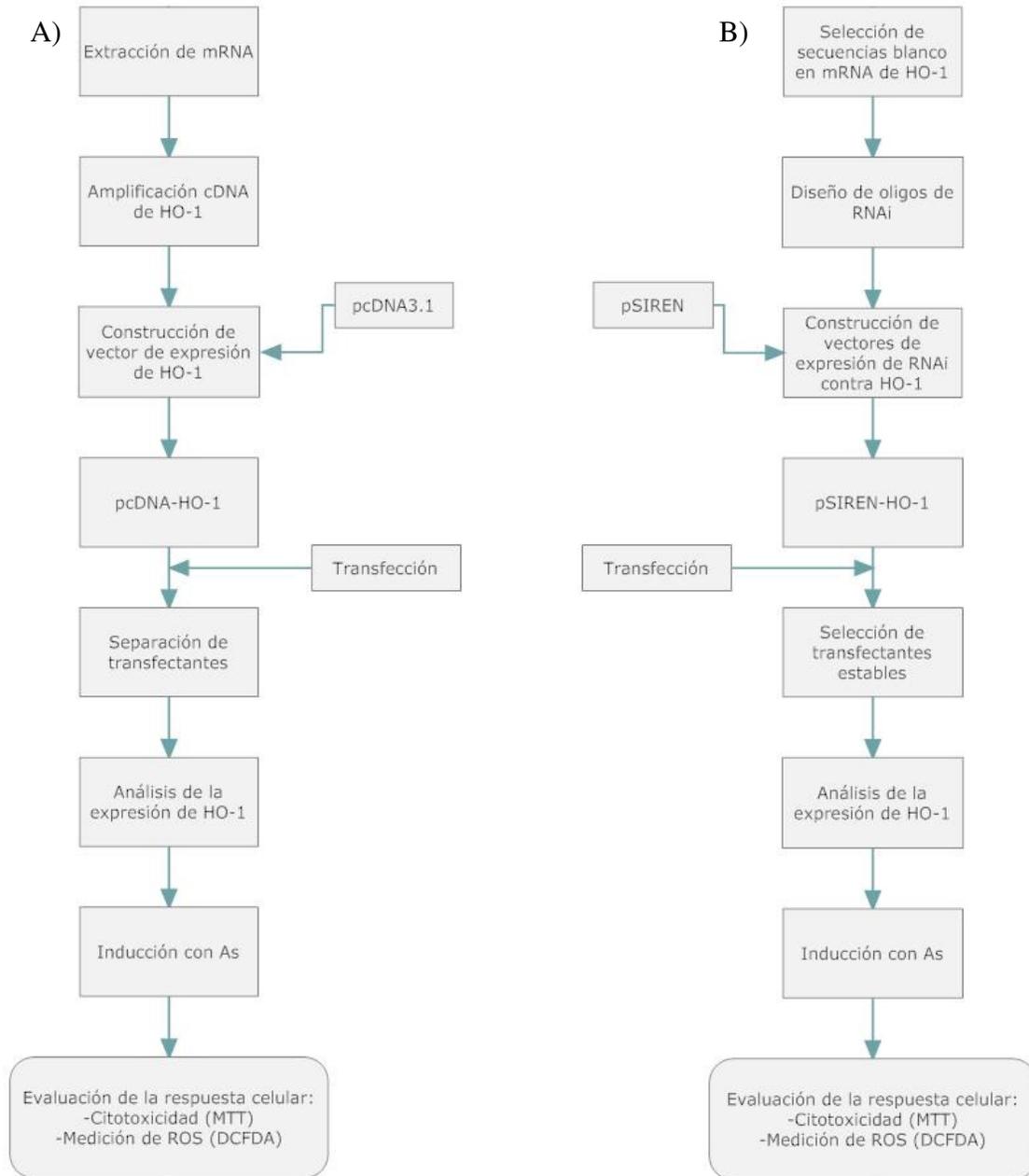


Figura 5. Diagrama de la estrategia experimental para evaluar el papel de HO-1 en la respuesta celular a arsenito de sodio. A) Estrategia para la sobreexpresión de HO-1. B) Estrategia para el silenciamiento de HO-1.

Se generaron los vectores de silenciamiento por RNA de interferencia (RNAi) y de sobreexpresión de HO-1 con el fin de evaluar el papel de HO-1 tanto en la citotoxicidad como en la contención de ROS por arsenito de sodio.

### ***Diseño de vectores de expresión de RNAi contra HO-1***

Para inducir el silenciamiento del mensajero de HO-1 (*knockdown*) se diseñaron vectores de expresión de RNA de interferencia contra el mensajero de HO-1. Se utilizó el vector pSIREN-RetroQ (Clontech, Mountain View, CA, EUA), que permite la expresión de RNA de tallo-asa (shRNA) bajo el control del promotor U6 de RNA polimerasa III humana y contiene el gen de resistencia a puomicina bajo el promotor de fosfoglicerato cinasa (PGK), para la selección en células de mamífero. El vector tiene los sitios *Bam*HI y *Eco*RI para la clonación de oligonucleótidos para la expresión de los shRNAs (figura 6). Los oligonucleótidos contienen la secuencia blanco del mensajero, una región espaciadora y la secuencia antisentido de la secuencia blanco para formar la estructura tallo-asa del shRNA. Además contienen una secuencia terminadora de Pol III de seis residuos de timidina, un sitio de restricción *Mlu*I y están flanqueados por los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI (figura 6). La secuencia blanco se seleccionó a partir del mRNA de HO-1 reportado en la base de datos GenBank (número de acceso NM\_002133) del Centro Nacional de Información Biotecnológica de EUA (NCBI, por sus siglas en inglés). Se eligieron tres regiones blanco con el programa RNAi Target Sequence Selector (Clontech) y se realizó una búsqueda con el algoritmo BLAST en la base de datos de mRNA de referencia para descartar homología con otros mensajeros humanos. A partir de esta información se sintetizaron tres pares de oligonucleótidos, que fueron designados HO-1A, HO-1B y HO-1C, que corresponden a las regiones blanco seleccionadas (tabla 3). Adicionalmente, se empleó un par de oligonucleótidos comerciales (Clontech) contra la secuencia del mensajero de luciferasa, para expresar un shRNA no relacionado, como control.



### ***Clonación de oligonucleótidos en el vector pSIREN***

Para la generación de los vectores de RNAi, los oligonucleótidos superior e inferior de shRNA fueron alineados y ligados con el plásmido pSIREN.

Para la alineación de los oligonucleótidos se mezclaron 10  $\mu$ l de oligonucleótidos superior y 10  $\mu$ l de oligonucleótido inferior a una concentración de 100  $\mu$ M (concentración final de cada uno: 50  $\mu$ M), con un ciclo de calentamiento a 95°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos, 37°C por 2 minutos y 25°C por 2 minutos en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Westbury, NY, EUA). Los oligonucleótidos alineados se diluyeron a una concentración de 0.5  $\mu$ M y se llevó a cabo la reacción de ligación con 1  $\mu$ l de los oligonucleótidos alineados, 2  $\mu$ l del vector, 1.5  $\mu$ l de *buffer* 10X de T4 DNA ligasa (New England BioLabs, Ipswich, MA, EUA), 0.5  $\mu$ l de albumina sérica bovina (BSA) (10 mg/ml) y 1  $\mu$ l de enzima T4 DNA ligasa (New England BioLabs) en un volumen final de 15  $\mu$ l. La mezcla se incubó por 3 horas a temperatura ambiente. Los productos de ligación se emplearon para transformar bacterias DH5 $\alpha$  para la propagación de los plásmidos, los cuales fueron designados pSIREN-HO1 y pSIREN-Luc.

### ***Extracción y purificación de RNA***

La extracción de RNA total de células HepG2 se hizo con Trizol siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Se agregó 1 ml de Trizol a una caja de cultivo de 60 mm de diámetro y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó el homogenizado a 13 000 rpm durante 15 minutos a 4° C. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol para precipitar el RNA. La solución se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos a 4° C. Se eliminó el sobrenadante, el botón de RNA se lavó agregando 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min a 4° C, se eliminó el exceso de etanol por decantación y el etanol residual se evaporó a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el botón de RNA en 15  $\mu$ l de agua libre de nucleasas.

Para eliminar los residuos de DNA de la muestra, el RNA fue tratado con la enzima Turbo DNase Free (Ambion, Austin, TX, EUA). Se agregaron 1.5  $\mu$ l de *buffer* 10X, 0.5  $\mu$ l

de la enzima y se incubó 30 minutos a 37° C. Después, se agregaron 3.3 µl de inhibidor de la DNasa (20% v/v) y se incubó por 2 minutos con agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó 90 segundos a 13 000 rpm. El sobrenadante, que contiene al RNA purificado, fue transferido a un tubo nuevo y se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop ND 1000 (Wilmington, DE, EUA). La integridad del RNA se evaluó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, a 90 volts durante 45 minutos.

### ***Síntesis de cDNA***

El cDNA se sintetizó con el kit TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Se colocaron 2 µg de RNA y 0.5 µl de oligonucleótido dT<sub>16</sub> (Fermentas, Burlington, Ontario, Canadá) en un volumen de 8.7 µl, se incubó a 70° C por 5 minutos para desnaturalizar las estructuras secundarias del RNA e inmediatamente después se colocó en hielo. Se agregaron 2 µl de *buffer* 10X, 4.4 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (concentración final: 5.5 mM), 4 µl de dNTPs 2.5 mM c/u (concentración final: 500 µM), 0.4 µl de inhibidor de RNasa (8 unidades) y se incubó 10 minutos a 25° C. Finalmente, se agregaron 0.5 µl de enzima retrotranscriptasa MultiScribe (25 unidades) y se incubó a 37° C por 60 minutos. El producto de la reacción de 20 µl de volumen final se almacenó a -70° C.

**K**KpnI

Forward: 5' **ACGAGGTAC**CATGGAGCGTCCGCAACCCGAC 3'

**K**XhoI

Reverse: 5' **ACCACTC**GAGTCACATGGCATAAAGCCCTACAGCAAC 3'

Figura 7. Esquema de los oligonucleótidos diseñados para amplificar el cDNA de HO-1 con los sitios de restricción para clonación. El codón de inicio en el oligonucleótido *forward* y el codón de término en el oligonucleótido *reverse* se muestran subrayados; en gris, las bases extra para el reconocimiento de los sitios de restricción (en negritas).

### ***Clonación del cDNA de HO-1 en el vector pcDNA3***

Para la sobreexpresión de HO-1 se clonó la secuencia codificante (CDS, por sus siglas en inglés) de HO-1 en el vector pcDNA3. Previamente, se indujo la expresión de HO-1 en

células HepG2 tratándolas con arsenito de sodio 10  $\mu$ M por 4 horas. Posteriormente, se extrajo el RNA y se sintetizó el cDNA.

Para la amplificación del cDNA de HO-1 se diseñaron un par de oligonucleótidos que flanquean la secuencia codificante del RNA mensajero con el programa Primer Select (Lasergene v.7.0, DNASTAR, WI, EUA). A los oligonucleótidos sentido y antisentido se les adicionaron las secuencias de los sitios de restricción *KpnI* y *XhoI*, respectivamente, así como cuatro nucleótidos extra para permitir el corte de estos sitios (figura 7). La reacción de PCR se realizó con 1  $\mu$ l de cDNA, 2.5  $\mu$ l de *buffer* GeneAmp 10X, 2.5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  25 mM, 2.5  $\mu$ l de dNTPs 2.5 mM, 1  $\mu$ l de cada oligonucleótido 10 mM y 0.25  $\mu$ l de AmpliTaq Gold (5U/ $\mu$ l) (Applied Biosystems) en un volumen final de 25  $\mu$ l. Las condiciones de la reacción fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 10 minutos; 30 ciclos con un paso de desnaturalización a 94° C por 30 segundos, un paso de alineamiento a 60° C por 30 segundos y un paso de extensión a 72° C por 45 segundos; un ciclo de extensión final a 72° C por 10 minutos en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% a 90 volts durante 45 minutos y el producto específico (889 pb) se purificó con el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Valencia, CA, EUA).

El producto de PCR purificado se clonó en el plásmido pJET1.2 con el kit CloneJet (Fermentas). Este plásmido contiene el marco de lectura del gen letal *eco471R* para la selección negativa de transformantes con el vector religado sin el inserto (figura 8). Para esto, 200 ng del producto de PCR se incubaron con 10  $\mu$ l de *buffer* 10X (Fermentas) y 1  $\mu$ l de enzima DNA blunting (Fermentas) en una reacción de 18  $\mu$ l a 70° C por 15 minutos. Al terminar se colocó la reacción en hielo y se agregaron 1  $\mu$ l del vector pJET1.2 linearizado (50 ng) y 1  $\mu$ l de enzima T4 DNA ligasa, en un volumen final de 20  $\mu$ l (manteniendo una relación vector-inserto 1:3). La reacción se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes DH5 $\alpha$  y amplificar el vector, que se denominó pJET-HO1 y en el que se confirmó la integridad del cDNA de HO-1 por secuenciación automática.

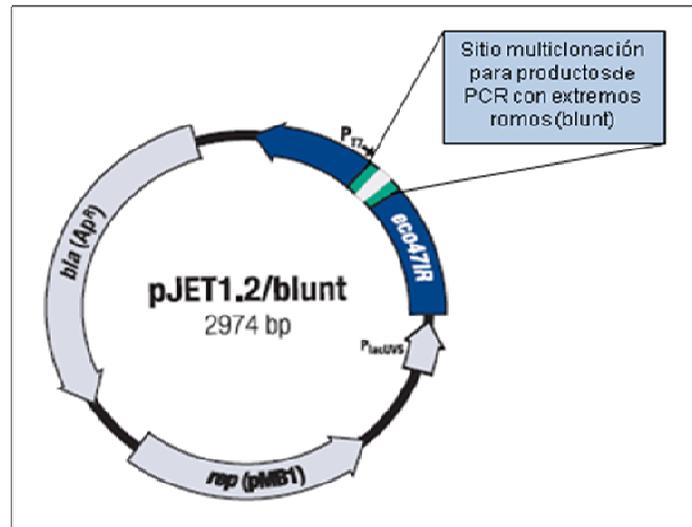


Figura 8. Mapa del vector de clonación para productos de PCR con extremos romos (*blunt*) pJET1.2. El producto de PCR se clona en el sitio multiclonación evitando la expresión del gen letal *eco47IR*, que se expresa bajo control del promotor  $P_{lacUV5}$ . Contiene el gen de resistencia a ampicilina (beta-lactamasa) *bla(Ap<sup>R</sup>)* y el replicón derivado del plásmido pMB1, *rep (pMB1)*. El promotor T7 ( $P_{T7}$ ) permite la transcripción *in vitro* del inserto clonado. [Imagen modificada de Fermentas].

El cDNA se reamplificó a partir del pJet-HO1 por PCR utilizando la enzima de alta fidelidad Platinum Pfx DNA polimerasa (Invitrogen). La reacción de amplificación se realizó con 0.5  $\mu$ l de templado de pJet-HO1, 2.5  $\mu$ l de *buffer* 10X, 1.5  $\mu$ l de  $MgSO_4$  50 mM, 2.5  $\mu$ l de dNTPs 2.5 mM cada uno, 1  $\mu$ l de oligonucleótidos cDNA HO-1 10 mM (descritos anteriormente), 5  $\mu$ l de *enhancer buffer* 10X y 0.4  $\mu$ l de enzima Platinum Pfx (0.5 unidades) en un volumen final de 25  $\mu$ l. Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 10 minutos; 30 ciclos con un paso de desnaturalización a 94° C por 30 segundos, un paso de alineamiento a 60° C por 30 segundos y un paso de extensión a 68° C por 60 segundos y un ciclo de extensión a 72° C por 10 minutos. El producto de PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 90 volts durante 45 minutos, se cortó la banda correspondiente al cDNA de HO-1 y se purificó con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

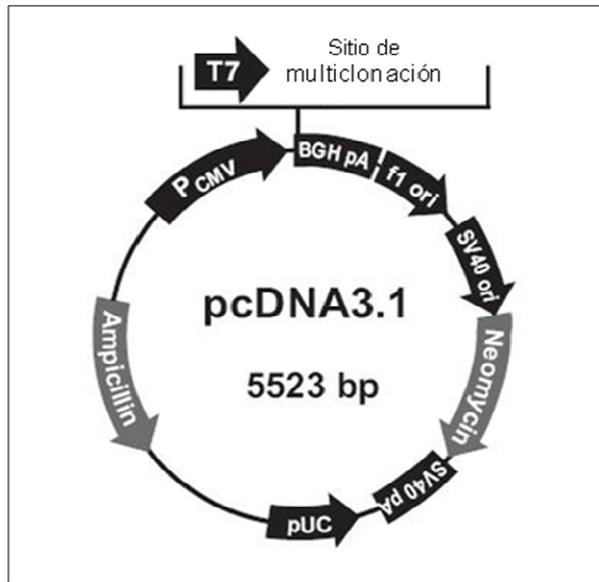


Figura 9. Mapa del vector de expresión pcDNA3.1. El transgen se clona en el sitio de multiclonación y se expresa bajo control del promotor de citomegalovirus (PCMV). El promotor T7 se utiliza para la transcripción *in vitro* del inserto. La señal de poliadenilación derivada del gen de la hormona de crecimiento bovina (BGH pA) permite la terminación de la transcripción y la poliadenilación del mRNA. Contiene los genes de resistencia a ampicilina para la selección en bacterias y el gen de resistencia a neomicina (bajo la expresión del promotor de SV40 y con su señal de poliadenilación, SV40 pA) para la selección en células de mamífero. Cuenta con un origen de replicación bacteriana derivado del plásmido pUC que permite la generación de un alto número de copias del plásmido. [Imagen modificada de Invitrogen].

El cDNA de HO-1 se subclonó en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen), que contiene el promotor de citomegalovirus (figura 9). Se restringieron el cDNA de HO-1 y 200 ng de pcDNA3.1 con las enzimas *KpnI* y *XhoI* (New England BioLabs, 1  $\mu$ l de cada una). Los productos de la restricción se purificaron (el plásmido a partir de gel) y se cuantificaron. Con una relación 3:1 (inserto:vector) se llevó a cabo la ligación en una reacción de 15  $\mu$ l, tomando 220 ng del vector y 108 ng del inserto, 1.5  $\mu$ l de *buffer* T4 DNA ligasa 10X y 1  $\mu$ l de enzima T4 ligasa. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y se utilizó el producto de ligación, el vector de expresión pcDNA-HO1, para transformar bacterias competentes DH5 $\alpha$ .

### ***Transformación bacteriana***

Se utilizaron bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ . La preparación de bacterias competentes se realizó con el método de Inoue (Sambrook y Russell, 2006). El protocolo de transformación que se siguió en todos los casos fue el siguiente: se descongelaron en hielo 50  $\mu$ l de bacterias, se les adicionó el plásmido o producto de ligación producto de ligación y

se agitó suavemente. Se incubaron 20 minutos en hielo, 90 segundos a 42° C y después se colocaron 2 minutos en hielo. Al final se les agregó 800 µl de medio LB y se incubaron durante 30 minutos a 37° C con agitación (500 rpm). Al terminar esta incubación, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos para eliminar el exceso de medio, se plaquearon en LB-agar con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37° C durante 16 horas.

De las colonias transformantes se eligieron aleatoriamente cinco colonias candidato y se evaluó la correcta clonación del inserto mediante restricción y finalmente fueron secuenciados.

#### ***Extracción y purificación de plásmidos a pequeña escala (miniprep)***

Para la obtención de plásmido en pequeña escala, la colonia correspondiente fue inoculada en 10 ml de medio LB suplementado con el antibiótico de selección y se incubó a 37° C con agitación (200 rpm) por 16 horas. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 600 µl de PBS. La miniprep para extraer el plásmido se realizó con el kit Zippy Plasmid Miniprep (Zymo Research, Orange, CA, EUA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en el principio de extracción del plásmido por lisis alcalina y purificación por columna. El plásmido obtenido se resuspendió en 30 µl de agua ultrapura, se cuantificó espectrofotométricamente y se corrieron 200 ng en un gel de agarosa al 1% durante 45 minutos a 90 volts para verificar que no hubieran trazas de DNA genómico y la integridad del plásmido.

#### ***Secuenciación de plásmidos***

Para la secuenciación de plásmidos, las muestras se diluyeron a 200 ng/ µl y se secuenciaron en la Unidad de secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica en un equipo ABI 3730XL Sequence (Applied Biosystems). Los plásmidos pSIREN-HO1 se secuenciaron con el oligonucleótido U6 5' GGGCAGGAAGAGGGCCTAT 3'; el vector pJet-HO1 se secuenció con los oligonucleótidos pJET1.2 forward sequencing primer 5' CGACTCCTATAGGGAGAGCGGC 3' y pJET1.2 reverse sequencing primer 5' AAGAACATCGATTTT CCATGGCAG 3' (Fermentas) y el plásmido pcDNA3-HO1 se

secuenció con los oligonucleótidos del cDNA de HO-1. Los electroferogramas se analizaron con el programa SeqMan (Lasergene).

#### ***Extracción y purificación de plásmidos a gran escala (maxiprep)***

Para la obtención de una gran cantidad de plásmido se inoculó un cultivo líquido de 200 ml de medio SOC o LB con ampicilina (100 µg/ml) y se incubó a 37° C durante 16 horas con agitación moderada (200 rpm). Al terminar la incubación se centrifugó el cultivo a 3000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. La maxiprep para extraer el plásmido con calidad para transfección se realizó con el kit Plasmid Maxi (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en los principios de lisis alcalina, purificación por columna de intercambio aniónico y precipitación con isopropanol. El plásmido se resuspendió en 200 µl de agua estéril y se cuantificó espectrofotométricamente. Los plásmidos se almacenaron a 4° C hasta su uso.

#### ***Preservación de plásmido en bacterias congeladas en glicerol***

Con el objeto de preservar las colonias con plásmidos, se prepararon tres alícuotas de cada una para congelarlas. Brevemente, a 500 µl de suspensión de bacterias (concentradas por centrifugación del cultivo líquido a 3000 rpm) se les agregó 500 µl de glicerol al 40% estéril, se agitó suavemente un par de veces y se colocaron en hielo seco. Una vez congeladas se almacenaron a -70° C.

#### ***Cultivo celular***

Se trabajó con la línea celular HepG2, derivada de un hepatocarcinoma humano. Todos los cultivos fueron mantenidos en una incubadora a 37° C en un ambiente húmedo con CO<sub>2</sub> al 5%, con medio Advanced-MEM (Invitrogen) suplementado con piruvato de sodio 100 mM (Invitrogen) al 1% v/v, aminoácidos no esenciales 1X (Invitrogen), L-glutamina 200 mM (Invitrogen) al 1% v/v, suero fetal bovino (Invitrogen) al 5% v/v, penicilina 5 U/ml, estreptomycin 5 µg/ml y anfotericina 0.25 µg/ml). Adicionalmente, para algunos experimentos se empleó la línea celular HEK293, derivada de células embrionarias de riñón humano y reconocida por su alta eficiencia de transfección, que se cultivó con las mismas condiciones que las células HepG2.

Para la criopreservación de las líneas celulares en nitrógeno líquido, las células fueron tripsinizadas, posteriormente fueron centrifugadas y lavadas con PBS. Se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en medio Advanced-MEM suplementado, con suero fetal bovino al 10% v/v y DMSO al 10% v/v. La congelación de las células se llevó a cabo enfriándolas lentamente para que no perdieran viabilidad, utilizando un contenedor de isopropanol que permite la disminución de 1° C cada hora. Una vez que las células se congelaron a una temperatura de -80° C aproximadamente, se pasaron al contenedor de nitrógeno líquido para su preservación.

Para la selección de células transfectadas establemente, 48 horas posteriores a la transfección, se cambió el medio de cultivo por medio A-MEM suplementado con 2 µg/ml de dihidrocloruro de puromicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) y se mantuvieron durante tres semanas hasta que se eliminaron de las células que no integraron el vector en su genoma. Las células transfectadas establemente que sobrevivieron se aislaron y se expandieron, manteniéndolas en medio A-MEM suplementado con 1 µg/ml de puromicina, con el fin de evaluar la expresión de HO-1 y congelarlas para su uso posterior.

### ***Transfección***

Todas las transfecciones de las células HepG2 fueron realizadas mediante el método basado en liposomas empleando lipofectamina (Invitrogen).

Para la transfección de vectores pSIREN, las células HepG2 fueron sembradas en placas de 24 pozos y se mantuvieron en medio A-MEM suplementado por 16 horas. Dos horas antes de la transfección, se lavaron las células con PBS y se mantuvieron en Opti-MEM (Invitrogen) sin suero y sin antibiótico. En todos los casos, se transfectaron 416 ng de plásmido por pozo. Para la transfección de plásmidos derivados de pcDNA3, las células HepG2 fueron sembradas en placas de 6 pozos y se transfectaron 4 µg de plásmido por pozo. En todas las transfecciones se empleó una relación de 2.5 µl de lipofectamina por cada µg de DNA y se llevaron a cabo preparando una dilución de DNA y una dilución de lipofectamina en Opti-MEM en un volumen final de 1200 µl para las placas de 24 pozos y de 1500 µl para las placas de 6 pozos. Se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se mezclaron ambas diluciones, incubándolas 25 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los liposomas y al final se agregó 100 µl ó 500 µl de

la mezcla por pozo a las placas de 24 y 6 pozos, respectivamente. Las células se incubaron por 4 hrs y posteriormente se cambió el medio a A-MEM suplementado con suero fetal bovino al 10%.

### ***RT-PCR en tiempo real***

Para la evaluación de los niveles de expresión de HO-1 se extrajo el RNA de las células y se sintetizó el cDNA como se describió previamente. La reacción de PCR en tiempo real se llevó a cabo en el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando Sybr Green como fluoróforo. Los oligonucleótidos empleados se muestran en la tabla 4. Las reacciones se realizaron colocando 200 ng de cDNA, 10 µl de reactivo Power Sybr Green (Applied Biosystems) y 8 picomoles de cada oligonucleótido en un volumen final de 20 µl. Cada condición experimental se evaluó por triplicado y de cada condición se realizaron tres réplicas de la reacción de PCR en tiempo real. Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 95° C por 10 minutos; 40 ciclos de amplificación con un paso de desnaturalización a 95° C por 30 segundos, un paso de alineamiento a 60° C por 45 segundos y un paso de extensión a 72° C por 60 segundos; posteriormente se agregó un ciclo para la generación de la curva de disociación, con un paso de desnaturalización a 95° C por 15 segundos, un paso de alineamiento a 60° C por 15 segundos y otro paso de desnaturalización a 95° C por 15 segundos.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la evaluación de la expresión de HO-1 por RT-PCR. †Oligonucleótidos usados para evaluar el silenciamiento de HO-1. ‡Oligonucleótidos usados para evaluar la sobreexpresión de HO-1.

Oligonucleótidos	Secuencia
GAPDH <sup>‡‡</sup>	Forward 5' CTCTGCCCCCTCTGCTGA 3'
	Reverse 5' GGATGACCTTGCCACAGCCT 3'
RT-HO-1 <sup>‡</sup>	Forward 5' AGGGCCAGG TGACCCGAGAC 3'
	Reverse 5' ACGGGGGCAGAATCTTGACAC 3'
RT-HO-1A <sup>†</sup>	Forward 5' AGGGCCAGGTGACCC GAGAC 3'
	Reverse 5' CAGCCTTGCGGTGCAGCTCT 3'
RT-HO-1BC <sup>†</sup>	Forward 5' CTCCCTGGAGATGACTCCCGCA 3'
	Reverse 5' ATGGCC CTGGGAGCCAGCAT 3'

El análisis de los datos se realizó en el programa SDS 2.2.2 (Applied Biosystems). Para evaluar cualitativamente la expresión del mRNA se analizaron los datos con el método

de  $\Delta\Delta Ct$ . El Ct es el valor del ciclo en el cual la fluorescencia emitida por el DNA cruza el valor umbral cuando la reacción de amplificación se encuentra en la fase exponencial. El cambio en la expresión de un mensajero se define con la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (1)$$

donde se calcula:

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct_{HO-1 \text{ control}} - Ct_{GAPDH \text{ control}}) - (Ct_{HO-1 \text{ inducido}} - Ct_{GAPDH \text{ inducido}})] \quad (2)$$

### ***Inmunodetección (Western blot)***

La extracción de proteínas del cultivo celular en cajas de 60 mm se realizó agregando 300  $\mu$ l de *buffer* de lisis ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent (Fermentas) suplementado con inhibidor de proteasas 1X (Fermentas). Las células se rasparon con un gendarme, se resuspendieron y homogenizaron con una jeringa de 1 ml y se centrifugaron a 13 000 rpm durante 15 minutos a 4° C. Se tomó el sobrenadante con las proteínas y se almacenó a -70° C hasta su uso.

Las proteínas se cuantificaron con el método colorimétrico del kit DC Protein Assay (BioRad, Hercules, CA, EUA). En una placa de ELISA se colocaron 5  $\mu$ l de muestra por pozo, 25  $\mu$ l de reactivo A' (20  $\mu$ l de reactivo A + 5  $\mu$ l de reactivo S) y 200  $\mu$ l de reactivo B. Se incubó la reacción por 10 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz y se leyó la absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro MultiSkan Spectrum (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Todas las mediciones se realizaron por triplicado; la cantidad de proteína se determinó extrapolando el valor promedio de absorbancia de las muestras contra una curva estándar de albumina sérica bovina.

Se corrieron 40  $\mu$ g de proteínas en un gel de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con TBS-leche al 5%. El anticuerpo primario contra HO-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) se usó en una dilución 1:500; el anticuerpo primario contra actina (Santa Cruz Biotechnology) se usó en una dilución 1:1000 y los anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina (Sigma) se usaron en una dilución 1:6000. Se reveló colorimétricamente con los sustratos BCIP-T/NBT (Fermentas). Para determinar cualitativamente la cantidad de proteína de las bandas se hizo un análisis de densitometría empleando el programa de libre acceso ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institutes of Mental Health, EUA).

### ***Medición de la citotoxicidad***

La viabilidad celular se analizó con el método colorimétrico de MTT y con el método fluorométrico del kit LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells (Invitrogen).

Para el ensayo colorimétrico, se agregó arsénico 100  $\mu\text{M}$  por 24 horas a las células previamente sembradas en placas de 96 pozos (20 000 células/pozo). Al término del tratamiento, las células se lavaron con PBS y se les agregó 200  $\mu\text{l}$  de MTT (500  $\mu\text{g/ml}$ ) disuelto en Opti-MEM. La placa se incubó a 37° C por 4 horas protegida de la luz; después se lavaron las células con PBS nuevamente y se les agregó 200  $\mu\text{l}$  de DMSO para solubilizar las sales de formazán que se producen cuando las células vivas reducen el MTT. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente con agitación y se leyó la placa a 595 nm en el espectrofotómetro MultiSkan Spectrum (Thermo Scientific).

Para el método fluorométrico, se sembraron células en cajas de 35 mm (confluencia ~80%) y se transfectaron con los vectores pcDNA3.0 y pcDNA3-HO-1. A las 24 horas de la transfección se les agregó una solución de arsénico 100  $\mu\text{M}$  en Opti-MEM y se incubaron otras 24 horas. Posteriormente, se lavaron con PBS y se les agregó una solución LIVE/DEAD (homodímero de etidio 2  $\mu\text{M}$  y calceína AM 0.4  $\mu\text{M}$ ) en Opti-MEM, se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y se observaron al microscopio confocal Axiovert 200 M, con el programa LSM 500 (Zeiss). Las imágenes se analizaron con el programa ZEN 2009 Light Edition (Zeiss). La viabilidad se calculó contando el número de células vivas (verdes) y el número de células muertas (rojas) en cinco campos tomados al azar.

### ***Medición de la generación de especies reactivas de oxígeno***

Para analizar la generación de especies reactivas de oxígeno por el arsénico se empleó el método fluorométrico de diclorofluoresceína di acetato (DCFDA). Las células son permeables a la DCFDA, la cual es intracelularmente desacetilada por esterasas (favoreciendo su retención) y posteriormente oxidada por ROS, generando un compuesto fluorescente, la diclorofluoresceína (DCF).

Para los ensayos de generación de especies reactivas de oxígeno, se sembraron células en placas de 48 pozos (50 000 células/pozo). A las 24 horas, se lavaron con PBS y

se incubaron con Opti-MEM 1 hora. Después se retiró el medio y se les agregó una solución de DCFDA 100  $\mu\text{M}$  en Opti-MEM y se incubaron 30 minutos a 37° C protegidas de la luz. Terminada la incubación, se lavaron con PBS, se les agregó una solución de arsénico 20  $\mu\text{M}$  o  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.03% (como control positivo) en Opti-MEM y se incubaron 5 minutos a 37° C protegidas de la luz. Finalmente, se lavaron con PBS, se les agregó 200  $\mu\text{l}$  de DMSO al 90%, se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó la fluorescencia en el fluorómetro GloMax (Promega, Madison, WI, EUA).

## RESULTADOS

### I. Construcción y validación de vectores de silenciamiento de HO-1

#### Obtención de vectores de expresión de RNAi contra HO-1

Para la construcción de los vectores de silenciamiento de HO-1 se eligieron tres regiones en el mensajero de HO-1 como blanco de RNAi que sirvieron para el diseño de tres pares de oligonucleótidos, que se nombraron HO1A, HO1B y HO1C (figura 10). Los oligonucleótidos se ligaron al vector pSIREN para generar los tres vectores de expresión de RNAi contra HO-1. Adicionalmente se construyó el vector pSIREN-Luc ligando oligonucleótidos de RNAi contra el mensajero de la luciferasa, gen que no se encuentra en las células de mamífero, como control.

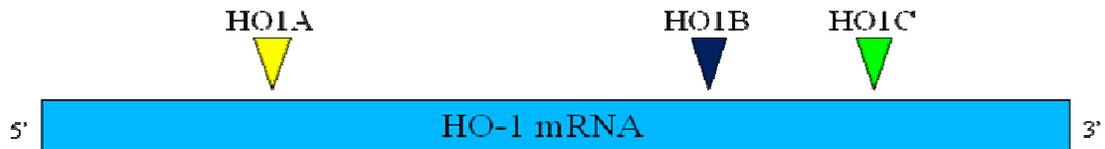


Figura 10. Diagrama de las regiones blanco de RNAi en el mensajero de HO-1. Se eligieron tres regiones distintas en la secuencia de HO-1 para diseñar los oligonucleótidos de expresión de shRNA para los vectores de silenciamiento. Hacia el extremo 5' se sintetizaron los oligonucleótidos HO1A y hacia el extremo 3' se sintetizaron los oligonucleótidos HO1B y HO1C.

Con los vectores se transformaron bacterias DH5 $\alpha$  y se analizaron por secuenciación cinco candidatos de cada construcción para verificar la correcta clonación de los oligonucleótidos de shRNA en el plásmido pSIREN (figura 11). De las colonias que tenían los vectores correctamente clonados se extrajo plásmido para la transfección de células HepG2.

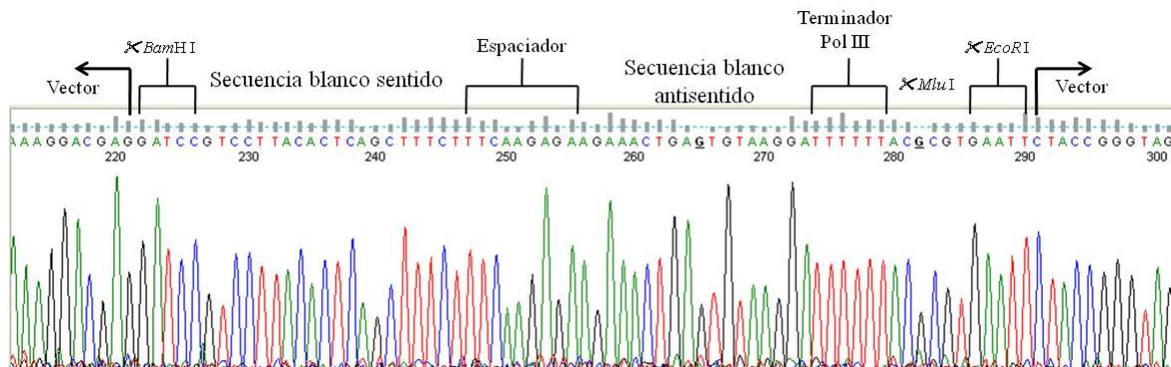


Figura 11. Electroferograma de la secuencia *forward* del vector pSIREN-HO1C. Se muestra el detalle de la secuenciación de la región correspondiente al oligonucleótido HO1C. El oligonucleótido fue clonado correctamente y no se aprecian errores en la secuencia. Se señalan las regiones que lo componen.

### ***Obtención de líneas estables de expresión de RNAi contra HO-1***

Se transfectaron las células HepG2 (figura 12A) con los vectores pSIREN-HO1A, pSIREN-HO1B, pSIREN-HO1C y pSIREN-Luc. Las células transfectadas establemente se seleccionaron con dihidrocloruro de puromicina. Durante la primera semana de selección con el antibiótico murieron la mayor parte de las células. A partir de las células transfectadas establemente que proliferaron durante las siguientes dos semanas se formaron colonias (figura 12B) que se aislaron y propagaron para evaluar la expresión de HO-1 y elegir las que presentaran un mayor silenciamiento. Se obtuvieron once líneas derivadas de colonias de pSIREN-HO1A, cuatro de pSIREN-HO1B, doce de pSIREN-HO1C y seis líneas pSIREN-Luc control.

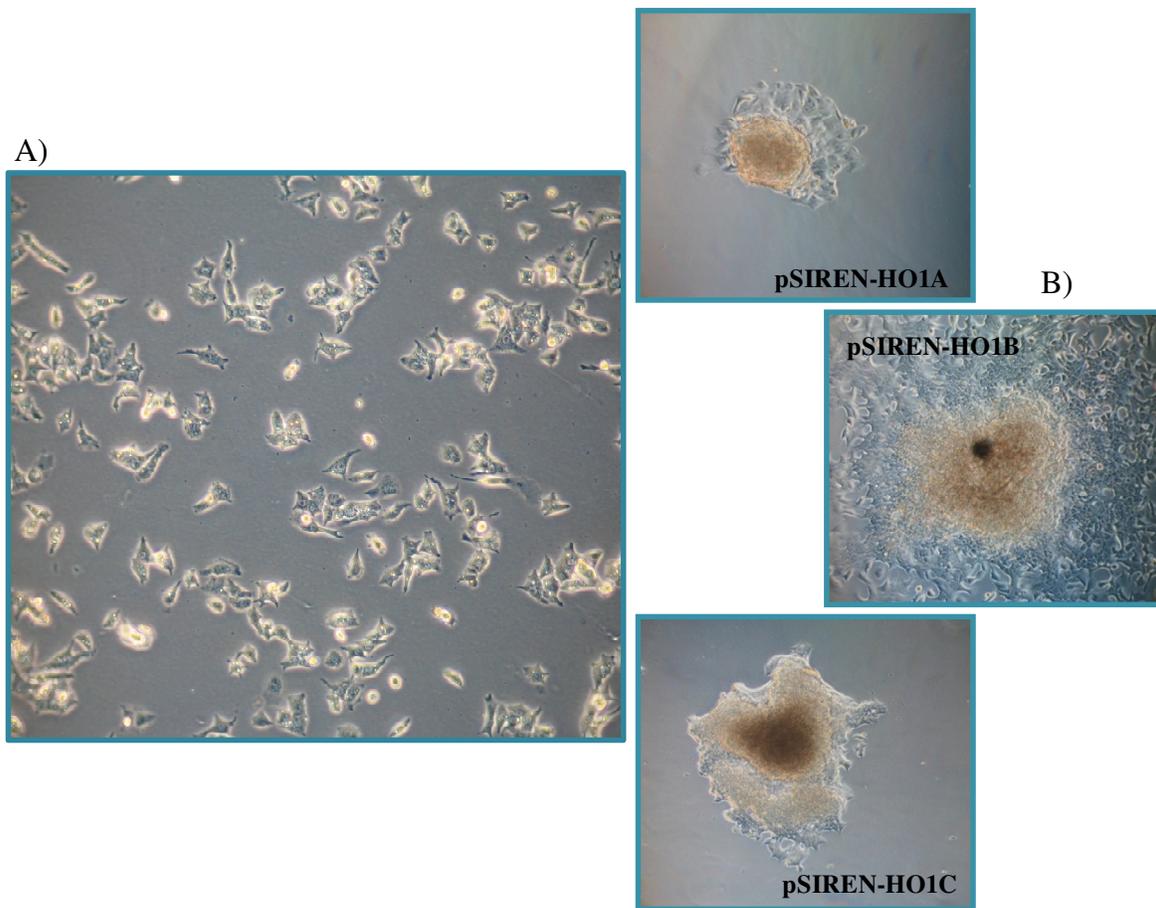


Figura 12. Fotografías de células HepG2. A) Cultivo de células HepG2. B) Colonias de células transfectadas y seleccionadas con puromicina. En cada recuadro se muestra una colonia que creció a partir de una célula transfectada con un vector distinto y en diferente etapa de crecimiento. Estas colonias se aislaron y propagaron por separado (Aumento: 100X).

### ***Validación de los vectores de silenciamiento***

Para analizar la efectividad de los vectores de expresión de RNAi en el silenciamiento de HO-1 se analizó la expresión de esta enzima tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína. La expresión del mRNA de HO-1 se evaluó por RT-PCR en tiempo real bajo una inducción con arsenito de sodio 10  $\mu\text{M}$  durante 4 horas. Cada línea celular se sembró por duplicado para evaluar la expresión de HO-1 en condiciones basales e inducidas. Se compararon los niveles de expresión del mRNA de HO-1 de cada línea contra los niveles de la línea control. Se evaluaron cinco líneas de HO1A, dos líneas de HO1B y dos líneas de HO1C. Se eligieron las tres líneas que tuvieron los niveles más bajos de expresión en ambas condiciones: dos correspondientes a HO1A, nombradas “clona 1” y “clona 2”, y una de HO1C nombrada “clona 3”. En estas líneas se observó un silenciamiento del 33.6%, 81% y 96.8%, respectivamente (figura 13). Se encontró que el vector más eficiente fue el pSIREN-HO1A, ya que los mayores niveles de silenciamiento se encontraron en estas líneas y se comprobó que los vectores de pSIREN-HO1 son efectivos para silenciar la expresión de HO-1.

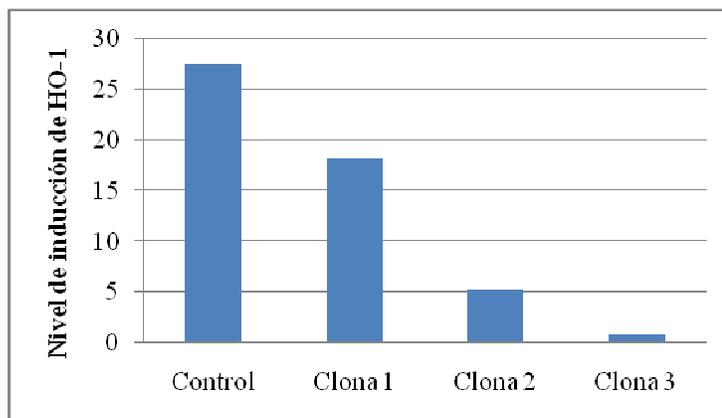


Figura 13. Expresión de HO-1 a nivel de mRNA en las líneas de RNAi. Se cuantificó por RT-PCR en tiempo real el nivel de expresión de HO-1 de células inducidas con arsenito de sodio 10  $\mu\text{M}$  por 4 horas. Se eligieron las tres clonas con los mayores niveles de silenciamiento.

El nivel de expresión de HO-1 también se evaluó a nivel de proteína mediante Western blot. Se sembraron por cuadruplicado cada una de las clonas utilizadas. A tres cajas se les dio un tratamiento con arsenito de sodio durante 4 h (2.5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) y se dejó una cuarta caja como control. Se extrajeron las proteínas y se realizó la inmunodetección. En condiciones basales la inmunodetección de HO-1 fue muy débil, sin embargo, en presencia de arsenito de sodio se observó una expresión de HO-1 dependiente de la dosis. Además, se

observó que en las clonas de RNAi contra HO-1 la cantidad de proteína presente en condiciones de inducción fue menor que en la línea celular control (figura 14). Con esto se documenta que existe una correlación del silenciamiento de la expresión de HO-1 con RNAi con una menor expresión de proteína. Por lo tanto, se cuenta ya con un modelo de estudio para poder evaluar el efecto del silenciamiento de HO-1 en la respuesta celular a arsénico.

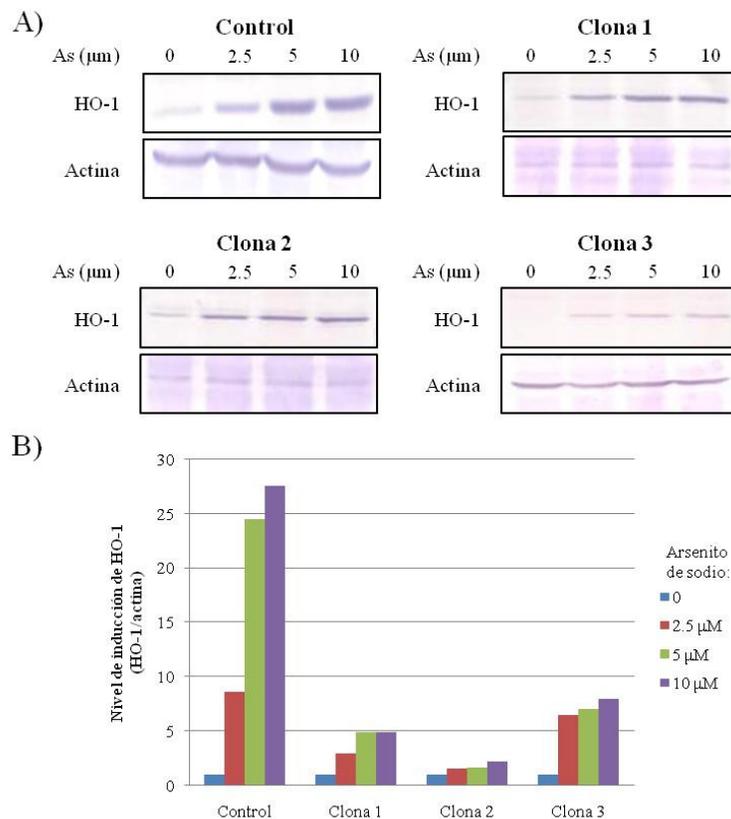


Figura 14. Expresión de HO-1 a nivel de proteína en clonas de RNAi. A) Niveles de proteína de HO-1 detectados por WB en las diferentes clonas para la inducción con arsenito de sodio en distintas concentraciones por 4 horas. B) Niveles de inducción de HO-1 determinados por densitometría de las imágenes de WB. En las clonas de RNAi hay una menor inducción de HO-1 que en la clona control.

## II. Construcción y validación de un vector de expresión de HO-1

### Clonación del cDNA de HO-1

Las células HepG2 se incubaron con arsenito de sodio 10  $\mu\text{M}$  durante 4 horas, posteriormente se extrajo el RNA total y se sintetizó el cDNA. El cDNA de HO-1 se amplificó, se clonó en el vector pJET1.2 y se transformaron bacterias DH5 $\alpha$ . Se extrajo plásmido de las colonias candidato y se analizó por secuenciación. Se encontró una colonia

en la que el cDNA de HO-1 no presentó ningún error (figura 15) y se extrajo el plásmido pJET1.2-HO1.

```

>ref|NM_002133.1|  Homo sapiens heme oxygenase (decycling) 1 (HMOX1), mRNA
Length=1550
Score = 1602 bits (867), Expect = 0.0
Identities = 867/867 (100%), Gaps = 0/867 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1 ATGGAGCGTCCGCAACCCGACAGCATGCCCCAGGATTTGTCAGAGGCCCTGAAGGAGGCC 60
      |||
Sbjct 81 ATGGAGCGTCCGCAACCCGACAGCATGCCCCAGGATTTGTCAGAGGCCCTGAAGGAGGCC 140

Query 61 ACCAAGGAGGTGCACACCCAGGCAGAGAATGCTGAGTTCATGAGGAACTTCAGAAGGGC 120
      |||
Sbjct 141 ACCAAGGAGGTGCACACCCAGGCAGAGAATGCTGAGTTCATGAGGAACTTCAGAAGGGC 200

Query 121 CAGGTGACCCGAGACGGCTTCAAGCTGGTGATGGCCTCCCTGTACCACATCTATGTGGCC 180
      |||
Sbjct 201 CAGGTGACCCGAGACGGCTTCAAGCTGGTGATGGCCTCCCTGTACCACATCTATGTGGCC 260

Query 181 CTGGAGGAGGAGATTGAGCGCAACAAGGAGAGCCAGTCTTCGCCCTGTCTACTTCCCA 240
      |||
Sbjct 261 CTGGAGGAGGAGATTGAGCGCAACAAGGAGAGCCAGTCTTCGCCCTGTCTACTTCCCA 320

Query 241 GAAGAGTGCACCGCAAGGCTGCCCTGGAGCAGGACCTGGCCTTCTGGTACGGGCCCGC 300
      |||
Sbjct 321 GAAGAGTGCACCGCAAGGCTGCCCTGGAGCAGGACCTGGCCTTCTGGTACGGGCCCGC 380

Query 301 TGGCAGGAGGTATCCCTACACACCAGCCATGCAGCGCTATGTGAAGCGGCTCCACGAG 360
      |||
Sbjct 381 TGGCAGGAGGTATCCCTACACACCAGCCATGCAGCGCTATGTGAAGCGGCTCCACGAG 440

Query 361 GTGGGGCGCACAGAGCCGAGCTGCTGGTGGCCACGCCTACACCCGCTACCTGGGTGAC 420
      |||
Sbjct 441 GTGGGGCGCACAGAGCCGAGCTGCTGGTGGCCACGCCTACACCCGCTACCTGGGTGAC 500

Query 421 CTGTCTGGGGGCCAGGTGCTCAAAAAGATTGCCAGAAAAGCCCTGGACCTGCCAGCTCT 480
      |||
Sbjct 501 CTGTCTGGGGGCCAGGTGCTCAAAAAGATTGCCAGAAAAGCCCTGGACCTGCCAGCTCT 560

Query 481 GGCAGGGCCTGGCCTTCTTACCTTCCCAACATTGCCAGTGCCACCAAGTTCAAGCAG 540
      |||
Sbjct 561 GGCAGGGCCTGGCCTTCTTACCTTCCCAACATTGCCAGTGCCACCAAGTTCAAGCAG 620

Query 541 CTCTACCGCTCCCGCATGAACTCCCTGGAGATGACTCCCGCAGTCAGGCAGAGGGTGATA 600
      |||
Sbjct 621 CTCTACCGCTCCCGCATGAACTCCCTGGAGATGACTCCCGCAGTCAGGCAGAGGGTGATA 680

Query 601 GAAGAGGCCAAGACTGCGTTCCTGCTCAACATCCAGCTCTTTGAGGAGTTGCAGGAGCTG 660
      |||
Sbjct 681 GAAGAGGCCAAGACTGCGTTCCTGCTCAACATCCAGCTCTTTGAGGAGTTGCAGGAGCTG 740

Query 661 CTGACCCATGACACCAAGGACCAGAGCCCTCACGGGCACCAGGGCTTCGCCAGCGGGCC 720
      |||
Sbjct 741 CTGACCCATGACACCAAGGACCAGAGCCCTCACGGGCACCAGGGCTTCGCCAGCGGGCC 800

Query 721 AGCAACAAGTGCAAGATTCTGCCCCGTGGAGACTCCCAGAGGGAAGCCCCACTCAAC 780
      |||
Sbjct 801 AGCAACAAGTGCAAGATTCTGCCCCGTGGAGACTCCCAGAGGGAAGCCCCACTCAAC 860

Query 781 ACCCGCTCCAGGCTCCGCTTCTCCGATGGGTCTTACTACTCAGCTTCTGGTGGCGACA 840
      |||
Sbjct 861 ACCCGCTCCAGGCTCCGCTTCTCCGATGGGTCTTACTACTCAGCTTCTGGTGGCGACA 920

Query 841 GTTGCTGTAGGGCTTTATGCCATGTGA 867
      |||
Sbjct 921 GTTGCTGTAGGGCTTTATGCCATGTGA 947

```

Figura 15. Análisis de la secuencia de la colonia candidato elegida para la extracción de plásmido pJET1.2-HO1. Se comparó la secuencia del cDNA de HO-1 obtenida por secuenciación automatizada de la colonia candidato con la secuencia reportada en el NCBI por medio del algoritmo BLAST. Se obtuvo una identidad del 100% entre ambas secuencias.

### ***Generación del vector de sobreexpresión pcDNA3-HO1***

El plásmido pJET1.2-HO1 se usó como templado para reamplificar el cDNA de HO-1 con una enzima de alta fidelidad (figura 16) y se clonó en el vector pcDNA3.0, generando el vector de expresión pcDNA3-HO-1 que se usó para transformar bacterias DH5 $\alpha$ . Como primer paso para identificar las colonias positivas se amplificó el cDNA de HO-1 por PCR en punto final directamente de las colonias candidato (figura 17). En las colonias que se logró amplificar el cDNA de HO-1 se extrajo plásmido y se corroboró la correcta clonación por secuenciación. Se eligió una colonia de las analizadas para extraer una gran cantidad de plásmido para la transfección.

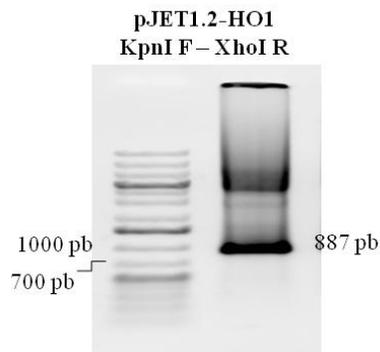


Figura 16. Amplificación del cDNA de HO-1 (887 pb) con la enzima de alta fidelidad Pfx usando como templado el pJET1.2-HO1 y utilizando los oligonucleótidos con los sitios de restricción (*forward KpnI* y *reverse XhoI*).

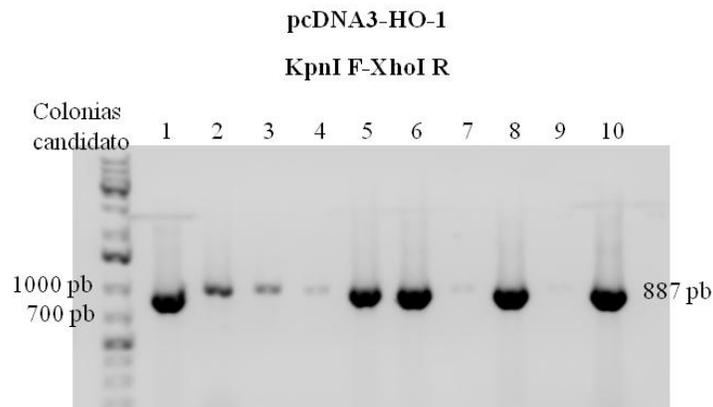


Figura 17. Amplificación del cDNA de HO-1 a partir de colonias transformadas con el vector pcDNA3-HO-1. Se amplificó por PCR el cDNA de HO-1 directamente de las colonias candidato. Las bandas más intensas (clonas 1, 5, 6, 8 y 10) corresponden a las colonias transformadas con vector que contiene inserto. Estas clonas fueron analizadas por secuenciación.

### ***Validación del vector de expresión de HO-1***

La efectividad del vector para sobreexpresar HO-1 en células de mamífero se validó mediante la transfección de la línea celular HEK293. La evaluación de la eficiencia de transfección por microscopía confocal mediante la transfección con el vector reportero pcDNA3-tdTomato mostró una eficiencia mayor del 50% (figura 18A). Por otra parte, los niveles de expresión de mRNA analizados por PCR muestran que las células transfectadas con el vector pcDNA3.0 vacío presentan una expresión de HO-1 muy baja. En cambio, las células transfectadas con el vector pcDNA3-HO-1 mostraron una alta expresión de HO-1 (figura 18B). Por otro lado, la transfección de las células HepG2 con el vector reportero pcDNA3-tdTomato mostró una eficiencia de sólo el 10% (figura 18A). No obstante, al amplificar el cDNA de HO-1 de las células transfectadas también se observó una banda de gran intensidad, lo cual indica un aumento de la expresión de HO-1 con respecto a las células transfectadas con el vector vacío (figura 18B). Así se demuestra que el vector pcDNA3-HO-1 permite la expresión del cDNA de HO-1 en estos dos tipos celulares.

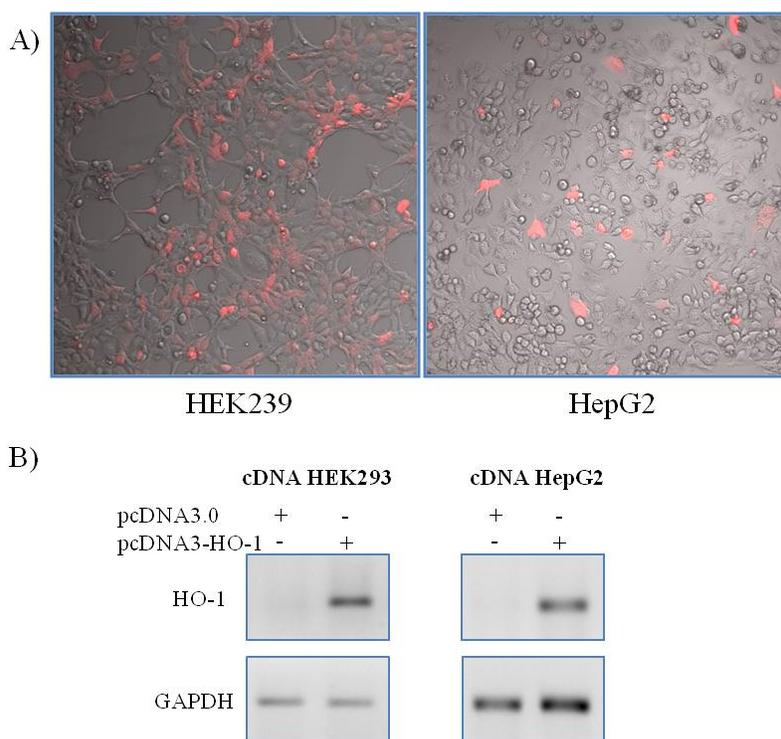


Figura 18. Sobreexpresión de HO-1 con el vector pcDNA3-HO-1 en células HEK293 y HepG2. A) Evaluación de la eficiencia de transfección en las líneas HEK293 y HepG2. Ambas fueron transfectadas con el vector pcDNA3-tdTomato y se analizó la fluorescencia mediante microscopía confocal. B) Se evaluó la sobreexpresión de HO-1 en los dos tipos celulares por RT-PCR. Se transfectaron las células con el vector vacío pcDNA3.0 o con el vector de expresión pcDNA3-HO-1. En las células transfectadas con pcDNA3-HO-1 hay una sobreexpresión de HO-1.

### III. Análisis de la participación de HO-1 en la respuesta celular a arsénico

#### Efecto de HO-1 en la viabilidad de células HepG2 expuestas a arsenito de sodio

Para analizar el papel de HO-1 en la citoprotección de células HepG2 expuestas a arsenito de sodio se realizó una curva de calibración para determinar el número de células y la concentración de MTT que se utilizaría en los experimentos subsecuentes. Se sembraron 1000, 5000, 10 000, 20 000, 50 000 y 100 000 células y se incubaron 4 horas con MTT 500  $\mu\text{g/ml}$ . Se encontró una muy buena correlación entre el número de células y la absorbancia utilizando esta concentración de MTT (figura 19A). Se trabajó con 20 000 células por la buena confluencia ( $\sim 70\%$ ) que presentan en los pozos de la placa y la poca variación entre las muestras.

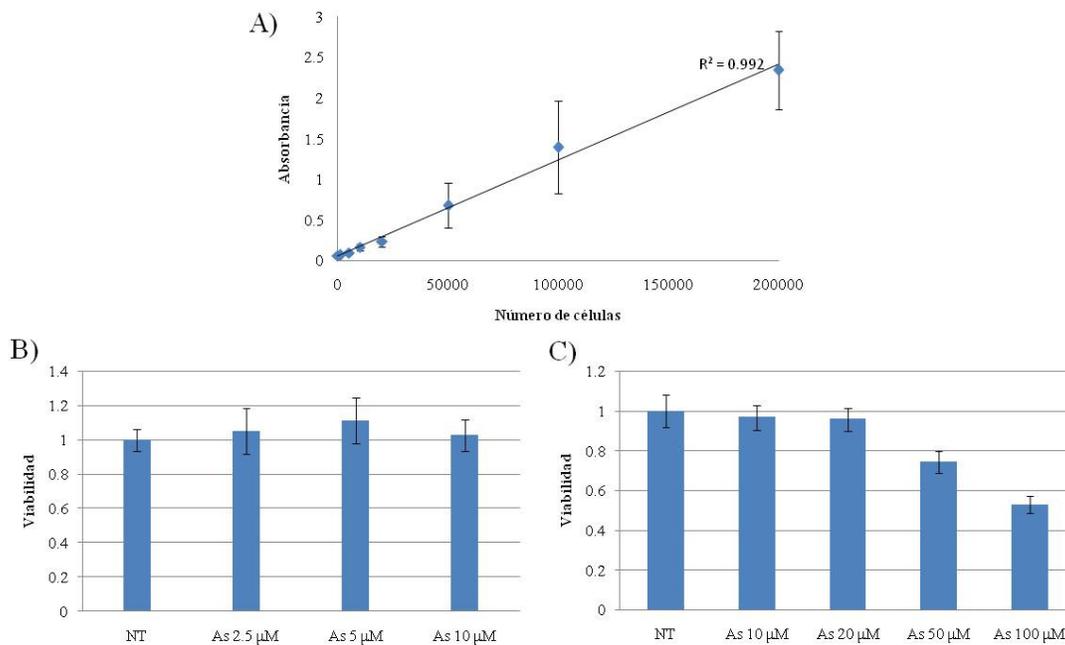


Figura 19. Curvas de viabilidad de células HepG2 en respuesta a diferentes concentraciones de arsenito de sodio. A) Se hizo una curva de número de células para estandarizar la prueba colorimétrica. Se sembraron 1000, 5000, 10 000, 20 000 y 50 000 células y se incubaron 4 horas con MTT a una concentración de 500  $\mu\text{g/ml}$ . Se eligió trabajar con 20 000 células para los siguientes experimentos. B) Curva de viabilidad a dosis bajas de arsenito de sodio. Las células control se expusieron a las concentraciones de arsenito de sodio indicadas por 24 horas y se midió la viabilidad por reducción de MTT. C) Curva de viabilidad a dosis mayores de arsenito de sodio. Se encontró una disminución de la viabilidad a las concentraciones 50 y 100  $\mu\text{M}$ .

Después se realizó un ensayo para determinar las concentraciones de arsenito de sodio que resultaban tóxicas a las células HepG2. La exposición de las células a las concentraciones de arsenito de sodio 2.5, 5 y 10  $\mu\text{M}$  por 24 horas no son citotóxicas en este

modelo celular (figura 19B), por lo cual se probaron concentraciones mayores (10, 20, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ), observando una disminución de la viabilidad a 50  $\mu\text{M}$  y una disminución drástica a 100  $\mu\text{M}$  (figura 19C). Una vez que se establecieron las condiciones para la evaluación de la toxicidad por arsénico se analizó el efecto del silenciamiento de HO-1. Se observó que las células con HO-1 silenciado son más sensibles al tratamiento con arsenito de sodio que las células control (figura 20). Esto indica que HO-1 tiene un papel importante en la citoprotección contra el daño producido por arsenito de sodio.

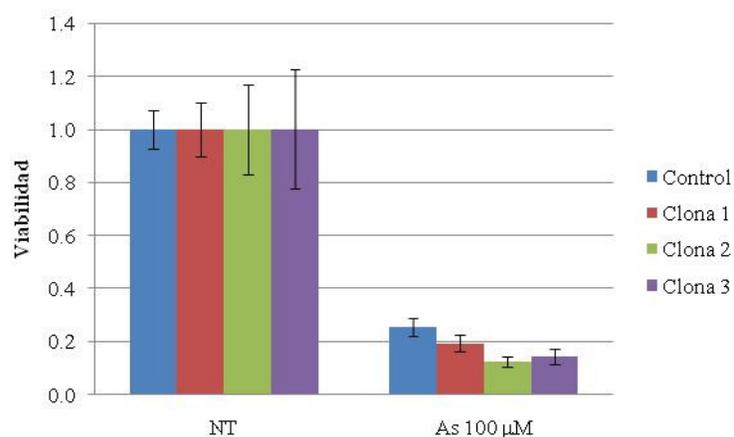


Figura 20. Efecto del silenciamiento de HO-1 en la viabilidad de células expuestas a arsenito de sodio. Las líneas silenciadas se expusieron durante 24 horas a arsenito de sodio 100  $\mu\text{M}$  y se evaluó la viabilidad celular con respecto a la línea control mediante ensayos de reducción de MTT.

Por otro lado, en las células transfectadas transitoriamente con los vectores pcDNA3.0 y pcDNA3-HO-1 se evaluó la viabilidad con la técnica fluorométrica del kit Live/Dead. Se sembraron cinco cajas de 35 mm con células HepG2. Se transfectó una caja con el vector pcDNA3-tdTomato para evaluar la eficiencia de transfección; dos con el vector pcDNA3.0 y otras dos con pcDNA3-HO-1. A las 24 horas de la transfección se observó una eficiencia de transfección de alrededor del 10% por microscopía confocal. La viabilidad celular también fue evaluada por microscopía confocal a las 24 horas de la inducción con arsenito de sodio (figura 21A). En las células transfectadas con el vector pcDNA3-HO-1 se encontró un ligero aumento (de aproximadamente 9.5%) en la viabilidad celular con respecto a las células control (figura 21B).

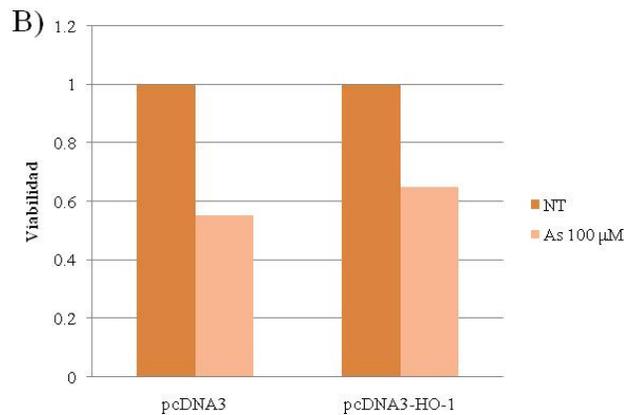
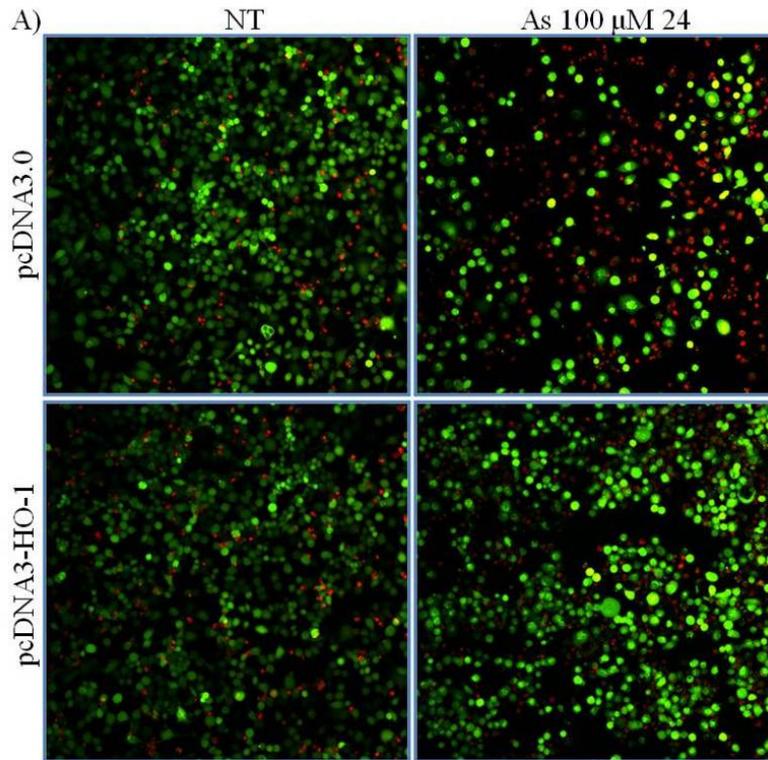


Figura 21. Efecto de la sobreexpresión de HO-1 en células expuestas a arsenito de sodio. Se transflectaron células HepG2 con los vectores pcDNA3.0 y pcDNA3-HO-1 y se les agregó arsenito de sodio 100 M por 24 horas. Se evaluó la viabilidad por microscopía confocal utilizando el kit Live/Dead. A) Identificación de células vivas y muertas. Se tomaron cinco campos al azar de cada tratamiento y se contaron el número de células vivas (verde) y muertas (rojo) para evaluar la viabilidad. B) En las células transfectadas con el vector pcDNA3-HO-1 se observó un ligero aumento en la viabilidad celular con respecto a las células transfectadas con el vector control al agregar arsenito de sodio 100 μM.



## DISCUSIÓN

Una gran cantidad de estudios resaltan el efecto citoprotector de HO-1 ante diversas enfermedades, en particular con aquellas que tienen que ver con inflamación crónica (diabetes tipo I, la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y lupus, así como en alergias: asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica; sepsis, obesidad e infecciones por virus como VIH, HBV, HCV y protozoarios como *Plasmodium falciparum*) o con estrés oxidativo (en corazón, hígado, pulmones y transplantes en general; en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica). Además, la exposición humana a arsénico, principalmente a través de fuentes de agua, se asocia a patologías como hiperqueratosis, arteroesclerosis, diabetes y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Shi et al., 2004). La comprensión de la contribución de HO-1 en la disminución de la toxicidad por arsénico es importante en el diseño de estrategias para prevenir la aparición de cánceres asociados a la contaminación por este metaloide. Ya que la exposición al arsénico es un problema de salud pública en México y en el mundo, el desarrollo de estrategias para disminuir su toxicidad en los casos en los que no pueda evitarse la exposición serán una gran contribución (Pi et al., 2002; Tchounwou et al., 2003).

En este trabajo se construyeron vectores para generar, mediante sobreexpresión o silenciamiento, un modelo biológico de cultivo celular que permita el estudio del papel de HO-1 en la respuesta celular a arsénico. Dado que el hígado es el órgano donde se lleva a cabo el metabolismo del arsénico y por lo tanto es uno de los órganos más susceptibles a este tóxico (Shinkai *et al.*, 2006; Liu y Waalkes, 2008; Smith y Steinmaus, 2009), se utilizó la línea celular HepG2, derivada de un hepatocarcinoma humano, la cual conserva todas las enzimas necesarias para el metabolismo del arsénico (Drobná *et al.*, 2006; Hernández-Zavala *et al.*, 2008).

Utilizando la tecnología de RNAi se generaron líneas celulares con silenciamiento de HO-1, documentado por RT-PCR, que es ampliamente usado por encima de otros métodos para evaluar el silenciamiento del gen blanco (Sandy *et al.*, 2005). Este proceso se realizó para cada una de las clonas generadas ya que no puede predecirse teóricamente el nivel de silenciamiento que se obtendrá con los shRNAs. Aunque existen varias características que deben cumplir los shRNAs para optimizar su funcionamiento (las cuales se han incorporado a los algoritmos para diseñarlos), se ha observado que la variación en el

silenciamiento generado por shRNAs distintos sobre una misma molécula, e incluso del mismo shRNA en distintas células, no puede predecirse (Sandy *et al.*, 2005). De esta manera, para evaluar la eficiencia de silenciamiento de un shRNA se debe comparar tanto el nivel de silenciamiento de un cierto shRNA contra otros que tengan como blanco regiones distintas del gen, así como el nivel de silenciamiento de un mismo shRNA pero en clones celulares distintas (ya que la inserción del vector es aleatoria). En este trabajo se encontraron tres líneas, denominadas “clona 1”, “clona 2” y “clona 3” en las cuales el silenciamiento de HO-1 fue mayor del 50%. De esta manera se pudo comprobar que los vectores de expresión de RNAi contra HO-1 son efectivos para el silenciamiento.

Por otra parte, se clonó el cDNA de HO-1 en un vector de expresión para transfectar transitoriamente las células y evaluar el efecto de la sobreexpresión. Primeramente, se validó el vector en la línea celular HEK293, que se ha utilizado ampliamente por ser una línea muy fácil de trabajar y transfectar (<http://hek293.com/>). Los resultados obtenidos muestran que el vector es efectivo para sobreexpresar HO-1 en células HEK293. En las células HepG2, en contraste con las HEK293, se encontró una eficiencia de transfección muy baja (<1%), que impide la separación de las células transfectadas por citometría de flujo o por algún otro método. Aunque se probaron variaciones al protocolo de transfección con lipofectamina y se realizaron algunas pruebas con otro reactivo, FuGENE HD (Promega), la eficiencia sólo se logró aumentar al 10%. A pesar de la proporción tan reducida de células transfectadas, en los cultivos celulares de la línea HepG2 fue posible detectar un aumento en la expresión de HO-1, lo que indica que el vector es adecuado para sobreexpresar la enzima en esta línea celular y muy probablemente en cualquier línea celular de mamífero. No obstante, para un análisis más detallado del efecto de la sobreexpresión de HO-1 es necesario contar con un mayor número de células transfectadas. Los vectores pcDNA3 contienen el gen de resistencia a neomicina pero se ha reportado que las células HepG2 son parcialmente resistentes a este antibiótico y requieren de dosis muy altas para lograr la selección (<http://www.hepg2.com/>). El cDNA de HO-1 que se clonó en este trabajo puede emplearse para construir vectores que contengan el gen de resistencia a algún otro antibiótico, como la puromicina, o para la construcción de vectores virales derivados de retro, lenti o adenovirus asociados para alcanzar una mejor eficiencia de transfección (Danthinne e Imperiale, 2000; Walther y Stein, 2000). Adicionalmente, se

podrían generar vectores para la activación condicional de HO-1 con doxiciclina utilizando los sistemas reguladores del operón de tetraciclina. De esta manera se podrían generar más modelos celulares para ampliar el estudio del papel citoprotector de HO-1. Esto permitiría explorar si el efecto citoprotector de HO-1 es dependiente del tipo celular.

Con la validación de los vectores de silenciamiento y sobreexpresión en las células HepG2 se generó un modelo de cultivo celular para evaluar el efecto que tiene tanto el silenciamiento como la sobreexpresión de HO-1. La generación de un modelo biológico adecuado es una parte esencial para realizar estudios de biología molecular. El uso de estos vectores de silenciamiento y sobreexpresión permite acotar el amplio espectro molecular con el que cuentan las células para enfocar las investigaciones sobre HO-1 y determinar más precisamente su función. Dado que todavía falta mucho por estudiar del mecanismo de citoprotección por HO-1, estos modelos serán de gran importancia (Sheftel *et al.*, 2007; Abiko *et al.*, 2010).

La tercera parte de este trabajo consistió en evaluar la participación que tiene HO-1 en la respuesta celular al arsénico, valorándola a través de la citotoxicidad (disminución de la viabilidad) y la generación de especies reactivas de oxígeno por el metaloide en los modelos celulares generados con dichos vectores. Las concentraciones entre 2.5-10  $\mu\text{M}$  inducen la ruta de Nrf2 y la expresión de sus genes blanco, como HO-1, de forma dosis dependiente. Sin embargo, a diferencia de lo que se ha reportado para otras líneas celulares, en las células HepG2 su efecto en la viabilidad celular no fue significativo, por lo que en esta línea se trabajó con una concentración mayor (100  $\mu\text{M}$ ), donde la viabilidad disminuyó drásticamente. En las clonas de RNAi se observó una tendencia hacia mayor citotoxicidad en comparación a la línea celular control. En contraste, en las células con sobreexpresión de HO-1 se observó un ligero aumento en la viabilidad, aunque este es un resultado preliminar, ya que, como se ha mencionado, la eficiencia de transfección en esta línea fue de sólo el 10% , por lo que es necesario construir vectores, como los lentivirales, que permitan sobreexpresar HO-1 en toda la población celular. En conjunto, los resultados obtenidos en los modelos biológicos de silenciamiento y sobreexpresión generados en este trabajo indican que HO-1 sí tiene un papel citoprotector en las células HepG2, particularmente en la exposición a dosis altas de arsénico. Esta observación es importante porque se ha

reportado que la activación de Nrf2 protege a las células de la citotoxicidad inducida por arsénico y que HO-1 es su blanco principal (Shinkai *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

Como uno de los efectos de la exposición al arsénico que podría relacionarse con la disminución de la viabilidad celular es la generación de especies reactivas de oxígeno, se midió la generación de ROS mediante la prueba con DCFDA. Este compuesto emite fluorescencia al oxidarse y como todas las células poseen cierta cantidad de especies oxidantes lo que se busca es un aumento significativo en la fluorescencia basal después de un tratamiento. Se encontró que en las clonas con HO-1 silenciado aumenta la generación de ROS tanto en condiciones basales como inducidas por arsenito de sodio. Estos datos sugieren que HO-1 sí está contribuyendo a mantener la homeostasis redox en las células HepG2. Además, la participación de HO-1 podría explicar al menos en parte el aumento en la generación de ROS que se ha reportado al silenciar Nrf2 (Wang *et al.*, 2007). De acuerdo con lo anterior, sería muy interesante evaluar si la generación de ROS es menor en células que sobreexpresen HO-1.

La ventaja del empleo de vectores respecto a otras formas de inhibir o inducir HO-1 a nivel posttraduccional, como la inhibición química de la actividad de HO-1 mediante agentes quelantes, protoporfirinas de cinc y estaño (ZnPPIX y SnPPIX) (Ryter *et al.*, 2006) es que estos métodos tienen la desventaja de no ser inhibidores específicos de HO-1 (también inhiben otras metalo y hemoproteínas) y que en dosis altas pueden llegar a ser tóxicos. Aunque recientemente se han desarrollado siRNAs comerciales (Sigma), su administración, costo económico y corto efecto temporal hacen que los vectores de expresión de shRNA sigan siendo una mejor opción para trabajar. Pese a las ventajas que proporciona el uso de vectores de RNAi, su uso clínico está muy lejos aún de lograrse, por lo que otros estudios siguen siendo de importancia médica.

Por otra parte, la activación de HO-1 vía Nrf2 con el uso de quimiopreventores abre la posibilidad de utilizarlos en ensayos clínicos de forma segura y con muy baja toxicidad debido a que son derivados de alimentos. Sin embargo, es necesario establecer primero el papel que tienen los distintos genes que se encienden con cada quimiopreventor, por lo que el estudio del papel específico de HO-1 en la citoprotección a través de modelos celulares como los generados en este trabajo sigue siendo de gran relevancia.

Finalmente, es importante recordar que el estrés oxidativo es una consecuencia inevitable del metabolismo aeróbico. Las células aeróbicas han desarrollado numerosas estrategias para contener el estrés oxidativo, entre las cuales la ruta Nrf2-Keap1 y la activación de HO-1 son de gran importancia. No obstante, en los diferentes tejidos las tasas metabólicas, el consumo de oxígeno y los niveles de antioxidantes varían enormemente (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009). Por esta razón, para la caracterización de HO-1 es necesario estudiar su función específica, su función en relación a los inductores (que pueden modificar el estado metabólico) y su función específica de tejido. Este estudio contribuyó al desarrollo de un modelo biológico de estudio para evaluar el papel citoprotector de HO-1 en la respuesta celular a arsénico, en células derivadas de hígado. Los resultados refuerzan las observaciones previas que señalan a HO-1 como una enzima de gran relevancia para la hepatoprotección (Farombi y Surh, 2006).

## CONCLUSIONES

En este trabajo se logró construir vectores para silenciar y sobreexpresar HO-1. Para los vectores de silenciamiento, el uso de shRNAs demostró ser una técnica efectiva para lograr niveles importantes de silenciamiento de HO-1 por medio del mecanismo de RNAi. Se encontró que el vector de sobreexpresión de HO-1 genera un gran aumento en la expresión de esta enzima.

Con la validación de estos vectores se generó un modelo biológico de cultivo celular para el análisis de la participación de HO-1 en la respuesta celular a arsénico. Este modelo creado en células HepG2 es adecuado para estudiar la toxicidad, en células hepáticas, asociada a la exposición a arsénico. Sin embargo, este modelo también puede emplearse en otros estudios en los que el interés principal recaiga en determinar el papel que HO-1 tenga en diversos fenómenos biológicos. Asimismo, la clonación del cDNA de HO-1 permitirá utilizarlo para otros estudios, para amplificarlo o subclonarlo desde los vectores pJet1.2-HO1 o pcDNA3-HO-1.

De acuerdo a los resultados de esta investigación, se obtuvo evidencia a favor del papel citoprotector de HO-1 en la respuesta celular a arsénico. Se encontró que el silenciamiento de HO-1 disminuye la viabilidad celular y favorece una generación mayor de ROS. En concordancia con lo anterior, la sobreexpresión de HO-1 puede proteger a las células de la citotoxicidad del arsénico. Se requieren más investigaciones que determinen con mayor detalle la contribución de HO-1 en la reducción de las ROS así como en la citoprotección. Sin embargo, este trabajo contribuye de forma especial al generar modelos de estudio adecuados.

La determinación de los mecanismos de citoprotección de HO-1 permitirá desarrollar estrategias eficientes para promover la expresión de HO-1 para la protección contra diversas patologías, en especial aquellas relacionadas con estrés oxidativo.

## REFERENCIAS

- Abiko, Y; Shinkai, Y; Sumi, D y Kumagai, Y. 2010. Reduction of arsenic-induced cytotoxicity through Nrf2/HO-1 signaling in HepG2 cells. *J Toxicol Sci* 35:419-423.
- Alam, J y Cook, JL. 2007. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol* 36:166-174.
- Chung, HT; Choi, BM, Kwon, YG y Kim, YM. 2008. Interactive relations between nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO): Heme Oxygenase-1/CO pathway is a key modulator in NO-mediated antiapoptosis and anti-inflammation. *Methods in Enzymol* 441:329-338.
- Copple, IM; Goldring, CE; Kitteringham, NR y Park, BK. 2010. The Keap1-Nrf2 Cellular Defense Pathway: Mechanisms of Regulation and Role in Protection Against Drug-Induced Toxicity. Pp. 233-254, *In: J. Uetrecht (ed.). Adverse Drug Reactions, Handbook of Experimental pharmacology* 196. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Cuadrado, A y Rojo, AI. 2008. Heme Oxygenase-1 as a Therapeutic Target in Neurodegenerative Diseases and Brain Infections. *Curr Pharm Des* 14:429-442.
- Danthinne, X e Imperiale, MJ. 2000. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Therapy* 7: 1707-1714.
- D'Autréaux, B y Toledano, MB. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 813-824.
- Drobná, Z; Xing, W; Thomas, DJ y Stýblo, M. 2006. shRNA silencing of AS3MT expression minimizes arsenic methylation capacity of HepG2 cells. *Chem Res Toxicol* 19:894-898.
- Elbirt, KK; Whitmarsh, AJ; Davis, RJ y Bonkovsky, HL. 1998. Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 273:8922-8931.
- Exner, M; Minar, E; Wagner, O y Schillinger, M. 2004. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med* 37:1097-1104.
- Farombi, EO y Surh, YJ. 2006. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol* 39:479-491.
- Ferrándiz, ML y Devesa, I. 2008. Inducers of heme oxygenase-1. *Curr Pharm Des* 14:473-486.
- Fredenburgh, LE; Perrella, MA y Mitsialis, SA. 2007. The role of heme oxygenase-1 in pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36:158-165.
- Furuyama, K; Kaneko, K y Vargas V, PD. 2007. Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku J Exp Med* 213:1-16.
- Galbraith, R. 1999. Heme oxygenase: who needs it? *Proc Soc Exp Biol Med* 222:299-305.
- Goven, D; Boutten, A; Leçon-Malas, V; Marchal-Sommé, J; Soler, P; Boczkowski, J y Bonay, M. 2010. Induction of heme oxygenase-1, biliverdin reductase and H-ferritin in lung macrophage in smokers with primary spontaneous pneumothorax: Role of HIF-1 $\alpha$ . *PLoS ONE* 5:e10886.

- Harada, H; Sugimoto, R; Watanabe, A; Taketani, S; Okada, K; Warabi, E; Siow, R, Itoh, K; Yamamoto, M e Ishii, T. 2008. Differential roles for Nrf2 and AP-1 in upregulation of HO-1 expression by arsenite in murine embryonic fibroblasts. *Free Radic Res* 42:297-304.
- Hernández-Zavala, A; Matoušek, T; Drobná, Z; Paul, DS; Walton, F; Adair, BM, Dědina, J; Thomas, DJ y Stýblo, M. 2008. Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer). *J Anal At Spectrom* 23:342-351.
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2004. Vol. 84. Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic.
- Jaiswal, A. 2004. Nrf2 Signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Mee* 36:1199-1207.
- Jiang, T; Huang, Z; Chan, JY y Zhang, DD. 2009. Nrf2 protects against As(III)-induced damage in mouse liver and bladder. *Toxicol Appl Pharmacol* 240:8-14.
- Jozkowicz, A; Was, H y Dulak, J. 2007. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid Redox Signal* 9:2099-2118.
- Kensler, TW; Wakabayashi, N y Biswal, S. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:89-116.
- Kim, HP; Ryter, SW y Choi, AMK. 2006. CO as a cellular signaling molecule. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:411-449.
- Kirkby, KA y Adin, CA. 2006. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F563-F571.
- Kitchin, KT. 2001. Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems and methylated arsenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 172:249-261.
- Koizumi, S. 2007. Human heme oxygenase-1 deficiency: a lesson on serendipity on the discovery of the novel disease. *Pediatr Int* 49: 125-132.
- Königsberg Fainstein, M. 2007. Nrf2: la historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *REB* 26(1):18-25.
- Lee, PJ; Jiang, BH; Chin, BY; Iyer, NV; Alam, J; Semenza, GL y Choi, AMK. 1997. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* 272:5375-5381.
- Lehmann, E; El-Tantawy, WH; Ocker, M; Bartenschlager, R; Lohmann, V; Hashemolhosseini, S; Tiegs, G y Sass, G. 2010. The heme oxygenase 1 product biliverdin interferes with hepatitis C virus replication by increasing antiviral interferon response. *Hepatology* 51:398-404.
- Limón-Pacheco, J y Gonsbatt, ME. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mut Res* 674:137-147.
- Lin, Q; Weis, S; Yang, G; Weng, YH; Helston, R; Rish, K; Smith, A; Bordner, J; Polte, T; Gaunitz, F y Dennery, PA. 2007. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem* 282:20621-20633.

- Liu, J y Waalkes, M. 2008. Liver is a target of arsenic carcinogenesis. *Toxicol Sci* 105:24-32.
- Motohashi, H; Shavit, JA; Igarashi, K; Yamamoto, M y Engel, JD. 1997. The world according to Maf. *Nucleic Acids Res* 25:2953-2959.
- Nicoilai, A; Li, M; Kim, DH; Peterson, SJ; Vanella, L; Positano, V; Gastaldelli, A; Rezzani, R; Rodella, LF; Drummond, G; Kusmic, C; L'Abbate, A; Kappas, A y Abraham, NG. 2009. Heme oxygenase-1 induction remodels adipose tissue and improves insulin sensitivity in obesity-induced diabetic rats. *Hypertension* 53:508-515.
- Niture, SK; Kaspar, JW; Shen, J y Jaiswal, AK. 2009. Nrf2 signalling and cell survival. *Tox Appl Pharmacol* 244:37-42.
- Numazawa, S y Yoshida, T. 2004. Nrf2-dependent gene expressions: a molecular toxicological aspect. *J Toxicol Sci* 29:81-89.
- Pae, HO; Kim, EC y Chung HT. 2008. Integrative survival response evoked by heme oxygenase-1 and heme metabolites. *J Clin Biochem Nutr* 42:197-203.
- Pae, HO y Chung, HT. 2009. Heme oxygenase-1: its therapeutic roles in inflammatory diseases. *Immune Netw* 9:12-19.
- Pi, J; Yamauchi, H; Kumagai, Y; Sun, G; Yoshida, T, Aikawa, H; Hopenhayn-Rich, C y Shimojo, N. 2002. Evidence for induction of oxidative stress caused by chronic exposure of Chinese residents to arsenic contained in drinking water. *Environ Health Perspect* 110:331-336.
- Poss, KD y Tonegawa, S. 1997. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci* 94:10925-10930.
- Reichard, JR; Sartor, MA y Puga, A. 2008. BACH1 is a specific repressor of *HMOX1* that is inactivated by arsenite. *J Biol Chem* 283:22363-22370.
- Rigas, B y Sun, Y. 2008. Induction of oxidative stress as a mechanism of action of chemopreventive agents against cancer. *Br J Cancer* 98:1157-1160.
- Rossmann, TG. 2003. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mut Res* 533:37-65.
- Ryter, SW; Otterbein, LE; Morse, D y Choi AMK. 2002. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 234-235: 249-263.
- Ryter, SW; Alam, J y Choi, AMK. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86:583-650.
- Sambrook, J y Russell, D. 2006. *The Condensed Protocols From Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, EUA.
- Sandy, P; Ventura, A y Jacks, T. 2005. Mammalian RNAi: a practical guide. *Biotechniques* 39:215-224.
- Sies, H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress*, ed. Sies, H., pp. 1-8. Academic Press, Londres.
- Shi, H; Shi, X y Liu, KJ. 2004. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 255:67-78.

- Shinkai, Y; Sumi, D; Fukami, I; Ishii, T y Kumagai, Y. 2006. Sulphoraphane, an activator of Nrf2, suppresses cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *FEBS Letters* 580:1771-1774.
- Sheftel, AD; Kim, SF y Ponka, P. 2007. Non-heme induction of heme oxygenase-1 does not alter cellular iron metabolism. *J Biol Chem* 282:10480-10486.
- Smith, AH y Steinmaus, CM. 2009. Health effects of arsenic and chromium in drinking water: recent human findings. *Annu Rev Public Health* 30:107-122.
- Sporn, MB y Liby, KT. 2005. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. *Nat Clin Pract Oncol* 2:518-525.
- Surh, YJ. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3:768-780.
- Surh, YJ; Kundu, JK y Na, HK. 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* 74:1526-1539.
- Tchounwou, PB; Patlolla, AK y Centeno, JA. 2003. Carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure—a critical review. *Toxicol Pathol* 31:575-588.
- Tenhunen, R; Marver, HS y Schmid, R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci* 61:748-755.
- Tenhunen, R; Marver, HS y Schmid, R. 1969. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 244:6388-6394.
- Trachootham, D; Alexandre, J y Peng, H. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Disc* 8:579-591.
- Valko, M; Rhodes, CJ; Moncol, J; Izakovic, M y Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1-40.
- Walter, W y Stein, U. 2000. Viral vectors for gene transfer. A review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* 60:249-271.
- Wang, XJ; Sun, Z; Chen, W; Eblin, KE; Gandolfi, AJ y Zhang, DD. 2007. Nrf2 protects human bladder urothelial cells from arsenite and monomethylarsonous acid toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 225:206-213.
- Wang, XJ; Sun, Z; Villeneuve, NF; Zhang, S; Zhao, F; Li, Y; Chen, W; Yi, X; Zheng, W; Wondrak, GT; Wong, PK y Zhang, DD. 2008. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 29:1235-1243.
- Winterbourn, CC. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 4: 278-286.
- Yang, C; Zhang, X; Fan, H y Liu, Y. 2009. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res* 1282:133-141.