



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“Participación del Receptor de Hidrocarburos Arilo (AhR) en la  
Expresión de AQP3 en células Renales Expuestas a Arsenito de Sodio”**

**T E S I S**

Que presenta

**Q.F.B. María del Rosario García Aguilar**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE TOXICOLOGÍA**

**Directora de Tesis:**

Dra. Libia Vega Loyo

**Ciudad de México**

**Agosto, 2018**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogénica e inmunotoxicología del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría de la Dra. Libia Vega Loyo y con el apoyo del CONACyT 237171 a través de la beca No. **615655**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACyT por la beca otorgada para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Libia Vega Loyo por haberme brindado la oportunidad de formar parte de este trabajo de investigación bajo su dirección contando siempre con su guía y consejo.

A la M. en C. Elizabeth Estrada Muñiz por su incondicional apoyo en el manejo de animales, cultivos celulares, así como en la estandarización de las técnicas empleadas y sobre todo por su valiosa amistad.

A los Dres. Arturo Ortega Soto y Octavio D. Reyes Hernández por las aportaciones realizadas para el desarrollo y enriquecimiento de este trabajo.

A los Doctores del Departamento de toxicología por sus enseñanzas y todo su empeño en transmitirme sus conocimientos.

A mis compañeros de laboratorio: Victor, Laura, Jairo, Tamach, David, Dunia, Adrián, Ignacio, Alfredo y mis compañeras del Laboratorio 31 Jazmin, Janisse, Ada, Catia, Laura por su valioso apoyo y por todas las alegrías compartidas en los maravillosos momentos que vivimos.

A Karen Hernández por hacer de mí una mejor persona, por sus consejos y por brindarme su ayuda cuando más lo necesitaba.

A mis compañeros de generación, por su apreciada amistad y cariño, ustedes me motivaron a volverme más fuerte y competente.

*A mi Familia...*

*“Un recuerdo de sus sonrisas es el mejor motivo para seguir adelante”*

## RESUMEN

El arsénico (As) es un metaloide ubicuo, estudios epidemiológicos muestran que la exposición crónica en humanos incrementa el riesgo a presentar cáncer de piel y de órganos internos como pulmón, vejiga y riñón. Sin embargo, su acumulación en tejidos es dependiente del ingreso a las células, proceso llevado a cabo a través de proteínas transportadoras, tal como acuaporina 3 (AQP3), que se expresa de forma diferencial a lo largo de los túbulos colectores renales, mayoritariamente en el túbulo contorneado distal. Existen reportes que indican que la exposición a arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) incrementa la expresión de AQP3. Adicionalmente un análisis *in silico* de este transportador reveló que contiene elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) en su región promotora, por lo que su modulación se puede asociar con la activación del Receptor de Hidrocarburos de Arilo (AhR). Complementario a esta evidencia se conoce que el As sin ser un ligando directo del AhR induce su translocación nuclear y es capaz de modificar la expresión de genes relacionados con su activación, por lo que es posible asociarle con un mecanismo de regulación indirecta que no se ha descrito con claridad hasta el momento. Debido a estos antecedentes es de nuestro interés determinar si la exposición a  $\text{NaAsO}_2$  induce la expresión de AQP3 de manera dependiente de la activación del AhR.

Para cumplir este objetivo se realizó un cultivo primario de células renales provenientes de túbulos colectores distales de ratones machos de la cepa C57BL/6 salvajes y deficientes del gen *Ahr*, las células renales se extrajeron mediante gradientes de percoll. Se aplicaron tratamientos de  $\text{NaAsO}_2$  (0, 0,1,1 y 5  $\mu\text{M}$ ) durante 8, 12 y 24 horas. Se empleó la técnica de MTT para comprobar que no se comprometiera la viabilidad celular con los tratamientos seleccionados y se determinó la expresión de AQP3 mediante Western blot. Se utilizó el 2,3,7,8-Tetra-clorodibenzo-p-dioxina (TCDD 10nM) como control positivo de la activación del AhR. Adicionalmente se realizaron tratamientos con D-actinomicina un inhibidor de la transcripción celular. Nuestros resultados muestran que existe un efecto tiempo-dependiente entre la exposición al TCDD y la expresión de AQP3. Adicionalmente se observa una asociación positiva entre la exposición a  $\text{NaAsO}_2$ , y la expresión de AQP3 la cuál disminuye en las células provenientes de ratones KO. En conclusión, el AhR participa en la expresión de AQP3 a través de un mecanismo de activación directo e indirecto. Sin embargo, no es imprescindible su presencia del AhR para modular su expresión, por lo que pueden existir otros factores de transcripción que coadyuven en conjunto para este fin.

## ABSTRACT

Arsenic (As) is an ubiquitous metalloid; epidemiological studies show that chronic exposure in humans increases the risk of skin and internal organ cancer such as lung, bladder and kidney. However, its accumulation in tissues is dependent on cell entry, a process carried out through transport proteins, such as aquaporin 3 (AQP3), differentially expressed along the renal collecting tubules, mostly in the distal convoluted tubule. Studies to date have shown that the exposure to sodium arsenite (NaAsO<sub>2</sub>) increases the expression of AQP3. Furthermore an *in silico* analysis of this transporter revealed that it contains a xenobiotic response element sequence (XRE) in its promoter region, strongly suggesting that its modulation might be associated with the activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). Along with this evidence it is known that As without being an AHR direct ligand, induces its nuclear translocation and is capable of modifying the expression of genes related to its activation. Therefore, it is possible to associate As to an indirect regulation mechanism that has not been described so far. Taking all of this together we aim to determine if NaAsO<sub>2</sub> exposure induces AQP3 expression in an AHR activation dependent pathway. To achieve this goal, C57/BL6 WT and KO male mice were used to establish a primary culture of renal cells from the distal collector tubules, these cells were isolated by a percoll density gradient procedure. Cells were treated with NaAsO<sub>2</sub> (0, 0,1,1 y 5 μM) during 8, 12 and 24 hours, cell viability was checked using the MTT protocol and AQP3 expression was determined by Western Blot. As a positive control Tetra-chlorodibenzo-p-dioxina (TCDD 10nM) was employed. To verify that the effects seen were due to newly made protein cells were also treated with D-actinomycin.

Our results show that there is a time-dependent effect between TCDD exposure and AQP3 expression, in addition there is a positive association between different NaAsO<sub>2</sub> concentrations and AQP3 expression which is decreasing in cells from KO mice.

In conclusion, the Aryl hydrocarbon receptor participates in the regulation of AQP3 through a direct and indirect mechanism induced by TCDD and NaAsO<sub>2</sub> exposure. However, its activation is not essential to modulate AQP3 expression and there might be other transcription factors that contribute together for this purpose.

<b>Índice General</b>	<b>Página</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Receptor para Hidrocarburos de Arilo .....	1
1.1.1 Mecanismo de Activación Directa .....	2
1.1.2 Mecanismo de Activación Indirecto.....	3
1.2 El Arsénico como Activador Indirecto del AhR .....	3
1.2.1 Toxicodinamia del As.....	4
1.3 AQPs como Transportadores Celulares de Arsénico.....	6
1.3.1 Regulación de AQP3 por AhR .....	7
1.4 Justificación.....	9
1.5 Hipótesis .....	9
1.6 Objetivos.....	9
2. MÉTODOS .....	10
2.1 Estrategia Experimental .....	10
2.2 Soluciones y Reactivos .....	10
2.3 Animales de experimentación .....	12
2.4 Genotipificación de Animales .....	13
2.5 Obtención de Cultivo Primario.....	14
2.6 Tratamientos .....	17
2.7 Ensayo de viabilidad por reducción metabólica del MTT.....	17
2.8 Determinación de mRNA por RT-PCR.....	17
2.9 Determinación de proteínas por Western blot .....	20
2.10 Análisis estadístico .....	21
3 RESULTADOS.....	22
4 DISCUSIÓN .....	27
5 CONCLUSIONES .....	31
6 PERSPECTIVAS .....	32
7 REFERENCIAS.....	33
8 ANEXOS .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Modelo de dominios funcionales del AhR.....	1
Figura 2. Vía de señalización clásica del AhR.....	2
Figura 3. Distribución de especies arsenicales en tejidos y orina.....	5
Figura 4. Distribución de Acuoporinas (AQP3) en el riñón.....	7
Figura 5. Secuencia promotora de AQP3.....	8
Figura 6. Identificación de ratones Knock-out y Wild type.....	13
Figura 7. Fraccionamiento de túbulo por gradiente de Percoll.....	15
Figura 8. Observación al microscopio 40x de células renales a 3 días de cultivo.....	16
Figura 9. Observación al microscopio 20x de células renales a 7 días de cultivo .....	16
Figura 10. Activación del <i>AhR</i> en cultivos WT y KO.....	19
Figura 11. Análisis de Viabilidad en cultivos primarios de células renales.....	22
Figura 12. Efecto de la activación directa del AhR en la expresión de AQP3.....	23
Figura 13. Efecto de la activación indirecta del AhR en la expresión de AQP3.....	24
Figura 14. Efecto de la inhibición de la transcripción sobre la expresión de AQP3.....	26
Figura 15. Modelo propuesto de regulación de AQP3 por As.....	30

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Efectos del As sobre el AhR y la expresión de sus genes blanco.....	4
<b>Tabla 2.</b> Ubicación de las principales AQPs transportadoras de Arsénico.....	5
<b>Tabla 3.</b> Primers empleados para PCR.....	19

## Índice de abreviaturas

<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AhR</b>	Receptor para hidrocarburos arilo
<b>AhRR</b>	Proteína represora del AhR
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>AQPs</b>	Acuaporinas
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNT</b>	Translocador nuclear del AhR
<b>AS3MT</b>	Arsenito 3-metiltransferasa
<b>As</b>	Arsénico inorgánico
<b>bHLH/PAS</b>	Secuencia básica hélice-bucle-hélice/Per-ARNT-Sim
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FAM</b>	6-carboxifluoresceína
<b>GSH</b>	Glutación
<b>GST</b>	Glatación S-transferasa
<b>HEPES</b>	Ácido N-(2-Hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$
<b>HSP</b>	Proteína de choque térmico
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>Nrf2</b>	Factor 2 asociado con el factor nuclear eritroide 2 p45
<b>PBS</b>	Amortiguador de fosfatos
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>TCDD</b>	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
<b>XRE</b>	Elemento de respuesta a xenobióticos

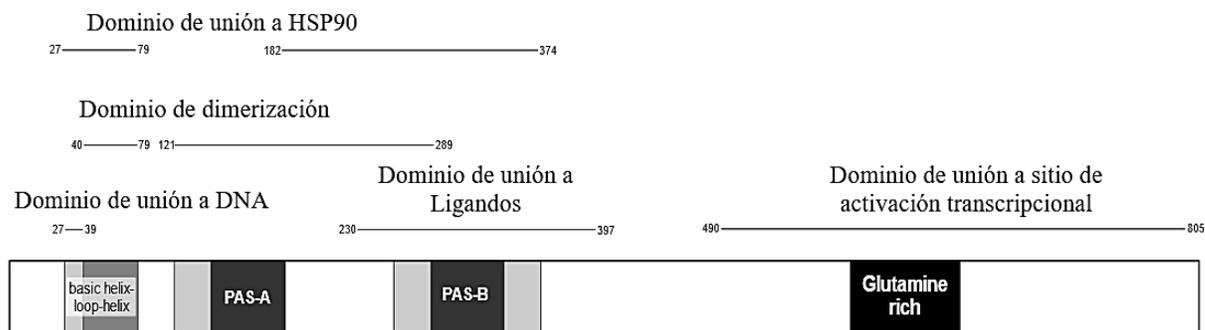
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Receptor para Hidrocarburos de Arilo

El AhR es un miembro de la familia de factores de transcripción de secuencia básica hélice-bucle-hélice bHLH/Per-ARNT-Sim (Bock y Köhle, 2006) está presente en el citosol unido a un complejo de proteínas chaperonas como la proteína de choque térmico de 90 kDa y la proteína X asociada al virus de la hepatitis B (XAP2) así como a p23. Informes recientes sugieren que un número de co-chaperonas, tales como hsp70 y p60, también pueden asociarse con este complejo (Petruilis *et al.*, 2003).

El AhR contiene una región bHLH que funciona en la dimerización con el Translocador nuclear del AhR (ARNT) y el ADN vinculante, adicionalmente contiene secuencias importantes tanto para dirigir la localización nuclear y la exportación nuclear. El dominio PAS contiene dos repeticiones estructurales (A y B) que están implicadas en la dimerización AhR/Arnt (PAS A) y el ligando AhR y la unión a hsp90 (PAS B). El dominio C-terminal, rico en Glutamina, es el que presenta la actividad de transactivación del AhR (Kudo *et al.*, 2018) (Figura 1)

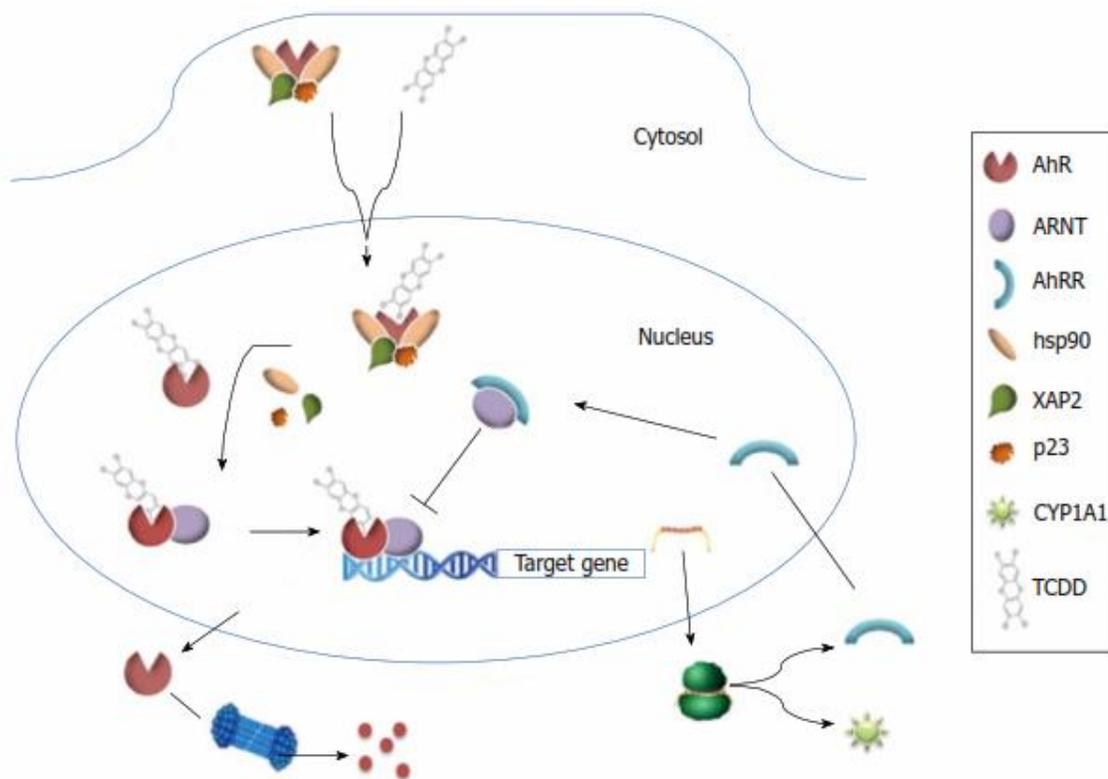
Aunque el AhR tiene funciones fisiológicas diferentes, se reconoce como el responsable de la mayoría de las respuestas tóxicas que se producen después de la exposición a xenobióticos ambientales que son sus ligandos, debido a que algunos de los metabolitos de estos xenobióticos son más tóxicos que sus compuestos originales (Ko y Shin, 2012).



**Figura 1.** Modelo de dominios funcionales del AhR (adaptado de Denison *et al.*, 2002).

### 1.1.1 Mecanismo de Activación Directa

Se conoce que las dioxinas como la 2,3,7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) se unen al AhR provocando que se transloque al núcleo a través de un proceso que se presume que implica la transformación estructural y / o la presentación de la secuencia de localización nuclear (NLS). Una vez en el núcleo forma un dímero con ARNT para finalmente unirse al XRE y aumentar la expresión de una batería de genes que codifican enzimas metabolizadoras, como por ejemplo los citocromos P450s (CYP) 1A1, 1A2 y 1B1, NAD (P) H quinona oxidoreductasa y UDP-glucuronosiltransferasa-6 (Tijet *et al.*, 2006) (Figura 2). Es importante mencionar que el heterodímero AhR-ARNT también aumenta la expresión de la proteína represora del AhR (AhRR), la cual compite con el AhR por ARNT y genera un mecanismo de retroalimentación negativa eficiente (Ohtake *et al.*, 2007; Vega y Elizondo, 2013).



**Figura 2.** Vía de señalización clásica del AhR (Vega y Elizondo, 2013).

### 1.1.2 Mecanismo de Activación Indirecta

Se han identificado algunos compuestos químicos que pueden inducir la expresión génica dependiente de AhR, sin embargo, según los informes, no se unen competitivamente al AhR. Se ha propuesto que estos compuestos químicos no son ligandos del AhR en sí mismos, pero pueden activar indirectamente la expresión génica de forma dependiente del mismo, ya sea a través de la conversión metabólica en un ligando o por su capacidad de afectar a alguna vía celular de señalización con intermediarios que activa al AhR.

La demostración de que algunos inductores "independientes del ligando" realmente se unen al AhR, plantea dudas en cuanto a la existencia de vías de inducción alternativas propuestas, a diferencia de otros receptores dependientes de ligando que se pueden activar de manera independiente del ligando mediante procesos tales como la fosforilación. Por lo tanto, la activación independiente del ligando para el AhR aún no está claramente dilucidado (Mackowiak y Wang, 2016).

### 1.2 El Arsénico como Activador Indirecto del AhR

Uno de los compuestos que al parecer induce la activación indirecta del AhR es el Arsénico, pues modifica la expresión de genes relacionados con la batería de regulación del AhR, aunque los estudios muestran información controversial con respecto al efecto biológico que esta exposición genera (Tabla 1). En modelos *in vivo* se ha demostrado que el arsenito disminuye el efecto del ligando modelo del AhR, el 2,3,7,8- tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), sobre los niveles de ARNm y actividad catalítica del CYP1A1 de manera dependiente del tiempo, por un mecanismo asociado con estrés oxidativo (Anwar-Mohamed *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2009).

Por un lado, se cree que el arsenito presenta un efecto modulador sobre la actividad del AhR, ya sea debido a una interacción directa con el factor de transcripción y/o sus moléculas chaperonas, o por la activación de otros factores como NrF2 que se activa por el estrés oxidativo, y en otros estudios se observa que la transcripción de este factor se modula por la activación del AhR (Miao *et al.*, 2005) (Köhle y Bock, 2007).

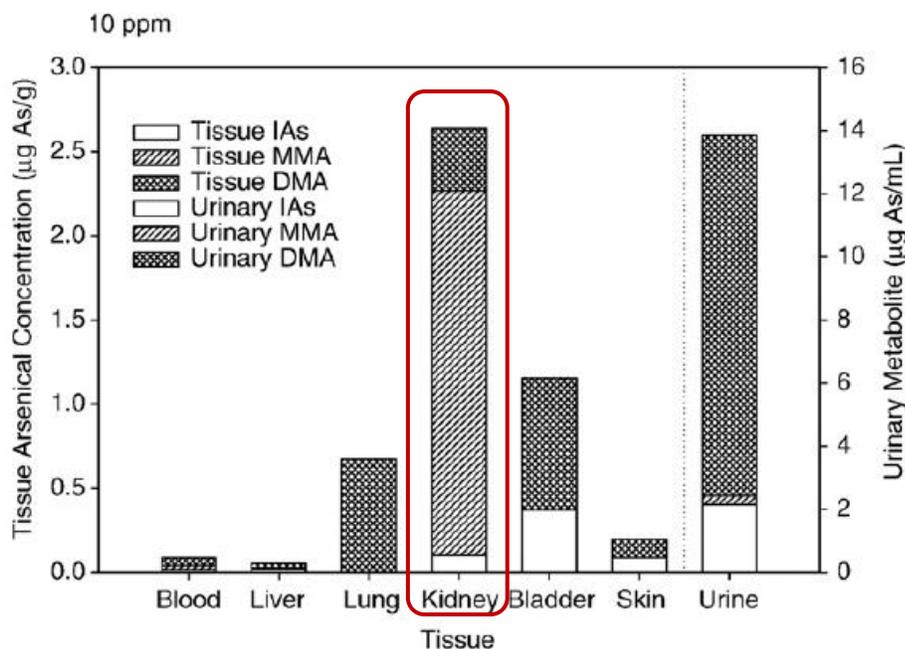
**Tabla 1.** Efectos del As sobre el AhR y la expresión de sus genes blanco

Efecto biológico	Modelo	Referencia
El As <sup>III</sup> altera la expresión de genes de Fase I y de Fase II regulados por el AhR	Hepa 1c1c7, HepG2 Hepatocitos primarios	(Anwar-Mohamed y El-Kadi, 2009)
NaAsO <sub>2</sub> es capaz de inducir la translocación del AhR activando la transcripción de CYP 1A1	Hepa 1c1c7	(Kann <i>et al.</i> , 2005)
As <sup>III</sup> disminuye el efecto del TCDD sobre los niveles de mRNA y la actividad catalítica del CYP1A1	Cultivo primario de Hepatocitos	(Wu <i>et al.</i> , 2009)
As <sup>III</sup> inhibe la inducción mediada por TCDD del mRNA de Cyp1a1 y Cyp1a2	Cultivo de células renales (Ratones C57BL/6)	(Anwar <i>et al.</i> , 2012)
NaAsO <sub>2</sub> inhibe la inducción del ARNm de CYP1A1 dependiente de AhR activado con TCDD a 6 h, y a 24 h se potencia su expresión.	Ratones C57BL/6	(Anwar-Mohamed, <i>et al.</i> , 2013)

### 1.2.1 Toxicodinamia del As

Actualmente se conoce que una exposición aguda a As causa daño cardiaco, neuropatía periférica, anemia, leucopenia y hasta la muerte. La exposición crónica causa varios tipos de cáncer, particularmente de piel, pulmón, hígado, riñón y vejiga, así como lesiones cutáneas, anemia, lesiones cardiovasculares, disfunción de ovarios, desarrollo aberrante de embriones y retardo del crecimiento postnatal (ATSDR, 2007). El riñón es uno de los órganos más susceptibles a la exposición de As, ya que desempeña un papel importante en su acumulación y excreción del organismo (Nandi *et al.*, 2006). Por lo tanto, la toxicidad renal derivada de la exposición a As recibe cada vez más interés de estudio. Existe evidencia que demuestra que la exposición a As altera el metabolismo de los aminoácidos, el metabolismo de los lípidos,

y el metabolismo energético tras la inhibición de la ruta de oxidación del piruvato y del ciclo de Krebs, la alteración de la gluconeogénesis y la disminución en la fosforilación oxidativa (Kumagai y Sumi, 2007; Aposhian, 2006). Actualmente se identifica que la base molecular de su toxicidad es la capacidad que tiene de unirse a grupos tioles y de generar estrés celular a través del incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las principales ROS inducidas por As incluyen anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) y radicales peroxilo (Flora, 2011), los cuales reaccionan con biomoléculas y causan alteraciones patofisiológicas al modificar la actividad enzimática de la célula, lo que culmina en el desarrollo de enfermedad renal crónica (ERC) (Zheng *et al.*, 2014). En modelos animales se muestra que éste tóxico ataca predominantemente el túbulo proximal causando aumento del nivel de bilirrubina y creatinina, estrés del retículo endoplásmico y daño mitocondrial, culminando con necrosis y/o apoptosis (Hong *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2011). Adicionalmente se conoce que las especies arsenicales después de distribuirse a través del torrente sanguíneo tienden a acumularse principalmente en el riñón (Kenyon *et al.*, 2008) (Figura 3).



**Figura 3.** Distribución de especies arsenicales en tejidos y orina en ratones expuestos a 10 ppm (A) o 50 ppm (B) de AsV en agua potable durante 12 semanas (Kenyon *et al.*, 2008).

Los efectos del As son dependientes del tiempo de retención en las células, proceso mediado por proteínas transportadoras que regulan la entrada y excreción del As y sus metabolitos.

### 1.3 AQPs como Transportadores Celulares de Arsénico

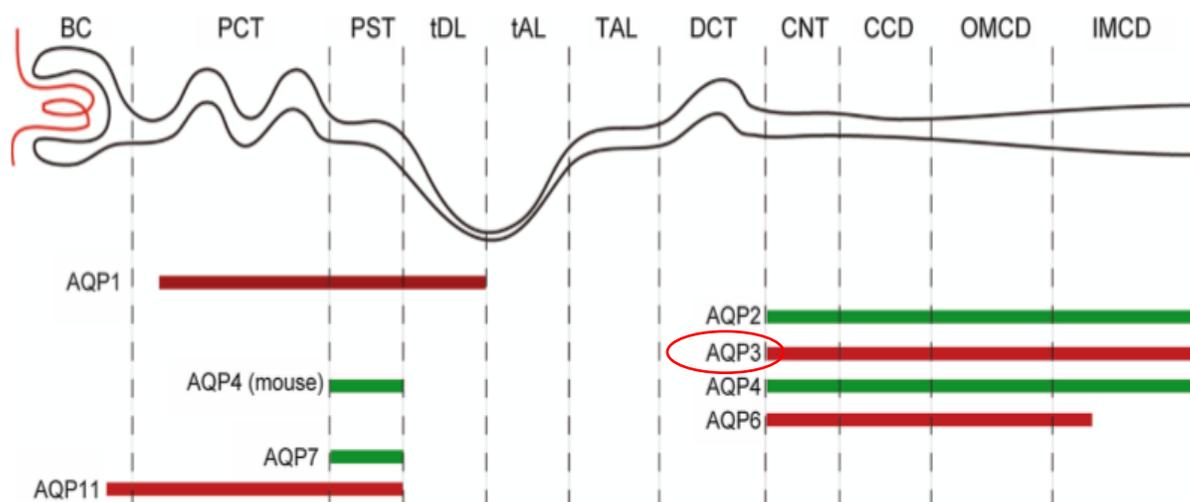
Se conoce que las AQPs, principalmente 1, 3 y 9, se relacionan con el movimiento bidireccional de los metaloides como el As y sus metabolitos (Liu *et al.*, 2006; McDermott *et al.*, 2010). Las AQPs son miembros de una familia de proteínas integrales de membrana que son omnipresentes en las células (Verkman *et al.*, 2005), se expresan en células epiteliales y endoteliales participando en el transporte de fluidos (Tabla 2). En los microorganismos, estas proteínas regulan la adaptación al choque osmótico y la congelación rápida. En los mamíferos, que son los organismos más estudiados, regulan el comportamiento celular (migración, proliferación), el metabolismo y el transporte (Verkman *et al.*, 2014). De hecho, recientemente, se demostró un papel *in vivo* para AQP3 en la migración celular y, potencialmente, en la metástasis celular (Bui *et al.*, 2016; Verkman *et al.*, 2014). Cada isoforma de las AQPs está compuesta por aproximadamente 270 aminoácidos y comprenden seis segmentos que atraviesan la membrana celular; ambos de sus terminales amino y carboxilo están localizados intracelularmente (Kruse *et al.*, 2006).

**Tabla 2.** Distribución de las principales AQPs transportadoras de Arsénico

Molécula	Ubicación	Referencia
AQP 1	Células epiteliales de colon, hepatocitos, células renales	Maunsbach <i>et al.</i> , 1997; Matsuzaki <i>et al.</i> , 2017
AQP 3	Células del esófago Adipocitos hepáticos, células renales	Matsuzaki <i>et al.</i> , 2017; Verkman, 2005
AQP 9	Hepatocitos, células de próstata	Drobná <i>et al.</i> , 2010; Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2014

Existen reportes que indican que la exposición a arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub>) modula la expresión de las AQPs. Se conoce por ejemplo que las AQP3 y 9 modifican el transporte del

arsenito en células de melanoma humano (Gao *et al.*, 2012). Un reporte indica que después de 24 horas de exposición a arsenito en células cancerígenas de vejiga humana se incrementan los niveles de AQP3 (Naranmandura *et al.*, 2009). De las 13 AQPs conocidas en los mamíferos, ocho se expresan en el riñón: AQP 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 11. Estas isoformas se expresan diferencialmente a lo largo de los túbulos renales (Figura 3) y la AQP3 la encontramos mayormente expresada en el túbulo complejo distal (Matsuzaki *et al.*, 2017).

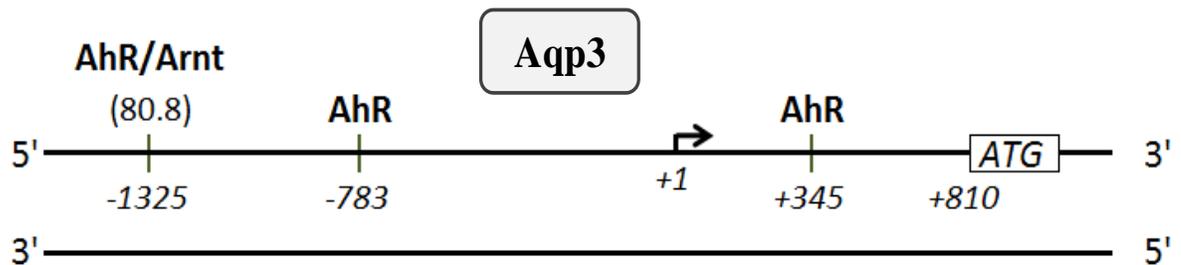


**Figura 4.** Dibujo esquemático de la distribución de Acuoporinas (AQPs) en el riñón. Cápsula Bowman (BC). Túbulo contorneado proximal (PCT), túbulo recto proximal (PST), rama fina descendente del bucle de Henle (tDL), rama fina ascendente del bucle de Henle (tAL), rama ascendente gruesa de del bucle de Henle (TAL), túbulo complejo distal (DCT), túbulo conector (CNT), conducto colector cortical (CCD), conducto colector medular externo (OMCD) y conducto colector medular interno (IMCD) (Adaptado de Matsuzaki *et al.*, 2017).

### 1.3.1 Regulación de AQP3 por AhR

Como se mencionó, los transportadores de As y en específico de AQP3 se expresa en diversos tipos celulares, dentro de ellos en las células del tejido renal. La regulación de su expresión se asocia con la activación de varios factores de transcripción dentro de los que destaca el Factor Eritroide Nuclear tipo 2 (Nrf2) (Zhao *et al.*, 2013) sin embargo, un análisis *in silico* de las regiones promotoras de AQP3 con base en la bibliografía reportada, utilizando las secuencias seleccionadas mediante el programa SequenceViewer del Centro Nacional para

la Información Biotecnológica (NCBI), muestra que existen secuencias de unión a xenobióticos (XRE; GCGTG) en los promotores de estos genes (TFSEARCH, versión 1.3, score 80) (Yutaka, 1998) (Figura 4). Lo anterior indica la posibilidad de que los factores transcripcionales que se unen a XRE, como AhR, puedan regular la transcripción de esta proteína.



**Figura 5.** Secuencia promotora del transportador AQP3 identificando la posición de los elementos de respuesta XRE (GCGTG) respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1) así como el umbral de puntuación.

## **1.4 Justificación**

El As es un metaloide ubicuo que tiende a acumularse en los tejidos, el ingreso de este compuesto a las células es por medio de proteínas transportadoras, tal como AQP3, la cual se ha demostrado que incrementa su expresión ante la exposición a NaAsO<sub>2</sub>. Las células de túbulo distal expresan abundantemente AQP3 en el riñón, órgano que almacena a su vez la mayor cantidad de metabolitos arsenicales. Existen antecedentes que indican que el NaAsO<sub>2</sub> puede inducir indirectamente la translocación nuclear del AhR y adicionalmente en la región promotora de AQP3 existen XRE's que podrían mediar su unión con este receptor.

## **1.5 Hipótesis**

La exposición a NaAsO<sub>2</sub> induce la expresión de AQP3 de forma dependiente del AhR en un cultivo primario de células renales.

## **1.6 Objetivos**

### **1.6.1 Objetivo General**

Determinar los niveles de AQP3 en un cultivo primario de células renales expuestas a NaAsO<sub>2</sub> y su dependencia del AhR

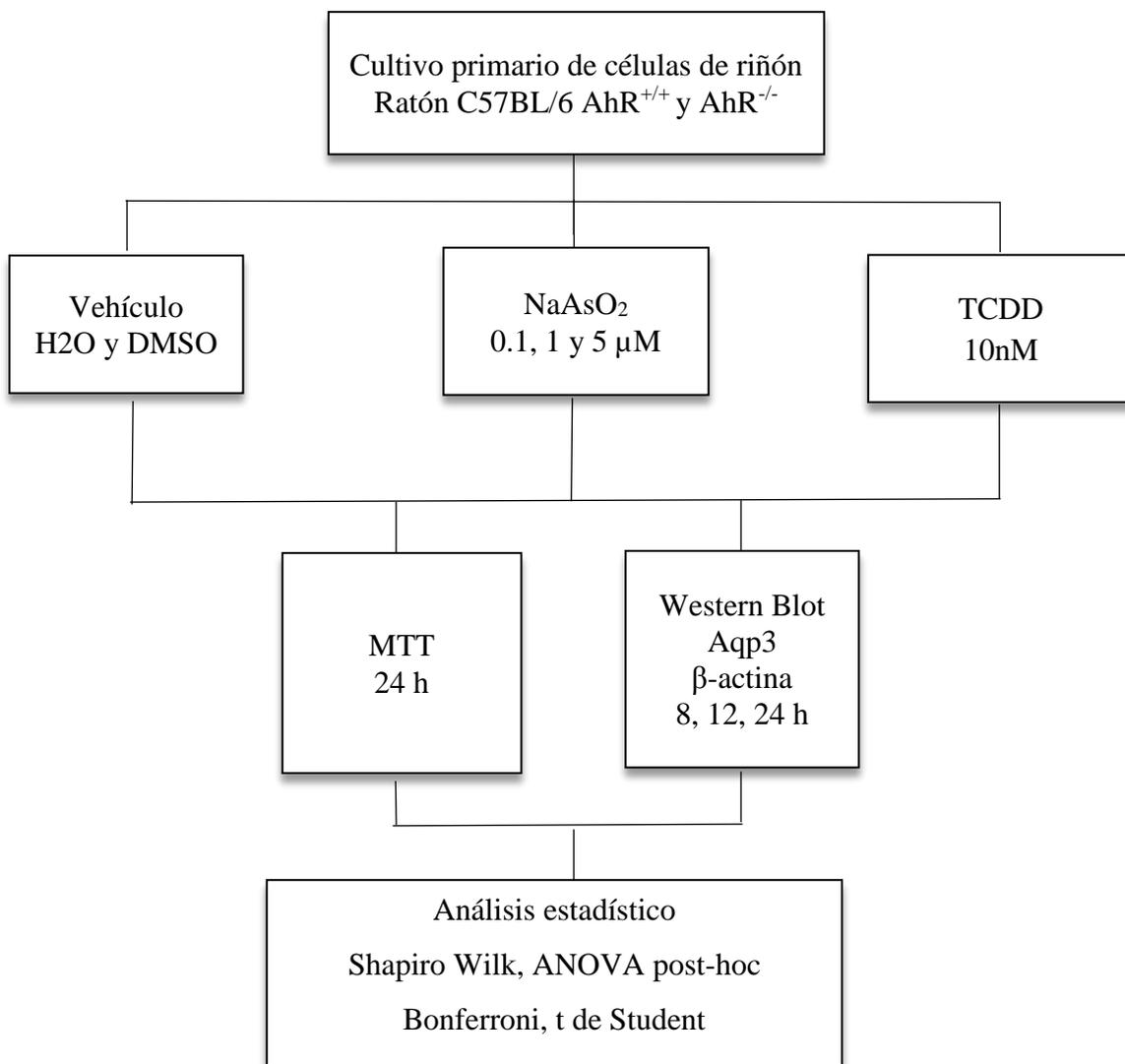
### **1.6.2 Objetivos Particulares**

1.9.2.1 Establecer si la activación directa con TCDD incrementa los niveles de AQP3 en cultivo primario de células renales provenientes de ratones WT y KO de AhR

1.9.2.2 Determinar si la activación indirecta con NaAsO<sub>2</sub> incrementa los niveles de AQP3 dependiente de la presencia de AhR.

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Estrategia Experimental



### 2.2 Soluciones y Reactivos

#### 2.2.1 Medio de cultivo DMEM complementado

Se adicionó al medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Invitrogen) 10% de suero fetal bovino (SFB, Invitrogen) inactivado por calor (incubado 30 min a 56° C) y se guardó a 4° C protegido de la luz.

### **2.2.2 Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 10X**

Se preparó en agua bidestilada y desionizada una solución conteniendo 1.37 M de cloruro de sodio (NaCl), 27 mM de cloruro de potasio (KCl), 100 mM de fosfato de sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) y 17.6 mM de fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y se ajustó el pH a 7.4.

### **2.2.3 Solución salina Krebs- Bicarbonato (KB)**

Se preparó en agua bidestilada y desionizada una solución que contenía 110 mM de cloruro de sodio (NaCl), 3 mM de cloruro de potasio (KCl), 1.2 mM de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), 0.7 mM de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>), 2 mM de fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 25 mM de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), 10 mM de acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COONa), 5.5mM de D-glucosa, 5 mM de Alanina y 0.5 g/l de Albúmina, se ajustó el pH a 7.4. (La solución se oxigena durante 30 minutos, previo a su utilización)

### **2.2.4 Solución de colagenasa**

A 9.5 ml de sol KB se le agregaron 0.015 g de colagenasa y 0.5 ml de solución de albúmina sérica bovina al 10%

### **2.2.5 Agua libre de nucleasas (agua-DEPC)**

Se adicionó 0.1% de dietilpirocarbonato (DEPC) a agua bidestilada y desionizada y se dejó en agitación, posteriormente se inactivó el DEPC esterilizando la solución.

### **2.2.6 Amortiguador de lisis (RIPA)**

A 0.25 ml de TRIS-HCl, pH 7.6, 1 M, se agregarán 1.5 ml de NaCl 1M; 4 µl de EDTA, pH 8, 0.5 M; 0.05 ml de DTT 0.1 M; 0.1 ml de Tritón X-100, Complete mini (1 pastilla), y 8 ml de agua MiliQ. Se almacenará a 4° C.

### **2.2.7 TBS-Tween**

Se pesaron 30.29 g de TRIS base, 43.83 g de NaCl, y se aforaron a 1 L con agua MiliQ. Se adicionó 1 mL de Tween 20 (Bio-Rad) y se homogenizó con agitación en parrilla eléctrica.

### **2.2.8 Amortiguador de carga 5 X**

A 2 ml de TRIS-HCl, pH 6.8, 1.5 M, se agregó 1 g de SDS; 5 ml de glicerol; y 0.05 g de azul de bromofenol y se almacenó en tubos eppendorf de 1.5 ml a -20° C. Previo a su uso, se agregaron 0.25 ml de β-mercaptoetanol por cada 1 ml de volumen.

### 2.2.9 TBS-Tween

Se pesaron 30.29 g de TRIS base y 43.83 g de NaCl, se aforaron a 1 l con agua MiliQ y se adicionó 1 ml de Tween 20 (Bio-Rad)

### 2.2.10 Solución de bloqueo

Se pesaron 2.5 g de leche descremada en polvo (Nestlé), 0.25 g de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich), y se solubilizaron con 50 mL con TBS-T.

### 2.2.11 Amortiguador de Transferencia 10x

Se pesaron 30.2 g de TRIS base, 144.2 g de glicina y se aforó a 1 L con agua MiliQ se homogenizó y se ajustó el pH a 8.3

### 2.2.12 Amortiguador de corrida 10x

Se pesaron 30.29 g de TRIS base, 144 g de Glicina, 10 g de SDS y se solubilizaron en 1 l de agua MiliQ, se homogenizó y se ajustó el pH a 8.6

## 2.3 Animales de experimentación

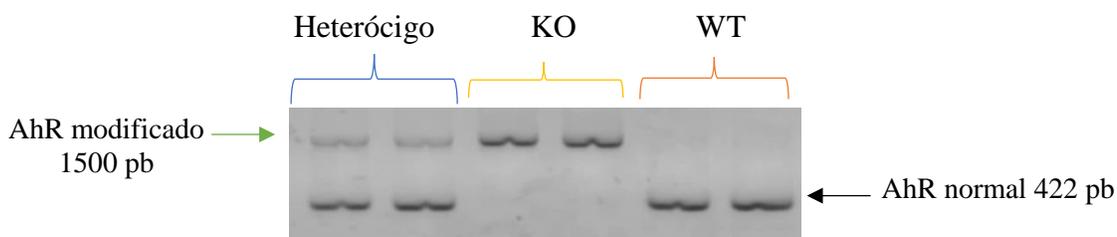
Se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6 WT y KO del gen *Ahr* de entre 6 y 10 semanas de edad (Fernandez-Salguero et al., 1995). En el modelo KO el dominio bHLH del gen AHR murino se interrumpió mediante la inserción de un casete del gen de la fosforribosiltransferasa II, el cual codifica una proteína bacteriana que media la resistencia a la toxina de células eucariotas G418 basada en neomicina. Esto se usa tradicionalmente como marcador de selección positiva en células madre embrionarias pluripotentes para generar ratones KO. Los ratones AHR KO no expresan los genes diana típicos de AHR, tales como CYP1A1 y CYP1A2 cuando se inducen con la administración de TCDD (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995).

Los ratones que se utilizaron eran clínicamente sanos, nacidos y criados en la Unidad de Producción de Pequeños Roedores 1 (UP-1) de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL-Cinvestav). Se mantuvieron en condiciones de barrera (sistema ventilado de alta densidad) con macroambiente filtrado al 95% de eficiencia y 0.5 micras, controlado a una temperatura de 19-23° C, humedad relativa de 40-70% y entre 15-18 vca/h, control luz-oscuridad 12:12 h, iluminación de 280-350 luxes a 1 m del piso y ruido <85 db. Los ratones se alimentaron *ad libitum* con la fórmula LabDiet 5258 esterilizada por

radiación. El agua de bebida se proporcionó *ad libitum* ozonizada y filtrada en columnas de carbón activado. En todo momento se siguieron las normas establecidas en la NOM-062-ZOO-1999.

#### 2.4 Genotipificación de Animales

Para identificar los ratones KO y WT, se realizó PCR punto final. Se cortaron de 4 a 6 mm de la cola de cada ratón, se colocaron en 500  $\mu$ l de solución de Lisis y se agregaron 20  $\mu$ l de un stock de 20 mg/ml de proteinasa K. Las muestras se incubaron en baño maria a 55°C durante 24 h y posteriormente se agitaron de forma manual antes de centrifugarse a 12,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se depositó en tubos nuevos previamente etiquetados, se les añadió 500 $\mu$ l de isopropanol frío y se agitó manualmente hasta visualizar el filamento de DNA. Se centrifugó 10 segundos a 6000 rpm para obtener la pastilla de DNA y eliminar el sobrenadante. Se adicionó 1 ml de etanol al 75% y se agitó por inversión para lavar la pastilla, posteriormente se centrifugó durante 5 min a 12,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet 20 min hasta eliminar totalmente el etanol. La pastilla se resuspendió en 150  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O- DEPC estéril (Laird et al., 1991). Se adicionaron por tubo 13  $\mu$ l de solución de reacción (buffer 10x, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, dNTP's 5 mM, F-primer, R-primer, Tag- Ramirez, betaína, agua, 2  $\mu$ l cDNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) (Volumen total= 15  $\mu$ l) se realizó la PCR para el total de reacciones bajo las siguientes condiciones: 94°-3min, /94°-1 min, 60°-1 min, 72°-2.30 min, 30 ciclos/ 72°-10 min y 4° indefinido. Una vez que salieron las muestras se les agregaron 2  $\mu$ l de solución de carga, se mezcló bien y se colocaron 15  $\mu$ l de muestra por pozo en un gel de agarosa al 1% teñido con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio. El gel se sometió a electroforesis a 80 volts (300-400 miliampers) por aproximadamente.40-50 min. El gel se observó en un equipo de transiluminación UV con fotodocumentador acoplado DigiDoc-it imaging system (Figura 6)



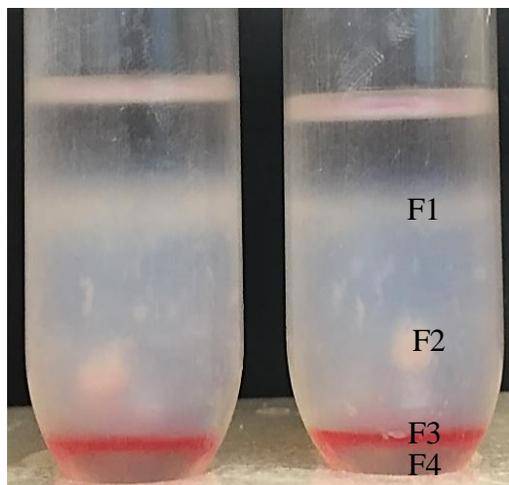
**Figura 6.** Productos de PCR para identificación de ratones KO y WT

## 2.5 Cultivo Primario de células renales

Se anestesió a los ratones por inhalación de isoflurano, posteriormente se realizó una punción cardiaca para retirar el exceso de sangre (así se extraen los riñones más limpiamente). Una vez que se observó ausencia de respuesta a estímulos, los ratones se colocaron en posición dorsal en una charola de disección asegurando sus extremidades, enseguida se les roció el área abdominal con etanol al 70% y se introdujeron en la campana de flujo laminar. Se realizó una incisión en forma de “u” en la piel para exponer la cavidad peritoneal y torácica, se ubicaron los riñones y se retiró la capsula cuidadosamente (los riñones se observan de color brillante y cuando se retira esta membrana transparente se observan de color opaco o mate). Posteriormente se disectó con tijera el tejido conectivo restante. Se colocaron los riñones en 3ml solución KB fría (sobre cama de hielo) y se picaron finamente con una hoja de navaja prensada en pinza quirúrgica.

El picado resultante se depositó en tubos de 50 ml y se lavó tres veces con 20 ml de solución KB fría, entre cada lavado se centrifugó a 1000rpm x 5 min separando el sobrenadante y adicionando de nuevo 20 ml de KB fría. Posteriormente se retiró el sobrenadante y al botón de cada tubo se le adicionaron 10 ml de una solución que contenía: 9.5 ml de sol KB con 0.015g de colagenasa y 0.5 ml de albúmina sérica bovina (fracción V al 10%).

Los tubos se colocaron en baño maría a 37°C y se gasean con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, todo dentro de la campana de flujo laminar. Se añadieron 20 ml de solución de KB fría para detener la reacción de la colagenasa, se filtró la suspensión con una malla de 40 micras y se centrifugó la solución resultante a 1000 rpm durante 5 min, se recuperó el botón y se lavó dos veces con 10 ml de sol KB repitiendo la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. Posteriormente el botón se resuspendió en 2.5 ml de solución de albúmina al 5% y se centrifugó a 1000 rpm durante 1 min. y se descartó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 15 ml de solución de Percoll al 40% (Percoll/KB). Los tubos se centrifugaron a 15,000 rpm en la ultracentrífuga a 4°C durante 30 min. Después del tiempo de centrifugado se observaron 4 bandas a diferente gradiente (Figura 7) se retiró la banda 1 (la de menor densidad) y se colocó en nuevos tubos de 50 ml, separando las muestras de los ratones WT y KO.



**Figura 7.** Fraccionamiento de túbulos por gradiente de Percoll: identificación de 4 bandas

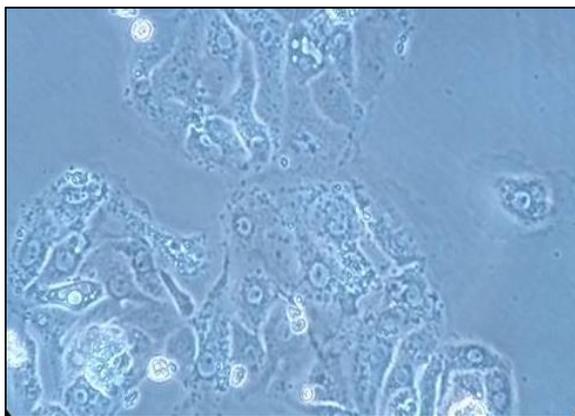
En la banda F1 se encuentran principalmente túbulos distales, la banda F2 es una mezcla de fragmentos de nefrona que incluye glomérulo y túbulos distales, en la banda F3 se encuentran principalmente los eritrocitos y las células mononucleares de sangre periférica. La banda F4 se encuentra enriquecida de túbulos Proximales (Gonzalez-Mariscal et al., 2000).

Seguido a estos pasos, se lavaron las muestras de ambos tubos con 5 ml de PBS centrifugando a 2000 rpm durante 10 min para eliminar los restos de Percoll (Se repitió 3 veces). Los botones se resuspendieron en 10 ml de DMEM suplementado con SFB al 10% libre de antibiótico. Se tomaron 50  $\mu$ l de la suspensión y se homogenizaron con 50  $\mu$ l de azul de tripano diluído 1:5 y posteriormente se colocaron 10  $\mu$ l de la muestra en la Cámara Neubauer, se observó al microscopio y se realizó el conteo de túbulos utilizando los cuatro cuadrantes externos de mayor tamaño y aplicando la siguiente fórmula:

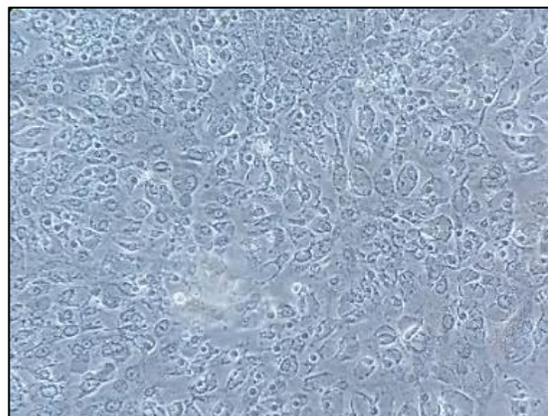
$$\text{Túbulos totales de los 4 cuadrantes} \times 2500 \times 2 = \text{cantidad de túbulos} \times \text{ml}$$

Se realizaron los cálculos y diluciones para obtener 100,000 túbulos x ml y se sembraron en placas de 6 pozos. Las placas se colocaron en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°. Después de 3 días se cambió el medio de cultivo realizando previamente dos lavados con PBS 1x estéril a temperatura ambiente y se colocaron nuevamente en la incubadora por 4 días más. Cuando se observó un 50% de confluencia, se realizó la caracterización del cultivo por microscopía, realizando un conteo celular tomando en cuenta 10 campos (20x) e

identificando la presencia de fibroblastos para determinar aproximadamente el porcentaje total de estos mismos por cada pozo. Finalmente, después de 7 días (cuando se observó una confluencia celular mayor al 80%) se trataron las células.



**Figura 8.** Células renales a 3 días de cultivo, 40x.



**Figura 9.** Células renales a 7 días de cultivo, 20x.

### 2.5.1 Caracterización Microscópica de Cultivo

Para comprobar que nuestro cultivo primario no estaba contaminado con otra estirpe celular, como fibroblastos, se realizó un conteo en microscopio (40x) de 10 cuadrantes aleatorios por pozo, identificando las principales características celulares. Las células del túbulo distal se pueden diferenciar en dos tipos: células principales y células intercalares o intercaladas. Las células principales tienen núcleos ovales en posición central, unas cuantas pequeñas mitocondrias y escasas microvellosidades cortas, sus membranas basales ponen en manifiesto varios repliegues. Las células intercaladas tienen varias vesículas apicales, micropliegues sobre su membrana plasmática apical y abundancia de mitocondrias; no es inusual encontrar su citoplasma ocupado por “gotitas” de reabsorción proteica y sus núcleos son redondos de localización central. (Gartner y Hiatt, 1997) Los fibroblastos por otra parte son células heterogéneas de menor tamaño, forma alargada, fusiforme, citoplasma basófilo y un núcleo elíptico que ocupa la mayor parte del interior. Debido a que la técnica se estandarizó para que se obtuviera la mínima cantidad de fibroblastos, el cultivo celular que se analizó está enriquecido en más del 95% con células de túbulo renal.

## **2.6 Tratamientos**

Los tratamientos se prepararon con medio DMEM que contenía SFB al 10% y diferentes concentraciones de NaAsO<sub>2</sub> (0, 0.1, 1 y 5 µM) disuelto en agua desionizada, así como TCDD a una concentración de 10 nM disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) sin superar el 0.05% (v/v) y conservado a -20° C hasta su uso.

## **2.7 Ensayo de viabilidad por reducción metabólica del MTT**

### **2.7.1 Principio**

El ensayo de reducción del tetrazolio, o MTT, se basa en la capacidad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, una sustancia hidrosoluble y de color amarillo, en la sal de tetrazolio (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazán), que es un producto insoluble en agua color morado-azul oscuro. Este método permite determinar la viabilidad celular de manera indirecta a través de la actividad mitocondrial mediante el uso de un espectrofotómetro de microplacas (Freimoser *et al.*, 1999).

### **2.7.1 Procedimiento**

Se colocaron 10,000 túbulos por pozo en placas de 96 pozos y se siguió el mismo procedimiento del cultivo celular, se cambió el medio al tercer día y a los 7 días se expusieron a NaAsO<sub>2</sub> (0.1, 1, y 5.0 µM) así como a TCDD (10 nM). Para determinar los cambios en la viabilidad a las 20 h después de los tratamientos, se agregaron 20 µl/pozo de MTT (5 mg/ml de PBS estéril) y se incubó por 4 h. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se adicionaron 200 µl de DMSO para solubilizar los cristales producidos al reducirse el MTT en azul de formazán. La absorbancia se detectó a una longitud de onda de 492 nm con un filtro de referencia de 620 nm en un espectrofotómetro de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific).

## **2.8 Determinación de mRNA por RT-PCR**

### **2.8.1 Principio**

La reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa es una técnica sensible para la detección y cuantificación de ARNm. Este método se basa en la actividad de transcripción

reversa de las polimerasas virales que sintetizan ADN complementario (ADNc) a partir del ARN. Posteriormente, el uso de una polimerasa de ADN termoestable permite generar copias múltiples del templete creado, para esto se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente.

### 2.8.2 Extracción y cuantificación de ARNm

Los tratamientos de los cultivos primarios se suspendieron a las 4, 8 y 12 h, se retiró el medio y las células se lavaron con PBS frío sobre una cama de hielo. Se adicionó 1 ml de TRIzol (Invitrogen) por pozo y con ayuda del émbolo de una jeringa se lisaron las células. La suspensión se transfirió a un tubo de microcentrífuga, se incubaron 5 min a temperatura ambiente, y se adicionaron 200  $\mu$ l de cloroformo agitando vigorosamente. Se incubó la mezcla por 3 min y se centrifugó a 15,000  $\times$  g por 15 min a 4° C. Se tomó la fase acuosa, se le adicionaron 500  $\mu$ l de isopropanol, y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 15,000  $\times$  g por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el botón de ARN se lavó con 1 ml de etanol al 70% frío (en agua- DEPC). Se agitó la muestra y se centrifugó a 5,800  $\times$  g por 5 min a 4° C. Se retiró el etanol y se dejó secar el botón. El ARN se disolvió en 10  $\mu$ l agua-DEPC estéril. La cuantificación del ARN se llevó a cabo en un espectrofotómetro a 260/280 nm (Biophotometer Eppendorf). (Laird *et al.*, 1991)

### 2.8.3 Síntesis de ADNc

Para sintetizar el ADNc se adicionaron 2 $\mu$ g de RNA de cada muestra a una mezcla de cebadores aleatorios (250 ng/ $\mu$ l, Invitrogen) y se ajustó a un volumen final de 13.5 $\mu$ l con agua-DEPC. La muestra se desnaturalizó incubando por 5 min a 65°C y enfriando en cama de hielo por 2 min. Se adicionaron 4  $\mu$ l de amortiguador para primera hebra 5x [250 nM HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>], 1  $\mu$ l de DL-ditiotreitol (DTT, 0.1 M) y 0.5  $\mu$ l de SuperScript III RT (200 U/ $\mu$ l, Invitrogen, 18080-044) y 1 $\mu$ l de dNTPs 10mM (Applied Biosystems). La mezcla de reacción final se incubó a 50°C por 40 min y finalmente se enfrió a 4° C, almacenando el ADNc a -20°C.

#### 2.8.4 Validación de actividad del AhR en cultivos celulares por RT-PCR

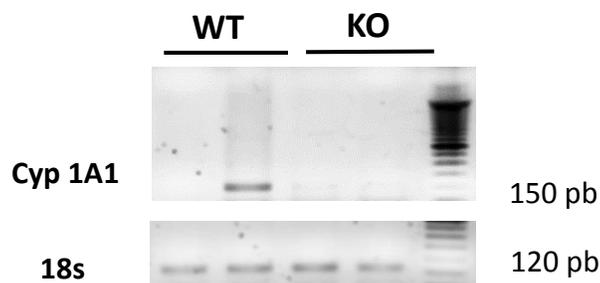
Para confirmar que las células renales en cultivo aún expresaran un AhR funcional, se determinó la inducción de su gen blanco *Cyp1a1* a través de RT-PCR en los cultivos primarios de células renales tratados con TCDD 10 nM por 12 h, utilizando como control negativo al vehículo (DMSO 0.35%). Se realizó RT-PCR bajo las siguientes condiciones: 94°-3 min, /94°-40s, 60°-30s, 72°-30s/ 35 ciclos 72°-10 min, 4° indefinido.

**Tabla 3.** Primers empleados para PCR

Gen	#oligo	Secuencia (5'-3')
18s FW	3015878325-000010	GGACAGGATTGACAGATTGATAG
18s RV	3015878325-000020	CTCGTTCGTTATCGGATTAAC
CYP 1A1 FW	3015878325-000030	GTGTCAAACCCAGCTCCAAAG
CYP 1A1 RV	3015878325-000040	GACATTTGAGAAGGGCCACATC

(Invitrogen)

Observamos que se induce la expresión de ARNm de *Cyp1a1* en las células provenientes de ratones WT, mientras que en los cultivos de ratones KO no se percibió incremento en la expresión, (Figura10) indicando que la proteína del AhR en las células renales KO no es funcional como factor de transcripción.



**Figura 10.** Expresión de *cyp1a1* en cultivos celulares WT y KO de *AhR*. Los cultivos primarios de células renales se expusieron a TCDD 10 nM por 12 h. La expresión de *Cyp1a1* se determinó por RT-PCR, se utilizó ARNm18s como control de carga. (n=2).

## **2.9 Determinación de proteínas por Western blot**

### **2.9.1 Principio**

El western blot es una técnica analítica empleada para aislar proteínas a partir de una mezcla compleja. Las proteínas de la mezcla se separan con base en su peso molecular y carga eléctrica mientras migran a través de un gel sobre el cual se hace pasar una corriente eléctrica. Las proteínas se transfieren desde el gel a una membrana en donde se marcan con anticuerpos primarios específicos que se unen a las proteínas que se desean detectar. Posteriormente se adiciona un anticuerpo secundario que reconoce una región concreta del anticuerpo primario y está marcado, comúnmente con peroxidasa de rábano (HRP) que reaccionará y cambiará de color para poder visualizar las bandas de proteínas. (Mahmood, *et al.*, 2012).

### **2.9.2 Procedimiento**

#### ***Extracción y Cuantificación de proteína***

A los cultivos celulares se les retiró el sobrenadante al término del tiempo de exposición, en seguida se adicionó amortiguador de lisis RIPA (70  $\mu$ l x pozo) y se colectó el sobrenadante con un raspador celular, posteriormente se realizó un lisado mecánico de las células con vortex durante 30 min, y se realizó un proceso de sonicado al 40% durante 1 minuto. La cantidad de proteínas se determinó por el método de Bradford, interpolando los valores en una curva estándar preparada a partir de albúmina de suero bovino y se determinaron las absorbancias a 595 nm.

#### ***Electroforesis e incubación con anticuerpos***

Se preparó un gel separador al 10% de acrilamida y un gel concentrador, las muestras se prepararon con amortiguador de carga 5x y se hirvieron durante 5 min, a continuación, se cargaron las muestras preparadas dentro de los pozos del gel, en la minicámara de electroforesis, conteniendo amortiguador de corrida. Se aplicó un voltaje de 80 V, durante 3.5 horas aproximadamente. Se transfirieron los blots del gel hacia la membrana de nitrocelulosa aplicando electroforesis a 40 mA durante 12 horas. Las membranas se tiñeron con solución de rojo Ponceau durante 5 minutos para comprobar la transferencia. Se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 1x y posteriormente se incubó la membrana con solución de bloqueo durante 4 horas con agitación constante. Se lavó 2 veces por 5 minutos con TBS 1x y se incubó con solución de anticuerpo primario, anti-AQP3(conejo/ invitrogen) y anti- $\beta$ actina (ratón IgG1/(Santacruz Biotechnology), durante toda la noche. Se lavó 4 veces

con TBS-Tween 1x y se incubó con solución de anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP) anti-conejo y anti-ratón, respectivamente, durante 2 horas.

### ***Revelado y cuantificación***

Se revelaron los blots incubando la membrana con un reactivo quimioluminiscente basado en luminol (Clarity Biorad) y revelando en un hiperfilm (Carestream Medical X-ray Blue/MXB Film). Finalmente se cuantificaron los blots revelados por densitometría empleando el programa Image J.

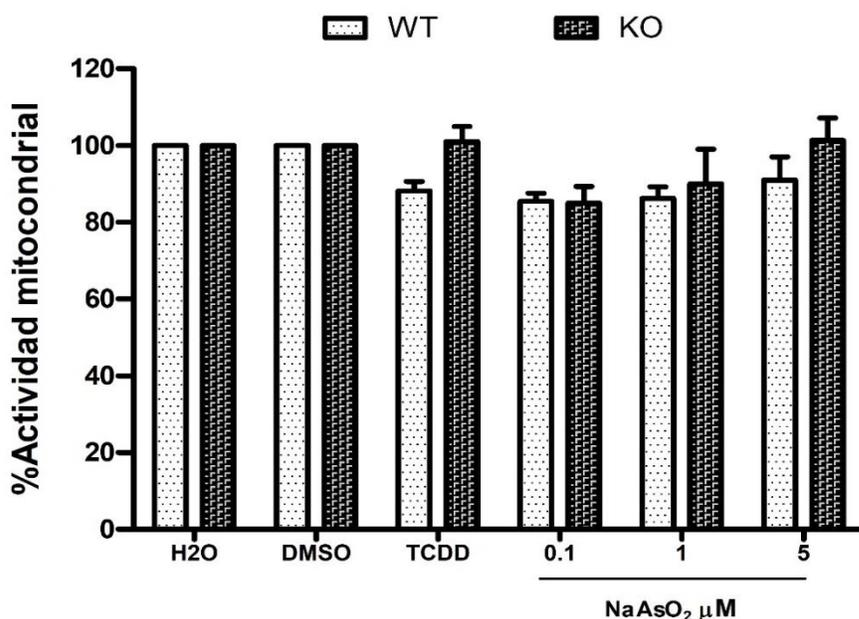
### **2.10 Análisis estadístico**

Los datos se muestran como promedios  $\pm$  desviación estándar (DE). Se evaluó la normalidad de los resultados con la prueba de Shapiro-Wilk y determinamos la significancia estadística de los datos mediante ANOVA, un análisis *post-hoc* Bonferroni y t de Student. Se consideró como significativo un valor de  $p < 0.05$  en todos los casos.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Efecto del NaAsO<sub>2</sub> y del TCDD en la viabilidad celular

Con el fin de establecer que las concentraciones que se utilizarán, tanto de NaAsO<sub>2</sub> como de TCDD no sean citotóxicas, realizamos el ensayo de viabilidad celular, por el método de reducción de sales de formazán (MTT) en cultivos primarios de células renales de ratones WT y KO del AhR expuestas por 24 h a NaAsO<sub>2</sub> (0.1, 1 y 5  $\mu$ M) y TCDD (10 nM). No se observó una disminución de la actividad mitocondrial significativa en los tratamientos con TCDD y NaAsO<sub>2</sub> con respecto a los vehículos control (Figura 11). Por lo que se decidió utilizar dichas concentraciones en el resto del trabajo.

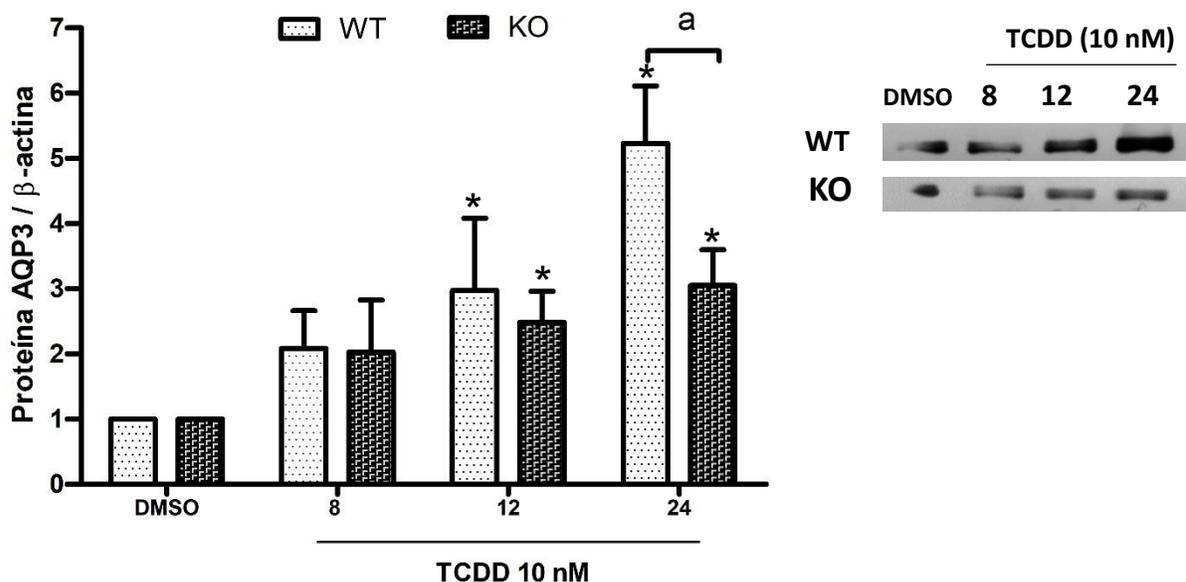


**Figura 11.** Viabilidad de cultivos primarios de células renales de ratones WT y KO del AhR tratados con TCDD 10 nM, y NaAsO<sub>2</sub> 0.1, 1, 5  $\mu$ M. Ensayo de MTT a 24 h. Media  $\pm$  DE (n=3). ANOVA *post-hoc* Bonferroni \* $p$ <0.05 NaAsO<sub>2</sub> vs H<sub>2</sub>O. t de Student # $p$ <0.05 TCDD vs DMSO.

#### 3.3 Efecto de la activación directa del AhR sobre la expresión de AQP3

Una vez que se determinaron las concentraciones de los tratamientos que se utilizarían, decidimos determinar si la activación directa del AhR por el TCDD induce la expresión de AQP3. Se cuantificó los niveles de proteína ante la presencia y activación del AhR en las células renales de ratones WT y KO con y sin tratamiento de TCDD 10 nM a 8, 12 y 24 h.

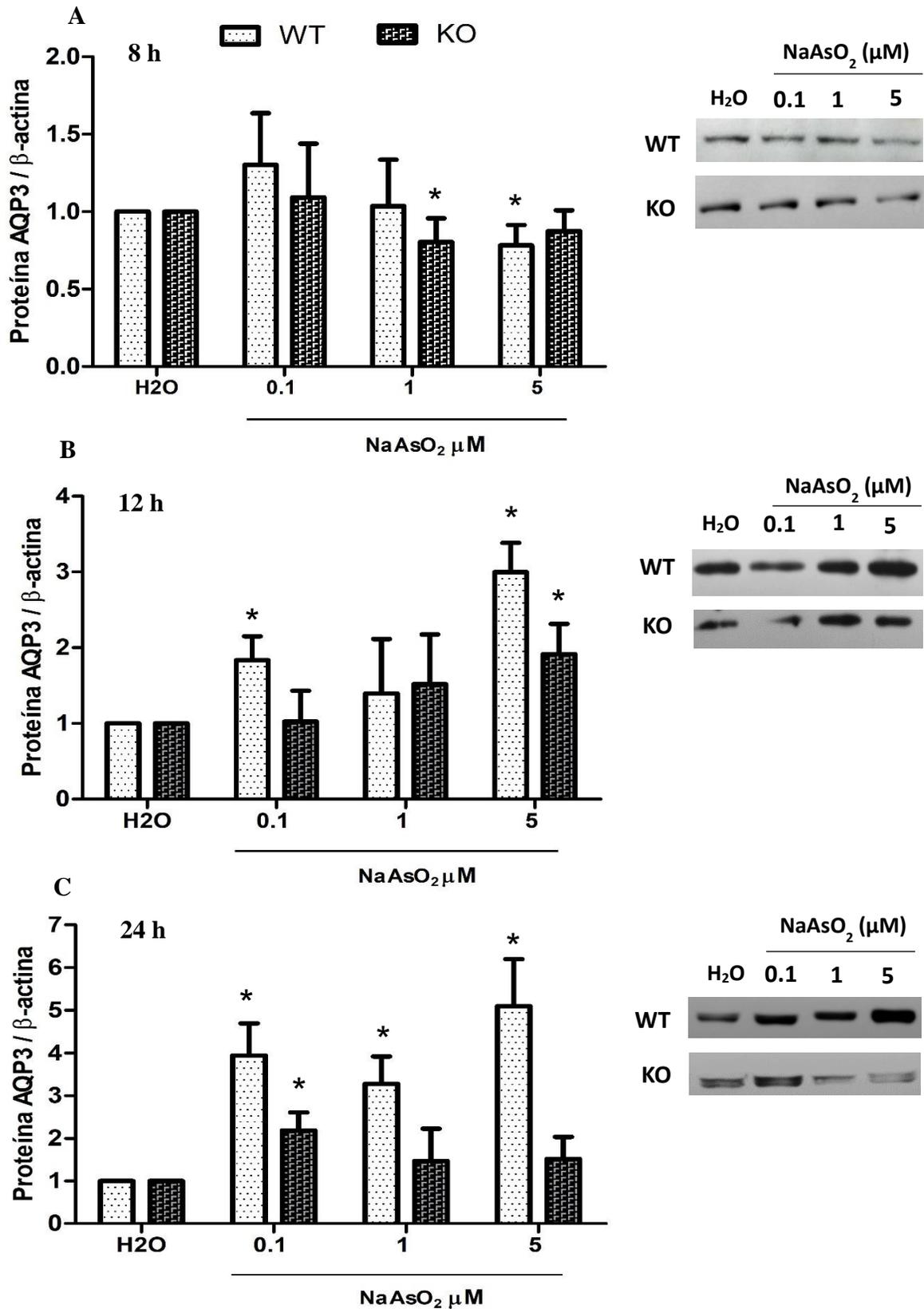
Observamos que la expresión de AQP3 se incrementó hasta 4 veces de forma significativa con respecto al control a 12 y 24 h y se observan características cinéticas de tiempo-respuesta ( $p < 0.0001$ ). Sin embargo, también se observó un incremento gradual de hasta dos veces en comparación con el control en las células KO a las 24 h (Figura 12) Esto nos sugiere que, aunque activar el AhR induce la expresión de AQP3, pueden existir mecanismos de incremento en la proteína relacionados con la exposición al TCDD (efectos no genómicos).



**Figura 12.** Efecto de la activación directa del AhR en la expresión de AQP3 en células renales WT y KO del AhR tratados con TCDD 10 nM por 8, 12 y 24 h. Media  $\pm$  DE (n=4), ANOVA *post-hoc* Bonferroni \* $p < 0.05$  TCDD vs. Control. <sup>a</sup> $p < 0.05$  WT vs KO.

### 3.4 Efecto de la activación indirecta con NaAsO<sub>2</sub> sobre la expresión de la AQP3

Posteriormente evaluamos el efecto del NaAsO<sub>2</sub> a 0.1, 1 y 5  $\mu$ M sobre la expresión de la AQP3 a 8, 12 y 24 h de tratamiento y se observó que a las 8 h a la concentración de 0.1  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> no existen cambios significativos con respecto al control, sin embargo, se observó una disminución en la expresión de proteína a la concentración de 5  $\mu$ M en las células renales provenientes de ratón WT, así como también a 1  $\mu$ M en las células renales KO. Por otra parte, a las 12 h de tratamiento con las mismas concentraciones de NaAsO<sub>2</sub>, observamos un incremento significativo en la expresión de AQP3 en las células WT tratadas con 0.1 y 5  $\mu$ M mientras que en las KO se observó un incremento significativo únicamente con la concentración de 5  $\mu$ M (Figura 13).



**Figura 13.** Efecto de la activación indirecta del AhR sobre la expresión de la AQP3 en cultivo primario de células renales WT y KO del AhR tratados con NaAsO<sub>2</sub> 0.1, 1 y 5  $\mu$ M por 8 (A)

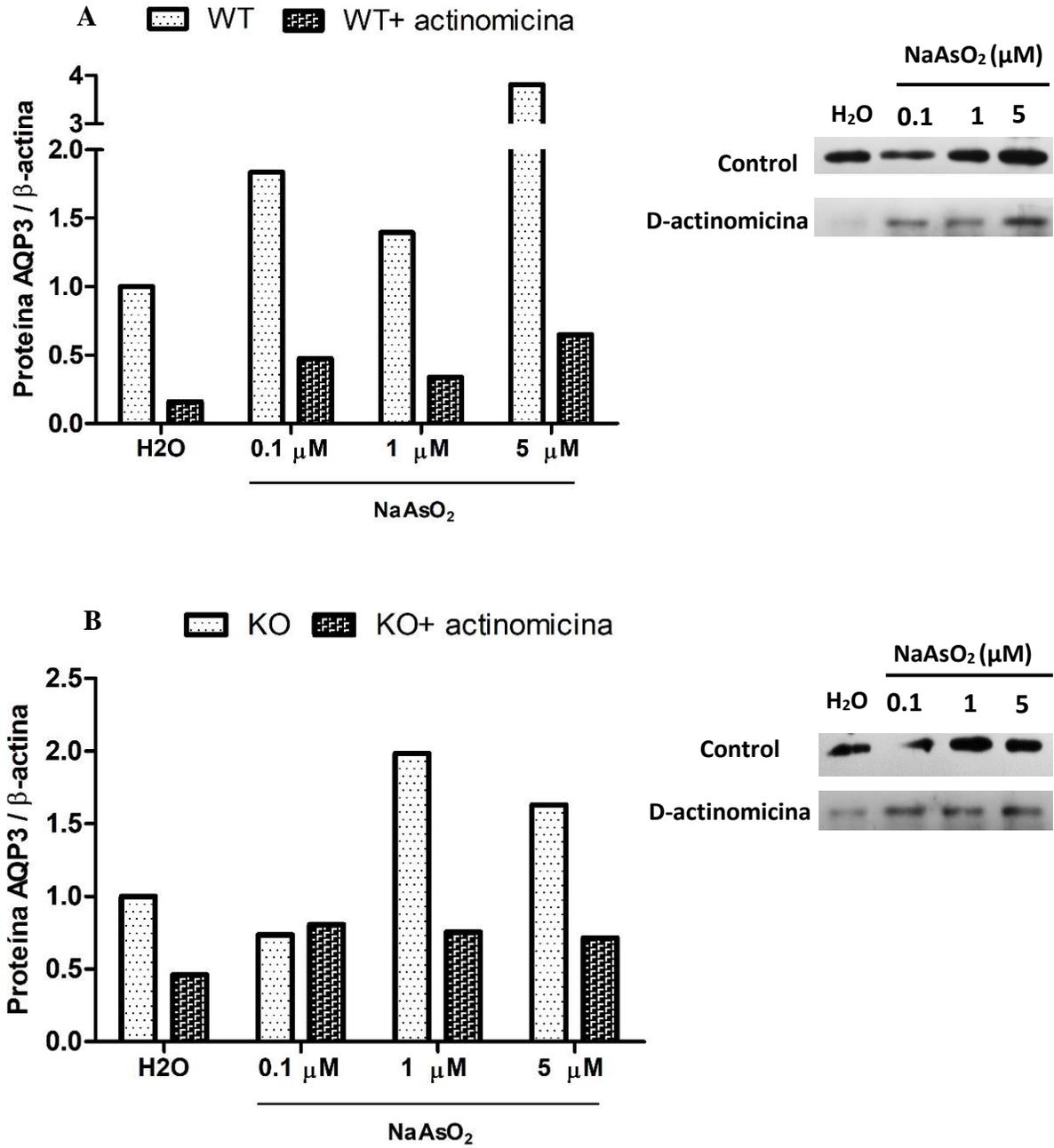
12 (B) y 24 h (C) Media  $\pm$  DE (n=4), ANOVA *post-hoc* Bonferroni \* $p < 0.05$  NaAsO<sub>2</sub> vs. control.

A las 24 h de tratamiento con NaAsO<sub>2</sub> se observó un incremento significativo de AQP3 mayor a 4 veces con respecto al control con las concentraciones de 0.1, 1 y 5  $\mu$ M en las células WT, mientras que en las células KO únicamente se incrementa la expresión de AQP3 de forma significativa con el tratamiento a 0.1 (Figura 13). Estos resultados indican que sí existe un efecto inductor mediado por la activación indirecta del AhR, sin embargo, el AhR no es imprescindible para la modulación de AQP3. Los resultados también sugieren que puede existir otro mecanismo de inducción de la expresión de AQP3 o que el fenómeno que observamos puede deberse a estabilización de las proteínas o ARNm en asociación con un aumento en la vida media de estos.

### **3.4 Efecto de la inhibición de la transcripción sobre la expresión de AQP3 en células renales WT y KO del AhR expuestas a NaAsO<sub>2</sub>**

Para identificar si el efecto inductor de AQP3 era dependiente de su transcripción, los cultivos celulares se trataron previamente por 30 min con D-actinomicina a una concentración de 0.04  $\mu$ g/ml y posteriormente se agregaron simultáneamente con la D-actinomicina los tratamientos con NaAsO<sub>2</sub> 0.1, 1 y 5  $\mu$ M durante 12 h. La D-actinomicina es un antibiótico cíclico que contiene un polipéptido que se une al ADN e inhibe la síntesis de ARN, esto lo logra al interferir con el alargamiento de las cadenas de ARN creciente por la enzima ARN polimerasa, para esto el sistema de anillo de fenoxasona en actinomicina se intercala entre pares de bases adyacentes, mientras que las cadenas de pentapéptidos se encuentran en el surco estrecho de la hélice B y forman enlaces con residuos de guanina en las cadenas opuestas. (Sobell H. 1985)

Nuestros resultados demostraron que en las células que fueron tratadas con D-actinomicina disminuye significativamente los niveles de AQP3, tanto en las células WT como en las KO (Figura 14) Estos resultados nos muestran que el principal incremento de AQP3 es dependiente de la transcripción, sin embargo, igualmente se aprecia un aumento en los niveles de proteína con respecto al control con D-actinomicina libre de NaAsO<sub>2</sub>, lo que significa que podría darse otro fenómeno en donde la exposición a As podría estar afectando la vida media de la proteína.



**Figura 14.** Efecto de la inhibición de la transcripción sobre la expresión de Aqp3 en cultivos de células renales de ratones WT tratados con NaAsO<sub>2</sub> 0.1, 1 y 5 μM y D-actinomicina 0.04 μg/ml a 12 h (n=1).

## 4 DISCUSIÓN

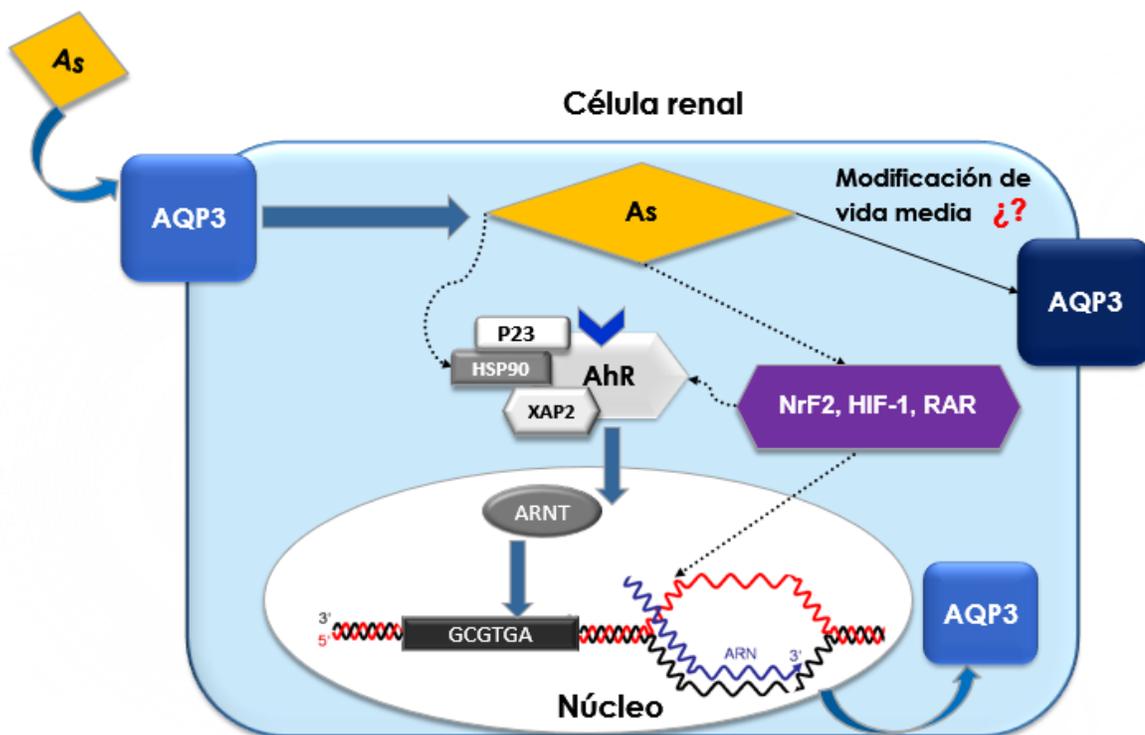
Debido a que en la literatura se reporta que la exposición a As puede modular los niveles de proteínas transportadoras de xenobióticos y que existen datos que indican que la exposición a As puede intervenir en las funciones del AhR, fue de nuestro interés estudiar si la inducción de proteica de AQP3 (transportador que ingresa As en las células), puede deberse a la exposición a  $\text{NaAsO}_2$  de manera dependiente de la actividad del factor de transcripción AhR. Nuestros resultados muestran que efectivamente el AhR participa en la modulación de los niveles proteicos AQP3 cuando se le activa de forma directa con TCDD, sin embargo, en las células KO de AhR también se observa una inducción de la proteína en función del tiempo, lo que sugiere que pueden existir otros mecanismos moleculares que de forma minoritaria participen en su modulación inducidos por la dioxina, de la cuál hasta el momento se desconoce si es capaz de interactuar directamente con otros factores transcripcionales u otras vías de señalización vinculadas a la modulación de AQP3. A estos efectos se les denomina efectos no genómicos del TCDD, existen reportes de Lu y colaboradores, que indican que el TCDD en ratones *Nrf2*-null incrementa los marcadores de estrés oxidante, lo cual quiere decir que el TCDD produce especies reactivas de oxígeno (ROS) capaces de favorecer cascadas de señalización que indirectamente activen a *Nrf2*, factor de transcripción asociado a la modulación de AQP3.

Por otra parte, observamos que el  $\text{NaAsO}_2$  sin ser un ligando del AhR también es capaz de incrementar la expresión de AQP3 a partir de 12 h de exposición en las células renales, a este respecto, Anwar-Mohamed y colaboradores demostraron que las especies arsenicales son inductoras de la vía AhR/XRE al incrementar los niveles del *Cyp1a1* en células HepG2 expuestas directamente a 5  $\mu\text{M}$  de estos metabolitos (Anwar-Mohamed *et al.*, 2014). Sin embargo, nuestros resultados evidencian que el efecto inductivo de AQP3 por el As no es totalmente dependiente de la activación del AhR por lo tanto, otros factores intermediarios podrían estar participando en la modulación de esta proteína, ya que aunque el As no es considerado ligando directo de ningún factor transcripcional, sí se sabe que también puede promover la disrupción de señales de transducción a través la producción de ROS (Kumagai y Sumi, 2007), y así mismo interactuar directamente con moléculas chaperonas al modificar la unión a grupos tioles reactivos.(Khalil *et al.*, 2006). De hecho, actualmente se sabe que

modificaciones en la proteína chaperona del AhR la HSP90 conlleva a la exhibición de sus señales de localización nuclear y a su consecuente translocación.(Kudo et al., 2018) Otro indicio de que el As puede tener otros mecanismos de acción para incrementar la cantidad de proteína de AQP3 son los resultados de los tratamientos con D-actinomicina que revelan que la inducción de AQP3 no se debe únicamente a un mecanismo dependiente de la transcripción, sino que también podrían estar implicados procesos moleculares que impacten en la vida media de la proteína, y en los cuáles, podría tener una participación el AhR, ya que se reportan antecedentes de que este receptor tiene actividad como ubiquitin ligasa (Ohtake et al., 2009), lo que impacta en las vías de degradación de las proteínas y resulta en un incremento en su vida media. sin embargo, para reforzar estas teorías sería necesario realizar otros experimentos más enfocados hacia estos procesos. Ahora bien, en vista de que AQP3 es un transportador de As el aumento de su expresión conllevaría a una acumulación de especies arsenicales en las células renales, haciéndolas más vulnerables a sus efectos tóxicos, sin embargo, con la concentraciones que evaluamos en este estudio, la regulación observada en AQP3 no contribuyó a una disminución significativa en la viabilidad celular que fuera observable mediante los ensayos de MTT, quizás debido a que se requiere una concentración mayor de arsenito para apreciar un efecto citotóxico (Anwar-Mohamed *et al.*, 2013). Una propuesta similar fue expuesta por Sumi y colaboradores en donde discuten que entre los múltiples factores que causaban una mayor retención de As estaba la alta expresión de Aqp3 en ratones C57BL/6 expuestos a 5 mg/kg de arsenito *i.p.* (Sumi *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta los diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos relacionados con AQP3, suponemos que la regulación de esta proteína por el AhR podría ser crítica para las patologías relacionadas con sus ligandos, incluido el cloracné (una enfermedad de la piel muy relacionada con exposición a dioxinas), trastornos metabólicos (debido a su expresión en tejidos adiposos) y cáncer. En particular, se plantea la hipótesis de que AQP3 aumenta el transporte de agua en la proximidad de la membrana celular, lo que permite una remodelación de las protrusiones celulares, que son esenciales para la migración celular (Ji *et al.* 2008). Por otra parte, los fenotipos de cáncer dependen de las características inflamatorias e hipóxicas del tumor que también se han asociado con la expresión de AQP3. Un estudio reciente mostró que AQP3 podría ser importante en la regulación de la inflamación pues AQP3 está regulado transcripcionalmente por la señalización de Notch en queratinocitos. La vía Notch-AQP3

(que implica un ciclo de retroalimentación negativa) desencadena la producción de citocinas proinflamatorias y su desregulación está asociada con el desarrollo de cánceres de piel (Guo *et al.*, 2013). Puesto que es ampliamente conocida la asociación de la exposición a As con el cáncer de piel, es posible que la regulación positiva de AQP3 contribuya a la evolución de esta patología. Por otra parte, se ha sugerido que los efectos derivados de la citotoxicidad causada por el arsenito, al generar estrés oxidativo, dependen de la activación de Nrf2 (He *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2013), y que Nrf2 puede modular la expresión de AQP3. Sabiendo esto, se puede suponer que la regulación del arsenito sobre los transportadores estudiados esté relacionada también con la vía de señalización de Nrf2 de manera conjunta con el AhR. De hecho, actualmente existe evidencia de que las vías de activación del AhR y Nrf2 mantienen una comunicación cruzada, lo que contribuye a integrar la modulación de enzimas de fase I y II facilitando la desintoxicación de xenobióticos (Miao *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2013), por ejemplo, existe un estudio en donde se demuestra que a través de un mecanismo dependiente de la enzima NADPH oxidasa la cual es regulada por Nrf2, se puede activar indirectamente el AhR (Mohammadi-Bardbori, *et al.*, 2015). Adicionalmente se observa que el arsenito es capaz de interactuar con otros factores relacionados directamente con la vía de señalización del ácido retinoico como RAR y del receptor X retinoide (Medina-Díaz *et al.*, 2009), por lo que es posible considerar que esta vía tenga también participación en la regulación que el arsenito produce sobre la AQP3 vinculado con la presencia del AhR. Otro factor de transcripción asociado a la regulación de AQP3 que cumple las características para considerarse como cofactor de su inducción por el As y relacionado a la presencia del AhR, es el factor inducible por hipoxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ). Existen reportes que indican que el arsenito es capaz de activar a HIF- $1\alpha$  a través de la producción de ROS (Li *et al.*, 2014). Este factor puede participar en la regulación As-AhR-Aqp3, ya que HIF- $1\alpha$  se entrecruza con la vía de transcripción del AhR pues requiere de ARNT para llevar a cabo su función transcripcional (Vorrink y Domann 2014). Después de analizar nuestros resultados y de acuerdo con la bibliografía consultada, se representó un modelo de la regulación positiva de AQP3 por exposición a As (Figura 15) en donde se propone que una vez que el As ingresa a la célula mediante proteínas transportadoras este puede activar indirectamente vías de señalización intermediarias que interactúan con el AhR o actuar a través de la producción de ROS sobre el complejo Hsp90-AhR lo que generaría un cambio

en su conformación, provocando su translocación nuclear (Tsuji *et al.*, 2014) una vez en el núcleo puede interactuar con otros factores de transcripción que también inducen la expresión de AQP3. Finalmente, aunque el efecto del As sobre la vida media de AQP3 no se ha descrito, resultaría interesante determinar si la exposición a As incrementa la vida media de algunas proteínas y cuál es su mecanismo de acción.



**Figura 15.** Modelo propuesto de regulación de AQP3 por As.

## 5 CONCLUSIONES

- 5.1 La activación directa del AhR con TCDD incrementa la expresión de AQP3 en células renales de animales WT y en menor medida en células KO.
- 5.2 El NaAsO<sub>2</sub> incrementa de forma significativa la expresión de AQP3 a 12 y 24 h, sin embargo, no es un mecanismo totalmente dependiente de la presencia del AhR pues también existe un incremento en células KO del AhR
- 5.3 Puesto que la inhibición de la transcripción de ARNm no inhibe completamente la inducción de AQP3, es posible que la vida media de la proteína se esté alterando por la exposición a NaAsO<sub>2</sub>.

## 6 PERSPECTIVAS

Al finalizar este estudio y a la luz de nuestros resultados, podemos plantear otros estudios para contribuir al entendimiento del mecanismo de acción del NaAsO<sub>2</sub> sobre la inducción de AQP3 y la participación del AhR en este proceso. De esta manera se plantea:

- 6.1 Evaluar la participación de otros factores de transcripción en los efectos del arsenito sobre la expresión de AQP3, tales como NrF2, RAR y HIF-1 $\alpha$
- 6.2 Hacer ensayos para analizar la vida media de AQP3 ante la exposición a NaAsO<sub>2</sub> y los mecanismos implicados en su posible alteración.
- 6.3 Realizar ensayos de inmunoprecipitación para dilucidar el posible mecanismo indirecto de activación del AhR con NaAsO<sub>2</sub> identificando el papel de las proteínas chaperonas.

## 7 REFERENCIAS

- Anwar-Mohamed, A., Abdelhamid, G., Amara, I. E. A., & El-Kadi, A. O. S. (2012). Differential modulation of aryl hydrocarbon receptor regulated enzymes by arsenite in the kidney, lung, and heart of C57BL/6 mice. *Archives of Toxicology*, 86(6), 897–910. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0855-x>
- Anwar-Mohamed, A., Abdelhamid, G., Amara, I. E. A., & El-Kadi, A. O. S. (2013). Differential modulation of cytochrome P450 1a1 by arsenite in vivo and in vitro in C57BL/6 mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 58, 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.012>
- Anwar-Mohamed, A., & El-Kadi, A. O. S. (2009). Sulforaphane induces CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity levels via an AhR-dependent pathway in murine hepatoma Hepa 1c1c7 and human HepG2 cells. *Cancer Letters*, 275(1), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.10.003>
- Anwar-Mohamed, A., Elshenawy, O. H., Soshilov, A. A., Denison, M. S., Chris Le, X., Klotz, L. O., & El-Kadi, A. O. S. (2014). Methylated pentavalent arsenic metabolites are bifunctional inducers, as they induce cytochrome P450 1A1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase through AhR- and Nrf2-dependent mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 67, 171–187. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.810>
- Aposhian, H. V., & Aposhian, M. M. (2006). Arsenic toxicology: Five questions. *Chemical Research in Toxicology*, 19(1), 1–15. <https://doi.org/10.1021/tx050106d>
- ATSDR. (2007). Toxicological Profile for Arsenic. *U.S Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, (August), 24. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2013/286524>
- Bock, K. W., & Köhle, C. (2006). Ah receptor: Dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochemical Pharmacology*, 72(4), 393–404. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.01.017>
- Bui, L. C., Tomkiewicz, C., Pierre, S., Chevallier, A., Barouki, R., & Coumoul, X. (2016). Regulation of Aquaporin 3 Expression by the AhR Pathway Is Critical to Cell Migration. *Toxicological Sciences*, 149(1), 158–166. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv221>
- Chen, Y., Parvez, F., Liu, M., Pesola, G. R., Gamble, M. V., Slavkovich, Ahsan, H. (2011). Association between arsenic exposure from drinking water and proteinuria: Results from the health effects of arsenic longitudinal study. *International Journal of Epidemiology*, 40(3), 828–835. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr022>
- Denison, M. S., Pandini, A., Nagy, S. R., Baldwin, E. P., & Bonati, L. (2002). Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chemico-Biological Interactions*, 141(1–2), 3–24. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00063-7)
- Drobná, Z., Walton, F. S., Paul, D. S., Xing, W., Thomas, D. J., & Stýblo, M. (2010). Metabolism of arsenic in human liver: The role of membrane transporters. *Archives of Toxicology*, 84(1), 3–16. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0499-7>
- Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268(5211):722
- Flora, S. J. S. (2011). Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(2), 257–281. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.0>

- Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, Tuor U (1999) The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and environmental microbiology* 65(8):3727-9
- Gao L, Gao Y, Li X, et al. (2012) Aquaporins mediate the chemoresistance of human melanoma cells to arsenite. *Molecular oncology* 6(1):81-7 doi:10.1016/j.molonc.2011.11.001
- Gonzalez-Mariscal, L., Namorado, M. C., Martin, D., Luna, J., Alarcon, L., Islas, S. Reyes, J. L. (2000). Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney International*, 57(6), 2386–2402. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00098>.
- He X, Chen MG, Lin GX, Ma Q (2006) Arsenic induces NAD(P)H-quinone oxidoreductase I by disrupting the Nrf2 x Keap1 x Cul3 complex and recruiting Nrf2 x Maf to the antioxidant response element enhancer. *The Journal of biological chemistry* 281(33):23620-31 doi:10.1074/jbc.M604120200
- Hong, F., Jin, T., & Zhang, A. (2004). Risk assessment on renal dysfunction caused by co-exposure to arsenic and cadmium using benchmark dose calculation in a Chinese population. *BioMetals*, 17(5), 573–580. <https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000045741.229>
- Jiang T, Huang Z, Chan JY, Zhang DD (2009) Nrf2 protects against As(III)-induced damage in mouse liver and bladder. *Toxicology and applied pharmacology* 240(1):8-14 doi:10.1016/j.taap.2009.06.010
- Kann, S., Huang, M.-Y., Estes, C., Reichard, J. F., Sartor, M. a, Xia, Y., & Puga, A. (2005). Arsenite-induced aryl hydrocarbon receptor nuclear translocation results in additive induction of phase I genes and synergistic induction of phase II genes. *Molecular Pharmacology*, 68(2), 336–346. <https://doi.org/10.1124/mol.105.011841>
- Kenyon EM, Hughes MF, Adair BM, Highfill JH, Crecelius EA, Clewell HJ, Yager JW (2008) Tissue distribution and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites in C57BL6 mice following subchronic exposure to arsenate in drinking water. *Toxicol Appl Pharmacol* 232:448–455
- Khalil S, Luciano J, Chen W, Liu AYC (2006) Dynamic regulation and involvement of the heat shock transcriptional response in arsenic carcinogenesis. *Journal of Cellular Physiology* 207(2):562-569
- Ko, S. K., & Shin, I. (2012). Cardiosulfa Induces Heart Deformation in Zebrafish through the AhR-Mediated, CYP1A-Independent Pathway. *ChemBioChem*, 13(10), 1483–1489. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200177>
- Köhle, C., & Bock, K. W. (2007). Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochemical Pharmacology*, 73(12), 1853–1862. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.01.009>
- Kruse, E., Uehlein, N., & Kaldenhoff, R. (2006). The aquaporins. *Genome Biology*, 7(2), 206. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-2-206>
- Kudo, I., Hosaka, M., Haga, A., Tsuji, N., Nagata, Y., Okada, H., ... Itoh, H. (2018). The regulation mechanisms of AhR by molecular chaperone complex. *Journal of Biochemistry*, 163(3), 223–232. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx074>
- Kumagai, Y., & Sumi, D. (2007). Arsenic: Signal Transduction, Transcription Factor, and Biotransformation Involved in Cellular Response and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 243–262.

- <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105144>
- Laird, P. W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R., & Berns, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research*, *19*(15), 4293. <https://doi.org/10.1093/nar/19.15.4293>
- Liu, Z., Styblo, M., & Rosen, B. P. (2006). Methylarsonous acid transport by aquaglyceroporins. *Environmental Health Perspectives*, *114*(4), 527–531. <https://doi.org/10.1289/ehp.8600>
- Mackowiak, B., & Wang, H. (2016). Mechanisms of xenobiotic receptor activation: Direct vs. indirect. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1859*(9), 1130–1140. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.02.006>
- Mahmood T., Yang P. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci*. 2012 Sep; *4*(9): 429–434.
- Maunsbach AB, Marples D, *et al.*, Aquaporin-1 water channel expression in human kidney. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* *8*(1):1-14 (1997)
- Matsuzaki, T., Yaguchi, T., Shimizu, K., Kita, A., Ishibashi, K., & Takata, K. (2017). The distribution and function of aquaporins in the kidney: resolved and unresolved questions. *Anatomical Science International*, *92*(2), 187–199. <https://doi.org/10.1007/s12565-016-0325-2>
- McDermott, J. R., Jiang, X., Beene, L. C., Rosen, B. P., & Liu, Z. (2010). Pentavalent methylated arsenicals are substrates of human AQP9. *BioMetals*, *23*(1), 119–127. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9273-9>
- Medina-Díaz, I. M., Estrada-Muñiz, E., Reyes-Hernández, O. D., Ramírez, P., Vega, L., & Elizondo, G. (2009). Arsenite and its metabolites, MMAIII and DMAIII, modify CYP3A4, PXR and RXR alpha expression in the small intestine of CYP3A4 transgenic mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *239*(2), 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.11.009>
- Miao, W., Hu, L., Scrivens, P. J., & Batist, G. (2005). Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: Direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(21), 20340–20348. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412081200>
- Mohammadi-Bardbori, A., Vikström Bergander, L., Rannug, U., & Rannug, A. (2015). NADPH Oxidase-Dependent Mechanism Explains How Arsenic and Other Oxidants Can Activate Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling. *Chemical Research in Toxicology*, *28*(12), 2278–2286. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00415>
- Mukhopadhyay, R., Bhattacharjee, H., & Rosen, B. P. (2014). Aquaglyceroporins: Generalized metalloid channels. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1840*(5), 1583–1591. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.021>
- Nandi, D., Patra, R. C., & Swarup, D. (2006). Oxidative stress indices and plasma biochemical parameters during oral exposure to arsenic in rats. *Food and Chemical Toxicology*, *44*(9), 1579–1584. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.04.013>
- Naranmandura, H., Ogra, Y., Iwata, K., Lee, J., Suzuki, K. T., Weinfeld, M., & Le, X. C. (2009). Evidence for toxicity differences between inorganic arsenite and thioarsenicals in human bladder cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *238*(2), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.05.006>
- Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Kato, S. (2007). Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature*, *446*(7135), 562–566.

- <https://doi.org/10.1038/nature05683>
- Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y., & Kato, S. (2009). AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. *Biochemical Pharmacology*, 77(4), 474–484. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.08.034>
- Petruelis, J. R., Kusnadi, A., Ramadoss, P., Hollingshead, B., & Perdew, G. H. (2003). The hsp90 co-chaperone XAP2 alters importin $\alpha$  recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2677–2685. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209331200>
- Sara, K. (2006). Dynamic Regulation and Involvement of the Heat Shock Transcriptional Response in Arsenic Carcinogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 207(1), 12–22. <https://doi.org/10.1002/JCP>
- Sobell, H M (1985) Actinomycin and DNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 5328-31
- Sumi D, Tsurumoto M, Yoshino Y, et al. (2014) High accumulation of arsenic in the esophagus of mice after exposure to arsenite. *Archives of toxicology*:1-8
- Tijet, N., Boutros, P. C., Moffat, I. D., Okey, A. B., & Tuomisto, J. (2006). Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Distinct Dioxin- Dependent and Dioxin-Independent Gene Batteries. *Molecular Pharmacology*, 69(1), 140–153. <https://doi.org/10.1124/mol.105.018705.al>
- Tsuji N, Fukuda K, Nagata Y, et al. (2014) The activation mechanism of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) by molecular chaperone HSP90. *FEBS open bio* 4:796-803
- Vega, L. (2013). Aryl hydrocarbon receptor as a new therapeutic target for cancer and immune disorders. *World Journal of Pharmacology*, 2(4), 107. <https://doi.org/10.5497/wjp.v2.i4.107>
- Verkman, A. S. (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of Cell Science*, 118(15), 3225–3232. <https://doi.org/10.1242/jcs.02519>
- Verkman, A.S., Anderson, M.O., and Papadopoulos, M.C. (2014) Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 259–277.
- Wang L, He X, Szklarz GD, Bi Y, Rojanasakul Y, Ma Q (2013) The aryl hydrocarbon receptor interacts with nuclear factor erythroid 2-related factor 2 to mediate induction of NAD(P)H:quinoneoxidoreductase 1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Archives of biochemistry and biophysics* 537(1):31-8 doi:10.1016/j.abb.2013.06.001
- Wu, J. P., Chang, L. W., Yao, H. T., Chang, H., Tsai, H. T., Tsai, M. H., Lin, P. (2009). Involvement of oxidative stress and activation of aryl hydrocarbon receptor in elevation of CYP1A1 expression and activity in lung cells and tissues by arsenic: an in vitro and in vivo study. *Toxicol Sci*, 107(2), 385–393. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn239>
- Yutaka A (1998) TFSEARCH (Searching Transcription Factor Binding Sites). In. <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html> Accessed Julio 2014
- Zhao, R., Yang, B., Wang, L., Xue, P., Deng, B., Zhang, G., ... Guan, D. (2013). Curcumin protects human keratinocytes against inorganic arsenite-induced acute cytotoxicity through an NRF2-dependent mechanism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/412576>
- Zheng, L., Kuo, C.-C., Fadrowski, J., Agnew, J., Weaver, V. M., & Navas-Acien, A. (2014). Arsenic and Chronic Kidney Disease: A Systematic Review. *Current Environmental Health Reports*, 1(3), 192–207. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0024-x.Arsenic>

## **8 ANEXOS**

### **8.1 Participaciones en congresos:**

#### 8.1.1 Primer Coloquio Interdisciplinario Xenobioticos y Señalización Celular

García Aguilar Ma. Del Rosario, Estrada Muñoz Elizabet, Vega Loyo Libia Participación del Receptor para Hidrocarburos Arilo (AhR) en la Expresión de AQP3 en células Renales Expuestas a Arsenito de Sodio. Realizado del 3 al 5 de Agosto del 2017 en Tequisquiapan, Querétaro, México.

## 8.2 Hoja de Seguridad TCDD

2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-p-DIOXIN		ICSC: 1467	
 <p>2,3,7,8-Tetraclorodibenzo b,e 1,4dioxin 2,3,7,8-TCDD 2,3,7,8-Tetracloro-1,4-dioxin <math>C_{12}H_4Cl_4O_2</math> Masa molecular: 322</p> <p>Nº ICSC 1467 Nº CAS 1746-01-6 Nº RTECS HP3500000 Nº NU 2611</p> 			
TIPOS DE PELIGRO/ EXPOSICION	PELIGROS/ SINTOMAS AGUDOS	PREVENCION	PRIMEROS AUXILIOS/ LUCHA CONTRA INCENDIOS
<b>INCENDIO</b>	En caso de incendio se desprenden humos (o gases) tóxicos e irritantes.		En caso de incendio en el entorno: Polvo, agua pulverizada, espuma, dióxido de carbono.
<b>EXPLOSION</b>			
<b>EXPOSICION</b>		¡EVITAR TODO CONTACTO!	¡CONSULTAR AL MEDICO EN TODOS LOS CASOS!
<b>• INHALACION</b>	Erupción cutánea semejantes a granos (Cloracne). Síntomas no inmediatos (véanse Notas).	Usar controles apropiados en el proceso.	Aire limpio, reposo. Proporcionar asistencia médica.
<b>• PIEL</b>	¡PUEDE ABSORBERSE! (para mayor información, véase Inhalación). Enrojecimiento. Dolor.	Guantes protectores. Traje de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar y lavar la piel con agua y jabón. Proporcionar asistencia médica.
<b>• OJOS</b>	Enrojecimiento. Dolor.	Pantalla facial, o protección ocular combinada con la protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
<b>• INGESTION</b>	(Para mayor información, véase Inhalación).	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo. Lavarse las manos antes de comer.	Dar a beber una papilla de carbón activado y agua. Provocar el vómito (¡UNICAMENTE EN PERSONAS CONSCIENTES!). Proporcionar asistencia médica.
DERRAMES Y FUGAS		ALMACENAMIENTO	ENVASADO Y ETIQUETADO
Evacuar la zona de peligro. Consultar a un experto. Traje de protección química, incluyendo equipo autónomo de respiración.		Separado de alimentos y piensos.	NU (transporte): Ver pictogramas en cabecera. Clasificación de Peligros NU: 6.1 Grupo de Envasado NU: I CE: No clasificado.
<b>VEASE AL DORSO INFORMACION IMPORTANTE</b>			
ICSC: 1467		Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión Europea© CE, IPCS, 2003	

**2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-p-DIOXIN**

ICSC: 1467

<b>D A T O S I M P O R T A N T E S</b>	<p><b>ESTADO FISICO: ASPECTO:</b> Cristales, semejantes a agujas, de incoloro a blanco.</p> <p><b>PELIGROS QUIMICOS:</b> La sustancia se descompone al calentarla intensamente a 750-800°C y bajo la influencia de radiación ultravioleta, produciendo vapores de cloro.</p> <p><b>LIMITES DE EXPOSICION:</b> TLV no establecido. MAK: (fracción inhalable) 10<sup>-6</sup> mg/m<sup>3</sup>; H; Categoría de limitación de pico: II(δ); Cancerígeno: categoría 4; Riesgo para el embarazo: grupo C (DFG 2003).</p>	<p><b>VIAS DE EXPOSICION:</b> La sustancia se puede absorber por inhalación del polvo, a través de la piel y por ingestión.</p> <p><b>RIESGO DE INHALACION:</b> La evaporación a 20°C es despreciable; sin embargo, se puede alcanzar rápidamente una concentración nociva de partículas en el aire cuando se dispersa.</p> <p><b>EFFECTOS DE EXPOSICION DE CORTA DURACION:</b> La sustancia irrita los ojos, la piel y el tracto respiratorio. La sustancia puede afectar al sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, hígado, sistema nervioso y sistema endocrino. Los efectos pueden aparecer de forma no inmediata.</p> <p><b>EFFECTOS DE EXPOSICION PROLONGADA O REPETIDA:</b> El contacto prolongado o repetido con la piel puede producir dermatitis. La sustancia puede afectar a médula ósea, sistema endocrino, sistema inmune, hígado y sistema nervioso. Esta sustancia es carcinógena para los seres humanos. La experimentación animal muestra que esta sustancia posiblemente cause efectos tóxicos en la reproducción humana.</p>
	<b>PROPIEDADES FISICAS</b>	<p>Punto de fusión: 305-306°C Densidad: 1.8 g/cm<sup>3</sup></p>
<b>DATOS AMBIENTALES</b>	<p>La sustancia es muy tóxica para los organismos acuáticos. Esta sustancia puede ser peligrosa para el ambiente; debería prestarse atención especial a la contaminación del suelo. Puede producirse una bioacumulación de esta sustancia en peces, en los vegetales, en mamíferos y en la leche. Evítase efectivamente que el producto químico se incorpore al ambiente.</p>	
<b>NOTAS</b>		
<p>Esta sustancia química sólo se produce con fines para la investigación, pero puede generarse como un subproducto de procesos químicos o incendios.</p> <p style="text-align: right;">Ficha de emergencia de transporte (Transport Emergency Card): TEC (R)-61GT2-I</p>		
<b>INFORMACION ADICIONAL</b>		
<p>Los valores LEP pueden consultarse en línea en la siguiente dirección: <a href="http://www.insht.es">http://www.insht.es</a></p>		<p>Última revisión IPCS: 2005</p>
<b>ICSC: 1467</b>		<b>2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-p-DIOXIN</b>
© CE, IPCS, 2003		
<b>NOTA LEGAL IMPORTANTE:</b>	<p>Esta ficha contiene la opinión colectiva del Comité Internacional de Expertos del IPCS y es independiente de requisitos legales. Su posible uso no es responsabilidad de la CE, el IPCS, sus representantes o el INSHT, autor de la versión española.</p>	

### 8.3 Hoja de Seguridad Arsenito de Sodio

ARSENITO SÓDICO		ICSC: 1603	
		Octubre 2005	
Ácido arsenioso, sal sódica		Metaarsenito de sodio	Dioxoarsenato de sodio
CAS:	7784-46-5	NaAsO <sub>2</sub>	
RTECS:	CG3675000	Masa molecular: 129,9	
NU:	2027		
CE índice Anexo I:	033-002-00-5		
CE / EINECS:	232-070-5		
TIPO DE PELIGRO / EXPOSICIÓN	PELIGROS AGUDOS / SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS / LUCHA CONTRA INCENDIOS
INCENDIO	No combustible. En caso de incendio se desprenden humos (o gases) tóxicos e irritantes.		En caso de incendio en el entorno: están permitidos todos los agentes extintores.
EXPLOSIÓN			
EXPOSICIÓN		¡EVITAR DISPERSIÓN DEL POLVO! ¡EVITAR TODO CONTACTO! ¡EVITAR EXPOSICIÓN DE MUJERES (EMBARAZADAS)!	¡CONSULTAR AL MEDICO EN TODOS LOS CASOS!
Inhalación	Tos. Dolor de cabeza. Dificultad respiratoria. Dolor de garganta. (Ver Ingestión).	Sistema cerrado y ventilación.	Aire limpio, reposo. Proporcionar asistencia médica.
Piel	¡PUEDE ABSORBERSE! Enrojecimiento. Dolor.	Guantes protectores. Traje de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar y lavar con agua y jabón. Proporcionar asistencia médica.
Ojos	Enrojecimiento. Dolor.	Pantalla facial o protección ocular combinada con protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad). Proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Dolor abdominal. Sensación de quemazón. Vómitos. Diarrea. Vértigo. Dolor de cabeza. Shock o colapso.	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo. Lavarse las manos antes de comer.	Enjuagar la boca. Dar a beber una papilla de carbón activado y agua. Provocar el vómito (¡ÚNICAMENTE EN PERSONAS CONSCIENTES!). Proporcionar asistencia médica.
DERRAMES Y FUGAS		ENVASADO Y ETIQUETADO	
Protección personal complementaria: traje de protección química, incluyendo equipo autónomo de respiración. NO permitir que este producto químico se incorpore al ambiente. Recoger con aspirador el material derramado con equipo especial. Barrer la sustancia derramada e introducirá en un recipiente de plástico predintable. Recoger cuidadosamente el residuo, trasladarlo a continuación a un lugar seguro.		Envase irrompible; colocar el envase frágil dentro de un recipiente irrompible cerrado. No transportar con alimentos y piensos. <b>Clasificación UE</b> Símbolo: T, N R: 23/25-50/53; S: (1/2-)20/21-28-45-60-61 Nota: A, 1 <b>Clasificación NU</b> Clasificación de Peligros NU: 6.1 Grupo de Envasado NU: II	
RESPUESTA DE EMERGENCIA		ALMACENAMIENTO	
Ficha de Emergencia de Transporte (Transport Emergency Card): TEC (R)-61GT5-II.		En un área sin acceso a desagües o alcantarillas. Bien cerrado. Mantener en lugar seco. Separado de ácidos, oxidantes fuertes, alimentos y piensos.	
<b>IPCS</b> International Programme on Chemical Safety    		 	
Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión Europea © CE, IPCS, 2006			

## DATOS IMPORTANTES

**ESTADO FÍSICO; ASPECTO:**  
Polvo higroscópico, blanco o gris.

**PELIGROS QUÍMICOS:**  
Por calentamiento intenso se producen humos tóxicos. Reacciona con ácidos y oxidantes fuertes formando un gas tóxico, arsina (ver F+G:0222). Ataca a muchos metales formando un gas combustible (hidrógeno) y arsina.

**LÍMITES DE EXPOSICIÓN:**  
TLV: (como As) 0,01 mg/m<sup>3</sup> como TWA; A1 (cancerígeno humano confirmado); BEI; (ACGIH 2005).  
MAK: (arsénico y compuestos inorgánicos de arsénico); EKA, BLW publicado; Cancerígeno: categoría 1; Mutágeno: categoría 3A; (DFG 2005).

**VÍAS DE EXPOSICIÓN:**  
La sustancia se puede absorber por inhalación del aerosol, a través de la piel y por ingestión.

**RIESGO DE INHALACIÓN:**  
Puede alcanzarse rápidamente una concentración nociva de partículas suspendidas en el aire cuando se dispersa.

**EFFECTOS DE EXPOSICIÓN DE CORTA DURACIÓN:**  
La sustancia irrita los ojos, la piel y el tracto respiratorio. La sustancia puede afectar al sistema cardiovascular, sistema nervioso, tracto gastrointestinal y riñón, dando lugar a gastroenteritis grave, pérdida de fluidos y electrolitos, alteraciones renales, alteraciones cardíacas, colapso, shock. La exposición puede producir la muerte. Los efectos pueden aparecer de forma no inmediata. Se recomienda vigilancia médica.

**EFFECTOS DE EXPOSICIÓN PROLONGADA O REPETIDA:**  
El contacto prolongado o repetido con la piel puede producir dermatitis y desórdenes de pigmentación. La sustancia puede afectar al sistema nervioso periférico, sistema cardiovascular, médula ósea, riñones, hígado y membranas mucosas, dando lugar a neuropatías, desórdenes cardiovasculares, lesiones de las células sanguíneas, alteraciones renales, cirrosis y perforación del tabique nasal. Esta sustancia es carcinógena para los seres humanos. La experimentación animal muestra que esta sustancia posiblemente cause efectos tóxicos en la reproducción humana.

## PROPIEDADES FÍSICAS

Punto de fusión: 615 °C  
Densidad: 1,87 g/cm<sup>3</sup>  
Solubilidad en agua: muy elevada

## DATOS AMBIENTALES

La sustancia es tóxica para los organismos acuáticos.

## NOTAS

Otro número NU: 1686 Arsenito sódico, solución acuosa. Está indicado un examen médico periódico dependiendo del grado de exposición. NO llevar a casa la ropa de trabajo.

## INFORMACIÓN ADICIONAL

Límites de exposición profesional (INSHT 2008):

VLA-ED: (como As) 0,01 mg/m<sup>3</sup>

VLB: 35 µg/L en orina de arsénico inorgánico más metabolitos metilados.

Notas: Esta sustancia tiene establecidas limitaciones a la comercialización y al uso en la legislación española.

**Nota legal**

Esta ficha contiene la opinión colectiva del Comité Internacional de Expertos del IPCS y es independiente de requisitos legales. Su posible uso no es responsabilidad de la CE, el IPCS, sus representantes o el INSHT, autor de la versión española.