



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO

EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“EFECTO DE OLA1 EN LA TRANSFORMACIÓN CELULAR INDUCIDA POR LA
MEZCLA DE ARSÉNICO, CADMIO Y PLOMO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Q.F.B. ELIA MARTÍNEZ BAEZA



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS

TUTOR: DRA. MAHARA A. VALVERDE RAMÍREZ

MÉXICO D.F.

JUNIO DE 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
2.1. OLA-1	
2.2. Estrés oxidante	
2.2.1. Estrés oxidante producido por metales	
2.3. Efecto de la mezcla en modelos <i>experimentales y humanos</i>	
2.4. Efectos de los metales As, Cd y Pb, en el proceso de transformación celular	
2.5. Transformación celular: modelos de transformación celular	
Estudios previos del ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3	23
Justificación	25
Hipótesis	27
Objetivo general	27
Objetivos particulares	28
Metodología	29
9.1. Ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3	
9.1.1. Diagrama de la estrategia experimental a seguir	
9.2. Cuantificación de ERO por oxidación de dihidrorhodamina 123	
9.3. Determinación proteica y génica de OLA-1	
Resultados	35
• Capacidad transformante de la mezcla de metales	
• Determinación de ERO por oxidación de dihidrorhodamina durante el ensayo de transformación inducido por la mezcla de metales	

- **Determinación génica y proteica de OLA-1 durante el ensayo de transformación inducido por la mezcla de metales**

Análisis de resultados	46
Conclusiones	50
Perspectivas	51
Apéndice	55
Bibliografía	60

RESUMEN

La mezcla de metales, arsénico (As); cadmio (Cd) y plomo (Pb) es encontrada en ambientes laborables como los de la metalurgia y el reciclamiento de baterías. Sus efectos tóxicos se han establecido en diversos sistemas de prueba tanto animales como humanos; sin embargo poco se conoce de su mecanismo de acción como carcinógeno. Trabajos previos realizados en nuestro grupo han demostrado la capacidad transformante de dicha mezcla de metales en el modelo de transformación de dos fases BALB/c 3T3. En ellos se determinó que la mezcla de metales tiene tanto capacidad de iniciador como de promotor dentro del proceso de transformación. Se pudo establecer que durante la etapa de iniciación no hay inducción de respuestas oxidante ni cambios en la actividad de las principales barreras antioxidantes, sin embargo, durante la promoción se evidenciaron tanto la inducción de estrés oxidante como incrementos en la respuesta antioxidante, enzimática y no enzimática. Considerando estos hallazgos y el hecho de que OLA-1 (Obg-like ATPasa 1) es un regulador negativo no transcripcional de la respuesta oxidante, es que planteamos estudiar el efecto que pudiera desempeñar en el proceso de transformación inducida por la mezcla de As-Cd-Pb (NaAsO_2 $2\mu\text{M}$, CdCl_2 $2\mu\text{M}$ y $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $5\mu\text{M}$). Hipotetizando que durante la fase de iniciación esta enzima, que en ratón tiene actividad de GTPasa, estuviera subexpresada y de esta forma es que favoreciera la regulación de la respuesta oxidante celular, mientras que a través del proceso de transformación dicha GTPasa incrementaría su expresión, reflejándose en cambios de la respuesta oxidante. Con base en este planteamiento es que el presente proyecto pretende aportar información

básica sobre los mecanismos de carcinogenicidad de metales. En resumen, los hallazgos del trabajo muestran cambios a través del proceso de transformación que se reflejan tanto en los niveles de especies reactivas de oxígeno como en los niveles de expresión génica y proteica de OLA-1, parámetros que correlacionan entre sí. Si bien no se encontró subexpresada OLA-1 durante la iniciación tal como se hipotetizó, si muestran incrementos a través del proceso de transformación inducido por la mezcla de metales. Estos datos se relacionan con la expresión de DOC45 (alias de OLA-1) en diferentes tipos de cáncer, ya que en etapas iniciales la expresión es baja e incrementa cuando hay transformación morfológica inducida por la mezcla de metales.

INTRODUCCIÓN

2.1. OLA-1

OLA-1 (Obg-like ATPasa 1) es una proteína que tiene un peso molecular de 45 KDa que consiste en 396 aa y es expresada en citoplasma; la cual tiene actividad de ATPasa principalmente en humanos y GTPasa en ratón (Zhang et al, 2009a). El gen que codifica para ella tiene varios alias entre los que destacan GTPBP9 y PTD004. Este gen se sobre-expresó en condiciones progresivas de depleción de glutatión (GSH) en un modelo celular carente del gen de la gamma glutamil cisteína sintetasa (γ GCS) o ligasa (GCLC) (Shi ZZ et al., 2000, Rojas E et al., 2003). Posteriormente, con la finalidad de caracterizar funcionalmente a la proteína OLA-1 se identificó su expresión basal en 17 líneas celulares humanas entre las que se encontraban HeLa (cancerosa) y BEAS2B (sana). El silenciamiento de OLA-1 en dichas células incrementa la resistencia a agentes oxidantes como terbutil hidroperóxido (tBH) y diamida (agente que depleta tioles celulares) sin afectar la proliferación, apoptosis basal o sensibilidad a otros agentes citotóxicos cuyos blancos fueran mitocondria, citoesqueleto o ADN (Zhang et al. 2009a). Por otro lado, el silenciamiento de OLA-1 en células cancerosas de mama MDA-MB-231, inhibe la motilidad e invasión de la línea celular altamente metastásica, a través de mecanismos que involucran la modulación intracelular de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Zhang et al. 2009b). Estos datos se resumen en la figura 1.

OLA-1 en ratón se localiza en el cromosoma 2 en la región 2 y se le conoce como **GTPBP9, PTD004, 2510025G09RiK**. El gen de OLA-1 esta conservado en humanos, chimpancé, perro, vaca, rata, pollo, pez cebra, mosca de la fruta, mosquito y levaduras. En humanos, hOLA-1 se localiza en el cromosoma 2, en la región 2q31.1 y se le conoce como **DOC45, GBP45, GTBP9, GTPBP9, PTD004, KFZp313H1942** (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/67059). DOC45 se ha encontrado en diversos tipos de canceres, entre los cuales destacan principalmente colon, recto, estomago, ovario, pulmón y útero. Se ha encontrado que la expresión de DOC45 se encuentra regulada

por el daño al ADN. Se ha propuesto que la expresión de DOC45 se relaciona con la vía de señalización Ras-PI3K (Sun et al. 2010).

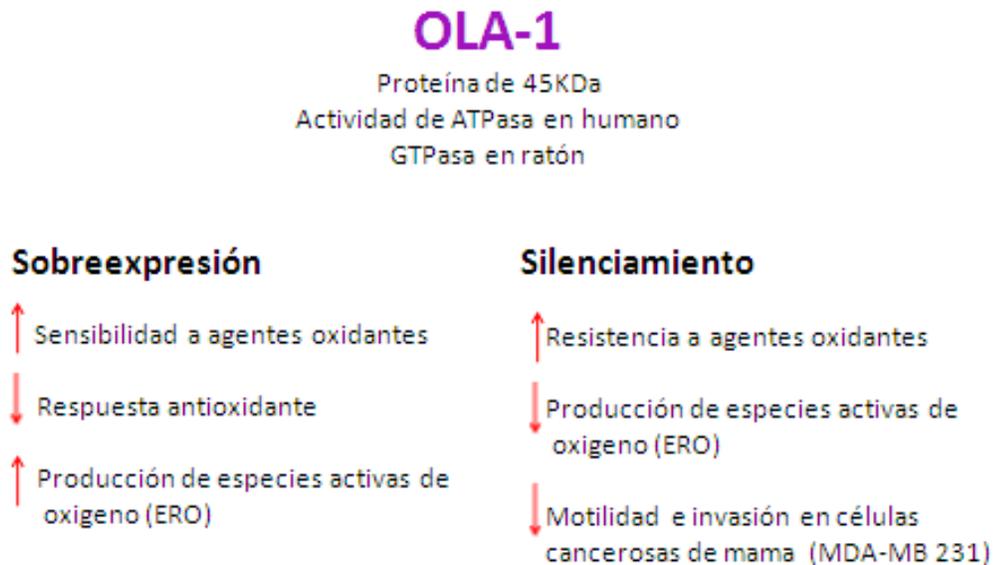


Figura 1. Actividad de OLA-1 cuando esta sobre o sub-expresada, mediante el uso de siRNA (modificado de Zang et al. 2009a, 2009b). Las flechas hacia arriba representan incrementos y las flechas hacia abajo representan decremento en la función.

Estudios del grupo de Sun y colaboradores han asociado una región de la proteína con la exportación nuclear (aa 267-274) de DOC45. Se ha comprobado la actividad de ATPasa de DOC45, por lo cual se ubica dentro de la familia de las OBG-like ATPasa, observando que no se une a GTP y que es capaz de hidrolizar ATP (Sun et al. 2010).

Cabe mencionar que OLA1 ha sido propuesta como una proteína que regula negativamente de la respuesta antioxidante, independiente de interacciones con el factor transcripcional Nrf2 (Zhang et al. 2009a). Por lo que la sub-expresión de OLA-1 se ha considerado de relevancia para mantener la homeostasis redox.

2.2. Estrés oxidante

El oxígeno es requerido por las células procariotas y eucariotas para la producción de energía en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. Por otro lado el oxígeno llega a ser perjudicial para los organismos, debido a la capacidad que tiene de aceptar electrones, generando las especies reactivas de oxígeno denominadas como pro-oxidantes, lo que conlleva a causar daños biológicos en las células y generar estrés oxidante que es la pérdida de la homeostasis oxido reductora intracelular, es decir que existe un incremento en la producción de pro-oxidantes y una disminución de los antioxidantes endógenos (Kohen & Nyska, 2002).

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN) son producto del metabolismo celular o por la exposición a agentes capaces de generarlos, bajas cantidades de ERO y ERN son requeridas para el funcionamiento celular normal, como pueden ser la defensa contra agentes infecciosos, la inducción de la respuesta mitogénica, entre otros. Las principales especies son producto de la ruptura o de la excitación del O, el oxígeno atómico, el ozono y el oxígeno en singulete, y las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas, esto es, el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Hansberg T. 2002), (Figura 2).

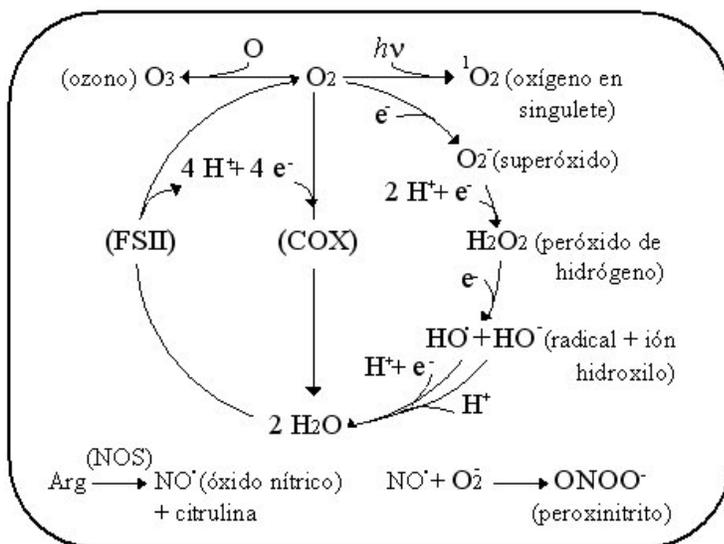


Figura 2. Las principales especies reactivas de oxígeno. Las especies de oxígeno reactivas se generan por la ruptura o la excitación del dioxígeno (O, O₃, ¹O₂) o por la reducción parcial del mismo (O₂⁻, H₂O₂, HO[•]). El fotosistema II (FSII) lleva a cabo la oxidación completa del agua en dioxígeno (fotosíntesis) mientras que la oxidasa del citocromo c (COX) efectúa la reducción completa del dioxígeno en agua (respiración). El óxido nítrico (NO[•]) se produce por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), conllevando a la posterior formación de peroxinitrito (Tomado de Hansberg T. 2002).

Sin embargo el aumento en la producción de radicales, resulta perjudicial para la supervivencia celular, ya que es capaz de dañar estructuras celulares, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Valko et al. 2006) (Figura 3). Las membranas son especialmente vulnerables a la oxidación dada por su alta concentración de ácidos grasos insaturados, debido a que las especies reactivas son capaces de abstraer átomos de hidrógeno de los grupos metileno de los lípidos. Las proteínas son blanco de ataque de ERO y ERN por peroxidación, daño a residuos de aminoácidos específicos, cambios en la estructura terciaria, degradación y fragmentación, desencadenando la pérdida de la actividad enzimática, alteraciones en las funciones celulares como producción de energía, interferencia con la creación del potencial de membranas y cambios en el tipo y niveles de proteínas celulares. Por otro lado, la interacción de ERO y ERN con el ADN causa varios tipos de daño, entre los que destacan la modificación de las bases, rupturas de cadena sencilla y doble cadena, pérdidas de purinas (sitios apurínicos, AP), uniones ADN-proteínas y daño a los sistemas de reparación del ADN (Kohen & Nyska, 2002).

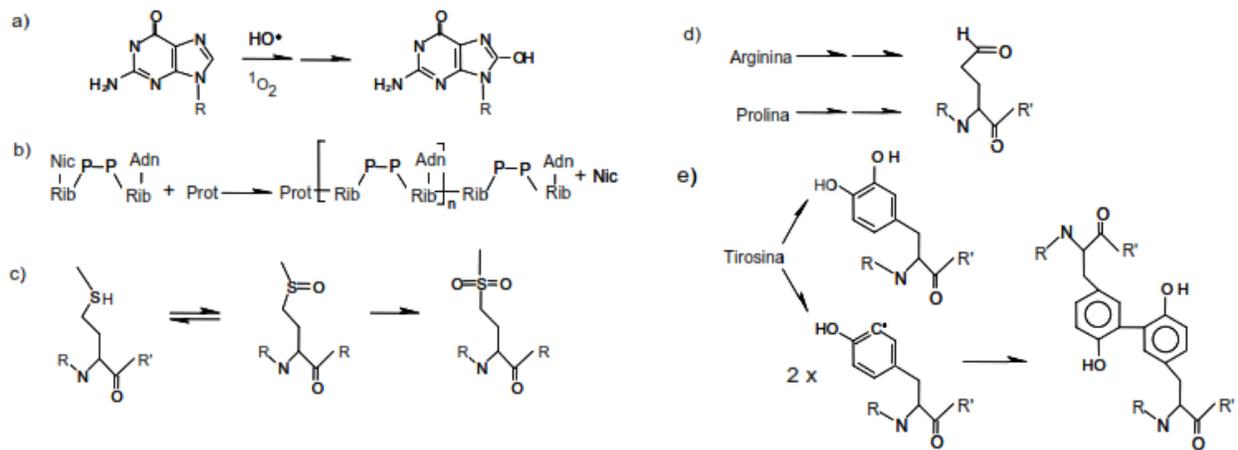


Figura 3. Productos de oxidación en el ADN y las proteínas. a) La 8-hidroxi guanina es el principal producto de oxidación de las bases nitrogenadas especialmente con el ¹O₂. b) La ADPribosa se polimeriza enzimáticamente en las proteínas que se unen al ADN en los sitios de ruptura del mismo; n puede ser hasta 200 con varias ramificaciones. c) La formación reversible del sulfóxido de metionina e irreversible de la sulfona de metionina. d) La prolina y la arginina generan el semialdehído de glutámico. El carbonilo que se forma se detecta por la formación de la base de Schiff. e) La tirosina (o la fenilalanina) se hidroxila para generar dihidroxifenilalanina (DOPA) y dos radicales tirosilo pueden formar ditirosina (tomado de Valko et al. 2006).

Niveles bajos de ERO tienen un papel importante en la proliferación celular y se ha observado un incremento en las células cancerosas. La constante activación de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1 (Tabla 1) parece tener un papel funcional en los elevados niveles de ERO durante la progresión del tumor. Dado que se ha demostrado la inducción de daño al ADN por la presencia de ERO y la inestabilidad genómica generada se cree que tiene un papel múltiple en la iniciación, progresión y mantenimiento de un tumor. La activación o inactivación molecular causada por ERO puede favorecer la transformación celular (como la sobreexpresión de Mox1 que induce la generación de superóxido conduciendo a la transformación de NIH 3T3) (Benhar et al. 2002).

Tabla 1. Señalización de moléculas reguladas por el efecto redox en las células (modificado de Kamata & Hitara, 1999).

Molécula de señalización	Efecto de ERO
1. Cinasas de tirosina Receptor EGF, receptor de insulina, receptor PDGF, Src, Lck, Fyn, ZAP-70, Syk, Lyn, Fgr, Hck, Btk y Ltk	Activación
2. Fosfatasa de tirosina La reducción de residuos de cisteína es esencial	Inactivación
3. Cinasas de serina/treonina MAP cinasas, JNK, p38, BMK1, Akt, cinasa S6 y PKC	Activación (activación/inactivación)
4. Fosfatasa de serina/treonina PP1, PP2A, calcineurina (PP3C)	Inactivación
5. Proteínas G pequeñas Ras	Activación
6. Señalización de lípidos PLC, PLD, PLA ₂ , PI 3-cinasa	Activación
7. Señalización de Ca²⁺ Receptor Ins(1,4,5)P ₃ , receptor ryanidina, intercambio Ca ²⁺ -ATPasa, Ca ²⁺ /Na ⁺	Activación
8. Factores de transcripción AP-1 (c-Fos, c-Jun), NF κ B (p50), Rel, USF, TTF-1, GR, BPV1E2, NFI, Myb, NF-Y, p53, PEBP2/AML, Oct-2, Erg-1, BZLF1, Ets, GABP, Receptor Ah, CREB, TTF-1, Ku	Inactivación

Abreviaturas: EGF factor de crecimiento epidermal; PDGF factor de crecimiento derivado de plaquetas; ZAP- ζ polipeptido asociado de 70Da; JNK c-jun cinasa N-terminal; BMK1 Big-MAP cinasa 1; PP proteína fosfatasa; PLD fosfolipasa D; PLA₂ fosfolipasa A₂; PI fosfatidilinositol; Ins(1,4,5)P₃ inositol 1,4,5-trifosfato; AP-1 proteína activadora 1; USF factor estimulatorio superior; TTF-1 factor de transcripción tiroideo; GR receptor glucocorticoide; BPV1E2 virus del papiloma bovino tipo 1 E2; NF factor nuclear; PEBP2/AML proteína de unión al potenciador del virus del polioma/leucemia mieloide aguda; BZLF1 activador de la proteína transcripcional codificada en el virus de Epstein-Barr; GABP proteína de unión GA; ATF factor activador de la transcripción; CREB proteína de unión al elemento de respuesta del cAMP.

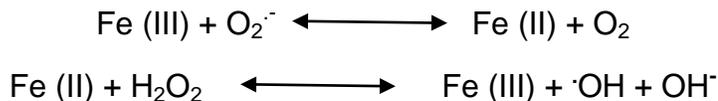
2.2.1. Estrés oxidante producido por los metales As, Cd y Pb.

La toxicidad de los metales esta mediada por mecanismos indirectos, de los cuales predominan 3:

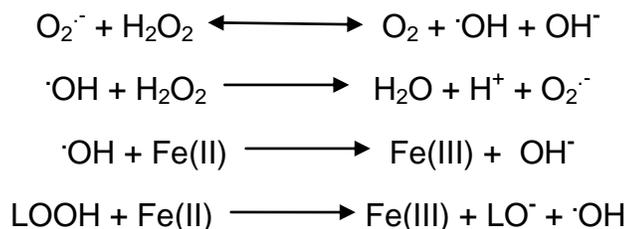
- A)** Interferencia con la regulación celular redox y la inducción de estrés oxidante, que puede causar daño oxidante o activar cascadas de señalización resultando en la estimulación del crecimiento celular.
- B)** Mayor inhibición de los sistemas de reparación del ADN, resultando en una inestabilidad genómica y acumulación de mutaciones críticas.
- C)** Desregularización de la proliferación celular por inducción de cascadas de señalización o inactivación de controles de crecimiento así como genes supresores de tumores (Beyersmann et al. 2008).

Dado que la inducción de estrés oxidante es una hipótesis atractiva para explicar los efectos mutagénicos y carcinogénicos de los metales (Figura 4) frecuentemente se observa la formación de radical hidroxilo y se asocia su generación a las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Valko et al. 2005):

1. Fenton



2. Haber-Weiss



Se sabe que estos radicales causan daño oxidante a lípidos, proteínas y ADN (Beyersmann et al. 2008).

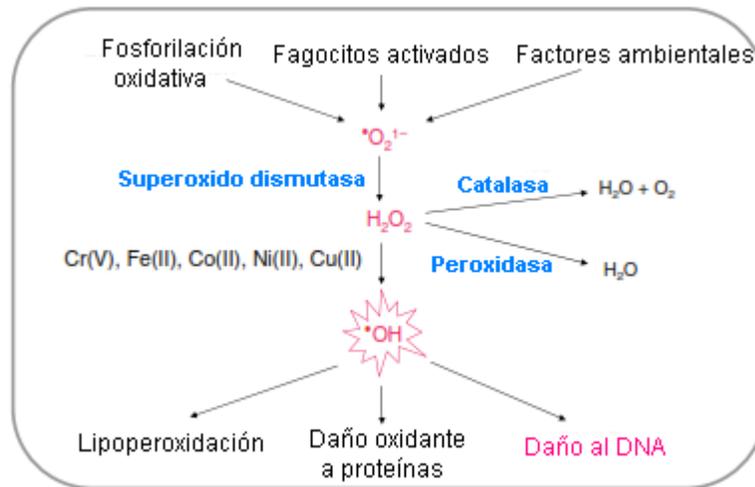


Figura 4. Iones metálicos y estrés oxidante como generadores de daño a macromoléculas (Modificado de Beyersmann et al. 2008).

La formación de radicales libres mediada por metales causa varias modificaciones en las bases del ADN, incrementando la peroxidación de lípidos y alteraciones de la homeostasis del calcio y los sulfidrilos. Mientras que el hierro (Fe), cobre (Cu), cromo (Cr), vanadio (V) y cobalto (Co) se someten a reacciones redox cíclicas, un segundo grupo de metales, mercurio (Hg), cadmio (Cd), y el níquel (Ni) tienen como primer ruta de toxicidad la depleción de glutatión (GSH) y la unión a los grupos sulfidrilos de las proteínas (Valko et al. 2005).

Se ha mostrado que el arsénico inorgánico, el ácido monometil-arsénico (MMA) y el ácido dimetil-arsénico (DMA) producen estrés oxidante por la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial a través de su unión con la nicotinamida diamida (NAD), resultando en la depleción del ATP. El arsénico genera radicales superóxido (O₂⁻), oxígeno singulete (¹O₂), radical peroxil (ROO[•]), óxido nítrico (NO[•]), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radicales peroxil dimetilarsénico ([(CH₃)₂AsOO[•]]), incluyendo al radical dimetilarsénico [(CH₃)₃As[•]]. Los mecanismos responsables de la generación de estas especies reactivas no está clara, pero algunos estudios proponen la formación de especies intermediarias de arsina (AsH₃) (Beyersmann et al. 2008).

El arsénico es capaz de inhibir la cadena respiratoria mediante la depleción de ATP, produciendo estrés oxidante. También se ha observado que es capaz de inhibir la actividad de la piruvato deshidrogenasa (PDH) uniéndose a los grupos tioles presentes en la enzima. En adición a la producción de ERO, la exposición a arsénico también puede generar ERN, principalmente el radical oxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) por interferencia con la enzima oxido nítrico sintasa (NO) inhibiendo su respuesta génica inducible (Valko et al. 2005).

El cadmio por si solo es incapaz de generar radicales libres directamente, proponiéndose un mecanismo por el cual este puede remplazar los iones de hierro y cobre en varias proteínas membranales y citoplásmicas, tales como la ferritina y la apoferritina, incrementando así la cantidad de de iones hierro y cobre libres o quelados que pueden participar en el estrés oxidante por reacciones tipo Fenton (Valko et al. 2005). Otro mecanismo por el cual genera ERO es por la capacidad que tiene el cadmio de inhibir enzimas antioxidantes como la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión reductasa y la glutatión peróxidasa (Beyersmann et al. 2008).

Wozniak y Blasiak (2002) reportan que la exposición ocupacional a plomo induce cambios en el estado redox celular, mostrando una correlación negativa y significativa entre las rupturas de la hélice del ADN con los niveles de GSH y muestran una correlación positiva con la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). El mecanismo por el cual el plomo se dice que es capaz de producir ERO puede ocurrir a diferentes niveles:

- I. Por inhibición de la enzima δ -aminolevulínico deshidrogenasa (ALAD) y por la subsecuente acumulación de su sustrato el ácido δ -aminolevulínico (ALA) que puede ser rápidamente oxidado para generar radicales libres como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- II. El plomo per se tiene la capacidad de estimular el ion hierro, generando la lipoperoxidación (Ahamed & Siddiqui, 2007), (Figura 5).

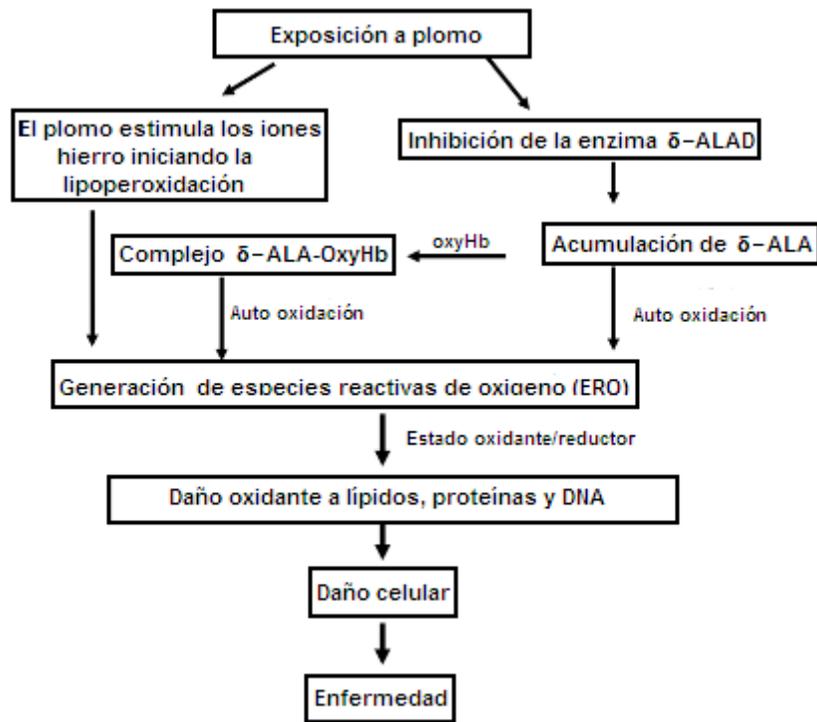


Figura 5. Posible mecanismo por el cual el plomo induce daño oxidante (modificado de Ahamed & Siddiqui, 2007).

2.3. Efectos de la mezcla As-Cd-Pb en modelos experimentales y humanos.

Las exposiciones humanas a sustancias químicas ambientales se caracterizan por ocurrir en forma de mezclas de estos agentes, particularmente en el caso de los metales que tienen una larga vida en el ambiente como es el caso del As, Cd y Pb. Entre los mecanismos en común que comparten estos metales y que explican su toxicidad se encuentran, la producción de estrés oxidante, reacciones con sulfidrilos e interferencia con metales esenciales. Así mismo, proteínas de estrés y enzimas antioxidantes han sido propuestas como mecanismo común que protege de su toxicidad. Estas propuestas surgen de varias décadas de investigación basadas en exposiciones individuales a estos metales. La exposición concurrente a As-Cd-Pb puede producir interacciones sinérgicas o aditivas, incluso efectos no detectados por la exposición a éstos de manera individual. La evaluación de interacciones en mecanismos de básicos es esencial para ensayos de evaluación de riesgo y manejo de esta mezcla de metales en particular. Al respecto, Wang y Fowler (2008), realizaron una revisión detallada de los trabajos que reportan efectos ocasionados por la mezcla de As-Cd-Pb en diferentes modelos experimentales (Tabla 2) y humanos (Tabla 3). Las conclusiones generales de esta revisión proponen que la coexposición a As-Cd-Pb produce efectos más severos a concentraciones relativamente altas en biomarcadores de forma específica; es decir, en pruebas tradicionales como la inducción de cambios morfológicos y parámetros bioquímicos de la toxicidad en órganos blanco fueron efectivos para exposiciones a altas concentraciones; mientras que biomarcadores de estrés oxidante, parámetros de alteración de biosíntesis de grupo hemo y proteínas de estrés respondieron mejor a concentraciones bajas.

Tabla 2. Estudios en modelos experimentales de la interacción de As, Cd y Pb (tomado de Wang & Fowler, 2008).

Referencia	Tipo de experimento	Elementos	Biomarcadores/criterios de evaluación
Mahaffey and Fowler, 1977	In vivo	As, Cd, Pb	ALA, porfirinas urinarias
Fowler and Mahaffey, 1978	In vivo	As, Cd, Pb	ALA, porfirinas urinarias
Mahaffey et al., 1981	In vivo	As, Cd, Pb	ALA, porfirinas urinarias
Liu et al., 2000	In vivo	As, Cd	Proteinuria
Fowler et al., 2004	In vivo	As, Cd, Pb	ZPP, ALAD
Wang et al., 2003	In vivo	As, Cd, Pb	HSPs, MT, ZPP
Yañez et al., 1991	In vivo	As, Cd	Lipoperoxidación, GSH, MT
Mistry et al., 1985	In vitro	Pb	Uniones de cromatina, PbBPs
Mistry et al., 1986	In vitro	Ca, Cd, Fe, Pb, Zn	PbBPs, desplazamiento del metal en la absorción nuclear.
Goering and Fowler, 1984	In vitro	Pb	ALAD
Goering and Fowler, 1985	In vitro	Pb	ALAD
Goering et al., 1986	In vitro	Pb	ALAD
Goering and Fowler, 1987a	In vivo	Pb, Zn	ALAD, MT
Goering and Fowler, 1987b	In vivo	Cd, Pb, Zn	ALAD, MT
Madden et al., 2002	In vitro	As, Cd	HSPs, MT

Abreviaturas: ALA ácido δ -aminolevulínico ; ZPP protoporfirinas de zinc; ALAD enzima δ -aminolevulínico deshidrogenasa; HSPs proteínas de choque térmico; MT metalotioneinas; GSH glutatión; PbBPs proteínas de unión a plomo.

Tabla 3. Estudios en humanos de la exposición a mezclas de As, Cd y Pb (tomado de Wang & Fowler, 2008).

Referencia	Sitio de exposición	Elementos	Biomarcadores/criterios de evaluación
deBurbe et al., 2003	Ambiental	Cd, Hg, Pb	Proteinuria
deBurbe et al., 2006	Ambiental	As, Cd, Hg, Pb	Prolactina sérica, ácido homovanílico
Garcon et al., 2007	Ocupacional	Cd, Pb	Aumento en orina de la α -glutatión transferasa, ZPP y malondialdehído
Garcon et al., 2004	Ocupacional	Cd, Pb	Aumento en orina de la α -glutatión transferasa
Hengstler et al., 2003	Ambiental	Cd, Co, Pb	Rompimientos de cadena del ADN, 8-OH DG
Hong et al., 2004	Ambiental	As, Cd	Proteinuria
Nordberg et al., 2005	Ocupacional	As, Cd	Proteinuria, MT
Palus et al., 2003	Ocupacional	Cd, Pb	Aumento de micronúcleos, rompimientos de cadena del ADN
Roels et al., 1999	Ocupacional	Cd, Hg, Pb	Proteinuria
Wasowicz et al., 2001	Ocupacional	Cd, Pb	Decremento de glutatión peroxidasa (GPx), incremento de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)

2.4. Efecto de los metales As, Cd y Pb, en el proceso de transformación celular.

Diversos iones metálicos son nutrientes esenciales para todos los organismos y juegan un papel importante en diferentes procesos bioquímicos, sin embargo altas concentraciones pueden resultar tóxicas (Cinquetti et al. 2003). La IARC (International Agency for Research on Cancer, siglas en inglés) clasifica a los metales en 3 grupos: Grupo 1) carcinógeno en humanos; Grupo 2A) probable carcinógeno en humanos y Grupo 2B) posible carcinógeno en humanos (Tabla I). La MAK (The german commission for the investigation of health hazards of chemical compounds in the work area) clasifica a los metales en 3 categorías: 1) carcinógeno en humanos, 2) carcinógeno en humanos probado por estudios en animales y 3) compuestos que aun no se comprueba su efecto carcinogénico en humanos (en la tabla 4 se observa la clasificación dada por la IARC y la MAK). Los metales pueden ser carcinógenos en forma de iones libres, complejos metálicos o partículas y compuestos poco solubles así mismo su toxicidad está determinada por sus propiedades fisicoquímicas (Beyersmann et al. 2008).

Tabla 4. Clasificación de los metales y/o sus compuestos como carcinogénicos (Beyersmann et. al 2008).

Compuesto	Grupo IARC	Categoría MAK
Antimonio y sus compuestos	No clasificado	2 (excepto SbH ₃)
Trióxido de antimonio (Sb ₂ O ₃)	2B	2
Trisulfido de antimonio (Sb ₂ S ₃)	3	2
Arsénico y sus compuestos	1	1
Berilio y sus compuestos	1	1
Cadmio y sus compuestos	1	1
Cromo en metal	3	No clasificado
Compuestos de Cromo (VI)	1	2 (excepto ZnCrO ₄)
Compuestos de Cromo (III)	3	No clasificado
Cobalto y sus compuestos	2B	2
Cobalto con carburo de tungsteno	2A	1
Arseniuro de Galio	1	No clasificado
Fosforo de Indio	2A	2
Plomo en metal	No clasificado	2
Compuestos de Plomo	2A	2
Mercurio y sus compuestos	2B	3B
Niquel en metal	2B	1
Compuestos del Niquel	1	1

Rodio	No clasificado	3B
Selenio y sus compuestos	3	3B
Vanadio y sus compuestos	No clasificado	2
Pentóxido de Vanadio	2B	2

Arsénico, cadmio y plomo son contaminantes ambientales extremadamente tóxicos, causantes de daño en diferentes órganos. Se ha reportado que los compuestos inorgánicos de arsénico inducen transformación en ensayos de colonia usando células SHE (Syrian Hámster Emrbyo), y en ensayos de formación de foci usando células Balb/c 3T3 y C3H10T1/2. Los estudios han mostrado que el arsénico posee actividad iniciadora y promotora, especialmente el arsenito de sodio trivalente muestra mayor actividad que los compuestos orgánicos y posee mayor actividad promotora que iniciadora a una menor concentración (Tsuchiya et al. 2005). El arsenito activa un gran número de cinasas en varias líneas celulares. La activación de factor de transcripción AP-1 respalda la hipótesis de que el arsénico promueve el crecimiento neoplásico a través de la estimulación de la proliferación celular (Beyersmann, 2002), (Figura 6).

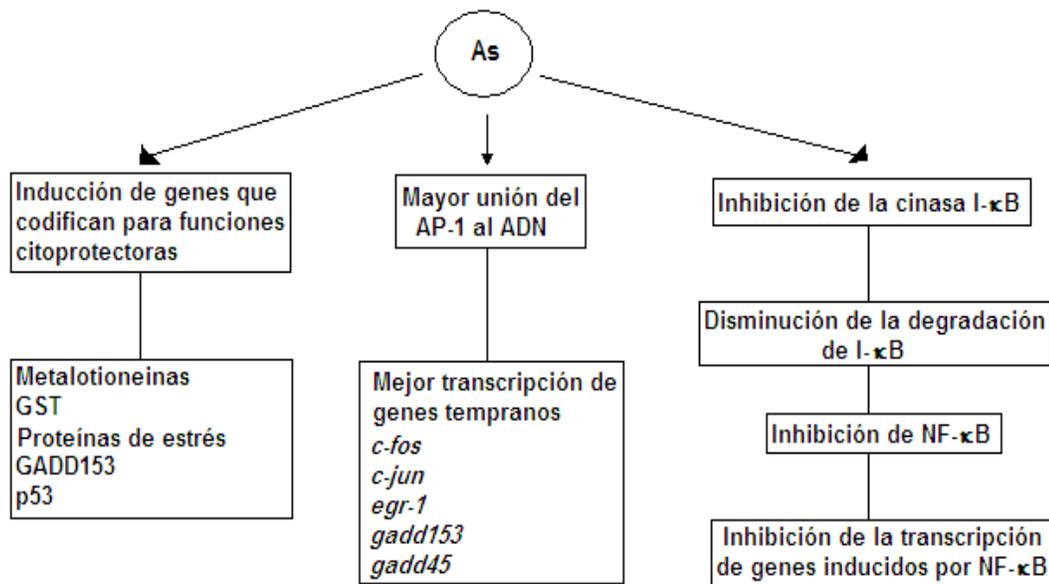


Figura 6. Efectos del arsénico sobre la expresión selectiva de genes (modificado de Beyersmann, 2002)

La exposición a cadmio ocurre principalmente en las fundidoras, a través de las baterías de níquel-cadmio y en el humo del cigarro (Keshava et al. 2000). Este metal

también puede sustituir al calcio y unirse a los grupos sulfidrilo de las proteínas. Se ha reportado que el cadmio induce por lo menos dos tipos de genes.

- 1) Genes que codifican para proteínas desintoxicantes y citoprotectoras (como las metalotioneinas, enzimas de la síntesis de glutatión y proteínas transportadoras de zinc).
- 2) Genes de respuesta temprana relacionados con el control de la proliferación celular (como *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* y *erg-1*) que interfieren con los mecanismos celulares de transducción de señales (Beyersmann, 2002). La carcinogenicidad producida por cadmio se debe principalmente a la disrupción de la adhesión célula-célula, mediado por la caderina, ya que es capaz de desplazar específicamente al calcio de la proteína E de la caderina, lo que explica su importante papel en la inducción del tumor y la progresión del proceso carcinogénico (Valko et al. 2005).

El plomo es un metal tóxico ubicuo con diferentes fuentes ambientales de exposición. Su toxicidad se da por la sustitución de calcio y la inhibición de la actividad de diversas proteínas por la unión a los grupos sulfidrilo (De la Fuente et al. 2002). También se sabe que la exposición a plomo induce mutaciones génicas e intercambio de cromátidas hermanas, que induce la transformación morfológica en cultivos celulares de roedores y el crecimiento libre de anclaje en fibroblastos diploides humanos (Tchounwou et al. 2004).

En la figura 7 se resume los principales mecanismos transformantes y carcinogénicos que tienen los metales de manera general, según Beyersmann y colaboradores.

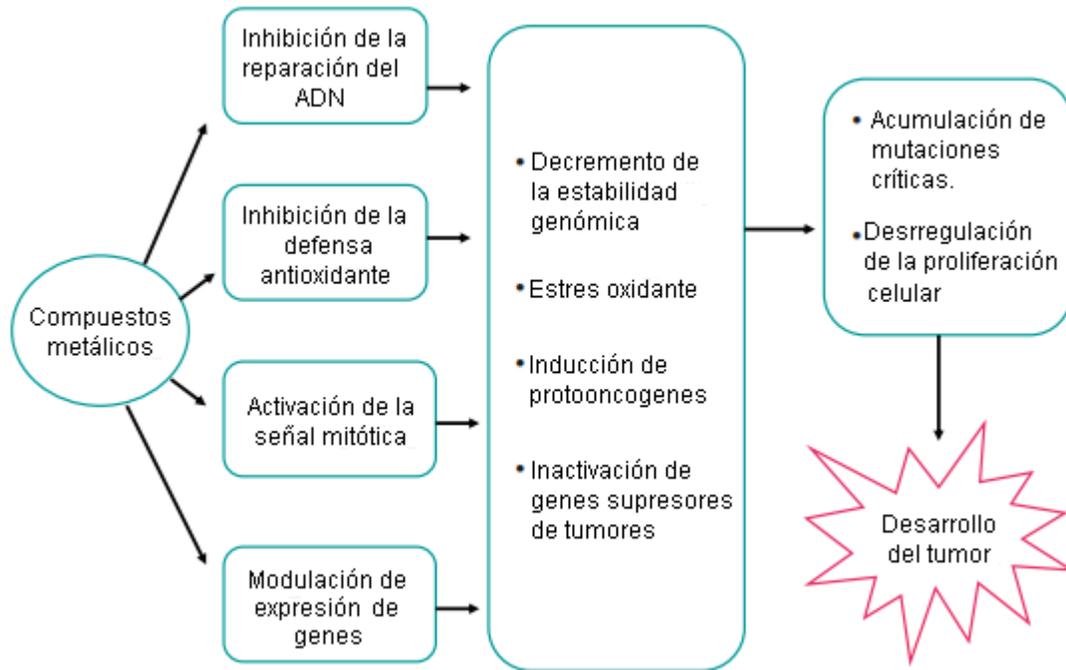


Figura 7. Principales mecanismos de transformación y carcinogenicidad de metales (tomado de Beyersmann et al. 2008).

2.5. Transformación celular: modelos de transformación celular

La transformación celular ha sido definida como la adquisición de ciertas características malignas en morfología, control o funcionamiento del ciclo celular y la adquisición de crecimiento libre de anclaje, inducido por carcinógenos químicos. Dicha transformación ocurre como resultado de una excesiva respuesta al daño directo o indirecto del ADN y maquinaria celular (Combes et al. 1999).

In vitro, la transformación es un proceso caracterizado por una serie de distintos eventos progresivos que a menudo simulan las manifestaciones ocurridas *in vivo* y que son asociadas con neoplasias. Estas manifestaciones incluyen la inmortalidad celular, los cambios fenotípicos, aneuploidias, desarreglo celular, crecimiento libre de anclaje y tumorigenicidad *in vivo* lo que ha mostrado ser un proceso multifacético con estrecha relación con varios estados en los modelos de carcinogénesis *in vivo* (Schechtman L. 2012). Se han reportado 4 estados involucrados en la transformación celular: **i)** bloqueo en la diferenciación celular (detectado como transformación morfológica en ensayos con SHE); **ii)** adquisición de inmortalidad expresada por una duración de vida ilimitada, un cariotipo aneuploide y una inestabilidad génica; **iii)** adquisición de tumorigenicidad asociada con la formación de foci y crecimiento libre de anclaje (obtenido en los sistemas de ensayo de células Balb/c 3T3, C3H10T1/2 y Bhas 42) y **iv)** total malignidad cuando son inyectadas en un animal hospedero (Creton et. al. 2012). En la figura 8 se observan las similitudes entre la carcinogénesis *in vivo* y la transformación *in vitro* según Combes y colaboradores (1999).

Los ensayos de transformación han sido propuestos como un método *in vitro* para la identificación de químicos potencialmente carcinogénicos (Creton et al. 2012), por lo cual son relevantes para la detección de carcinógenos animales, capaces de proveer información de los mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis, capaces de detectar varios tipos de carcinógenos (genotóxicos y no-genotóxicos) (Schechtman L. 2012).

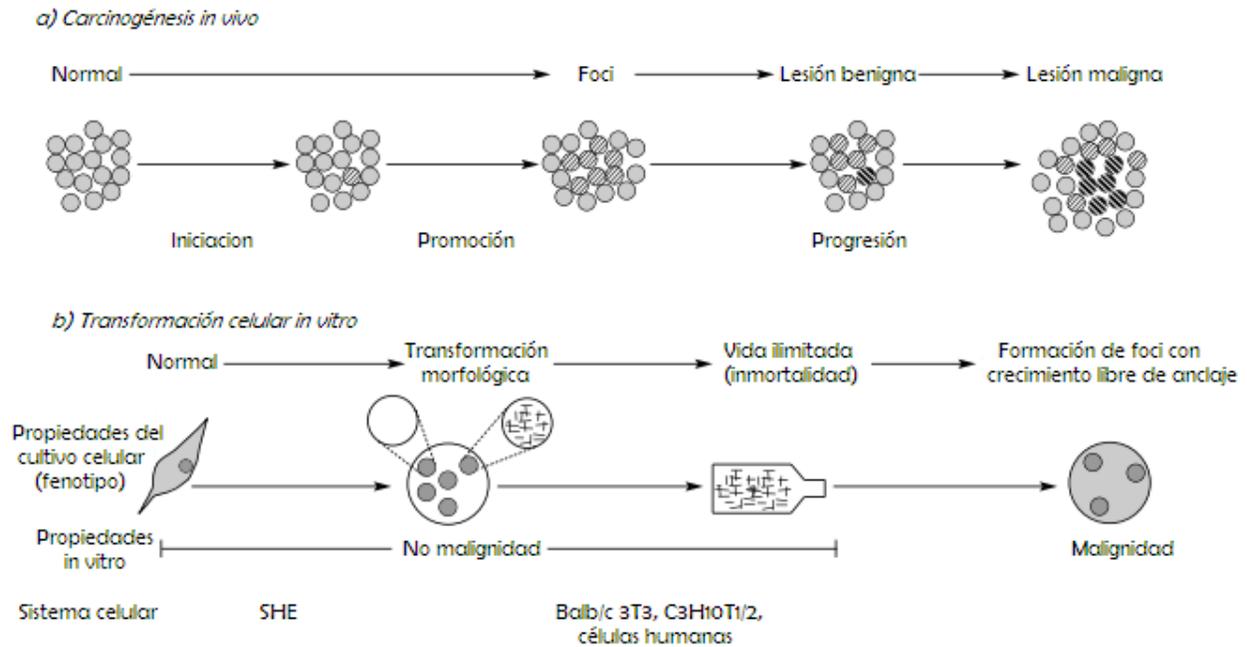


Figura 8. Representación de la carcinogénesis *in vivo* y transformación celular *in vitro* (modificado de Combes et. al 1999).

El uso de líneas celulares de roedores en los sistemas de transformación involucra las células con una duración de vida ilimitada (SHE *syrian hamster embryo*) o las líneas celulares de fibroblastos inmortalizadas (Balb/c 3T3 y C3H10T1/2). Estos tres ensayos han sido ampliamente usados en la evaluación de carcinógenos, mostrando altos valores predictivos para el resultado de bioensayos animales y para predecir carcinógenos humanos (Mazzotti, 2003), en la tabla 5 se muestran las características de los ensayos de transformación SHE, Balb/c 3T3 y C3H10T1/2.

Tabla 5. Ensayos de transformación celular de roedores *in vitro* (modificado de Mazzotti 2003 y Meyer 1983).

	Balb/c 3T3	C3H10T1/2	SHE
Línea celular/línea primaria	Línea celular	Línea celular	Línea primaria
Origen	Embriones de ratón	Embriones de ratón	Embriones de hámster syrian
Tipo celular	Fibroblastos	Fibroblastos	Células primarias de fibroblastos
Poliploidía	Aneuploide (predominantemente tetraploide)	Aneuploide (predominantemente tetraploide)	Diploide
Ensayo de dos fases	+	+	-
Duración de la prueba (semanas)	5	6	1
Marcador	Formación de foci	Formación de foci	Colonias individuales con características similares a los foci pero en monocapa
Ventajas	Reproducible, confiable, es estable, se usa la línea clonada	Confiable, reproducible, adaptabilidad para detectar iniciadores y promotores.	Células metabólicamente competentes
Desventajas	Insensibilidad para detectar algunos precarcinógenos	Insensibilidad a algunos precarcinógenos y agentes alquilantes	Falta de uniformidad en las células blanco y dificultad para estandarizar

El sistema de transformación celular Balb/c 3T3 está basado en una línea celular inmortalizada espontáneamente e inicialmente derivada de un embrión de ratón por repetidos pases y subsecuentes subclonas para generar la línea (Aaranson et. al 1968a, b). Este ensayo provee información relevante para la comunicación celular en el contexto de los mecanismos de acción de agentes iniciadores y promotores. La transformación químicamente inducida en células Balb/c 3T3 establece la relación de la transformación *in vitro* y la citotoxicidad, carcinogenicidad y genotoxicidad, mostrando alta especificidad y sensibilidad para la detección de carcinógenos citotóxicos y no-citotóxicos (Matthews, 1990).

Las células Balb/c 3T3 subclona A31 posee ciertas propiedades que hacen que sea un efectivo sistema de transformación celular, que incluyen: **a)** sensibilidad de división celular por inhibición a post-confluencia (inhibición por contacto); **b)** adhesión

de las células al sustrato; **c)** baja densidad de saturación ($1.2-1.3 \times 10^4$ células/cm²); **d)** alta eficacia de clonación (50-55%); **e)** tiempo de duplicación relativamente corto (aprox. 19 h); **f)** *in vitro* tienen una duración de vida infinita; **g)** alto grado de sensibilidad a transformación química y **h)** un límite espontáneo de transformación (Schechtman L, 2012).

La transformación celular *in vitro* de SHE es un proceso neoplásico que procede a través de varias etapas identificables, incluyendo la transformación morfológica *in vitro*, la adquisición de inmortalidad, tumorigenicidad y células derivadas de tumor. Las células SHE son células primarias diploides de roedor, con capacidades metabólicas y de baja frecuencia de transformación espontánea en contraste a las líneas celulares establecidas (Isfort et al 1994).

El ensayo con células SHE tiene varias características que limitan su uso en la detección de carcinógenos, incluyendo: **a)** la baja frecuencia de transformación morfológica seguida de la exposición a carcinógenos, que requiere del marcador de grandes números de colonias para permitir el análisis estadístico necesario; **b)** extensas discrepancias en la habilidad de aislar diferentes células y en la disminución de la cantidad de suero para ayudar a la transformación morfológica químicamente producida; y **c)** dificultades con la selección e identificación de las colonias de células transformadas (Combes et al. 1999).

El uso del ensayo con células C3H10T1/2 involucra el uso de fibroblastos que se inhiben al contacto con una baja saturación de densidad y una frecuencia extremadamente baja de transformación espontánea. Las células deben ser primero sincronizadas para detectar agentes alquilantes de corta duración y luego tratadas durante la fase S o el límite de la fase G₁-S del ciclo celular. Sin embargo, el ensayo con C3H10T1/2 aun requiere promover el desarrollo y evaluación independiente (Combes et al. 1999).

También existen ensayos de transformación celular humanos que puede servir como un sistema ideal para la identificación de agentes cancerígenos que promueve la transformación en un contexto más fisiológico. Sin embargo, el número de eventos

genéticos necesarios para transformar células humanas es mayor que en los roedores. Por ejemplo, la introducción de pares de oncogenes, tales como el SV40 del antígeno T (LT) y un alelo oncogénico de H-ras, es suficiente para transformar células de roedores, pero ha fallado en inducir la transformación tumorigénica en células humanas. Esta discrepancia tal vez explique por qué un ensayo de transformación sobre la base de las células humanas aún no se ha establecido para su uso rutinario (Creton et al. 2012).

ESTUDIOS PREVIOS DEL ENSAYO DE TRANSFORMACION DE DOS FASES BALB/c 3T3

El modelo de transformación de dos fases Balb/c 3T3 representa uno de los ensayos de transformación *in vitro* mejor conocidos y es considerado como una herramienta útil en la prueba de químicos o mezcla de complejos para la predicción de carcinógeno (Mascolo et al. 2010).

Umeda (2004) demostró que el uso del ensayo de transformación de dos fases con células Balb/c 3T3 es sensible, reproducible, confiable y relevante para la detección de promotores tumorigénicos, aun habiéndose observado algunas variaciones interlaboratorios se llega a reproducir el mismo fenómeno. Al respecto, estudios de Sakai (2007) mostraron que se debe a su capacidad de complementar los ensayos de genotoxicidad, debido a las grandes similitudes entre el ensayo de dos fases *in vitro* y los ensayos *in vivo*, además es un ensayo de corta duración y el análisis de la expresión de genes involucrado en la transformación celular puede ser usado para el desarrollo de pruebas predictivas de carcinógenos químicos.

Silva-Aguilar y colaboradores (2011) estudiaron el papel del estrés oxidante en el modelo de dos fases Balb/c 3T3 al exponer las células a la mezcla de As-Cd-Pb (NaAsO_2 2 μM , CdCl_2 2 μM y $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 μM) a concentraciones similares a las determinadas en poblaciones ocupacionalmente expuestas, observando que el estrés oxidante generado por los metales correlaciona con el potencial transformante. Esto se comprobó al adicionar estímulos antioxidantes con N-acetil-cisteína (NAC) y observarse una disminución en la eficiencia relativa de formación de foci.

Sasaki y colaboradores (2012) hicieron modificaciones al ensayo de transformación descrito por Kakunaga, usando la clona de células Balb/c 3T3 A31-1-1 en su pase 17 y cuyo ensayo de transformación morfológica consta de 32 días, donde el día uno dan un tratamiento por 24 horas, removiendo el medio después de ese lapso y adicionando medio fresco adicionando cada 24 horas nuevo tratamiento. El día 4 se

elimina el ultimo tratamiento y se suplementan las células con medio fresco. Del día 7 al 25 se hace cambio de medio fresco y el día 31 o 32 se hace la fijación y tinción de las células para observar la presencia de los foci, concluyendo que el protocolo establecido puede ser utilizable para la detección de compuesto con potencial carcinogénico.

JUSTIFICACION

- ❖ OLA-1 (Obg-like ATPasa 1) es una proteína que tiene un peso molecular de 45 KDa que consiste en 396 aa y es expresada en citoplasma. El gen que la codifica tiene varios alias entre los que destacan GTPBP9, PTD004 y DOC45; dicho gen se sobre-expresó en condiciones progresivas de depleción de glutatión (GSH) en un modelo celular carente del gen de la gamma glutamil cisteína sintetasa (γ GCS) o ligasa (GCLC) (Shi ZZ et al. 2000, Rojas E et al. 2003). Posteriormente, con la finalidad de caracterizar funcionalmente a la proteína OLA-1 se identificó su expresión basal en 17 líneas celulares humanas entre las que se encontraban HeLa (cancerosa) y BEAS2B (sana). El silenciamiento de OLA1 en dichas células incrementa la resistencia a agentes oxidantes como terbutil hidroperóxido (tBH) y diamida (agente que depleta tioles celulares) sin afectar la proliferación, apoptosis basal o sensibilidad a otros agentes citotóxicos cuyos blancos fueran mitocondria, citoesqueleto o ADN (Zhang et al. 2009a).

Por otro lado, el silenciamiento de OLA-1 en células cancerosas de mama MDA-MB-231, inhibe la motilidad e invasión de la línea celular altamente metastásica, a través de mecanismos que involucran la modulación intracelular de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) proponiéndola como una proteína reguladora negativa de la respuesta antioxidante, independiente de interacciones con el factor transcripcional Nrf2 (Zhang et al. 2009a, Zhang et al. 2009b). El desequilibrio oxidante está presente en muchas alteraciones fisiológicas entre las que se encuentra el proceso carcinogénico. Es por ello que nuestro grupo está interesado en estudiar las alteraciones en la respuesta oxidante que se presentan durante la transformación celular. Un trabajo previo realizado en nuestro grupo ha evidenciado la capacidad transformante de una mezcla de As-Cd-Pb (NaAsO₂ 2 μ M, CdCl₂ 2 μ M y Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O 5 μ M) en concentraciones de relevancia epidemiológicas en el modelo de transformación de dos fases BALB/c 3T3, se pudo establecer que durante la etapa de iniciación no hay

inducción de respuestas oxidante ni cambios en la actividad de las principales barreras antioxidantes, sin embargo, durante la promoción se evidenciaron tanto la inducción de estrés oxidante como incrementos en la respuesta antioxidante, enzimática y no enzimática, así mismo, la transformación fue inhibida por la presencia de NAC (Silva-Aguilar et al. 2011). Considerando de manera conjunta los antecedentes previamente mencionados el presente proyecto plantea estudiar el efecto que puede tener OLA1 como regulador de la respuesta oxidante en el proceso de transformación inducido por la mezcla de metales, ya que su sub-expresión ha mostrado conferir resistencia ante agentes que depletan tioles y también oxidantes, que son mecanismos de acción que se han atribuido a los metales de interés (As, Cd y Pb) (Beyersmann, D., Hartwig, 2008).

HIPOTESIS

- ❖ Dado que OLA-1 es un regulador negativo de la respuesta antioxidante, se espera esté subexpresada en la etapa de iniciación del proceso de transformación morfológico inducido por la mezcla de As-Cd-Pb (NaAsO_2 2 μM , CdCl_2 2 μM y Pb ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) $_2$ ·3 H_2O 5 μM) en el modelo Balb/c 3T3 A31-1-1.

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar el efecto de OLA-1 durante el proceso de transformación inducido por la mezcla As-Cd-Pb (NaAsO_2 2 μM , CdCl_2 2 μM y Pb ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) $_2$ ·3 H_2O 5 μM) en el modelo Balb/c 3T3 A31-1-1.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) durante el proceso de transformación inducido por la mezcla As-Cd-Pb (NaAsO_2 2 μM , CdCl_2 2 μM y $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 μM).
- ❖ Identificar la expresión génica y proteica de OLA1 durante el proceso de transformación celular (iniciación: días 1, 4, 7 y promoción: días 11, 16 y 21) inducida por la mezcla de As-Cd-Pb (NaAsO_2 2 μM , CdCl_2 2 μM y $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 μM).
- ❖ Evaluar la correlación entre los niveles de especies reactivas de oxígeno inducidas por un generador clásico (cloruro férrico) y la expresión de la proteína OLA-1.
- ❖ Determinar la correlación entre los niveles de especies reactivas de oxígeno y la expresión proteica de OLA1 en la transformación inducida por la mezcla de As-Cd-Pb (NaAsO_2 2 μM , CdCl_2 2 μM y $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 μM).

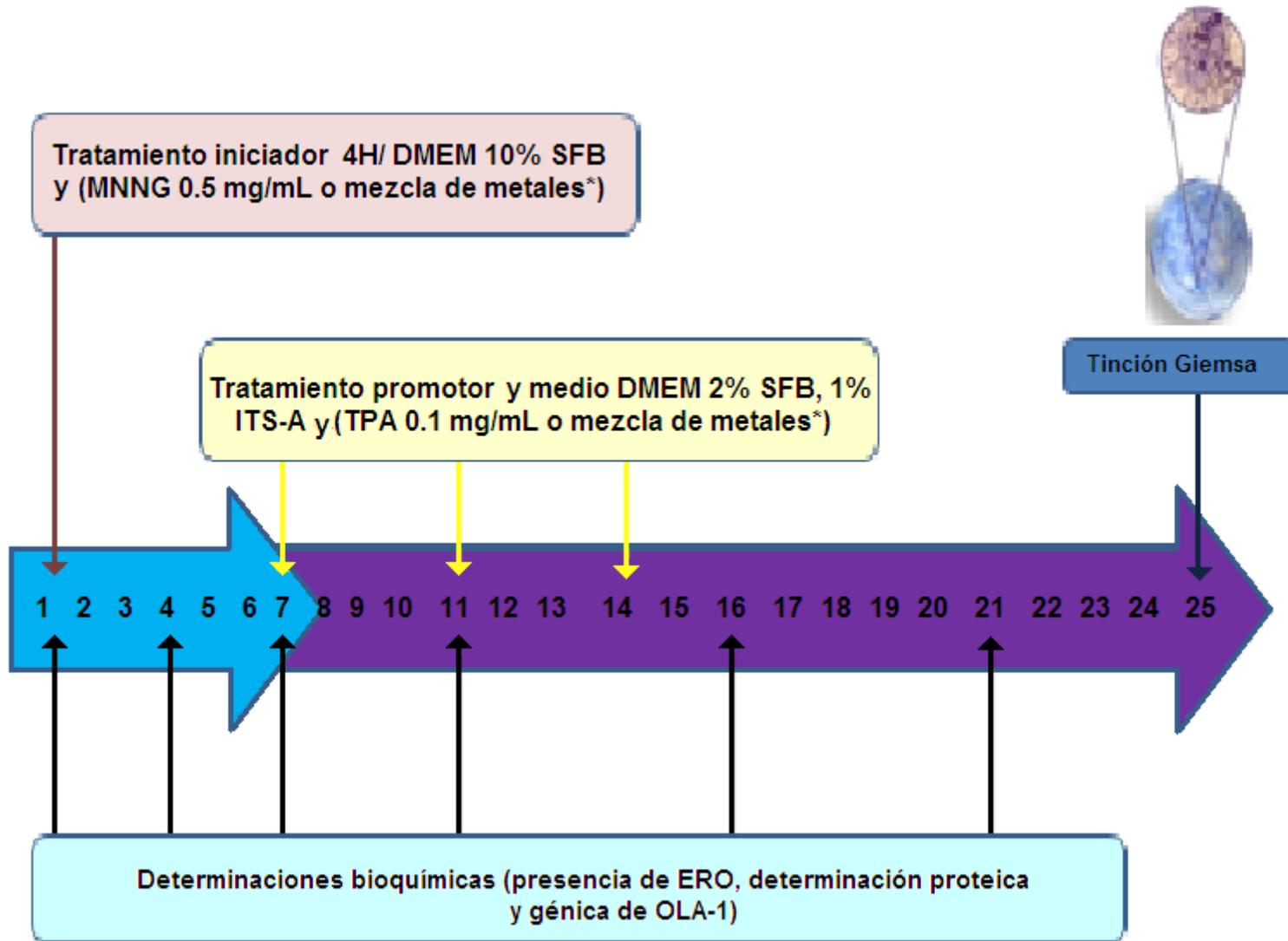
METODOLOGIA

9.1. Ensayo general de transformación de dos fases Balb/c 3T3

El protocolo de transformación constó de 25 días dividido en dos fases: la fase de iniciación entre los días 1-7 y la fase de promoción entre los días 7-25: Las células Balb/c 3T3 fueron sembradas 48 h antes del tratamiento a una densidad de 5×10^5 células en cajas de 100mm de diámetro con medio DMEM suplementado al 10% con SFB. Transcurridas 48 h de incubación, las células fueron expuestas a la mezcla As-Cd-Pb (NaAsO_2 $2 \mu\text{M}$, CdCl_2 $2 \mu\text{M}$ y $\text{Pb} (\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $5 \mu\text{M}$) o MNNG ($0.5 \mu\text{g/mL}$) como estímulo iniciador durante 4 h. Una vez transcurrido el tiempo las células fueron resembradas a una confluencia de 1×10^4 células por caja de 100mm para los controles negativos y positivos (MNNG-TPA) y las condiciones: metales como iniciadores (Metales-TPA), los metales como promotores (MNNG-Metales) y los metales como iniciador-promotor (Metales-Metales). El día 7 se hizo cambio de medio fresco DMEM suplementado con 2% SFB y 1% ITS-A y se dio el primer estímulo promotor con la mezcla de metales o TPA ($0.1 \mu\text{g/mL}$). Los días 11 y 14 se dieron el segundo y tercer estímulos promotores con cambio de medio. Los días 9, 16, 18 y 21 se hizo cambio de medio DMEM + 2% SFB + 1% ITS-A. El día 25 las células fueron lavadas y fijadas con etanol frío al 70% y teñidas posteriormente con solución Giemsa para visualizar los foci, los cuales son los que determinan el potencial transformante de los metales. Los criterios para determinar la presencia de un foci son: **a)** tener alta basofilia (Kajiwara et. al. 2003 ; Tsuchiya et. al. 2005; Sakai 2007); **b)** 2mm de diámetro (Tsuchiya et. al. 2005; Sakai 2007); **c)** formación de multicapa (Kajiwara et. al. 2003 ; Tsuchiya et. al. 2005; Sakai 2007); **d)** orientación azarosa de las células en el foci (Kajiwara et. al. 2003 ; Tsuchiya et. al. 2005; Sakai 2007); y **e)** agregados de células fusiformes (Sakai 2007).

Una vez identificados los foci, se cuantificaron y se determinó la eficiencia relativa transformadora de colonias (RCFE) mediante la relación existente con respecto a la condición de control negativo. La estrategia experimental realizada se muestra en el siguiente diagrama.

DIAGRAMA DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL REALIZADA



Modificado Tsuchiya 2005.

9.2. Determinación de ERO por oxidación de dihidrorhodamina 123

El principio de este método está basado en la oxidación de la dihidrorhodamina 123 dependiente de la cantidad de ERO, para formar el compuesto fluorescente de rodamina 123 que se visualiza por microscopia de fluorescencia.

Las células se cosecharon los días 1, 4, 7, 11, 16 y 21 del ensayo de transformación. Al retirar los cubreobjetos de la caja se colocaron sobre PBS para quitarles el medio, siguiendo el protocolo descrito en Ferrera et al. 2008, basado en la oxidación de dihidrorhodamina 123 a rodamina 123 por la presencia de especies reactivas de oxígeno. Esta técnica consistió en añadir 20 μL a cada cubreobjetos de una mezcla que contiene 18 μL de buffer A (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.8 mM CaCl_2 , 5 mM glucosa y 15 mM HEPES) y 2 μL de una solución de dihidrorhodamina 10 μM (1 μM) e incubar por 2 minutos, antes de evaluar al microscopio de fluorescencia (Zeiss, Axistar) e identificar la presencia de ERO intracelular, usando el filtro verde y objetivo 40x. La preparación de las laminillas se hace de una por una para evitar que se pierda la fluorescencia de la muestra y no se logre identificar la presencia de ERO. Para el análisis se realizó un conteo de células en 5 campos, con al menos 100 células.

9.3. Determinación proteica de OLA-1 por inmunocitoquímica

El objetivo de esta metodología es determinar la proteína de OLA-1. Para realizar las inmunocitoquímicas se colocó un cubreobjetos estéril dentro de la caja de cultivo para crecer sobre él las células. Estos se cosecharon para hacer las determinaciones de la fase de iniciación (días 1, 4 y 7) y la promoción (días 11, 16 y 21). Los cubreobjetos se trataron de la siguiente manera:

- ✓ Se fijaron las células de los cubreobjetos con la solución fijadora que tiene 90% de etanol, 5% de ácido acético y 5% de agua destilada, durante 30 minutos.
- ✓ Se rehidrataron las células en un tren de alcoholes: etanol 95%, etanol 70%, etanol 50% y agua por 5 minutos en cada alcohol.
- ✓ Se lavaron las células con PBS+H₂O₂ 0.1%.
- ✓ Después del lavado se incubaron las células durante 30 minutos con el anticuerpo contra OLA-1 (1:200; anticuerpo marca Santa Cruz).
- ✓ Se lavaron nuevamente las células con PBS+H₂O₂ 0.1%.
- ✓ Se incubaron las células con un segundo anticuerpo HRP [1:500] durante 30 minutos.
- ✓ Se lavaron nuevamente con PBS+H₂O₂ 0.1%.
- ✓ Se deshidrataron las células en tren de alcoholes: etanol 50%, etanol 75%, etanol 90% durante 5 minutos en cada alcohol.
- ✓ Se montaron los cubreobjetos con glicerol al 80% y se sellaron resina.
- ✓ Posteriormente se observaron las laminillas en microscopio (Zeiss, Axistar) bajo un mismo estándar de brillo, saturación de luz, en objetivo

60x y determinando el número de células con marca positiva con respecto a una preparación sin anticuerpo anti-OLA1.

Determinación de la expresión génica de OLA-1 por RT-PCR

Para la realización del RT-PCR, se hizo la extracción del RNA siguiendo el protocolo de la extracción con Trizol de invitrogen:

- Se levantaron las células con 1 ml de trizol y se recolectaron en un tubo eppendorf, de 1.5 mL, adicionando 200 μ L de cloroformo por cada mililitro de trizol y se agitaron vigorosamente, dejándose reposar 10 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugaron a 12,000 g por 15 min a 4°C. Se extrajo la fase acuosa cuidadosamente y se recolectó en un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio y se le agregaron 500 μ L de isopropanol, mezclando cuidadosamente las fases y dejando reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se centrifugaron a 12,000 g por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se le adicionó 1 mL de etanol al 75% (preparado con agua DEPEC), mezclando con vortex la muestra y centrifugando a 7,500 g por 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se añadió agua libre de ADNAsas (20-50 μ L) y las muestras se pusieron a baño María a 55°C para disolver el RNA, cuantificándolo posteriormente en el equipo NANO DROP. Se hizo una electroforesis con gel de agarosa para observar la integridad del RNA.

El RT-PCR se realizo siguiendo el protocolo de Access RT-PCR System:

- Se preparan 50 μ L de la siguiente mezcla de reacción para realizar un RT-PCR y probar los oligos diseñados y sintetizados en el Instituto de Fisiología Celular de

la UNAM (ver cuadro de la mezcla de reacción) y se realizó el RT-PCR para determinar la presencia de OLA-1 en cada una de las muestras.

Cuadro representativo de la mezcla de reacción empleada para el RT-PCR.

Reactivos	Volumen (μL)	Concentración Final
Buffer de reacción	10	1x
Mezcla de dNTP	1	0.2 mM
Primer Foward	50 pM	1 μM
Primer Revers	50 pM	1 μM
MgSO ₄ 25 mM	2	1 mM
Transcriptasa reversa	1	0.1 u/ μL
ADN polimerasa	1	0.1 u/ μL
RNA templado	1 μg	10 ³ - 10 ⁶ copias
Agua libre de ADNAsas	La necesaria para llegar 50 μl finales de reacción	-

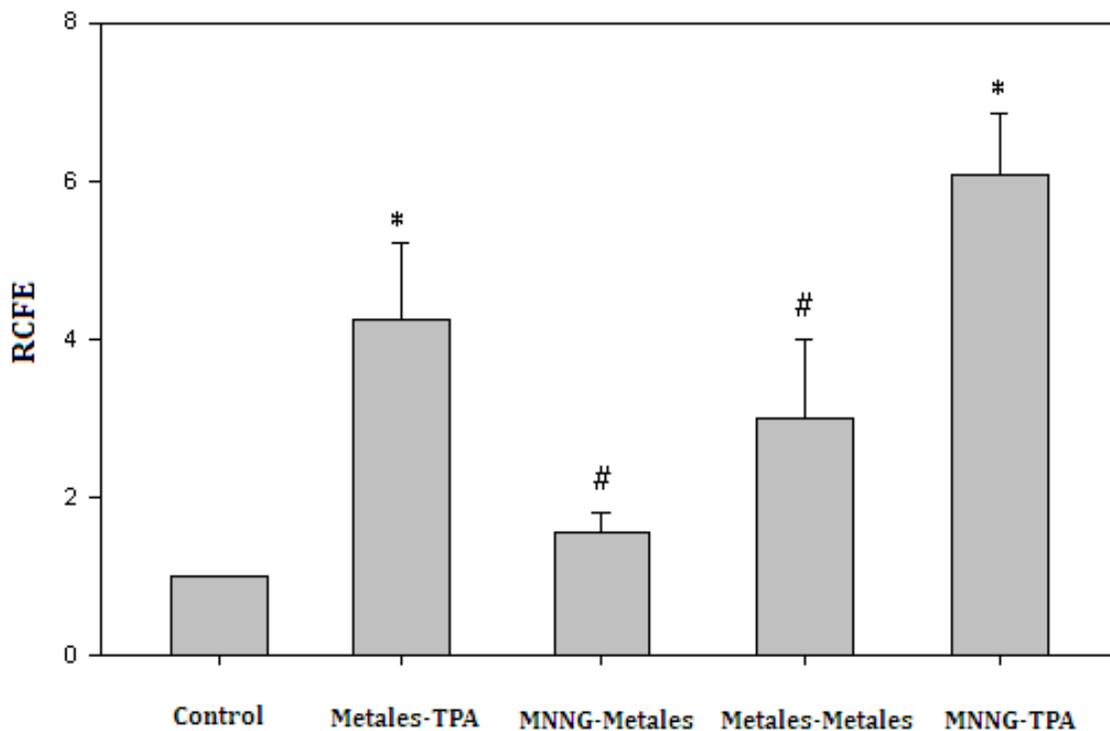
Se realizó el RT-PCR en termociclador TECHINE modelo TC-512, bajo las condiciones de 32 ciclos a una T_M de 60°C, tras haber realizado una curva de condiciones para estandarizar la condición óptima. Una vez realizado el RT-PCR, se llevó a cabo una electroforesis para observar los productos de la reacción, preparando un gel al 3% agarosa 1% en TBE teñido con bromuro de etidio, corriendo el gel con una fuente de poder Amersham Pharmacia Biotech 60-100 V, con amperaje libre, por una hora en TBE 1X (ver apéndice), verificando la presencia del producto de interés por medio de un transiluminador marca TFX-20M y analizando el producto por medio del programa Kodak 1D.

RESULTADOS

La capacidad transformante de la mezcla metales As, Cd y Pb (2 μ M, 2 μ M, 5 μ M respectivamente) se determinó mediante el ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3, cuyo resultado se muestra en la gráfica 1 con base en la eficiencia relativa transformadora de colonias (RCFE por sus siglas en ingles) que se calcula de la siguiente forma:

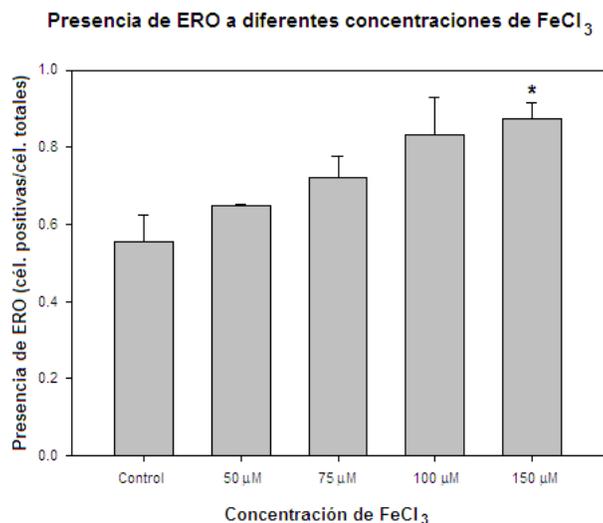
$$\text{RCFE} = \frac{\text{número de foci experimentales}}{\text{número de foci del control}}$$

Capacidad transformante de la mezcla de metales As, Cd y Pb

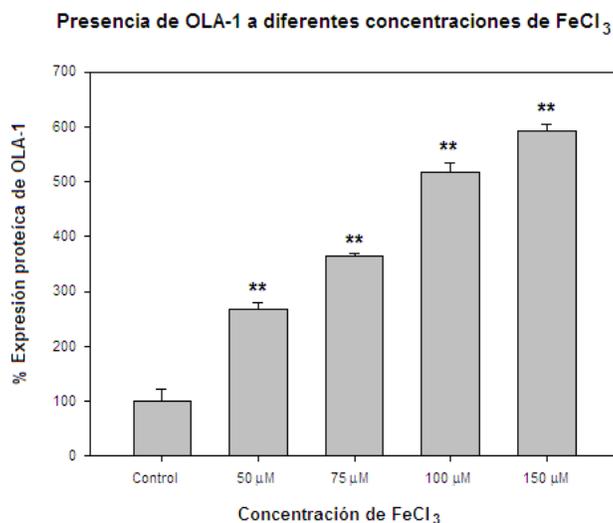


Gráfica 1. Eficiencia relativa transformadora de colonias (donde el * denota la diferencia estadísticamente significativa respecto al control determinada por ANOVA y con una prueba de Tukey ($p < 0.05$) y # denota la diferencia estadísticamente significativa respecto a la condición MNNG-TPA, que es el control positivo del ensayo; las barras que muestra el gráfico es el error estándar; $n=6$).

Para determinar los niveles de especies reactivas de oxígeno y la expresión proteica de OLA-1 se empleo como control positivo al cloruro férrico en tratamientos de 24 h, el cual clásicamente se emplea como inductor de ERO, para lo cual se realizó una curva dosis-efecto en la que se puede documentar la relación existente entre ambos parámetros, mostrándose mayor sensibilidad a los cambios a través de la expresión de OLA-1, datos que se muestran en la gráfica 2 y 3.

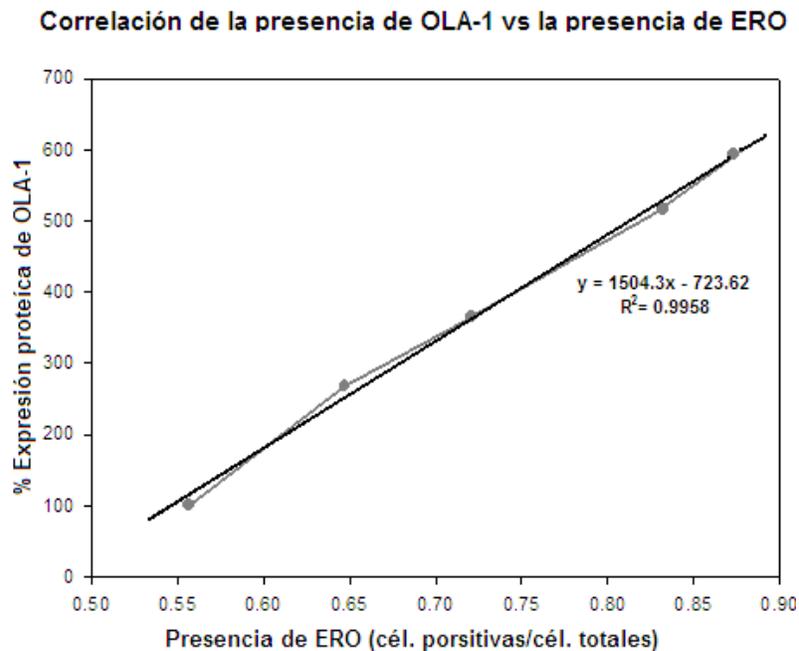


Gráfica 2. Presencia de ERO durante el tratamiento 24 horas a diferentes concentraciones de FeCl₃. El análisis estadístico se llevó a cabo por ANOVA, donde los * muestran las diferencias estadísticamente significativas respecto al control; las barras están en base a la desviación estándar, * <0.05, n=2.



Gráfica 3. Expresión proteica de OLA-1 por inmunocitoquímica durante el tratamiento 24 horas a diferentes concentraciones de FeCl₃. El análisis estadístico se llevó a cabo por ANOVA, donde los * muestran las diferencias estadísticamente significativas respecto al control; barras están en base a la desviación estándar, * <0.05, ** <0.01 y *** <0.0001, n=2.

La gráfica 4 muestra la correlación simple (Pearson) que determina la dependencia entre ambas determinaciones, el % de expresión proteica de OLA-1 y la presencia de ERO.



Gráfica 4. Correlación simple de Pearson, entre la presencia de OLA-1 y la presencia de ERO tras el tratamiento (24 horas) con diferentes concentraciones de FeCl_3 , para demostrar la relación que presenta el incremento de OLA-1 al incrementar ERO, $p < 0.01$.

En las imágenes 1 y 2 se observan las fotografías de microscopía de luz y fluorescencia en microscopio Zeiss para determina la presencia de ERO por la oxidación de la dihidrorhodamina 123 y la presencia de la proteína de OLA-1 durante el tratamiento de 24 horas con cloruro férrico a concentración de $100 \mu\text{M}$ y su respectivo control por inmunocitoquímica.

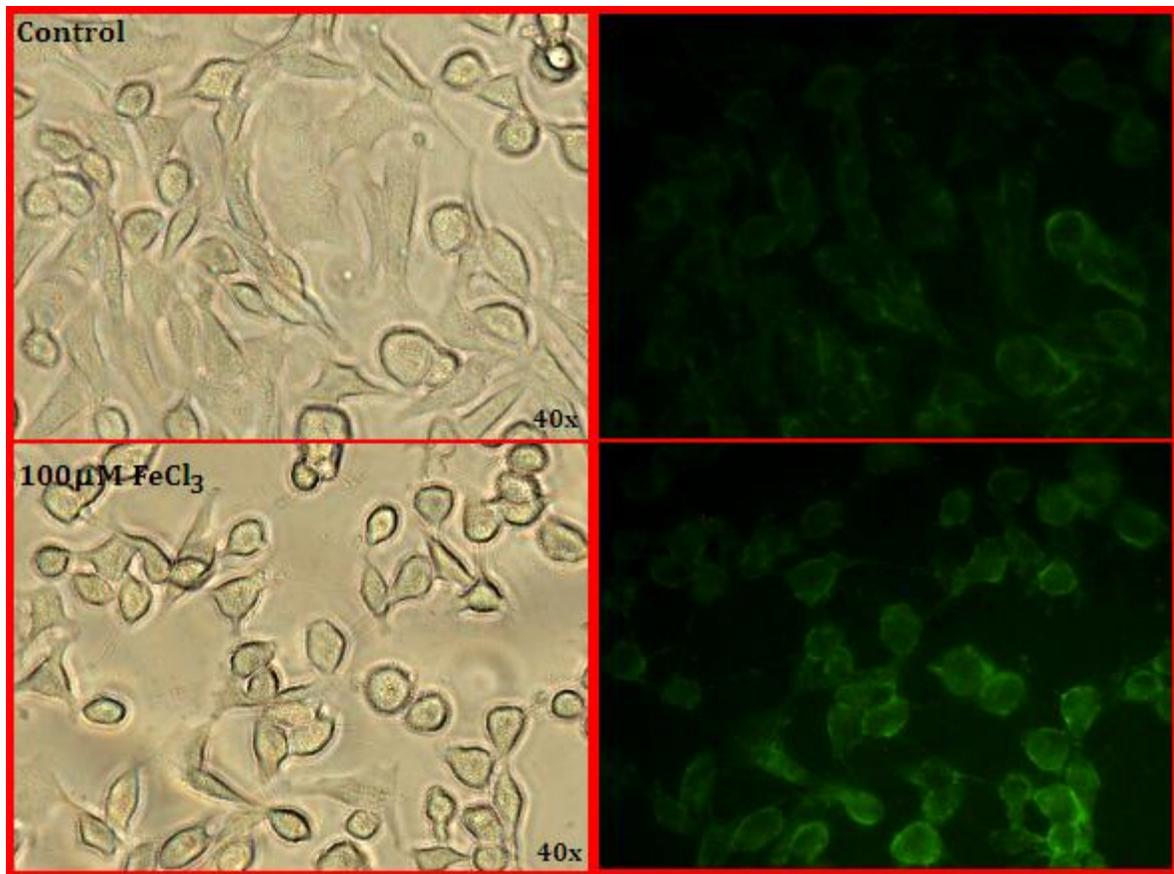


Imagen 1. Microscopia de luz (izquierda) y de fluorescencia (derecha), vista en objetivo 40x, observándose las células control y las células tratadas 24 horas con cloruro férrico 100 μM . Las células tratadas con FeCl_3 al adicionar la dihidrorhodamina 123, muestran mayor fluorescencia, haciendo así evidente la capacidad de este compuesto de generar especies reactivas de oxígeno.

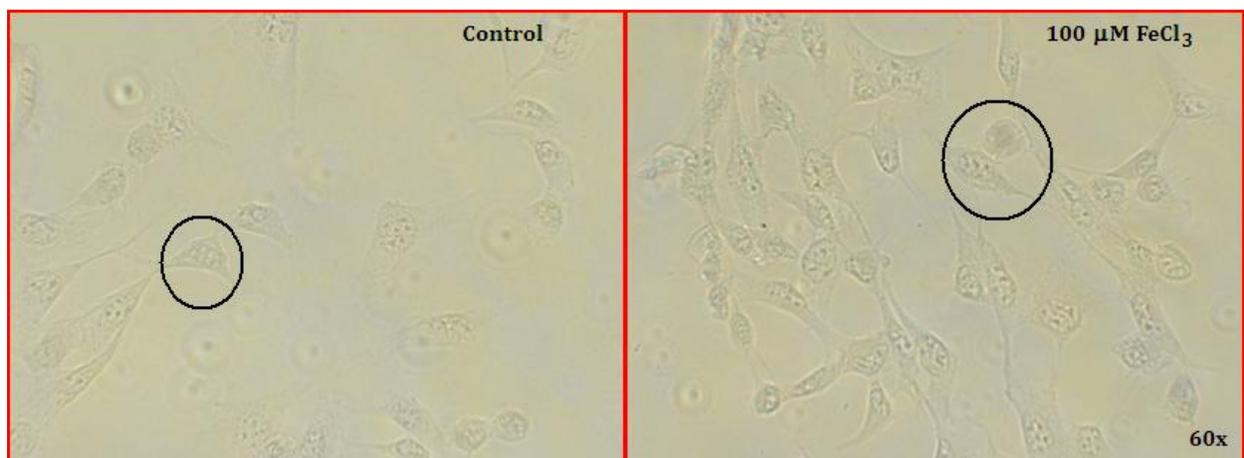
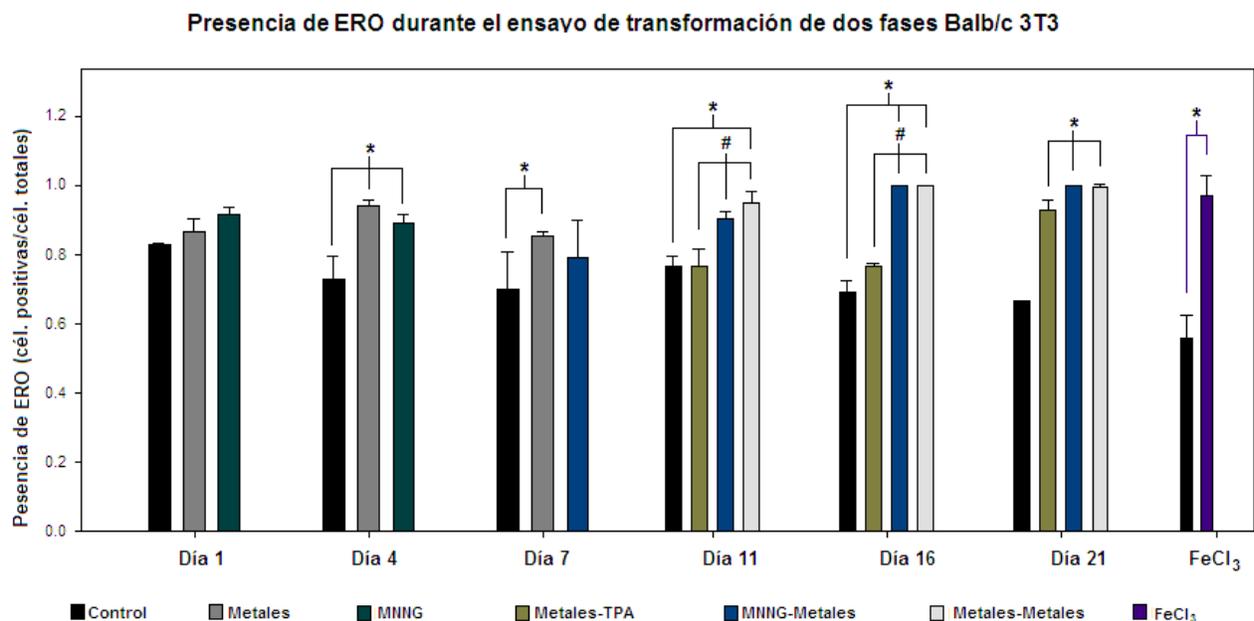


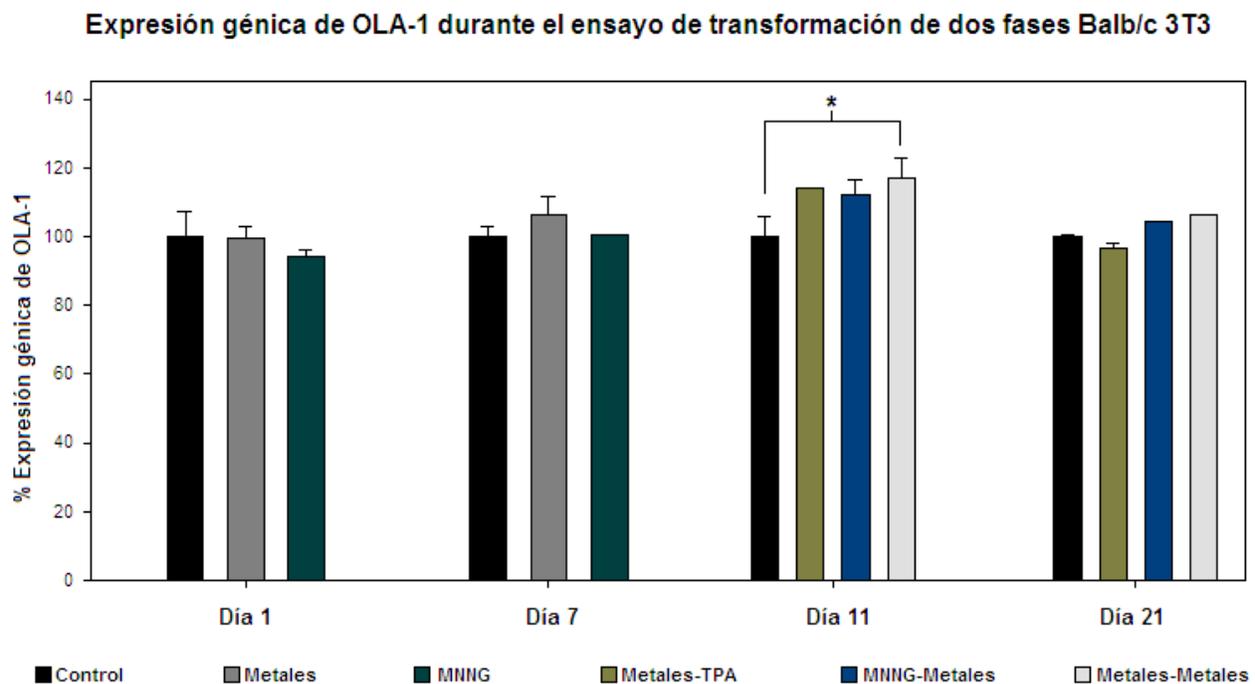
Imagen 2. Microscopia de luz, vista en objetivo 60x, observándose las inmunocitoquímicas contra OLA-1 para determinar la presencia de la proteína de OLA-1 durante el tratamiento de 24 horas con cloruro férrico 100 μM . Se observa que las células tratadas con FeCl_3 presentan mayor proteína en su citoplasma, observándose que en algunas se observa en núcleo. La imagen de la izquierda corresponde al control, observando que la célula dentro del círculo es una célula marcada positivamente para OLA-1.

En la gráfica 5 se muestran los niveles de ERO durante la iniciación (días 1, 4 y 7) y la promoción (días 11, 16 y 21) del ensayo de transformación inducido por la mezcla de As-Cd-Pb. Los resultados muestran que durante la iniciación los metales son capaces de elevar la generación de especies reactivas de oxígeno, mientras que en la promoción esta capacidad es más evidente en los tratamientos en los que se emplean como estímulo promotor y como ambos (iniciador-promotor). La eficiencia metodológica de determinó usando como control positivo al cloruro férrico. Hay que hacer notar que el tratamiento de metales como estímulo iniciador no incrementa los niveles de ERO durante la promoción sino hasta el día 21 del ensayo.



Gráfica 5. Niveles de ERO a través del ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3 determinados por la oxidación de dihidrorhodamina 123. Durante la etapa de iniciación los días 1, 4 y 7 y de promoción los días 11, 16 y 21. El análisis estadístico se hizo en base a un análisis de varianza ANOVA y Tukey, donde los * muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control y los # muestran las diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales; las barras que muestra el grafico es la desviación estándar; $n = 4$.

La gráfica 6 muestra la expresión génica de OLA-1 durante el ensayo de transformación celular inducido por la mezcla de metales, mostrándose cambios génicos de OLA-1 solo en la condición en la que los metales se emplearon como estímulo iniciador-promotor, esto se determinó mediante un RT-PCR en el cual se emplearon los oligos del gen hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HPRT) que es un gen constitutivo para la normalización de los datos.



Gráfica 6. Expresión génica de OLA-1 a través del ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3 inducido por la mezcla de As-Cd-Pb. El análisis estadístico de las densitometrías se hizo en base a un análisis de varianza ANOVA y Tukey, donde los * muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control; $n=2$.

En las imágenes 3 y 4 se observan los gels de los productos de generados durante el RT-PCR para la iniciación y promoción de las muestras en el ensayo de transformación inducido por la mezcla de metales, observándose que la primer banda de 203 pb es el producto de OLA-1 y la segunda banda de 179 pb es el gen constitutivo (Hprt-1).

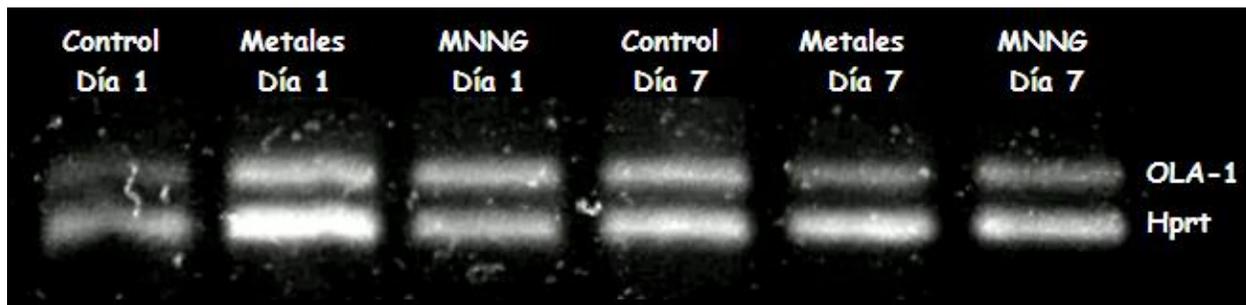


Imagen 3. Productos generados por RT-PCR durante la iniciación de la transformación inducida por la mezcla de metales, la primer banda muestra el producto de OLA-1 con 203 pb y la segunda banda corresponde al gen constitutivo Hprt con 179 pb.

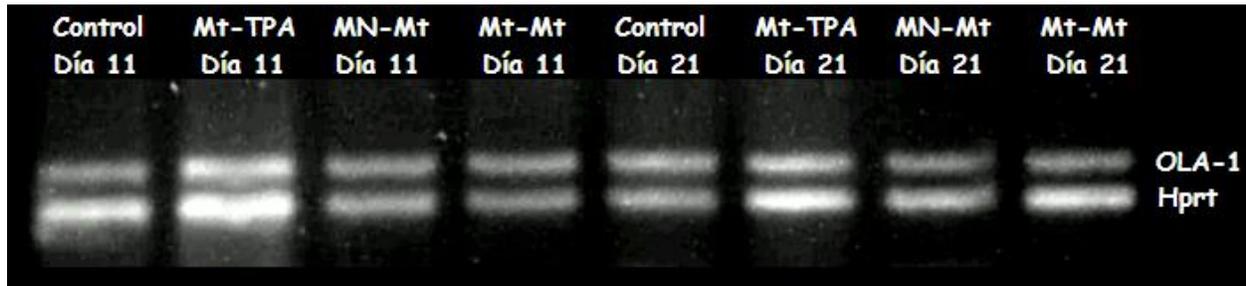
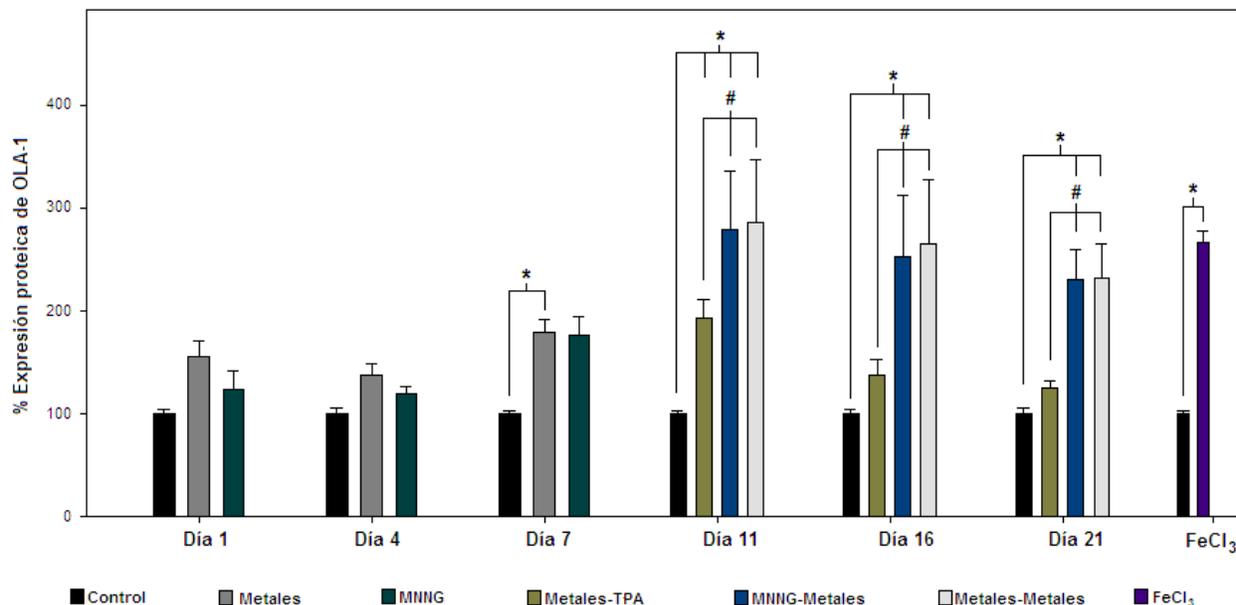


Imagen 4. Productos generados por RT-PCR durante la promoción de la transformación inducida por la mezcla de metales, la primer banda muestra el producto de OLA-1 con 203 pb y la segunda banda corresponde al gen constitutivo Hprt con 179 pb. Mt-TPA: metales-TPA; MN-Mt: MNNG-metales; Mt-Mt: metales-metales.

En la gráfica 7 se muestra la expresión proteica de OLA-1 durante el ensayo de transformación inducido por la mezcla de metales As-Cd-Pb, observándose claramente que los niveles de OLA-1 incrementan paulatinamente a través del proceso, sin embargo, muestran los mayores niveles durante la promoción en los tratamientos en los que la mezcla de metales se administran como promotor y ambos (iniciador-promotor). La respuesta proteica de OLA-1 fue inducida con cloruro férrico como control positivo.

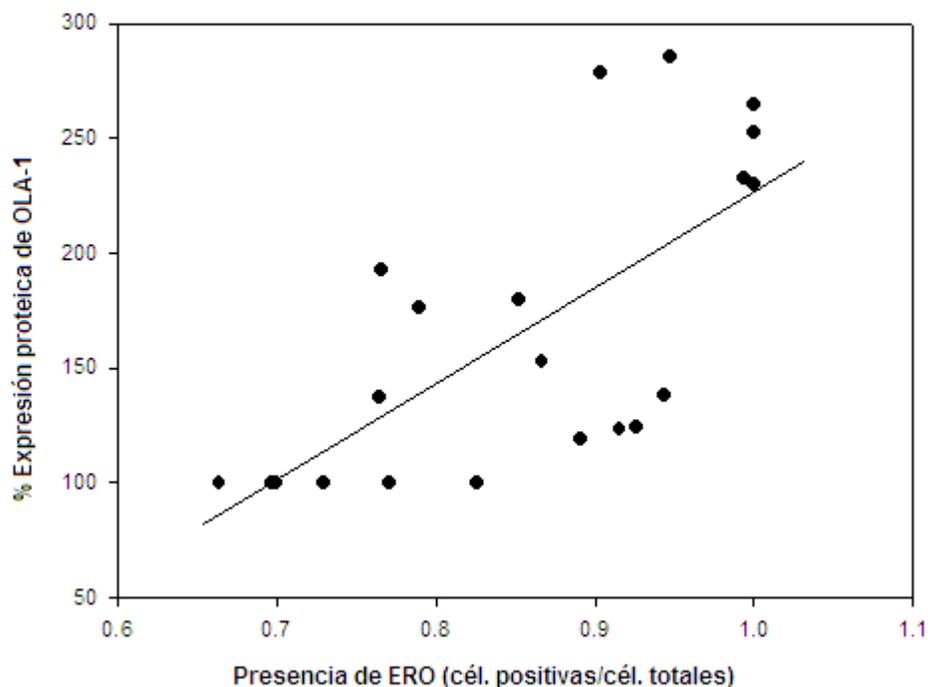
Presencia de OLA-1 durante el proceso de transformación de dos fases Balb/c 3T3



Gráfica 7. Expresión proteica de OLA-1 a través del ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3 inducido por la mezcla de metales As-Cd-Pb. Durante la etapa de iniciación los días 1, 4 y 7 y de promoción los días 11, 16 y 21. El análisis estadístico se hizo en base a un análisis de varianza ANOVA y Tukey, donde los * muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control y los # muestran las diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales; las barras que muestra el grafico es la desviación estándar; $n=4$.

Para determinar la relación que existe entre la presencia de ERO y OLA-1 en el modelo de transformación inducido por la mezcla de metales As-Cd-Pb, se realizó una correlación simple de Pearson, ya que empleando el control positivo generador de especies reactivas se obtuvo un buen coeficiente de correlación con una p extremadamente significativa. Los resultados de este análisis se presentan en la gráfica 8 y se determinó un coeficiente de correlación de **0.694** con un valor de p de **0.000481**, lo cual describe dependencia entre ambos parámetros.

Correlación de la presencia de OLA-1 vs la presencia de ERO durante el ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3



Gráfica 8. Correlación simple de Pearson, entre la presencia de OLA-1 y la presencia de ERO durante el ensayo de transformación inducido por la mezcla de metales. $r = 0.694$ con un valor de p de 0.000481 .

En la imagen 5 y 6 se observan las fotografías de microscopia de luz y fluorescencia (en microscopio Zeiss) para determina la presencia de ERO por la oxidación de la dihidrorhodamina 123 y la presencia de la proteína de OLA-1 durante el día 16 del ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3, mostrando el respectivo control para cada determinación.

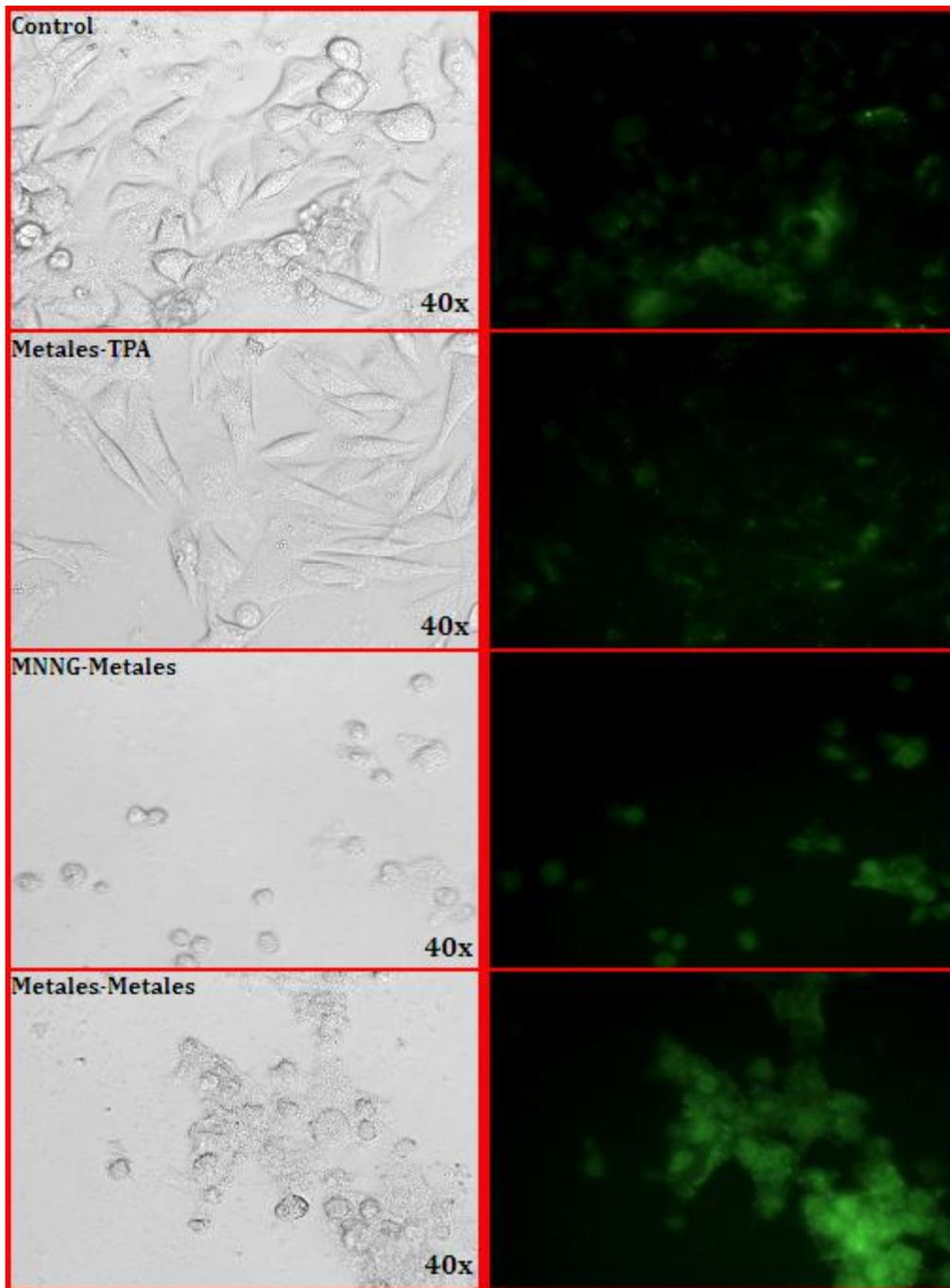


Imagen 5. Microscopia de luz (izquierda) y de fluorescencia (derecha), vista en objetivo 40x, observándose las células control y las células tratadas con la mezcla de metales como estímulo iniciador y promotor. Las imágenes son representativas del día 16 del ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3 inducido por la mezcla de metales, observándose la oxidación de la dihidrorhodamina 123 por la presencia de especies reactivas de oxígeno, observándose mayor aumento en las condiciones de MNNG-Metales y Metales-Metales.

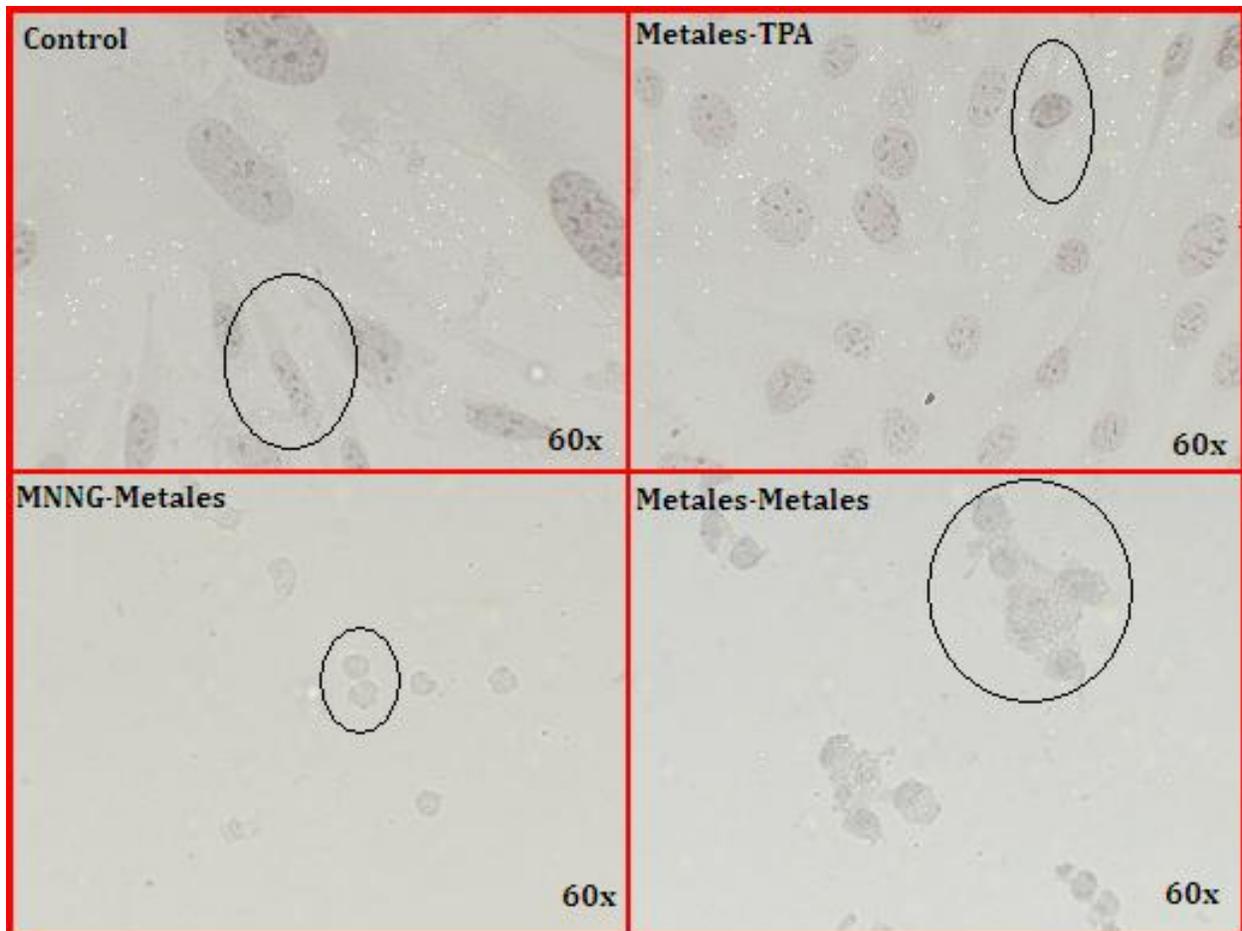


Imagen 6. Microscopia de luz, vista en objetivo 60x, observándose las inmunocitoquímicas contra OLA-1 para determinar la presencia de la proteína de OLA-1 durante el día 16 del ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3 inducido por la mezcla de metales. Se observa que las células tratadas con metales como estímulo promotor (MNNG-Metales) y iniciador-promotor (Metales-Metales) presentan mayor proteína en su citoplasma, observándose que en algunas se observa en núcleo, principalmente en estas condiciones que casi no se observa citoplasma, observando que las células dentro del círculo son células marcadas positivamente para OLA-1.

ANALISIS DE RESULTADOS

La mezcla de metales As-Cd-Pb es una realidad presente en ambientes aledaños a zonas mineras y recicladoras de baterías, sin embargo, poco se ha determinado en cuanto a los mecanismos que explican sus efectos tóxicos. Dentro de las propuestas que surgen como conclusión de la revisión realizada por Wang y Fowler (2008), está el que en pruebas tradicionales como la inducción de cambios morfológicos y parámetros bioquímicos de la toxicidad en órganos blanco fueron efectivos para exposiciones a altas concentraciones; mientras que biomarcadores de estrés oxidante, parámetros de alteración de biosíntesis de grupo hemo y proteínas de estrés respondieron mejor a concentraciones bajas. Estos hallazgos condujeron a nuestro grupo a determinar marcadores de estrés oxidante y respuesta antioxidante en el sistema de transformación de dos fases (Silva-Aguilar et al., 2011).

Al igual que en el trabajo previo del grupo, en este proyecto se documenta la capacidad transformante del modelo tras la exposición a la mezcla de As-Cd-Pb (NaAsO_2 2 μM , CdCl_2 2 μM y $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 μM), si bien, estas son exposiciones epidemiológicamente relevantes ya que son la determinadas en individuos ocupacionalmente expuestos, se identificaron tanto respuestas esperadas para altas concentraciones como la inducción de cambios morfológicos evidenciados por la formación de foci (transformación morfológica de las células). Esto se muestra en la grafica 1, donde la mezcla de metales fue capaz de producir transformación celular, observándose un mayor efecto como iniciadores.

Para observar si existe una correlación entre la producción de ERO y la presencia de OLA-1, se trataron las células por 24 horas a diferentes concentraciones de cloruro férrico, FeCl_3 , un inductor positivo de ERO, observándose en las gráficas 2 y

3 la presencia de ERO y OLA-1 durante las 24 h, mostrando que existe una correlación entre la producción de ERO y la presencia de OLA-1, ya que al aumentar la producción de ERO aumenta de forma lineal la presencia de OLA-1, observando esta correlación en la gráfica 4. Este efecto se observa también durante el ensayo de transformación celular, observándose que al ir aumentando la producción de ERO, aumenta la presencia de OLA-1 sobre todo durante la etapa promotora, observándose un incremento tanto en la producción de ERO como de OLA-1, teniendo un efecto como el reportado bajo el alias de DOC45 por Sun y colaboradores (2011), estos autores encontraron sobre-expresión de DOC45 en diversos tipos de cánceres, entre los cuales destacan principalmente colon, recto, estómago, ovario, pulmón y útero. También reportan que la expresión de DOC45 se encuentra regulada por el daño al ADN, lo cual es un fenómeno que se presenta durante la transformación, específicamente en la etapa de promoción, que es la etapa en la que determinamos la mayor expresión de la proteína OLA-1.

Al observar por microscopia de fluorescencia se obtuvieron las imágenes 1, donde se muestra claramente la producción de ERO observándose un incremento, ya que comparando con la condición de FeCl_3 100 μM con el control se observa claramente. Respecto a la imagen 2 se observan las microscopias de luz para identificar la proteína de OLA-1, observándose un precipitado en el citoplasma de color café, al llevar a cabo la inmunocitoquímica, que aumenta respecto a la condición de FeCl_3 100 μM .

Con respecto al comportamiento que ha inducido esta mezcla a bajas concentraciones, específicamente en cuanto a alteraciones a nivel bioquímico y en proteínas de estrés esperadas, en este trabajo reportamos que la mezcla de As-Cd-Pb induce incrementos paulatinos de las ERO y la expresión proteica de OLA-1. Esto se

documenta en los gráficos 5 y 7, donde se observa la capacidad de los metales de producir ERO como un mecanismo indirecto de la genotoxicidad (Beyersman et al, 2008) observándose un cambio significativo a partir del día 4, manteniéndose hasta el día 16 del ensayo en comparación con sus respectivos controles, siendo este día cuando comienzan a visualizarse la aparición de foci como marcador morfológico de transformación celular (Tsuchiya et al, 2005).

En cuanto al gráfico 7 los cambios en la presencia de la proteína de OLA-1 se observan a partir del día 7, aumentando los días 11 y 16 y disminuyendo nuevamente al día 21, que es cuando ya se dio el establecimiento de la transformación celular. Sin embargo estos efectos no se ven tan evidentes a nivel de la expresión génica de OLA-1 ya que no se observan cambios estadísticamente significativos, a excepción del día 11, habiendo un mayor incremento de OLA-1 en la condición tratada con la mezcla de metales como iniciador y como promotor. Las imágenes de microscopia de fluorescencia para ERO y de microscopia de luz para OLA-1 se observan en la imagen 5 y 6, observándose un incremento tanto de ERO como de OLA-1 durante el día 16 con respecto al control y las condiciones experimentales, así mismo, se observa un cambio en la morfología de las células durante la condición de MNNG-Metales y Metales-Metales.

Con estos hallazgos sabemos el efecto de OLA-1 a través de la transformación inducida por la mezcla de metales As-Cd-Pb incrementando hacia la etapa de promoción, sin embargo habrá que realizarse otro tipo de investigación más puntual para determinar su relación directa al proceso.

Al realizar una prueba de correlación de Pearson, se observa que OLA-1 tiene una correlación positiva con respecto a las especies reactivas de oxígeno, observándose que una variable afecta a la otra de forma lineal, ya que al aumentar las

especies reactivas de oxígeno aumenta la expresión proteica de OLA-1, observando lo propuesto por Zang (2009a,b) que al tener una sobreexpresión de OLA-1 aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno.

CONCLUSIONES

- La mezcla de metales As-Cd-Pb tiene la capacidad de inducir la transformación morfológica, teniendo un mayor potencial como estímulo iniciador del proceso.
- A través del proceso de transformación hay un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, el cual tiene mayores efectos cuando la mezcla de metales se administra como estímulo promotor.
- A través del proceso de transformación hay un incremento en la expresión proteica de OLA-1 que es de mayor magnitud en los tratamientos donde la mezcla de metales es el estímulo promotor.
- Hay una correlación directa entre los niveles de especies reactivas de oxígeno y la expresión proteica de OLA-1 en tratamientos con cloruro férrico, un potente generador de especies reactivas.
- Se observa una correlación directa entre los niveles de especies reactivas de oxígeno con la expresión proteica de OLA-1 durante el ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3 inducido por la mezcla de metales.

PERSPECTIVAS

Como perspectiva se tiene el hacer uso del siRNA para llevar a cabo el silenciamiento de OLA-1 en primer instancia de forma transiente observando si existe un posible efecto sobre la capacidad transformante de la mezcla de metales As-Cd-Pb, bajo esta condición de silenciamiento. Debido a que OLA-1 es un regulador negativo de la respuesta antioxidante, se esperaría que al dar un estímulo iniciador con la mezcla de metales, la cantidad de ERO se vieran disminuidas y por ende no habría estrés oxidante lo cual pueda limitar la transformación celular morfológica del modelo.

De forma preliminar, se realizó un experimento silenciando OLA-1 con un kit de Santa Cruz Biotechnology Inc. haciendo una transfección bajo las indicaciones del proveedor. Para determinar si el siRNA es capaz de entrar en la célula y así mismo determinar el volumen a utilizar de la mezcla de siRNA, se realizó un ensayo en el cual se adicionó el control positivo con un conjugado FITC y se observó al microscopio de fluorescencia, observándose lo siguiente:

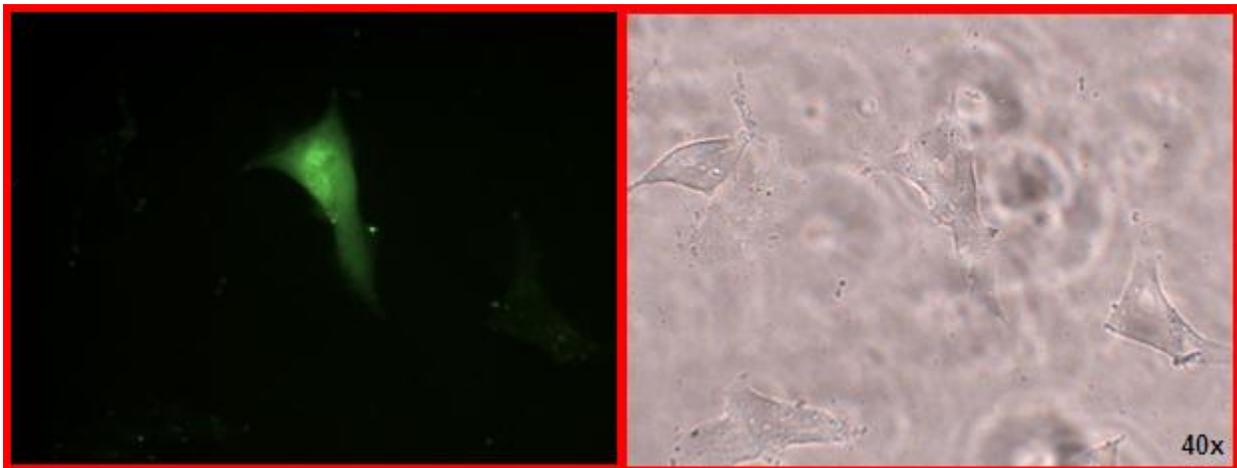


Imagen 1. Microscopía de fluorescencia y de luz de las células transfectadas con el siRNA para OLA-1 a un volumen de 2 μ L de siRNA, donde se observa que se está dando la unión del siRNA con el mRNA de OLA-1.

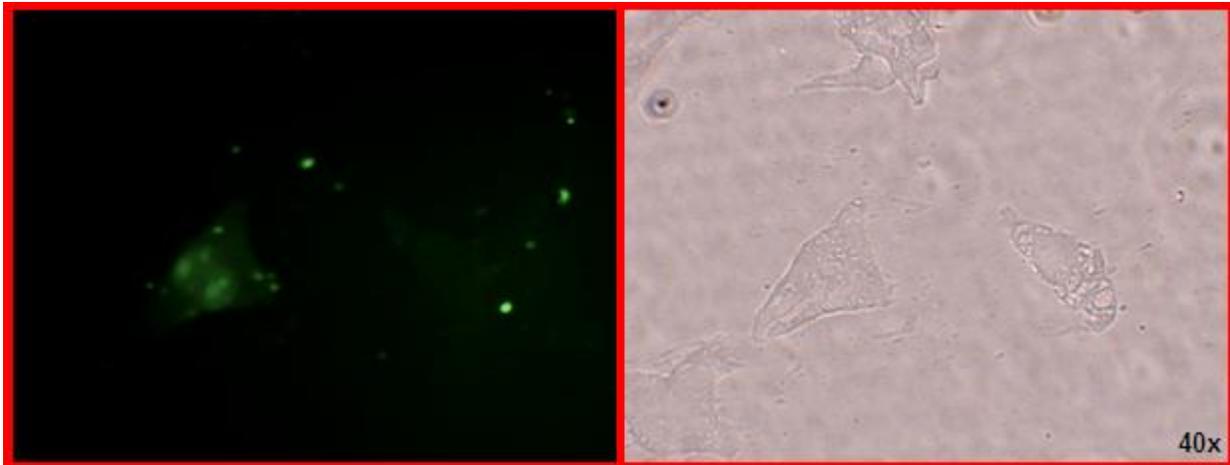


Imagen 2. Microscopia de fluorescencia y de luz de las células transfectadas con el siRNA para OLA-1 a un volumen de 5 μ L de siRNA, donde se observa que se está dando la unión del siRNA con el mRNA de OLA-1

Dado que las células a un volumen de 2 μ L de siRNA conservan su morfología de fibroblasto se selecciono este volumen a trabajar. El protocolo está diseñado para una placa de 6 pozos y se realizó de la siguiente forma:

- Se sembraron 2×10^5 células por pozo adicionando 2 mL de medio DMEM 10% SFB y sin antibióticos, incubando 18 horas a 37°C con CO₂ teniendo una confluencia del 60-80% para asegurar la viabilidad celular antes de la transfección.
- Se prepararon las soluciones de transfección: solución “A” se preparo por cada transfección diluyendo 2 μ L de la mezcla de siRNA (Santa Cruz) en 100 μ L de medio de transfección (Santa Cruz); solución “B” se preparó por cada transfección diluyendo 6 μ L de reactivo de transfección (Santa Cruz) en 100 μ L de medio de transfección. Una vez preparadas estas soluciones se mezclaron cuidadosamente y se dejaron reposar a temperatura ambiente 45 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 800 μ L de medio de transfección a cada tubo que contiene la mezcla de A+B, mezclando gentilmente.

- Transcurridas las 18 horas, las células fueron lavadas con 330 μ L de medio de transfección para posteriormente adicionar la mezcla preparada en el paso anterior e incubar 7 horas a 37°C con CO₂. Una vez pasado este tiempo a cada pozo se le adicionó 1 mL de medio DMEM 2x (20% SFB y 2% antibióticos) incubando por 18 horas más las células a 37°C con CO₂.
- Transcurridas las 18 horas, se eliminó el medio DMEM 2x de cada pozo y se le adicionó con 3 mL de medio DMEM 10% SFB, 1% antibióticos, tomando en este momento el tiempo cero de transfección, recolectando muestras a las 24, 48 y 72 horas para observar la transfección.

Una vez realizado el protocolo, se extrajo el RNA de las muestras y se realizó un RT-PCR para determinar la presencia de OLA-1 y poder determinar la mayor inhibición producida durante esta ventana de tiempo (24-72 horas). Este resultado se muestra en la imagen 3.



Imagen 3. Productos del RT-PCR, en un gel de agarosa al 4%, siendo la banda de mayor peso molecular OLA-1 (203 pb) y la banda de menor peso molecular el gen constitutivo (Hprt, 173 pb).

Determinando que a las 24 horas se dio la inhibición máxima del mensajero de OLA-1 que fue de tan solo el 15.4%, la cual es baja y probablemente comprometa la posibilidad para determinar efecto sobre la capacidad transformante de la mezcla de metales. Aumentando la cantidad de siRNA a 5 μ L por el mismo método de transfección, esperamos que el silenciamiento a las 24 horas se manifieste como la inhibición de OLA-1 de forma significativa para y poder dar un tratamiento iniciador a las células con la mezcla de metales y observar el fenómeno de transformación y poder determinar el papel de OLA-1.

El ensayo de transformación celular que corroborará si el silenciamiento de OLA-1 al dar el tratamiento iniciador tendrá un efecto sobre la capacidad transformante de los metales evidenciando su papel como potenciador o inhibidor del proceso está en proceso y del resultado obtenido se planteara otra perspectiva.

APENDICE

Medio DMEM modificado al 10% SFB y 1% Antibiótico para ensayo de transformación.

Para preparar un litro de medio se necesita:

- Sobre de medio GIBCO bajo en glucosa y sin bicarbonato de sodio
- 1.5 g de Bicarbonato de sodio
- 3.5 g de Glucosa
- 10% Suero fetal bovino (SFB)
- 1% Antibiótico
- Agua destilada

Medir en una probeta 800 mL de agua destilada, pasar a un vaso de precipitados, añadir el sobre de medio GIBCO con agitación constante para disolver, añadir los 3.5 g de glucosa y el 1.5 g de bicarbonato. Esperar a que se disuelva bien y ajustar el pH a 7.2. Una vez obtenido el pH se afora a 890 mL. En condiciones de esterilidad se agregan los 100 mL de SFB y los 10 mL de antibiótico, se mezcla bien y se filtra en un millipore con membrana 0.2mm en frascos estériles, se etiqueta y se guarda a 4°C.

Medio DMEM modificado al 2% SFB, 1% Antibiótico y 1% ITS-A para ensayo de transformación.

Para preparar un litro de medio se necesita:

- Sobre de medio GIBCO bajo en glucosa y sin bicarbonato de sodio
- 1.5 g de Bicarbonato de sodio
- 3.5 g de Glucosa
- 10% Suero fetal bovino (SFB)
- 1% Antibiótico

- 1% ITS-A (Insulina-Transferrina-Selenio-A)
- Agua destilada

Medir en una probeta 800 mL de agua destilada, pasar a un vaso de precipitados, añadir el sobre de medio GIBCO con agitación constante para disolver, añadir los 3.5 g de glucosa y el 1.5 g de bicarbonato. Esperar a que se disuelva bien y ajustar el pH a 7.2. Una vez obtenido el pH se afora a 960 mL. En condiciones de esterilidad se agregan los 20 mL de SFB, los 10 mL de antibiótico y los 10 mL de ITS-A, se mezcla bien y se filtra en un millipore con membrana 0.2mm en frascos estériles, se etiqueta y se guarda a 4°C.

Preparación de metales y de la mezcla de metales (As 1.154µM, Cd 2.74µM y Pb 4.8µM)

- 100 mL de solución stock de acetato de Plomo

Pb (C₂H₃O₂)₂·3H₂O PM = 379.35 g/mol

Se pesan 182.98 mg de acetato de plomo y se disuelve en 100 de agua destilada y estéril tibia con agitación constante. El uso del agua tibia es para favorecer la solubilidad del acetato de plomo.

- 100 mL de solución stock de cloruro de Cadmio

CdCl₂ PM = 183.32 g/mol

Se pesan 49.49 mg de cloruro de cadmio y se disuelven en 100 mL de agua destilada y estéril.

- 100 mL solución stock de Arsenito de sodio

NaAsO₂ PM = 129.9 g/mol

Se pesan 14.93 mg de arsenito de sodio y se disuelven el 100 mL de agua destilada estéril.

- Preparación de la mezcla de metales

Para preparar 11 mL de la mezcla de metales, se toma una alícuota de cada stock de los metales:

3 mL del stock de CdCl_2

3 mL del stock de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

5 mL del stock de NaAsO_2

Se mezcla bien y se filtra en un filtro pirinola en condiciones de esterilidad en tubos eppendorf de 1 mL. Se etiquetan los tubos y se guardan a -20°C . Los stocks de los metales se guardan también a -20°C para conservar la estabilidad de estos.

PBS

Para preparar 1L de PSB se necesita:

8.00 g	NaCl
0.20 g	KCl
1.44 g	Na_2HPO_4
0.24 g	KH_2PO_4
0.09010 g	Glucosa
1 L	Agua

Se coloca el agua en un vaso de precipitados, disolviendo cada una de las sales y se ajusta el pH a 7.4

Solución de MNNG 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (N-Metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanina)

Para preparar una solución stock de MNNG se utilizan guantes y cubrebocas, pesando 0.01 g de MNNG y aforando con 1 mL de metanol en un tubo eppendorf. De esta solución tomamos 10 μL y añadimos 990 μL de agua destilada estéril. Esta solución en condiciones de esterilidad se filtra con un filtro pirinola para mantener la solución estéril.

Solución de TPA 10 µg/mL (12-Otetradecanoilforbol-13-acetato)

Para preparar la solución stock se toma 1 mg de TPA y se disuelve en 1 mL de DMSO. De esta solución tomamos 100 µL y lo aforamos a 10 mL en un tubo falcón de 15 mL con medio DMEM bajo en glucosa sin SFB, sin ITS-A y solo con 1% antibiótico. Filtramos la mezcla con una pirinola en otro tubo falcón estéril, se etiqueta y se tapa con aluminio. Se guarda a 4°C

Medio para congelamiento de células

Adicionar 1 mL de DMSO estéril a un tubo falcón de 15 mL y se aforar a 10 mL con medio DMEM al 10%. Se guarda a 4°C.

Solución de dihidrorhodamina 123

Cuando la dihidrorhodamina 123 es nueva se resuspende el contenido del vial (5 mg) en 1 mL de DMSO de tal forma que se tiene una solución madre 14.4341 mM. A partir de esta solución se prepara un stock de 10 µM por lo que se tomara 6.93 µL de la solución madre y se lleva a 10 mL con agua estéril (buffer A).

Buffer A para determinación de ROS

Para preparar 100 mL de buffer se necesita:

0.81818 g	NaCl
0.03728 g	KCl
0.01972 g	MgSO ₄ -7H ₂ O
0.02646 g	CaCl ₂
0.09010 g	Glucosa
0.35750 g	HEPES
100 mL	Agua

Se coloca el litro de agua en un vaso de precipitados, disolviendo por agitación magnética cada una de las sales. Una vez disuelto todo se ajusta a pH 7.2

TBE 1X

Para preparar 1 L de TBE se necesita:

10.8 g	Tris base
5.50 g	Acido bórico
0.93 g	EDTA
1 L	Agua

Se coloca el agua en un vaso de precipitados y se disuelven las sales, ajustando a pH 8.3

BIBLIOGRAFIA

1. Aaronson S.A. and Todaro G.J. Development of 3T3-like line from Balb/c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. *J. Cell Physiol* 74: 141-148; 1968a.
2. Aaronson S.A. and Todaro G.J. Basis for the acquisition of malignant potential by cell cultivated in vitro. *Science* 162: 1024-1026; 1968b.
3. Ahamed M. and Siddiqui M.K.J. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clinica Chimica Acta* 383: 57-64; 2007.
4. Benhar M., Engelberg D. and Levitzki A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO reports* 3: 420-425; 2002.
5. Beyersmann D. Effects of carcinogenic metals on gene expression. *Toxicology Letters* 127: 63-68; 2002.
6. Beyersmann D. & Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch. Toxicol.* 82: 493-512; 2008.
7. Cinquetti R., Mazzotti F., Acquati F., Gornati R., Sabbioni E., Taramelli R., Bernardini G. influence of metals ions on gene expression of Balb/c 3T3 fibroblasts. *Gene* 318: 83-89; 2003.
8. Combes R., Balls M., Curren R., Fischbach M., Fusening N., Kirkland D., Lasne C., Landolph J., LeBoeuf R., Marquardt H., McCormick J., Müller L., Rivedal E., Sabbioni E., Tanaka N., Vasseur P. and Yamasaki H. Cell transformation assays as predictors of human carcinogenicity. *Atla* 27:745-767; 1999.
9. Creton S., Aardema M., Carmichel P., Harvey J., Martin F., Newbold R., O'Donovan K., Pant K., Poth A., Sakai A. Sasaki K., Scott A., Schechtman L., Shen R., Tanaka N. and Yasaei H. Cell transformation assays for prediction of

carcinogenic potential: state of the science and future research needs. *Mutagenesis* 27:93-101. 2012.

10. De la Fuente H., Portales-Perez D., Baranda L., Díaz-Barriga F., Saavedra-Alanis V., Layseca E. & González-Amaro R. Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol* 129: 69-77; 2002.
11. Ferrera P., Mercado-Gómez O., Silva-Aguilar M. Valverde M. and Arias C. Cholesterol potentials β -amiloid-induced toxicity in human neuroblastoma cells: involvement of oxidative stress. *Neurochem Res.* 33:1509-1517; 2008.
12. Hansberg Torres W. Biología de las especies reactivas de oxígeno. Facultad de Medicina, Depto. de Bioquímica, 2002.
13. Isfort R.J., Cody D.B., Doersen C.J., Kerckaert G.A., Leboeuf R.A. Alterations in cellular differentiation, mutagenesis, cytoskeleton and growth characteristics during Syrian hamster embryo cell multistep in vitro transformation. *Int. J. Cancer* 59: 114-125; 1994.
14. Kajiwara Y., Ajimi S. Verification of the Balb/c 3T3 cell transformation assay after improvement by using an ITES-medium. *Toxicology in vitro* 17: 489-496; 2003.
15. Kamata H. and Hirata H. Redox regulation of cellular signaling. *Cell. Signal* 11:1-14; 1999
16. Keshava N., Zhou G., Hubbs A., Ensell M. and Ong T. Transforming and carcinogenic potential of cadmium chloride in Balb/c 3T3 cells. *Mutation Research* 448: 23-28; 2000.
17. Kohen Ron and Nyska Abraham. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicology pathology* 30: 620-650; 2002.
18. Mascolo M., Perdichizzi S., Rotondo F., Morandi E., Guierini A., Silingardi P., Vaccari M., Grilli S. and Colacci A. Balb/c 3T3 cell transformation assay for the

prediction of carcinogenic potential of chemicals and environmental mixtures. *Toxicology in vitro* 24: 1292-1300; 2010.

19. Matthews E.J. Chemical-induced transformation in Balb/3T3 cells: relationships between *in vitro* transformation and cytotoxicity, carcinogenesis and genotoxicity. *Mutation and the Environment*. Parte D 229-238: 1990.
20. Mazzotti F. *In vitro* rodent models as alternative methods in assessing cytotoxicity and carcinogenic potential of metal compounds. Tesis para obtener el grado de doctor, Barcelona 2003.
21. Meyer A.L. *In vitro* transformation assays for chemical carcinogens. *Mutation Research* 115: 323-338; 1983.
22. Rojas E., Shi Z-Z., Valverde M., Paules R.S., Habib G.M. and Lieberman M.W. Cell survival and changes in gene expression in cells unable to synthesize glutathione. *Biofactors* 17:13-19; 2003.
23. Sakai Ayako. Balb/c 3T3 cell transformation assays for the assessment of chemical carcinogenicity. *AATEX*, special issue 14: 367-373; 2007.
24. Sasaki K., Bohnenberger S., Hayashi K., Kunkelmann T., Muramatsu D., Phrakonkham P., Poth A., Sakai A., Salovaara S., Tanaka N., Thomas B. and Umeda M. Recommended protocol for the BALB/c 3T3 cell transformation assay. *Mutation Research*, doi:10.1016/j.mrgentox.2011.12.014; 2012.
25. Schechtman M. L. Rodent cell transformation assays – A brief historical perspective. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.
26. Shi, ZZ. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5101-5106; 2000.
27. Silva-Aguilar M., Rojas E. and Valverde M. Role of oxidative stress in transformation induced by metal mixture. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2011/935160; 2011.

28. Sun H., Luo X., et. al. DOC45, a Novel DNA Damage-Regulated nucleocytoplasmic ATPase that is overexpressed in multiple human malignancies. *Molecular Cancer Research* 8(1); 57-66. 2010.
29. Tchounwou P., Yedjou C., Foxx D., Ishaque A. and Shen E. Lead-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma (HepG₂) cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 255: 161-170; 2004.
30. Tsuchiya T., Kagawa T., Jinno H., Tokunaga H., Sakimoto K., Ando M and Umeda M. Inorganic arsenic compounds and methylated metabolites induce morphological transformation in two-stage Balb/c 3T3 cell assay and inhibit metabolic cooperation in V79 cell assay. *Toxicological sciences* 84: 344-351; 2005.
31. Umeda Makamoto. Cell transformation assay using Balb/c 3T3 cells or Bhas 42 cells for the efficient detection of tumor promoters. *Atla* 32: 673-677; 2004.
32. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovich M. and Mazaur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 16: 1-40; 2006.
33. Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12: 1161-1208; 2005.
34. Wang G. and Fowler B. Roles of biomarkers in evaluation interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology* 233: 92-99; 2008.
35. Wozniak, K; Blasiak, J; In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links; *Genetic toxicology and environmental mutagenesis* 535: 127-139; 2002
36. www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/67059

- 37.** Zhang, J., Rubio, V., Lieberman, M.W., Shi, Z.Z. OLA1, an Obg-like ATPase, suppresses antioxidant response via nontranscriptional mechanisms. PNAS vol. 106. 36:15356-15361; 2009a.
- 38.** Zhang, J., Rubio, V., Zheng, S., Shi, Z.Z. Knockdown of OLA1, a regulator of oxidative stress response, inhibits motility and invasion of breast cancer cells. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 10(11):796-804; 2009b.