



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**“INHIBICIÓN DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN LA  
TRANSFORMACIÓN INDUCIDA POR LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A UNA  
MEZCLA DE METALES As-Cd-Pb EN LA LÍNEA HEPÁTICA EMBRIONARIA  
DE HUMANO WRL-68”**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA  
VICENTE SÁNCHEZ-VALLE**

**TUTOR PRINCIPAL.  
Dr. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO  
Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM.**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**Dra. VILMA A. MALDONADO LAGUNAS  
Facultad de Medicina (INMEGEN)-UNAM.**

**Dra. ESTHER I. LÓPEZ BAYGHEN PATIÑO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**MÉXICO D.F. FEBRERO 2015.**



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.

# Dedicatoria

---

A:



أنا أكرّم والديّ الذين ربّوا  
هذا القلب الصغير بحبّهم  
وحنانهم. هذا الكتاب  
هو مكرّم لهم. أحبّكم  
أبويّ. أحبّكم لأنكم  
أعزّ الناس عليّ في  
الكون. أحبّكم لأنكم  
أعزّ الناس عليّ في  
الكون. أحبّكم لأنكم  
أعزّ الناس عليّ في  
الكون.

A mis padres:

**María Cruz Valle Rosales**  
y  
**Anselmo Sánchez Romero**

**Por su amor y apoyo incondicional**

## Reconocimiento

---

- **Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Toxicogenómica, del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental en el Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM.**
- **Este trabajo fue apoyado por el CONACYT con el número de proyecto M47330.**
- **Agradezco al Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM y el apoyo económico de CONACYT (Becario: 200002) para realizar esta tesis.**
- **Agradezco el apoyo académico del Dr. Emilio Rojas del Castillo como tutor de esta tesis Doctoral.**
- **Agradezco el apoyo académico de la Dra. Vilma A. Maldonado Lagunas y la Dra. Esther I. López Bayghen Patiño; integrantes del comité tutorial.**
- **Agradezco las aportaciones académicas de la Dra. Mahara A. Valverde Ramírez, Dra. Patricia Ostrosky Shejet y Dra. Ana María Salazar Martínez; IIB-UNAM.**
- **Agradezco al personal y compañeros del laboratorio de Toxicogenómica del IIB-UNAM por su amistad y apoyo.**

# Contenido

---

	Página
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Antecedentes.....	3
• Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	5
• Antioxidantes.....	8
• Transformación celular .....	13
• Mecanismos moleculares As, Cd, Pb.....	16
• Mezcla de metales As-Cd-Pb.....	19
Hipótesis y objetivos.....	23
Diseño experimental.....	24-25
Metodología.....	26
• Cultivo celular y tratamientos .....	26
• Cuantificación intracelular de la mezcla de metales (As-Cd-Pb).....	27
• Viabilidad celular .....	27
• Detección de especies reactivas de oxígeno (ERO ).....	27
• Determinación de la actividad de Superóxido dismutasa-1 (SOD-1).....	28
• Cuantificación de la actividad de Catalasa (CAT).....	29
• Cuantificación de lipoperoxidación (Lpx).....	29
• Evaluación de genotoxicidad (Ensayo cometa).....	30
• Evaluación morfológica de la transformación celular.....	31
• Ensayo de crecimiento celular libre de anclaje.....	31
• Análisis estadístico.....	31
Resultados.....	32
Discusión.....	43
Conclusión.....	48
Referencias.....	50
Anexo.....	54

## Resumen

---

Los metales son elementos ubicuos contaminantes del aire, agua y suelo; se encuentran formando una mezcla compleja en la que destaca la presencia de As, Cd, y Pb presentes en áreas cercanas a fundidoras y metalúrgicas. Se ha reportado que esta mezcla tiene potencial carcinogénico y transformante a través del establecimiento de estrés oxidativo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de la barrera antioxidante en el proceso de transformación celular mediante la exposición crónica a la mezcla de metales ( $2\mu\text{M NaAsO}_2$ ,  $2\mu\text{M CdCl}_2$ , y  $5\mu\text{M Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), en combinación con L-buthionin sulfoxamina (BSO) y 3-aminotriazol (3-ATZ) inhibidores químicos de los antioxidantes glutatión (GSH) y catalasa (CAT) respectivamente en un modelo celular de origen hepático embrionario humano no transformado (WRL-68).

Se evaluó la concentración intracelular de metales; especies reactivas de oxígeno; marcadores de daño oxidativo (lipoperoxidación y genotoxicidad); actividad antioxidante GSH, CAT, superóxido dismutasa (SOD) y promoción de la transformación celular.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo en la concentración intracelular de Cd y Pb. Se observó la generación de especies reactivas de oxígeno, citotoxicidad, genotoxicidad, lipoperoxidación y cambios morfológicos relacionados con la transformación celular, exclusivos del grupo tratado con la mezcla de metales más inhibidores antioxidantes.

En conclusión, nuestros resultados demuestran la participación directa de la barrera antioxidante en la protección e integridad celular, inhibiendo el potencial transformante de la mezcla de metales (As-Cd-Pb) por el establecimiento de estrés oxidativo.

## Abstract

---

Metals are ubiquitous soil, air, and water pollutants. A mixture of arsenic cadmium and lead, in particular, has commonly been found in the vicinity of smelter areas. The mixture of As-Cd-Pb has been shown to be carcinogenic and transforming potential; oxidative stress have been proposed as principal mechanisms involved in this process. The aim of this work was to explore the role of the antioxidant barrier in the establishment of cell transformation upon chronic exposure to a metal mixture containing  $2\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$ ,  $2\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , and  $5\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  in WRL-68 cells a non transformed human hepatic cell line.

In this study, we used a model of human embryonic hepatic origin treated with antioxidant inhibitors (L-buthionine-sulfoxamine and aminotriazole) to test the role of the antioxidant barrier in the establishment of cell transformation upon chronic exposure to a metal mixture of As-Cd-Pb. We evaluated oxidative damage markers, including reactive oxygen species, lipid peroxidation, and genotoxicity, as well as antioxidant response markers, including glutathione concentration, catalase activity, and superoxide dismutase activity; the promotion of morphological transformation was quantified by foci formation in cell exposed to metals mixture.

As expected, we found an increase in the intracellular concentration of the metals after treatment with the metal mixture. The treatment with metal mixture more antioxidants inhibitors resulted a large increase intracellular concentration of cadmium and lead. Our results describe the increased generation of reactive oxygen species, cytotoxicity, genotoxicity, and oxidative damage to macromolecules that occurred exclusively in cells that were morphologically transformed upon exposure to a metal mixture and antioxidant barrier inhibition.

In conclusion our results show the importance of the antioxidant barrier role in the protection of cellular integrity and the transformation potential of this metal mixture via free radicals.

## Antecedentes

---

Los metales son elementos presentes en la corteza terrestre, distribuidos de forma natural en el ambiente como consecuencia de los procesos bio-geoquímicos. Debido a su versatilidad, son ampliamente utilizados en la manufactura de componentes electrónicos, materiales de construcción, combustible y fertilizantes; por lo que su uso, producción y emisión ha aumentado exponencialmente desde la revolución industrial. Favorecido la acumulación de estos elementos en el ambiente, por su incapacidad para biodegradarse. Provocando la contaminación de múltiples ecosistemas donde el ser humano entra en contacto con estos metales de forma crónica por vía oral, olfatoria y dérmica; con efectos directos sobre la salud [1, 2].

Algunos metales como el Fe, Cu y Zn son elementos esenciales para los organismos vivos, ya que participan en una amplia variedad de procesos biológicos como la homeostasis de iones metálicos. El desequilibrio de los iones metálicos en los sistemas biológicos puede llevar al establecimiento de estrés oxidativo, afectando la estructura y función de macromoléculas de importancia biológica; asociando estos cambios con múltiples enfermedades humanas entre las que destaca el cáncer [3].

Las actividades humanas en los campos de la industria, minería, agrotecnología y quema de combustible fósil generan miles de compuestos químicos que son liberados al medio ambiente en forma de mezclas. De ahí que las poblaciones humanas estén expuestas a mezclas de compuestos persistentes en el ambiente, en las que son frecuentes encontrar metales como



el plomo (Pb), cadmio (Cd) y el metaloide arsénico (As). La acumulación de esta mezcla de metales en los ecosistemas son una importante fuente de exposición humana, además de las mezclas generadas en los lugares de trabajo donde la población está expuesta de forma crónica, representando un importante problema de salud pública [4].

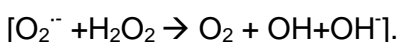
El plomo, cadmio y arsénico se encuentran a altas concentraciones en el entorno cercano a la industria minera, metalúrgica y fundición. Diferentes estudios publicados por la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) [5] y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos [6]; han identificado que la exposición a mezclas de metales entre ellas, a la de As, Cd, Pb, resultan un factor de riesgo para el desarrollo de múltiples enfermedades [4, 7].

Lo anterior, sugiere la necesidad de estudiar los efectos ocasionados por la mezcla de As-Cd-Pb a bajas concentraciones y periodos de exposición crónica; ya que es la forma real en la que las poblaciones humanas se exponen tanto en el ámbito ambiental como laboral. Por lo que la propuesta del presente trabajo, está dirigida a identificar el papel que juega la barrera antioxidante en el proceso de transformación celular.

### ***Especies reactivas de oxígeno (ERO).***

Un radical libre es un átomo o molécula con uno o más electrones desapareados en el último orbital, capaz de reaccionar con múltiples moléculas a través de su oxidación. Bajo este concepto, las formas reducidas del O<sub>2</sub> se denominan especies reactivas de oxígeno (ERO); en las que se incluyen a los radicales libres derivados del oxígeno y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [36]. Las ERO son producto del metabolismo celular y fuentes exógenas (rayos X, humo de tabaco, contaminación ambiental); en la célula tienen una participación dual ya que pueden adoptar un papel benéfico o perjudicial en los sistemas vivos. Los efectos benéficos de las ERO se presentan a bajas concentraciones, participando en diferentes funciones fisiológicas de la célula; como defensa contra agentes infecciosos y en los sistemas de señalización celular [37]. En contraparte, el efecto nocivo en los sistemas biológicos está basado en el establecimiento de estrés oxidativo por desequilibrio en el estado redox celular, generando daño a macromoléculas de importancia biológica [38].

El anión **superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)** es de las primeras ERO en formarse; derivadas del metabolismo celular y "la activación" del oxígeno por irradiación física. Por otra parte, el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> puede actuar de forma recíproca con otras moléculas para generar ERO secundarias; frecuentemente a través de reacciones catalizadas por enzimas y metales, como ocurre en la reacción de Haber-Weiss [39]:



Respecto a su participación en el daño a macromoléculas biológicas, el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> no reacciona directamente con polipéptidos, azúcares, o ácidos nucleicos y su participación en la peroxidación de lípidos, aún no es bien definida. La eliminación del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se da por acción de la enzima SOD, a través de una

reacción de dismutación en la que se genera como producto final  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$  [40, 41].

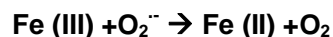
La generación de varios radicales libres está estrechamente unida con metales, que participan activamente en el mantenimiento redox de la célula [42]. El estado redox celular está relacionado con el hierro (Fe) y cobre (Cu), los cuales se mantienen dentro de límites fisiológicos para conservar la homeostasis celular. El Fe (II) puede participar en la reacción Fenton, generando el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) el cual es altamente reactivo a través de la siguiente reacción:



Reacción de Fenton

---

Como ya se mencionó el radical superóxido también participa en la reacción de Haber-Weiss. La cual combina una reacción tipo Fenton y la reducción de Fe (III) por el superóxido, cediendo Fe (II) y oxígeno como se muestra en la reacción [43]:



Reacción de Haber-Weiss

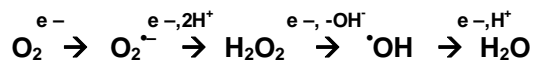
---

El radical **hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ )**, es otra especie altamente reactiva con una vida media de menos de 1ns (nano segundo) en solución acuosa [44]. Cuando este se produce *in vivo* reacciona cerca de su sitio de formación; y puede ser generado por descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y radiación ionizante, generando el radical  $\cdot\text{OH}$  y átomos de hidrógeno. La generación in-vivo de este radical se da

mediante la reacción de Fenton, la cual es catalizada en presencia de metales como el Fe, Cu, Cr, Co, entre otros [43, 45]. La producción del  $\cdot\text{OH}$  cerca del ADN puede reaccionar con las bases de esta molécula, generando rupturas de cadena como consecuencia de la afinidad del  $\cdot\text{OH}$  por los átomos de hidrógeno del ADN.

El radical **peroxil (ROO $\cdot$ )** puede generarse en los sistemas vivos y participar en diversas reacciones biológicas. La detección y medida de la peroxidación de lípidos es citada como prueba de la participación del radical ROO $\cdot$  en esta reacción; como marcador de enfermedades humanas y exposición a tóxicos. El radical ROO $\cdot$  también está implicado en la inducción de daño a proteínas y ADN en interacción sinérgica con el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  [46, 47].

Aunado a estos mecanismos, existe la reducción univalente del oxígeno que resume de forma química la generación de ERO; basado en la reducción secuencial de la molécula de oxígeno en medio acuoso a pH 7.0 a 1atm. como se observa en la reacción [48]:



Reducción univalente del oxígeno

---

## ***Antioxidantes.***

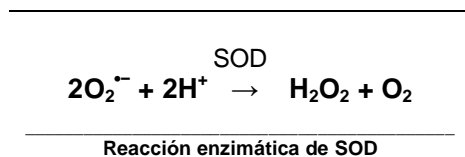
Para equilibrar y contrarrestar los efectos negativos de las ERO propias del metabolismo celular o derivadas de la exposición a tóxicos, la célula cuenta con moléculas y enzimas antioxidantes capaces de remover a los radicales libres (pro-oxidantes) proporcionando protección a la célula y sus biomoléculas.

Un antioxidante por definición presenta las siguientes características:

(I) Especificidad contra radicales libres; (II) Capacidad para atrapar metales; (III) Interacción con la regeneración de otros antioxidantes; (IV) Ser fácilmente absorbido; (V) Estar presente a una concentración fisiológicamente relevante en tejidos y biofluidos; (VI) Capacidad de acción tanto en los dominios acuosos como en los de membrana [22].

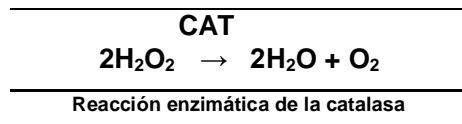
Los antioxidantes se dividen en dos grupos; los de tipo enzimático como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) [49], y los de tipo no enzimático que incluyen a vitaminas, carotenoides, tioles (glutatión, thioredoxina y ácido lipóico), flavonoides naturales, melatonina y otros compuestos [50]. Debido a la importancia de los antioxidantes en el equilibrio redox celular, se ha identificado una interacción directa entre el aumento de los niveles de ERO y una baja en la actividad y concentración de los antioxidantes en diferentes enfermedades crónicas como el cáncer.

La enzima **superóxido dismutasa (SOD)**, es uno de los antioxidantes intracelulares más eficientes. Tiene la capacidad de catalizar la dismutación del  $O_2^{\cdot -}$  a  $O_2$ , generando  $H_2O_2$  como especie intermedia de la siguiente reacción [51]:



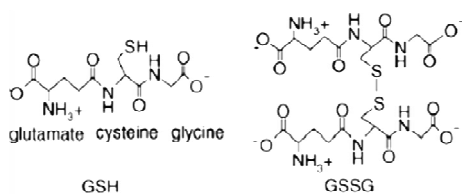
Esta enzima presenta diferentes isoformas, que difieren en la naturaleza de su centro metálico activo, constitución de aminoácidos, número de sub-unidades y cofactores. En el humano hay tres isoformas de SOD, clasificadas con base a sus centros metálicos y localización; una de ellas está localizada en el citoplasma celular y contiene como centro metálico al cobre y zinc (Cu, Zn-SOD), otra se localiza en la mitocondria presentando manganeso (Mn-SOD) y finalmente la forma extracelular (EC-SOD) que contiene Cu y Zn [52].

Por otro lado la **Catalasa (CAT)** es una enzima presente en las células animales, vegetales y bacterias aerobias; se encuentra localizada en los peroxisomas de la célula, y es considerada como una de las enzimas celulares más eficientes en la conversión de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno molecular. La catalasa es una enzima que cuenta con una elevada velocidad de reacción, ya que una molécula de catalasa puede convertir aproximadamente 6 millones de moléculas de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno cada minuto, a través de la siguiente reacción [49].



Además, esta enzima se asocia con el desarrollo de cáncer, ya que se ha reportado una disminución en su actividad en varios tumores. Lo cual podría estar favoreciendo el desarrollo y progresión del cáncer, debido a que se hace ineficiente el proceso de detoxificación del  $H_2O_2$  en la célula, generando daño oxidativo a biomoléculas y desregulación génica [49].

A su vez el **Glutati3n (GSH)** es uno de los antioxidantes no enzimáticos m3s abundantes de la c3lula, formado por glutamato, cisteina y glicina. Es considerado como un amortiguador celular, encargado de mantener en equilibrio el estado redox intracelular. De acuerdo a su localizaci3n en la c3lula, se estiman diferentes concentraciones; en el citosol una concentraci3n de (1-11 mM), en el n3cleo (3-15 mM), y en mitocondrias (5-11 mM) [53]. El glutati3n es un antioxidante que se puede encontrar tanto en su forma reducida como glutati3n (GSH) y oxidada formando glutati3n disulfuro (GSSG), como se observa en la figura [22].




---

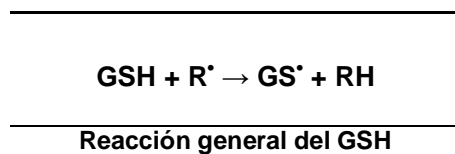
Estructura del glutati3n reducido (GSH) y oxidado (GSSG).

---

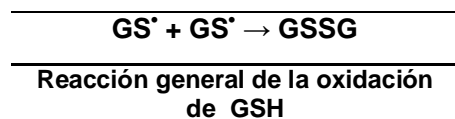
Como consecuencia de un ambiente oxidante, se genera la modificaci3n de los grupos sulfhidrilo de las prote3nas (prote3na-SH); generando como productos de la oxidaci3n al 3cido sulf3nico (prote3na-SOH) y radicales tiol (prote3na-S $\cdot$ ) [54].

Estos productos parcialmente oxidados reaccionan con el GSH y forman proteínas S-glutationadas (proteína-SSG), que son reducidas en el ciclo del glutatión por la enzima glutatión reductasa y pequeñas proteínas como glutaredoxinas y tioredoxinas, restaurando los grupos sulfhidrilo de la proteína (proteína-SH). Si el proceso de oxidación de los grupos sulfhidrilo de las proteínas no es frenado por el GSH, la oxidación conduce a la formación irreversible de formas oxidadas como el ácido sulfénico (proteína-SO<sub>2</sub>H) y ácido sulfónico (proteína-SO<sub>3</sub>H) [55].

La capacidad antioxidante del GSH se puede describir de forma general mediante su reacción con un radical (R<sup>•</sup>), como se observa en la siguiente reacción:



Los radicales tiol (GS<sup>•</sup>) generados de esta reacción pueden dimerizarse para formar un producto no radical, como el glutatión oxidado (GSSG), mediante la reacción:



En las células el GSSG acumulado puede afectar la actividad de enzimas, reaccionar con los grupos sulfhidrilo de las proteínas y generar la unión de las proteínas con el glutatión; por lo que el equilibrio entre GSH/GSSG es importante para mantener el equilibrio redox de la célula, además de funcionar como marcador de estrés oxidativo en los organismos vivos [56].



El GSH desempeña múltiples funciones en la célula, todas ellas encaminadas a neutralizar el estrés oxidativo a través de los siguientes mecanismos de acción:

(I) Actúa como co-factor de enzimas antioxidantes, como la glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión S-transferasa (GST) entre otros; (II) Participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana celular; (III) Atrapa al  $\cdot\text{OH}$  y oxígeno singlete, detoxifica a la célula del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y peróxidos lipídicos por acción de la GPx; (IV) Capacidad de regenerar antioxidantes como la vitamina C y E a sus formas activas, puede reducir directamente al tocoferol a vitamina E, o indirectamente a través de la reducción del dehidroascorbato a ascorbato [53].

Aunado a esto, varios reportes apoyan la participación del GSH en la regulación de las vías de señalización redox de la célula, a través de los cambios en el nivel total de GSH y la proporción de su forma oxidada (GSSG) o reducida (GSH) [57]. Además el GSH regula la actividad de varios factores de transcripción como son el factor nuclear NF- $\kappa$ B y la proteína activadora AP-1, mientras que en el núcleo parece estar regulando la unión del factor de transcripción Sp-1 con el ADN. También se ha identificado su participación en la apoptosis celular, debido a los diferentes mecanismos que desempeña en la eliminación de radicales libres, modulación del estado redox y su interacción con las vías pro y anti apoptóticas [53, 58].

Además de esto, se ha reportado una asociación entre la incidencia de cáncer y alteraciones en la función de la enzima GST, así como el aumento de GSSG en la progresión del cáncer en todas sus etapas [59].

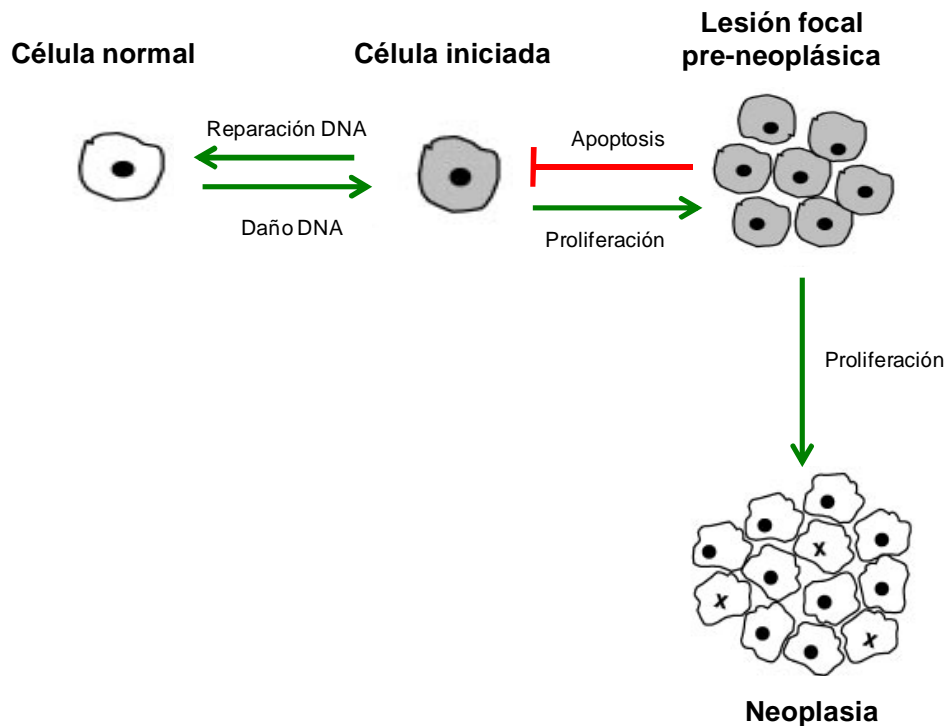
En conclusión, estos tres antioxidantes (SOD, CAT y GSH) forman parte de la denominada barrera antioxidante primaria, la cual está encargada del manejo e inhibición de las especies reactivas de oxígeno (ERO) nocivas para las célula.

### ***Transformación celular***

El proceso de carcinogénesis es un evento multi-etapas, en el que participan varios de los mecanismos moleculares descritos para los metales en estudio como son: la generación de ERO, cambios en la expresión y activación de señales celulares, regulación de factores nucleares de transcripción, inhibición de la apoptosis, desregulación del crecimiento y ciclo celular, sobre expresión de oncogenes, daño al material genético e inhibición de los mecanismos de reparación del ADN [27, 60].

Este proceso presenta tres etapas según el modelo de carcinogénesis química clasificadas como: iniciación, promoción y progresión.

La etapa de ***iniciación*** se presenta como consecuencia de la interacción del carcinógeno con el ADN generando mutaciones no letales, las cuales al fijarse pueden ser consideradas como precursores de un futuro tumor. La etapa de ***promoción*** se considera como un proceso que facilita la expansión clonal, de las células previamente iniciadas por inducción de la proliferación celular y/o la inhibición de la apoptosis, identificándose la formación de lesiones focales. Por último la etapa de ***progresión*** involucra cambios celulares y moleculares que conducen de un estado pre neoplásico a neoplásico [61] (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema de transformación celular [61].

La evaluación del potencial carcinógeno de las sustancias químicas hacia los humanos, se ha hecho a través de experimentos animales. Sin embargo, la comunidad científica ha prestado atención a estrategias alternativas en el cumplimiento de los valores éticos y de regulación en los estudios con modelos animales. Una alternativa para los ensayos de carcinogénesis *in vivo* es la sustitución de los bioensayos animales con modelos *in vitro* de mediano a largo plazo.

Para realizar estos ensayos, se cuenta con dos categorías generales de sistemas de transformación, basadas en el tipo celular. Una de ellas incluye células diploides con tiempo de vida limitado (embriones de hámster sirio SHE) y líneas celulares de tipo aneuploide inmortalizadas (BALB/c 3T3, C3H/10T1/2) [62]. Estos modelos cuentan con diferentes inconvenientes en cuanto a su

origen (animal) no humano y los métodos de inmortalización celular; las cuales pueden ser variables importantes de predisposición a la transformación celular propias del modelo, enmascarando los efectos reales de la sustancia a evaluar. Lo cual hace que los resultados obtenidos con estos modelos presenten variantes importantes en comparación con los sistemas *in vivo* y aún más con lo esperado en humanos.

Por lo anterior, surgió el interés de estudiar un modelo de origen humano para obtener resultados representativos de la exposición *in vivo* en humanos. Se decidió emplear para este estudio a la línea celular WRL-68 de origen fetal humano no transformado, con características morfológicas y fisiológicas similares a la de hepatocitos y cultivos primarios. Metabólicamente esta línea es pro-eficiente, ya que conserva la secreción de proteínas características como alfa-feto proteína, albúmina, cito-queratinas, alanino aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, gamma glutamil transpeptidasa y fosfatasa alcalina [63]. Las cuales son características que hacen de esta línea celular un buen modelo de estudio para evaluar el efecto tóxico de la mezcla de As-Cd-Pb.

### ***Mecanismos moleculares As, Cd, Pb***

Los mecanismos moleculares mediante los cuales el As, Cd y el Pb ejercen sus efectos tóxicos, convergen en el potencial de generar ERO capaces de alterar el equilibrio de óxido-reducción en la célula (estado redox), el cual es uno de los principales mecanismos involucrados en el proceso de carcinogénesis [8, 9].

Dentro de las ERO generadas por exposición a As se incluyen a los iones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), radical peroxilo ( $ROO^{\cdot}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), peroxil dimetilarsenico ( $[(CH_3)_2AsOO^{\cdot}]$ ) y dimetilarsenico ( $[(CH_3)_2As^{\cdot}]$ ) [10, 11]. Aunque el mecanismo responsable de la generación de estas especies aún sigue siendo estudiado, se propone también la generación de especies intermediarias de arsina [3]. Por otra parte, se ha identificado que el arsenito tiene la capacidad de activar a la enzima NADPH oxidasa, contribuyendo con la generación de iones  $O_2^{\cdot-}$  [10, 12].

El Cd genera de forma directa ERO, como el radical  $O_2^{\cdot-}$ ,  $^{\cdot}OH$ ,  $H_2O_2$  y óxido nítrico (NO), e indirecta mediante la reducción de la actividad de los antioxidantes (GSH, SOD y CAT) [13-15], a través del desplazamiento de Fe y Cu de diferentes moléculas intracelulares; los cuales participan en la generación de  $^{\cdot}OH+OH^{\cdot}$  a través de la reacción de Fenton [16].

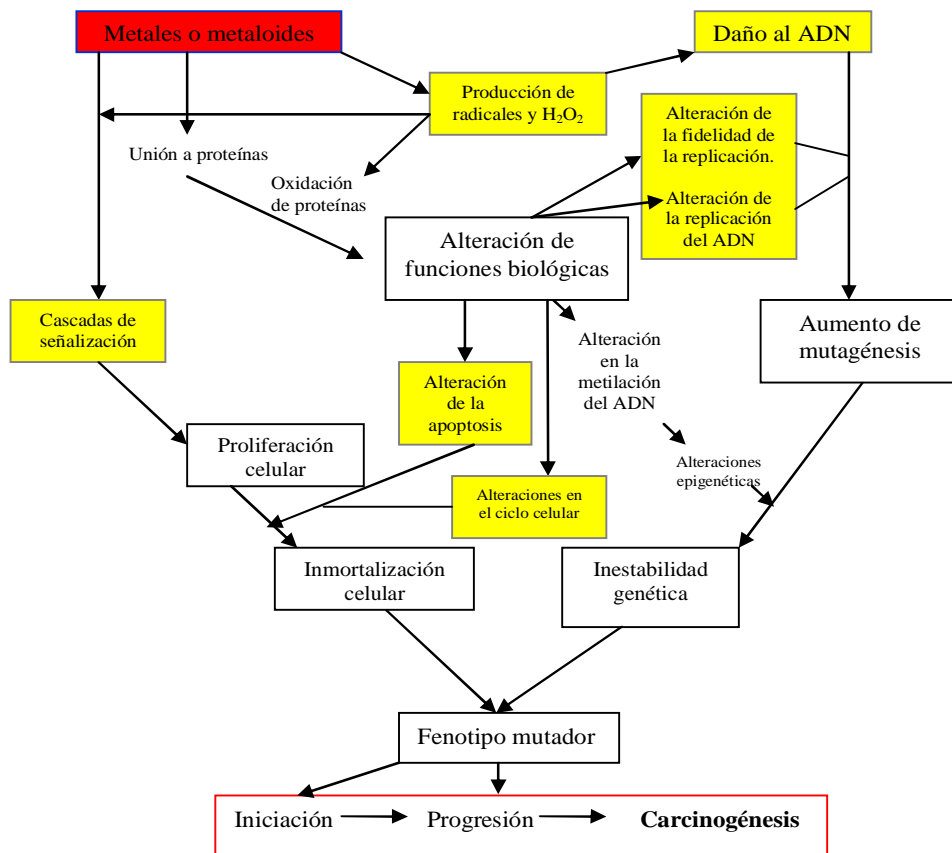
El Pb genera como principales ERO al  $^1O_2$ ,  $H_2O_2$  e hidroperóxido ( $HO_2$ ) [17, 18]. Además de inhibir a la enzima ácido delta aminolevulinico deshidrogenasa (ALAD), precursora del grupo hemo en los eritrocitos [19]; lo cual desencadena la generación de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $^{\cdot}OH$ ,  $H_2O_2$  [20-22].

Existen pocos estudios sobre la generación de ERO por exposición a la mezcla de As-Cd-Pb (23,25) y aun son escasos aquellos que identifiquen directamente la presencia de cada una de las ERO.

Nuestro grupo de investigación ha identificado de forma indirecta la generación de  $O_2^{\bullet-}$ ,  $\cdot OH$  y  $H_2O_2$ , a través de la cuantificación de ERO por medio de la oxidación de la dihidrorhodamina-123, por exposición a la mezcla de As, Cd, Pb en un modelo de transformación celular. Por otra parte, el incremento en la actividad de las enzimas SOD y CAT, sugieren la presencia de  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  por exposición a esta mezcla como lo reportan los estudios publicados por Silva-Aguilar [23]; Martínez-Pacheco [24] y Rodríguez-Sastre [25].

De forma general se ha reportado la participación de estos metales en el proceso de carcinogénesis, a través de la modulación de varios mecanismos moleculares y vías de señalización. Entre los que se incluyen: (a) la generación de ERO, involucradas en la generación de daño a biomoléculas; (b) cambios en la expresión y activación de la transducción de señales sobre la función celular por medio de los factores de crecimiento EGF, VEGF, PDGF, proteínas G: H-ras, K-ras, proteínas tipo tirosina kinasa c-src, proteínas MAPK: ERK, JNK, p38, BMAPK-1 y la vía de PI3K/Akt; (c) regulación de los factores nucleares de transcripción NF- $\kappa$ B, AP-1, p53, HIF; (d) inhibición de la apoptosis mediante la activación de moléculas anti apoptóticas Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W; (e) regulación del crecimiento y ciclo celular; (f) expresión de oncogenes; (g) daño al material genético vía radicales libres, metal-ADN; (h) inhibición de los mecanismos de reparación del ADN.

Estos mecanismos de acción descritos en metales interactúan de forma coordinada en el proceso de carcinogénesis; Figura 2 [26-28].



**Figura 2.** Mecanismos de acción generados por metales y metaloides en el proceso de carcinogénesis [28].

Los mecanismos antes descritos resumen de forma general el efecto por exposición individual a los metales de estudio (As, Cd y Pb); sin embargo, es necesario estudiar y precisar la participación e interacciones moleculares de estos metales en forma de mezcla y su participación en el proceso de carcinogénesis.

### ***Mezcla de metales As-Cd-Pb***

Como se ha descrito con anterioridad, las poblaciones humanas se encuentran expuestas a metales en el entorno ambiental y ocupacional; la cual es una condición común en los países industrializados. Actualmente, se tiene amplio conocimiento sobre la toxicidad de estos metales en su forma individual, pero poco se sabe acerca de ellos como mezcla. Con la finalidad de conocer sus interacciones químicas y efectos sobre la salud al acumularse en los tejidos; en los últimos años se ha incrementado el interés por estudiar la exposición ambiental/ocupacional de esta mezcla de metales a bajas concentraciones y periodos de exposición crónica. Sin embargo, evaluar el efecto tóxico de estos elementos en las poblaciones humanas es difícil, ya que generalmente la exposición es a bajas concentraciones y con efectos a largo plazo [4, 29].

Los reportes de la ATSDR concluyen que la mezcla formada por As-Cd-Pb, es la más frecuente en los depósitos de desechos peligrosos, contaminando el suelo de 219 de los 1.608 sitios evaluados; entre los que se incluyen centros de almacenamiento de residuos, tratamiento o eliminación, manufactura e industria, y sitios de desechos peligrosos del gobierno. Donde la exposición a esta mezcla es a través del agua y suelo, siendo la vía oral la principal ruta de contacto humano con un periodo de exposición de sub-crónico a crónico [5].

Aunado a esto, se ha reportado que la exposición a la mezcla de As, Cd y Pb, está asociada con el desarrollo de enfermedades de tipo hematológico, hepático, renal, neurológico, reproductivo e inmunológico [30].



Mientras que en su forma individual estos elementos se han relacionado con enfermedades de tipo hepático, cardiovascular, renal, hematológico, dermatomiositis, trastornos neurológicos y cáncer [31].

La concentración de la mezcla (As-Cd-Pb), generalmente es elevada en el entorno cercano a la minería y los sitios de fundición, donde las poblaciones circundantes están expuestas de forma crónica a estos metales. Lo anterior ha sido confirmado por diferentes estudios poblacionales en países como los Estados Unidos, en los que se han identificado marcadores de exposición y hallazgos clínicos en las poblaciones cercanas a las áreas contaminadas.

Sin embargo, la mayoría de estos estudios están enfocados a uno o dos metales, sin investigar su potencial de interacción como mezcla. Mientras que otros estudios han evaluado la mezcla de As, Cd y Pb en concentraciones de relevancia epidemiológica, encontrando marcadores de exposición propios de estos metales tanto en su forma individual y en combinaciones binarias, resultando ser indicadores potenciales del desarrollo de varias enfermedades humanas entre las que destaca el cáncer [32, 33].

En busca de conocer los mecanismos y efectos por exposición a esta mezcla de metales; varios grupos de investigación enfocaron sus estudios hacia esta mezcla y sus efectos en diferentes modelos de estudio. Una recopilación hecha por Wang & Fowler [4] y Kossowska, *et al.*, [34]; resume los principales hallazgos por exposición a la mezcla de As-Cd-Pb, en combinaciones binarias con alguno de estos metales y otros elementos (Tablas 1-2).

Tabla 1. Estudios experimentales con exposición As, Cd, Pb

Experimento	Elementos de exposición	Bio-marcador/Efecto	Referencia
<i>In vivo</i>	As, Cd, Pb	ALA/porfirinas	Mahaffey y Fowler., 1977 Fowler y Mahaffey., 1978 Mahaffey <i>et al.</i> , 1981
	As, Cd	Proteinuria	Liu <i>et al.</i> ,2000
	As, Cd, Pb	ZPP,ALAD	Fowler <i>et al.</i> , 2004
	As, Cd, Pb	HSPs, MT, ZPP	Wang <i>et al.</i> , 2003
	As, Cd	LPX,GSH,MT	Yáñez <i>et al.</i> , 1991
<i>In vitro</i>	Pb, Cd, Ca, Fe, Zn	PbBPs	Mistry <i>et al.</i> ,1986
	Pb, Cd, Zn	ALAD,MT	Goering y Fowler.,1987
	Cd, As	HSPs, MT	Madden <i>et al.</i> , 2002

Abreviaturas: Ácido aminolevulinico (ALA); Zinc Proto-Porfirina (ZPP); ácido delta-aminolevulinico dehidratasa (ALAD); Proteínas de choque térmico (HSPs); Metalotioneina (MT); Glutacion (GSH); lipoperoxidación (LPX); Proteínas de unión a Pb (PbBPs).

Tabla 2. Estudios en poblaciones expuestas a As, Cd, Pb

Experimento	Elementos de exposición	Bio-marcador/Efecto	Referencia
Medioambiental	Pb, Cd, Hg	Proteinuria	deBurbure <i>et al.</i> ,2003
	As, Cd	Proteinuria	Hong <i>et al.</i> ,2004
	As, Cd	Proteinuria,MT	Nordberg <i>et al.</i> , 2005
	As, Cd, Pb, Hg	Prolactina,ácido homovanílico	deBurbure <i>et al.</i> ,2006
	Pb, Cd	Enfermedad arterial periférica	Navas-Acien <i>et al.</i> 2004
Ocupacional	Pb, Cd, Hg	Proteinuria	Roels <i>et al.</i> , 1999
	Pb, Cd	↓GPx,↑LPX	Wasowiez <i>et al.</i> ,2001
	Pb, Cd	↑Micronucleos y rompimientos en el ADN.	Palus <i>et al.</i> ,2003
	Cd, Pb, Co	Rompimientos en el ADN, 8-OH DG	Hengstler <i>et al.</i> ,2003
	Pb, Cd	↑α-Glutation transferasa	Garcon <i>et al.</i> ,2004
	Pb, Cd	↑α-Glutation transferasa, ZPP,MDA	Garcon <i>et al.</i> ,2007
	Pb,Cd,As	Falla renal crónica, Enfermedad cardiovascular (cistatina-C).	Poreba <i>et al.</i> , 2011 <sup>a</sup>

Abreviaturas: Metalotioneina (MT); Glutación Peroxidasa (GPx); Lipoperoxidación (LPX); 8 hidroxi deoxiguanina (8-OH DG); Zinc Proto-Porfirina (ZPP); Malondialdehido (MDA); Aumento (↑); Disminución (↓).

Los anteriores reportes muestran un panorama global e interés por el estudio toxicológico y efectos sobre la salud de esta mezcla, con amplia distribución y persistencia en el ambiente. Lo cual ha ubicado a esta mezcla dentro de la lista de prioridades epidemiológicas por diferentes agencias internacionales, categorizando la exposición a esta mezcla como un problema de salud pública.

Por otra parte, cabe mencionar que los constantes avances en la industria y los requerimientos de las grandes ciudades potencian la producción de nuevos tóxicos, así como la generación de efectos sinérgicos o potenciación entre las nuevas mezclas y las ya existentes en el medio ambiente. Haciendo de estos puntos críticos un importante reto para su estudio, prevención, tratamiento y regulación a nivel de los sistemas de salud [35].

## **Hipótesis**

---

- La barrera antioxidante es un factor protector en el proceso de transformación celular mediado por el establecimiento de estrés oxidativo.

## **Objetivo general**

---

- Conocer si la inhibición de las defensas antioxidantes en combinación con la exposición crónica a la mezcla de As-Cd-Pb participan en la transformación de la línea celular WRL-68.

## **Objetivos particulares**

---

- Evaluar por medio de espectrofotometría de absorción atómica la concentración intracelular de As-Cd-Pb por un periodo de exposición crónica.
- Evaluar si la exposición crónica a la mezcla de As-Cd-Pb, es capaz de inhibir la barrera antioxidante.
- Evaluar si la inhibición química de las moléculas antioxidantes GSH, CAT favorece el proceso de transformación celular, junto con la exposición crónica a la mezcla de As-Cd-Pb.
- Evaluar el establecimiento de estrés oxidativo mediante la determinación de ERO, lipoperoxidación y daño genotóxico.
- Evaluar la transformación celular según los parámetros recomendados por la IARC/NCI/EPA.

# Diseño experimental

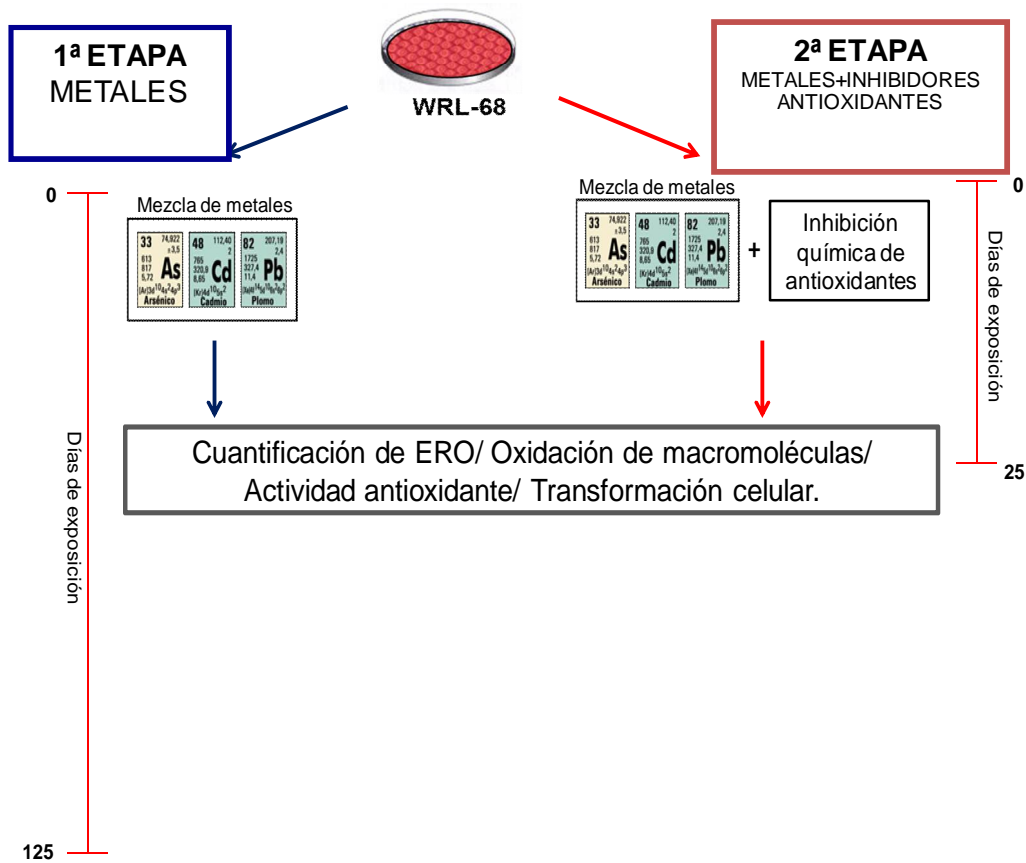
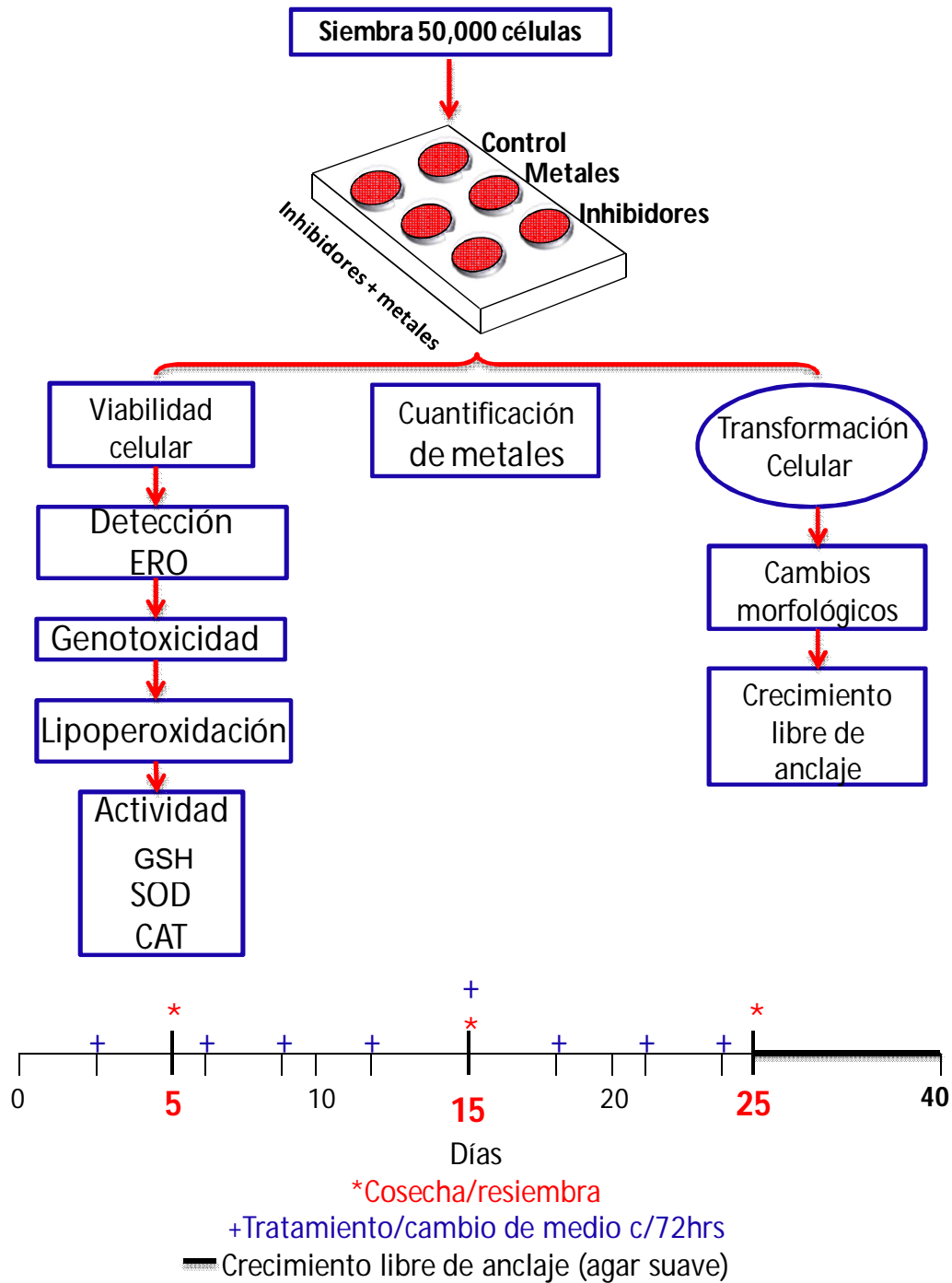


Figura 3. Diseño experimental general

## Metales + Inhibidores antioxidantes (2ª etapa)



**Figura 4.** Diseño Experimental 2ª etapa "Metales+inhibidores antioxidantes".  
Especies reactivas de oxígeno, (ERO); Glutación, (GSH); Superóxido dismutasa, (SOD); Catalasa, (CAT).

## Metodología

---

### Cultivo celular y tratamientos

Las células WRL-68 fueron cultivadas con el medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomicina. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. La siembra de células se hizo en cajas de 6 pozos con 5 X 10<sup>4</sup> células/pozo y fueron cosechadas al 80% de confluencia.

Se evaluaron cuatro grupos experimentales: grupo control (C) no tratado, cultivado según las condiciones antes descritas y reemplazando el medio de cultivo cada 72 hrs; grupo (M) tratado con la mezcla de metales (2 µM NaAsO<sub>2</sub>, 2 µM CdCl<sub>2</sub> y 5 µM Pb (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O) equivalente a las concentraciones de exposición ocupacional, renovando el tratamiento cada 72 hrs (1ª etapa experimental) [7, 64]; grupo (I) tratado con la mezcla de inhibidores químicos 1 mM de L-buthionine-S, R-sulphoximine (BSO) (inhibidor de la síntesis de GSH) y 1.66 mM de 3-aminotriazol (3-ATZ) (inhibidor de CAT), aplicando el tratamiento por 2 hrs de exposición y renovando cada 72 hrs; por último se incluyó el grupo (M+I) tratado con la mezcla de metales e inhibidores antioxidantes antes descritos, aplicando el tratamiento por 2 hrs y renovando cada 72 hrs (2ª etapa experimental). Todos los grupos fueron sub-cultivados cada 5 días durante 125 días (1ª etapa) y 25 días (2ª etapa) de tratamiento.

## Cuantificación intracelular de la mezcla de metales (As-Cd-Pb)

La concentración intracelular de metales fue determinada por espectrofotometría de absorción atómica. Para la cuantificación de As las muestras fueron digeridas y analizadas usando la técnica de evolución de hidruros, cuantificadas con el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 3110 [65]. La concentración de Cd y Pb se determinó con la técnica de horno de grafito en el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 2380.

## Viabilidad celular

Se evaluó por el método de doble tinción metabólica FDA, descrito por Hartmann & Speit [66]. Las células son mezcladas con una solución de fluorocromos que contiene 0.02 g/l Et-Br y 0.015 g/l de FDA. Las células fueron analizadas por microscopia de fluorescencia (Olympus BMX-60 con un filtro de UM61002). Las células muertas fluorescen en color rojo, y las vivas en color verde. Se evaluaron 100 células al azar por triplicado por cada condición y los resultados se expresaron en porcentaje.

## Detección de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Esta técnica se basa en la oxidación de la dihidrorodamina-123 a rodamina-123 por especies reactivas de oxígeno [67]. A partir de una alícuota de 100  $\mu$ l de suspensión celular (aproximadamente  $1 \times 10^6$  células) fué centrifugada a 1200 rpm durante 5 min. Posteriormente, el sobrenadante fue retirado y se adicionaron 180  $\mu$ l de buffer A (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.8 mM  $CaCl_2$ , 5 mM de glucosa, 15 mM HEPES) y 20  $\mu$ l de



dihidrorrodamina-123 (1mM). Las muestras se colocaron en una placa de 96 pozos y se cuantificaron en espectrofotómetro de microplaca (Bio-Rad, Modelo 550) a 505 nm. Los resultados se interpolaron a partir de una curva estándar de 0-10 mM rodamina-123 en buffer A.

### Determinación de la actividad de Superóxido Dismutasa-1 (SOD-1)

La actividad de la enzima superóxido dismutasa fue evaluada según el protocolo descrito por Sun *et al.*, [68]. Este método se basa en la competencia entre la superóxido dismutasa y el azul de tetrazolio por los radicales superóxido formados por el sistema xantina oxidasa. Las células fueron sonicadas y centrifugadas a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. Se tomaron 200 µl de sobrenadante y dividió en dos tubos con 1.85 ml de mezcla de reacción (0.265 mM xantina, 0.53 mM EDTA, 0.1325 mM NBT, 883mg/ml albumina, 353 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). En un tubo se adicionaron 50 µl de buffer de fosfatos 50 mM, como blanco de reacción; en otro tubo, se pusieron 50 µl de muestra y se adiciono 2-2.5 U/mL xantina oxidasa. Las muestras y sus blancos de reacción fueron incubados a 37°C por 15 min. Posteriormente, se adicionaron 500 µl de CuCl<sub>2</sub> para parar la reacción. Se tomo una alícuota de 200 µl de cada muestra y coloco en una microplaca de 96 pozos y cuantifico a 560 nm de absorbancia (A). Las unidades de SOD fueron calculadas con la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de SOD} = [A_{\text{mezcla de reacción}} - (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}})] / [A_{\text{mezcla de reacción}} (0.5 \%) ]$$

## Cuantificación de la actividad de catalasa (CAT)

La actividad de la catalasa se midió de acuerdo con el protocolo descrito por Aebi. [69], se usó una alícuota de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células, se lavaron tres veces con PBS estéril e inhibidores de proteasas. Las células fueron sonicadas durante 10 ciclos de 10 segundos a una amplitud de 20 MHz. Después de sonicar las células se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min a  $4^{\circ}$  C. El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad de la catalasa y la concentración de proteínas. La actividad de la catalasa se determinó leyendo la absorbancia a 240 nm a temperatura ambiente, ajustando a cero con buffer de fosfatos 50 mM. Para la reacción se agregaron 500  $\mu$ l  $H_2O_2$  (20 mM) más 100  $\mu$ l de sobrenadante y 400  $\mu$ l de buffer de fosfatos 50 mM, midiendo la absorbancia a 15 y 30 segundos de iniciada la reacción.

## Cuantificación de lipoperoxidación (Lpx)

El método del ácido tiobarbitúrico se utilizó para medir la concentración de malondialdehído (MDA) [70]. Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l (aproximadamente  $1 \times 10^6$  células), se adicionó 100  $\mu$ l de ácido tricloroacético (10% w/v) y se centrifugó a 3000g por 10 min. Al sobrenadante obtenido se añadió 1 ml de ácido tiobarbitúrico (0.375%) y posteriormente la mezcla se calentó a  $92^{\circ}$ C durante 45 minutos. La absorbancia del complejo ácido tiobarbitúrico-MDA se midió a 532 nm usando un espectrofotómetro en placas. Los datos fueron interpolados en una curva de concentración de 1,1,3,3-tetraetoxipropano que va de 0 a 10 nM.

## Evaluación de genotoxicidad (ensayo cometa)

Se tomaron  $1-1.5 \times 10^4$  células en  $10 \mu\text{l}$  de suspensión, se mezclaron con  $75 \mu\text{l}$  de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% y se colocaron en laminillas para microscopio precargadas con  $150 \mu\text{l}$  de agarosa normal al 0.5%. El ensayo cometa alcalino se realizó según lo descrito por Vega et al. [71]. Las laminillas gelificadas se incubaron en solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10, suplementado con 10% DMSO y 1% de Triton X-100) a  $4^\circ\text{C}$  durante al menos 1h. Posteriormente las laminillas se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal con solución alcalina que contiene (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13). Las laminillas se mantuvieron durante 10 min en solución para permitir el relajamiento del ADN. La electroforesis se corrió en la misma solución durante 10 min a 300 mA y 25 V ( $\sim 0.8 \text{ V/cm}^2$ ). Todos los pasos del ensayo se llevaron a cabo bajo condiciones de luz amarilla. Después de la electroforesis, las laminillas se enjuagaron con solución de neutralización (Tris 0.4 M, pH 7.5) a temperatura ambiente durante 15 min. Las laminillas fueron deshidratadas con etanol al 100% por 15 min y se dejaron secar al aire. Para evaluar las laminillas se adicionó bromuro de etidio ( $20 \mu\text{l}$  de solución  $0.2 \mu\text{g/ml}$ ) sobre el gel y se colocó un cubre objetos. Los núcleos fueron evaluados de forma individual y visualizados a un aumento de 20x usando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX-60 (515–560nm filtro de excitación, 590nm de filtro de barrera). Las imágenes fueron digitalizadas y analizadas con el programa KOMET v. 3.1 (Kinetic Imaging). Para evaluar el daño del ADN se empleó el parámetro de Olive tail moment (OTM), evaluando 200 células por cada condición de estudio.

## Evaluación morfológica de la transformación celular

La transformación celular se evaluó de acuerdo a los parámetros morfológicos descritos por la IARC/NCI/EPA [72]. Los focos de transformación se evaluaron en base a los siguientes criterios morfológicos: 1) diámetro mayor a 2 mm, 2) tinción basófila intensa, 3) multicapas densas de células y 4) orientación azarosa de las células en el borde de los focos de transformación [62, 73].

## Ensayo de crecimiento celular libre de anclaje

El crecimiento libre de anclaje de los hepatocitos fue monitoreado mediante el ensayo de formación de colonias en agar suave; la cual es una prueba selectiva para evaluar la capacidad de transformación celular. Las células son disgregadas ( $1 \times 10^4$ ) y sembradas en placas de cultivo de seis pozos con agar noble al 0.3%, medio de cultivo DMEM, 10% de suero fetal bovino y fueron incubadas a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Las colonias celulares fueron evaluadas después de 14 días de cultivo, se fijaron con etanol al 70% y tiñeron con azul de Coomassie [74].

## Análisis estadístico

Los resultados fueron reportados como medias y error estándar  $\pm$  (SE) de tres experimentos independientes con duplicado. La significancia estadística entre los grupos experimentales y el grupo control se calculó por análisis de varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni y análisis post hoc. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos. Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico Sigma-Stat (V).

## Resultados

---

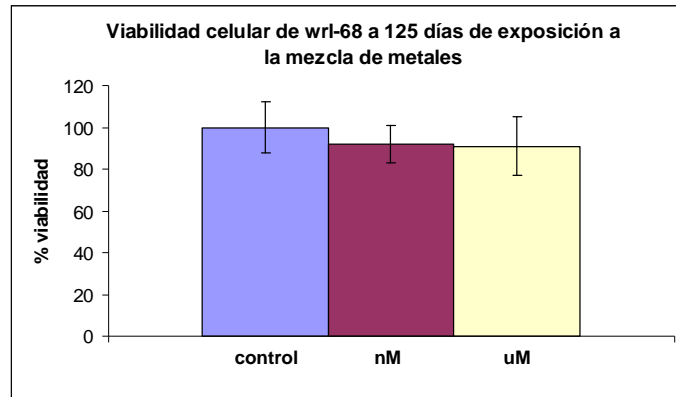
Los resultados de este proyecto fueron obtenidos en dos etapas, como se describió en el diseño experimental general (Figura 3).

En la primera etapa, se evaluó la capacidad transformante de la mezcla de metales en concentraciones del orden micromolar ( $\mu\text{M}$ ), equivalente a la reportada en la población ocupacionalmente expuesta (POE). Como control negativo, se usó una concentración de metales del orden nanomolar (nM) reportadas en el ambiente. La evaluación de ambas mezclas, fue crónica durante 125 días de exposición.

En la segunda etapa, se evaluó el potencial transformante de la mezcla de metales en concentración ( $\mu\text{M}$ ) equivalente a la reportada en POE, en combinación con la inhibición química de las moléculas antioxidantes (GSH y CAT). Con la finalidad de disminuir la actividad de la barrera antioxidante endógena y evaluar la participación del estrés oxidativo en el proceso de transformación celular por exposición crónica a la mezcla de metales (As-Cd-Pb). La evaluación se realizó durante 25 días, obteniendo resultados característicos de la transformación celular en la línea WRL-68.

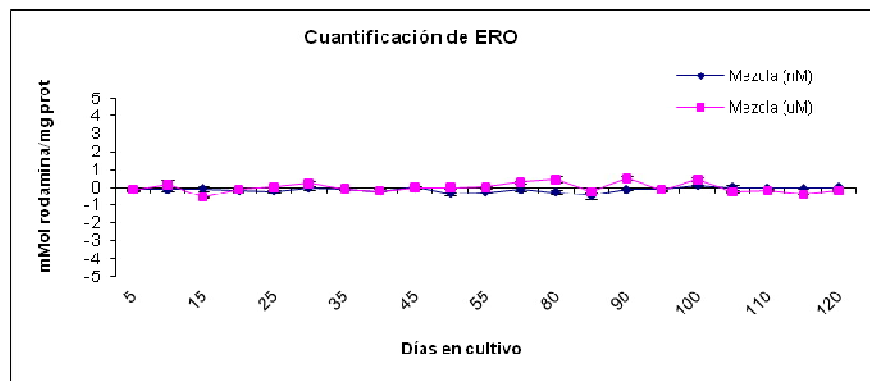
Los resultados de la **primera etapa**, se obtuvieron de tres experimentos independientes cada uno por duplicado y su respectivo grupo control (C) (no tratado), mezcla de metales en concentración nanomolar (nM) (11.54nM de As, 27.39nM de Cd y 48.26nM de Pb), y la mezcla de metales en concentración micromolar ( $2\mu\text{M}$  para As y Cd y  $5\mu\text{M}$  de Pb).

Como se observa en la Figura 5, los resultados de viabilidad celular se mantuvieron en 90% para ambas concentraciones de metales (nM y  $\mu$ M). Mientras que el grupo control mantuvo el 100% de viabilidad durante los 125 días de tratamiento.



**Figura 5.** Viabilidad promedio de WRL-68, evaluada durante 125 días de exposición. nM = Mezcla de metales en concentración nano molar.  $\mu$ M= Mezcla de metales en concentración micro molar.

La generación de especies reactivas de oxígeno ERO ( $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot}$ ,  $^{\cdot}OH$ ), no fue significativa durante los 125 días de tratamiento para ambas concentraciones de metales (nM y  $\mu$ M); mientras que el grupo control presentó valores cercanos a cero, por lo que su valor promedio fue ajustado a cero y representado con una línea recta como valor basal (Figura 6).



**Figura 6.** Cuantificación de ERO en WRL-68 durante 125 días de exposición a la mezcla de metales.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD-1), aumento con el tratamiento a concentración micro molar durante los 125 días de exposición. Mientras que con el tratamiento a concentración nano molar y grupo control no se encontraron cambios en la actividad enzimática (Figura 7). Lo anterior sugiere que la mezcla micro molar genera iones superóxido y por consiguiente la inducción significativa de SOD-1 durante todo el tratamiento.

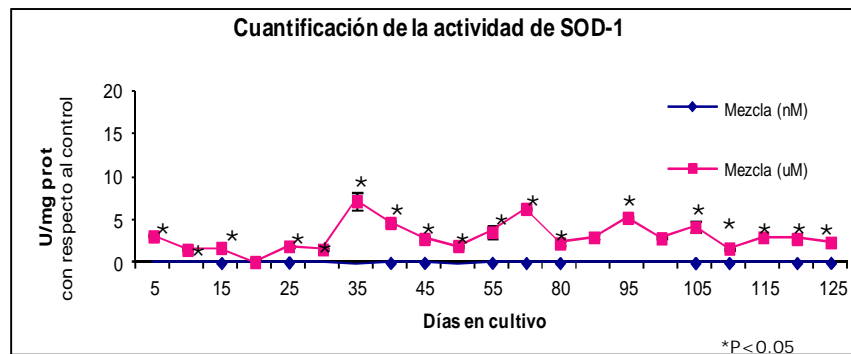


Figura 7. Actividad enzimática de SOD-1 en WRL-68, durante 125 días de exposición a las mezclas de metales.

La actividad de la catalasa (CAT), aumento por el tratamiento a concentración micro molar a partir del día 55, manteniéndose hasta los 125 días de exposición; sugiriendo el aumento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como resultado de la actividad constante de SOD-1, favoreciendo la actividad de CAT. Mientras que el tratamiento a concentración nano molar y grupo control, no mostraron cambios (Figura 8).

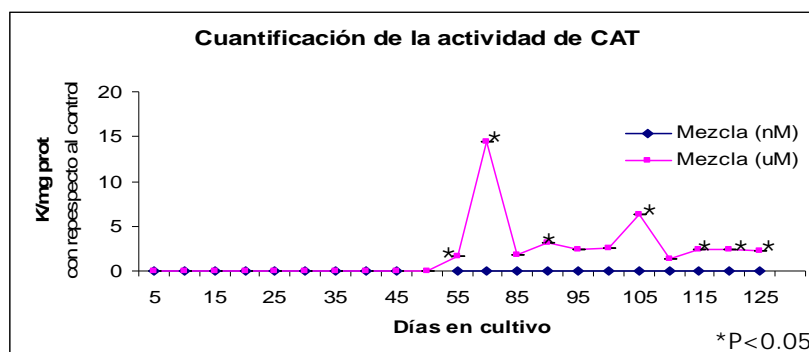


Figura 8. Actividad enzimática de CAT en WRL-68, durante 125 días de exposición a la mezcla de metales.

La cuantificación de la oxidación de los lípidos de membrana reportaron valores negativos para las condiciones experimentales y grupo control, como se muestra en la figura 9. Lo anterior como consecuencia de la eficiente actividad de SOD y CAT capaces de remover las ERO previniendo la oxidación de los lípidos.

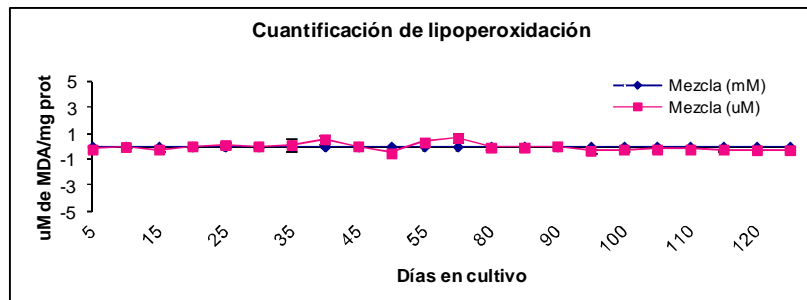


Figura 9. Cuantificación de lipoperoxidación, en WRL-68 durante 125 días de exposición a la mezcla de metales.

Para evaluar el efecto genotóxico de ambas concentraciones de metales (nM y µM), se cuantificaron los rompimientos de cadena sencilla en el ADN mediante el ensayo cometa a pH>13, el cual no evidencio daño reportando valores cercanos a cero para los tratamientos con las mezclas de metales y el grupo control. Como resultado de la activación de SOD y CAT responsables de eliminar las ERO, manteniendo así la integridad del ADN (Figura 10).

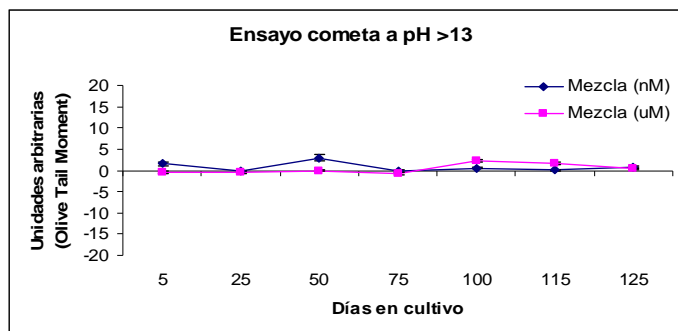
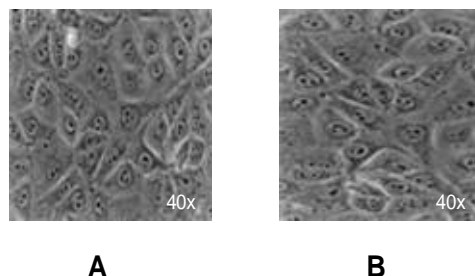


Figura 10. Evaluación de daño al ADN por ensayo cometa a pH>13 en WRL-68 durante 125 días de exposición a la mezcla de metales.



La evaluación morfológica de las células en cultivo, se realizó por microscopía de luz a 40x. Se buscaron cambios morfológicos relacionados con la transformación en las células tratadas con las mezclas de metales. La evaluación se realizó en base a los parámetros recomendados por la IARC/NCI/EPA [72] que incluyen: la pérdida de inhibición por contacto entre células, orientación azarosa en el borde del cúmulo de crecimiento, invasión a la mono capa de crecimiento, crecimiento en multicapas densas y predominio de células fusiformes. Sin embargo, bajo estos criterios no se encontraron cambios que indicaran la transformación celular, tanto en el grupo control como en los grupos tratados con las mezclas de metales después de 125 días de tratamiento (Figura 11).



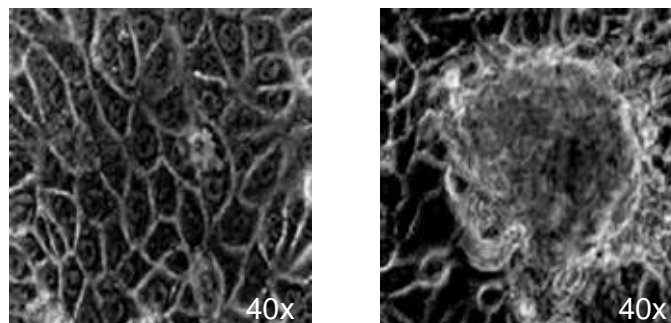
**Figura 11.** Análisis morfológico representativo del cultivo de WRL-68 a semi-confluencia (80%), por microscopía de luz a 40x después de 125 días de tratamiento. **A.** Grupo control. **B.** Grupo representativo de la mezcla de metales a concentración  $\mu\text{M}$ .

Con base en estos resultados, se logró evaluar uno de los objetivos propuestos en este estudio. Al demostrar que la mezcla de metales en concentración micromolar, equivalente a la presente en POE es incapaz de inhibir a la barrera antioxidante y llevar a la transformación al modelo celular WRL-68 por un periodo de exposición crónico.

Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de trabajo, al observar que la integridad de la barrera antioxidante previene el establecimiento de estrés

oxidativo y desencadenar el proceso de transformación; permitiendo abordar la segunda etapa del proyecto, encaminada a la inhibición de las moléculas antioxidantes y evaluar su participación en el proceso de transformación celular.

Los anteriores resultados generaron la interrogante sobre la capacidad transformante del modelo de estudio (WRL-68), al no encontrar evidencia de este proceso tras exponerlo por 125 días a la mezcla de metales. Se decidió evaluar la capacidad transformante de la línea WRL-68, para lo cual se incorporó el modelo de transformación celular propuesto por Kajiwara y Ajimi [62], con modificaciones de Tsuchiya y Umeda [73] en el que se da un estímulo iniciador y varios estímulos promotores. En nuestro modelo de estudio se empleó Cd ( $50 \mu\text{M}$ ) como estímulo iniciador por 4 hrs de exposición, según lo reportado por Keshava [75] y como agente promotor se usó al 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) en una concentración de  $0.1 \mu\text{g/ml}$  administrado cada 72 hrs. Tratamiento con el que las células WRL-68 presentaron cambios morfológicos similares a los reportados por la IARC/NCI/EPA; con lo cual se confirmó la capacidad transformante del sistema celular (WRL-68) después de 25 días en cultivo (Figura 12).



**A**

**B**

**Figura 12.** Evidencia representativa de transformación celular de la línea WRL- 68, después de 25 días de tratamiento.  
A. Control no tratado B. Tratamiento con Cd ( $50 \mu\text{M}$ ) / TPA ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ ).

Una vez confirmada la capacidad transformante de nuestro modelo de estudio, se continuó con la segunda etapa del proyecto. Encaminada a evaluar la participación de la barrera antioxidante en el proceso de transformación celular, mediante el establecimiento de estrés oxidativo. A través de la inhibición química de los antioxidantes GSH y CAT con los inhibidores, L-Buthionine-Sulfoxamine (BSO) y 3-Amino Triazol (3-ATZ) respectivamente, en combinación con la mezcla de metales a una concentración presente en POE ( $2\mu\text{M}$  para As y Cd y  $5\mu\text{M}$  de Pb) por un periodo de exposición crónico.

Los resultados de la segunda etapa, se obtuvieron de tres experimentos independientes por duplicado.

La viabilidad celular fue constante, conservando un porcentaje mayor al 90% entre los grupos de estudio (C, M, I) durante los 25 días de tratamiento. Sin embargo, se presentó una reducción significativa en la viabilidad celular del grupo M+I al 5° día de exposición; sugiriendo el fenómeno de selección clonal entre las células expuestas al tratamiento y el posible inicio de transformación celular (Tabla 3).

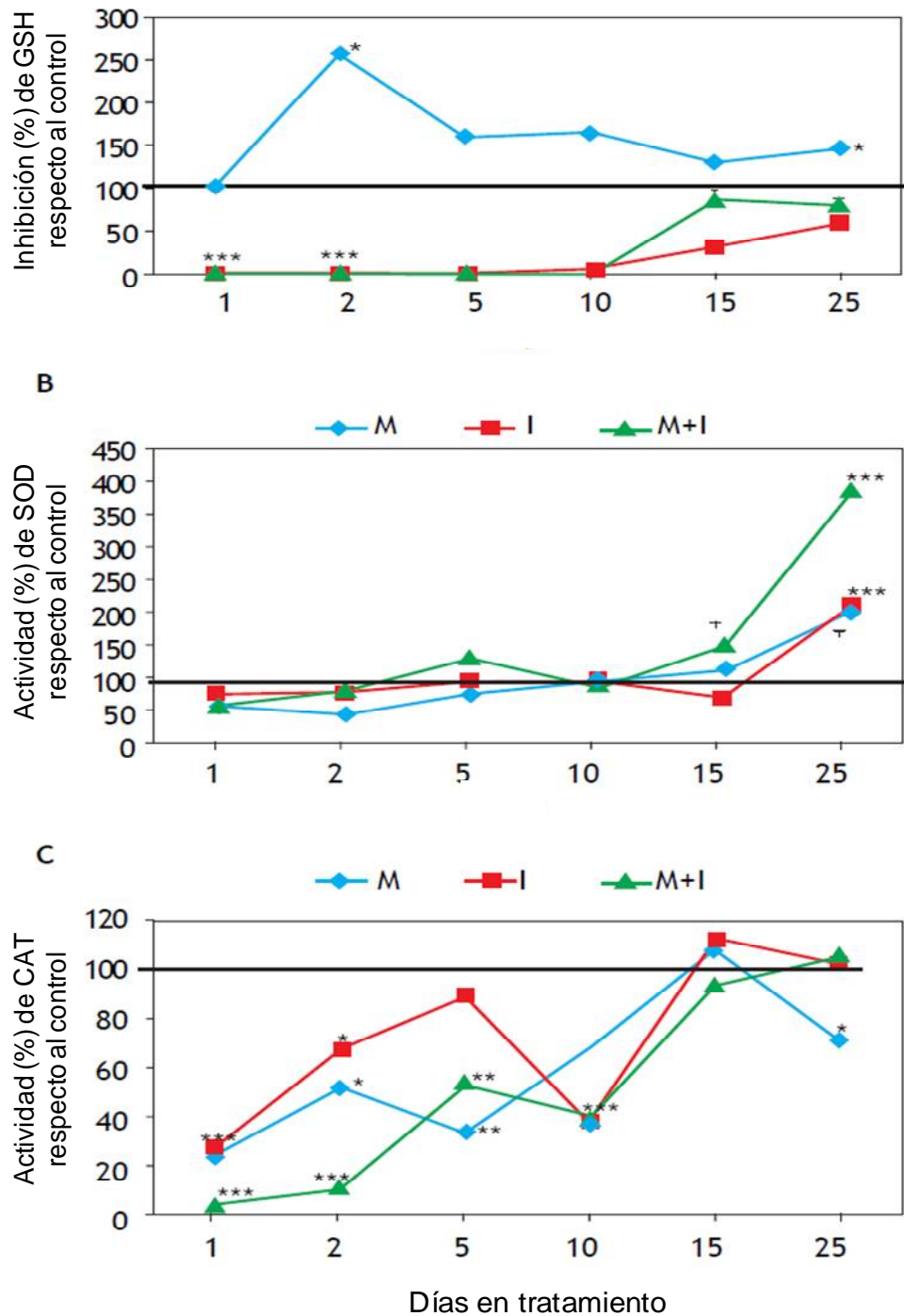
La concentración intracelular de metales (As, Cd, Pb) presentes en la mezcla de estudio, fue similar entre el grupo control (C) y el grupo tratado con los inhibidores de antioxidantes (I) durante todo el tratamiento. Mientras que los grupos tratados con la mezcla de metales (M) y la mezcla de metales más inhibidores antioxidantes (M+I), presentaron un aumento significativo en la concentración de Pb durante los 25 días de tratamiento (Tabla 3).

**Tabla 3.** Viabilidad celular y cuantificación intracelular de metales en WRL-68 durante 25 días tratamiento.

Días	Tratamiento	Viabilidad (%)	As (µg/L)	Cd (µg/L)	Pb (µg/L)
5	C	100 ± 2.8	0.526 ± 0.020	3.359 ± 0.001	4.287 ± 0.760
	M	100 ± 0	9.805 ± 0.059**	4.298 ± 0.000**	37.475 ± 6.031**
	I	98 ± 2.8	1.276 ± 0.022**	3.317 ± 0.000*	5.475 ± 0.700
	M + I	23 ± 0**	21.07 ± 0.078**	7.549 ± 0.001**	22.955 ± 0.021**
15	C	100 ± 0	1.203 ± 0.020	6.441 ± 0.001	4.972 ± 1.460
	M	100 ± 1.4	14.316 ± 0.130**	10.217 ± 0.014**	31.35 ± 4.228**
	I	96 ± 2.8*	0.667 ± 0.029**	2.739 ± 0.002**	5.94 ± 2.291
	M + I	100 ± 0	11.863 ± 0.453**	10.107 ± 0.014**	98.815 ± 3.500**
25	C	100 ± 1.4	0.508 ± 0.007	4.794 ± 0.001	5.4 ± 2.206
	M	97 ± 0*	11.413 ± 0.130**	5.67 ± 0.001**	44.64 ± 5.798**
	I	91 ± 2.1*	0.403 ± 0.019**	2.241 ± 0.001**	4.55 ± 1.258
	M + I	100 ± 0.7	14.513 ± 0.030**	12.617 ± 0.014**	117.51 ± 0.035**

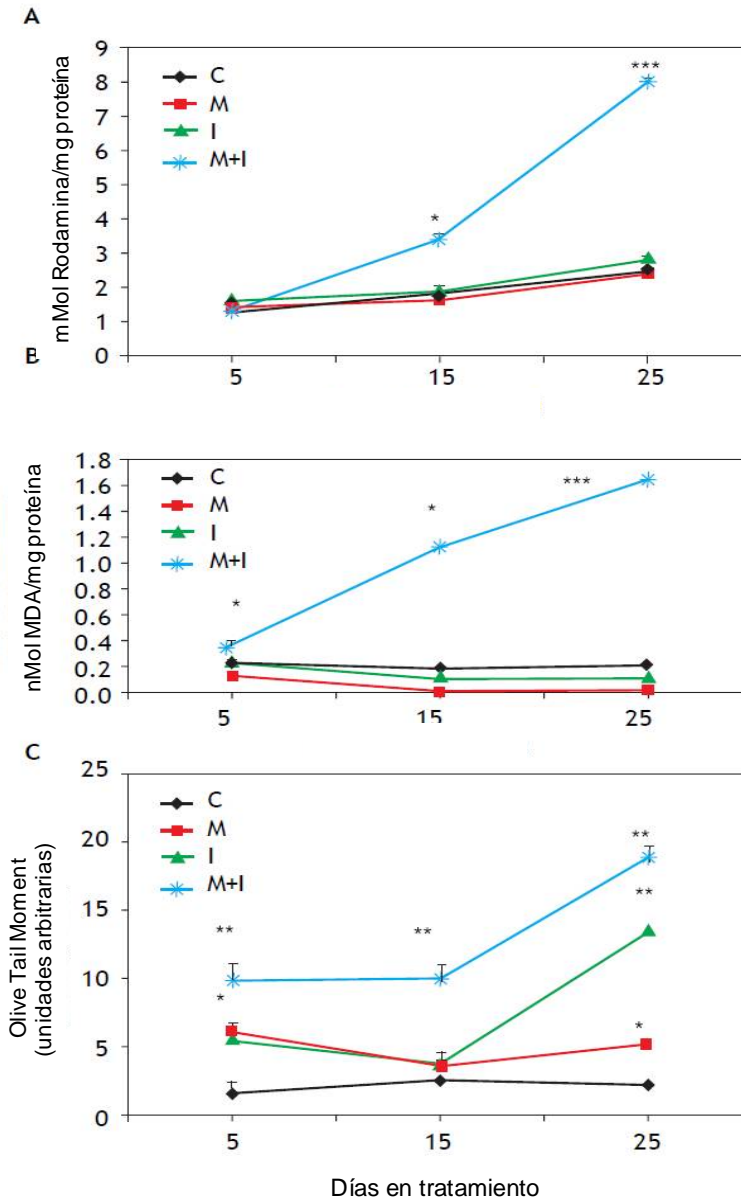
C: control. M: Mezcla de metales. I: Mezcla de inhibidores. M + I: Mezcla de metales + Inhibidores. Todos los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes con duplicado. El análisis estadístico se determinó con la prueba de ANOVA and post hoc, comparando el grupo experimental con respecto al grupo control; los valores con significancia estadística son representados con \*p < 0.05, \*\*p < 0.005.

Con respecto a la evaluación de los antioxidantes, se identificó una reducción en la concentración de GSH en los grupos (I) y (M+I), mientras que en el grupo (M) aumentó significativamente en comparación con el grupo (C) (Figura 13 A). La actividad enzimática de SOD presentó una tendencia similar entre grupos con respecto al grupo (C). Sin embargo, se observó un aumento a partir del día 15 entre los grupos (M) y (M+I); acentuándose el efecto en este último grupo al día 25 (Figura 13B). Respecto a la actividad de la CAT, presento una reducción en los grupos de estudio hasta los 10 días de tratamiento, recuperando los valores basales del grupo control a los 15 días (Figura 13 C).



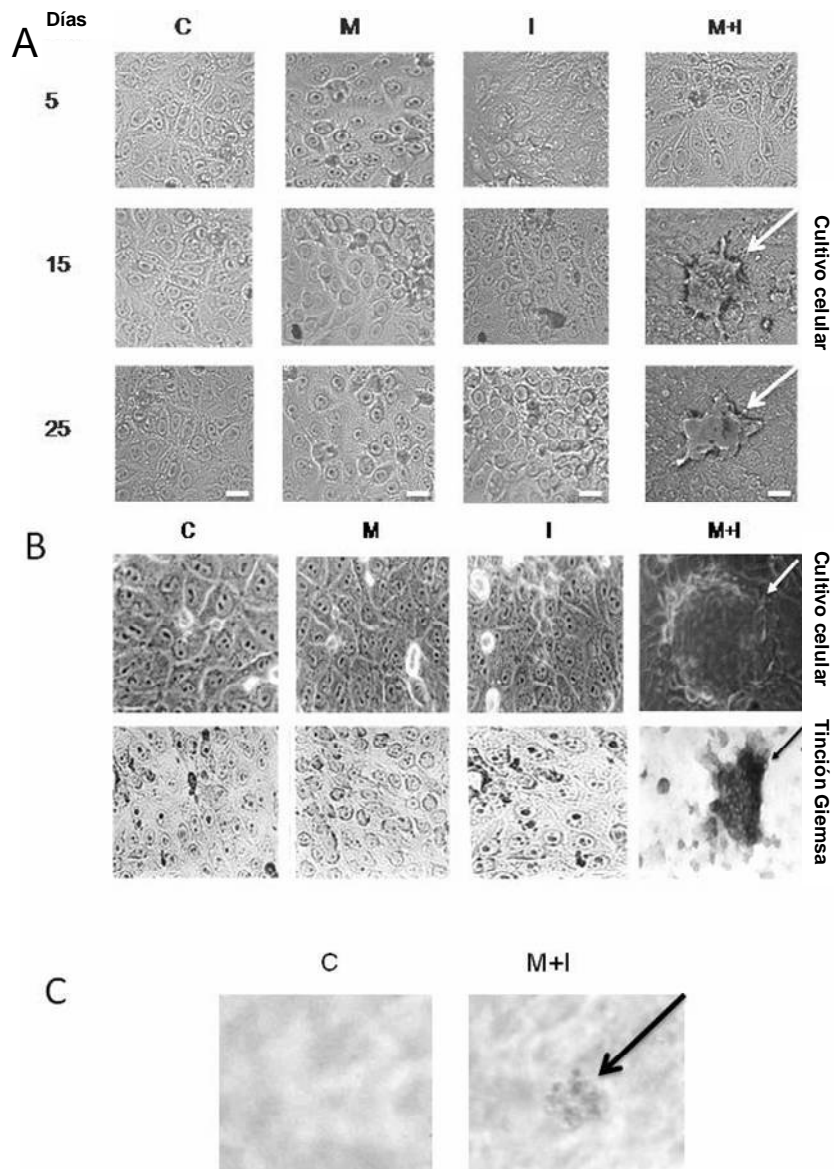
**Figura 13.** Actividad antioxidante. **A.** concentración de GSH, evaluada por el método de OPT. **B.** Actividad de SOD, evaluada por el sistema xantina oxidasa. **C.** Actividad de CAT, evaluada por la vía de degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La línea horizontal en el eje Y representa el valor relativo del grupo control (100%), comparado con los grupos de estudio. M: Mezcla de metales. I: Mezcla de inhibidores. M + I: Mezcla de metales + Inhibidores. Todos los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes con duplicado. El análisis estadístico se determinó con la prueba de ANOVA and post hoc, comparando el grupo experimental con respecto al grupo control; los valores con significancia estadística son representados con \*p < 0.05, \*\*p < 0.005.

La evaluación de la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) y su efecto sobre blancos moleculares, mostró un aumento significativo y exclusivo del grupo M+I durante los días 15-25 (Figura 14A); teniendo como consecuencia la presencia de lipoperoxidación (Figura 14B) y rompimientos de cadena sencilla en el ADN (Figura 14C).



**Figura 14.** Especies reactivas de oxígeno y blancos moleculares de oxidación. **A.** Especies reactivas de oxígeno (ERO), cuantificadas por medio de la oxidación de la dihidrorodamina-123. **B.** Lipoperoxidación (LPX), cuantificada por la reacción de T-BARS. **C.** Evaluación de daño al DNA, determinada por ensayo cometa. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes con duplicado. El análisis estadístico se determinó con la prueba de ANOVA and post hoc, comparando el grupo experimental con respecto al grupo control; los valores con significancia estadística son representados con el valor \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ .

Por último, se evaluaron los cambios morfológicos característicos de la transformación celular; los cuales se presentaron exclusivamente en el grupo M+I a partir del día 15 de tratamiento (Figuras 15 A y 15 B). Posteriormente se confirmó la transformación celular del grupo M+I a través del sub cultivo positivo en agar suave (Figura 15C).



**Figura 15.** Transformación celular de WRL-68 tratadas por 25 días, evaluadas por microscopía de luz a 40X. **A.** Morfología de células expuestas a diferentes tratamientos por 25 días. **B.** Foco de transformación con basofilia intensa, identificadas con la tinción de Giemsa. **C.** Células positivas a la transformación, identificadas con el ensayo libre de anclaje en agar suave. C: control. M: Mezcla de metales. I: Mezcla de inhibidores. M + I: Mezcla de metales + Inhibidores. Barra=10µm.

## Discusión

---

En la primera etapa del estudio no se identificaron cambios en la viabilidad, ERO, SOD-1, CAT, lipoperoxidación y daño al ADN en el grupo tratado con la mezcla de metales en concentración nanomolar (11.54nM de As, 27.39nM de Cd y 48.26nM de Pb) durante los 125 días de exposición. Mientras que para la mezcla de metales en concentración micromolar (2μM As-Cd y 5μM de Pb); no se encontró efecto en la viabilidad y generación de ERO de forma significativa. Sin embargo, se identificó un efecto inductor de esta mezcla sobre la actividad de SOD-1 durante los 125 de tratamiento. Lo anterior propone una activa generación de iones  $O_2^{\cdot-}$  durante el tratamiento, los cuales no favorecieron el incremento de ERO como consecuencia de la inestabilidad del ion y la actividad enzimática coordinada de SOD y CAT en la eliminación del  $O_2^{\cdot-}$ .

Por otra parte se identificó un aumento significativo en la actividad de la CAT hasta el día 55, sugiriendo la participación de otras moléculas antioxidantes, como la glutatión peroxidasa y peroxiredoxinas en la eliminación del  $H_2O_2$  durante los primeros días del tratamiento, impidiendo la inducción temprana de la CAT.

Lo anterior contribuyó a inhibir el efecto oxidante de las ERO, por lo que no se observaron daños en macromoléculas como lípidos y ADN. No se observaron cambios morfológicos relacionados con la transformación celular. Lo que indica que bajo estas condiciones, la mezcla de metales en concentración micro molar solo tiene la capacidad de retar a la célula. Sin generar efectos que comprometan su integridad y funcionalidad, como resultado de la participación



de la barrera antioxidante; capaz de contrarrestar el efecto de esta mezcla y mantener la homeostasis celular.

En la segunda etapa de estudio, se observó el aumento significativo de la concentración de As-Cd-Pb en el grupo (M) tratado con la mezcla de estos metales; mientras que el grupo (M+I) presentó un incremento exacerbado en la concentración de Pb, en comparación con el grupo (M). El cual es un efecto ya reportado por Hwua *et al.* [76] y Kowaltowski, *et al.* [77] que puede explicarse por acción del 3-aminotriazol que inhibe la actividad de la catalasa y metalotioneínas, activando proteínas transportadoras de Pb y Cd dando como resultado el aumento en la absorción de estos metales. Por otra parte, Doroshenko & Doroshenko [78] y Lee, *et al.* [79] propusieron un incremento en el influjo de calcio dependiente de los canales tipo L-Ca<sup>2+</sup> e inducida por estrés oxidativo como consecuencia del agotamiento de GSH. Además de esto, Hinkle, *et al.* [80] y Lou, *et al.* [81] analizaron la actividad de los transportadores de calcio e intercambio de aniones cuando se aumenta la absorción de estos metales; encontrando cambios significativos en su actividad. Sin embargo, estas propuestas aun son aproximaciones al mecanismo responsable del aumento intracelular de Pb; por lo que hacen falta nuevos estudios encaminados a precisar la participación de los inhibidores antioxidantes en el proceso de acumulación del plomo.

El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, es el proceso responsable de causar el establecimiento de estrés oxidativo y se ha propuesto como uno de los mecanismos implicados en la carcinogénesis por exposición a metales [22]. Existe evidencia de la participación de la inhibición de los mecanismos de

defensa antioxidante durante el desarrollo tumoral. Reiners, *et al.* [82] reportó una disminución significativa en la actividad de SOD, CAT y glutatión peroxidasa en las células SENCAR procedentes de piel de ratón después de la exposición a TPA. También se evaluó la actividad enzimática de SOD y CAT en la generación de papilomas y carcinomas utilizando un protocolo de iniciación-promoción en donde estos antioxidantes presentaron una reducción en comparación con el grupo control. Aunado a esto, la promoción y progresión de tumores de piel en diferentes cepas de ratón ha mostrado correlación con eventos oxidativos y de daño al ADN [83].

Los datos de la literatura sugieren que la modulación de la actividad de la catalasa puede estar involucrada en la desregulación de las cascadas de señalización durante la promoción-progresión tumoral, con vías reguladas por la trans-activación de AP-1, NF-kB y CREB siendo afectados de manera significativa [84].

La disminución del GSH genera estrés oxidativo y posteriormente, conduce a la inducción de JNK/SAPK, p38 y MAPK [85], por lo que es posible que la reducción sostenida de los niveles de glutatión facilite la aparición de un fenotipo transformante. Interesantemente en nuestro estudio se observó el aumento en la concentración de GSH en el tratamiento con metales. Este resultado es paradójico, ya que se esperaba la disminución de GSH después de la exposición a metales pro-oxidantes debido al consumo de este antioxidante para contrarrestar el efecto de exposición a los metales. Muchos estudios se han centrado en la regulación transcripcional de las enzimas intermediarias para la síntesis de GSH; interactuando con factores nucleares

de transcripción como NFκB, Sp-1, AP-1, el activador de la proteína-2 (AP-2), elementos de respuesta a metales (MRE), elementos de respuesta antioxidante (ARE) y la promoción de gamma glutamato cisteína ligasa (GCL) humana. Por otra parte, se ha identificado al elemento proximal AP-1 (-263 a -269) como un mediador crítico del aumento de estrés oxidativo, induciendo la transcripción de GCL humana. Aunado a esto, se suma la activación de la vía ARE con lo que se podría explicar por qué los xenobióticos causan un aumento en la concentración de GSH como una primera respuesta al estímulo [86, 87].

Además de la disminución de antioxidantes, se identifico la generación ERO, peroxidación de lípidos y genotoxicidad en las células tratadas con M+I durante el tiempo de exposición. Considerando que el daño al ADN estuvo presente durante todo el tiempo del tratamiento (Figura 14 C), se sugiere que el mecanismo de reparación del ADN pudo haber sido afectado por el tratamiento de la mezcla de metales; favoreciendo el daño genotóxico observado en nuestro estudio y otros reportes [88, 89].

El aumento de los marcadores de estrés oxidativo, tales como ERO y la peroxidación lipídica, se observaron de manera uniforme durante todo el tiempo de exposición en el grupo M+I (Figura 14 A y B). La inactivación de la barrera antioxidante con 3-ATZ y BSO podría haber ayudado al aumento de los niveles de ERO en células tratadas con metales y posteriormente se dio el aumento de la peroxidación lipídica y genotoxicidad. El efecto potenciador de 3-ATZ en la genotoxicidad inducida por exposición a cadmio a bajas concentraciones (1-2μM) sugiere que pudo haber sido por una alta concentración intracelular de Cd como resultado de la exposición con 3-ATZ. Sin embargo, este efecto no

fue similar bajo las mismas condiciones experimentales al usar Pb como lo reporta Gupta, *et al.* [84] .

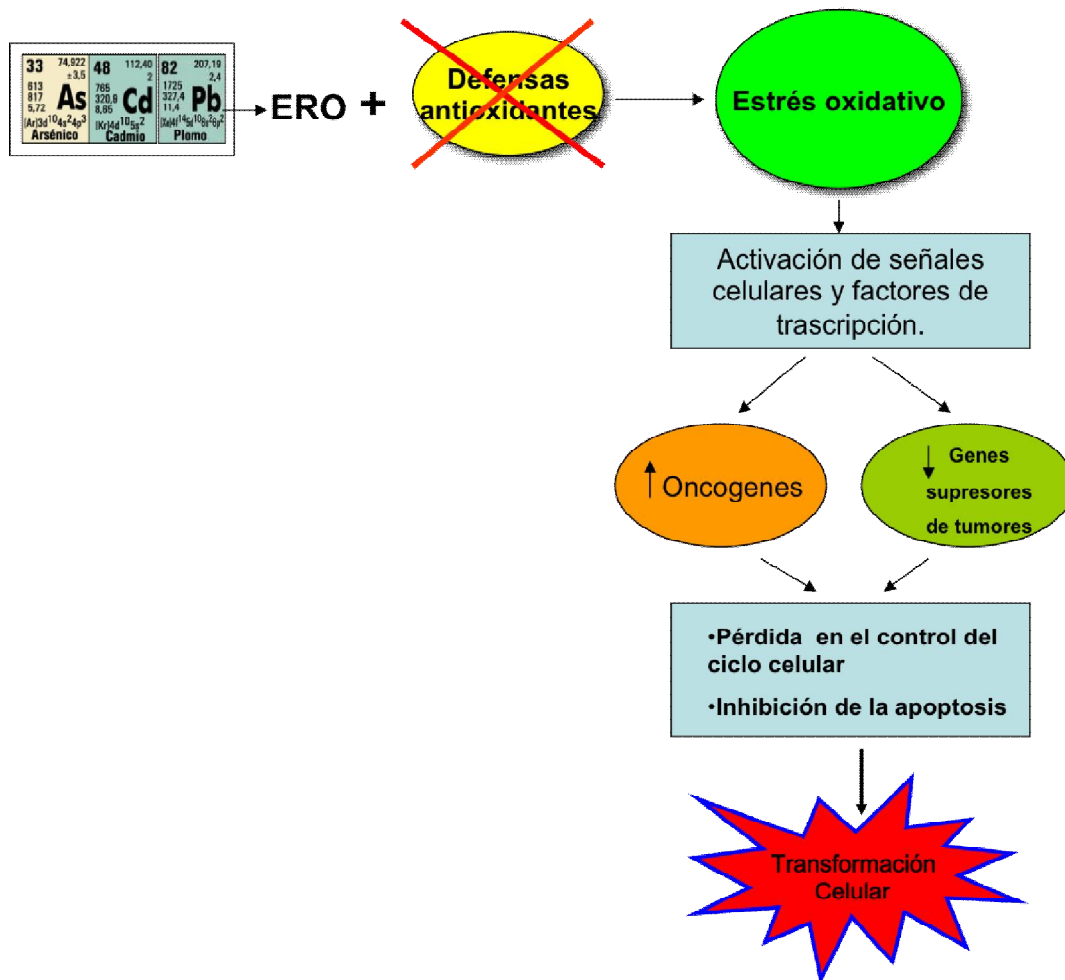
En este escenario, las células tratadas con M+I presentaron alteraciones morfológicas que las llevaron a perder sus características de células hepáticas. Es importante señalar que las células tratadas con la mezcla de metales en concentración nano molar durante más de 4 meses no mostraron cambios morfológicos (primera etapa experimental). Para determinar si los cambios morfológicos inducidos por la exposición a la mezcla de metales estaban relacionados con la transformación, se evaluó la capacidad de estas células para crecer en condiciones libres de anclaje. El cual es un importante paso en el proceso multi-etapas de la transformación neoplásica, como se ha reportado en estudios previos con fibroblastos humanos [76]; en nuestro trabajo este fenotipo se presentó como resultado de la exposición a la mezcla de metales y el establecimiento de estrés oxidativo por inhibición de GSH y CAT. Cabe resaltar que los cambios bioquímicos de las células con fenotipo libre anclaje aún no son conocidos completamente; sin embargo varios estudios sugieren que la independencia libre de anclaje derivan de un evento mutacional o epigenético, ya que es un fenotipo adquirido permanentemente por la célula [90, 91]. Además de esto, se ha reportado la vinculación de los inhibidores antioxidantes en combinación con metales en el crecimiento libre de anclaje; un ejemplo de esto es el efecto de 3-ATZ combinado con Cd en la inducción del crecimiento libre de anclaje en fibroblastos humanos HFW [76, 92]. Por el contrario el 3-ATZ en combinación con Pb no induce crecimiento libre de anclaje, citotoxicidad y mutagenicidad a pesar de que el 3-ATZ mejora la absorción y acumulación de este metal en las células HFW.

Finalmente este estudio aporta nuevos conocimientos sobre los mecanismos de acción de la mezcla de (As-Cd-Pb) en el proceso de transformación celular; mediante la interacción de la barrera antioxidante y el estrés oxidativo. De igual forma se aportaron nuevos conocimientos en el campo de la toxicología; al estudiar a los metales en forma de mezcla a concentraciones equivalentes equimolares a las presentes en el ambiente y por exposición ocupacional, haciendo este estudio de relevancia epidemiológica.

## **Conclusión**

---

- Se estandarizo un modelo celular de origen humano sensible a la transformación, con potencial utilidad para el estudio de la carcinogénesis química en humanos.
- Se identifico la participacion de la mezcla de (As-Cd-Pb) en combinación con la inhibición de enzimas antioxidantes (GSH,CAT) en el establecimiento de estrés oxidativo, como posible mecanismo de acción en el proceso de tranformacion celular (WRL-68); confirmando nuestra hipótesis de trabajo (Figura 16).
- Este estudio apoya que la barrera antioxidante es un factor protector en el proceso de transformación celular y propone la implementación de moléculas antioxidantes como biomarcadores de riesgo entre la población expuesta a estos metales.
- Los resultados obtenidos abren nuevas perspectivas en el campo del tratamiento e identificación de blancos moleculares; por exposición crónica a esta mezcla de As-Cd-Pb.



**Figura 16.** Mecanismos moleculares involucrados en la transformación celular por inhibición de la barrera antioxidante y exposición crónica a la mezcla de As-Cd-Pb.

## Referencias

---

1. Jozefczak, M., et al., *Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(3): p. 3145-75.
2. Rojas, E., et al., *Are metals dietary carcinogens?* Mutat Res, 1999. **443**(1-2): p. 157-81.
3. Jomova, K. and M. Valko, *Advances in metal-induced oxidative stress and human disease*. Toxicology, 2011. **283**(2-3): p. 65-87.
4. Wang, G. and B.A. Fowler, *Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic*. Toxicol Appl Pharmacol, 2008. **233**(1): p. 92-9.
5. [www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/ip04.html](http://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/ip04.html).
6. [www.epa.gov](http://www.epa.gov).
7. Palus, J., et al., *Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium*. Mutat Res, 2003. **540**(1): p. 19-28.
8. Leonard, S.S., J.J. Bower, and X. Shi, *Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses*. Mol Cell Biochem, 2004. **255**(1-2): p. 3-10.
9. Harris, G.K. and X. Shi, *Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species*. Mutat Res, 2003. **533**(1-2): p. 183-200.
10. Barchowsky, A., et al., *Stimulation of reactive oxygen, but not reactive nitrogen species, in vascular endothelial cells exposed to low levels of arsenite*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(11-12): p. 1405-12.
11. Yamanaka, K. and S. Okada, *Induction of lung-specific DNA damage by metabolically methylated arsenics via the production of free radicals*. Environ Health Perspect, 1994. **102 Suppl 3**: p. 37-40.
12. Hei, T.K., S.X. Liu, and C. Waldren, *Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: role of reactive oxygen species*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8103-7.
13. del Carmen, E.M., et al., *Cadmium induces alpha(1)collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells*. Toxicology, 2002. **170**(1-2): p. 63-73.
14. Waalkes, M.P., *Cadmium carcinogenesis in review*. J Inorg Biochem, 2000. **79**(1-4): p. 241-4.
15. Waisberg, M., et al., *Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis*. Toxicology, 2003. **192**(2-3): p. 95-117.
16. Watjen, W. and D. Beyersmann, *Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress*. Biometals, 2004. **17**(1): p. 65-78.
17. Patrick, L., *Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity*. Altern Med Rev, 2006. **11**(2): p. 114-27.
18. Whittaker, M.H., et al., *Exposure to Pb, Cd, and As mixtures potentiates the production of oxidative stress precursors: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats*. Toxicol Appl Pharmacol, 2011. **254**(2): p. 154-66.
19. Hoffman, D.J., et al., *Developmental toxicity of lead-contaminated sediment in Canada geese (Branta canadensis)*. J Toxicol Environ Health A, 2000. **59**(4): p. 235-52.
20. Flora, S.J., et al., *Arsenic and lead induced free radical generation and their reversibility following chelation*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2007. **53**(1): p. 26-47.
21. Ahamed, M. and M.K. Siddiqui, *Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions*. Clin Chim Acta, 2007. **383**(1-2): p. 57-64.
22. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem Biol Interact, 2006. **160**(1): p. 1-40.
23. Martin, S.A., R. Emilio, and V. Mahara, *Role of oxidative stress in transformation induced by metal mixture*. Oxid Med Cell Longev, 2011. **2011**: p. 935160.
24. Martinez-Pacheco, M., et al., *MRNA and miRNA expression patterns associated to pathways linked to metal mixture health effects*. Gene, 2014. **533**(2): p. 508-14.
25. Rodriguez-Sastre, M.A., E. Rojas, and M. Valverde, *Assessing the impact of As-Cd-Pb metal mixture on cell transformation by two-stage Balb/c 3T3 cell assay*. Mutagenesis, 2014. **29**(4): p. 251-7.

26. Lee, J.C., et al., *Oxidative stress and metal carcinogenesis*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(4): p. 742-57.
27. Beyersmann, D. and A. Hartwig, *Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms*. Arch Toxicol, 2008. **82**(8): p. 493-512.
28. Ariza, M.E., *Environmental Metal Pollutants, Reactive Oxygen Intermediaries and Genotoxicity. Molecular Approaches to Determine Mechanisms of Toxicity*, M.V.W. G.N.B., Editor 1999: Kluwer Academic Publishers
29. Dudka, I., et al., *Metabonomic analysis of serum of workers occupationally exposed to arsenic, cadmium and lead for biomarker research: a preliminary study*. Environ Int, 2014. **68**: p. 71-81.
30. de Rosa, C.T., et al., *Implications of chemical mixtures in public health practice*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2004. **7**(5): p. 339-50.
31. Hou, L., D. Wang, and A. Baccarelli, *Environmental chemicals and microRNAs*. Mutat Res, 2011. **714**(1-2): p. 105-12.
32. Marlowe, M., et al., *Main and interaction effects of metallic toxins on classroom behavior*. J Abnorm Child Psychol, 1985. **13**(2): p. 185-98.
33. Moon, C., et al., *Main and interaction effects of metallic pollutants on cognitive functioning*. J Learn Disabil, 1985. **18**(4): p. 217-21.
34. Kossowska, B., et al., *Application of classic epidemiological studies and proteomics in research of occupational and environmental exposure to lead, cadmium and arsenic*. Int J Hyg Environ Health, 2013. **216**(1): p. 1-7.
35. Conolly, R.B., *Biologically motivated quantitative models and the mixture toxicity problem*. Toxicol Sci, 2001. **63**(1): p. 1-2.
36. Halliwell, B., *Biochemistry of oxidative stress*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 5): p. 1147-50.
37. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
38. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
39. Fridovich, I., *Biological effects of the superoxide radical*. Arch Biochem Biophys, 1986. **247**(1): p. 1-11.
40. Desideri, A. and M. Falconi, *Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1322-5.
41. Fridovich, I., *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 97-112.
42. Valko, M., H. Morris, and M.T. Cronin, *Metals, toxicity and oxidative stress*. Curr Med Chem, 2005. **12**(10): p. 1161-208.
43. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view*. Redox Rep, 2002. **7**(1): p. 55-7; author reply 59-60.
44. Pastor, N., et al., *A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding*. J Mol Biol, 2000. **304**(1): p. 55-68.
45. Platenik, J., et al., *Quinolinic acid-iron(ii) complexes: slow autoxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the Fenton reaction*. Free Radic Res, 2001. **34**(5): p. 445-59.
46. Burcham, P.C., *Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts*. Mutagenesis, 1998. **13**(3): p. 287-305.
47. Cadenas, E. and H. Sies, *The lag phase*. Free Radic Res, 1998. **28**(6): p. 601-9.
48. Valko, M., et al., *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence*. Mol Cell Biochem, 2004. **266**(1-2): p. 37-56.
49. Mates, J.M., C. Perez-Gomez, and I. Nunez de Castro, *Antioxidant enzymes and human diseases*. Clin Biochem, 1999. **32**(8): p. 595-603.
50. McCall, M.R. and B. Frei, *Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?* Free Radic Biol Med, 1999. **26**(7-8): p. 1034-53.
51. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein)*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
52. Landis, G.N. and J. Tower, *Superoxide dismutase evolution and life span regulation*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(3): p. 365-79.



53. Masella, R., et al., *Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes*. J Nutr Biochem, 2005. **16**(10): p. 577-86.
54. Ji, Y., et al., *S-nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitroso glutathione*. Arch Biochem Biophys, 1999. **362**(1): p. 67-78.
55. Karoui, H., et al., *Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. ESR-spin trapping and oxygen uptake studies*. J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 6000-9.
56. Hwang, C., A.J. Sinsky, and H.F. Lodish, *Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum*. Science, 1992. **257**(5076): p. 1496-502.
57. Jones, D.P., et al., *Redox state of glutathione in human plasma*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(4): p. 625-35.
58. Valverde, M., et al., *Survival and cell death in cells constitutively unable to synthesize glutathione*. Mutat Res, 2006. **594**(1-2): p. 172-80.
59. Pastore, A., et al., *Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification*. Clin Chim Acta, 2003. **333**(1): p. 19-39.
60. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
61. Klaunig, J.E. and L.M. Kamendulis, *The role of oxidative stress in carcinogenesis*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004. **44**: p. 239-67.
62. Kajiwara, Y. and S. Ajimi, *Verification of the BALB/c 3T3 cell transformation assay after improvement by using an ITES-medium*. Toxicol In Vitro, 2003. **17**(4): p. 489-96.
63. Gutierrez-Ruiz, M.C., et al., *Expression of some hepatocyte-like functional properties of WRL-68 cells in culture*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1994. **30A**(6): p. 366-71.
64. Merzenich, H., et al., *Biomonitoring on carcinogenic metals and oxidative DNA damage in a cross-sectional study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001. **10**(5): p. 515-22.
65. de la Fuente, H., et al., *Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells*. Clin Exp Immunol, 2002. **129**(1): p. 69-77.
66. Hartmann, A. and G. Speit, *Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE)*. Mutat Res, 1995. **346**(1): p. 49-56.
67. Lee, V.M., et al., *NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblasts used as models*. Hypertension, 2003. **41**(4): p. 925-31.
68. Sun, Y., L.W. Oberley, and Y. Li, *A simple method for clinical assay of superoxide dismutase*. Clin Chem, 1988. **34**(3): p. 497-500.
69. Aebi, H., *Catalase in vitro*. Methods Enzymol, 1984. **105**: p. 121-6.
70. Bouaicha, N. and I. Maatouk, *Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes*. Toxicol Lett, 2004. **148**(1-2): p. 53-63.
71. Vega, L., et al., *Diethylthiophosphate and diethyldithiophosphate induce genotoxicity in hepatic cell lines when activated by further biotransformation via Cytochrome P450*. Mutat Res, 2009. **679**(1-2): p. 39-43.
72. IARC/NCI/EPA Group. *Cellular and molecular mechanisms of cell transformation and standardization of transformation assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols*. Cancer Res, 1985. **45**:: p. 2395-2399.
73. Tsuchiya, T., et al., *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*. Toxicol Sci, 2005. **84**(2): p. 344-51.
74. Yoo, S.M., M.A. Antonyak, and R.A. Cerione, *The adaptor protein and Arf GTPase-activating protein Cat-1/Git-1 is required for cellular transformation*. J Biol Chem, 2012. **287**(37): p. 31462-70.
75. Keshava, N., et al., *Transforming and carcinogenic potential of cadmium chloride in BALB/c-3T3 cells*. Mutat Res, 2000. **448**(1): p. 23-8.
76. Hwua, Y.S. and J.L. Yang, *Effect of 3-aminotriazole on anchorage independence and mutagenicity in cadmium- and lead-treated diploid human fibroblasts*. Carcinogenesis, 1998. **19**(5): p. 881-8.
77. Kowaltowski, A.J., et al., *Catalases and thioredoxin peroxidase protect Saccharomyces cerevisiae against Ca(2+)-induced mitochondrial membrane permeabilization and cell death*. FEBS Lett, 2000. **473**(2): p. 177-82.

78. Doroshenko, N. and P. Doroshenko, *The glutathione reductase inhibitor carmustine induces an influx of Ca<sup>2+</sup> in PC12 cells*. Eur J Pharmacol, 2004. **497**(1): p. 17-24.
79. Lee, M., et al., *Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases*. FASEB J, 2010. **24**(7): p. 2533-45.
80. Hinkle, P.M., E.D. Shanshala, 2nd, and E.J. Nelson, *Measurement of intracellular cadmium with fluorescent dyes. Further evidence for the role of calcium channels in cadmium uptake*. J Biol Chem, 1992. **267**(35): p. 25553-9.
81. Lou, M., R. Garay, and J.O. Alda, *Cadmium uptake through the anion exchanger in human red blood cells*. J Physiol, 1991. **443**: p. 123-36.
82. Reiners, J.J., Jr., et al., *Assessment of the antioxidant/prooxidant status of murine skin following topical treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and throughout the ontogeny of skin cancer. Part I: Quantitation of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and xanthine oxidase*. Carcinogenesis, 1991. **12**(12): p. 2337-43.
83. Wei, L., H. Wei, and K. Frenkel, *Sensitivity to tumor promotion of SENCAR and C57BL/6J mice correlates with oxidative events and DNA damage*. Carcinogenesis, 1993. **14**(5): p. 841-7.
84. Gupta, A., et al., *Attenuation of catalase activity in the malignant phenotype plays a functional role in an in vitro model for tumor progression*. Cancer Lett, 2001. **173**(2): p. 115-25.
85. Wilhelm, D., et al., *The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(8): p. 4792-800.
86. Lu, S.C., *Regulation of glutathione synthesis*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(1-2): p. 42-59.
87. Croute, F., et al., *Expression of stress-related genes in a cadmium-resistant A549 human cell line*. J Toxicol Environ Health A, 2005. **68**(9): p. 703-18.
88. McNeill, D.R., et al., *Inhibition of Ape1 nuclease activity by lead, iron, and cadmium*. Environ Health Perspect, 2004. **112**(7): p. 799-804.
89. Hartwig, A. and T. Schwerdtle, *Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications*. Toxicol Lett, 2002. **127**(1-3): p. 47-54.
90. Kenney, N.J., et al., *Expression of transforming growth factor alpha antisense mRNA inhibits the estrogen-induced production of TGF alpha and estrogen-induced proliferation of estrogen-responsive human breast cancer cells*. J Cell Physiol, 1993. **156**(3): p. 497-514.
91. Ciardiello, F., et al., *Down-regulation of RI alpha subunit of cAMP-dependent protein kinase induces growth inhibition of human mammary epithelial cells transformed by c-Ha-ras and c-erbB-2 proto-oncogenes*. Int J Cancer, 1993. **53**(3): p. 438-43.
92. Wiseman, H. and B. Halliwell, *Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer*. Biochem J, 1996. **313** ( Pt 1): p. 17-29.

## A metal mixture induces transformation upon antioxidant depletion in a hepatic cell line

Vicente Sánchez-Valle,\* Mahara Valverde,\* Leticia Carrizales,\*\* Jesus Mejía,\*\* Nahum Zepeta,\* Emilio Rojas\*

\* Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

\*\* Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

### ABSTRACT

**Introduction.** Metals are ubiquitous soil, air, and water pollutants. A mixture of arsenic cadmium and lead, in particular, has commonly been found in the vicinity of smelter areas. The mixture of As-Cd-Pb has been shown to be carcinogenic, and transforming potential and oxidative stress have been proposed as principal mechanisms involved in this process. The aim of this work was to explore the role of the antioxidant barrier in the establishment of cell transformation upon chronic exposure to a metal mixture containing 2  $\mu\text{M}$  NaAsO<sub>2</sub>, 2  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>, and 5  $\mu\text{M}$  Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O in WRL-68 cells-a non-transformed human hepatic cell line. **Material and methods.** In this study, we used a WRL-68 cell model of human embryonic hepatic origin treated with antioxidant inhibitors (L-Buthionine-sulfoxamine and aminotriazole) to test the role of the antioxidant barrier in the establishment of cell transformation upon chronic exposure to a metal mixture of As-Cd-Pb (2  $\mu\text{M}$  NaAsO<sub>2</sub>, 2  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> and 5  $\mu\text{M}$  Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O). We evaluated oxidative damage markers, including reactive oxygen species, lipid peroxidation, and genotoxicity, as well as antioxidant response markers, including glutathione concentration, catalase activity, and superoxide dismutase activity, which promote morphological transformation, which can be quantified by foci formation. **Results.** As expected, we found an increase in the intracellular concentration of the metals after treatment with the metal mixture. In addition, treatment with the metal mixture in addition to inhibitors resulted in a large increase in the intracellular concentration of cadmium and lead. Our results describe the generation of reactive oxygen species, cytotoxicity, genotoxicity, and oxidative damage to macromolecules that occurred exclusively in cells that were morphologically transformed upon exposure to a metal mixture and antioxidant barrier inhibition. **Conclusion.** Our results show the importance of the antioxidant barrier role in the protection of cellular integrity and the transformation potential of this metal mixture via free radicals.

**Key words.** Arsenic. Cadmium. Lead. Morphological transformation. Aminotriazole. BSO. Antioxidant barrier. WRL68.

### INTRODUCTION

Arsenic (As), cadmium (Cd) and lead (Pb) are ubiquitous air and water pollutants that continue to threaten the quality of public health around the world. Exposure to complex mixtures of metals in the workplace or environment is more likely to occur than exposure to a single metal alone.<sup>1</sup> These

three metals share several common mechanisms by which they exert their toxicities. In addition, stress proteins and antioxidant enzymes have been proposed to provide common protective cellular mechanisms against element-induced toxicities when they occur on an individual basis.<sup>2</sup> Furthermore, these metals have been included in the list of the top ten hazardous substances and are proposed as one of the mixtures for which interaction profile studies will be completed by the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).<sup>3</sup> As and Cd have been classified as carcinogens and Pb has been classified as a possible carcinogen by the International Agency in Research of Cancer (IARC).<sup>4</sup>

Metals are associated with a multitude of adverse health effects, such as cancer, hepatotoxicity, nephrotoxicity, and neurotoxicity.<sup>5</sup> Some

Correspondence and reprint request: Emilio Rojas, PH.D.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.  
C.P. 04510, Ciudad de México, México.  
E-mail: emilior@servidor.unam.mx

Manuscript received: April 23, 2012.  
Manuscript accepted: September 20, 2012.



potential mechanisms involve the direct interaction of the metal with DNA or modification of DNA repair, DNA methylation status, and metabolic processes involved in DNA replication and expression.<sup>6-12</sup>

However, as a result of recent studies from a number of laboratories, oxidative stress is thought to play a major role in the development of As, Cd and Pb-related adverse health effects.<sup>2,13,14</sup>

As, Cd and Pb generate reactive oxygen species (ROS) in the form of superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ), singlet oxygen ( $^1O_2$ ), the peroxy radical ( $ROO^{\cdot}$ ), nitric oxide ( $NO^{\cdot}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), the dimethylarsinic peroxy radical [ $(CH_3)_2AsOO^{\cdot}$ ] and the dimethylarsinic radical [ $(CH_3)_2As^{\cdot}$ ].<sup>15,16</sup> In addition, Cd treatment can cause iron replacement in some enzymes, and the accumulation of iron molecules reacts with  $H_2O_2$  to produce hydroxyl radicals ( $HO^{\cdot}$ ).<sup>16,17</sup> ROS-generating mechanism of Pb is mediated by delta-aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALAD) inhibition, which provokes the accumulation of delta-aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA).<sup>16,18</sup>

Defense against xenobiotic toxicity, which is composed of many types of antioxidants, is well characterized in mammals.<sup>19,20</sup> We report here our study of the role of oxidative damage (and its modulation) in events evoked by the As-Cd-Pb metal mixture, in which we analyze the involvement of two preventive antioxidant compounds (catalase and glutathione) and their inhibitors in the modulation of the transformation process.

The hepatic cell line WRL-68 is a non-transformed human embryonic cell line that presents a morphological structure that is similar to hepatocytes and hepatic primary cultures. Derived from the fetal liver, WRL-68 preserves the activity of several characteristic liver enzymes and antioxidant efficient, providing an *in vitro* model to study the toxic effects of xenobiotics.<sup>21</sup>

In a previous report, using a two-step cell transformation model exposed to this metal mixture, we found an increase in the level of damage markers and the antioxidant response, a loss of cell viability and an elevation in the transforming potential. Cotreatment with N-acetyl-cysteine reduces the transforming capacity, suggesting the participation of oxidative stress in the transformation process.<sup>22</sup> The aim of this work was to explore the role of the antioxidant barrier in the establishment of cell transformation upon chronic exposure to a metal mixture containing  $2 \mu M$   $NaAsO_2$ ,  $2 \mu M$   $CdCl_2$ , and  $5 \mu M$   $Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3H_2O$  in WRL-68 cells—a non-transformed human hepatic cell line.

## MATERIAL AND METHODS

### Chemical reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM), antibiotic/antimycotic, MEM, non-essential amino acids, and fetal bovine serum were obtained from Gibco-Mexico. Sodium m-arsenite, L-buthionine-sulfoxamine (BSO), 3-amino-1,2,4-triazole (3-ATZ), 2-thiobarbituric acid, O-phthalaldehyde (OPT), ethidium bromide (Et-Br), fluorescein diacetate (FDA), rhodamine-123, xanthine, xanthine oxidase, EDTA, nitro blue tetrazolium (NBT), sodium carbonate ( $Na_2CO_3$ ), cupric chloride ( $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ), normal agarose, and low melting point agarose were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Cadmium chloride was purchased from Mallinckodt-Paris, lead acetate was from J.T Baker-Mexico, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) was from Merck-Mexico, and bovine serum albumin was from USB Corporation-USA.

### Cells, culture conditions, and exposure to the As, Cd, Pb mixture

WRL-68 is a non-transformed human hepatic cell line that is derived from the fetal liver and has a morphological structure that is similar to hepatocytes.

Cells were grown and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% non-essential amino acids, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu g/mL$  streptomycin. Cells were incubated at 37°C and 5%  $CO_2$ . Approximately  $5 \times 10^4$  cells/plaque were plated in 6-well culture plates and cultured reach to 80% confluency.

Four experimental groups were evaluated: an untreated group, a control group (C), which was cultivated as described above but with replacement of the maintenance medium every 72 h; a group (M) treated with the metal mixture ( $2 \mu M$   $NaAsO_2$ ,  $2 \mu M$   $CdCl_2$  and  $5 \mu M$   $Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3H_2O$ ) every 72 h at a concentration that is equivalent to that for occupational exposure;<sup>23,24</sup> a group (I) treated with a mixture of chemical inhibitors, including 1 mM L-buthionine-S,R-sulphoximine (BSO) (inhibitor of GSH synthesis), and 1.66 mM 3-aminotriazole (ATZ) (catalase inhibitor), which was applied for 2 h and repeated every 72 h; and a group (M + I) treated with the metal mixture and the mixture of antioxidant inhibitors every 72 h. Subcultures were treated every 5 days for 25 days of total treatment.

### Measurement of the intracellular concentration of As, Cd, Pb

The intracellular quantification of metals was determined by atomic absorption spectrophotometry. For As, the samples were digested and analyzed using the hydride evolution technique with a Perkin-Elmer 3110 atomic absorption spectrometer.<sup>25</sup> Cd and Pb levels were determined using graphite furnace analyses with a Perkin-Elmer 2380 atomic absorption spectrophotometer. These methods detect the total metal concentration in the sample.

### Cell viability

Cell viability was measured using the metabolic dual stain FDA method, as described by Hartmann and Speit.<sup>26</sup> Briefly, cells were mixed with a fluorochrome solution containing 0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Et-Br and 0.015  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of FDA. The cells were then analyzed under a fluorescence microscope (Olympus BMX-60 with a UM61002 filter). Dead cells appeared red in color, and live ones appeared green. One hundred randomly chosen cells per condition were evaluated, and the results are expressed as percentages. All of the experiments were conducted in triplicate.

### Detection of reactive oxygen species

This technique is based on the oxidation of dihydrorhodamine-123 to rhodamine-123 by reactive oxygen species.<sup>27</sup> Briefly, aliquots of 100  $\mu\text{L}$  of the harvested samples (approximately  $1 \times 10^6$  cells) were centrifuged at 1,200 rpm for 5 min. Next, the supernatant was poured off, and 180  $\mu\text{L}$  of buffer A (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM glucose, 15 mM HEPES) and 20  $\mu\text{L}$  of dihydrorhodamine-123 (1 mM) were added. The samples were placed in a 96-well plate and read in a microplate reader (Biorad) at 505 nm. The results were interpolated from a standard curve of 0-10  $\mu\text{M}$  rhodamine-123 in buffer A.

### Determination of catalase activity

Catalase activity was measured according to the protocol described by Aebi.<sup>28</sup> Briefly, cells (approximately  $1 \times 10^6$  cells) were washed two or three times with sterile PBS containing protease inhibitors. The cells were sonicated for 10 cycles of 10 seconds at an amplitude of 20 MHz. After sonication, the cells were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min at 4 °C. The supernatant was used to determine the catalase

activity and protein concentration. The catalase activity was determined by reading the absorbance at 240 nm at room temperature, adjusting to zero with 50 mM phosphate buffer.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (500  $\mu\text{L}$  of 20 mM) was added to 100  $\mu\text{L}$  of supernatant and 400  $\mu\text{L}$  of 50 mM phosphate buffer, and the absorbance was measured at 15 seconds and 30 seconds.

### Determination of superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase activity was measured following the protocol described by Sun, *et al.*<sup>29</sup> This method is based on the competition between superoxide dismutase and tetrazolium blue for the superoxide radicals formed by the xanthine oxidase system. The cells were sonicated and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4°C. Then, 200  $\mu\text{L}$  of the supernatant was divided into two tubes with 1.85 mL of reaction mix (0.265 mM xanthine, 0.53 mM EDTA, 0.1325 mM NBT, 883 mg/mL albumin, 353 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). To one tube, 50  $\mu\text{L}$  of 50 mM phosphate buffer (blank) was added; to the other tube, 50  $\mu\text{L}$  of 2-2.5 U/mL xanthine oxidase (sample) was added. These samples were incubated for 15 min. Next, 500  $\mu\text{L}$  of  $\text{CuCl}_2$  was added to quench the reaction. An aliquot of 200  $\mu\text{L}$  of these samples was added to a 96-well microplate, and the absorbance was measured at 560 nm (A). The units of SOD were calculated as follows:

$$\text{Units of SOD} = \frac{[\text{A reaction mix} - (\text{A sample} - \text{A blank})]}{[\text{A reaction mix} (0.5\%)]}$$

### Lipid peroxidation (Lpx)

The thiobarbituric acid method was used to measure the concentration of malondialdehyde (MDA).<sup>30</sup> A 100  $\mu\text{L}$  aliquot (approximately  $1 \times 10^6$  cells) was added to 100  $\mu\text{L}$  of trichloroacetic acid (10% w/v) and centrifuged at 3,000 x g for 10 min. The supernatant was then added to 1 mL of thiobarbituric acid reagent (0.375%), and the mixture was heated at 92°C for 45 min. The absorbance of the thiobarbituric acid-MDA complex was measured at 532 nm using an ELISA spectrophotometer (Bio-Rad Model 550). Data were interpolated onto a concentration curve of 1,1,3,3-tetraethoxypropane ranging from 0 to 10 nM.

### Comet assay

Ten microliters of the cell suspension ( $1-1.5 \times 10^4$  cells) was mixed with 75  $\mu\text{L}$  of a 0.5% LMP agarose



solution (0.36% final) and loaded onto microscope slides pre-layered with 150  $\mu$ L of 0.5% normal melting point agarose. The Comet assay was performed as described by Vega, *et al.*<sup>31</sup> Briefly, after incubation with lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10, supplemented with 10% DMSO and 1% Triton X-100) at 4°C for at least 1 h, the slides were placed in a horizontal electrophoresis chamber containing running buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13). The slides remained in the electrophoresis buffer for 10 min to allow the DNA to unwind. Electrophoresis was performed for 10 min at 300 mA and 25 V (~0.8 V/cm), and all of the technical steps were conducted using very dim indirect light. After electrophoresis, the slides were gently removed and rinsed with neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) at room temperature for 15 min. The slides were dehydrated with 100% ethanol for 15 min and air dried. Ethidium bromide (20  $\mu$ L of a 0.2  $\mu$ g/mL solution) was added to each slide, and a coverslip was placed on the gel. Individual cells were visualized at 20x magnification using an Olympus BX-60 microscope with fluorescence attachments (515-560 nm excitation filter, 590 nm barrier filter). Images were digitized and analyzed using KOMET v.31 software (Kinetic Imaging), and the Olive tail moment (OTM) parameter was used to evaluate DNA damage (200 cells were scored for each condition).

#### ***In vitro* evaluation of cell transformation**

Cell transformation was evaluated according to the morphologic parameters of the IARC/NCI/EPA Working Group.<sup>32</sup> Transformed foci were scored according to the following criteria, which discriminate these foci based on four morphological characteristics:

- Diameter > 2 mm.
- Deep basophilic staining.
- Dense multi-layering of cells, and
- Random orientation of cells at the edge of the foci.<sup>33,34</sup>

#### **Assay of anchorage-independent cell growth**

The anchorage-independent growth of hepatocytes was monitored using the soft agar colony formation assay a selective test to evaluate the cell transformation capacity. Disaggregated cells ( $1 \times 10^4$ ) were plated in six-well plates containing 0.3% Noble agar in DMEM with 10% FBS and incubated

at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Colonies were evaluate after 14 days, fixed with 70% ethanol, and stained with Coomassie Blue.<sup>35</sup>

#### **Statistical analysis**

Results are expressed as means  $\pm$  standard error (SE). The statistical significance between the experimental groups and the control group was calculated by analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni correction, and post hoc analysis was performed between groups. P-values of < 0.05 were considered to be significant. All analyses were performed using the statistical software Sigma Stat (V).

## **RESULTS**

### **Intracellular metal quantification and cellular viability in WRL-68 cells subjected to several treatments**

The metals were present at a very low intracellular concentration in cells treated with the inhibitor mixture (group I) throughout the treatment period, similar to the control cells (group C) (Table 1). In contrast, cells treated with the metal mixture (group M) and the metal mixture plus inhibitors (group M + I) showed an increase in their intracellular metal concentration, with a significant accumulation of Pb in group M + I after 25 days of treatment (Table 1). Cell viability remained constant at over 90% in all groups during the 25 days of treatment, except at day 5 in group M+I, in which a loss in cell viability was observed, representing clonal selection of cells exposed to this treatment and suggesting an initiation phase for the cell transformation process (Table 1).

### **Chemical inhibition of antioxidants**

We observed a decrease in the concentration of GSH in group I and an increase in GSH in group M as compared to group C (Figure 1A). The percentage of SOD activity for the experimental groups had a similar trend to that for group C until day 15; a significant increase was induced by all treatments on day 25, and this increase was exacerbated in group M + I (Figure 1B). The percentage of CAT activity was constantly inhibited by all treatments during the first 15 days and reached a similar activity to that of group C after 25 days (Figure 1C).

**Table 1.** Viability of WRL-68 cells treated for 25 days, measured by the dual stain FDA method, and the intracellular quantification of metals, measured by atomic absorption spectrophotometry.

Days	Treatment	Viability (%)	As ( $\mu\text{g/L}$ )	Cd ( $\mu\text{g/L}$ )	Pb ( $\mu\text{g/L}$ )
5	C	100 $\pm$ 2.8	0.526 $\pm$ 0.020	3.359 $\pm$ 0.001	4.287 $\pm$ 0.760
	M	100 $\pm$ 0	9.805 $\pm$ 0.059**	4.298 $\pm$ 0.000**	37.475 $\pm$ 6.031**
	I	98 $\pm$ 2.8	1.276 $\pm$ 0.022**	3.317 $\pm$ 0.000*	5.475 $\pm$ 0.700
	M + I	23 $\pm$ 0**	21.07 $\pm$ 0.078**	7.549 $\pm$ 0.001**	22.955 $\pm$ 0.021**
15	C	100 $\pm$ 0	1.203 $\pm$ 0.020	6.441 $\pm$ 0.001	4.972 $\pm$ 1.460
	M	100 $\pm$ 1.4	14.316 $\pm$ 0.130**	10.217 $\pm$ 0.014**	31.35 $\pm$ 4.228**
	I	96 $\pm$ 2.8*	0.667 $\pm$ 0.029**	2.739 $\pm$ 0.002**	5.94 $\pm$ 2.291
	M + I	100 $\pm$ 0	11.863 $\pm$ 0.453**	10.107 $\pm$ 0.014**	98.815 $\pm$ 3.500**
25	C	100 $\pm$ 1.4	0.508 $\pm$ 0.007	4.794 $\pm$ 0.001	5.4 $\pm$ 2.206
	M	97 $\pm$ 0*	11.413 $\pm$ 0.130**	5.67 $\pm$ 0.001**	44.64 $\pm$ 5.798**
	I	91 $\pm$ 2.1*	0.403 $\pm$ 0.019**	2.241 $\pm$ 0.001**	4.55 $\pm$ 1.258
	M + I	100 $\pm$ 0.7	14.513 $\pm$ 0.030**	12.617 $\pm$ 0.014**	117.515 $\pm$ 0.035**

C: control. M: metal mixture. I: inhibitor mixture. M + I: metal mixture plus inhibitor mixture. All results represent the average of three independent experiments. \*p < 0.05, \*\*p < 0.005. ANOVA and *post hoc* analysis with respect to the control condition.

### Evaluation of reactive oxygen species and molecular target effects

We observed an increase in the ROS concentration on days 15 and 25 in group M + I, while the remaining groups did not show an induction of ROS (Figure 2A). Lipid peroxidation significantly increased in group M + I on days 15 and 25 (Figure 2B). DNA strand breaks, assessed using the alkaline comet assay, were induced in group M + I at all treatment times (Figure 2C). It is worth noting that we also observed DNA damage in group M at 5 and 25 days of treatment.

### Induction of cell transformation

Cell transformation was observed as morphological changes in group M + I. We observed the formation of foci from day 15 of culture using Giemsa staining, with a mean of  $84 \pm 21.58$  foci per flask. However, we did not observe the formation of any foci in groups C, M, or I (Figure 3A and 3B). To confirm the morphological transformation state, the cells were cultured in soft agar, and the cells treated with M + I were able to grow under this condition (Figure 3C).

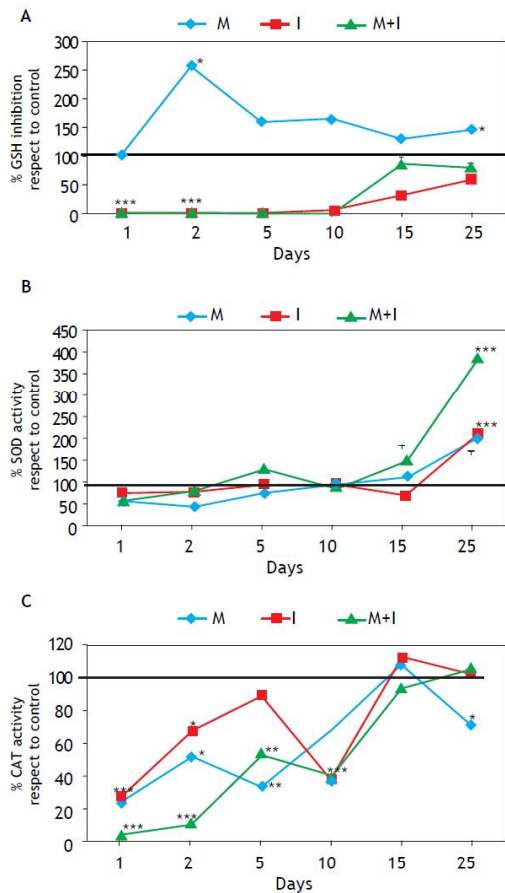
## DISCUSSION

Mixtures of metals, such as As, Cd and Pb, are widely distributed in the environment as a result of human activities. These three elements are among the top ten substances in the priority list

of hazardous substances of the Superfund of the United States.<sup>36</sup> In most cases, these metals exist together and are among the first binary combinations of contaminants in soil and water.<sup>37</sup> Therefore, most human populations are chronically exposed to these elements as a mixture. Accordingly, it is important to investigate the possible mechanisms of carcinogenicity of the As-Cd-Pb mixture as well as the participation of antioxidant molecules in the process of cell transformation associated with exposure to this mixture. Currently, these mechanisms are not fully understood.

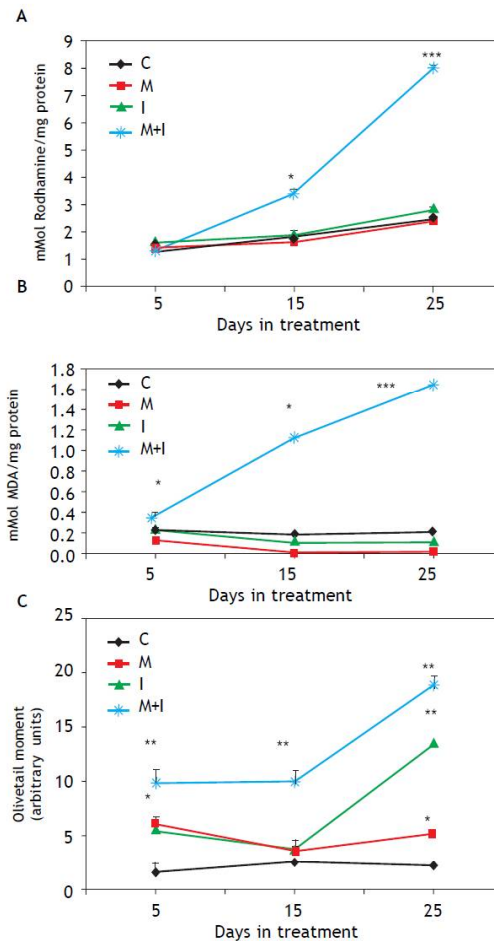
After the treatment of cells with the As-Cd-Pb mixture, we observed an increase in the intracellular concentration of these metals in group M, while in group M + I, we observed a large increase in the concentration of intracellular Pb compared to group M. This effect has been reported previously;<sup>38</sup> however, there are different theories to explain it. Kowaltowski, *et al.*<sup>39</sup> showed that 3-aminotriazole inhibits catalase and metallothionein and activates some Pb and Cd protein transporters as a result of the increase in metal absorption. However, Doroshenko and Doroshenko<sup>40</sup> and Lee, *et al.*<sup>41</sup> proposed an increase in calcium influx that is dependent on L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and induced by oxidative stress due to GSH depletion. Additionally, Hinkle, *et al.*<sup>42</sup> and Lou, *et al.*<sup>43</sup> discussed the activity of calcium transporters and anion exchangers when metal absorption is increased. Further studies are needed to clarify which of these mechanisms is responsible for the intracellular increase in Pb in the presence of antioxidant inhibitors.





**Figure 1.** Activity of antioxidants. A. GSH concentration, detected using the OPT method. B. SOD activity, evaluated using the xanthine oxidase system. C. CAT activity, determined via the degradation of  $H_2O_2$ . The horizontal line on the Y axis represents the relative value of the control group (100%) compared to the other groups. M: Metal mixture. I: inhibitor mixture. M + I: metal mixture plus inhibitor mixture. All results represent the average of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ . ANOVA and post hoc analysis with respect to the control condition.

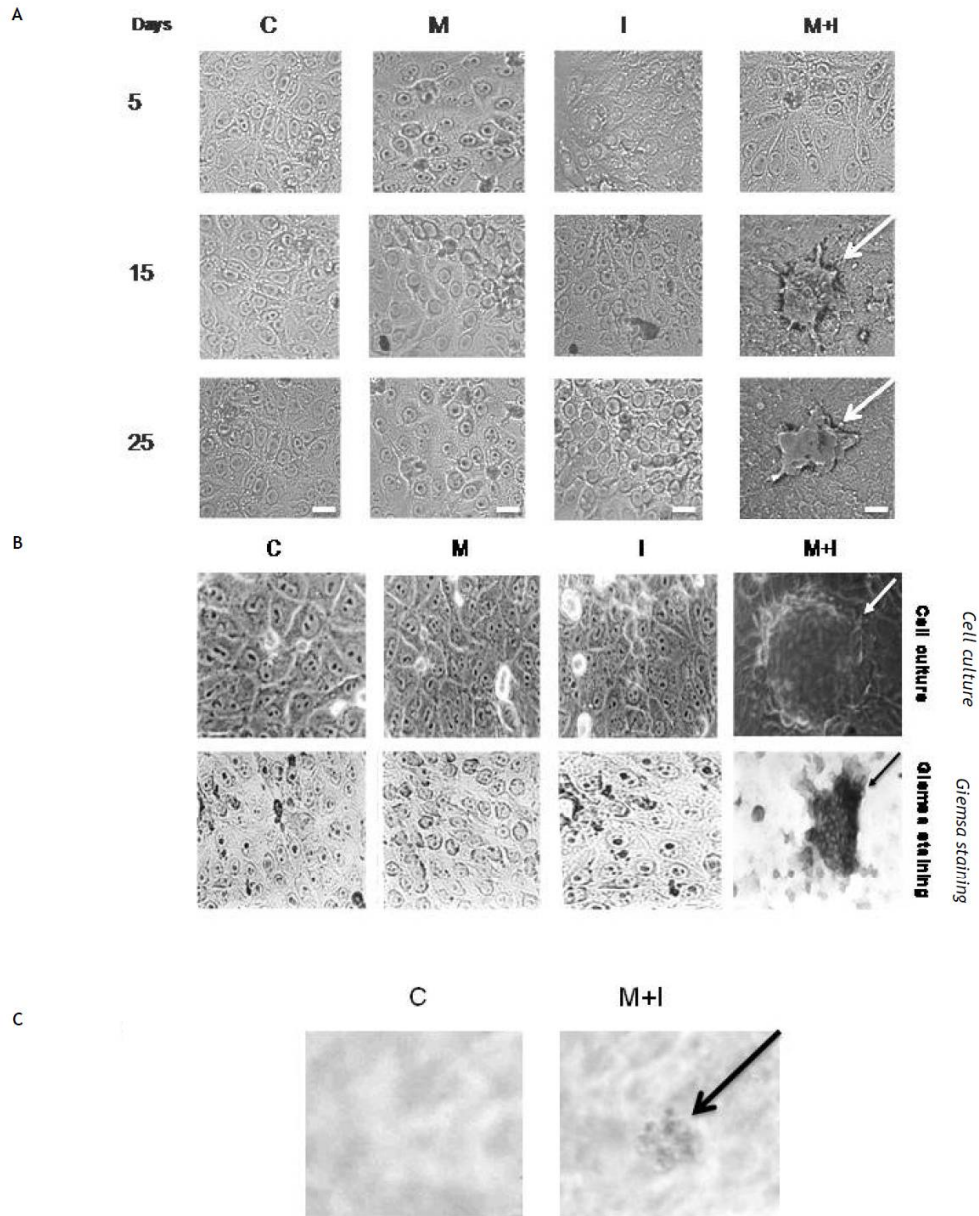
An imbalance between oxidants and antioxidants, which can cause oxidative stress, is thought to underlie metal carcinogenicity.<sup>16</sup> Increasing evidence exists for the attenuation of individual antioxidant defense mechanisms during tumor development. Reiners, *et al.*<sup>44</sup> reported a significant decrease in SOD,



**Figure 2.** Reactive oxygen species and molecular targets of oxidation. A. Reactive oxygen species (ROS), measured by the oxidation of dihydrorhodamine-123. B. Lipid peroxidation (LPX), measured using the T-BARS reaction. C. DNA damage, determined as single strand breaks with the Comet assay. All results represent the average of three independent experiments. \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.005$ . ANOVA and post hoc analysis with respect to the control condition.

catalase and glutathione peroxidase activities in SENCAR mouse skin following exposure to TPA. The specific activities of SOD and catalase in papillomas and carcinomas generated using an initiation-promotion protocol were also found to be similarly depressed compared to those in normal skin.





**Figure 3.** Cellular transformation characteristics of WRL-68 cells treated for 25 days in culture, observed by light microscopy at 40X. **A.** Morphology of cells exposed to different treatments for 25 days. **B.** Transformed foci with intense basophilia, assessed by Giemsa staining. **C.** Positive cell transformation test for anchorage-independent in soft agar. C: Control. M: Metal mixture. I: inhibitor mixture. M + I: metal mixture plus inhibitor mixture. Bars = 10  $\mu$ m.

Furthermore, the promotion and progression of skin tumors in different strains of mice were shown to correlate with oxidative events and DNA damage.<sup>45</sup>

Data in the literature suggest that the modulation of catalase activity may be mechanistically involved in the deregulation of signaling cascades during tumor promotion-progression, with pathways regulated by the trans-activation of AP-1, NF- $\kappa$ B and CREB being significantly impacted.<sup>46</sup>

However, the attenuation of GSH generates oxidative stress and subsequently leads to the induction of JNK/SAPK and p38 MAPK, which are necessary components of the cellular defense program against cytotoxic xenobiotics.<sup>47</sup> Therefore, it is possible that a sustained reduction in glutathione levels facilitated the emergence of a xenobiotic-resistant, malignant transformed phenotype upon repeated treatments with xenobiotic agent. An interesting observation was the increase GSH concentration upon metal treatment. This result is paradoxical because the GSH content should decrease following exposure to pro-oxidant metals due to consumption. However, many studies have focused on the transcriptional regulation of enzymes to synthesize GSH. NF $\kappa$ B, Sp-1, AP-1, activator protein-2 (AP-2), metal response elements (MRE), and antioxidant response elements (ARE) have been identified in the human gamma-glutamyl cysteine ligase (GCL) promoter. Many studies have identified a proximal AP-1 element (-263 to -269) as a critical mediator of the oxidative stress-induced increase in human GCL transcription. Moreover, the activation of the ARE pathway could explain why xenobiotics cause an increase in the GSH concentration as a first response.<sup>48,49</sup>

In addition to the diminution in antioxidant levels, ROS, lipid peroxidation and genotoxicity were consistently found in cells treated with both metals and inhibitors over time. Considering that DNA damage was present during all treatment times (Figure 2C), we suggest that the DNA repair system may have been impaired by the metal mixture treatment, in addition to the observed genotoxicity; these effects have also been observed in other studies.<sup>11,50</sup> An increase in oxidative stress markers, such as ROS and lipid peroxidation, were observed uniformly over time in cells treated with both metals and inhibitors (Figure 2). Inactivating the antioxidant machinery with 3-AT and BSO may resulted in increased levels of ROS in metal-treated cells and, subsequently, enhanced lipid peroxidation and genotoxicity. The enhancing effect of 3-AT on genotoxicity induced by exposure to cadmium at low concentrations (1-2  $\mu$ M) has

been suggested to be partially due to a higher intra-cellular concentration of cadmium as a result of 3-ATZ; however, the authors did not observe the same pattern when performing the same experiments with lead.<sup>46</sup>

In this scenario, the M+I treated cells presented morphological alterations; they lost their hepatic cell characteristics. It is worth noting that cells chronically treated with the metal mixture at nanomolar concentrations for more than 4 months did not show any morphological changes (data not shown). To determine whether the morphological changes induced by exposure to the metal mixture were related to transformation, we evaluated the capacity of these cells to grow in anchorage-independent conditions. Anchorage independence is believed to be one step in the multi-step process of the neoplastic transformation of human fibroblasts, and it has proven to be a particularly attractive endpoint for transformation studies;<sup>38</sup> however, the biochemical changes of cells with anchorage-independent phenotypes are not yet fully understood. Several studies have suggested that anchorage independence results from a mutational or epigenetic event because the acquired anchorage-independent phenotype is a permanent characteristic of the cells.<sup>51,52</sup> Moreover, some reports link the use of antioxidant inhibitors with an enhancement of anchorage independence. For instance, 3-ATZ has been reported to significantly enhance cadmium-induced anchorage independence and cytotoxicity in diploid human fibroblasts HFW, thus supporting the notion that ROS is involved in cadmium genotoxicity;<sup>38,53</sup> this increase in metal uptake by 3-ATZ does not occur at high cadmium-treatment doses (10 mM). In contrast, 3-ATZ neither affects lead-induced anchorage independence and cytotoxicity nor induces the weak mutagenicity of lead, even though 3-ATZ does enhance lead uptake and accumulation in HFW cells.

## CONCLUSION

In our study, we established a model that is sensitive to cell transformation using human cells, which could be useful tool for the study of chemical carcinogenesis. Moreover, in this model we showed the cell transforming effect of metal mixture (As-Cd-Pb) at concentrations equivalent to those reported for occupationally exposed individuals. We also demonstrated that the balance between the antioxidant status and oxidant insult generated by the mixture of metals plays a pivotal role in the process



of cell transformation. In general our findings could provide new insights in the field such as the use of different antioxidant parameters as a risk associated biomarkers and interventional design studies of the population exposed to these metals.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to all of the cooperating organizations that made this study possible: Universidad Nacional Autónoma de México, Doctorado en Ciencias Biomédicas and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología M47330.

### REFERENCES

- Carrizales L, Razo I, Tellez-Hernandez JI, Torres-Nerio R, Torres A, Batres LE, Cubillas AC, et al. Exposure to arsenic and lead of children living near a copper-smelter in San Luis Potosi, Mexico: Importance of soil contamination for exposure of children. *Environ Res* 2006; 101: 1-10.
- Wang G, Fowler BA. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233: 92-9.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2007. Primary known toxic pollutants list from and possible technology advances to harness, sequester or fix the air and water pollution caused by them-new technologies and possible solutions.
- IARC 2006. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Inorganic and Organic Lead Compounds. Vol. 87.
- Madden EF, Fowler BA. Mechanisms of nephrotoxicity from metal combinations: a review. *Drug Chem Toxicol* 2000; 23: 1-12.
- Banerjee S, Flores-Rozas H. Cadmium inhibits mismatch repair by blocking the ATPase activity of the MSH2-MSH6 complex. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 1410-9.
- Clark AB, Kuntel TA. Cadmium inhibits the functions of eukaryotic MutS complex. *J Biol Chem* 2004; 279: 52903-6.
- Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 213: 282-90.
- Kopera E, Schwerdtle T, Hartwig A, Bal W. Co(II) and Cd(II) substitute for Zn(II) in the zinc finger derived from the DNA repair protein XPA, demonstrating a variety of potential mechanisms of toxicity. *Chem Res Toxicol* 2004; 17: 1452-8.
- Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1921-42.
- McNeill DR, Narayana A, Wong HK, Wilson DM 3rd. Inhibition of Ape1 nuclease activity by lead, iron, and cadmium. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 799-804.
- Witkiewicz-Kucharczyk A, Bal W. Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicol Lett* 2006; 162: 29-42.
- Del Carmen EM, Souza V, Bucio L, Hernández E, Damián-Matsumura P, Zaga V, Gutiérrez-Ruiz MC. Cadmium induces alpha(1)collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells. *Toxicology* 2002; 170: 63-73.
- Valverde M, Trejo C, Rojas E. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis* 2001; 16: 265-70.
- Cooper KL, Liu KJ, Hudson LG. Enhanced ROS production and redox signaling with combined arsenite and UVA exposure: contribution of NADPH oxidase. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 381-8.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
- Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238: 209-14.
- Ahamed M, Singh S, Behari JR, Kumar A, Siddiqui MK. Interaction of lead with some essential trace metals in the blood of anemic children from Lucknow, India. *Clin Chim Acta* 2007; 377: 92-7.
- Noguchi N, Watanabe A, Shi H. Diverse functions of antioxidants. *Free Radic Res* 2000; 33: 809-17.
- Cicchetti R, Argentin G. The role of oxidative stress in the in vitro induction of micronuclei by pesticides in mouse lung fibroblasts. *Mutagenesis* 2003; 18: 127-32.
- Gutiérrez-Ruiz MC, Bucio L, Souza V, Gomez JJ, Campos C, Carabez A. Expression of some hepatocyte-like functional properties of WRL-68 cells in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1994; 30A: 366-71.
- Silva Aguilar M, Rojas E, Valverde M. Role of oxidative stress in transformation induced by metal mixture. *Oxid Med Cell Longev* 2011; 2011: 935160.
- Merzenich H, Hartwig A, Ahrens W, Beyersmann D, Schlegel R, Scholze M, Timm J, et al. Biomonitoring on carcinogenic metals and oxidative DNA damage in a cross-sectional study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 515-22.
- Palus J, Rydzynski K, Dziubaltowska E, Wyszynska K, Natarajan AT, Nilsson R. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat Res* 2003; 540: 19-28.
- 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* 2002; 129: 69-77.
- Hartmann A, Speit G. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutat Res* 1995; 346: 49-56.
- Lee VM, Quinn PA, Jennings SC, Ng LL. NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblasts used as models. *Hypertension* 2003; 41: 925-31.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-6.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
- Bouaicha N, Maatouk I. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 2004; 148: 53-63.
- Vega L, Valverde M, Elizondo G, Leyva JF, Rojas E. Diethylthiophosphate and diethyldithiophosphate induce genotoxicity in hepatic cell lines when activated by further biotransformation via Cytochrome P450. *Mutat Res* 2009; 679: 39-43.
- IARC/NCI/EPA Working Group. Cellular and molecular mechanisms of cell transformation and standardization of

- transformation assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols. *Cancer Res* 1985; 45: 2395-9.
33. Kajiwara Y, Ajimi S. Verification of the BALB/c 3T3 cell transformation assay after improvement by using an ITES-medium. *Toxicol In Vitro* 2003; 17: 489-96.
  34. Tsuchiya T, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Tokunaga H, Sakimoto K, Ando M, 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. *Toxicol Sci* 2005; 84: 344-51.
  35. Yoo SM, Antonyak MA, Cerione RA. The adaptor protein and Arf GTPase-activating protein Cat-1/Git-1 is required for cellular transformation. *J Biol Chem* 2012; 37: 31462-70.
  36. De Rosa CT, Johnson BL, Fay M, Hansen H, Mumtaz MM. Public health implications of hazardous waste sites: findings, assessment and research. *Food Chem Toxicol* 1996; 34: 1131-8.
  37. Fay RM, Mumtaz MM. Development of a priority list of chemical mixtures occurring at 1188 hazardous waste sites, using the HazDat database. *Food Chem Toxicol* 1996; 34: 1163-5.
  38. Hwua YS, Yang JL. Effect of 3-aminotriazole on anchorage independence and mutagenicity in cadmium- and lead-treated diploid human fibroblasts. *Carcinogenesis* 1998; 19: 881-8.
  39. Kowaltowski AJ, Vercesi AE, Rhee SG, Netto LE. Catalases and thioredoxin peroxidase protect *Saccharomyces cerevisiae* against Ca(2+)-induced mitochondrial membrane permeabilization and cell death. *FEBS Lett* 2000; 473: 177-82.
  40. Doroshenko N, Doroshenko P. The glutathione reductase inhibitor carmustine induces an influx of Ca<sup>2+</sup> in PC12 cells. *Eur J Pharmacol* 2004; 497: 17-24.
  41. Lee M, Cho T, Jantaratnotai N, Wang YT, McGeer E, McGeer PL. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *FASEB J* 2010; 24: 2533-45.
  42. Hinkle PM, Shanshala ED 2nd, Nelson EJ. Measurement of intracellular cadmium with fluorescent dyes. Further evidence for the role of calcium channels in cadmium uptake. *J Biol Chem* 1992; 267: 25553-9.
  43. Lou M, Garay R, Alda JO. Cadmium uptake through the anion exchanger in human red blood cells. *J Physiol* 1991; 443: 123-36.
  44. Reiners JJ Jr, Thai G, Rupp T, Cantu AR. Assessment of the antioxidant/prooxidant status of murine skin following topical treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and throughout the ontogeny of skin cancer. Part I: Quantitation of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and xanthine oxidase. *Carcinogenesis* 1991; 12: 2337-43.
  45. Wei L, Wei H, Frenkel K. Sensitivity to tumor promotion of SENCAR and C57BL/6J mice correlates with oxidative events and DNA damage. *Carcinogenesis* 1993; 14: 841-7.
  46. Gupta A, Butts B, Kwei KA, Dvorakova K, Stratton SP, Briehl MM, Bowden GT. Attenuation of catalase activity in the malignant phenotype plays a functional role in an in vitro model for tumor progression. *Cancer Lett* 2001; 173: 115-25.
  47. Wilhelm D, Bender K, Knebel A, Angel P. The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4792-800.
  48. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30: 42-59.
  49. Croute F, Beau B, Murat JC, Vincent C, Komatsu H, Obata F, Soleilhavoup JP. Expression of stress-related genes in a cadmium-resistant A549 human cell line. *J Toxicol Environ Health A* 2005; 68: 703-18.
  50. Hartwig A, Schwerdtle T. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett* 2002; 127: 47-54.
  51. Kenney NJ, Saeki T, Gottardis M, Kim N, Garcia-Morales P, Martin MB, Normanno N, et al. Expression of transforming growth factor alpha antisense mRNA inhibits the estrogen-induced production of TGF alpha and estrogen-induced proliferation of estrogen-responsive human breast cancer cells. *J Cell Physiol* 1993; 156: 497-514.
  52. Ciardiello F, Pepe S, Bianco C, Baldassarre G, Ruggiero A, Bianco C, Selvam MP, et al. Down-regulation of RI alpha subunit of cAMP-dependent protein kinase induces growth inhibition of human mammary epithelial cells transformed by c-Ha-ras and c-erbB-2 proto-oncogenes. *Int J Cancer* 1993; 53: 438-43.
  53. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313 (Pt. 1): 17-29.