



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

**RESPUESTA DE LOS MIRNAS A LA EXPOSICIÓN A UNA MEZCLA DE METALES
Y SU PAPEL COMO REGULADORES DE LA REPARACIÓN DEL DNA DURANTE
LA INICIACIÓN DE LA CARCINOGENESIS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
BIÓL. MÓNICA LETICIA MARTÍNEZ PACHECO

TUTOR PRINCIPAL:
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. FÉLIX RECILLAS TRAGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

MÉXICO, D. F., JUNIO 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.

A mis papás.

“It was the best of times, it was the worst of times, it was the age of wisdom, it was the age of foolishness, it was the epoch of belief, it was the epoch of incredulity, it was the season of light, it was the season of darkness, it was the spring of hope, it was the winter of despair.”

— Charles Dickens

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al Instituto de Investigaciones Biomédicas, al Posgrado de la UNAM y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, por permitirme realizar la investigación correspondiente a esta tesis de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca de doctorado que me otorgó (número de becario 229336) para poder trabajar de tiempo completo en el proyecto.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (proyecto número IN214310) y al CONACYT (proyecto número 152473), por otorgar el financiamiento para la realización de los experimentos necesarios en esta investigación.

A mi tutor Dr. Emilio Rojas del Castillo, por abrirme las puertas de su laboratorio, por el apoyo, confianza y guía que me brindó durante estos años, así como por los ejemplos y consejos que contribuyeron de manera indispensable a mi formación doctoral.

A los miembros del comité tutor Dr. Félix Recillas Targa y Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, por el apoyo, retroalimentación y crítica constructiva que me brindaron cada semestre durante la realización del doctorado.

A la Dra. Alexandra Rodríguez Sastre, Técnico Académico del laboratorio del Dr. Emilio Rojas del Castillo, por su asesoría técnica durante la realización de los experimentos, así como por su contribución en el análisis y discusión de los resultados presentados en esta tesis.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A mis papás Lety y Dany, por su apoyo y motivación incondicionales en mi toma de decisiones, por ser los pilares inquebrantables en la construcción de mis proyectos, por guiarme y acompañarme en el camino, por celebrar mis éxitos y cargar en sus hombros el peso de mis fracasos, por inculcarme respeto, ética y amor hacia mi profesión, y porque sin ellos no habría podido finalizar con tanta alegría y satisfacción esta etapa de mi formación académica y personal. Pero, sobre todo, porque son mis primeros y grandes maestros en la vida, porque confían plenamente en mi y porque me animan y ayudan siempre a realizar cada sueño. Soy el resultado de su trabajo duro y dedicación, de su educación, de sus logros, de su calidez, de su fortaleza, de su amistad y de su amor. Los llevo siempre conmigo, los quiero y atesoro con todo mi corazón.

A mi familia, por el núcleo de cariño, comprensión, confort, energía, fuerza y felicidad que me permite alcanzar las metas y materializar los sueños.

A mi hermana Iliana, por su cariño y empatía, por su ejemplo de dedicación, por darme la mano en el camino, por compartir su inteligencia y su punto de vista realista y objetivo, por enseñarme a reír de toda situación y a vivir sin preocupación.

A mi tía Lupita, por su amor incondicional y sus enseñanzas de mamá, por consentirme y alentarme, por las lecciones de trabajo duro, por su amistad y complicidad, por las palabras de desapruebo cuando me equivoco y por las de júbilo cuando aserto, y por motivarme siempre a llegar lejos.

A mis amigos Alex, Eli, Mario, Diana, Reyna, Jon, Adal, Yun, August, Isis, Hugo, Pépe, Erick, Pato, Abraham y Germán, por la buena vibra y las porras, por las muestras de cariño y apoyo, por los momentos de risa incontrolable, por ayudarme a cargar las decepciones y por festejar los logros como si fueran propios.

A Alex, por su amistad incondicional, por ser mi compañera de jornadas y travesuras, por ser mi colega y cómplice, por las mañanas de café y temas profundos, por su retroalimentación académica y por la terapia a carcajadas, por tomar mi mano y no soltarla, y por ayudarme a llegar al final.

A mis compañeros de laboratorio Martín, Alex, Paty, Pau, Brenda, Nahum, Jon, Reyna, August, Ernest, Griss, Vero, Diego, Pablo, Vicente y Elia, por sus enseñanzas y empatía, por su cariño y crítica constructiva, por todos los momentos de diversión y su ejemplo de éxito, y por animarme a seguir caminando.

Al Dr. Félix Recillas Targa, por la disponibilidad, amabilidad, crítica, retroalimentación positiva, motivación, apoyo incondicional, palabras alentadoras, sonrisas y compromiso que siempre ha tenido conmigo, y por la guía, ejemplo y ayuda que me brindó de principio a fin en la realización del doctorado y también a nivel personal.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	5
ABREVIATURAS.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Relevancia toxicológica de las mezclas de metales	8
1.2 Mezcla de arsénico, cadmio y plomo	11
1.2.1 Efectos en la salud.....	12
1.2.2 Mecanismos de acción	12
1.3 Mecanismos de carcinogénesis del As, Cd y Pb	14
1.3.1 Inhibición de la reparación del DNA: Recombinación Homóloga	15
1.4 MicroRNAs y regulación de la expresión génica.....	19
1.4.1 Biogénesis de los microRNAs.....	20
1.4.2 Mecanismos de acción de los microRNAs.....	22
1.4.3 Funciones biológicas de los microRNAs.....	24
1.4.4 Papel de los microRNAs en el desarrollo de enfermedades	26
1.5 Metales y la expresión de microRNAs	27
1.6 Reparación de daño al DNA y su relación con microRNAs	30
2. JUSTIFICACIÓN	31
3. HIPÓTESIS	32
4. OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo General I	33

4.1.1 Objetivos Particulares	33
4.2 Objetivo general II	34
4.2.1 Objetivos particulares	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1 Compuestos químicos.....	36
5.2 Líneas celulares	36
5.3 Cultivo de la línea celular Balb/c-3T3 y condiciones de exposición a la mezcla de metales para la determinación de los perfiles de expresión de los mRNAs y miRNAs	37
5.4 Prueba de viabilidad celular	38
5.5 Extracción y cuantificación de RNA para la determinación de los perfiles de expresión de mRNAs y miRNAs	39
5.6 Expresión de mRNAs por microarreglo y análisis	40
5.7 Expresión de miRNAs mediante arreglo de RT-qPCR con sondas TaqMan y análisis	41
5.8 Ensayo de transformación celular Balb/3T3 de dos fases inducida por la mezcla de Metales.....	42
5.9 Ensayo de transformación celular Balb/3T3 de dos fases modificado para su transfección con el pre-miR-222	43
5.10 Extracción y cuantificación de RNA y proteína total.....	46
5.11 RT-qPCR de miR-222	46
5.12 RT-PCR de Rad51c	47
5.13 Inmunoblot de Rad51c	47
5.14 Ensayo de luciferasa de miR-222 y Rad51c	48
5.15 Transfección de pre-miR-222 y anti-miR-222	50
5.16 Ensayo cometa pH neutro.....	50
5.17 Análisis bioinformáticos.....	51

5.17.1 IPA: Predicción de funciones celulares y enfermedades.....	51
5.17.2 Predicción de genes blanco para microRNAs con miRWalk, microRNA, miRDB y TargetScan	51
5.17.3 Identificación <i>in silico</i> de la interacción entre miR-222 y Rad51c.....	52
5.18 Análisis estadístico.....	52
5.18.1 Datos de expresión de mRNAs.....	52
5.18.2 Datos de expresión de miRNAs.....	53
5.18.3 Predicciones realizadas en IPA	53
5.18.4 Datos de formación de <i>foci</i> de transformación celular.....	54
5.18.5 Otros	54
6. RESULTADOS	55
6.1 Viabilidad celular después del tratamiento con la mezcla de metales	55
6.2 Perfil de expresión de mRNAs en células expuestas a la mezcla de metales.....	55
6.3 Predicción de alteraciones celulares y el desarrollo de enfermedades asociadas a la mezcla de metales, usando el perfil de expresión de mRNAs	56
6.4 Perfil de expresión de miRNAs en células expuestas a la mezcla de metales.....	58
6.5 Predicción de alteraciones celulares y el desarrollo de enfermedades asociadas a la mezcla de metales, usando el perfil de expresión de miRNAs	58
6.6 miRNAs que han sido asociados a la alteración de funciones celulares y desarrollo de enfermedades que fueron predichos con IPA después de la exposición a la mezcla de metales.....	61
6.7 mRNAs sub-expresados predichos y validados para ser regulados por los miRNAs sobre-expresados	66
6.8 Predicción de la interacción entre miR-222 y Rad51c	69
6.9 Confirmación de la expresión de miR-222 en células iniciadas con la mezcla de metales.....	70
6.10 Expresión génica y proteica de Rad51c en células iniciadas con la mezcla de metales.....	71

6.11 Validación de miR-222 como regulador directo de Rad51c.....	72
6.12 Inducción e inhibición de la expresión de miR-222.....	74
6.13 RCDs del DNA en células que sobre-expresan miR-222.....	79
6.14 Tratamiento con la molécula precursora de miR-222 como estímulo iniciador de la transformación celular	82
7. DISCUSIÓN.....	86
8. CONCLUSIONES.....	96
LITERATURA CITADA	98
ANEXOS.....	107
Anexo I: Publicación de los resultados del objetivo general I	107
Anexo II: Manuscrito de los resultados del objetivo general II sometido a <i>Molecular Carcinogenesis</i>	115
Anexo III: Figura complementaria 1	125
Anexo IV: Figura complementaria 2	126

RESUMEN

Los metales pesados son contaminantes ambientales que representan una amenaza para la salud humana al incrementar el riesgo de desarrollo de enfermedades como el cáncer. Elementos como el As, Cd y Pb están ubicados en los primeros lugares de la lista de agentes tóxicos de relevancia epidemiológica de la ATSDR y, aunque en el medio se encuentran principalmente a bajas concentraciones y en forma de mezcla, gran parte de los estudios toxicológicos se enfocan en los efectos que éstos ejercen de manera individual. Los mecanismos de acción de dichos metales incluyen la alteración de la expresión génica y datos experimentales recientes han asociado la alteración en la expresión de los miRNAs bajo la exposición a As, Cd y Pb, entre otros. Los miRNAs representan una familia grande de moléculas de RNA no codificante y de cadena sencilla cuya función principal es la de regular de manera negativa la expresión génica a nivel post-transcripcional. Por lo tanto, el primer objetivo de este trabajo fué evaluar los cambios en la expresión global de los mRNAs y miRNAs en fibroblastos de ratón (Balb/3T3) bajo la exposición a mezcla de NaAsO_2 , CdCl_2 , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a concentraciones de relevancia epidemiológica, y utilizarlos para predecir el posible desarrollo de enfermedades relacionadas a dichos metales. Los resultados demuestran que la mezcla de metales induce un perfil de expresión de miRNAs que podría ser responsable de los cambios en el perfil de expresión de mRNAs observado bajo esta condición experimental. Los genes codificantes de proteínas que participan en procesos celulares como muerte, crecimiento y proliferación celulares, y reparación del DNA, entre otros, los cuales se relacionan con la respuesta inflamatoria y cáncer que

se sabe que están asociados a la exposición a As, Cd y Pb. Nuestro entendimiento de la biología molecular del cáncer asociado a la exposición a metales se ha visto enriquecido por la inclusión de éstos resultados experimentales, donde la reparación del DNA, cuya disrupción es esencial en la iniciación del proceso de carcinogénesis, se ve comprometida como consecuencia de la sobre-expresión de ciertos miRNAs. Por lo tanto, el segundo objetivo del proyecto fue utilizar el ensayo de transformación celular Balb/3T3 con la finalidad de estudiar la etapa de iniciación de dicho fenómeno inducido por la mezcla de NaAsO_2 , CdCl_2 , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (a las mismas concentraciones de relevancia epidemiológica), y determinar la expresión de miR-222 por RT-qPCR, pues es considerado un oncomiRNA biomarcador de diferentes tipos de cáncer asociados a la exposición a As, Cd y Pb, y la expresión génica y proteica de Rad51c mediante RT-PCR e inmunoblot respectivamente, quien esta predicho como blanco de dicho RNA pequeño y cuya sub-expresión esta relacionada con el establecimiento de la etapa de iniciación de la carcinogénesis. Además, realizamos un ensayo de luciferasa para validar a Rad51c como blanco de regulación por miR-222 y el ensayo cometa neutro para evaluar la respuesta al daño al DNA bajo la condición experimental mencionada. Los resultados demuestran que la mezcla de As, Cd y Pb, induce la sobre-expresión de miR-222, el cual regula de manera negativa directa la expresión de Rad51c y compromete la reparación de rompimientos de cadena doble del DNA por recombinación homóloga durante la iniciación de la transformación celular. Esta inhibición contribuye a la transformación morfológica de los fibroblastos de ratón Balb/3T3, sugiriendo a dicho RNA pequeño como iniciador del proceso de carcinogénesis.

ABSTRACT

Heavy metals are environmental pollutants that threaten human health by increasing the risk of disease such as cancer. As, Cd and Pb are ranked on the top of the toxic agents of epidemiological relevance list according to ATSDR and although they are present in the environment, mainly at low concentrations and as a mixture, most toxicological studies focus on the effects they exert individually. The mechanisms of action of these metals include the alteration of gene expression and recent experimental data have suggested changes in the expression of miRNAs upon exposure to As, Cd and Pb, among others. MiRNAs represent a large family of non-coding single-stranded RNA molecules whose main function is to negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level. Therefore, the first aim of this study was to evaluate changes in the overall expression of mRNAs and miRNAs in mouse fibroblasts (Balb/3T3) during exposure to the NaAsO_2 , CdCl_2 , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ mixture at concentrations of epidemiological relevance, and use them to predict the possible development of diseases related to these metals. The results demonstrate that such mixture induces the expression profile of miRNAs that might be responsible for changes in the expression of mRNAs observed under this experimental condition. Those genes encode proteins involved in cellular processes such as death, growth, proliferation, and DNA repair, among others, which are related to the inflammatory response and cancer that are known to be associated with exposure to As, Cd and Pb. Our understanding of the molecular biology of cancer associated with exposure to metals has been enriched by the inclusion of these experimental results where DNA repair, whose disruption is essential for the initiation of the carcinogenesis process, is compromised as result of

over-expression of certain miRNAs. Then, the second aim of the project was to use the cell transformation assay Balb/3T3 in order to study the initiation phase of such phenomenon induced by the metal mixture (at same concentrations of epidemiological relevance), and determine the expression of mmu-miR-222 (considered as an oncomiRNA and biomarker of different types of cancer associated with exposure to As, Cd and Pb) by RT-qPCR and gene and protein expression of the recombinase RAD51C, by RT-PCR and immunoblot respectively, who is a predicted target of this small RNA and whose sub-expression is related to the establishment of the initiation phase of carcinogenesis. In addition, we performed a luciferase assay to validate RAD51C as direct target of miR-222 regulation and the neutral comet assay to assess DNA damage response under the experimental condition. The results show that the As, Cd and Pb mixture induces overexpression of miR-222, which negatively regulates the expression of RAD51C and compromises the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination during the initiation of cellular transformation. This inhibition contributes to the morphological transformation of the mouse fibroblasts Balb/3T3, suggesting this miRNA as initiator of the carcinogenesis process.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Esta tesis esta estructurada con los siguientes elementos: introducción, justificación, hipótesis, objetivos, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones y anexos con las publicaciones científicas de los resultados y figuras complementarias.

La introducción explica la relevancia del estudio de la mezcla de metales As, Cd y Pb como inductora del desarrollo de enfermedades haciendo hincapié en el establecimiento del cáncer, su relación con los miRNAs, las evidencias acerca de sus mecanismos de acción y cómo podrían llevar a la inhibición de la reparación de daño al DNA mediado por recombinación homóloga, lo cual puede resultar en la generación de mutaciones, evento característico de la etapa de iniciación de la carcinogénesis.

El proyecto desarrollado consta de dos partes complementarias: (1) el efecto de la mezcla de As, Cd y Pb en los perfiles de expresión de mRNAs y miRNAs, los cuales pueden utilizarse para predecir el impacto de la misma en las funciones celulares clave y en el desarrollo de enfermedades incluyendo al cáncer, y (2) la regulación de la expresión génica y proteica de Rad51c (que participa en la reparación por recombinación homóloga) a través del oncomiRNA miR-222 en la etapa de iniciación del proceso carcinogénico. Debido a esto, se plantean dos objetivos generales, cada uno con objetivos particulares específicos.

La sección de materiales y métodos describe detalladamente las estrategias experimentales a las que recurrimos para lograr los objetivos del trabajo.

En los apartados correspondientes a los resultados y discusión de los mismos se integran los datos obtenidos con la literatura disponible con la finalidad de explicarlos y conseguir validar o rechazar nuestras hipótesis en la sección de conclusiones.

Por último, como anexos se adjuntan la publicación de los resultados correspondientes al objetivo general I “mRNA and miRNA expression patterns associated to pathways linked to metal mixture health effects” *Gene* 533:508-514 (2014) y el manuscrito que incluye aquellos correspondientes al objetivo general II “Post-transcriptional regulation of Rad51c by miR-222 contributes to metal-induced cellular transformation” sometido a la revista *Molecular Carcinogenesis*, así como las figuras complementarias a los resultados.

ABREVIATURAS

3'UTR	región 3' no traducida
5'UTR	región 5' no traducida
anti-miR-222	molécula inhibidora del microRNA 222
As	arsénico
ATSDR	Agencia para el registro de sustancias tóxicas y enfermedades
BER	reparación por escisión de bases
Cd	cadmio
Ct	ciclo umbral
ERO	especie reactiva de oxígeno
Gluc	<i>Gaussia luciferasa</i>
HRR	reparación por recombinación homóloga
IB	intensidad de banda
IPA	herramienta bioinformática Ingenuity Pathway Analysis
miRNA	microRNA
miRNA*	microRNA estrella
MMR	reparación de bases mal apareadas
mmu-miR-222	microRNA 222 de ratón
mRNA	RNA mensajero
ncRNA	RNA no codificante
NER	reparación por escisión de nucleótidos
OTM	momento de la cola del cometa
Pb	plomo
POE	población ocupacionalmente expuesta
pre-miR-222	molécula precursora del microRNA 222
RCD	rompimiento de cadena doble del DNA
RCFE	eficiencia relativa de formación de colonias
RCS	rompimiento de cadena sencilla del DNA
SEAP	fosfatasa alcalina excretable
TLDA	arreglo de baja densidad de RT-qPCR con sondas TaqMan

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Relevancia toxicológica de las mezclas de metales

La exposición a elementos tóxicos como los metales pesados representa un problema para la salud humana. Estos contaminantes se diferencian de la mayoría de los otros en que no son biodegradables y ocurren de manera natural en el ambiente (Keil *et al.*, 2011). Además, la actividad antropogénica (minera, agrícola e industrial, entre otras) contribuye de manera importante a su presencia en el medio y, por lo tanto, a la exposición por parte de las poblaciones humanas (Keil *et al.*, 2011; Wasi *et al.*, 2012).

Por definición, los metales pesados poseen un peso atómico, densidad, conductividad térmica y conductividad eléctrica elevadas, son elementos dúctiles, resistentes, y pueden tener varios estados de oxidación y formar compuestos organometálicos que definen su perfil toxicológico y órganos blanco (Liu *et al.*, 2008). Gran parte de las investigaciones toxicológicas se enfocan en los efectos que estos agentes químicos ejercen de manera individual, sin embargo, se ha reconocido que la mayoría de las poblaciones se encuentran expuestas cotidianamente a ellos en forma de mezclas (Silva-Aguilar *et al.*, 2011) y que las consecuencias toxicológicas son dependientes de la interacción de los elementos de las mismas. Entonces, la evaluación de los efectos en la salud bajo la exposición a un solo metal puede subestimar las consecuencias reales de las exposiciones ambientales y ocupacionales, por lo que existe una necesidad crítica de entender los efectos en la salud que estas tienen (Mumtaz *et al.*, 2004; Henn *et al.*, 2014).

De acuerdo con la Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (ATSDR), dentro de las mezclas de metales de relevancia epidemiológica se encuentran aquellas que incluyen a los metales arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb), pues ocupan posición dentro de la lista de los diez contaminantes tóxicos más abundantes y peligrosos en el ambiente (ATSDR, 2004).

Las mezclas más estudiadas son las de tipo binario, es decir aquellas compuestas por dos metales. Por ejemplo, se ha observado que la combinación de As y Pb tiene efectos neurológicos (disrupción de las funciones cognitiva y visual-motora, y del comportamiento), hematológicos (disminución del hematocrito), renales (incremento en la excreción de porfirina), óseos (acumulación de Pb en los huesos y reemplazo del calcio (Ca)), en la función hepática y carcinogénicos, participando en el desarrollo de leucemias (ATSDR, 2004). La evaluación de la exposición a Cd y Pb muestra que, además del daño neurológico (disrupción de las funciones cognitiva y visual-motora) y hematológico (disminución del ácido- δ -aminolevulínico (ALAD)), interfiriendo así con la síntesis del grupo hemo y provocando la acumulación de dicho ácido y disminución de la hemoglobina), las poblaciones ocupacionalmente expuestas (POEs) presentan disfunción renal, cardiovascular y testicular (conteo espermático bajo), enfermedades respiratorias y óseas, una absorción pobre de vitaminas como la D3, y cáncer de hígado y riñón (ATSDR, 2004). La mezcla de cromo (Cr) y Pb ha sido poco estudiada pero se sabe que tiene efectos genotóxicos al ser clastógena y provocar rearrreglos cromosómicos (ATSDR, 2004), por lo que podría ser asociada a diversos tipos de cáncer. El manganeso (Mn) y Pb generan problemas neurológicos (disrupción de la función cognitiva y cambios en el comportamiento) y hematológicos (disminución de

ALAD y síntesis del grupo hemo), así como un decremento en la función del hígado (Roney y Colman, 2004). Las investigaciones realizadas utilizando la mezcla de As y Cd han mostrado que ésta se relaciona con el desarrollo de cáncer de pulmón, hígado y riñón en POEs, así como a enfermedades hematológicas (disminución del hematocrito) y problemas de absorción de nutrientes y elementos esenciales como el Ca, llevando a la disminución del peso corporal y problemas del desarrollo óseo (ATSDR, 2004). Por su parte, la mezcla de As y Cr compromete la función hepática y el desarrollo embrionario (anormalidades óseas) mientras que la mezcla de Cd y Cr provocan daño renal (proteinuria) (ATSDR, 2004).

Por otro lado, se han realizado investigaciones evaluando los efectos tóxicos de mezclas compuestas por tres metales (mezclas terciarias). La exposición simultánea a cobre (Cu), Pb y zinc (Zn) en POEs es capaz de inducir daño neurológico (aletargamiento motor) y hematológico (disminución de ALAD y síntesis del grupo hemo) (Roney y Colman, 2004). El As, Cr y Pb son contaminantes comunes de los cuerpos de agua cercanos a depósitos de desechos tóxicos y aunque se sabe poco, algunos estudios demuestran que la exposición a su mezcla lleva a la formación de lesiones preneoplásicas en el hígado, siendo capaz de inducir la etapa de iniciación del proceso de carcinogénesis, sin embargo no induce la de promoción, por lo que la atención se ha desviado al estudio de otro tipo de mezclas terciarias relacionadas con el cáncer (ATSDR, 2004).

También se ha comenzado a estudiar la mezcla cuaternaria de As, Cd, Cr y Pb, ya que ocurre frecuentemente en el medio y en sitios de actividad industrial o almacenaje/tratamiento de desechos tóxicos. La ruta de exposición a esta mezcla tan

compleja que resulta de mayor preocupación es la oral y de duración intermedia a crónica, pero aún no se definen bien los efectos en la salud que puede ejercer (Bae *et al.*, 2001; ATSDR, 2004).

Con respecto al As, Cd y Pb, se sabe que es una de las mezclas de mayor ocurrencia de manera natural y gracias a la actividad antropogénica en el ambiente, pero no ha sido lo suficientemente estudiada para poder entender los mecanismos a través de los cuáles provocan el establecimiento de enfermedades neurológicas, cardiovasculares y el cáncer, entre otras (ATSDR, 2004; Wang y Fowler, 2008; Ashok *et al.*, 2015). Sin embargo, la información al respecto se describe a continuación.

1.2 Mezcla de arsénico, cadmio y plomo

La abundancia del As, Cd y Pb favorece que las poblaciones humanas se encuentren expuestas a ellos y, debido a las consecuencias de esto, que sean considerados elementos potencialmente tóxicos (Duffus, 2002; Keil *et al.*, 2011; Ashok *et al.*, 2015).

Aunque las poblaciones se encuentran expuestas a la mezcla de dichos metales, la mayoría de los estudios toxicológicos se enfocan en los efectos que éstos ejercen por separado (Silva-Aguilar *et al.*, 2011) y los resultados no pueden utilizarse como base única para predecir o concluir aquellos que son resultado de la exposición a la mezcla (Koppe *et al.*, 2006). Por lo tanto, resulta de gran importancia evaluar los riesgos de salud pública que la presencia de la misma puede representar.

La información con respecto a los efectos que puede ejercer, así como sus mecanismos de acción, es limitada y se describe a continuación.

1.2.1 Efectos en la salud

De acuerdo con la ATSDR, la mezcla de As, Cd y Pb es considerada como una de las de mayor importancia para la salud humana (ATSDR, 2004), pues ocupa una de las primeras posiciones en la lista de los principales elementos tóxicos presentes en los desechos generados por la actividad humana y que resultan de prioridad para ser estudiadas (ATSDR, 2004; ATSDR, 2007; ATSDR, 2008).

Algunos trabajos (ATSDR, 2004; Reichard *et al.*, 2007; Beyersmann y Hartwig, 2008; Hou *et al.*, 2011; Jomova y Valko, 2011; Prüss-Ustün *et al.*, 2011; Brocato y Acosta, 2013; Henn *et al.*, 2014; Ashok *et al.*, 2015) han evidenciado su relación con el establecimiento y desarrollo de diferentes efectos en la salud, como:

- Enfermedades respiratorias
- Problemas neuronales: aprendizaje lento y aletargamiento.
- Enfermedades inmunológicas: inducción de la respuesta inflamatoria.
- Daño reproductivo: disrupción de la función del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal.
- Problemas cardiovasculares: isquemia.
- Enfermedades hepáticas.
- Enfermedades renales crónicas.
- Problemas en los huesos: osteoporosis.
- Cáncer: pulmón, piel, hígado, riñón, vejiga, próstata y cerebro, entre otros.

1.2.2 Mecanismos de acción

Las características toxicológicas y mecanismos de acción del As, Cd y Pb (por separado) han sido muy estudiados y definidos (ATSDR, 2004; ATSDR, 2007; ATSDR,

2008; Bollati *et al.*, 2010; Pimparkar y Bhave, 2010; Cao *et al.*, 2011; Bolt, 2013; Rani *et al.*, 2013), sin embargo los resultados no pueden utilizarse para explicar o predecir los efectos en la salud que la mezcla puede tener.

Los trabajos cuyo objetivo es estudiar y describir los mecanismos de acción propios de la misma indican que ésta ejerce sus efectos a través de la disrupción de las siguientes funciones moleculares y celulares:

- Unión a grupos sulfhidrilo de las proteínas (ATSDR, 2004).
- Desplazamiento de sitios activos de Zn⁺² de las proteínas (ATSDR, 2004).
- Generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Fowler *et al.*, 2004; Hernández-Franco *et al.*, 2011; Silva-Aguilar *et al.*, 2011; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014).
- Oxidación de proteínas (Wang y Fowler, 2008; Henn *et al.*, 2014).
- Lipoperoxidación (Hernández-Franco *et al.*, 2011; Silva-Aguilar *et al.*, 2011).
- Inducción de las metalotioneínas (MTs), que son proteínas de unión específica a metales y que participan en la defensa antioxidante (Silins y Högberg, 2011; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014).
- Cambios en la actividad de enzimas antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD) (Hernández-Franco *et al.*, 2011; Silva-Aguilar *et al.*, 2011; Sánchez-Valle *et al.*, 2013).
- Interferencia en la señalización celular regulada por calcio (Henn *et al.*, 2014).
- Cambios en la expresión génica (ATSDR, 2004; Yang *et al.*, 2004; Wang y Fowler, 2008).

- Daño al DNA (Hernández-Franco *et al.*, 2011; Silva-Aguilar *et al.*, 2011; Sánchez-Valle *et al.*, 2013).
- Disrupción de los procesos de ciclo y muerte celular (Henn *et al.*, 2014; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014).

1.3 Mecanismos de carcinogénesis del As, Cd y Pb

El papel que juegan metales como el As, Cd y Pb en el establecimiento y desarrollo de enfermedades son dependientes tanto de la predisposición genética como de la concentración (a dosis bajas o elevadas) y el tipo de exposición (crónica o aguda) a la misma (Hou *et al.*, 2011).

Se han identificado varios mecanismos moleculares de la etiología del cáncer y el proceso carcinogénico asociado a los metales pesados (Leonard *et al.*, 2004; Beyersmann y Hartwig, 2008; Arita y Costa, 2009; Hanahan y Weinberg, 2011; Hernández-Franco *et al.*, 2011; Silva-Aguilar *et al.*, 2011; Sánchez-Valle *et al.*, 2013; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014), los cuales incluyen:

- Interacción con grupos funcionales de las proteínas
- Daño al DNA
- Atenuación de los mecanismos de reparación del DNA
- Incremento en la replicación del DNA
- Aumento en la tasa de división celular
- Generación de EROs
- Deficiencia de enzimas antioxidantes
- Modificaciones epigenéticas

La mayoría de estas asociaciones se han hecho a través de ensayos con microarreglos de RNA mensajero (mRNA) y evaluación de la expresión y/o función proteica, y a mayoría de las investigaciones se han enfocado en los procesos de generación de EROs e inhibición de la defensa antioxidante.

Sin embargo, la literatura indica que la inhibición de la reparación del DNA (la cual ha sido menos estudiada en este contexto) parece ser determinante en el proceso de carcinogénesis (Beyersmann y Hartwig, 2008; Hanahan y Weinberg, 2011) y que el mecanismo de regulación post-transcripcional orquestado por los microRNAs (miRNAs) juega un papel importante en el mismo (Ruan *et al.*, 2009; Santarpia *et al.*, 2010; Jansson y Lund; 2012; Pasquinelli, 2012; Dong *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2013; Di Leva *et al.*, 2014). Por lo tanto, el vínculo entre estos dos procesos será el tema de estudio de la presente tesis.

1.3.1 Inhibición de la reparación del DNA: Recombinación Homóloga

En el contexto del cáncer, se ha visto que la atenuación de la capacidad de reparación del daño al DNA es consecuencia de la inhibición de los mecanismos dados a través de la escisión de bases (BER), escisión de nucleótidos (NER), reparación de bases mal apareadas (MMR) y por recombinación homóloga (HRR) (Dietlein *et al.*, 2014; Hosoya y Miyagawa, 2014). De manera interesante, la exposición a metales como el As, Cd y Pb tiene la misma consecuencia, pues regulan de manera negativa la expresión y/o función de los genes que participan en los mecanismos de reparación del DNA por BER, NER, MMR y HRR (Leonard *et al.*, 2004; Beyersmann y Hartwig, 2008; Hernández-Franco *et al.*, 2011; Muenyi *et al.*, 2011; Kryeziu *et al.*, 2013; Rani *et al.*, 2013; Treas *et al.*, 2013).

La importancia de dicha inhibición en la expresión radica en que lleva a la atenuación de la reparación del material genético, evento que resulta esencial en la acumulación de mutaciones en el DNA y en la consecuente inestabilidad genómica, los cuales son considerados requisitos para la iniciación del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011; Cerbinskaite *et al.*, 2012; Dietlein *et al.*, 2014).

De entre las diferentes vías de reparación del DNA, la dada por HRR ha adquirido importancia recientemente en el estudio del proceso de iniciación de la carcinogénesis, debido a que es el mecanismo por el cual se reparan los rompimientos de cadena doble (RCDs) del DNA que son altamente mutagénicos y que, por lo tanto, contribuyen de manera esencial en el inicio del cáncer, además de que ha demostrado ser un mecanismo versátil de reconocimiento de un gran número de sustratos (tipos de daño e el DNA) incluyendo las lesiones reparadas por los mecanismos de BER y NER (Helleday, 2010; Cerbinskaite *et al.*, 2012; Carvalho y Karnaar, 2014; Guirouilh-Barbat *et al.*, 2014; Watkins *et al.*, 2014).

La vía de HRR responde a los RCDs del DNA a través del alineamiento de secuencias homólogas del mismo y ocurre, principalmente, durante la etapa de síntesis (S) tardía y la mitosis (M) del ciclo celular (Filippo *et al.*, 2008; Jasin y Rothstein, 2013; Watkins *et al.*, 2014). Este tipo de daño (RCDs) surge por la exposición a radiación ionizante, rayos X, radicales libres y sustancias químicas, así como durante la reparación de rompimientos de cadena sencilla (RCSs) y a partir del arresto de las horquillas de replicación del DNA (Hoeijmaker, 2001; Jasin y Rothstein, 2013; Dietlein *et al.*, 2014).

Explicado de manera breve (figura 1), después de la detección de RCDs una cascada compleja de reacciones es desencadenada para alentar la maquinaria de ciclo celular y

reclutar factores de reparación. Los primeros eventos son la activación de la cinasa ATM (mutante presente en el síndrome de ataxia telangiectasia), el arresto del ciclo celular mediado por p53 y la fosforilación de la histona H2AX por parte de ATM, ATR (relacionada a ataxia telangiectasia) y las DNA-PKcs, que proveen un estado de cromatina relajada para facilitar el acceso de las proteínas de reparación. Para promover la invasión de las secuencias homólogas, el complejo con actividad de exonucleasa 5'-3' RAD50/MRE11/NBS1 expone los dos extremos 3'. RPA facilita la incorporación del complejo RAD51, el cual incluye a RAD51 y sus proteínas relacionadas XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51C y RAD51D. RAD52 estimula el ensamblaje de complejo. El complejo RAD51 intercambia la hebra de cadena sencilla con la misma secuencia de DNA en la hebra de cadena doble, ayudado por cohesinas que posicionan de manera correcta las cromátidas hermanas, e identifica a la secuencia homóloga. Después de dicha identificación, la copia de cadena doble intacta es utilizada como templado para reparar de manera adecuada el RCD mediante la síntesis de DNA. Finalmente, los extremos de Holliday son resueltos por resolvasas. La reparación por HRR involucra la actividad simultánea de proteínas como BRCA1 y BRCA2, quienes están implicadas en la traslocación nuclear de RAD51 (Hoeijmakers, 2001; Cerbinskaite *et al.*, 2012; Jasin y Rothstein, 2013; Carvalho y Karnaar, 2014; Guirouilh-Barbat *et al.*, 2014; Dietlein *et al.*, 2014; Watkins *et al.*, 2014) (figura 1).

La función de la HRR puede verse inhibida si uno o más de los genes involucrados están mutados o silenciados, comprometiendo la reparación del DNA libre de errores. La atenuación de la respuesta por esta vía resulta de gran interés, pues contribuye a y mantiene la inestabilidad genómica que juega un papel determinante en el desarrollo

de varios tipos de cáncer (Bindra *et al.*, 2004; Filippo *et al.*, 2008; Helleday, 2010; Carvalho y Karnaar, 2014; Guirouilh-Barbat *et al.*, 2014; Watkins *et al.*, 2014).

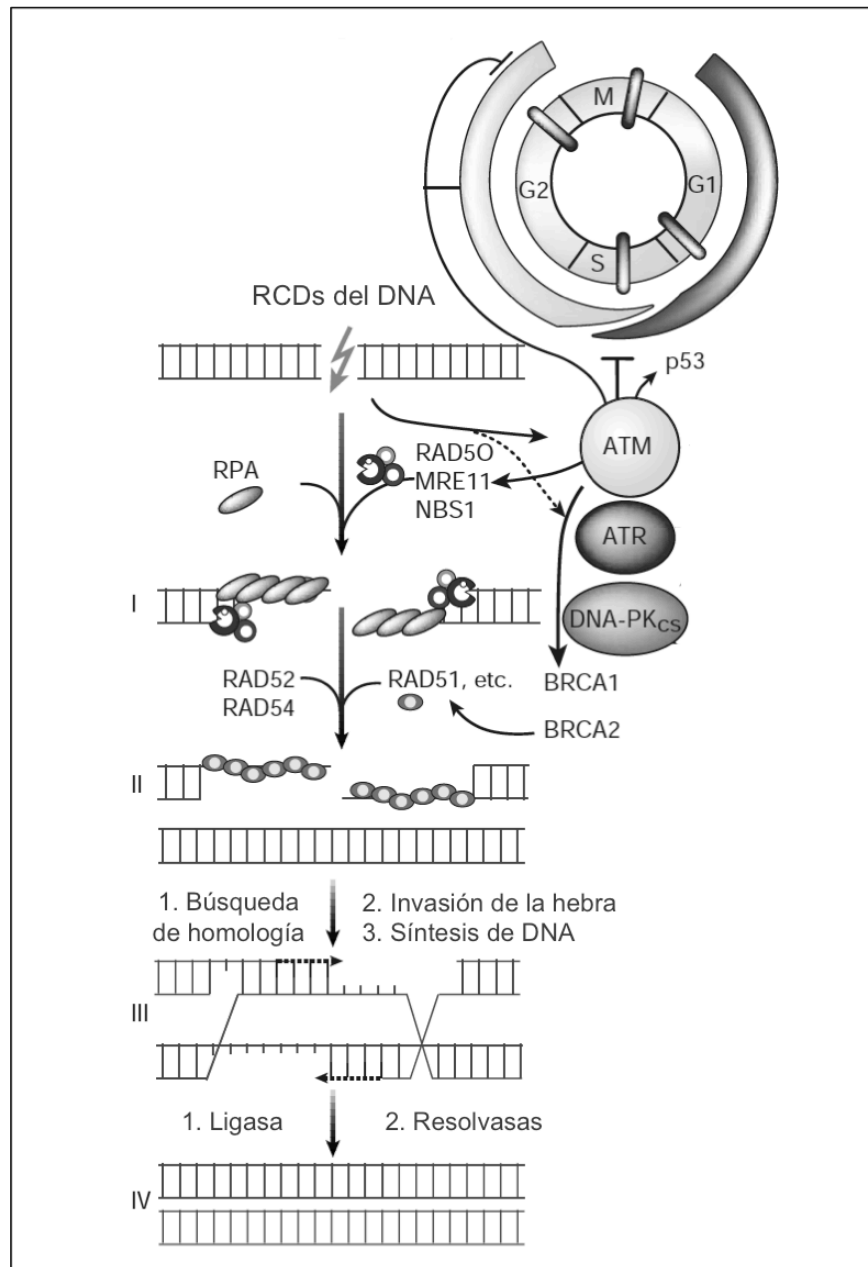


Fig. 1 Diagrama del mecanismo de reparación del DNA por recombinación homóloga (HRR). Para promover la invasión de la hebra de DNA en las secuencias homólogas, la actividad de exonucleasa del complejo RAD50/MRE11/NBS1 expone los dos extremos (I); RPA facilita el ensamblaje del filamento de RAD51, cuyo ensamblaje es facilitado por RAD52 (II); RAD51 realiza el intercambio de la hebra con su homóloga en la cadena doble de DNA, la cual es utilizada como templado para reparar el RCD mediante la síntesis de DNA (III); finalmente, los extremos de Holliday son resueltos por resolvasas (IV). Modificado de Hoeijmakers, 2001.

1.3.1.1 Rad51c

Actualmente se le ha prestado atención especial a la familia de recombinasas Rad51, implicada en la reparación del DNA por HRR, y específicamente al miembro Rad51c, ya que participa de manera esencial en los procesos clave de este mecanismo de reparación, los cuales son: unión al DNA y cohesión del complejo RAD51, desenrollamiento de la cadena doble de DNA y formación de los filamentos de nucleoproteína en el sitio del RCD (Filippo *et al.*, 2008; Helleday, 2010; Carvalho y Karnaar, 2014; Guirouilh-Barbat *et al.*, 2014; Watkins *et al.*, 2014).

Debido a esto, a los trabajos que demuestran que su inactivación o silenciamiento funciona como un factor de susceptibilidad para desarrollar cáncer de cabeza y cuello, mama, ovario y colon (Cerbinskaite *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2012; Pelttari *et al.*, 2012; Scheckenbach *et al.*, 2014), y a que hasta el momento no se ha estudiado la relación de la sub-expresión y pérdida de función de Rad51c con la exposición a As, Cd y Pb, este gen resulta de nuestro interés para ser estudiado.

1.4 MicroRNAs y regulación de la expresión génica

Uno de los mecanismos de acción de los metales As, Cd y Pb menos estudiado es el correspondiente a la regulación de la expresión génica mediada de manera independiente a su capacidad mutagénica y la alteración de factores de transcripción, es decir, aquella preceptuada por los microRNAs.

Los miRNAs representan una familia grande de RNAs no codificantes cuya longitud es de alrededor de 21 nucleótidos (nt) y han emergido como reguladores post-transcripcionales clave de la expresión génica en animales y plantas, revolucionando

así nuestro entendimiento de dicho nivel de regulación. Desde su descubrimiento como reguladores esenciales del desarrollo en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, se han identificado miles de miRNAs en los genomas de virus, plantas y animales. En este último grupo, está predicho que los miRNAs controlan la expresión de más del 50% de los genes codificantes de proteínas, por lo que participan en la modulación de casi todos los procesos celulares investigados hasta el momento y se asocian con el establecimiento de diversas patologías. Además, durante los últimos 15 años, se ha descubierto mucho sobre los mecanismos de biogénesis y función de estos RNAs pequeños (Pasquinelli, 2012; Dong *et al.*, 2013).

1.4.1 Biogénesis de los microRNAs

Los miRNAs son una clase de RNAs de cadena sencilla, pequeños y no codificantes (ncRNAs) que se expresan de manera endógena, se encuentran conservados evolutivamente y, en su mayoría, son transcritos por la RNA polimerasa II. A estos transcritos primarios de miRNA se les denomina pri-miRNAs, tienen una longitud de entre 1 y 3 kilobases (kb) y pueden transcribirse del DNA a partir de regiones intergénicas, con secuencias reguladoras propias, o intrónicas, localizadas dentro de genes que codifican proteínas (Krol *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2013).

Los pri-miRNAs forman estructuras secundarias que actúan como sustrato de dos miembros de la familia de las enzimas RNAsas de tipo III, Drosha y Dicer. Estas dos proteínas se asocian al cofactor Región Crítica del Gen 8 del Síndrome de DiGeorge (DGCR8), formando el complejo llamado Microprocesador. El producto de la digestión por parte de Microprocesador es una molécula precursora de miRNA con estructura de asa y horquilla llamada pre-miRNA y cuya longitud es de alrededor de 70 nt, la cual

es exportada del núcleo por Exportina 5 (Xpo5), que es un transportador dependiente de RAN/GTP presente en la membrana nuclear (Krol *et al.*, 2010; Pasquinelli, 2012; Dong *et al.*, 2013; Tétreault y De Guire, 2013; Valinezhad Orang *et al.*, 2014).

Una vez localizado en el citoplasma, la enzima Dicer dirige la digestión del pre-miRNA, eliminando la estructura de horquilla, y transformándolo en el dúplex de miRNA/miRNA* que mide entre 19 y 23 nt de longitud. El siguiente paso del procesamiento involucra a la Proteína de unión de RNA de respuesta de transactivación (TRBP), la cual se une al dúplex y recluta a una helicasa no identificada hasta el momento y a la proteína Argonauta (Ago2), presente en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), quienes se encargan de separar el dúplex e incorporar al miRNA a dicho complejo seleccionando a la secuencia del dúplex que presente menor estabilidad termodinámica en su región 5'. La secuencia de cadena sencilla seleccionada, madura y funcional, recibe el nombre de "miRNA", mientras que la complementaria que fue excluida del complejo se denomina "miRNA estrella" (miRNA*), la cual podrá o no ser funcional y degradada o almacenada en los cuerpos P de la célula (Pasquinelli, 2012; Tétreault y De Guire, 2013;).

Cabe mencionar que durante la maduración de estos RNAs pequeños, Drosha, Dicer y Ago2 son asistidas por un número de cofactores y proteínas accesorias que, *per se*, resultan importantes en la regulación de funciones celulares como la transcripción del DNA, traducción del RNA, y adenilación y ubiquitinación proteica, entre otras (Krol *et al.*, 2012; Pasquinelli, 2012).

RISC es un complejo grande de proteínas que incluye también a la Glicina-Triptofano de 182 kilodaltones (kDa) (GW182), la cual actúa como efector río abajo en la represión

de la expresión génica. Ago2 y GW182 son miembros clave del complejo RISC inducido por miRNAs (miRISC) y al acoplarse con los mismos forman el complejo llamado miRISC (Krol *et al.*, 2012; Pasquinelli, 2012; Tétreault y De Guire, 2013).

1.4.2 Mecanismos de acción de los microRNAs

Como parte de miRISC, los miRNAs tienen la capacidad de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional gracias a su unión complementaria con el mRNA blanco. La consecuencia de dicha unión ha sido un tema de controversia, pues existen evidencias de que estos ncRNAs inhiben la expresión proteica, desestabilizan al mRNA, y, en el menor de los casos, activan la expresión génica (Pasquinelli, 2012; Dong *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2013; Valinezhad Orang *et al.*, 2014).

Los sitios de unión del miRNA se localizan en la 3'UTR del mRNA blanco, la cual es la siguiente a las secuencias codificantes, y la secuencia del miRNA que se une corresponde a los nucleótidos 2 a 8 de su región 5' no traducida (5'UTR) y es llamada "región semilla". La mayoría de las herramientas bioinformáticas que existen para predecir la interacción entre un miRNA y un mRNA están basadas en la regla de reconocimiento de la región semilla, aunque también toman en cuenta la interacción entre los nucleótidos 9 a 20-23 del miRNA con el gen blanco (Pasquinelli, 2012; Tétreault y De Guire, 2013).

El primer miRNA descrito, lin-4, fue reportado como represor de la expresión de lin-14 en *C. elegans* en el año 1993 (Lee *et al.*, 1993). Esta función de los miRNAs sigue siendo la más común y, aunque se sabe que el mecanismo por el cual se logra dicha represión es a través de la inhibición de la traducción del mRNA blanco, el mecanismo

específico sigue bajo descripción (Tétreault y De Guire, 2013; Valinezhad Orang *et al.*, 2014) y se han propuesto dos mecanismos de acción generales:

- Degradación del mRNA. Se observa principalmente en las plantas. Sucede cuando el apareamiento de los nucleótidos 2 a 8 (región semilla) de la 5'UTR del miRNA se une de manera homóloga perfecta con la 3'UTR del mRNA blanco, lo que lleva a su degradación por la digestión que Ago2 dirige dentro del complejo miRISC. En los animales, la desestabilización del mRNA puede darse a través de otros mecanismos, por ejemplo, la unión de GW182 a la secuencia 3'UTR puede resultar en el reclutamiento de factores de desadenilación que remueven la cola de poli-adenina y hacen que el mRNA sea susceptible a la degradación exonucleolítica (Pasquinelli, 2012; Tétreault y De Guire, 2013; Valinezhad Orang *et al.*, 2014).
- Represión de la traducción del mRNA. Este mecanismo de acción es el más común en los animales, donde el apareamiento entre la región semilla del miRNA y la 3'UTR del blanco es imperfecto y, en muchos casos, se observa una reducción en los niveles de la proteína y no así en los del mRNA, lo que indica que la inhibición de la traducción es dirigida por miRISC. El mecanismo que bloquea la producción de proteína se encuentra aún bajo descripción, pues se sugiere que puede ser a través de la inhibición de la maquinaria de iniciación traduccional, de la elongación y la proteólisis del péptido que está siendo sintetizado a partir del mRNA blanco. Trabajos recientes han demostrado que el complejo CCR4-NOT, que es reclutado por GW182 para desadenilar el mRNA,

también actúa reprimiendo la iniciación de la traducción (Pasquinelli, 2012; Gomes *et al.*, 2013; Tétreault y De Guire, 2013; Valinezhad Orang *et al.*, 2014).

La complementariedad limitada que hay entre las moléculas de miRNA y mRNA puede ser considerada a primera vista como un punto débil, pero esta propiedad posee ventajas intrínsecas del mecanismo de regulación génica por miRNAs. De hecho, la afinidad moderada de un miRNA por cierto blanco permite que uno solo pueda inhibir la expresión simultánea de cientos de diferentes mRNAs, por lo que el efecto biológico de estos ncRNAs puede reflejar la sinergia o combinación de los blancos inhibidos. Esta habilidad para regular varios mRNAs al mismo tiempo, junto con el hecho de que un mismo mRNA puede presentar sitios de complementariedad con diferentes miRNAs, coloca a los miRNAs en el núcleo de las redes complejas de regulación de la expresión génica, asegurando que esta se realice de manera adecuada y fina (Pasquinelli, 2012; Tétreault y De Guire, 2013).

1.4.3 Funciones biológicas de los microRNAs

Hasta el momento, se han descubierto mas de 1000 miRNAs que se transcriben a partir del genoma humano, que regulan a mas del 50% de los mRNAs y que juegan un papel importante en la regulación de casi todos los procesos biológicos (Ambros, 2004; Vidigal y Ventura, 2015). Los ejemplos mas estudiados de funciones controladas por estos RNAs pequeños son:

- Desarrollo celular. Esta función de los miRNAs se manifestó desde su descubrimiento como reguladores del tiempo larvario en el nemátodo *C. elegans*, donde resultan indispensable para la supervivencia y reproducción. Además, mucha evidencia experimental demuestra que los miRNAs participan

en el desarrollo neuronal, cardíaco, muscular y embrionario (Ambros, 2004; Dong *et al.*, 2013).

- Diferenciación celular. Estos RNAs pequeños juegan un papel significativo en la determinación del destino de las células madre, además de que reprimen la pluripotencialidad y modulan a las células madre asociadas a cáncer, así como el proceso de hematopoiesis (Ambros, 2004; Dong *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2013).
- Proliferación celular. Los miRNAs están involucrados en el control de la promoción y progresión del ciclo celular, por lo que pueden inhibir o inducir la división celular (Ambros, 2004).
- Morfología y movimiento celular. La migración y movimiento celulares son procesos altamente dinámicos cuya regulación precisa es esencial para una variedad de funciones biológicas y estos RNAs pequeños tienen la capacidad de orquestrarla (Huang y He, 2010).
- Replicación y reparación del DNA. Se sabe que los miRNAs tienen la capacidad de regular la expresión de las proteínas involucradas en los procesos de replicación y reparación del DNA, modulando la integridad del material genético (Wan *et al.*, 2011).
- Muerte celular. Existen evidencias suficientes que demuestran que los miRNAs regulan el proceso de muerte celular por apoptosis al intervenir en la expresión de los genes involucrados en las vías de señalización que culminan en ella (Ambros, 2004; Jovanovic y Hengartner, 2006).

- Metabolismo celular. Recientemente, los miRNAs han emergido como reguladores clave de esta función celular, controlando el metabolismo de lípidos y colesterol, y modulando la homeostasis de la insulina y glucólisis (Rottiers y Näär, 2012).

1.4.4 Papel de los microRNAs en el desarrollo de enfermedades

Debido a la gran cantidad de genes que son regulados por los miRNAs y a que se ven involucrados en la modulación de las funciones celulares, éstos juegan un papel importante en el desarrollo y establecimiento de diversas enfermedades (Lu *et al.*, 2008). Dicho papel es consecuencia de cambios en los niveles de expresión de estos RNAs pequeños, por lo que sus mRNA blanco se ven modificados e involucrados en diferentes efectos en la salud, algunos ejemplos son:

- Diabetes. Los miRNAs se ven implicados en el desarrollo de las complicaciones secundarias relacionadas a la diabetes, pues modulan la secreción de insulina y el ritmo circadiano (Dong *et al.*, 2013).
- Patologías del sistema nervioso central. Varias condiciones neurológicas como el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson has sido asociadas a cambios en la expresión de miRNAs (Ambros, 2004; Dong *et al.*, 2013).
- Enfermedades cardiovasculares. Los miRNAs participan en el desarrollo de desórdenes cardiovasculares como las arritmias, fibrosis, variación en la presión arterial y cambios metabólicos (Ambros, 2004; Lu *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2013).
- Disrupción del sistema inmune. La ausencia de ciertos miRNAs compromete la respuesta inmune, lo que puede llevar al desarrollo de desórdenes de

autoinmunidad, como la psoriasis, artritis reumatoide y cáncer (Gomes *et al.*, 2013).

- Infecciones virales. Los miRNAs podrían actuar en el desarrollo de enfermedades virales como el herpes mediante la regulación de la expresión de genomas virales una vez que han entrado a la célula o a través de la regulación de los genes huésped por parte de los miRNAs virales (Dong *et al.*, 2013).
- Cáncer. La alteración de los perfiles de expresión de los miRNAs es una característica común del cáncer y lleva a desbalances en la etiología, progresión y pronóstico de las leucemias y cáncer de mama, próstata, pulmón, estómago, páncreas, hígado, cerebro y tiroides, entre otros. Tal es el papel de estos ncRNAs pequeños en el desarrollo de la enfermedad que se han clasificado en “miRNAs supresores de tumores”, aquellos que se ven sub-expresados y tienen como blanco a los oncogenes, y “oncomiRNAs”, que son aquellos que se ven sobre-expresados en este contexto y tienen como blanco a los genes supresores de tumores (Ambros, 2004; Lu *et al.*, 2008).

1.5 Metales y la expresión de microRNAs

Hasta el momento, existen algunos reportes que describen los cambios en la expresión de miRNAs dirigidos por la exposición a metales. Sin embargo, estudios realizados utilizando sulfato de níquel (NiSO_4), sulfato de hierro trivalente ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) y materia particulada (PM) rica en metavanadato de sodio (NaVO_3 -PM) han demostrado la sub-expresión de varios miRNAs del cardiomiocito en ratas, como miR-1, -22, -24, -99a, -125a, -145, -191, -224 y -375, entre otros (Huntzinger e Izaurralde, 2011); el mismo

efecto es observado por Fabbri et al. (2012) en los niveles de miR-let-7a, -let-7b, -let-7c, -let-7d, -let-7e, -let-7f, -let-7g, -1233, -1275, -130a, -15b, -15b*, -23b, -361-5p y -455-3p en células de hepatocarcinoma humano (HepG2) expuestas a cloruro de cadmio (CdCl_2) a una concentración de 10 μM (Fabbri et al., 2012).

Otros sulfatos de metales han sido reconocidos como inductores de cambios en la expresión de los miRNAs. Por ejemplo, Lukiw y Pogue (2007) observan un incremento en miR-9, -125b y -128 en células humanas de neuroglia (HN) tratadas con 100 nM de sulfato de aluminio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) y con la mezcla de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ y sulfato de hierro (FeSO_4) (a una concentración de 100 nM cada uno), mientras que éste último induce la expresión de miR-125b y -146a en el mismo tipo celular pero a una mayor concentración (1 μM) (Pogue et al., 2009; Lukiw et al., 2011).

Se ha visto que el cloruro de cobalto (CoCl_2) facilita la expresión de miR-124a en células madre mesenquimales de humano (hMSCs) cuando estas son tratadas con 100 μM del compuesto (Jeon et al., 2014).

Por otro lado, la investigación de discos de implantes dentales de cerámica que contienen dióxido de titanio (TiO_2) y dióxido de circonio (ZrO_2) al 12% como plataforma de cultivos celulares de osteoblastos humanos (MG63) muestra que estos compuestos metálicos son capaces de dirigir la sobre-expresión de miR-1, -34c, -210, -193b, -214, -337, -339, -377 y -423, y la sub-expresión de miR-17-5p, -22, -23b, -24, -93, -130b, -143, -377 y -422b (Palmieri et al., 2008).

Con respecto a los elementos que integran la mezcla de metales en la que se enfoca esta tesis, Bollati et al. (2010) demuestran que la expresión de miR-146 decrece cuando leucocitos humanos son expuestos a PM rica en Cd y Pb, y que miR-222 se

sobre-expresa cuando la exposición es solamente a PM rica en Cd (Kong *et al.*, 2012); mientras que, en ratas expuestas a concentraciones que van de 100 a 300 partes por millón (ppm) en el agua de bebida, el cloruro de plomo (PbCl_2) induce la expresión de miR-34b, -34c, -204, -211, -448 y -449a en sangre (An *et al.*, 2014).

En cuanto al arsénico, se ha observado un incremento en los niveles de miR-21 en las células epiteliales bronquiales de humano HBE expuestas a 1 μM de arsenito de sodio (NaAsO_2) (Lou *et al.*, 2014) y en los de miR-221, -222 y -34a de linfoblastos humanos TK6 expuestos a una concentración de 2 μM del mismo (Cao *et al.*, 2011). Este compuesto (NaAsO_2) es capaz de inducir la expresión de miR-148, -151, -183 y -192 en el hígado de ratas expuestas al mismo a través del agua de bebida (0.1, 1, 10 y 100 mg/L) (Ren *et al.*, 2015) y favorece la presencia de miR-21 y -221 en la orina de individuos humanos expuestos al mismo y a Pb (Farraj *et al.*, 2011).

Por último, el trióxido de arsénico (As_2O_3) induce la expresión de miR-222* en las células de carcinoma de vejiga humana T24 estimuladas con 4 μM de dicho compuesto (Krol *et al.*, 2010), la transcripción de miR-491 en líneas celulares de hepatocarcinoma (MHCC97H y MHCC97L) a concentraciones de 5 y 10 μM (Jiang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), la expresión de miR-155 en líneas celulares de cáncer de próstata humanas (PC-3 y LNCaP) expuestas a 0.5 – 4 μM (Ji *et al.*, 2014) y el aumento en los niveles de miR-1 y -133 en cardiomiocitos de un modelo de cerdo de Guinea que recibió una dosis de 0.8 mg/kg, 1.6 mg/kg o 5 mg/kg por día, durante siete días (Shan *et al.*, 2013).

1.6 Reparación de daño al DNA y su relación con microRNAs

La regulación negativa de la reparación del DNA mediada por miRNAs esta pobremente descrita, sin embargo, existe evidencia que los señala como moduladores de la respuesta de daño al DNA (DDR) (Hu y Gatti, 2011; Di Francesco *et al.*, 2013; Tessitore *et al.*, 2013; Bottai *et al.*, 2014) y de la expresión de algunos genes participantes en los mecanismos de reparación del mismo. Por ejemplo, miR-16, -34c y -199 provocan la sub-expresión de la glicosilasa de uracilo de DNA (UNG) de BER (Hegre *et al.*, 2013). MiR-373 y -744-3p regulan negativamente a Rad23b involucrado en la reparación por NER (Crosby *et al.*, 2009; Hatano *et al.*, 2015), donde además las helicasas Ercc2 y Ercc3 son silenciadas por miR-192 (Xie *et al.*, 2011) y la proteína de reconocimiento de daño Xpc es inhibida por miR-890 (Hatano *et al.*, 2015). Mientras que miR-31-5p y -155 regulan a los genes Mlh1 (Valeri *et al.*, 2010a; Zhong *et al.*, 2013), Msh6 (Valeri *et al.*, 2010a) y, junto con miR-21, Msh2 (Valeri *et al.*, 2010b) de la vía de MMR.

Para el caso de la reparación por HRR, parece que esta se ve atenuada por la acción negativa de miR-210 sobre la expresión de Rad51 (Crosby *et al.*, 2009), la regulación de Rad51 y Rad51d por miR-96, -103, -107 y -155 (Wang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013; Gasparini *et al.*, 2014), la sub-expresión de Brca1 y Brca2 a través de miR-9, -128-5p, -182, -218, -638 y -1245 (Moskwa *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2013; He *et al.*, 2015), y el efecto negativo de miR-7 y -3940-5p sobre Xrcc2 (Li *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

Aunque la mayoría de las poblaciones humanas se encuentran expuestas a la mezcla de As, Cd y Pb, gran parte de las investigaciones se enfocan en los efectos que estos metales ejercen por separado, por lo que resulta de gran importancia describir los mecanismos a través de los cuales dicha mezcla induce el establecimiento del cáncer.

Aunque varios de los mecanismos propuestos hasta el momento, por ser aquellos a través de los cuales dichos elementos ejercen sus efectos por separado, han sido evaluados en nuestro laboratorio (Silva-Aguilar *et al.*, 2011; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014), éstos no logran explicar completamente los efectos carcinogénicos de la mezcla, por lo que es necesario estudiar la modulación fina de la regulación génica a nivel post-transcripcional, y, por lo tanto, elucidar el impacto de la mezcla en la expresión de los mRNAs y miRNAs, así como la relación que existe entre ambas moléculas enfocándonos en el efecto del oncomiRNA 222 en la reparación del DNA por HRR, cuya disrupción lleva a la iniciación del proceso carcinogénico.

3. HIPÓTESIS

La mezcla de 2 μM de NaAsO_2 , 2.4 μM de CdCl_2 y 4.8 μM de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ inducirá cambios en la expresión de los mRNAs y miRNAs que llevarán a la disrupción de funciones celulares y al establecimiento de enfermedades, incluyendo el cáncer, lo cual representará un mecanismo complementario para explicar dichos efectos.

Además, si dicha mezcla es capaz de inducir la sobre-expresión de miR-222 en la etapa de iniciación de la carcinogénesis, se observará la sub-expresión de Rad51c, involucrado en la reparación del DNA por HRR, lo que provocará una deficiencia en la misma y favorecerá la transformación de la línea celular BALB/c 3T3 inducida por exposición a la mezcla metales antes mencionada.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General I

Evaluar los cambios en la expresión global de los mRNAs y miRNAs en las células Balb/3T3 (fibroblasto de ratón) expuestas a mezcla de NaAsO_2 , CdCl_2 , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a concentraciones de relevancia epidemiológica y utilizarlos para predecir el posible desarrollo de enfermedades que ya han sido relacionadas a dichos metales.

4.1.1 Objetivos Particulares

- Determinar el perfil de expresión de los mRNAs y miRNAs en las células Balb/3T3 (fibroblasto de ratón) en el día 4 del ensayo (72 h post-exposición a la mezcla de metales) mediante un microarreglo de mRNA y un arreglo de baja densidad de RT-qPCR con sondas TaqMan (TLDA) para miRNAs.
- Utilizar el perfil de expresión de los mRNAs y miRNAs, por separado, para predecir el impacto de la mezcla de metales en las funciones celulares y el desarrollo de enfermedades asociadas a los mismos utilizando la herramienta bioinformática Ingenuity Pathway Analysis (IPA).
- Determinar la relación que existe entre los miRNAs que resulten sobre-expresados y los mRNAs que se sub-expresen, usando la herramienta IPA, la literatura y las bases de datos disponibles para predicción de genes blanco de miRNAs miRWalk, microRNA, miRDB y TargetScan, con la finalidad de elucidar si éste es el mecanismo de regulación génica por el cual la mezcla de metales

induce cambios en las funciones celulares y el desarrollo de enfermedades, incluyendo el cáncer.

4.2 Objetivo general II

Evaluar el papel que juega miR-222 en el silenciamiento del gen Rad51c, involucrado en la vía de reparación del DNA por HRR, en la iniciación de la transformación celular de la línea BALB/c-3T3 inducida por la exposición a la mezcla de NaAsO₂, CdCl₂, Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O.

4.2.1 Objetivos particulares

- Confirmar la expresión de miR-222 durante la iniciación de la transformación celular inducida por la mezcla de metales en la línea Balb/3T3 a través RT-qPCR con sondas TaqMan.
- Predecir los sitios de unión de miR-222 a la 3'UTR de Rad51c mediante análisis *in silico* con los algoritmos de las bases de datos miRWalk, microRNA y miRBase.
- Evaluar la expresión génica y proteica de Rad51c, en las células Balb/3T3 iniciadas con la mezcla de metales, realizando ensayos de RT-PCR e inmunoblot, respectivamente.
- Determinar si miR-222 es regulador directo de Rad51c, transfectando a la línea celular Vero con un plásmido que contiene a la luciferasa acoplada a la 3' UTR de Rad51c y co-transfectándola con la secuencia madura del miRNA.

- Inducir e inhibir la expresión de miR-222 en las células Balb/3T3, tratadas o no con la mezcla de metales, a través de la transfección de la molécula precursora (pre-miR-222) o inhibidora (anti-miR-222) de miR-222, respectivamente.
- Evaluar la expresión génica y proteica de Rad51c en las células Balb/3T3 transfectadas con el pre-miR-222 o anti-miR-222 y tratadas o no con la mezcla de metales, realizando ensayos de RT-PCR e inmunoblot, respectivamente.
- Medir la capacidad de reparación del DNA de las células Balb/3T3 transfectadas con el pre-miR-222 o anti-miR-222 mediante a técnica de ensayo cometa neutro.
- Evaluar los cambios en el proceso de transformación celular (en el día del ensayo en el que ocurre la transformación morfológica) de la línea Balb/3T3 reemplazando el tratamiento iniciador y/o promotor de la mezcla de metales con la transfección del pre-miR-222.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Compuestos químicos

El arsenito de sodio (NaAsO_2 , pureza 100%) y el cloruro de cadmio (CdCl_2 , pureza 99.5%) fueron comprados al proveedor Aldrich Chemical Co. (WI, USA). El acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, pureza del 99.9%) fue obtenido a través de la compañía J. T. Baker (México).

Se prepararon soluciones madre de cada compuesto con las siguientes concentraciones: 1.91 mM para el NaAsO_2 , 2.7 mM para el CdCl_2 y 4.8 mM para el $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; los reactivos fueron disueltos en agua destilada estéril y se almacenaron a -20°C hasta el momento de su utilización. Para preparar la mezcla de metales, se tomaron 5 mililitros (mL) de la solución madre de NaAsO_2 , 3 mL de la solución madre de CdCl_2 y 3 mL de la solución madre de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, y se mezclaron en un tubo estéril para después realizar alícuotas y almacenarlas a -20°C .

Las concentraciones de 2 uM de NaAsO_2 , 2.4 uM de CdCl_2 y 4.8 uM de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, que son equivalentes a las encontradas en poblaciones ocupacionalmente expuestas (Merzenich *et al.*, 2001; Hengstler *et al.*, 2003; Palus *et al.*, 2003), se lograron añadiendo 36.7 microlitros (uL) de la mezcla de metales por cada 10 mL de medio de cultivo.

5.2 Líneas celulares

Las células Balb/3T3 clona A31-1-1 son fibroblastos embrionarios no tumorigénicos y no inmunosuprimidos de ratón (*Mus musculus*) ampliamente utilizados y reconocidos

en pruebas con fines carcinogénicos (Tsuchiya y Umeda, 1997; Silva-Aguilar *et al.*, 2011; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014). La línea fue adquirida en 2009 a través de la Colección Americana de Cultivos Celulares (ATCC por sus siglas en inglés) y ha sido criopreservada con medio de congelación (medio de cultivo suplementado con dimetil sulfóxido (DMSO) 5% (v/v)) y en nitrógeno líquido. Todos los experimentos se llevaron a cabo con pases tempranos del subcultivo (pase 4).

La línea Vero esta constituida por células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto y es ampliamente utilizada para la transfección de plásmidos (Yasumura y Kawakita, 1963). Fue adquirida con el mismo proveedor (ATCC), las condiciones de criopreservación fueron las mencionadas anteriormente y también se utilizaron células de pases tempranos del subcultivo (pase 5) para llevar a cabo los experimentos.

5.3 Cultivo de la línea celular Balb/c-3T3 y condiciones de exposición a la mezcla de metales para la determinación de los perfiles de expresión de los mRNAs y miRNAs

La línea celular inmortalizada de fibroblastos de ratón Balb/3T3 A31-1-1 fue adquirida de la ATCC y cultivada en medio Dulbecco's Modified Eagle's minimum essential Medium (DMEM) (GIBCO, NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen, MF, USA) y 1% de antibiótico-antimicótico (GIBCO) en incubadora a 37°C y 5% de dióxido de carbono (CO₂).

Para exponerlas a la mezcla de metales, las células Balb/3T3 fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 en placas de cultivo de 100-mm en medio DMEM 10% SFB y 1%

antibiótico-antimcótico. Después de 48 h de incubación, los cultivos subconfluentes fueron tratados durante 4 h con la mezcla de 2 uM de NaAsO_2 , 2.4 uM de CdCl_2 y 4.8 uM de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (colocando 36.7 uL de la mezcla de metales en 10 mL de medio de cultivo), como trabajos previos de nuestro laboratorio lo describen (Silva-Aguilar *et al.*, 2011; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014). Después del tratamiento, el medio de cultivo fue removido y las células fueron resembradas a una densidad de 4×10^5 células en placas de cultivo de 100-mm. Las células que fueron utilizadas como condición control también fueron resembradas, pero no recibieron el tratamiento de la mezcla de metales.

Cabe mencionar que la línea celular Balb/3T3 A31-1-1 se utiliza como un ensayo de transformación celular que provee evidencia específica para el potencial tumorigénico de cierta sustancia cuya toxicidad no puede ser probada por si sola. Los modelos de transformación celular de roedores demuestran especificidad y sensibilidad para predecir la carcinogenicidad de los químicos, por lo que han sido validados y aceptados para este tipo de estudio (Rohrbeck *et al.*, 2010).

5.4 Prueba de viabilidad celular

La viabilidad de las células tratadas y no tratadas se determinó con la tinción doble de diacetato de fluoresceína (FDA) (5 mg/mL) y bromuro de etidio (EtBr) (0.2 mg/mL), siguiendo el procedimiento estándar (Persidsky y Baillie, 1977; Hernández-Franco *et al.*, 2011). Explicado de manera breve, el colorante FDA atraviesa fácilmente la membrana celular y es utilizado como sustrato por las esterasas localizadas en el citoplasma, el resultado de la actividad de éstas enzimas es un producto de color verde

fluorescente, observable bajo microscopio de fluorescencia, que es retenido dentro de la célula y que correlaciona con la funcionalidad metabólica y la integridad de la membrana de la misma. Cuando la célula no es viable, el EtBr atraviesa la envoltura nuclear que debe encontrarse fragmentada, se intercala en el DNA y fluoresce en color rojo (Persidsky y Baillie, 1977).

5.5 Extracción y cuantificación de RNA para la determinación de los perfiles de expresión de mRNAs y miRNAs

En el día 4 del ensayo (72 h post-exposición a la mezcla de metales), los cultivos de las condiciones control (Ctrl) y mezcla de metales (Metales) fueron cosechadas con solución amortiguadora salina de fosfatos/ ácido etildiaminotetraacético (PBS-EDTA) 0.2% y centrifugadas para remover el medio.

Para el análisis de expresión de los miRNAs, el RNA total fue extraído inmediatamente a partir de 1×10^5 células usando el kit de aislamiento ZR RNA Microprep (Zymo Research; CA, USA) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor y se analizó en placas LabChip Nano RNA 6000 (Agilent; CA, USA) con el bioanalizador Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) para determinar su concentración e integridad.

Para la evaluación de la expresión de los mRNAs, el RNA fue extraído con agente Trizol (Invitrogen) analizado en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific; DE, USA) para determinar su concentración e integridad.

En ambos casos, se realizaron alícuotas de las muestras de RNA y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

5.6 Expresión de mRNAs por microarreglo y análisis

Se realizó un microarreglo del genoma completo del ratón (*Mus musculus*) consistente de 11,000 genes para evaluar el perfil de expresión del mRNA bajo la exposición a la mezcla de metales. Este experimento se realizó en la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) usando bibliotecas genómicas de oligonucleótidos con una longitud de 45-mer y por hibridación competitiva entre las muestras de RNA de la condición control y la experimental.

El valor de la fluorescencia de fondo se sustrajo del de la fluorescencia de las muestras, tanto de la control como de la experimental, y entonces los datos fueron comparados entre sí para expresar los resultados de sobre- o sub-expresión en términos de veces de cambio (± 1.5) en logaritmo base 2 (± 0.5).

Para nuestros experimentos, los mRNAs con valores de expresión menores a 1.5 veces de cambio (-0.5 en escala logarítmica) con respecto al control fueron considerados como sub-expresados, mientras que aquellos mRNAs con valores de expresión mayores a 1.5 (0.5 en escala logarítmica) fueron tratados como sobre-expresados. Los experimentos se realizaron por duplicado e incluyendo tres replicas técnicas para cada uno, por lo que obtuvimos un total de seis datos para cada mRNA en cada condición.

5.7 Expresión de miRNAs mediante arreglo de RT-qPCR con sondas TaqMan y análisis

Los perfiles de expresión de miRNAs fueron obtenidos utilizando el Arreglo de baja densidad de RT-qPCR con sondas TaqMan (TLDA) Megaplex de Applied Biosystems y todos los reactivos fueron adquiridos con el mismo proveedor. Para la síntesis de DNA complementario (cDNA), el RNA fue retro-transcrito con el kit miRNA Reverse Transcription combinado con el conjunto de primers Primer Pool Megaplex y el producto fue pre-amplificado con la mezcla maestra PreAmp TaqMan Megaplex y los primers PreAmp Primer Megaplex. Se llevó a cabo la PCR en tiempo real (qPCR) de 768 RNAs pequeños (384 miRNAs por TLDA) usando el termociclador Fast Real-time TaqMan miRNA Array 7900hHT PCR System (Applied Biosystems; CA, USA). Los experimentos se realizaron por duplicado, cada uno con una réplica técnica.

Un análisis comparativo de Ct (cycle threshold (número de ciclos requerido para que la señal de fluorescencia cruce el umbral)) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) se realizó para identificar la expresión diferencial de los miRNAs cuando las células son expuestas a la mezcla de metales y se utilizó el RNA pequeño nuclear U6 de mamífero (U6 snRNA) como control de normalización en los experimentos. Los datos fueron procesados y exportados usando la herramienta SDS v2.3 (Applied Biosystems) con los parámetros basales y un umbral (threshold) de 0.2, para luego ser analizados con la herramienta DataAssist (Applied Biosystems). Los miRNAs con valores de expresión menores a 1.5 veces de cambio (-0.5 en escala logarítmica) comparados con la condición control fueron considerados como sub-expresados y aquellos con valores de expresión mayores a 1.5 veces de cambio (0.5 en escala logarítmica) fueron tratados como sobre-expresados.

5.8 Ensayo de transformación celular Balb/3T3 de dos fases inducida por la mezcla de Metales

El ensayo de transformación celular Balb/3T3 de dos fases se realizó como se describió anteriormente (Silva-Aguilar *et al.*, 2011; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014). El protocolo de transformación consistió en un periodo de tiempo de 25 días dividido en dos fases: iniciación (días 1 a 7) y promoción (días 7 a 25). Las células fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 en placas de cultivo de 100-mm con medio DMEM suplementado con SFB 10%. Después de 48 h de incubación, en el día 1 del ensayo las células subconfluentes fueron expuestas a la mezcla de metales durante 4 h o con N-metil-N-nitro-N-nitroso-guanidina (MNNG) ($0.05 \mu\text{g/mL}$), también durante 4 h, como estímulo iniciador; las células no tratadas se utilizaron como control negativo. Después de dicho tratamiento, las células fueron cosechadas y resembradas a una densidad de 4×10^5 . En el día 4 (72 h post-exposición y durante la fase de iniciación de la carcinogénesis), se cambió el medio de los cultivos por medio DMEM SFB 10% fresco. En los días 7, 11 y 14 los cultivos recibieron medio DMEM SFB 2% e insulina-transferrina-selenio-A (ITS-A)1%, y el tratamiento promotor con la mezcla de metales o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) $0.1 \mu\text{g/ml}$ (control positivo).

En el día 4 (durante la fase de iniciación) las células fueron cosechadas para poder realizar todos los experimentos (figura 2A). En el día 16, cuando ocurre la transformación morfológica (Silva-Aguilar *et al.*, 2011; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014), las células fueron fijadas con etanol, teñidas con Giemsa acuoso 10% y evaluadas para cuantificar la formación de *foci*. Los *foci* de transformación fueron tomados en cuenta siempre y cuando cumplieran con los siguientes criterios de inclusión: (1) *foci* con un

diámetro mayor a 2-mm, (2) tinción basofílica, (3) crecimiento celular en multicapa y (4) orientación al azar en los bordes del foco (IARC/NCI/EPA Working Group, 1985). Se calculó la Eficiencia Relativa de Formación de Colonias (RCFE) como: número de *foci* por placa de la condición experimental / número de *foci* por placa de la condición control. Las condiciones experimentales de la formación de *foci* en el día 16 fueron: Control (células no tratadas) y Metales/Metales para probar las capacidades iniciadora y promotora de la mezcla de metales (figura 2A).

5.9 Ensayo de transformación celular Balb/3T3 de dos fases modificado para su transfección con el pre-miR-222

Para este experimento se realizó el ensayo de dos fases Balb/3T3 como se describió en la sección anterior y se modificó para implementar la transfección de la molécula precursora de miR-222 (pre-miR-222) como estímulo iniciador y/o promotor de la transformación celular. Las células fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 en placas de cultivo de 100-mm con medio DMEM suplementado con SFB 10%, después de 48 h de incubación, en el día 1 del ensayo, los cultivo sub-confluentes fueron transfectados con el pre-miR-222 5 pmol durante 4 h y las células no tratadas fueron utilizadas como control. Después del tratamiento iniciador, el medio de cultivo fue reemplazado por medio DMEM SFB 10% fresco. En los días 7, 11 y 14, el medio fue cambiado por DMEM SFB 2% e ITS-A 1% y se añadió el pre-miR-222 5 pmol como estímulo promotor.

En el día 4 (durante la fase de iniciación) las células fueron cosechadas para realizar los experimentos correspondientes (figura 2B). En el día 13, cuando se observó la

transformación morfológica, las células fueron fijadas con etanol, teñidas con Giemsa acuoso 10% y evaluadas para cuantificar la formación de *foci*. La RCFE fue calculada como se mencionó anteriormente y las condiciones experimentales probadas fueron las siguientes: Control (células no tratadas), Pre-miR-222/Metales para probar la capacidad iniciadora de miR-222, Metales/Pre-miR-222 para probar la capacidad promotora de miR-222 y Pre-miR-222/Pre-miR-222 para probar ambas capacidades de miR-222 (figura 2B).

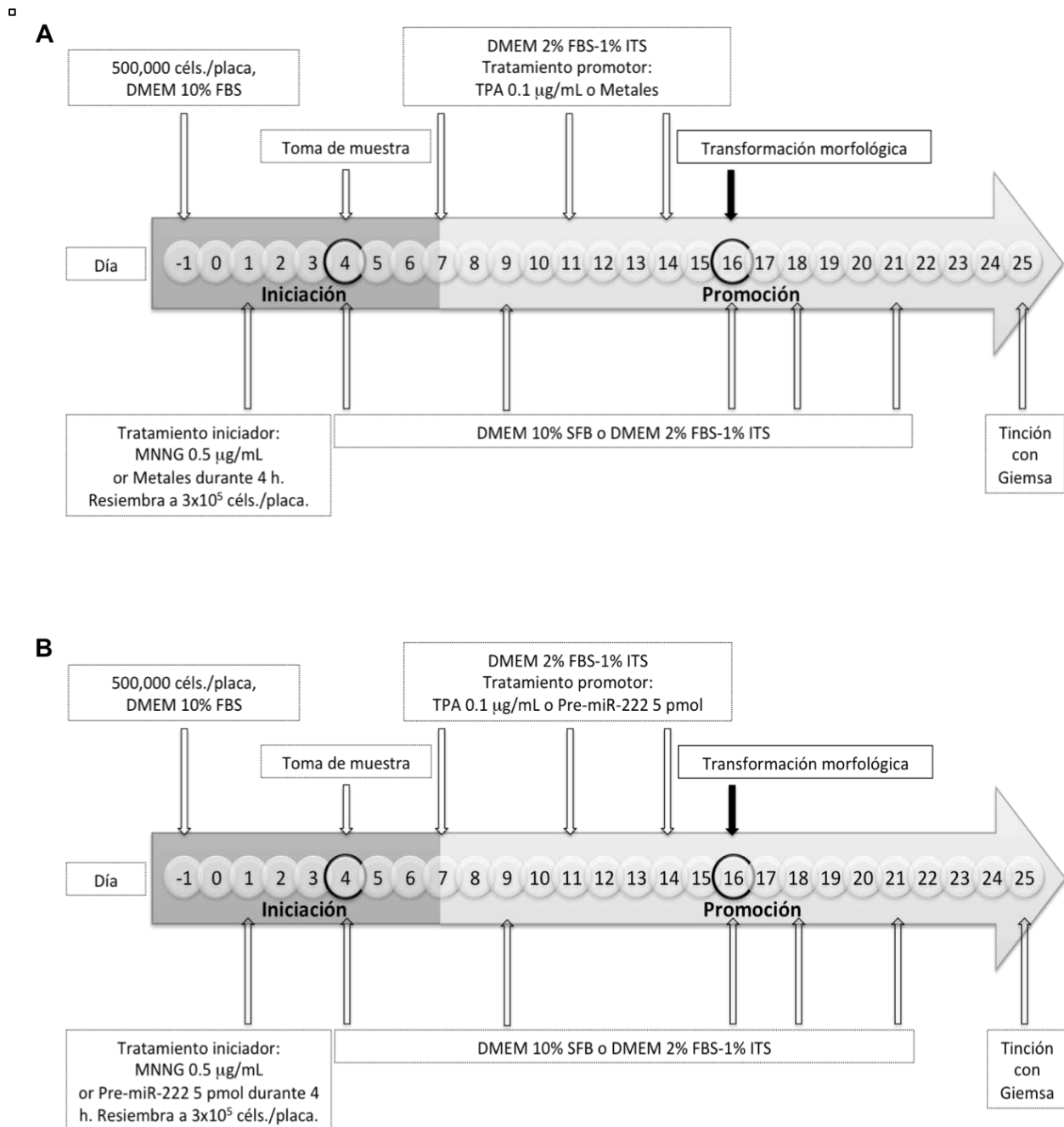


Fig. 2 (A) Esquema convencional del ensayo de transformación Balb/3T3 de dos fases inducida con la mezcla de As, Cd y Pb. MNNG: iniciador conocido (control positivo); TPA: promotor conocido (control positivo). Modificado de Tsuchiya *et al.*, 2005 y Silva-Aguilar *et al.* 2011. (B) Esquema del ensayo de transformación Balb/3T3 para probar a miR-222 (5 pmol) como estímulo iniciador y/o promotor. MNNG: iniciador conocido (control positivo); TPA: promotor conocido (control positivo).

5.10 Extracción y cuantificación de RNA y proteína total

En el día 4 (durante la fase de iniciación) del ensayo de transformación Balb/3T3, las células de las condiciones Control y Metales fueron cosechadas con PBS-EDTA 0.2% y centrifugadas para remover el medio de cultivo. Para los experimentos con miRNAs, el RNA total fue extraído a partir de muestras de 1×10^5 células usando el kit de extracción ZR RNA MicroPrep (Zymo Research; CA, USA) de acuerdo con el protocolo sugerido por el proveedor, mientras que para la evaluación de mRNA el RNA se aisló con el kit Maxwell 16 LEV Simply RNA para células (Promega; WI, USA) en el extractor Maxwell 16 Instrument (Promega). El miRNA fue analizado con el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent; CA, USA) y el mRNA con el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific; DE, USA) para evaluar la integridad y concentración. Las muestras de RNA total fueron alicuotadas y preservadas a -80°C .

La proteína total fue extraída de las células con la solución amortiguadora Radio Immunoblot Precipitation Assay (RIPA) y cuantificada por el método convencional de BCA con el kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific; DE, USA).

5.11 RT-qPCR de miR-222

La expresión de miR-222 fue evaluada con un ensayo de RT-qPCR y todos los reactivos fueron adquiridos con el mismo proveedor (Applied Biosystems; CA, USA). Para la síntesis del cDNA (DNA complementario), el RNA fue retrotranscrito con el kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription y usando los primers TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-222-3p, y la PCR el tiempo real se realizó usando el reactivo TaqMan Universal Master Mix II (sin uracil-N-glicosilasa (UNG)) junto con los primers TaqMan

MicroRNA Assay hsa-miR-222 marcados. El snRNA U6 de mamífero se utilizó para la normalización de los datos y el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) se aplicó para calcular los cambios relativos en la expresión génica.

5.12 RT-PCR de Rad51c

La expresión génica de Rad51c fue medida por RT-PCR usando el kit Access RT-PCR Systems (Promega) y primers específicos para la recombinasa Rad51c de ratón (IDT; IA, USA) en RNA de las células tratadas con la mezcla de metales o en aquellas donde se indujo la sobre- o sub-expresión de miR-222. Se usó el gen de ratón Hprt1 como control endógeno y los productos de la RT-PCR fueron resueltos en un gel de agarosa 2.5% con EtBr (0.5 mg/mL), visualizados bajo luz ultravioleta (UV) en el instrumento MiniBis Pro Imaging System (DNR; JRS, Israel) y cuantificados en términos de intensidad de banda (IB) con la herramienta computacional Kodak 1D Image Analysis v3.5 (Kodak; NY, USA).

5.13 Inmunoblot de Rad51c

Las muestras de proteína total extraídas de las células Control, Metales y las que sobre-expresan miR-222 fueron sometidas al método convencional de inmunodetección específica por Western blot (Towbin *et al.*, 1979) de la proteína Rad51c de ratón. Utilizamos un anticuerpo policlonal de conejo anti-Rad51c específico para ratón (Cat. ab95201, Abcam; Cambs., UK) y detectamos a la proteína β -tubulina como control endógeno de los experimentos con un anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina para ratón (Cat. 322600, Invitrogen, Camarillo, CA, USA). Lo anticuerpos secundarios

monoclonales de cabra anti-IgG (inmunoglobulina G) para conejo y anti-IgG para ratón acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) fueron usados para la detección radiográfica de Rad51c y β -tubulina, respectivamente, con el kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore; MA, USA). La cuantificación de la proteína se realizó en términos de Intensidad de Banda (IB) con la herramienta Kodak 1D Analysis v3.5.

5.14 Ensayo de luciferasa de miR-222 y Rad51c

Un ensayo de reportero de luciferasa fue llevado a cabo en las células Vero (que son fáciles de transfectar) para probar los efectos regulatorios de miR-222 sobre el mRNA de Rad51c. El plásmido pEZXT05-Rad51c-3'UTR (figura 3) contiene la 3'UTR de Rad51c, obtenida de una base de datos de dominio público (RefSeq ID: NM_053269), insertada río abajo del gen reportero *Gussia luciferasa* (Gluc) (luciferasa excretable) dentro de un vector dirigido por el promotor de expresión génica SV40 de mamíferos. El vector fue adquirido a través de GeneCopoeia (MD, USA) y las células fueron transfectadas con el agente EndoFectin Plus, comprado al mismo proveedor. Después de una transfección exitosa, se transcribe el mRNA que consiste de la Gluc y la 3'UTR Rad51c, cuando la célula es co-transfectada con la secuencia madura (sintética) de mmu-miR-222 (5 pmol) (GeneCopoeia), se puede estudiar fácilmente la interacción miRNA-mRNA en términos de la actividad de Gluc detectada en el medio de cultivo, la cual evaluamos con el kit Secret Pair Dual Luminescence Assay (GeneCopoeia). Como control interno, el reportero de actividad de fosfatasa alcalina secretada (SEAP) dirigido por el promotor de expresión CMV fue clonado e insertado en el vector antes

mencionado (figura 3) para poder normalizar los resultados entre muestras. Además, un plásmido carente de la 3'UTR de Rad51c (pEZXTM05) se usó como control negativo para demostrar el efecto nulo de miR-222 en Gluc cuando Rad51c no esta presente. Las actividades de Gluc y SEAP fueron leídas en el instrumento FLx800 Microplate Fluorescence/Luminiscence Reader (Biotek Instruments; VT, USA) con la herramienta KCJunior v1.41.8 (Biotek).

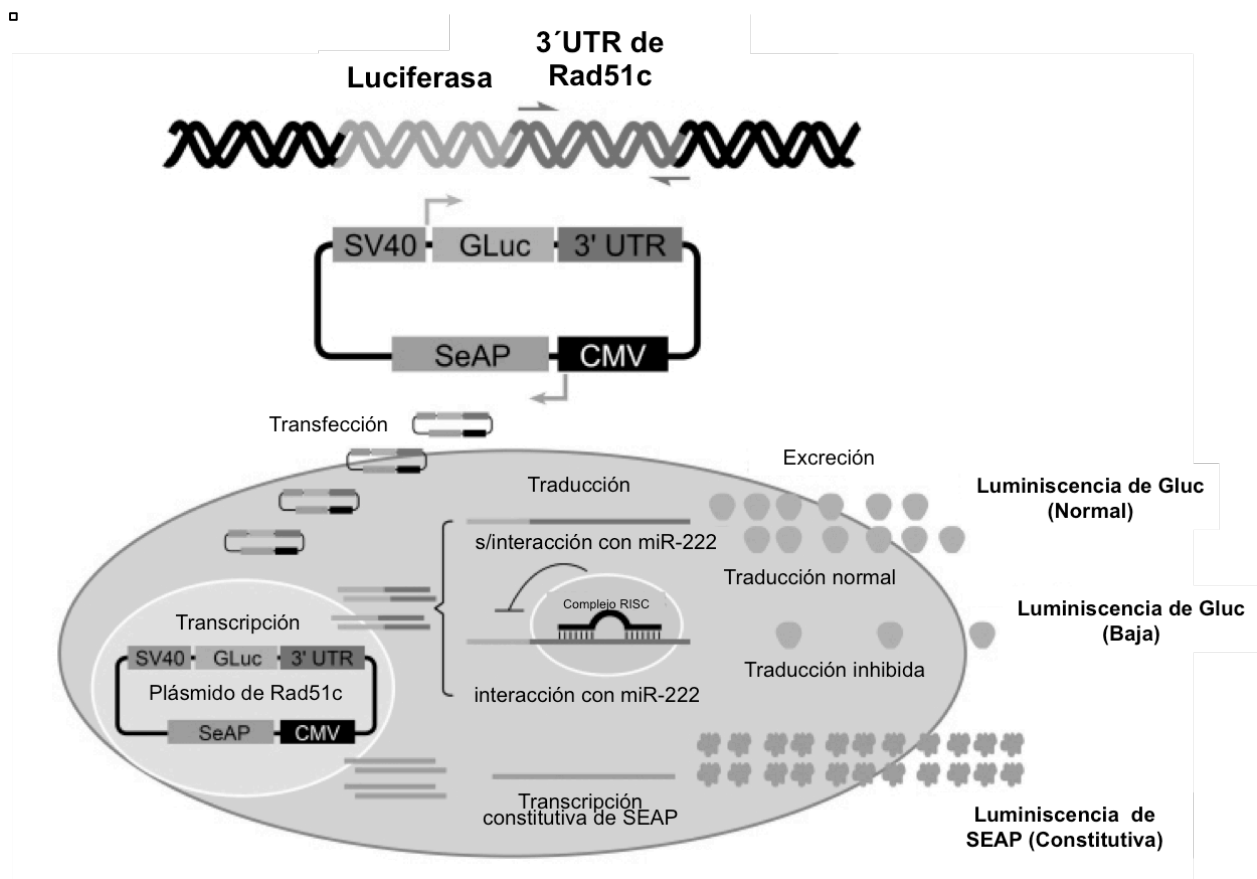


Fig. 3 Esquema de la estructura del plásmido pEZXTM05-Rad51c-3'UTR y funcionamiento del ensayo de luciferasa cuando éste es o no co-transfectado con el miR-222 maduro (sintético).

5.15 Transfección de pre-miR-222 y anti-miR-222

Las células Balb/3T3 fueron transfectadas con 5 pmol del precursor (pre-miR-222) o la molécula inhibidora (anti-miR-222) de miR-222 durante 24 h usando el agente de transfección siPORT NeoFX (todos los reactivos de Ambion; MA, USA) para inducir su sobre- o sub-expresión, respectivamente, la cual fue evaluada por RT-qPCR tal y como se describió anteriormente.

5.16 Ensayo cometa pH neutro

Para evaluar la presencia de RCDs del DNA cuando se sobre- o sub-expresan miR-222, corrimos el ensayo cometa neutro en las células Balb/3T3 como se ha descrito previamente (Rojas *et al.*, 1999) bajo la condición en la que se transfectó el pre-miR-222. 50,000 células fueron mezcladas con 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) 0.7% y colocadas en laminillas para microscopio, previamente cargadas con una capa de 150 μ L de agarosa regular 0.5%, para después colocar una tercera capa de agarosa LMP. Después de incubarlas en solución de lisis (EDTA 30 mM y dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.5%, pH7) fría durante 24 h, los nucleoides presentes en las laminillas fueron sometidos a un proceso de desenrollamiento del DNA durante 2 h y a una electroforesis a 25 V 20 mA (\approx 0.8 V/cm) durante 25 min (en buffer de ácido bórico 90 mM, EDTA 5 mM y Tris base 117 mM, pH 7.8). Al finalizar, las laminillas realizadas por duplicado fueron deshidratadas con etanol 96%, teñidas con EtBr y visualizadas bajo microscopio de fluorescencia (20x) para determinar el Momento de la Cola de Olive (OTM) de 100 cometas por laminilla con la herramienta Komet 5 (Andor Technology Ltd; N-IRL, UK) para electroforesis de células únicas (ensayo cometa).

Como control positivo de la técnica, se aplicó una dosis de 3 Gy de radiación gamma para retar la respuesta de reparación de daño al DNA de doble cadena por HRR (Olive *et al.*, 1999).

5.17 Análisis bioinformáticos

5.17.1 IPA: Predicción de funciones celulares y enfermedades

De manera independiente, tanto los resultados de expresión de mRNAs como los de expresión de miRNAs fueron sometidos a un Análisis de Núcleos (Core Análisis) con la herramienta bioinformática Ingenuity Pathway Analysis (IPA) para evaluar e identificar las vías de señalización, vías metabólicas, redes moleculares y procesos biológicos que fueron perturbados de manera significativa, y para predecir el posible desarrollo y establecimiento de enfermedades.

5.17.2 Predicción de genes blanco para microRNAs con miRWalk, microRNA, miRDB y TargetScan

Se realizó una minería de la literatura con la finalidad de identificar a aquellos mRNAs sub-expresados que están ya validados para ser regulados por los miRNAs que resultaron sobre-expresados cuando las células son tratadas con la mezcla de metales. Aunado a esto, las bases de datos miRWalk (Dweep *et al.*, 2011), microRNA (Betel *et al.*, 2010), miRDB (Wang, 2008) y TargetScan (Lewis *et al.*, 2005), cuyos algoritmos determinan la probabilidad de unión entre la región 3'UTR de un mRNA y la región semilla de la 5'UTR de un miRNA, fueron utilizadas para predecir la regulación directa de los genes sub-expresados a través de los miRNA sobre-expresados, pues de esta manera se puede determinar la relación que existe entre ambos perfiles de expresión.

5.17.3 Identificación *in silico* de la interacción entre miR-222 y Rad51c

La predicción de los sitios de unión por complementariedad entre la secuencia semilla de mmu-miR-222-3p (seed sequence: 5'-aGCUACAU-3') y la 3'UTR del mRNA de Rad51c (RefSeq ID: NM_053269) se hizo utilizando los algoritmos de las bases de datos miRWalk (Dweep *et al.*, 2011), microRNA (Betel *et al.*, 2010) y miRBase (Kozomara y Griffiths-Jones, 2011).

5.18 Análisis estadístico

5.18.1 Datos de expresión de mRNAs

Los datos del microarreglo de mRNA fueron analizados con la herramienta genArise de Bioconductor, la cual fue desarrollada en la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). El valor de fondo fue sustraído de aquel correspondiente a la intensidad de fluorescencia de cada punto del microarreglo y la normalización de Lowess fue aplicada a la laminilla. El radio de expresión de la condición experimental (Metales) y la control fueron obtenidos con genArise para cada réplica experimental.

Esta herramienta identifica genes expresados de manera diferencial al calcular un valor de z dependiente de la intensidad, es decir, utiliza un algoritmo que calcula la media y desviación estándar dentro de la ventana que rodea a cada punto del microarreglo y arroja el valor de z , el cual mide el número de desviaciones estándar que un dato tiene a partir de su media: $z_i = [R_i - \text{media}(R)] / ds(R)$, donde z_i el valor de z de cada uno de los elementos, $\text{media}(R)$ la media del radio en escala logarítmica, R_i es el radio de cada elemento en escala logarítmica y $ds(R)$ es la desviación estándar del radio en escala

logarítmica. Utilizando este criterio, los elementos de todos los experimentos con un valor de z de 1.5 desviaciones estándar fueron considerados como genes diferencialmente expresados de manera significativa.

Para eliminar los efectos de los marcadores fluorescentes utilizados, se usaron marcas con colorantes diferentes. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la incorporación de las marcas fluorescentes Cy3 y Cy5, indicando que la fluorescencia observada es estable.

5.18.2 Datos de expresión de miRNAs

Los datos obtenidos con el arreglo de RT-qPCR de miRNAs fueron procesados y exportados con la herramienta SDS v2.3 bajo los parámetros estándar y un umbral (threshold) de 0.2.

La expresión relativa de los miRNAs fue calculada con la herramienta RQ Manager v1.2 y los datos subsecuentes fueron analizados usando la herramienta DataAssist v2.0 (Applied Biosystems), permitiendo un máximo de 35 ciclos de amplificación, utilizando al control endógeno (U6 snRNA) para la normalización y ajustando los valores de p mediante la prueba estadística de tasa de falso descubrimiento de Benjamini-Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995).

5.18.3 Predicciones realizadas en IPA

Los grupos de genes involucrados fueron identificados en IPA como aquellos con un valor de p de asociación menor a 0.01. La significancia de la asociación entre la expresión génica y los procesos celulares y enfermedades se evaluó con una prueba estadística de exactitud de Fisher, la cual fue utilizada para calcular dicho valor de p y para determinar la probabilidad de que la asociación se deba al azar.

5.18.4 Datos de formación de *foci* de transformación celular

Para los resultados de la formación de *foci* de transformación celular, se realizó un ANOVA de una vía y se aplicó la prueba de Tukey post-hoc (intervalo de confianza del 95%) para poder comparar entre grupos experimentales. Los resultados con valor de p menores que 0.05 fueron considerados como estadísticamente significativos.

5.18.5 Otros

Todos los demás datos obtenidos fueron sometidos a una prueba t de student de dos colas no pareada con corrección de Welch para determinar diferencias entre las condiciones experimentales, usando el paquete estadístico Prism 6 (GraphPad; CA, USA). Los resultados con un valor de p menor que 0.05 fueron considerados como estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1 Viabilidad celular después del tratamiento con la mezcla de metales

La viabilidad de los cultivos de fibroblastos Balb/3T3 en el día 4 del ensayo (72 h post-exposición a la mezcla de metales y durante la fase iniciación de la carcinogénesis) (Metales) no presentó diferencias ($92.66\% \pm 0.88$) con respecto a la condición Control ($95\% \pm 0.57$) (figura 4).

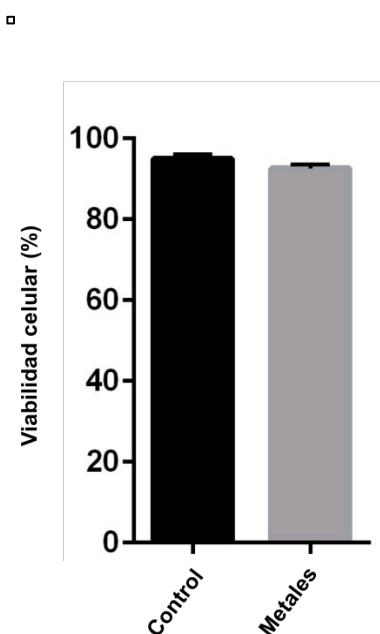


Fig. 4 Porcentaje de viabilidad celular, medido con la técnica dual de fluorescencia FDA/EtBr, de la línea Balb/3T3 en el día 4 del ensayo (72 h post-exposición a la mezcla de As, Cd y Pb). $n=3$, media \pm e.e. prueba de dos colas no pareada.

6.2 Perfil de expresión de mRNAs en células expuestas a la mezcla de metales

Los patrones de expresión de los mRNAs de las células Balb/3T3 control (Ctrl) y expuestas a la mezcla de metales (Metales) se evaluaron en el día 4 (72h post-

exposición) mediante un microarreglo del genoma completo (11,000) del ratón (*Mus musculus*), donde se observó que aproximadamente el 12% de los genes (1,311) se encuentra sub-expresado (veces de cambio < 1.5) y el 12% (1,352) se encuentra sobre-expresado (veces de cambio > 1.5) en la condición Metales con respecto a la Control, mientras que el 76% (8,337) de los genes no sufrió cambios (figura 5).

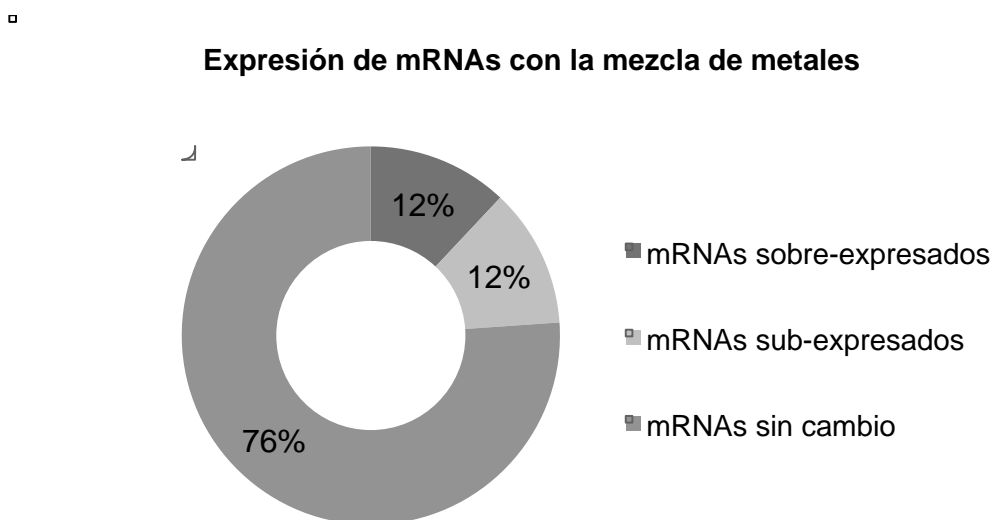


Fig. 5 Perfil de expresión de los mRNAs de fibroblastos Balb/3T3 obtenido por microarreglo en el día 4 del ensayo (72h post-exposición a la mezcla de As, Cd y Pb).

6.3 Predicción de alteraciones celulares y el desarrollo de enfermedades asociadas a la mezcla de metales, usando el perfil de expresión de mRNAs

Los datos de los genes (mRNAs) sub-expresados (veces de cambio < 1.5) en el microarreglo de mRNA fueron analizados con la herramienta bioinformática IPA para predecir las funciones celulares alteradas como consecuencia de la exposición a la mezcla de metales. Encontramos que existen entre 22 y 334 genes involucrados en

cada una de las funciones celulares y moleculares afectadas, las cuales son muerte, movimiento, morfología, crecimiento, desarrollo y proliferación celulares, con valores de p de 1.65×10^{-11} - 2.65×10^{-3} a 9.73×10^{-16} - 2.64×10^{-3} que demuestran que los resultados son estadísticamente significativos (figura 6).

Además, el análisis predictivo de enfermedades y desórdenes identificó el posible desarrollo y establecimiento de cáncer, respuesta inflamatoria, desórdenes genéticos, neurológicos y enfermedades respiratorias, a través de la sub-expresión de entre 27 y 392 genes (mRNAs) (figura 6).

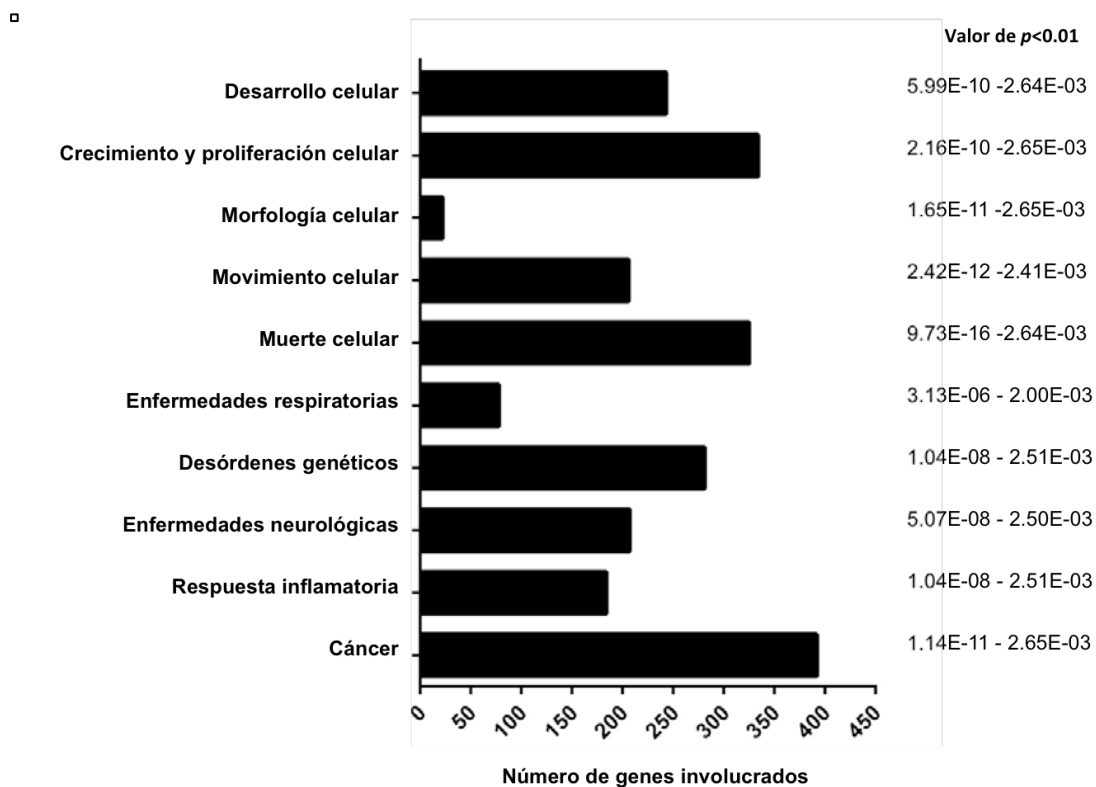


Fig. 6 Predicción en IPA, con el perfil de expresión de mRNAs, de las funciones celulares alteradas y el desarrollo de enfermedades a consecuencia de la exposición de fibroblastos Balb/3T3 a la mezcla de As, Cd y Pb. Se muestra la cantidad de genes sub-expresados participantes en cada proceso celular y desarrollo de enfermedades. El valor de p demuestra que los resultados son estadísticamente significativos.

6.4 Perfil de expresión de miRNAs en células expuestas a la mezcla de metales

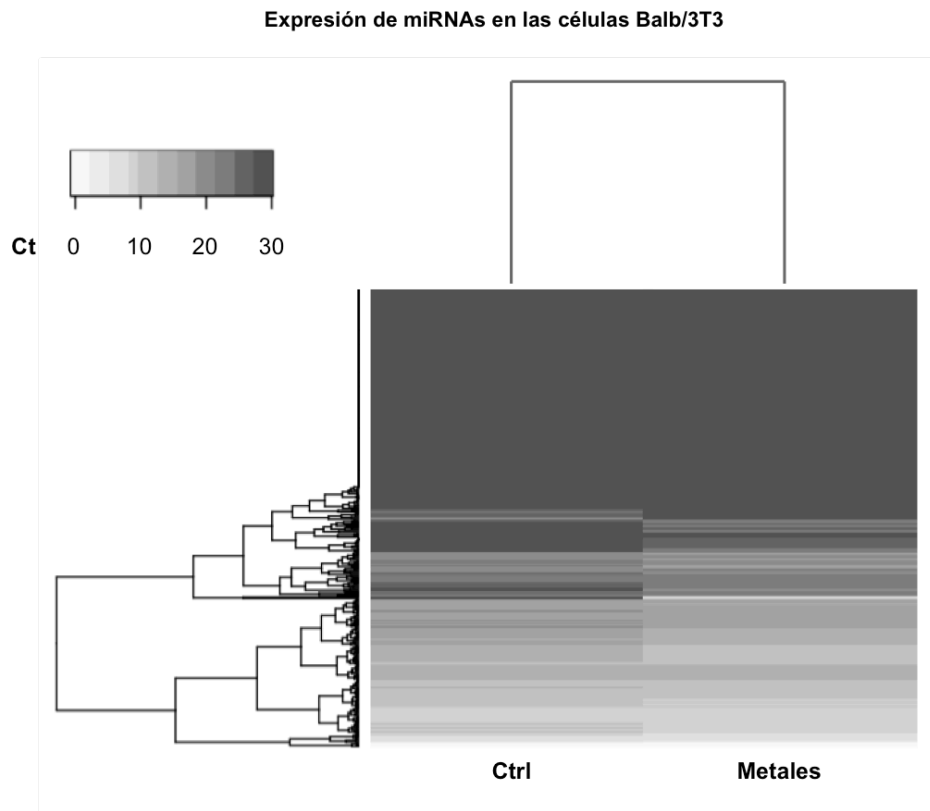
Los perfiles de expresión de los miRNAs de los fibroblastos Balb/3T3 control y expuestos a la mezcla metales se evaluaron en el día 4 del ensayo (72 h post-exposición) mediante un arreglo de baja densidad de RT-qPCR de miRNAs con sondas TaqMan (TLDA), en el que se evaluaron 768 miRNAs (384 por TLDA). Con base en el análisis comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) que se hizo de los resultados obtenidos, observamos que la población de miRNAs bajo la condición experimental (Metales) se comporta totalmente diferente a aquella de la condición control (Ctrl) (figura 7A). Además, se obtuvo que aproximadamente el 27% (209 miRNAs) del total de miRNAs evaluados resulta sobre-expresado (veces de cambio > 1.5) en los fibroblastos Balb/3T3 expuestos a la mezcla de metales, comparado con aquellos no tratados (Ctrl) (figura 7B).

6.5 Predicción de alteraciones celulares y el desarrollo de enfermedades asociadas a la mezcla de metales, usando el perfil de expresión de miRNAs

Los patrones de expresión de miRNAs fueron analizados con la herramienta bioinformática IPA y se predijo que la alteración de dichos patrones puede provocar la disrupción de varias funciones moleculares y celulares, como desarrollo celular, crecimiento y proliferación, muerte, ciclo y movimiento celular (figura 8). Se encontró que entre 24 y 48 miRNAs están involucrados en la des-regulación de cada función y estas predicciones tienen valores de p de entre 1.08×10^{-55} - 3.88×10^{-2} y 1.08×10^{-55} - 4.64×10^{-2} que demuestran que los resultados son estadísticamente significativos. Se predijo además el desarrollo de enfermedades que han sido asociadas a la mezcla de

metales, como daño y anormalidades orgánicas, desórdenes del tejido conectivo genéticos, inflamación y enfermedades respiratorias (valores de p de 3.94×10^{-12} - 3.88×10^{-2} a 6.97×10^{-8} - 4.64×10^{-2} que demuestran que los resultados son estadísticamente significativos), donde se ven implicados de 42 a 81 miRNAs en cada una (figura 8).

A



B

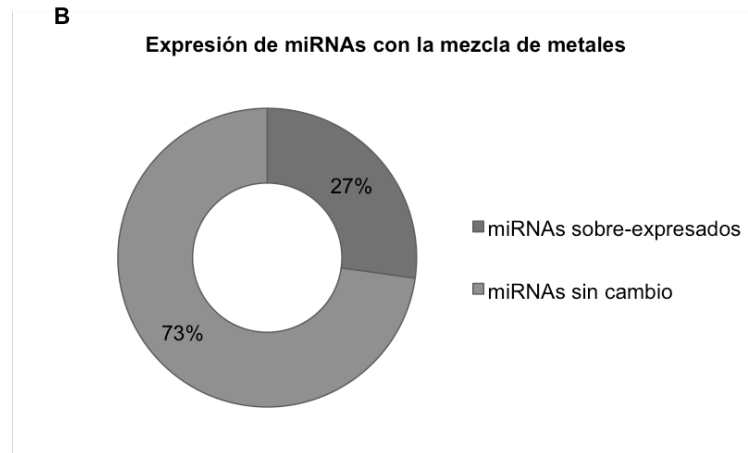


Fig. 7 (A) Mapa de expresión de los miRNAs realizado con la herramienta DataAssiste usando los datos obtenidos por el arreglo de RT-qPCR en los fibroblastos Balb/3T3 en el día 4 (72 h post-exposición a la mezcla de As, Cd y Pb). Mientras mas claro es el tono de color gris, menor es el valor de Ct (ciclo de la PCR en el que comienza la amplificación), lo que indica un mayor número de copias del amplicón de miRNA. (B) Perfil de expresión de los miRNAs. Los resultados son presentados en términos de porcentaje.

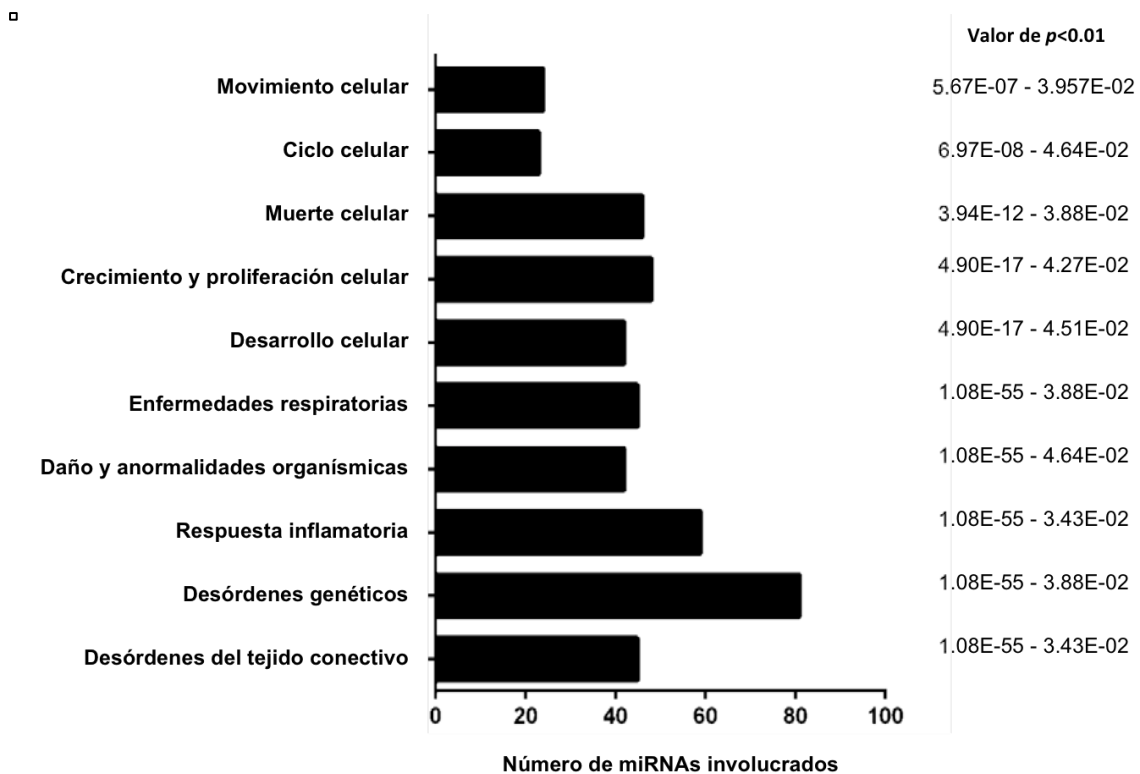


Fig. 8 Predicción en IPA, con el perfil de expresión de miRNAs, de las funciones celulares alteradas y el desarrollo de enfermedades a consecuencia de la exposición de fibroblastos Balb/3T3 a la mezcla de As, Cd y Pb. Se muestra la cantidad de genes sub-expresados participantes en cada proceso celular y desarrollo de enfermedades. El valor de p demuestra que los resultados son estadísticamente significativos.

6.6 miRNAs que han sido asociados a la alteración de funciones celulares y desarrollo de enfermedades que fueron predichos con IPA después de la exposición a la mezcla de metales

Realizamos un análisis basado en la literatura disponible hasta el momento para incrementar la evidencia de los procesos moleculares y celulares, así como del establecimiento de efectos en la salud, de la participación de los diez miRNAs que cuentan con los valores mas grandes de sobre-expresión descubiertos en nuestros datos experimentales (figura 9).

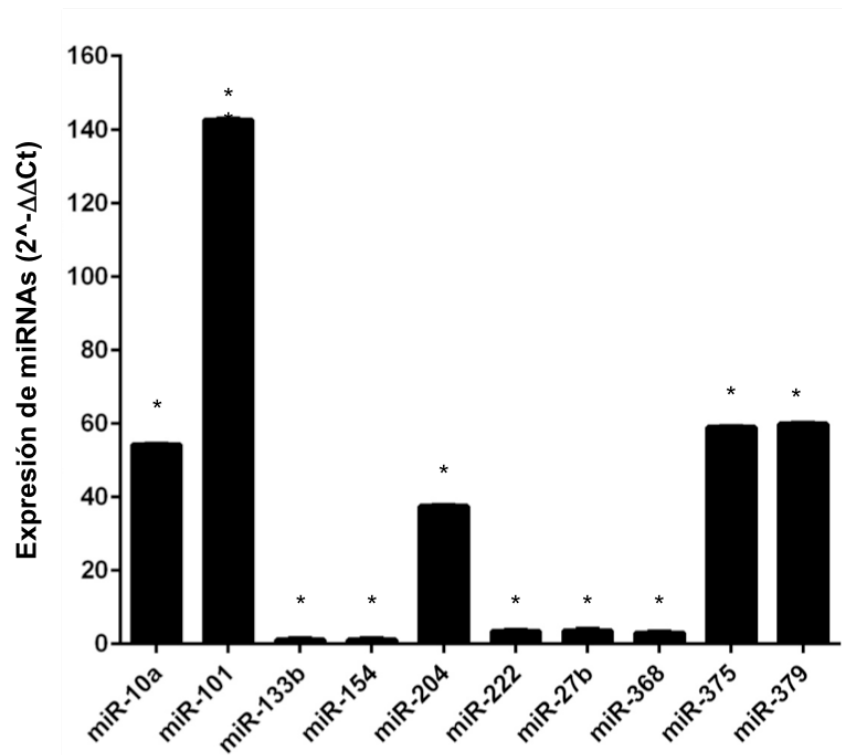


Fig. 9 Expresión relativa de miRNAs en las células Balb/3T3 en el día 4 (72 h post-exposición a la mezcla de As, Cd y Pb). Los resultados de la RT-qPCR son presentados en términos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct$ promedio del miRNA- Ct promedio de snRNAU6; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ Metales - ΔCt Control); control endógeno: snRNA U6, n=4, media \pm e.e., prueba de t no pareada de dos colas, *p<0.05.

Encontramos que procesos como el de inflamación, muerte celular, crecimiento, proliferación y establecimiento de cáncer ya han sido asociados con algunos de los miRNAs que encontramos sobre-expresados en este trabajo (figura 10).

La búsqueda y análisis de información que realizamos nos permitió evidenciar que miR-154, -222 y -379 regulan positivamente la respuesta inflamatoria (Izzotti *et al.*, 2011; Ooi *et al.*, 2012), miR-204 (Xiao *et al.*, 2011) y miR-133 (Zhu y Fan, 2012) inhiben la muerte celular, éste último además induce el crecimiento celular y la proliferación junto con miR-222 (Li *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012) y miR-375 (Poy *et al.*, 2009; Simonini *et*

al., 2010), quien también ha sido asociado con carcinoma de pulmón (Nishikawa *et al.*, 2011). MiR-10 ha sido ligado a carcinoma oral, leucemias, y cáncer de esófago y mama (Lund, 2010; Tian *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2012), y, finalmente, miR-222 también ha sido identificado como sobre-expresado en leucemia (Poláková *et al.*, 2011) y cáncer de mama (Fu *et al.*, 2011), hígado (Varnholt, 2008), tiroides (Chira *et al.*, 2010), próstata y vejiga, entre otros (Catto *et al.*, 2011).

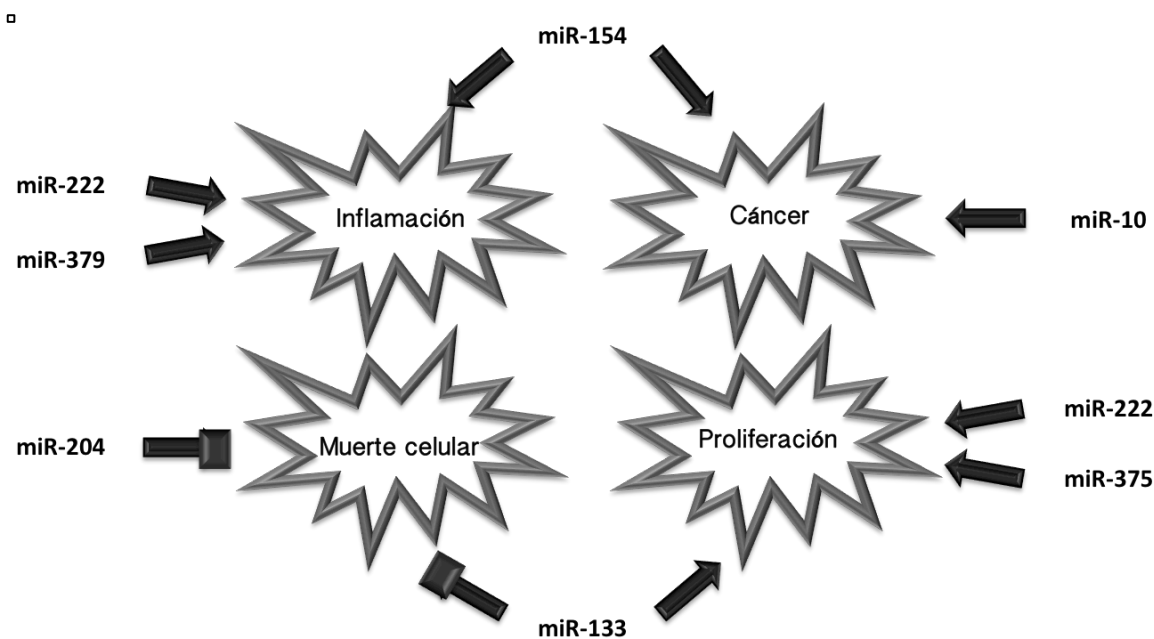


Fig. 10 miRNAs sobre-expresados en las células Balb/3T3 expuestas a la mezcla de As, Cd y Pb que están ya validados como reguladores de algunas de las funciones celulares y enfermedades predichas por IPA.

Nuestro primer acercamiento bioinformático fue utilizar a la herramienta IPA para determinar las funciones biológicas alteradas y el desarrollo de enfermedades con los patrones de expresión de los mRNAs y de los miRNAs. El segundo acercamiento fue definir los mRNAs predichos y validados como genes blanco de los miRNAs, usando el

algoritmo de la base de datos miRWalk a través de las correspondientes a microRNA, miRDB y TargetScan, donde el apareamiento de los siete nucleótidos de la secuencia semilla del miRNA con la 3'UTR del mRNA y un valor de p menor a 0.001 fueron utilizados como criterios principales para la predicción.

Se determinó que seis de los diez mRNAs que presentan los valores de sub-expresión mas evidentes (figura 11) pueden ser regulados por seis de los miRNAs que presentan los mayores valores de expresión (figura 12).

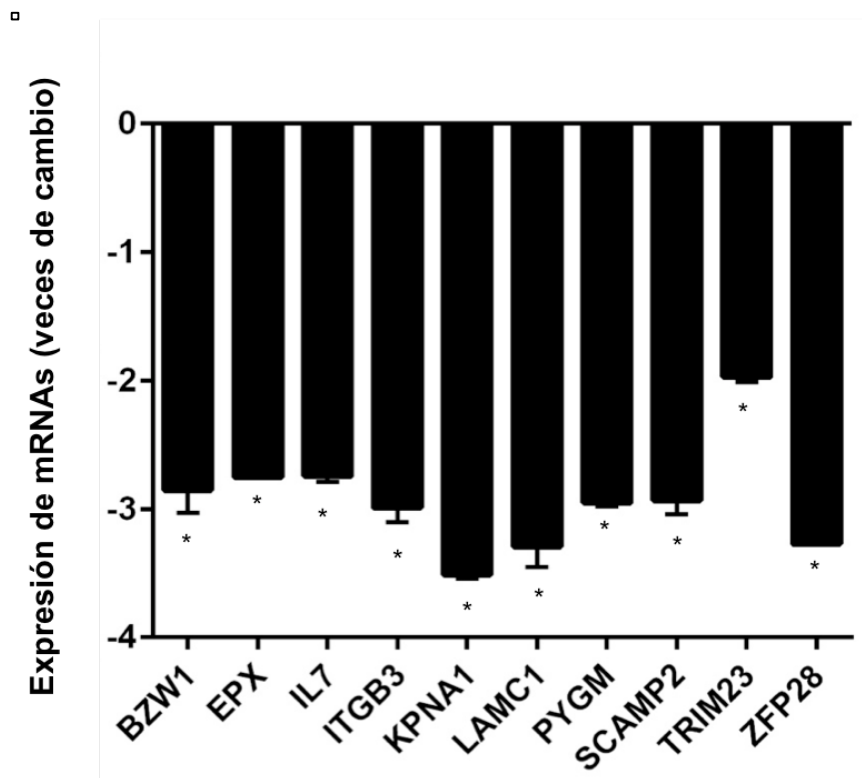


Fig. 11 Expresión de mRNAs en las células Balb/3T3 en el día 4 (72 h post-exposición a la mezcla de As, Cd y Pb). Los resultados del microarreglo son presentados en términos de veces de cambio con respecto al control; $n=6$, media \pm e.e., prueba de t no pareada de dos colas, $*p<0.05$.

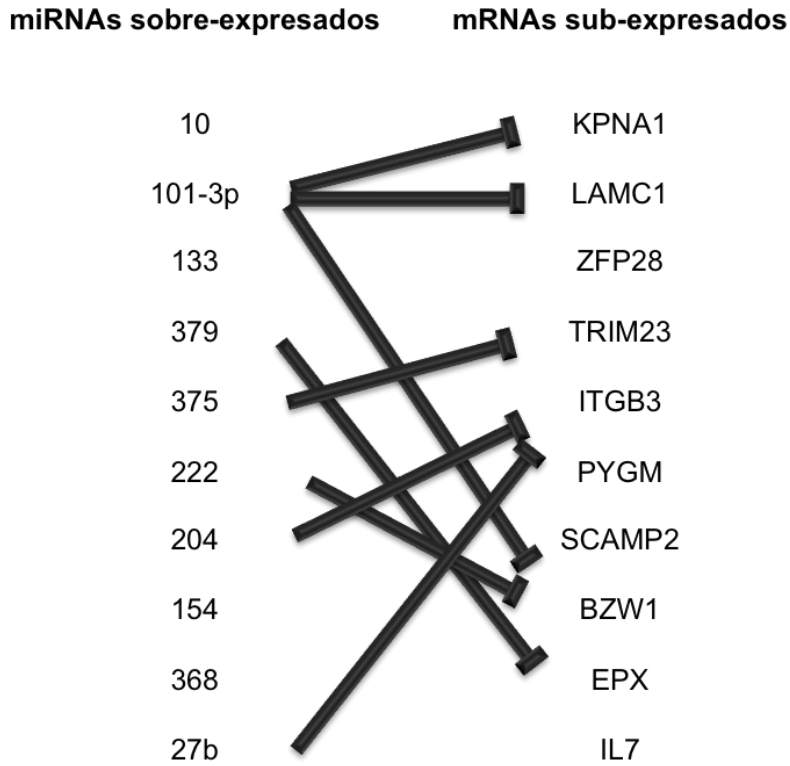


Fig. 12 Lista de los diez miRNAs con los mayores niveles de expresión y los diez mRNAs con los menores niveles de expresión en las células Balb/3T3 en el día 4 (72 h post-exposición a la mezcla de As, Cd y Pb). Base de datos utilizada: miRWalk (microRNA, miRDB y TargetScan).

Estos resultados sugieren una relación cercana entre los perfiles de expresión de mRNAs y miRNAs que podría ser responsable de la alteración de los procesos celulares antes mencionados y, por lo tanto, del establecimiento de las enfermedades predichas en este estudio. Esta observación se ve fortalecida por el hecho de que cinco de los diez miRNAs con los mayores niveles de expresión (figura 9) están reconocidos como reguladores negativos directos (según la base de datos miRWalk) de catorce de los genes que se sub-expresan a las 72h (4 días) post-exposición a la mezcla metales (tabla 1).

miRNAs sobre-expresados	Genes (mRNAs) sub-expresados
10	C-MOS
101-3p	FGFR, LAMC1, MTPN, CCNI, CAMKA2A, MADD
133	CNN1, C-MOS, SP1, STAT3, NKX6-1
222	C-MOS, CCNI, STAT3, CASP3, FOS
375	NCAM1, CASP3, C-MOS, MTPN, SFN

Tabla 1. miRNAs sobre-expresados que ya han sido validados como reguladores negativos directos de algunos de los mRNAs que se ven sub-expresados en las células Balb3T3 en el día 4 (72 h post-exposición a la mezcla de As, Cd y Pb). Base de datos utilizada: miRWalk.

6.7 mRNAs sub-expresados predichos y validados para ser regulados por los miRNAs sobre-expresados

Usando la base de datos miRWalk, identificamos a los genes sub-expresados que están predichos y validados para ser regulados por los cinco miRNAs que presentan los mayores valores de expresión, obteniendo una lista de 42 mRNAs (tabla 2).

Las listas de los cinco miRNAs sobre-expresados y los 42 mRNAs sub-expresados fueron sometidas al mismo tiempo al análisis en IPA que se describió anteriormente. Encontramos que las enfermedades, que han sido relacionadas a la exposición a la mezcla de metales, predichas por la combinación de dichos patrones de expresión son el cáncer y enfermedades cardiovasculares, entre otras. Mientras que las funciones celulares que se ven alteradas son el crecimiento y proliferación, desarrollo celular, muerte celular, metabolismo de aminoácidos y síntesis de proteínas (figura 13).

miRNA	Genes predichos	Genes validados
10	C-MOS, CASP3	STK4, CLCC1, DHFR, SMAP1, CYP1A1, PGM3, CNTD1, PHACTR2, OGDH
101-3p	FGFRL1, LAMC1, C-MOS, MTPN, MADD, CCNI, CAMK2A	FZD6, NDFIP1, GLO1, RAB30, FZD4, RAP2B, SPAM1, EDEM3, PLXNA2, MBNL1, DNAJB4, NUPL2, SLC1A1, RIPK4, KCND2, STAG2
133	CNN1, C-MOS, SP1, STAT3, NKX6-1	SRXN1, ADCYAP1, PPP2CB
375	NCAM1, CASP3, C-MOS, MTPN, SFN	
222	CCNI, STAT3, CASP3, C-MOS, FOS	

Tabla 2. mRNAs sub-expresados predichos y/o validados para ser regulados negativamente por cinco de los miRNAs más expresados en las células Balb3T3 en el día 4 (72 h post-exposición a la mezcla de As, Cd y Pb). Base de datos utilizada: miRWalk.

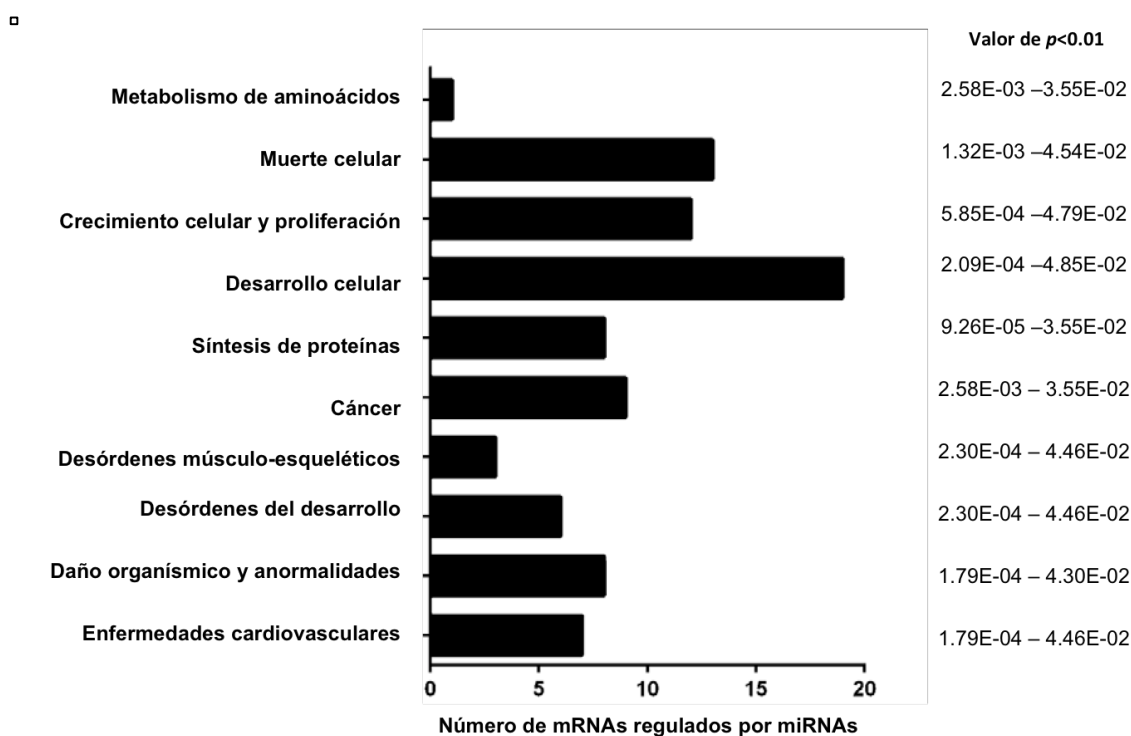


Fig. 13 Predicción en IPA, con los cinco miRNAs sobre-expresados y los 42 mRNAs sub-expresados, de las funciones celulares alteradas y el desarrollo de enfermedades a consecuencia de la exposición de fibroblastos Balb/3T3 a la mezcla de As, Cd y Pb. Se muestra la cantidad de genes sub-expresados participantes en cada proceso celular y desarrollo de enfermedades. El valor de p demuestra que los resultados son estadísticamente significativos.

Para enriquecer nuestros análisis bioinformáticos y darles robustez, también se realizó una búsqueda de los resultados de microarreglos ya publicados en el contexto del cáncer, desórdenes genéticos, respuesta inflamatoria y enfermedades respiratorias con la finalidad de confirmar la sub-expresión de los mRNAs observada en el presente trabajo. Utilizando la herramienta Gene Expression Atlas (Kapushesky *et al.*, 2010) encontramos que, efectivamente, los mRNAs mostrados en la tabla 2 se encuentran sub-expresados.

De la misma manera, confirmamos que dichos genes se encuentran involucrados en la disrupción de tres de los procesos celulares antes mencionados (crecimiento y proliferación celular, desarrollo y muerte celular), utilizando la información de los bancos de datos GeneCards (Safran *et al.*, 2010), Mouse Genome Database (MGD) del sitio de internet Mouse Genome Informatics (Eppig *et al.*, 2012) y la literatura disponible (Singh y Arlinghaus, 1997).

Con todos estos análisis se identificó al cáncer como la principal enfermedad que puede desencadenarse por la exposición a la mezcla de metales y al conocido oncomiRNA miR-222 como regulador de los procesos de inflamación y proliferación celular, los cuales están estrechamente relacionados con la enfermedad, sin embargo, el análisis completo en IPA del perfil de expresión de mRNAs (tabla 3) determinó la afectación de otros procesos celulares clave que están mucho menos estudiados como la reparación del DNA, cuya disrupción es un evento clave en la etapa de iniciación de los procesos carcinogénicos (Hoeijmakers, 2001; Hanahan y Weinberg, 2011; Carvalho y Karnaar, 2014; Guirouilh-Barbat *et al.*, 2014; Watkins *et al.*, 2014). Basándonos en esto, el siguiente objetivo de la tesis fue evaluar el papel que juega miR-222 en el

silenciamiento del gen Rad51c, esencial en la vía de reparación del DNA por HRR y cuya disrupción puede llevar a la generación de mutaciones y así desencadenar la etapa de iniciación de la transformación celular de la línea BALB/c-3T3 inducida por la exposición a la mezcla de metales.

Funciones celulares y moleculares	Número de genes involucrados	Valor de $p < 0.01$
Crecimiento y proliferación celular	334	2.16E-10 - 2.65E-03
Muerte celular	325	9.73E-16 - 2.64E-03
Desarrollo celular	243	5.99E-10 - 2.64E-03
Movimiento celular	206	2.42E-12 - 2.41E-03
Ciclo celular	102	1.57E-08 - 4.81E-02
Metabolismo de lípidos	75	1.05E-05 - 6.95E-03
Reparación del DNA	40	1.14E-11 - 6.53E-02
Replicación del DNA	40	6.54E-11 - 1.36E-01
Recombinación del DNA	24	1.29E-09 - 1.36E-01
Morfología celular	22	1.65E-11 - 2.65E-03

Tabla 3. Predicción completa en IPA, con el perfil de expresión de mRNAs, de las funciones celulares alteradas y el desarrollo de enfermedades a consecuencia de la exposición de fibroblastos Balb/3T3 a la mezcla de As, Cd y Pb. Se muestra la cantidad de genes sub-expresados participantes en cada proceso celular. El valor de p demuestra que los resultados son estadísticamente significativos.

6.8 Predicción de la interacción entre miR-222 y Rad51c

Con el análisis *in silico* realizado con las bases de datos miRWalk, microRNA y miRBase, logramos identificar la posible unión de la región semilla de miR-222 en cinco diferentes sitios a lo largo de la 3'UTR del mRNA de Rad51c. El algoritmo de mirWalk

nos permitió predecir la regulación de dicho gen blanco con un valor de p menor a 0.05 ($p=0.0413$), fortaleciendo la posibilidad de su regulación negativa a través de miR-222.

6.9 Confirmación de la expresión de miR-222 en células iniciadas con la mezcla de metales

Los resultados del objetivo general I de esta tesis demuestran la sobre-expresión de miR-222 en el día 4 del ensayo de transformación celular Balb/3T3 inducida por la mezcla de metales (Metales). Corroboramos dicho resultado, por RT-qPCR, y observamos una elevación significativa en los niveles de mmu-miR-222 ($2^{-\Delta\Delta Ct}=29.04\pm 0.55$), con respecto a la condición Control ($2^{-\Delta\Delta Ct}=1.0\pm 0.10$) (figura 14).

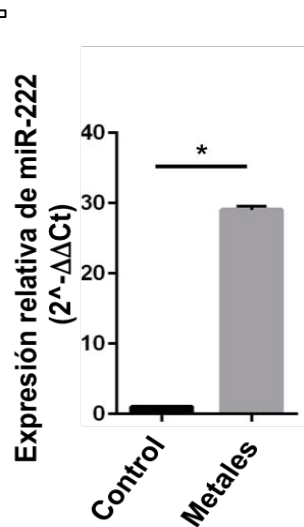


Fig. 14 Expresión relativa de miR-222 en células Balb/3T3 en el día 4 del ensayo (72 h post-exposición a la mezcla de As, Cd y Pb y durante la fase de iniciación de la carcinogénesis). Los resultados de la RT-qPCR se muestran en términos de $2^{-\Delta\Delta Ct} = \Delta Ct \text{ Metales} - \Delta Ct \text{ Control}$; control endógeno snRNA U6; $n=3$, media \pm e.e., prueba de t de dos colas no pareada, $*p<0.05$.

6.10 Expresión génica y proteica de Rad51c en células iniciadas con la mezcla de metales

Una vez confirmada la sobre-expresión de miR-222 durante la iniciación de la transformación celular inducida por metales, investigamos los niveles de expresión de su gen blanco. Primero, por RT-PCR, medimos los niveles de mRNA de Rad51c y observamos una sub-expresión de alrededor del 50% (Intensidad de banda (IB)= 0.46 ± 0.16) con respecto a la condición Control (IB= 1.0 ± 0.09), como se muestra en la figura 15 (la fotografía del gel completo se muestra en el Anexo III de esta tesis como Figura complementaria 1).

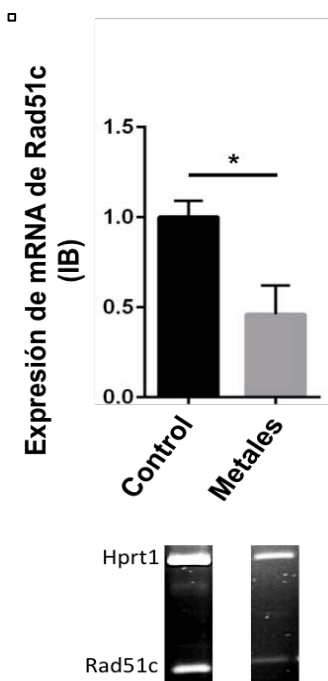


Fig. 15 Expresión relativa de Rad51c medida por RT-PCR en células Balb/3T3 en el día 4 del ensayo (72 h post-exposición a la mezcla de As, Cd y Pb y durante la fase de iniciación de la carcinogénesis). La intensidad de banda (IB) fue normalizada contra el control endógeno; control endógeno: Hprt1; n=3, media±e.e., prueba de t de dos colas no pareada, *p<0.05.

Después, elucidamos que la expresión proteica de Rad51c, evaluada por inmunoblot, disminuye alrededor de 10 veces de cambio (IB=0.09±0.02) en la condición Metales con respecto a la Control (IB=1.0±0.08) (figura 16) (la fotografía de la placa completa se muestra en el Anexo IV de esta tesis como Figura complementaria 2).

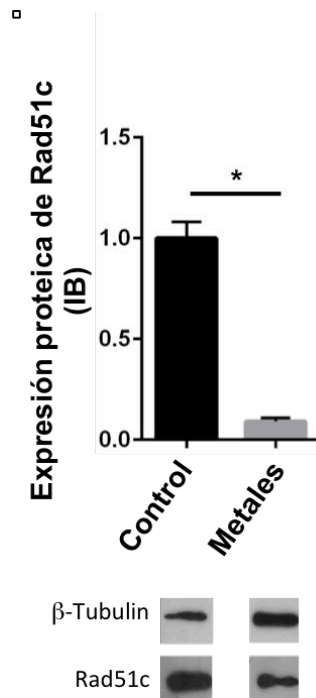


Fig. 16 Expresión relativa de la proteína de Rad51c evaluada por inmunoblot en células Balb/3T3 en el día 4 del ensayo (72 h post-exposición a la mezcla de As, Cd y Pb y durante la fase de iniciación de la carcinogénesis). La intensidad de banda (IB) fue normalizada contra el control endógeno; control endógeno: β -tubulina; n=3, media±e.e., prueba de t de dos colas no pareada, *p<0.05.

6.11 Validación de miR-222 como regulador directo de Rad51c

Debido a la correlación que existe entre la sobre-expresión de miR-222 con la sub-expresión génica y proteica de Rad51c, nos dimos a la tarea de evaluar si ésta es atribuible a la regulación negativa directa de Rad51c por miR-222. Para lograrlo, transfectamos la línea celular Vero con el plásmido reportero de luciferasa que contiene

la 3'UTR del gen en cuestión. El plásmido pEZXMT05-Rad51c-3'UTR fue co-transfectado con la secuencia madura sintética de mmu-miR-222, y un plásmido carente de 3'UTR de Rad51c (pEZXMT05) fue usado como control negativo. Nuestros resultados muestran que hay un decremento de alrededor del 80% (Unidades relativas de luminiscencia (URL)= 1.27 ± 0.32) en la actividad de Gluc en presencia del miR-222 (condición pEZXMT05-Rad51c-3'UTR/miR-222), con respecto a la condición donde solamente se transfectó el plásmido (pEZXMT05-Rad51c-3'UTR) (URL= 6.47 ± 0.22). No observamos diferencias significativas cuando se co-transfecta al plásmido Control negativo con el miR-222 (condición pEZXMT05/miR-222) (URL= 4.18 ± 0.34), comparado con la condición donde se solamente se transfectó el plásmido Control negativo (pEZXMT05) (URL= 4.72 ± 0.58) (figura 17).

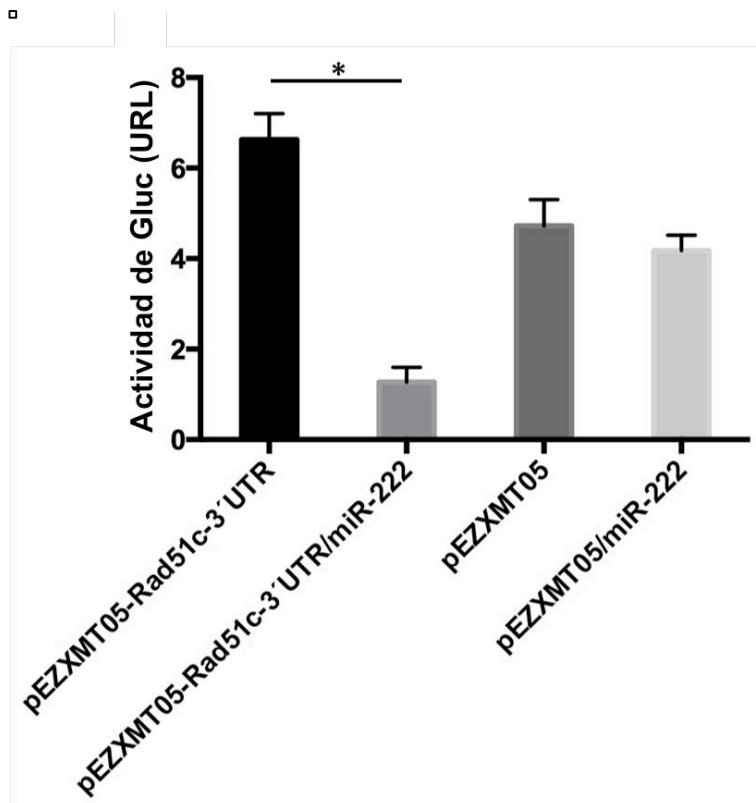


Fig. 17 Actividad de Gaussia luciferasa (Gluc) en células Vero transfectadas con el plásmido que contiene la 3'UTR de Rad51c río abajo de la región codificante de Gluc (pEZXTM05-Rad51c-3'UTR) y co-transfectadas o no con la secuencia madura de miR-222. Los resultados están expresados en unidades relativas de luminiscencia (URL) y el cero representa la condición control (sin transfectar). Control enfógeno: fosfatasa alcalina secretada (SEAP), pEZXTM05: control negativo, n=3, media±e.e., prueba de t de dos colas no pareada, *p<0.05.

6.12 Inducción e inhibición de la expresión de miR-222

Los resultados demuestran que miR-222 se encuentra sobre-expresado en las células Balb/3T3 iniciadas con la mezcla de metales y que miR-222 es regulador negativo directo de la traducción del mRNA de Rad51c a través de su unión con la 3'UTR. Por lo tanto, el siguiente paso fue determinar la función biológica y el impacto que este RNA pequeño tiene *per se* en el proceso de iniciación de carcinogénesis, es decir fuera del

contexto de la mezcla de metales (eliminando la mezcla de metales como estímulo iniciador).

Para lograrlo se indujo la sobre-expresión o abatió la sub-expresión de miR-222 al transfectar las células Balb/3T3 con la molécula precursora (pre-miR-222) o inhibidora (anti-miR-222) del miRNA. Medimos dicha expresión mediante RT-qPCR en una curva de tiempo post-transfección (4, 8, 24 y 48 h) y determinamos que a las 24 h se tienen valores de sobre- y sub-expresión equivalentes (figura 18). Debido a esto, tomamos el tiempo de 24 h post-transfección como el día 1 del ensayo de transformación celular, donde las células son cosechadas, sub-cultivadas y seguidas al día 4 para las determinaciones experimentales (figura 2A).

Evaluamos la viabilidad celular bajo dichas condiciones y observamos que las transfecciones no genera efectos citotóxicos (viabilidad del $89.66\% \pm 1.69$ con el pre-miR-222 y del $88.33\% \pm 0.88$ con el anti-miR-222), comparado con la condición del agente de transfección (siPORT) ($92.22\% \pm 0.88$) (figura 19).

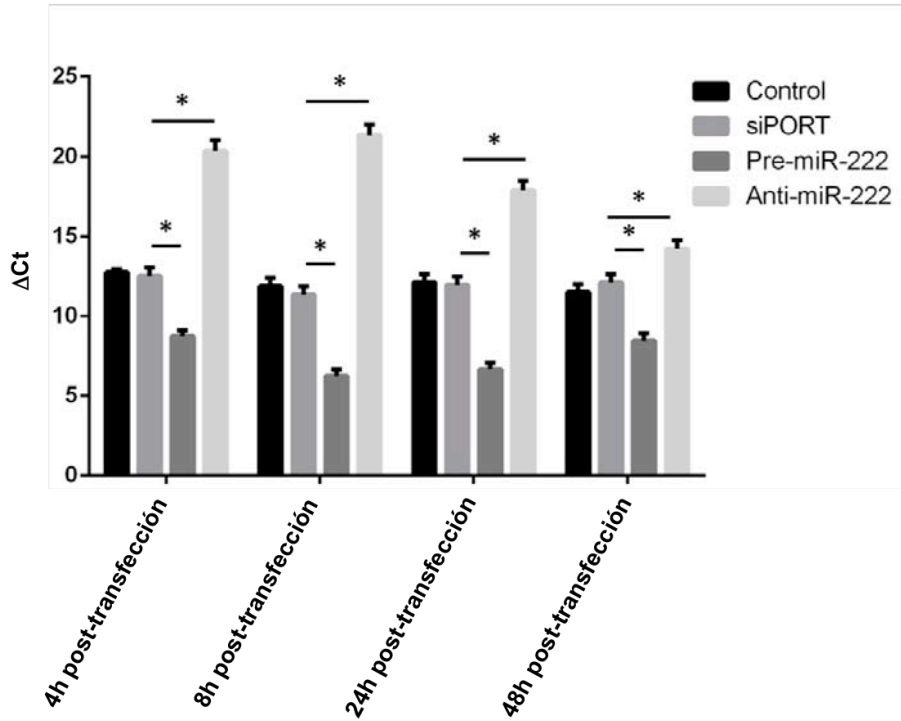


Fig. 18 Expresión relativa de miR-222 en células Balb/3T3 a las 4, 8, 24 y 48 h post-transfección con el pre-miR-222 o anti-miR-222. Los resultados de la RT-qPCR se muestran en términos de $\Delta Ct = Ct$ promedio de miR-222 - Ct promedio de snRNAU6. Control endógeno snRNA U6, siPORT: agente de transfección; $n=3$, media \pm e.e., prueba de t de dos colas no pareada, $*p < 0.05$.

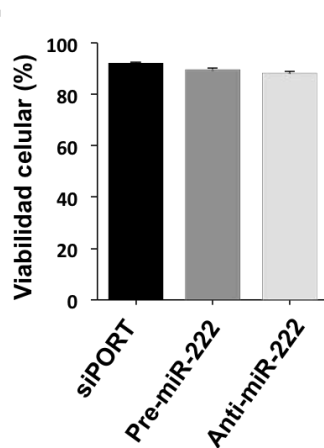


Fig. 19 Porcentaje de viabilidad celular medido por el método de FDA/EtBr en células Balb/3T3 en el día 4 del ensayo. Células tratadas con el agente transfección (siPORT) y con el pre-miR-222 o anti-miR-222; media \pm e.e, $n=3$, prueba de t de dos colas no pareada.

En el día 4 del ensayo, evaluamos la expresión de miR-222 por RTqPCR y observamos una elevación de sus niveles ($2^{-\Delta\Delta CT}=39.21\pm 0.44$) cuando transfectamos la molécula precursora y una disminución significativa ($2^{-\Delta\Delta CT}=0.007\pm 0.005$) con la molécula inhibidora, relativa a la condición control (siPORT) ($2^{-\Delta\Delta CT} = 1.0\pm 0.09$) (figura 20).

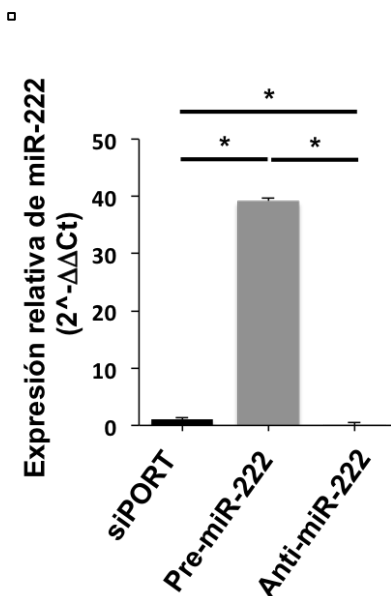


Fig. 20 Expresión relativa de miR-222 en células Balb/3T3 en el día 4 del ensayo en células transfectadas con el pre-miR-222 o anti-miR-222. Los resultados de la RTqPCR se muestran en términos de $2^{-\Delta\Delta Ct} = \Delta Ct \text{ pre-miR-222 o anti-miR-222} - \Delta Ct \text{ Control}$; control endógeno snRNA U6; n=3, media±e.e., prueba de t de dos colas no pareada, *p<0.05.

Las células que sobre-expresan miR-222 exhibieron una disminución de alrededor del 50% ($IB=0.47\pm 0.04$) en la expresión génica de Rad51c, comparado con la condición control (siPORT) ($IB=1.0\pm 0.11$) (figura 21), así como un decremento significativo, aproximadamente del 80% ($IB=0.17\pm 0.04$), en su expresión proteica, comparado con el control ($IB=1.0\pm 0.13$) (figura 22) (las fotografías del gel y de la placa completos se muestra en el Anexo III y IV de esta tesis como Figuras complementarias 1 y 2).

El mismo efecto en la expresión de la proteína de Rad51c, pero no en la del mRNA, tuvo lugar en las células transfectadas con el anti-miR-222 (IB=0.13±0.01) (figura 22).

Cuando las células pre-transfectadas fueron expuestas a la mezcla de metales como tratamiento iniciador, solamente aquellas que sobre-expresan miR-222 mostraron niveles menores del mRNA de Rad51c (IB=0.57±0.08) (figura 21), pero no en los niveles proteicos, con respecto a la condición control (figura 22).

Finalmente, las células tratadas con el agente de transfección y la mezcla de metales (siPORT/Metales) sufrieron un decremento en la cantidad de proteína de Rad51c (IB=0.15±0.02), comparadas con la condición siPORT (figura 22).

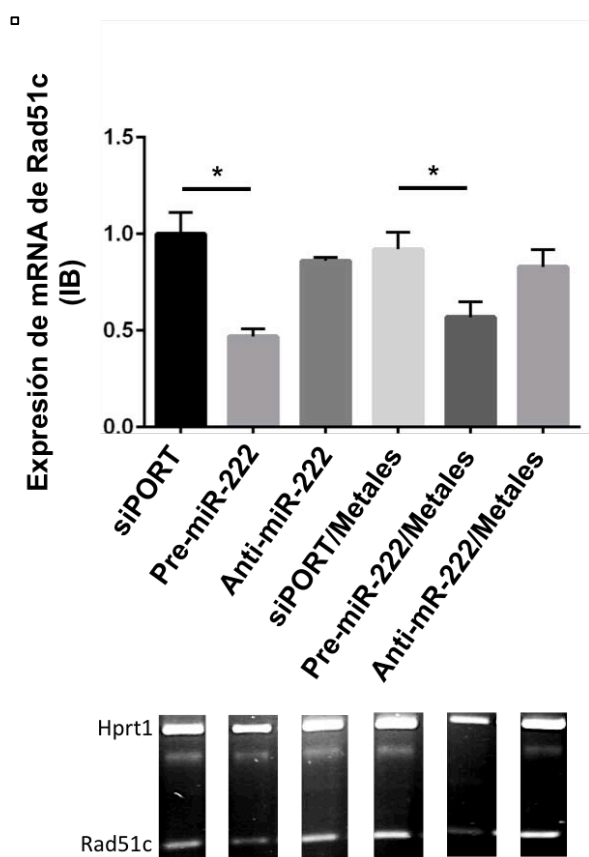


Fig. 21 Expresión relativa de Rad51c medida por RT-PCR en células Balb/3T3 en el día 4 del ensayo. Células transfectadas con el pre-miR-222 o anti-miR-222, y co-tratadas o no con la mezcla de metales. La intensidad de banda (IB) fue normalizada contra la condición control. siPORT: agente de transfección; control endógeno: Hprt1; n=3, media±e.e., prueba de t de dos colas no pareada, *p<0.05.

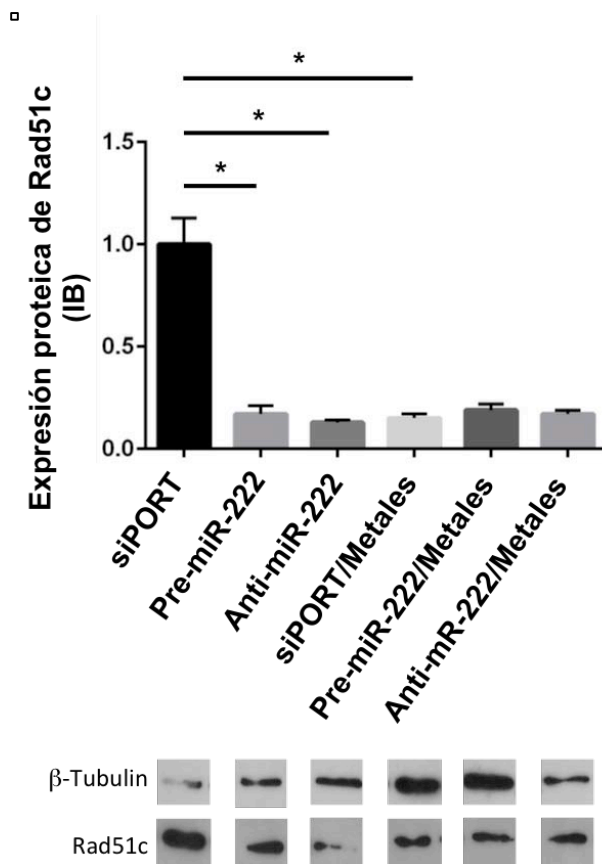


Fig. 22 Expresión relativa de la proteína de Rad51c evaluada por inmunoblot en células Balb/3T3 el día 4 del ensayo. Células transfectadas con el pre-miR-222 o anti-miR-222, y co-tratadas o no con la mezcla de metales. La intensidad de banda (IB) fue normalizada contra la condición control. siPORT: agente de transfección; control endógeno: β -tubulina; n=3, media \pm e.e., prueba de t de dos colas no pareada, *p<0.05.

6.13 RCDs del DNA en células que sobre-expresan miR-222

Una vez que demostramos que la inducción de la sobre-expresión de miR-222 causa los mismos efectos en el mRNA y la proteína de Rad51c que la mezcla de metales, decidimos estudiar la consecuencia de dicha regulación en la reparación del DNA mediada por HRR. Por lo que evaluamos la presencia de RCDs en las células transfectadas con el pre-miR-222 o anti-miR-222, aplicando o no una dosis de 3 Gy de

radiación gamma (la cual genera RCDs del DNA) con la finalidad de retar la respuesta de reparación por HRR.

Llevamos a cabo una prueba de ensayo cometa neutro (pH7) y midiendo los RCD del DNA en términos de OTM observamos que, comparado con la condición Control (OTM = 4.5 ± 0.26), el reto con 3 Gy de radiación gamma (utilizado como control positivo de la técnica para inducir daño genotóxico) indujo daño al DNA a los 5 min (3 Gy) (OTM = 6.87 ± 0.43), a la hora (1h Post-3Gy) (OTM = 6.25 ± 0.28) y a las 24 h post-irradiación (24h Post-3 Gy) (OTM = 14.2 ± 0.48) (tabla 4).

Por otro lado, determinamos que el agente de transfección (siPORT), comparado con las condiciones experimentales donde se retó a las células con 3 Gy de radiación gamma, no induce RCDs en el DNA pues no existen diferencias significativas entre los niveles de daño (tabla 4).

Tiempo post-irradiación	OTM	
	Radiación con 3 Gy	siPORT
Control	4.5 ± 0.26	4.92 ± 0.3
3Gy	$6.87 \pm 0.43^*$	6.47 ± 0.5
1h Post-3Gy	$6.25 \pm 0.28^*$	7.15 ± 0.52
24h Post-3Gy	$14.2 \pm 0.48^*$	$11.60 \pm 0.65^{**}$

Tabla 4. RCDs del DNA presentes en células Balb/3T3 tratadas con 3 Gy de radiación gamma o con el agente de transfección (siPORT). Las muestras fueron procesadas para el ensayo cometa neutro a los 5 min (3Gy), 1 h (1h Post-3Gy) y 24 h (24h Post-3Gy) post-irradiación. Los resultados se presentan como momento de la cola de Olive (OTM). Los valores de los tiempos post-irradiación con 3Gy fueron comparados con el control (*) y los valores del agente de transfección fueron comparados con los correspondientes en a condición de radiación con 3Gy (**). Dosis de radiación gamma: 3 Gy; n = 2 laminillas/condición, 50 cometas/laminilla; media \pm e.e., prueba de t de dos colas no pareada, *,**p<0.05.

Las células que sobre-expresan miR-222 sufrieron un incremento en los RCDs del DNA cuando no fueron irradiadas (Pre-miR-222) (OTM = 7.76 ± 0.49) y a la hora (Pre-miR-222 – 1h Post-3Gy) (OTM = 10.01 ± 0.44) y a las 24 h (Pre-miR-222 – 24h Post-3Gy) (OTM = 15.94 ± 0.45) post-irradiación, con respecto al agente de transfección (siPORT). Mientras que las células que no expresan a miR-222 (Anti-miR-222), tanto irradiadas como no irradiadas, presentan niveles de daño similares a los de siPORT (tabla 5).

Cuando comparamos los niveles de daño de las células que sobre-expresan a este miRNA con las que no lo hacen, observamos que en las primeras hay un aumento en los RCDs del DNA a todos los tiempos post-irradiación (Pre-miR-222 – 3Gy, Pre-miR-222 – 1h-3Gy y Pre-miR-222 – 24h-3Gy) (tabla 5).

Por último, en el transcurso del tiempo posterior a la radiación, hay una inducción en el daño al DNA a las 24 h (siPORT – 24h Post-3Gy) (OTM = 11.60 ± 0.65), comparado con la condición del agente de transfección (siPORT) donde no se aplicó radiación. En las condiciones donde se sobre-expresa miR-222 se observa el mismo patrón a los 5 min (Pre-miR-222 - 3Gy) (OTM = 10.01 ± 0.44) y a las 24 h (Pre-miR-222 – 24h Post-3Gy) (OTM = 15.94 ± 0.45) post-irradiación, y en donde no se expresa miR-222 ocurre lo mismo a las 24 h (Anti-miR-222 – 24h Post-3Gy) (OTM = 11.40 ± 0.49) (tabla 5).

Tiempo post-irradiación	OTM		
	siPORT	Pre-miR-222	Anti-miR-222
Control	4.92±0.3	7.76±0.49*	6.1±0.27
3Gy	6.47±0.5	10.01±0.44* **	6.89±0.32***
1h Post-3Gy	7.15±0.52	8.68±0.35	5.47±0.25***
24h Post-3Gy	11.60±0.65	15.94±0.45* **	11.40±0.49**,* ***

Tabla 5. RCDs del DNA presentes en células Balb/3T3 tratadas con 3 Gy de radiación gamma, el agente de transfección (siPORT), la molécula precursora de miR-222 (Pre-miR-222) o a molécula inhibidora de miR-222 (Anti-miR-222). Las muestras fueron procesadas para el ensayo cometa neutro a los 5 min (3Gy), 1 h (1h Post-3Gy) y 24 h (24h Post-3Gy) post-irradiación. Los resultados se presentan como momento de la cola de Olive (OTM). Los valores de las condiciones experimentales fueron comparados con los de siPORT (*), dentro de cada condición se compararon los valores de los tiempos post-transfección con los de Control (**), y, además, aquellos de Anti-miR-222 fueron comparados con los de Pre-miR-222 (***). Dosis de radiación gamma: 3 Gy; n = 2 laminillas/condición, 50 cometas/laminilla; media±e.e., prueba de t de dos colas no pareada, *, **, ***p<0.05.

6.14 Tratamiento con la molécula precursora de miR-222 como estímulo iniciador de la transformación celular

Por último, evaluamos el papel de la regulación de Rad51c a través de miR-222 en la transformación celular morfológica del ensayo Balb/3T3 al reemplazar la mezcla de metales (que induce dicho fenómeno en el día 16 del modelo (Silva-Aguilar *et al.*, 2011; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014)) con la transfección del pre-miR-222, como estímulo iniciador y/o promotor. Observamos que la transformación ocurre 72 h antes de la observada con Metales, es decir, en el día 13 del ensayo (figura 23).

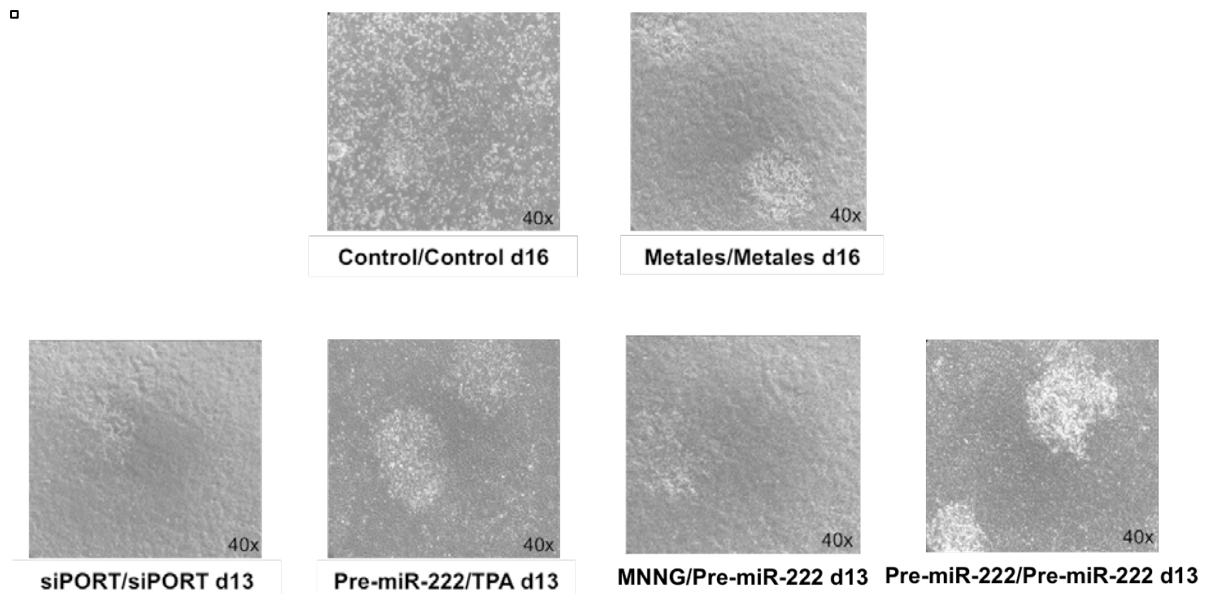


Fig. 23 Fotografías representativas de los *foci* de transformación en el día 16 (Control/Control y Metales/Metales) y en el día 13 (todas las demás condiciones) en las células tratadas con la mezcla de As, Cd y Pb o con el pre-miR-222 como iniciador y/o promotor. siPORT/siPORT: agente de transfección, TPA: promotor conocido, MNNG: iniciador conocido; microscopía de luz.

Entonces, calculamos la eficiencia formadora de colonias ($RCFE = \frac{\text{No. } foci \text{ en la placa de la condición experimental}}{\text{No. } foci \text{ en la placa Control del día 16 o siPORT del día 13}}$) (figura 24C). Como esperábamos, observamos un incremento ($RCFE = 1.24 \pm 0.05$) en el número de células iniciadas y promovidas con Metales (Metales/Metales) con respecto al control (Control/Control) en el día 16.

Cuando empleamos al pre-miR-222 como iniciador, combinado con el promotor conocido TPA (Pre-miR-222/TPA) o con el mismo pre-miRNA como estímulo promotor (Pre-miR-222/Pre-miR-222), hubo un incremento significativo en la RCFE (1.62 ± 0.09 y 2.09 ± 0.45 , respectivamente). También encontramos un incremento significativo en la RCFE de las células iniciadas con MNNG (iniciador conocido) y promovidas con el Pre-

miR-222 (1.29 ± 0.21), pero dicho cambio es menos evidente con respecto a las otras condiciones experimentales.

Como observamos en la figura 24B, el porcentaje de formación de *foci* en la condición Pre-miR-222/Pre-miR-222 fue mayor (205.56 ± 1.5) que el de la condición Metales/Metales (130 ± 0.5) (figura 24A).

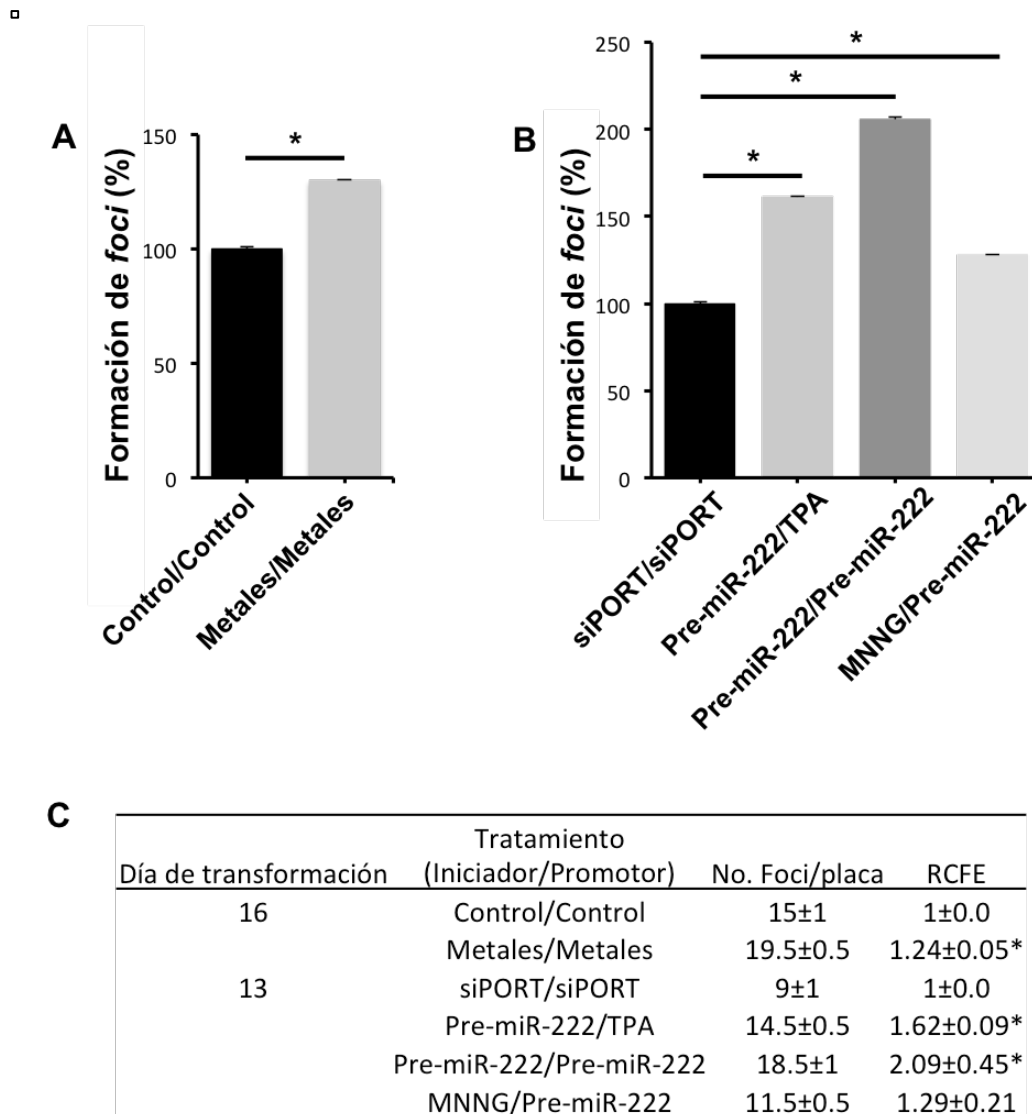


Fig. 24 Porcentaje de *foci* generados en cultivos Balb/3T3 ((RCFE / Control/Control d13 o d16)(100)). (A) Análisis de *foci* en el día 16 de células tratadas con la mezcla de metales como iniciador y promotor (Metales/Metales). (B) Análisis de *foci* en el día 13 en células tratadas con el pre-miR-222 como iniciador y/o promotor; TPA: promotor conocido, MNNG: iniciador conocido; siPORT/siPORT: agente de transfección. n=2, media±e.e., ANOVA de una vía $F(5,6)=49043$ * $p<0.0001$, prueba de Tukey post-hoc para comparación entre grupos 95% IC (intervalo de confianza). (C) Eficiencia relativa de formación de colonias (RCFE) de células Balb/3T3 en el día 16 para Metales/Metales y en el día 13 para las pruebas con pre-miR-222. n=2, media±e.e., prueba de te de dos colas no pareada * $p<0.05$.

7. DISCUSIÓN

La viabilidad de las células Balb/c3T3 (fibroblasto de ratón) no se comprometió después de que fueran tratadas con la mezcla de metales durante 4 h (figura 4), comparándola con la de las células que no fueron expuestas (Ctrl). Esto indica que todos los resultados mostrados en este manuscrito son consecuencia de la expresión génica mediada por la mezcla de metales y no a los efectos citotóxicos que la misma pudiera tener, tal como se ha demostrado ya en trabajos previos de nuestro laboratorio en donde células de hepatocitos humanos (WRL-68) son expuestas a la misma mezcla (Sánchez-Valle *et al.*, 2013).

Con los resultados de nuestros experimentos de microarreglo de mRNAs y arreglo RT-qPCR con sondas TaqMan (TLDA) de miRNAs, logramos observar que la mezcla de metales es capaz de alterar de manera diferencial los patrones de expresión de ambos tipos de RNAs, con respecto al control, en los fibroblastos de ratón Balb/3T3 expuestos al tratamiento de 4 h, determinándose una sobre-expresión de aproximadamente el 27% de los miRNAs evaluados, y una sobre-expresión del 12% y sub-expresión del 12% de los mRNAs estudiados (figuras 5 y 7).

Existe mucha evidencia que explica cómo es que metales como el As, Cd y Pb podrían regular la expresión de los mRNAs. Algunos de los mecanismos reconocidos hasta el momento incluyen la capacidad co-mutagénica (mutagénica débil) del As y Cd, disrupción de la función de factores de transcripción y de señalización celular, y eventos epigenéticos (Madden, 2003; ATSDR, 2004; Yang *et al.*, 2004; Salnikow y Zhitkovich, 2008; Wang y Fowler, 2008; Arita y Costa, 2009; Hou *et al.*, 2011; Henn *et*

al., 2014). Sin embargo, hasta antes de este trabajo, no existía evidencia de que dicha regulación estuviera mediada también a través de los miRNAs.

La mayoría de los miRNAs cuentan con secuencias regulatorias propias y sufren de modificaciones post-transcripcionales (Krol *et al.*, 2004; Mahony *et al.*, 2007; Hinske *et al.*, 2010), como los genes codificantes de proteína, por lo que podemos sugerir que los mecanismos de acción de los metales antes mencionados pueden estarse aplicando para inducir la expresión de dichos RNAs pequeños.

El análisis predictivo en IPA, utilizando los datos de los mRNAs sub-expresados, puntualizó la afectación de varias funciones celulares cuando los fibroblastos son tratados con la mezcla de metales (figura 6), coincidiendo con la disrupción de proliferación y muerte celulares, así como con el desarrollo de enfermedades respiratorias, neuronales y cáncer que han sido ya relacionadas con la exposición a dicha mezcla (ATSDR, 2004; Reichard *et al.*, 2007; Beyersmann y Hartwig, 2008; Salnikow y Zhitkovich, 2008; Hernández-Franco *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2011; Jomova y Valko, 2011; Prüss-Ustün *et al.*, 2011; Silva-Aguilar *et al.*, 2011; Sánchez-Valle *et al.*, 2013; Brocato y Acosta, 2013; Henn *et al.*, 2014; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014). Por lo que podemos decir que los efectos de estos metales pueden estarse ejerciendo a través de la sub-expresión génica que observamos.

Por otro lado, realizando el análisis en IPA con los miRNAs que resultaron sobre-expresados, se logró identificar la disrupción de los procesos de desarrollo, proliferación, movimiento y muerte celulares (figura 8), lo cual se ha visto relacionado anteriormente con la exposición a la mezcla de metales (ATSDR, 2004; Henn *et al.*, 2014; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014). Y dentro de las enfermedades predichas

encontramos a las de tipo respiratorio, neuronales, inmunológicas, cardiovasculares, diabetes y cáncer (figura 8), las cuales también han sido previamente asociadas a la mezcla (ATSDR, 2004; Reichard *et al.*, 2007; Beyersmann y Hartwig, 2008; Hou *et al.*, 2011; Jomova y Valko, 2011; Prüss-Ustün *et al.*, 2011; Brocato y Acosta, 2013; Henn *et al.*, 2014). Estos resultados indicarían que los metales ejercen sus efectos también a través de la modulación de la expresión de los miRNAs.

Mas interesante aún, el hecho de que ambos perfiles de expresión predigan el desbalance de procesos celulares y desarrollo de enfermedades que se han visto ya como consecuencia de la exposición a As, Cd y Pb, sugiere que existe una relación estrecha entre ambos tipos de RNA donde, según los mecanismos de acción de estos RNAs pequeños (Krol *et al.*, 2010; Pasquinelli, 2012; Dong *et al.*, 2013; Tétreault y De Guire, 2013; Valinezhad Orang *et al.*, 2014), la sobre-expresión de cierto miRNA induce la sub-expresión de sus mRNAs blanco. Para nutrir esta propuesta, realizamos una investigación bibliográfica que nos permitió identificar a la respuesta inflamatoria (Izzotti *et al.*, 2011; Ooi *et al.*, 2012), al cáncer (Varnholt, 2008; Chira *et al.*, 2010; Lund, 2010; Tian *et al.*, 2010; Catto *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2011; Poláková *et al.*, 2011; Nishikawa *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012), a la inhibición de muerte celular (Xiao *et al.*, 2011; Zhu y Fan, 2012) y a la inducción de proliferación (Poy *et al.*, 2009; Simonini *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012;) como las funciones y enfermedades desencadenadas por la sobre-expresión de miR-10, -133, -154, -204, -222, -375 y -379 (figura 10). Dichos miRNAs se encuentran sobre-expresados en nuestro arreglo de qRT-PCR (figura 9), por lo que regularían de manera negativa la expresión de los genes (mRNAs) BZW1, EPX, ITGB3,

KPNA1, LAMC1 y TRIM23 (figura 12), la cual se ve inhibida en nuestros experimentos de microarreglos (figura 11).

Con la finalidad de dar contundencia a nuestros resultados, utilizamos las bases de datos disponibles en miRWalk para identificar a los mRNAs sub-expresados que han sido predichos para ser regulados de manera directa y negativa por parte de miR-10, -101-3p, -133, -222 y -375 (tabla 1), y comprobamos que nuestros resultados concuerdan con estas predicciones.

Además, tomamos esos cinco miRNAs y la población de mRNAs mensajeros que encontramos sub-expresados y, realizando un análisis en dichas bases de datos (miRWalk), identificamos como predichos y/o validados a un total de 42 genes (tabla 2), hecho que añade robustez a nuestras predicciones.

Por último, tomamos la lista de los cinco miRNAs con mayores niveles de expresión (miR-10, -101-3p, -133, -222 y -375) y los 42 genes sub-expresados (tabla 2), y los sometimos a un análisis en IPA. Obtuvimos que la combinación de ambos patrones de expresión predice la inducción de proliferación y la inhibición de muerte celular, y el establecimiento y desarrollo de enfermedades respiratorias y cáncer (figura 13), efectos que, nuevamente, se han asociado ya a la exposición a la mezcla de As, Cd y Pb (ATSDR, 2004; Reichard *et al.*, 2007; Beyersmann y Hartwig, 2008; Hou *et al.*, 2011; Jomova y Valko, 2011; Prüss-Ustün *et al.*, 2011; Brocato y Acosta, 2013; Henn *et al.*, 2014; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014).

Debido a que el As y Pb son considerados como mutágenos débiles, las mutaciones en el DNA pueden explicar solo una pequeña proporción de los cambios en los procesos celulares y enfermedades (Arita y Costa, 2009; Hou *et al.*, 2011; Salnikow y Zhitkovich,

2008). Esto, aunado a los resultados que obtuvimos, nos permite proponer a los miRNAs como reguladores paralelos que inducen los efectos ejercidos por la mezcla de metales, a través de la inhibición de la expresión de ciertos mRNAs, pues la alteración en ambos tipos de moléculas lleva a las mismas consecuencias biológicas.

Nuestros resultados, y la literatura que los respalda, nos llevan a identificar la gran importancia de los miRNAs en la toxicología de metales y a señalarlos como un mecanismo de acción clave de los efectos que ejercen. Además, podemos dejar en evidencia que la identificación de los patrones de expresión de mRNAs y miRNAs es necesaria para determinar el riesgo de las poblaciones ocupacionalmente expuestas y prevenir enfermedades degenerativas. Sin embargo, es necesario el estudio a profundidad del desbalance en la expresión génica orquestado por miRNAs en el desarrollo de las mismas, especialmente del cáncer.

Con los resultados que obtuvimos hasta ese momento, determinamos que el cáncer es la principal enfermedad que puede desencadenarse por la exposición a la mezcla de metales e identificamos al oncomiRNA miR-222 como regulador común de los procesos de inflamación y proliferación celular, los cuales están estrechamente relacionados con la enfermedad. Pero el análisis completo en IPA del perfil de expresión de mRNAs (tabla 3) predijo la afectación de otros procesos celulares clave como la reparación del DNA, cuya disrupción es un evento esencial en la etapa de iniciación de los procesos carcinogénicos (Hoeijmakers, 2001; Hanahan y Weinberg, 2011; Dietlein *et al.*, 2014). Por lo tanto, decidimos evaluar el papel que juega miR-222 en el silenciamiento del gen Rad51c, quien es esencial en la vía de reparación del DNA por HRR y cuya disrupción puede llevar a la generación de mutaciones y así desencadenar la etapa de iniciación

de la transformación celular de la línea BALB/c-3T3 inducida por la exposición a la mezcla de metales, y los resultados se discuten a continuación.

Se sabe muy poco acerca de los mecanismo por los cuales se induce la transcripción de los miRNAs bajo cierto estímulo y se sabe aún menos de cómo los metales son capaces de provocarla, de hecho, hasta la fecha existen solamente correlaciones entre la exposición y los niveles elevados de dichos RNAs pequeños (Lukiw y Pogue, 2007; Palmieri *et al.*, 2008; Pogue *et al.*, 2009; Bollati *et al.*, 2010; Krol *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2011; Farraj *et al.*, 2011; Huntzinger and Izaurralde, 2011; Lukiw *et al.*, 2011; Fabbri *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2012; Shan *et al.*, 2013; An *et al.*, 2014; Jeon *et al.*, 2014; Ji *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014; Lou *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2015). Sin embargo, nuestro descubrimiento sobre la habilidad de la mezcla de metales para inducir la expresión de miR-222 durante la iniciación de la carcinogénesis (figura 14) puede explicarse, en parte, por la basta evidencia que describe que los metales pueden inducir la expresión de mRNAs. Algunos de los mecanismos reconocidos incluyen la mutación génica, des-regulación de factores de transcripción y de la señalización celular, y eventos epigenéticos (Madden, 2003; ATSDR, 2004; Yang *et al.*, 2004; Salnikow y Zhitkovich, 2008; Wang y Fowler, 2008; Arita y Costa, 2009; Hou *et al.*, 2011; Henn *et al.*, 2014). Debido a que el contexto genómico de miR-222 es intergénico y, por lo tanto, posee secuencias regulatorias propias (Ozsolak *et al.*, 2008), y ya que este tipo de miRNA se comporta como los genes que codifican proteínas (Mahony *et al.*, 2007), podemos sugerir que los metales pueden estarlo regulando a través de los mecanismos por los cuales regulan la expresión de mRNAs. Por ejemplo, el Cd favorece la señalización por MAPKs (cinasas activadas por mitógenos) (Jonak *et al.*,

2004) y se sabe que dicha señalización induce la transcripción del gen de miR-222 (Cardinali *et al.*, 2009).

En este estudio observamos la disminución en los niveles de mRNA (figura 15) y de la proteína (figura 16) de Rad51c en la células tratadas con la mezcla de metales, resultados que son consistentes con la literatura que demuestra que el As y el Pb inhiben la reparación de RCDs por HRR a través de Rad51 (Beyersmann y Hartwig, 2008; Kryeziu *et al.*, 2013). Además, demostramos que miR-222 es regulador negativo directo de Rad51c y que esto es a través de la unión complementaria del mismo con la 3'UTR del gen, como se observó en el ensayo de luciferasa (figura 17), confirmando así nuestras predicciones *in silico* y validando un nuevo blanco para dicho RNA pequeño.

Cuando tomamos el sistema de regulación miR-222/Rad51c, es decir en ausencia del estímulo con la mezcla de metales y manipulando la expresión del miRNA (figura 20) sin comprometer la viabilidad celular (figura 19), identificamos la importancia específica de esa expresión. Observamos un decremento notable en la expresión génica y proteica de Rad51c (figuras 21 y 22, respectivamente) en la células transfectadas con el pre-miR-222 permitiéndonos concluir que este miRNA tiene sobre Rad51c los mismos efectos que la mezcla de metales. Como esperábamos, la transfección con el anti-miR-222 no indujo cambios en la expresión del mRNA (figura 21) pero si provocó la inhibición a nivel de proteína (figura 22). Este resultados es difícil de explicar, pero podemos especular que la sub-expresión del miRNA podría provocar la disrupción de varios genes y funciones celulares, incluyendo la activación de la ubiquitina o miembros del proteosoma que puedan afectar a Rad51c y otros genes (Bennett y Knight, 2005),

pero estamos conscientes de que se necesitan mas estudios para responder a esta incógnita en específico.

Después de confirmar la sobre-expresión de miR-222 y la sub-expresión de Rad51c, probamos la reparación del DNA mediada por HRR en las células Balb/3T3 bajo estas condiciones, induciendo RCDs con radiación gamma e identificando la presencia o ausencia de los mismos a los 5 min, 1 h y 24 h post-irradiación (tablas 4 y 5). Pudimos observar un incremento en el daño al DNA a los 5 min, 1 h y 24 h post-irradiación (condiciones 3Gy, 1h Post-3Gy 24 h Post-3Gy) en las células retadas con dicha radiación, por lo que el reto de radiación gamma fue considerado como un control positivo adecuado de la inducción de RCDs y de la técnica. Dicho incremento en el daño se obtuvo también en aquellas células que sobre-expresan miR-222 (condiciones experimentales Pre-miR-222, Pre-miR-222 – 3Gy y Pre-miR-222- 24h Post-3Gy) (con respecto al agente de transfección (siPORT)) y esto concuerda con que en dicha condición hay una inhibición de la expresión de Rad51c (como lo observamos en los ensayos de inmunoblot) mediada por este RNA pequeño (como lo observamos en el ensayo de luciferasa), lo cual indicaría la atenuación de la reparación de RCDs del DNA a través el mecanismo de HRR. Esta hipótesis se ve respaldada por los resultados obtenidos con las células que no expresan a miR-222 donde no hay inducción de daño (con respecto al siPORT), pues en estas condiciones no hay un efecto negativo del miRNA sobre la expresión de Rad51c (como se observa en los ensayos de inmunoblot) y se permitiría así la reparación por HRR de manera adecuada.

Cabe mencionar que el incremento de daño a las 24 h post-irradiación podría estar reflejando el daño al DNA no reparado una vez que las células han sufrido por lo menos

un ciclo de división (de acuerdo con la información provista por la ATCC para la clona A31-1-1), lo cual es consistente con el hecho de que la inestabilidad genómica es requerida para la iniciación de la carcinogénesis.

Estos resultados indican que dicho RNA pequeño juega un papel determinante en la iniciación del proceso de transformación al inducir la atenuación del mecanismo de reparación mediado por HRR, pues esto puede llevar a la acumulación de daño e inestabilidad genómica características de dicha fase de la carcinogénesis (Hoeijmakers, 2001; Hanahan y Weinberg, 2011; Dietlein *et al.*, 2014).

Finalmente necesitábamos elucidar si los efectos de miR-222 son relevantes o no en el proceso de la transformación celular medido por los cambios celulares morfológicos y la formación de *foci* en el modelo Balb/3T3 (Silva-Aguilar *et al.*, 2011; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014), donde se observa que dicho fenómeno ocurre en el día 16 del ensayo de 25 días. Cuando reemplazamos la mezcla de metales por la administración de la molécula precursora de miR-222 (pre-miR-222) como estímulo iniciador y/o promotor, y comparamos la formación de *foci* entre condiciones, vimos que el pre-miR-222 como iniciador (usado con el promotor TPA (Tsuchiya y Umeda, 1997)) acelera el proceso de transformación y genera *foci* en el día 13 del ensayo (72 h antes de lo observado con la mezcla de metales (Silva-Aguilar *et al.*, 2011; Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014)) (figura 23), además de provocar el incremento en el número de los mismos (figura 24). La transfección con el pre-miR-222 también aumenta el número de *foci* cuando es usado como promotor de las células iniciadas con pre-miR-222, pero no lo hace cuando se usa como promotor en células iniciadas con MNNG (iniciador conocido (Tsuchiya y Umeda, 1997)) (figura 24), resultados que concuerdan con trabajos previos de nuestro

laboratorio donde se observa que cuando la mezcla de metales es utilizada como estímulo promotor (en células iniciadas con MNNG) no induce la transformación celular (Rodríguez-Sastre *et al.*, 2014). Por lo tanto, podemos confirmar que la sobre-expresión de miR-222 durante la iniciación tiene consecuencias determinantes en el proceso de la carcinogénesis final.

En conjunto, nuestros resultados nos llevaron a reconocer a Rad51c como blanco directo de miR-222, interacción que no había sido descrita hasta antes de este trabajo; además, indican que miR-222 actúa como iniciador del proceso carcinogénico y, por lo tanto, juega un papel esencial en el desarrollo del cáncer y no es solamente un marcador de la enfermedad ya establecida, papel que se la ha atribuido, de manera indirecta además, hasta el momento (Manikandan *et al.*, 2008; Pineau *et al.*, 2010; Puerta-Gil *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2013). Podemos decir entonces que esta investigación contribuye al entendimiento de la etiología de la enfermedad.

8. CONCLUSIONES

- La mezcla de As, Cd y Pb provocó cambios en los patrones de expresión de los mRNAs y miRNAs en las células Balb/3T3 que al ser analizados por separado permitieron predecir la alteración de los procesos de proliferación y muerte celular, así como el desarrollo de cáncer, enfermedades respiratorias y desórdenes neurológicos, por lo que se puede decir que los cambios en ambos perfiles tienen los mismos efectos biológicos y están relacionados entre sí.
- Los patrones de expresión, al ser combinados, predicen la alteración de la proliferación y muerte celular, así como el desarrollo del cáncer, efectos que han sido relacionados anteriormente con la exposición a dichos metales.
- Los análisis bioinformáticos nos permitieron señalar a los miRNAs como posibles determinantes de los cambios en la expresión de los mRNAs, ayudando a explicar mecanismos moleculares de la toxicología de metales complementarios a los ya existentes.
- Junto con el respaldo y confirmación que nos brinda la literatura, este estudio demuestra la importancia de los miRNAs en las funciones celulares clave mediante la modulación de un pequeño grupo de genes, incluso sin haber considerado el efecto de la población total de miRNAs que se vieron sobre-expresados bajo la exposición a la mezcla de metales.
- La mezcla de metales provoca la sub-expresión de Rad51c durante la fase de iniciación de la carcinogénesis y esto es atribuible a la sobre-expresión de miR-

222 que, como demostramos, regula de manera directa y negativa la expresión de dicho gen.

- La inhibición de Rad51c dada por miR-222 atenúa la reparación de daño al DNA (RCDs) mediada por la HRR, generando y manteniendo el ambiente de inestabilidad genómica que lleva a la iniciación del proceso de carcinogénesis.
- *Per se*, la sobre-expresión de miR-222 durante la iniciación acelera la transformación celular e incrementa el número de *foci* al final del proceso, lo que sugiere a miR-222 como iniciador de la carcinogénesis.
- Es evidente la necesidad de la evaluación de la expresión de mRNAs y miRNAs para determinar el riesgo del desarrollo del cáncer en las poblaciones expuestas a la mezcla de As, Cd y Pb.
- Con estos hallazgos, la presente investigación contribuye al entendimiento de la toxicología molecular de los metales y la etiología del cáncer.

LITERATURA CITADA

- Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**, 350–5 (2004).
- An, J. *et al.* The changes of miRNA expression in rat hippocampus following chronic lead exposure. *Toxicol. Lett.* **229**, 158–66 (2014).
- Arita, A. & Costa, M. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium. *Metallomics* **1**, 222–8 (2009).
- Ashok, A., Rai, N. K., Tripathi, S. & Bandyopadhyay, S. Exposure to As-, Cd-, and Pb-Mixture Induces A β , Amyloidogenic APP Processing and Cognitive Impairments via Oxidative Stress-Dependent Neuroinflammation in Young Rats. *Toxicol. Sci.* **143**, 64–80 (2015).
- ATSDR. Interaction profile for: Arsenic, cadmium, chromium, and lead. U. S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 181 pp (2004).
- ATSDR. Toxicological profile for cadmium. U. S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 512 pp (2008).
- ATSDR. Toxicological profile for lead. U. S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 582 pp (2007).
- Bae, D.-S., Gennings, C., Carter, W., Yang, R. & Campaign, J. Toxicological Interactions among Arsenic, Cadmium, Chromium, and Lead in Human Keratinocytes. *Toxicol Sci.* **63**, 132–42 (2001).
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *R Stat Soc Series B* **57**, 289–300 (1995).
- Bennett, B. & Knight, K. Cellular localization of human Rad51C and regulation of ubiquitin-mediated proteolysis of Rad51. *J. Cell. Biochem.* **96**, 1095–109 (2005).
- Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C. & Leslie, C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.* **11**, R90 (2010).
- Beyersmann, D. & Hartwig, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch. Toxicol.* **82**, 493–512 (2008).
- Bindra, R. *et al.* Down-Regulation of Rad51 and Decreased Homologous Recombination in Hypoxic Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 8504–18 (2004).
- Bollati, V. *et al.* Exposure to Metal-Rich Particulate Matter Modifies the Expression of Candidate MicroRNAs in Peripheral Blood Leukocytes. *Environ. Health Perspect.* **118**, (2010).
- Bolt, H. M. Current research trends on arsenic toxicology. *Arch. Toxicol.* **87**, 925–6 (2013).
- Bottai, G., Pasculli, B., Calin, G. A. & Santarpia, L. Targeting the microRNA-regulating DNA damage/repair pathways in cancer. *Expert Opin Biol Ther* **14**, 1667–83 (2014).
- Brocato, J. & Costa, M. Basic mechanics of DNA methylation and the unique landscape of the DNA methylome in metal-induced carcinogenesis. *Crit. Rev. Toxicol.* **43**, 493–514 (2013).

- Cao, Y. *et al.* MicroRNA-dependent regulation of PTEN after arsenic trioxide treatment in bladder cancer cell line T24. *Tumour Biol.* **32**, 179–88 (2011).
- Cardinali, B. *et al.* MicroRNA-221 and MicroRNA-222 Modulate Differentiation and Maturation of Skeletal Muscle Cells. *PLoS ONE* **4**, (2009).
- Carvalho, J. F. & Kanaar, R. Targeting homologous recombination-mediated DNA repair in cancer. *Expert. Opin. Ther. Targets.* **18**, 427-58 (2014).
- Catto, J. *et al.* MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *Eur. Urol.* **59**, 671–81 (2011).
- Cerbinskaite, A., Mukhopadhyay, A., Plummer, E., Curtin, N. & Edmondson, R. Defective homologous recombination in human cancers. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 89–100 (2012).
- Chira, P., Vareli, K., Sainis, I., Papandreou, C. & Briasoulis, E. Alterations of MicroRNAs in Solid Cancers and Their Prognostic Value. *Cancers* **2**, (2010).
- Crosby, M., Glazer, P. & Ivan, M. 'Micro'-management of DNA repair genes by hypoxia. *Cell Cycle* **8**, 4009–10 (2009).
- Di Francesco, A. *et al.* The DNA-damage response to γ -radiation is affected by miR-27a in A549 cells. *Int J Mol Sci* **14**, 17881–96 (2013).
- Dietlein, F., Thelen, L. & Reinhardt, H. Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. *Trends in Genetics* **30**, (2014).
- Di Leva, G., Garofalo, M. & Croce, C. M. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* **9**, 287–314 (2014).
- Dias, F. *et al.* Renal cell carcinoma development and miRNAs: a possible link to the EGFR pathway. *Pharmacogenomics.* **14**, 1793-803 (2013).
- Dong, H. *et al.* MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis. *Chem. Rev.* **113**, 6207–33 (2013).
- Duffus, J. Heavy metals – A meaningless term?. *Pure Appl. Chem.* **74**, 793-807 (2002).
- Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P. & Gretz, N., miRWalk - database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of 3 genomes. *J. Biomed. Inform.* (2011).
- Eppig, J.T. *et al.* The Mouse Genome Database (MGD): comprehensive resource for genetics and genomics of the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res.* **40**, D881–6 (2012).
- Fabbri, M., Urani, C., Sacco, M. G., Procaccianti, C. & Gribaldo, L. Whole genome analysis and microRNAs regulation in HepG2 cells exposed to cadmium. *ALTEX* **29**, 173–82 (2012).
- Farraj, A. *et al.* ST Depression, Arrhythmia, Vagal Dominance, and Reduced Cardiac Micro-RNA in Particulate-Exposed Rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* **44**, 185-96 (2011).
- Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 229–57 (2008).
- Fowler, B. A., Whittaker, M. H., Lipsky, M., Wang, G. & Chen, X.-Q. Q. Oxidative stress induced by lead, cadmium and arsenic mixtures: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats: an overview. *Biometals* **17**, 567-8 (2004).
- Fu, S. W., Chen, L. & Man, Y.-G. G. miRNA Biomarkers in Breast Cancer Detection and Management. *J Cancer* **2**, 116–22 (2011).
- Gasparini, P. *et al.* Protective role of miR-155 in breast cancer through RAD51 targeting

- impairs homologous recombination after irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 4536-41 (2014).
- Gomes, A., Nolasco, S. & Soares, H. Non-Coding RNAs: Multi-Tasking Molecules in the Cell. *Int J Mol Sci* **14**, (2013).
- Guirouilh-Barbat, J., Lambert, S., Bertrand, P. & Lopez, B. Is homologous recombination really an error-free process? *Front. Genet.* **5**, (2014).
- Hanahan, D. & Weinberg, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, (2011).
- Hartwig, A. Cadmium and cancer. *Met Ions Life Sci* **11**, 491–507 (2013).
- Hatano, K. *et al.* A functional screen identifies miRNAs that inhibit DNA repair and sensitize prostate cancer cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res.* (2015). doi:10.1093/nar/gkv273.
- He, X. *et al.* MiR-218 regulates cisplatin chemosensitivity in breast cancer by targeting BRCA1. *Tumour Biol.* **36**, 2065–75 (2015).
- Hegre, S. *et al.* Multiple microRNAs may regulate the DNA repair enzyme uracil-DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst.)* **12**, 80–6 (2013).
- Helleday, T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis* **31**, 955–60 (2010).
- Hengstler, J. G. *et al.* Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis* **24**, 63–73 (2003).
- Henn, B., Coull, B. & Wright, R. Chemical mixtures and children's health. *Current Opinion in Pediatrics* **26**, 223 (2014).
- Hernández-Franco, P., Silva, M., Valverde, M. & Rojas, E. Induction of oxidative stress by low doses of lead in human hepatic cell line WRL-68. *Biometals* **24**, 951–8 (2011).
- Hinske, L. C., Galante, P. A., Kuo, W. P. & Ohno-Machado, L. A potential role for intragenic miRNAs on their hosts' interactome. *BMC Genomics* **11**, 533 (2010).
- Hoeijmakers, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366–74 (2001).
- Hosoya, N. & Miyagawa, K. Targeting DNA damage response in cancer therapy. *Cancer Sci* **105**, 370–88 (2014).
- Hou, L., Wang, D. & Baccarelli, A. Environmental chemicals and microRNAs. *Mutat. Res.* **714**, 105–12 (2011).
- <http://www.ifc.unam.mx/genarise>. GenArise microarray analysis tool. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
- Hu, H. & Gatti, R. MicroRNAs: new players in the DNA damage response. *J Mol Cell Biol* **3**, 151–8 (2011).
- Huang, S. & He, X. microRNAs: tiny RNA molecules, huge driving forces to move the cell. *Protein Cell* **1**, 916–26 (2010).
- Huang, J. *et al.* Systematic Screen Identifies miRNAs That Target RAD51 and RAD51D to Enhance Chemosensitivity. *Molecular Cancer Research* **11**, 1564-73 (2013).
- Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 99–110 (2011).
- 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.* **45**, 2395-99 (1985).
- Izzotti, A. *et al.* Interplay between histopathological alterations, cigarette smoke and chemopreventive agents in defining microRNA profiles in mouse lung. *Mutat. Res.* **717**, 17–24 (2011).
- Jansson, M. D. & Lund, A. H. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol* **6**, 590–610 (2012).
- Jasin, M. & Rothstein, R. Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a012740 (2013).
- Jeon, E. S. *et al.* Cobalt chloride induces neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells through upregulation of microRNA-124a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **444**, 581–7 (2014).
- Ji, H. *et al.* Inhibition of transforming growth factor beta/SMAD signal by MiR-155 is involved in arsenic trioxide-induced anti-angiogenesis in prostate cancer. *Cancer Sci.* **105**, 1541–9 (2014).
- Jiang, F. *et al.* Inhibition of TGF- β /SMAD3/NF- κ B signaling by microRNA-491 is involved in arsenic trioxide-induced anti-angiogenesis in hepatocellular carcinoma cells. *Toxicol. Lett.* **231**, 55–61 (2014).
- Jomova, K. & Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* **283**, 65–87 (2011).
- Jonak, C., Nakagami, H. & Hirt, H. Heavy Metal Stress. Activation of Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium. *PLANT PHYSIOLOGY* **136**, 3276–83 (2004).
- Jovanovic, M. & Hengartner, M. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene* **25**, 6176–87 (2006).
- Kapushesky, M. *et al.* Gene expression atlas at the European bioinformatics institute. *Nucleic Acids Res.* **38**, D690-8 (2010).
- Keil, D., Berger-Ritchie, J. & McMillin, G. Testing for Toxic Elements: A Focus on Arsenic, Cadmium, Lead, and Mercury. *Laboratory Medicine* **42**, 735–42 (2011).
- Kong, A. *et al.* Associations between microRNA (miR-21, 126, 155 and 221), albuminuria and heavy metals in Hong Kong Chinese adolescents. *Clin. Chim. Acta* **413**, 1053–7 (2012).
- Koppe, J. *et al.* Exposure to multiple environmental agents and their effect. *Acta Paediatrica* **95**, 106–13 (2006).
- Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **39**, D152–7 (2011).
- Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 597–610 (2010).
- Krol, J. *et al.* Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design. *J. Biol. Chem.* **279**, 42230–9 (2004).
- Kryeziu, K. *et al.* Synergistic anticancer activity of arsenic trioxide with erlotinib is based on inhibition of EGFR-mediated DNA double-strand break repair. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 1073–84 (2013).
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–54 (1993).

- Leonard, S., Harris, G. & Shi, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* **37**, 1921-42 (2004).
- Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* **120**, 15-20 (2005).
- Li, G., Luna, C., Qiu, J., Epstein, D. & Gonzalez, P. Role of miR-204 in the regulation of apoptosis, endoplasmic reticulum stress response, and inflammation in human trabecular meshwork cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 2999–3007 (2011).
- Li, Y. *et al.* miR-3940-5p associated with genetic damage in workers exposed to hexavalent chromium. *Toxicol. Lett.* **229**, 319–26 (2014).
- Liu, J., Goyer, R. A. & Waalkes, M. P. Toxic effects of metals. En: Klaassen CD, ed. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 7th ed. New York, NY: McGraw-Hill:931-80 (2008).
- Livak, K. & Schmittgen, T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**, (2001).
- Luo, F. *et al.* MicroRNA-21, up-regulated by arsenite, directs the epithelial-mesenchymal transition and enhances the invasive potential of transformed human bronchial epithelial cells by targeting PDCD4. *Toxicol. Lett.* **232**, 301–9 (2014).
- Lu, M. *et al.* An Analysis of Human MicroRNA and Disease Associations. *PLoS ONE* **3**, (2008).
- Lu, Y.-C. *et al.* Oncogenic function and early detection potential of miRNA-10b in oral cancer as identified by microRNA profiling. *Cancer Prev Res (Phila)* **5**, 665–74 (2012).
- Lukiw, W. & Pogue, A. Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROS-generating metal sulfates in primary human brain cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* **101**, 1265-9 (2007).
- Lukiw, W. J., Dua, P., Pogue, A. I., Eicken, C. & Hill, J. M. Upregulation of micro RNA-146a (miRNA-146a), a marker for inflammatory neurodegeneration, in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) and Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) syndrome. *J. Toxicol. Environ. Health. Part A* **74**, 1460-8 (2011).
- Lund, A.H. miR-10 in development and cancer. *Cell Death Differ.* **17**, 209–214 (2010).
- Madden, E.F. The role of combined metal interactions in metal carcinogenesis: a review. *Rev. Environ. Health* **18**, 91–109 (2003).
- Mahony, S., Corcoran, D., Feingold, E. & Benos, P. Regulatory conservation of protein coding and microRNA genes in vertebrates: lessons from the opossum genome. *Genome Biol* **8**, R84 (2007).
- Manikandan, J., Aarthi, J. J., Kumar, S. D. & Pushparaj, P. N. Oncomirs: the potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer. *Bioinformatics.* **8**, 330-4 (2008).
- Martínez-Pacheco, M., Hidalgo-Miranda, A., Romero-Córdoba, S., Valverde, M. & Rojas, E. mRNA and miRNA expression patterns associated to pathways linked to metal mixture health effects. *Gene* **533**, 508-14 (2014).
- Merzenich, H. *et al.* Biomonitoring on carcinogenic metals and oxidative DNA damage in a cross-sectional study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **10**, 515-22 (2001).
- Moskwa, P. *et al.* miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and

- sensitivity to PARP inhibitors. *Mol. Cell* **41**, 210–20 (2011).
- Muenyi, C. et al. Sodium arsenite and hyperthermia modulate cisplatin-DNA damage responses and enhance platinum accumulation in murine metastatic ovarian cancer xenograft after hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). *J Ovarian Res* **4**, 9 (2011).
- Mumtaz, M., Rosa, C., Cibulas, W. & Falk, H. Seeking solutions to chemical mixtures challenges in public health. *Environ Toxicol Pharmacol* **18**, 5563 (2004).
- Nishikawa, E. et al. miR-375 Is Activated by ASH1 and Inhibits YAP1 in a Lineage-Dependent Manner in Lung Cancer. *Cancer Res.* **71**, 6165–73 (2011).
- Olive, P. L. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Rad. Biol.* **75**, 395-405 (1999).
- Ooi, A. et al. Identification of an interleukin 13-induced epigenetic signature in allergic airway inflammation. *Am J Transl Res* **4**, 219–28 (2012).
- Ozsolak, F. et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* **22**, 3172–83 (2008).
- Palmieri, A. et al. Short-period Effects of Zirconia and Titanium on Osteoblast MicroRNAs. *Clin Implant Dent Relat Res* **10**, 200–5 (2008).
- Palus, J. et al. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat Res.* **540**, 19–28 (2003).
- Pasquinelli, A. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 271–82 (2012).
- Pelttari, L. et al. Screening of Finnish RAD51C founder mutations in prostate and colorectal cancer patients. *BMC Cancer* **12**, 552 (2012).
- Persidsky, M. D. & Baillie, G. S. Fluorometric test of cell membrane integrity. *Cryobiology* **14**, 322–31 (1977).
- Pimparkar, B. D. & Bhawe, A. Arsenicosis: review of recent advances. *J Assoc Physicians India* **58**, 617–24 (2010).
- Pineau, P. et al. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 264–9 (2010).
- Pogue, A. I. et al. Characterization of an NF-kappaB-regulated, miRNA-146a-mediated down-regulation of complement factor H (CFH) in metal-sulfate-stressed human brain cells. *J. Inorg. Biochem.* **103**, 1591–5 (2009).
- Poláková, K. et al. Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets. *Mol. Cancer* **10**, 41 (2011).
- Poy, M. N. et al. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 5813–8 (2009).
- Puerta-Gil, P. et al. miR-143, miR-222, and miR-452 are useful as tumor stratification and noninvasive diagnostic biomarkers for bladder cancer. *Am. J. Pathol.* **180**, 1808-15 (2012).
- Rani, A., Kumar, A., Lal, A. & Pant, M. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International Journal of Environmental Health Research* **24**, 378-99 (2013).
- Reichard, J. F., Schnekenburger, M. & Puga, A. Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 188–92 (2007).
- Ren, X. et al. Arsenic responsive microRNAs in vivo and their potential involvement in

- arsenic-induced oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **283**, 198–209 (2015).
- Rodriguez-Sastre, M., Rojas, E. & Valverde, M. Assessing the impact of As-Cd-Pb metal mixture on cell transformation by two-stage Balb/c 3T3 cell assay. *Mutagenesis* **29**, 251-7 (2014).
- Rohrbeck, A. *et al.* Toxicogenomics Applied to In Vitro Carcinogenicity Testing with Balb/c 3T3 Cells Revealed a Gene Signature Predictive of Chemical Carcinogens. *Toxicol. Sci.* **118**, 31–41 (2010).
- Rojas, E., Lopez, M. & Valverde, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **722**, 225-54 (1999).
- Roney, N. & Colman, J. Interaction profile for lead, manganese, zinc, and copper. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **18**, 231–4 (2004).
- Rottiers, V. & Näär, A. M. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 239-50 (2012).
- Ruan, K., Fang, X. & Ouyang, G. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett.* **285**, 116–26 (2009).
- Safran, M. *et al.* GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database (Oxford)* (2010).
- Salnikow, K. & Zhitkovich, A. Genetic and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic, and Chromium. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 2844 (2008).
- Sánchez-Valle, V. *et al.* A metal mixture induces transformation upon antioxidant depletion in a hepatic cell line. *Ann Hepatol* **12**, 315–24 (2013).
- Santarpia, L., Nicoloso, M. & Calin, G. MicroRNAs: a complex regulatory network drives the acquisition of malignant cell phenotype. *Endocr. Relat. Cancer* **17**, F51–75 (2010).
- Scheckenbach, K. *et al.* RAD51C--a new human cancer susceptibility gene for sporadic squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *Oral Oncol.* **50**, 196-9 (2014).
- Shan, H. *et al.* Upregulation of microRNA-1 and microRNA-133 contributes to arsenic-induced cardiac electrical remodeling. *Int. J. Cardiol.* **167**, 2798–2805 (2013).
- Silins, I. & Högberg, J. Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *Int J Environ Res Public Health* **8**, 629-47 (2011).
- Silva-Aguilar, M., Emilio, R. & Mahara, V. Role of Oxidative Stress in Transformation Induced by MetalMixture. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2011**, (2011).
- Simonini, P. *et al.* Epigenetically Deregulated microRNA-375 Is Involved in a Positive Feedback Loop with Estrogen Receptor α in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **70**, 9175–84 (2010).
- Singh, B. & Arlinghaus, R.B. Mos and the cell cycle. *Prog. Cell Cycle Res.* **3**, 251–9 (1997).
- Song, L. *et al.* Up-regulation of miR-1245 by c-myc targets BRCA2 and impairs DNA repair. *J Mol Cell Biol* **4**, 108–17 (2012).
- Sun, C. *et al.* miR-9 regulation of BRCA1 and ovarian cancer sensitivity to cisplatin and PARP inhibition. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1750-8 (2013).
- Tan, X. *et al.* miR-638 mediated regulation of BRCA1 affects DNA repair and sensitivity to UV and cisplatin in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* **16**, 435

- (2014).
- Tessitore, A. *et al.* MicroRNAs in the DNA Damage/Repair Network and Cancer. *Int J Genomics* **2014**, 820248 (2014).
- Tétreault, N. & Guire, V. miRNAs: their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clin. Biochem.* **46**, 842–5 (2013).
- Tian, Y. *et al.* MicroRNA-10b Promotes Migration and Invasion through KLF4 in Human Esophageal Cancer Cell Lines. *J. Biol. Chem.* **285**, 7986–94 (2010).
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 4350–4 (1979).
- Treas, J., Tyagi, T. & Singh, K. Chronic exposure to arsenic, estrogen, and their combination causes increased growth and transformation in human prostate epithelial cells potentially by hypermethylation - mediated silencing of MLH1. *Prostate* **73**, 1660–72 (2013).
- Tsuchiya, T. & Umeda, M. Relationship between exposure to TPA and appearance of transformed cells in MNNG-initiated transformation of BALB/c 3T3 cells. *Int. J. Cancer* **73**, 271–6 (1997).
- 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.* **84**, 344–51 (2005).
- Valeri, N. *et al.* MicroRNA-21 induces resistance to 5-fluorouracil by down-regulating human DNA MutS homolog 2 (hMSH2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 21098–103 (2010b).
- Valeri, N. *et al.* Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 6982–7 (2010a).
- Valinezhad Orang, A., Safaralizadeh, R. & Kazemzadeh-Bavili, M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics* 2014, ID 97607 (2014).
- Varnholt, H. The role of microRNAs in primary liver cancer. *Ann Hepatol* **7**, 104–13 (2008).
- Vidigal, J. A. & Ventura, A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol.* **25**, 137–47 (2015).
- Wang, X. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA* **14**, 1012-7 (2008).
- Wang, G. & Fowler, B. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **233**, 92–9 (2008).
- Wang, Y., Huang, J.-W., Calses, P., Kemp, C. & Taniguchi, T. MiR-96 Downregulates REV1 and RAD51 to Promote Cellular Sensitivity to Cisplatin and PARP Inhibition. *Cancer Res.* **72**, 4037–46 (2012).
- Wang, X. *et al.* Arsenic trioxide attenuates the invasion potential of human liver cancer cells through the demethylation-activated microRNA-491. *Toxicol. Lett.* **227**, 75–83 (2014).
- Wasi, S., Tabrez, S. & Ahmad, M. Toxicological effects of major environmental pollutants: an overview. *Environ Monit Assess* **185**, 2585–93 (2012).
- Watkins, J., Irshad, S., Grigoriadis, A. & Tutt, A. Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian

- cancers. *Breast Cancer Res* **16**, 211 (2014).
- Xiao, J. *et al.* MiR-204 regulates cardiomyocyte autophagy induced by ischemia-reperfusion through LC3-II. *J. Biomed. Sci.* **18**, 35 (2011).
- Xie, Q.-H. *et al.* MiR-192 inhibits nucleotide excision repair by targeting ERCC3 and ERCC4 in HepG2.2.15 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**, 440–5 (2011).
- Xu, K., Chen, Z., Qin, C. & Song, X. miR-7 inhibits colorectal cancer cell proliferation and induces apoptosis by targeting XRCC2. *OTT* **7**, (2014).
- Yang, R. *et al.* Chemical mixture toxicology: from descriptive to mechanistic, and going on to in silico toxicology. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **18**, 65-81 (2004).
- Yasumura, Y. & Kawakita, Y. Studies on SV40 in tissue culture-preliminary step for cancer research in vitro. *Nihon rinsho* **21**, 1201-15 (1963).
- Yu, B. *et al.* miR-221 and miR-222 promote Schwann cell proliferation and migration by targeting LASS2 after sciatic nerve injury. *J. Cell. Sci.* **125**, 2675–83 (2012).
- Zhong, Z., Dong, Z., Yang, L., Chen, X. & Gong, Z. MicroRNA-31-5p modulates cell cycle by targeting human mutL homolog 1 in human cancer cells. *Tumor Biol.* **34**, 1959-65 (2013).
- Zhu, H. & Fan, G.C. Role of microRNAs in the reperfused myocardium towards post-infarct remodelling. *Cardiovasc. Res.* **94**, 284–92 (2012).

ANEXOS

Anexo I: Publicación de los resultados del objetivo general I



mRNA and miRNA expression patterns associated to pathways linked to metal mixture health effects



M. Martínez-Pacheco^a, A. Hidalgo-Miranda^b, S. Romero-Córdoba^b, M. Valverde^a, E. Rojas^{a,*}

^a Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, C.U., 04510 México, México

^b Instituto Nacional de Medicina Genómica, Laboratorio de Genómica del Cáncer, 14610 México, México

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 13 September 2013
Available online 27 September 2013

Keywords:
Metal
MicroRNA
miRNA
Bioinformatics
Disease

ABSTRACT

Metals are a threat to human health by increasing disease risk. Experimental data have linked altered miRNA expression with exposure to some metals. MiRNAs comprise a large family of non-coding single-stranded molecules that primarily function to negatively regulate gene expression post-transcriptionally. Although several human populations are exposed to low concentrations of As, Cd and Pb as a mixture, most toxicology research focuses on the individual effects that these metals exert. Thus, this study aims to evaluate global miRNA and mRNA expression changes induced by a metal mixture containing NaAsO₂, CdCl₂, Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O and to predict possible metal-associated disease development under these conditions. Our results show that this metal mixture results in a miRNA expression profile that may be responsible for the mRNA expression changes observed under experimental conditions in which coding proteins are involved in cellular processes, including cell death, growth and proliferation related to the metal-associated inflammatory response and cancer.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Metals are a major category of globally distributed pollutants due to their natural presence on the earth's crust and their extraction for industry throughout human history. Both epidemiological and *in vitro/in vivo* studies have illustrated the association between disease risk and chronic exposure to particular metals, such as cadmium (Cd), lead (Pb) and arsenic (As) (ATSDR, 2004). These metals tend to accumulate in select bodily tissues and represent a potential human health threat (ATSDR, 2004). Their importance as a risk factor is reflected by their

position at the top of the potential hazard elements present in toxic wastes list maintained by the U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR, 2004). The metal mixture of As, Cd and Pb, has been associated by ATSDR with hematological, hepatic, renal, neurological, reproductive and immunological diseases (ATSDR, 2004). Meanwhile these elements individually have been linked to several diseases, including cardiovascular, renal, hematological and dermatological diseases as well as neurological disorders and cancer (Hou et al., 2011). The roles that heavy metals play in health disorder development and establishment are dependent on both genetic background

Abbreviations: °C, degree Celsius; ADCYAP1, *adenylate cyclase activating polypeptide 1*; Al₂(SO₄)₃, aluminium sulfate; As, arsenic; As₂O₃, arsenic trioxide; ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; C-MOS, *moloney murine sarcoma oncogene*; CA, California; CAMK2A, *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha*; CASP3, *caspase 3*; CCNI, *cyclin I*; Cd, cadmium; CdCl₂, cadmium chloride; cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; CLCC1, *chloride channel CLIC-like 1*; CNN1, *calponin 1*; CNTD1, *cyclin N-terminal domain containing 1*; CO₂, carbon dioxide; Ct, cycle threshold; CYP1A1, *cytochrome P450 family 1 subfamily A polypeptide 1*; DE, Delaware; DHFR, *dihydrofolate reductase*; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; DNA, deoxyribonucleic acid; DNABJ4, DNABJ (Hsp40) *homolog subfamily B member 4*; EDEM3, *ER degradation enhancer mannosidase alpha-like 3*; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FBS, fetal bovine serum; Fc, fold change; Fe₂SO₄, iron sulfate; FGFR, *fibroblast growth factor receptor*; FGFR1, *fibroblast growth factor receptor-like 1*; FOS, *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*; FZD4, *frizzled family receptor 4*; FZD6, *frizzled family receptor 6*; GLO1, *glyoxalase I*; h, hour; HepG2, human hepatocellular G2 cell line; HN, human neural glioma cell line; IPA, Ingenuity Pathway Analysis; KCND2, *potassium voltage-gated channel Shal-related subfamily member 2*; LAMC1, *laminin gamma 1*; Log, logarithm; *M. musculus*, *Mus musculus*; MADD, *MAP-kinase activating death domain*; MBNL1, *muscleblind-like splicing regulator 1*; MD, Maryland; MG63, *Homo sapiens* bone osteosarcoma cell line; MGD, Mouse Genome Database; miRNA, microRNA; mRNA, messenger RNA; MTPN, *myotrophin*; NaAsO₂, sodium meta-arsenite; NaVO₃, sodium vanadate; NCAM1, *neural cell adhesion molecule 1*; NDFIP1, *nedd4 family interacting protein 1*; NiSO₄, nickel sulfate; NiXG-1, *NKG homeobox 1*; nM, nanomolar; NUPL2, *nucleoporin like 2*; NY, New York; OGDH, *oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)*; p-value, probability value; Pb, lead; Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O, lead acetate; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; PGM3, *phosphoglucomutase 3*; PHACTR2, *phosphatase and actin regulator 2*; PLXNA2, *plexin A2*; PM, particulate matter; PPP2CB, *protein phosphatase 2 catalytic subunit beta isozyme*; RAB30, *RAB30 member RAS oncogene family*; RAP2B, *RAP2B member RAS oncogene family*; RIPK4, *receptor-interacting serine–threonine kinase 4*; RNA, ribonucleic acid; ROS, reactive oxygen species; RT-qPCR, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; SDS, *serine dehydratase*; SFN, *stratifin*; SLC1A1, *solute carrier family 1 member 1*; SMAP1, *small ArfGAP 1*; SP1, SP1 transcription factor; SPAM1, *sperm adhesion molecule 1*; SRXN1, *sulfiredoxin 1*; STAG2, *stromal antigen 2*; STAT3, *signal transducer and activator of transcription 3*; STK4, *serine/threonine kinase 4*; T4, T lymphocyte cell line; TiO₂, titanium dioxide; TK6, thymidine kinase 6 cell line; TLDA, TaqMan low density array; μM, micromolar; UTR, untranslated region; WI, Wisconsin; ZrO₂, zirconium dioxide.

* Corresponding author.

E-mail address: emilior@biomedicas.unam.mx (E. Rojas).

and amount and duration of exposure (Hou et al., 2011). The molecular mechanism is well understood in the etiology of heavy metal-associated illness, including known interactions with protein functional groups, DNA damage, increased DNA replication and cell division, reactive oxygen species (ROS) generation and epigenetic changes (Arita and Costa, 2009; Hou et al., 2011; Madden, 2003; Wang and Fowler, 2008). Most of these associations have been demonstrated through mRNA (messenger RNA) expression assays (Bae et al., 2002; Sen et al., 2007), but recently, experimental data have also linked altered miRNA expression with exposure to As, Cd, Pb and other metals (Bollati et al., 2010; Cao et al., 2011; Farraj et al., 2011; Huntzinger and Izaurrealde, 2011; Kong et al., 2012; Krol et al., 2010; Marsit et al., 2006).

MicroRNAs (miRNAs) comprise a large family of non-coding single-stranded RNA molecules of approximately 19–22 nucleotides in length whose major function is to negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level (Huntzinger and Izaurrealde, 2011; Jost et al., 2011; Krol et al., 2010) by recognizing the first 2–8 nucleotides of the 3' untranslated region (3' UTR) of their mRNA targets, resulting in the target's degradation or translational repression (Fabian et al., 2010; Krol et al., 2010). More broadly, miRNAs play important roles in development and the response to environmental cues (Kaikkonen et al., 2011).

In mammals, miRNAs are predicted to control the activity of 30–50% of all protein-coding genes, which makes their biogenesis and function a serious player in cell fate decisions, and they are involved in the many critical biological events, including proliferation, differentiation, apoptosis, metabolism and viral infection, and many diseases, including metabolic disorders, diseases of various organ systems and several forms of cancer (Choudhuri, 2010; Huang et al., 2011; Krol et al., 2010).

There are few reports describing miRNA expression changes due to metal exposure. However, Bollati et al. (2010) showed that miR-146 concentration decreases when human leukocytes are exposed to Cd- and Pb-enriched particulate matter (PM). They also showed that miR-222 is over-expressed only with exposure to Cd-PM (Kong et al., 2012). This result was also observed in TK6 human lymphoblasts exposed to 2 μM NaAsO₂ (Cao et al., 2011), in which miR-221, -222 and -34a showed the same expression pattern as miR-21 and 221 in urine from As and Pb exposed individuals (Farraj et al., 2011) and miR-222* in T24 human bladder carcinoma cells stimulated with 4 μM As₂O₃ (Krol et al., 2010). Studies utilizing NiSO₄, Fe₂SO₄ and NaVO₃-rich PM have demonstrated the down-regulation of several rat cardiomyocyte miRNAs, such as miR-1, -9, -22, -24, -99a, -125a, -145, -191, -224 and -375 among others (Huntzinger and Izaurrealde, 2011), and the same effect was also observed by Fabbri et al. (2012) on miR-let-7a to 7g, -1233, -1275, -130a, -15b, -15b*, -23b, -361-5p and -455-3p from HepG2 human hepatocellular carcinoma cells exposed to 10 μM CdCl₂ (Fabbri et al., 2012). Metal sulfates have also been demonstrated to change miRNA expression. Lukiw and Pogue (2007) observed increases in miR-9, -125b and -128 in HN neuroglia human cells treated with 100 nM Al₂(SO₄)₃ and a mixture of Al₂(SO₄)₃ and FeSO₄ (100 nM each) (Lukiw and Pogue, 2007), which also induces expression of miR-125b and 146a in the same cell type but at minor concentration (1 μM) (Lukiw et al., 2011). Finally, the investigation of dental implants using 12% TiO₂- and ZrO₂-containing ceramic disks as a platform for MG63 human osteoblast culture has shown that these compounds are able to drive the up-regulation of miR-1, -34c, -210, -193b, -214, -337, -339, -377 and -423 and the down-regulation of miR-17-5p, -22, -23b, -24, -93, -130b, -143, -377 and -422b (Palmieri et al., 2008).

Although several human populations are exposed to particular metal mixtures at low concentrations (ATSDR, 2004), most toxicology research focuses on the effects that these metals exert individually. Thus, the aim of this study is to predict the establishment of metal mixture health effects based on global mRNA and miRNA expression patterns induced by a metal mixture of NaAsO₂, CdCl₂ and Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O at epidemiologically relevant concentrations.

2. Materials and methods

2.1. Chemical compounds

Sodium meta-arsenite (NaAsO₂, purity 100%) and cadmium chloride (CdCl₂, purity 99.5%) were purchased from the Aldrich Chemical Company (WI, USA). Lead acetate (Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O, purity 99.9%) was obtained from J. T. Baker (México).

2.2. Cell culture and exposure conditions

The immortalized mouse fibroblast cell line BALB/3T3 A31-1-1 (from the American Type Culture Collection; VA, USA) was grown in Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) (GIBCO, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, MD, USA) and 1% antibiotic-antimycotic (GIBCO) in a humidified incubator under 95% air and 5% CO₂.

BALB/c 3T3 cells were plated at 5×10^5 cells/100-mm dish density in DMEM medium, 10% FBS, and 1% antibiotic-antimycotic. After a 48 h incubation, subconfluent cells were exposed to a 4 h treatment with the metal mixture (2 μM NaAsO₂, 2.4 μM CdCl₂, and 4.8 μM Pb(Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O), as described before (Martin et al., 2011). The medium was then removed, and the cells were replated at 4×10^5 cells/100-mm dish density.

The present study was performed in BALB/3T3 A31-1-1 cell line, which is a cell transformation assay that provides specific evidence for the tumorigenic potential of substances, which cannot be defined by genotoxicity testing alone. Rodent cell transformation assays had been developed that exhibit sensitivity and specificity for predicting chemical carcinogens and are suitable for validation to foster regulatory acceptance (Rohrbeck et al., 2010).

2.3. RNA isolation

On day four post-exposure, control and treated cells were harvested with 0.2% PBS-EDTA and centrifuged to remove the medium. Total RNA was immediately extracted from 1×10^5 cells using the ZR RNA MicroPrep (Zymo Research; CA, USA) isolation kit according to the manufacturer's protocol for miRNA analysis and with TRIzol reagent (Invitrogen) for mRNA evaluation. Total RNA was analyzed using LabChip Nano RNA 6000 chips (Agilent; CA, USA) on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) for miRNA and with the Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific; DE, USA) spectrophotometer for mRNA, in both cases to evaluate the integrity and concentration of the samples, which were then aliquoted and stored at -80°C .

2.4. mRNA expression assays and analysis

A *Mus musculus* whole genome microarray consisting of 11,000 genes was utilized to evaluate the mRNA expression profile following metal mixture exposure. These experiments were performed in the in the microarray unit of Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM using 45-mer oligonucleotide genomic libraries and competitive hybridization between the control and experimental RNA samples. For our experiments, mRNAs with expression values of less than 1.5 (log scale) fold-change compared to controls were considered under-expressed, while expression values greater than 1.5 were treated as overexpressed. Experiments were conducted twice including three technical replicates, in total six data per condition.

2.5. miRNA expression assays and analysis

miRNA expression profiles were obtained using the Applied Biosystems Megaplex RT-qPCR Low Density miRNA Array (TLDA), all of the reagents were purchased from the same supplier, and all experiments were conducted twice with a technical replicate. For miRNA cDNA

synthesis, RNA was reverse transcribed with the miRNA Reverse Transcription kit combined with the Megaplex Primer Pool, and the product was pre-amplified with the TaqMan PreAmp Master mix and Megaplex PreAmp Primer mix. Real-time PCR of 768 small RNAs (384 per TLDA plate) was performed on the TaqMan miRNA Array using the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems; CA, USA).

A comparative Ct (number of cycles required for the fluorescent signal to cross the threshold) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) analysis was performed to identify the differential miRNA expression under the metal mixture exposure, and the mammalian U6 small nuclear RNA was used for data normalization across the experiments. Data were processed and exported using Applied Biosystems SDSv2.3 software with baseline settings and a threshold of 0.2 and were subsequently analyzed using DataAssist software (Applied Biosystems). MiRNAs with expression values of less than 0.2 (log scale) fold-change compared to controls were considered as under-expressed while those with a value of greater than 0.5 were treated as overexpressed.

2.6. Pathway analysis

Both mRNA and miRNA expression data were normalized with respect to internal housekeeping sequences. The fluorescent signal intensity and background measurements were obtained on six spots for each mRNA. The results filtering and normalization were processed with the Microsoft Excel software, where the background value was subtracted from the fluorescence of the sample for both the control and experimental condition, and then compared between them to express the result up- or down-regulation as fold-change (± 1.5). For the analysis, both mRNA and miRNA data were independently submitted to IPA Core Analysis on the Ingenuity Pathway Analysis software application to deliver a rapid assessment of the signaling and metabolic pathways, molecular network and biological processes that were most significantly perturbed in a dataset of interest, and to predict the possible disease establishment.

2.7. Statistical analysis

mRNA microarray data were analyzed with the genArise software, which was developed in the Computing Unit of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). The local background value was subtracted from the intensity of each spot, and Lowess normalization was applied to the slide. The normalized ratio of the expression of the experimental sample to the expression of the control was calculated with genArise software for each experimental replicate. This software identifies differentially expressed genes by calculating an intensity-dependent z score. It uses a sliding window algorithm to calculate the mean and standard deviation within a window surrounding each data point and determines a z score which measures the number of standard deviations that a data point is from the mean: $z_i = [R_i - \text{mean}(R)] / \text{sd}(R)$, where z_i is the z score for each element, $\text{mean}(R)$ is the mean log ratio, R_i is the log ratio for each element, and $\text{sd}(R)$ is the standard deviation of the log ratio. Using this criterion, the elements in all experiments with a z score of > 1.5 standard deviations were considered significantly differentially expressed genes. To eliminate dye effects, labeling with different dyes was performed for single replicates. However, no significant differences between Cy3 and Cy5 in incorporation, fluorescence yield, or stability were observed.

miRNA data were processed and exported using SDS v2.3 software with baseline settings and a threshold of 0.2, relative microRNA expression was calculated with the RQ Manager v1.2, and data was subsequently processed using DataAssist v2.0 allowing a maximum of 35 cycles of amplification, adjusting p-values using Benjamini-Hochberg False Discovery Rate, excluding outliers among replicates,

and using endogenous control normalization method as analysis parameters (all software packages from Applied Biosystems).

2.7.1. Ingenuity Pathway Analysis

A set of focus genes was identified in IPA as those genes with an association p-value less than 0.01. Pathways analysis identified the pathways from the IPA library of pathways that were most significant given the focus genes. The significance of the association between the focus genes and the pathway was measured using Fisher's exact test, which was used to calculate a p-value to determine the probability that the association between the focus genes and the pathway is explained by chance alone.

3. Results

3.1. mRNA expression profiles in metal mixture-exposed fibroblasts

Gene expression profiles were assayed using an mRNA microarray in which the entire *M. musculus* genome (11,000 genes) was evaluated, and we observed that approximately 12% of genes (1311) were under-expressed ($fc < 1.5$) and 12% (1352 genes) of genes were over-expressed ($fc > 1.5$) in fibroblasts exposed to the metal mixture (2 μM NaAsO₂, 2.4 μM CdCl₂, and 4.8 μM Pb(Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O) (Fig. 1).

3.2. Prediction of biological function and disease establishment associated with mRNA expression profile exposure to the metal mixture

mRNA expression profiles were analyzed using the IPA bioinformatics tool to predict biological functions resulting from metal mixture exposure (2 μM NaAsO₂, 2.4 μM CdCl₂, and 4.8 μM Pb(Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O). We found that 22 to 334 genes were involved in molecular and cellular functions, such as cell death, movement, morphology, growth and proliferation, and development, which have p-values between 1.65×10^{-11} – 2.65×10^{-3} and 9.73×10^{-16} – 2.64×10^{-3} when murine fibroblasts are treated with the metal mixture (2 μM NaAsO₂, 2.4 μM CdCl₂, and 4.8 μM Pb(Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O) (Table 1). In addition, the predictive analysis of disease and disorders predicted that cancer; inflammatory response, genetic disorders, neurological and respiratory

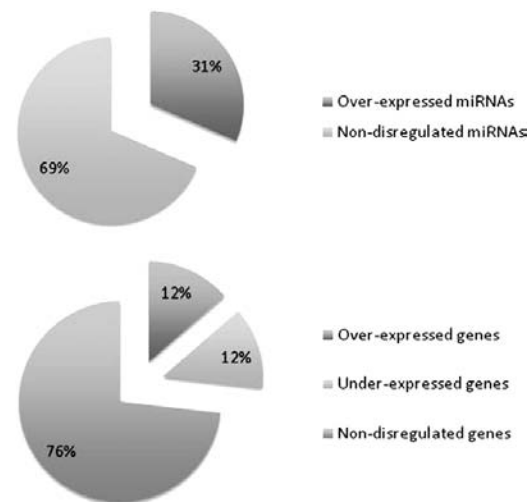


Fig. 1. miRNA expression profile obtained by Megaplex RT-qPCR Array in fibroblasts exposed to a metal mixture of As, Cd and Pb (top). Gene expression profile obtained by mRNA microarray in fibroblasts exposed to a metal mixture of As, Cd and Pb (bottom).

Table 1
Top five biofunctions and disease predicted by IPA to be regulated by mRNA expression profile under metal-exposure.

Diseases and disorders	Number of genes involved	p-Value
Cancer	392	1.14E-11-2.65E-03
Inflammatory response	184	1.04E-08-2.51E-03
Neurological disease	207	5.07E-08-2.50E-03
Genetic disorders	281	1.01E-06-2.31E-03
Respiratory disease	78	3.13E-06-2.00E-03
<i>Molecular and cellular functions</i>		
Cell death	325	9.73E-16-2.64E-03
Cellular movement	206	2.42E-12-2.41E-03
Cell morphology	22	1.65E-11-2.65E-03
Cellular growth and proliferation	334	2.16E-10-2.65E-03
Cellular development	243	5.99E-10-2.64E-03

disease might be involved through a range of between 27 and 392 genes (Table 1).

3.3. miRNA expression profile in metal mixture-exposed fibroblasts

Approximately 27% (209 miRNAs) of the total studied miRNAs (768) were over-expressed ($fc > 1.5$) in fibroblasts exposed to the metal mixture (2 μM NaAsO₂, 2.4 μM CdCl₂, and 4.8 μM Pb(Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O)) compared to untreated cells (control experimental conditions) using a comparative Ct analysis ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) of the expression levels assayed by the Applied Biosystems Megaplex RT-qPCR Low Density miRNA Array (Fig. 1).

3.4. Prediction of biological function and disease establishment associated with miRNA expression profiles following metal mixture-exposure

miRNA expression profiles were analyzed using the IPA bioinformatics tool, and the alterations were predicted to disrupt various molecular and cellular functions, such as cellular development, growth and proliferation, death, cell cycle and movement, as shown in Table 1 (bottom). There were 24 to 48 miRNAs found to be involved. These predictions have p-values of approximately 1.08×10^{-55} – 3.88×10^{-2} to 1.08×10^{-55} – 4.64×10^{-2} , and those corresponding to metal mixture-associated disease establishment (3.94×10^{-12} – 3.88×10^{-2} to 6.97×10^{-8} – 4.64×10^{-2}), including organism injury and abnormalities and connective, genetic, inflammatory and respiratory disease, involve approximately 42 to 81 miRNAs for establishment (Table 2).

Table 2
Top five biofunctions and disease predicted by IPA to be regulated by miRNA expression profile under metal-exposure.

Diseases and disorders	Number of miRNAs involved	p-Value
Connective tissue disorders	45	1.08E-55-3.43E-02
Genetic disorders	81	1.08E-55-3.88E-02
Inflammatory disease	59	1.08E-55-3.43E-02
Organismal injury and abnormalities	42	1.08E-55-4.64E-02
Respiratory disease	45	1.08E-55-3.88E-02
<i>Molecular and cellular functions</i>		
Cellular development	42	4.90E-17-4.51E-02
Cellular growth and proliferation	48	4.90E-17-4.27E-02
Cell death	46	3.94E-12-3.88E-02
Cell cycle	23	6.97E-08-4.64E-02
Cellular movement	24	5.67E-07-3.957E-02

3.5. miRNAs already validated to regulate predicted IPA biological functions and disease establishment following metal exposure

A literature-based analysis was performed to increase evidence of the predicted molecular and cellular functions and disease regulation for the top ten over-expressed miRNAs discovered in our experimental data (Fig. 2). We found that processes such as inflammation, cell death, cellular growth and proliferation, and cancer establishment have already been associated with a subset of our up-regulated small RNAs (Fig. 3), such as miR-154 and -379, which positively regulates the inflammatory response (Izzotti et al., 2011; Ooi et al., 2012) as well as the cell death-inhibiting miRNAs 204 (Xiao et al., 2011) and 133 (Zhu and Fan, 2012), the latter of which up-regulates cellular growth and proliferation along with miR-222 (Li et al., 2012; Yu et al., 2012) and miR-375 (de Souza Rocha Simonini et al., 2010; Poy et al., 2009), which have also been associated with lung carcinoma (Nishikawa et al., 2011). MiR-10 has been linked to oral carcinoma, leukemia, esophagus and breast cancer (Lu et al., 2012; Lund, 2010; Tian et al., 2010). Finally, miR-222 has been identified as also overexpressed in leukemia (Machova Polakova et al., 2011) and breast cancer (Fu et al., 2011) and in liver (Varnholt, 2008), thyroid (Chira et al., 2010), prostate and bladder cancer, among others (Catto et al., 2011).

The first bioinformatics approach was to use Ingenuity Pathway Analysis (IPA; CA, USA) to determine the biological pathways and to predict disease development affected by the altered expression of miRNAs and mRNAs. The second approach was to define the predicted and validated mRNA targets from the differentially expressed miRNAs using the miRWalk (Dweep et al., 2011) algorithm through the microRNA (Betel et al., 2008, 2010), miRDB (Wang, 2008) and TargetScan (Lewis et al., n.a.) databases with the 7-mer miRNA seed sequence matching the 3' UTR of the mRNA and a p-value under 0.001 as main criteria.

We determined that six of the top ten under-expressed mRNAs may be regulated by six of the top ten over-expressed miRNAs (Fig. 2).

These results suggest a close relationship between the miRNA and mRNA expression profiles that may be responsible for the cellular processes and disease phenotypes predicted in this study. This observation is strengthened by the fact that five of the microRNAs with the highest expression levels are recognized as direct regulators of 14 of the annotated down-regulated genes (868) observed following metal mixture exposure (2 μM NaAsO₂, 2.4 μM CdCl₂, and 4.8 μM Pb(Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O)) (Table 3), according to the miRWalk databases (Dweep et al., 2011).

3.6. Under-expressed genes are predicted and validated to be regulated by over-expressed miRNAs following metal mixture exposure

Using the miRWalk databases (Dweep et al., 2011), we identified down-expressed genes that are predicted and validated to be regulated

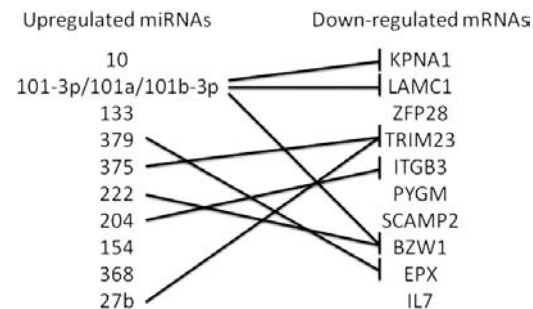


Fig. 2. Top ten dis-regulated miRNAs and mRNAs predicted to be principally responsible for biofunction disruption and disease establishment related to metal mixture exposure.

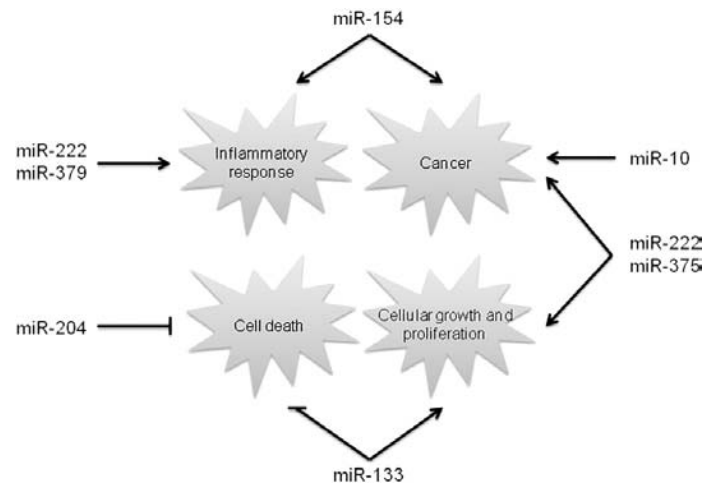


Fig. 3. The eight miRNAs up-regulated in RT-qPCR Megaplex under metal mixture exposure that have been linked already to cellular function regulation and cancer establishment predicted by our IPA analysis.

by five of the most highly expressed miRNAs, based on information available in databases (Table 4). The combined gene sets were submitted for IPA analysis as previously described to test for disease establishment and altered cellular functions following metal mixture exposure (2 μM NaAsO_2 , 2.4 μM CdCl_2 , and 4.8 μM $\text{Pb}(\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$, after taking into consideration the 42 (3.2%) down-regulated genes. We found that cancer is a predicted disease, a result similar to that of the entire down-regulated gene set (Tables 2 and 5). Cellular growth and proliferation, development and death are altered cellular processes predicted in both analyses, which indicates extensive participation of these 42 genes in these key cellular functions and diseases.

To enrich and give robustness to our bioinformatics analyses, we also performed a search of previously published microarray assays in the cancer, genetic disorder, inflammatory response and respiratory disease contexts to confirm the predicted and validated down-regulated genes (Table 4). We found 42 genes to be under-expressed according to the Gene Expression Atlas tool (Kapushesky et al., 2010). Similarly, the

genes were confirmed to be involved in the impairment of the previously cited three cellular functions using GeneCards (Safra et al., 2010), the Mouse Genome Database (MGD) at the Mouse Genome Informatics website (Eppig et al., 2012), and the literature (Singh and Arlinghaus, 1997).

4. Discussion

We observed that a metal mixture (2 μM NaAsO_2 , 2.4 μM CdCl_2 , and 4.8 μM $\text{Pb}(\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$ was capable of differentially altering miRNA and mRNA gene expression profiles in murine fibroblasts (cell transformation assay) exposed to 4 h of treatment. Over-expression was induced in approximately 31% of miRNAs, with gene over-expression and under-expression of 12% and 12%, respectively, in the cellular mRNAs, as shown in Fig. 1. There is much evidence regarding how these metals may regulate mRNA expression. Some of the recognized mechanisms include genetic mutation, transcription factor and cell signaling deregulation, and epigenetic events (Arita and Costa, 2009; Hou et al., 2011; Madden, 2003; Sahnikow and Zhitkovich, 2008; Wang and Fowler, 2008). However, there is no evidence of miRNA mis-regulation. Because many miRNAs behave like protein-coding genes (Mahony et al., 2007), we suggest that the same metal-associated mechanisms may apply.

Our gene expression profile-based predictive analysis via IPA identified differential expression of mRNAs and miRNAs in fibroblasts exposed to a metal mixture (2 μM NaAsO_2 , 2.4 μM CdCl_2 , and 4.8 μM $\text{Pb}(\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$ that may induce changes in key cellular

Table 3

Up-regulated miRNAs that have been already validated as among the various down-regulated genes observed under the metal mixture condition.

Up-regulated miRNAs	Down-regulated genes
10	C-MOS
101-3p/101a/101b-3p	F6FR LAMC1 MTPN CCNI CAMK2A MADD
133	CNN1 C-MOS SP1 STAT3 NKX6-1
222	C-MOS CCNI STAT3 CASP3 FOS
375	NCAM1 CASP3 C-MOS MTPN SFN

Table 4

Predicted and validated mRNA targets indicated by the miRWalk databases to be regulated by over-expressed miRNAs during metal mixture exposure.

miRNA	Predicted targets	Validated targets
10	C-MOS, CASP3	STK4, CLCC1, DHFR, SMAP1, CYP1A1, PGM3, CNTD1, PHACTR2, OGDH
101	FGFRL1, LAMC1, C-MOS, MTPN, MADD, CCNI, CAMK2A	FZD6, NDFIP1, GLO1, RAB30, FZD4, RAI2B, SPAM1, EDEM3, PLXNA2, MBNL1, DNABJ4, NUPPL2, SLC1A1, RIPK4, KCND2, STAG2
133	CNN1, C-MOS, SP1, STAT3, NKX6-1	SRXN1, ADCYAP1, PPP2CB
375	NCAM1, CASP3, C-MOS, MTPN, SFN	
222	CCNI, STAT3, CASP3, C-MOS, FOS	

Table 5

IPA prognostication of disease and disorder development and molecular and cellular function alteration using the genes predicted and validated for miRNA-regulation.

Diseases and disorders	Number of genes involved	D-value
Cardiovascular disease	7	1.79E–04–4.46E–02
Organismal injury and abnormalities	8	1.79E–04–4.30E–02
Developmental disorder	6	2.30E–04–4.46E–02
Skeletal and muscular disorders	3	2.30E–04–4.46E–02
Cancer	9	2.58E–03–3.55E–02
<i>Molecular and cellular functions</i>		
Protein synthesis	8	9.26E–05–3.55E–02
Cellular development	19	2.09E–04–4.85E–02
Cellular growth and proliferation	12	5.85E–04–4.79E–02
Cell death and survival	13	1.32E–03–4.54E–02
Aminoacid metabolism	1	2.58E–03–3.55E–02

processes and disease. Both effects share the disruption of cellular development, growth and proliferation, and cell death as well as the establishment of genetic disorders, inflammatory responses and respiratory disease (Table 5). The results obtained for mRNA gene expression agree with the current literature because As, Cd and Pb exposure disrupts key cellular processes (Bae et al., 2002; Hengstler and Bolt, 2008; Hou et al., 2011; Salnikow and Zhitkovich, 2008) and because disease development is related to these metals as a mixture (Bollati et al., 2010; Pohl et al., 2003; Sen et al., 2007). Because some of these metals are considered weak mutagens and/or co-carcinogenic compounds, genetic mutations can explain only a small proportion of metal-associated changes in cellular processes and diseases (Arita and Costa, 2009; Hou et al., 2011; Salnikow and Zhitkovich, 2008). Therefore, we propose miRNAs as parallel regulators that account for the effects exerted by the metal mixture (2 μM NaAsO₂, 2.4 μM CdCl₂, and 4.8 μM Pb(Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O) and support this idea using results obtained from the prediction analysis in which miRNAs seem to have the same repercussions that metal-modulated mRNAs do.

We provide evidence for over-expression of miR-10, -133, -154, -204, -222, -375 and -379 as indicators of the inflammatory response, cell death, cell growth and proliferation, and cancer development as mined from literature data.

Along with the literature support and confirmation, in this study, we show the importance of miRNAs in key cellular processes by modulating a small gene set without considering the participation of all up-regulated miRNAs observed in this study. The down-regulation of the 42 predicted and validated gene targets are determinants of cellular function impairment and disease establishment.

Together, our findings allow us to assert the great importance of miRNAs in the development and/or establishment of metal-associated disease, especially cancer, through the modulation of key cellular processes that have also been cited as metal exposure targets. The patterns of mRNA and miRNA expression that predict establishment of metal mixture health effects must be determined in populations identified as at risk for occupational exposure to prevent degenerative diseases, as evidenced by the analysis. However, further study is needed to understand the balance between genetic predisposition and epigenetic disruption in the development of metal-associated disease.

5. Conclusions

The metal mixture 2 μM NaAsO₂, 2.4 μM CdCl₂, and 4.8 μM Pb(Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O) resulted in miRNA and mRNA expression profiles that predict the disruption of cellular death, growth and proliferation in addition to inflammatory response and cancer, which have previously been linked with exposure.

Our bioinformatics analyses have allowed us to identify miRNAs as possible determinants of mRNA expression changes observed under

experimental conditions. These mRNAs code for proteins involved in cellular processes, such as death, growth, and proliferation, and have been related to metal-associated inflammatory response and cancer.

Our predictions give another possible explanation for the molecular mechanism of heavy metal toxicology.

Conflict of Interest

The authors report no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank M. Silva for extraction of the RNA used in the mRNA microarrays analyzed in this work and Alexandra Rodríguez for her technical assistance and helpful comments. We also thank PAPIIT (IN214310) and CONACyT (152473) for financial support. MPM is a recipient of CONACyT scholarship 229336 and this publication is part of her doctoral thesis as student of the Biomedical Sciences PhD Program of the National Autonomous University of Mexico.

References

- Arita, A., Costa, M., 2009. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium. *Metalomics* 1, 222–228. <http://dx.doi.org/10.1039/b903049b>.
- ATSDR, 2004. Interaction Profile for: Arsenic, Cadmium, Chromium and Lead. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry 160.
- Bae, D.S., Hanneman, W.H., Yang, R.S., Campain, J.A., 2002. Characterization of gene expression changes associated with MNNG, arsenic, or metal mixture treatment in human keratinocytes: application of cDNA microarray technology. *Environ. Health Perspect.* 110 (Suppl. 6), 931–941.
- Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S., Sander, C., 2008. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res.* 36, D149–D153. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm995>.
- Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C., Leslie, C., 2010. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.* 11, R90. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2010-11-8-r90> Cell 120, 15–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>.
- Bollati, V., et al., 2010. Exposure to metal-rich particulate matter modifies the expression of candidate microRNAs in peripheral blood leukocytes. *Environ. Health Perspect.* 118, 763–768. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.0901300>.
- Cao, Y., et al., 2011. MicroRNA-dependent regulation of PTEN after arsenic trioxide treatment in bladder cancer cell line T24. *Tumour Biol.* 32, 179–188. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-010-0111-z>.
- Catto, J.W., et al., 2011. MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *Eur. Urol.* 59, 671–681. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2011.01.044>.
- Chira, P., V.K., Sainis, I., Papanreou, C., Briasoulis, E., 2010. Alterations of microRNAs in solid cancers and their prognostic value. *Cancers* 2, 1328–1353. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers2021328>.
- Choudhuri, S., 2010. Small noncoding RNAs: biogenesis, function, and emerging significance in toxicology. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 24, 195–216. <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.20325>.
- de Souza Rocha Simonini, P., et al., 2010. Epigenetically deregulated microRNA-375 is involved in a positive feedback loop with estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cancer Res.* 70, 9175–9184. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1318>.
- Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P., Gretz, N., 2011. miRWalk—database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* 44, 839–847. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbi.2011.05.002>.
- Eppig, J.T., et al., 2012. The Mouse Genome Database (MGD): comprehensive resource for genetics and genomics of the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res.* 40, D881–D886. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr974>.
- Fabbri, M., Urani, C., Sacco, M.G., Proccaccianti, C., Gribaldo, L., 2012. Whole genome analysis and microRNAs regulation in HepG2 cells exposed to cadmium. *Alte* 29, 173–182.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., Filipowicz, W., 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 351–379. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060308-103103>.
- Farrar, A.K., et al., 2011. ST depression, arrhythmia, vagal dominance, and reduced cardiac micro-RNA in particulate-exposed rats. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 185–196. <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2009-0456OC>.
- Fu, S.W., Chen, L., Man, Y.G., 2011. miRNA biomarkers in breast cancer detection and management. *J. Cancer* 2, 116–122.
- Hengstler, J.G., Bolt, H.M.A., 2008. Special issue on metal toxicity. *Arch. Toxicol.* 82, 489–491. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-008-0333-7>.
- Hou, L., Wang, D., Baccarelli, A., 2011. Environmental chemicals and microRNAs. *Mutat. Res.* 714, 105–112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.05.004>.
- Huang, Y., et al., 2011. Biological functions of microRNAs: a review. *J. Physiol. Biochem.* 67, 129–139. <http://dx.doi.org/10.1007/s13105-010-0050-6>.

- Huntzinger, E., Izaurralde, E., 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* 12, 99–110. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2936>.
- Izzotti, A., et al., 2011. Interplay between histopathological alterations, cigarette smoke and chemopreventive agents in defining microRNA profiles in mouse lung. *Mutat. Res.* 717, 17–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.10.003>.
- Jost, D., Nowojewski, A., Levine, E., 2011. Small RNA biology is systems biology. *BMB Rep.* 44, 11–21. <http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2011.44.1.11>.
- Kaikkonen, M.U., Lam, M.T., Glass, C.K., 2011. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc. Res.* 90, 430–440. <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvr097>.
- Kapushesky, M., et al., 2010. Gene expression atlas at the European Bioinformatics Institute. *Nucleic Acids Res.* 38, D690–D698. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp936>.
- Kong, A.P., et al., 2012. Associations between microRNA (miR-21, 126, 155 and 221), albuminuria and heavy metals in Hong Kong Chinese adolescents. *Clin. Chim. Acta* 413, 1053–1057. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.02.014>.
- Krol, J., Loedige, I., Filipowicz, W., 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11, 597–610. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2843>.
- Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Genes Dev.* 15, 1053–1057.
- Li, N., et al., 2012. Increased miR-222 in *H. pylori*-associated gastric cancer correlated with tumor progression by promoting cancer cell proliferation and targeting RECK. *FEBS Lett.* 586, 722–728. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.01.025>.
- Lu, Y.C., et al., 2012. Oncogenic function and early detection potential of miRNA-10b in oral cancer as identified by microRNA profiling. *Cancer Prev. Res.* 5, 665–674. <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CCR-11-0358>.
- Lukiw, W.J., Pogue, A.L., 2007. Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROS-generating metal sulfates in primary human brain cells. *J. Inorg. Biochem.* 101, 1265–1269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.06.004>.
- Lukiw, W.J., Dua, P., Pogue, A.L., Eicken, C., Hill, J.M., 2011. Upregulation of micro RNA-146a (miRNA-146a), a marker for inflammatory neurodegeneration, in sporadic Creutzfeldt–Jakob disease (sCJD) and Gerstmann–Straussler–Scheinker (GSS) syndrome. *J. Toxic. Environ. Health A* 74, 1460–1468. <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2011.618973>.
- Lund, A.H., 2010. miR-10 in development and cancer. *Cell Death Differ.* 17, 209–214. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.58>.
- Machova Polakova, K., et al., 2011. Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets. *Mol. Cancer* 10, 41. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-10-41>.
- Madden, E.F., 2003. The role of combined metal interactions in metal carcinogenesis: a review. *Rev. Environ. Health* 18, 91–109.
- Mahony, S., Corcoran, D.L., Feingold, E., Benos, P.V., 2007. Regulatory conservation of protein coding and microRNA genes in vertebrates: lessons from the opossum genome. *Genome Biol.* 8, R84. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r84>.
- Marsit, C.J., Eddy, K., Kelsey, K.T., 2006. MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res.* 66, 10843–10848. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1894>.
- Martin, Silva A., Emilio, Rojas, Mahara, Valverde, 2011. Role of oxidative stress in transformation induced by metal mixture. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 935160. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/935160>.
- Nishikawa, E., et al., 2011. miR-375 is activated by ASH1 and inhibits YAP1 in a lineage-dependent manner in lung cancer. *Cancer Res.* 71, 6165–6173. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1020>.
- Ooi, A.T., et al., 2012. Identification of an interleukin 13-induced epigenetic signature in allergic airway inflammation. *Am. J. Transl. Res.* 4, 219–228.
- Palmieri, A., et al., 2008. Short-period effects of zirconia and titanium on osteoblast microRNAs. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 10, 200–205. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1708-8208.2007.00078.x>.
- Pohl, H.R., Roney, N., Wilbur, S., Hansen, H., De Rosa, C.T., 2003. Six interaction profiles for simple mixtures. *Chemosphere* 53, 183–197. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00436-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00436-3).
- Poy, M.N., et al., 2009. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5813–5818. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0810550106>.
- Rohrbeck, A., et al., 2010. Toxicogenomics applied to *in vitro* carcinogenicity testing with Balb/c 3T3 cells revealed a gene signature predictive of chemical carcinogens. *Toxicol. Sci.* 118, 31–41. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfq246>.
- Safra, M., et al., 2010. GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database (Oxford)* 2010, baq020. <http://dx.doi.org/10.1093/database/baq020>.
- Salnikow, K., Zhitkovich, A., 2008. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 28–44. <http://dx.doi.org/10.1021/bx700198a>.
- Sen, B., Mahadevan, B., DeMarini, D.M., 2007. Transcriptional responses to complex mixtures: a review. *Mutat. Res.* 636, 144–177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.08.002>.
- Singh, B., Arlinghaus, R.B., 1997. Mos and the cell cycle. *Prog. Cell Cycle Res.* 3, 251–259.
- Tian, Y., et al., 2010. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 in human esophageal cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* 285, 7986–7994. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.062877>.
- Varnholt, H., 2008. The role of microRNAs in primary liver cancer. *Ann. Hepatol.* 7, 104–113.
- Wang, X., 2008. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA* 14, 1012–1017. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.965408>.
- Wang, G., Fowler, B.A., 2008. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233, 92–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2008.01.017>.
- Xiao, J., et al., 2011. MiR-204 regulates cardiomyocyte autophagy induced by ischemia–reperfusion through LC3-II. *J. Biomed. Sci.* 18, 35. <http://dx.doi.org/10.1186/1423-0127-18-35>.
- Yu, B., et al., 2012. miR-221 and miR-222 promote Schwann cell proliferation and migration by targeting LASS2 after sciatic nerve injury. *J. Cell Sci.* 125, 2675–2683. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.098996>.
- Zhu, H., Fan, G.C., 2012. Role of microRNAs in the reperfused myocardium towards post-infarct remodelling. *Cardiovasc. Res.* 94, 284–292. <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvr291>.

Anexo II: Manuscrito de los resultados del objetivo general II sometido a
Molecular Carcinogenesis

Post-transcriptional regulation of Rad51c by miR-222 contributes to metal-induced cellular transformation

Martínez-Pacheco M., Rodríguez-Sastre M. A. and Rojas E*.

Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental. C.U. 04510, México.

*Corresponding author

e-mail: emilior@biomedicas.unam.mx

Keywords

microRNA, metal, DNA damage, DNA repair, carcinogenesis initiation

Abstract

Our understanding of the molecular biology of heavy metal-associated illness has been enriched by the inclusion of experimental data suggesting that altered microRNA expression under As-Cd-Pb mixture exposure may alter several critical cellular processes. Among these processes is DNA repair inhibition, which has been described as an essential event leading to the initiation of metal-induced carcinogenesis. We implemented the Balb/c 3T3 cell assay in order to study the initiation phase of metal-induced carcinogenesis, and determined miR-222 expression by RT-qPCR, and Rad51c gene and protein expression by RT-PCR and immunoblot, respectively. A luciferase assay was performed to validate Rad51c as miR-222 target and the neutral Comet assay was used in order to evaluate DNA damage response under experimental conditions. Here, we demonstrate that the mixture of As-Cd-Pb at epidemiologically relevant concentrations induces miR-222 up-regulation, which directly negatively regulates Rad51c expression and impairs homologous recombination of double-strand break DNA repair during the initiation stage of cell transformation. This inhibition triggers morphological transformation in a murine two-stage Balb/c 3T3 cell assay, suggesting that this small RNA acts as an initiator of the carcinogenesis process.

Introduction

Heavy metals and metalloids mixtures such as arsenic (As), cadmium (Cd), and lead (Pb), are considered a major category of globally-distributed pollutants according to the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) and represent a potential health threat associated with a number of diseases, including cancer [1]. Recently, knowledge about the molecular background of heavy metal-associated illness has been enriched by the inclusion of experimental data suggesting altered microRNA (miRNA) expression under metal exposure [2].

MiRNAs comprise a large family of non-coding single-stranded RNA molecules of 19–22 nucleotides in length whose major function is to negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level by recognizing the first 2–8 nucleotides of the 3' untranslated region (3' UTR) of their messenger RNA (mRNA) targets, resulting in its degradation or translational repression. In a previous work, we reported that upon As-Cd-Pb mixture exposure at epidemiologically relevant concentrations, these small RNAs may regulate gene expression, leading to alterations in several cellular processes, including altered cellular proliferation and death, which have previously been related to the metal-induced carcinogenesis process [2-6].

Nevertheless, additional mechanisms may exist by which heavy metals exert their effects, such as DNA repair inhibition, in which base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), mismatch repair (MMR), and homologous recombination (HR) are attenuated or inhibited [3]. DNA repair inhibition has been described as an essential event leading to the accumulation of DNA mutations and subsequent genomic instability, which are considered hallmarks of cancer [7,8]. In this context, the negative regulation of DNA repair gene expression through miRNA is poorly understood; however, there is evidence that these RNAs modulate the DNA damage response (DDR) [9] and some of the DNA repair mechanisms gene expression in mammals. For instance, miR-16, -34c, and -199 down-regulate the uracil DNA glycosylase (UNG) of BER [10]. MiR-373 targets Rad23b, which is involved in the NER mechanism [11]. The helicases Ercc2 and Ercc3 are modulated by miR-192 [12], and miR-31-5p and -155 regulate the Mh1 [13,14], Msh6 [13] and, along with miR-21, the Msh2 genes of MMR [13,15]. HR seems to be attenuated by the action of miR-210 over Rad52 [11], the miR-96, -103, -107 and -155 regulation of Rad51a and Rad51d [16-18], the Brca1 and Brca2 down-regulation through miR-9, -182 and -1245 [19,20], and the negative effect of miR-7 on Xrcc2 expression [21].

The impairment of the DNA repair mechanisms leads to DNA damage accumulation and thus contributes to cancer initiation [22]. HR have been suggested as a determinant of this outcome because it represents a manner by which the highly recognized mutagenic double strand breaks (DSBs) are repaired through the alignment of homologous sequences of DNA and because it exhibits broad DNA damage substrate specificity. Furthermore, HR is of great interest due to its ability to maintain genomic instability and its important role in the development of diverse types of cancer [22]. Particular attention is paid to the Rad51 recombinase protein family implicated in this DNA repair mechanism and more specifically to the Rad51c member in light of the experimental data demonstrating its mutation or inactivation as a susceptibility factor of various types of cancer, including head and neck, breast and ovarian, and colorectal [22-25].

MiR-222 is known to be up-regulated under As-Cd-Pb mixture exposure [2] and in established cancers of the liver [26], prostate [27], kidney [28], and bladder [29], which have been related to these metals [1]. However this small RNA has never been related to DNA repair gene expression.

The majority of toxicological studies focus on the effect the metals exert separately [1] despite the fact that most of the human population is exposed to these metals as a mixture. In light of this fact and given the previous studies of miR-222, the aim of our study is to determine the expression of miR-222 under the As-Cd-Pb mixture treatment as an initiator of cellular transformation in a murine two-stage Balb/c 3T3 cell assay. In addition, we aim to correlate miR-222 expression with the protein expression of Rad51c, a regulator of HR- DNA repair.

Materials and methods

In silico identification of miR-222 target and Rad51c interaction

Prediction of complementary binding sites between the mature mmu-miR-222 (seed sequence: 5'-aGCUACAU-3') and the 3'UTR of Rad51c mRNA (RefSeq ID: NM_053269) sequences was made using the miRWalk [30], microRNA [31] and miRBase [32] algorithms.

Chemical compounds

Sodium meta-arsenite (NaAsO₂, purity 100%) and cadmium chloride (CdCl₂, purity 99.5%) were purchased from the Aldrich Chemical Company (WI, USA). Lead acetate (Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O, purity 99.9%) was obtained from J. T. Baker (México).

Cell lines

The Balb/c 3T3 clone A31-1-1 is a *Mus musculus* (mouse) non-tumorigenic and non-immunosuppressed embryo fibroblast widely used for carcinogenicity test purposes. The strain was acquired on 2009 from the ATCC (American Type Culture Collection; VA, USA) and it has been cryopreserved in freeze medium (complete growth medium supplemented with 5% (v/v) DMSO (dimethyl sulfoxide)) on liquid nitrogen. All of the experiments were carried out using an early passage number of the subculture (passage 4) and employing a positive (known initiator and promoter) and negative (basal conditions culture) control for cellular transformation assays.

The Vero strain is an adult *Cercopithecus aethiops* (African green monkey) kidney cell vastly used for plasmid transfection that has been acquired from the same supplier and cryopreserved under the same conditions. All of the experiments were performed using an early passage number of the subculture (passage 5).

Two-stage Balb/c 3T3 cell assay with the As, Cd and Pb mixture

The two-stage Balb/c 3T3 cell assay was performed as described previously with slight modifications [2,5,6]. The transformation protocol consisted of 25 days, divided in two phases: initiation between days 1 to 7 and promotion between days 7 to 16. Cells were plated at a density of 5x10⁵ cells per 100-mm dish in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum). After 48-h incubation, on day 1 of the assay, subconfluent cells were exposed to the metal mixture (2 μM NaAsO₂, 2 μM CdCl₂, and 5 μM Pb(C₂H₃O₂)₂·3HO) as the initiator stimuli or MNNG (N-methyl-N-nitro-N-nitroso-guanidine) (0.5 μg/mL) as a positive control during 4 h, and untreated cells were used as a negative control. After such initiator treatment, cells were harvested and replated at a density of 3 x10⁵. On day 4, cultures were replenished with fresh DMEM medium supplemented with 10% FBS. On days 7, 11 and 14, cells were replenished with medium supplemented with 1% ITS-A (insulin transferrin selenium-A) and 2% FBS, and the metal mixture (2 μM NaAsO₂, 2 μM CdCl₂, and 5 μM Pb(C₂H₃O₂)₂·3HO) or TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) (0.1 μg/ml) (positive control) was added as the promoter stimuli. On day 4 (during the initiation phase) cells were harvested for all of the experimental procedures (Figure 1A). On day 16, when morphological transformation is observed [5,6], the cells were fixed with ethanol, stained with 10% aqueous Giemsa and scored for foci formation. Transformed foci were scored according to criteria that discriminate transformed foci on the basis of 3 morphological characteristics: (1) basophilic staining; (2) a dense layer formation; and (3) random orientation of cells at the edges of foci [33]. Foci less than 2-mm diameter were not scored. Relative Colony Formation Efficiency (RCFE) was calculated as the number of foci per dish in experimental conditions/number of foci per dish in control conditions. The experimental conditions tested for foci formation on day 16 were Control (untreated cells) and Metals/Metals to probe initiator and promoter capacities of the metal mixture (Figure 1A).

Two-stage Balb/c 3T3 cell assay modified for pre-miR-222 transfection

The two-stage Balb/c 3T3 cell assay was performed as described before. The transformation protocol, consisted of 25 days, was modified for pre-miR-222 transfection as initiator and promoter stimulus. Cells were plated at a density of 5x10⁵ cells per 100-mm dish in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum). After 48-h incubation, on day 1 of the assay, subconfluent cells were transfected with the pre-miR-222 molecule (5 pmol) as the initiator stimuli, and untreated cells were used as a negative control. After such initiator treatment, cells were harvested and replated at a density of 3 x10⁵. On day 4, cultures were replenished with fresh DMEM medium supplemented with 10% FBS. On days 7, 11 and 14, cells were replenished with medium supplemented with 1% ITS-A (insulin transferrin selenium-A) and 2% FBS, and transfection of the pre-miR-222 molecule (5 pmol) was used as the promoter stimuli. On day 4 (during the initiation phase) cells were harvested for all of the experimental procedures (Figure 1B). On day 13, when morphological transformation was observed, the cells were fixed with ethanol, stained with 10% aqueous Giemsa and scored for foci formation. Transformed foci scoring and Relative Colony Formation Efficiency (RCFE) was calculated as described before. The experimental conditions were as follows: Control (untreated cells); Pre-miR-222/Metals to probe initiator capacity of miR-222; Metals/Pre-miR-222 to probe the promoter capacity of miR-222; and Pre-miR-222/Pre-miR-222 to probe both capacities of miR-222 (Figure 1B).

Cell viability assay

Viability was determined using double staining (FDA (fluorescein diacetate) (5 mg/mL) and EtBr (ethidium bromide) (0.2 mg/mL) following standard procedures [34]. Briefly, the FDA dye freely passes through cell membranes and is cleaved in viable cells by intracellular esterase. The resulting fluorescent product is retained within the cell, and its intensity correlates with cellular function.

RNA isolation

On day four of the Balb/c 3T3 transformation assay, during the initiation stage, control and treated cells were harvested with 0.2% PBS-EDTA (phosphate buffered saline-ethylenediaminetetraacetic acid) and centrifuged to remove the medium. Total RNA was immediately extracted from 1 × 10⁵ cells using the ZR RNA MicroPrep (Zymo Research; CA, USA) isolation kit according to the manufacturer's protocol for miRNA analysis and with the Maxwell 16 LEV Simply RNA cells kit (Promega; WI, USA) on a Maxwell 16 Instrument (Promega) for mRNA evaluation. Total RNA was analyzed on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent; CA, USA) for miRNA and with a Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific; DE, USA) spectrophotometer for mRNA integrity evaluation and sample quantification; samples were then aliquoted and stored at -80 °C.

miR-222 RT-qPCR

Mus musculus miR-222 expression was determined by RT-qPCR (reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction), and all of the reagents were purchased from the same supplier (Applied Biosystems; CA, USA). For miRNA cDNA (complementary

DNA) synthesis, RNA was reverse transcribed with the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit and TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-222 primer, and real time PCR was performed using TaqMan Universal Maser Mix II (no UNG (uracil-N-glycosylase)) along with labeled TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-222 primers. The mammalian U6 non-coding small nuclear RNA (U6 snRNA) was used for data normalization, and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ comparative method (described on the Applied Biosystems ABI Prism User Bulletin No. 2, and explained by Livak and Schmittgen, 2001 [35]) was applied to calculate relative changes in gene expression determined from quantitative experiments.

Rad51c mRNA RT-PCR

Rad51c gene expression was assessed by endpoint RT-PCR using the Access RT-PCR System kit (Promega) and mouse Rad51c recombinase primers (IDT; IA, USA) in cells treated with the metal mixture or in cells in which miR-222 expression was up- and down-regulated; we employed the mouse Hprt1 gene as an endogenous control across all experiments. The RT-PCR products were resolved on a 2.5% agarose gel containing EtBr (0.5 mg/mL), visualized under UV (ultraviolet) light on the MiniBIS Pro Imaging System (DNR; JRS, Israel) and quantified by means of band intensity with the Kodak 1D Image Analysis v3.5 software (Kodak; NY, USA).

Protein extraction and Rad51c immunoblot

Whole cell protein was extracted with Radio Immunoblot Precipitation Assay buffer (RIPA) and conventionally treated for specific immunodetection by western blot technique [36] of mouse Rad51c protein in cells treated with the metal mixture or cells in which miR-222 expression was up- and down-regulated. We used a mouse-specific rabbit anti-Rad51c polyclonal antibody (Cat. ab95201, Abcam; Camb., UK) and detected β -tubulin protein as an endogenous control for the experiments with a mouse anti- β -tubulin monoclonal antibody (Cat. 322600, Invitrogen, Camarillo, CA, USA). Horseradish Peroxidase (HRP)-coupled goat anti-rabbit IgG (immunoglobulin G) monoclonal (Cat. 816129, Invitrogen) and goat anti-mouse IgG monoclonal (Cat. 626520, Invitrogen) secondary antibodies were utilized for Rad51c and β -tubulin radiographical detection, respectively, with the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate kit (Millipore; MA, USA). Protein quantitation was performed in terms of band intensity with the Kodak 1D Image Analysis v3.5 software.

miR-222 and Rad51c luciferase assay

A luciferase reporter assay was performed in the easy-to-transfect Vero (African green monkey kidney cells) cell line to test the regulatory effect of miR-222 over Rad51c mRNA. The pEZXT05-Rad51c-3'UTR plasmid containing the Rad51c 3'UTR sequence, obtained from a public domain gene sequence database, was inserted downstream of the secreted Gaussia luciferase (Gluc) reporter gene inside a vector system driven by the SV40 promoter for expression in mammalian cells. The vector was purchased from GeneCopoeia (MD, USA), and the cells were transfected with EndoFectin PLUS reagent from the same supplier. After successful transfection, an mRNA consisting of the Gluc and the 3' UTR target sequence is transcribed; thus, when it is co-transfected with the synthetic mmu-miR-222 mature sequence (5 pmol) (GeneCopoeia), the study of mRNA-miRNA target interaction can be easily observed in terms of the Gluc activity detected in the culture medium, which was measured using the Secrete Pair Dual Luminescence Assay kit (GeneCopoeia). As an internal control, a secreted Alkaline Phosphatase (SEAP) activity reporter, driven by a CMV promoter, was cloned into the same vector and used for transfection-normalization across sample comparison. Additionally, a negative control plasmid lacking the Rad51c 3'UTR sequence (pEZXT05) was used to demonstrate the null effect of miR-222 on Gluc assay when Rad51c is not present. Gluc and SEAP activities were read on the FLx800 Microplate Fluorescence/luminescence Reader (BioTek Instruments; VT, USA) with the KCjunior v1.41.8 software (BioTek).

miR-222 precursor and inhibitor molecule transfection

Balb/c 3T3 cells were transfected with 5 pmol of the miR-222 precursor or inhibitor molecule (pre-miR-222 and anti-miR-222, respectively) for 24 h using the siPORT NeoFX transfection solution (all reagents from Ambion; MA, USA) to induce the up- or down-regulation of miR-222 expression, which was confirmed by RT-qPCR as described earlier in this manuscript (Supplementary figure 1).

Neutral single cell gel electrophoresis assay

To evaluate DNA DSBs induced by the up- or down-regulation of miR-222 expression, the neutral comet assay was performed in Balb/c 3T3 cells as described previously [37] under pre-miR-222 or anti-miR-222 transfection conditions. Slides were prepared per duplicate; 50,000 cells were mixed with 75 μ L of a 0.7% LMP (low melting point) agarose solution and loaded onto microscope slides prelayered with 150 μ L of 0.5% normal melting point agarose, after which a third layer of LMP agarose was added. After incubation with lysis buffer for 24 hours (cold EDTA sodium salt 30 mM and SDS 0.5% pH 7), the slides were subjected to a 2-h unwinding and 25–V, 20-mA electrophoresis for 25 min (boric acid 90 mM, EDTA 200 mM and Tris Base 117 mM pH 7.8), dehydrated with 96% ethanol, stained with EtBr and visualized under a fluorescence microscope (20x) to determinate the Olive Tail Moment (OTM) of 100 comets/slide with the Komet 5 Single Cell Gel Electrophoresis software (Andor Technology Ltd.; N-IRL, UK). As positive control, a 3-Gy gamma radiation was applied [38] to challenge the HR DNA repair mechanism.

Statistical analysis

All of the data were analyzed using a Welch-corrected unpaired two-tailed t-test to determine differences between experimental conditions using the Prism 6 (GraphPad; CA, USA) statistics package. Results with a p-value < 0.05 were considered statistically significant. A one-way ANOVA was performed for foci formation results, and Tukey post-hoc (95% CI (confidence interval)) test was applied for comparisons between groups. Results with a p-values < 0.05 were considered as statistically significant.

Results

Prediction of miR-222 and Rad51c interaction

We identified the possible direct binding of the miR-222 seed sequence on five different sites throughout the 3'UTR of Rad51c mRNA using the miRWalk, microRNA and miRBase databases. The miRWalk algorithm allowed us to predict the regulation of this gene target with a p-value < 0.05 (p=0.0413), strengthening the possibility of its negative regulation by miR-222.

MiR-222 expression is up-regulated when cells are treated with the metal mixture. Viability studies revealed that 2 μM NaAsO₂, 2.4 μM CdCl₂, and 4.8 μM Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O exposure had no cytotoxic effect (92.66%±0.88 viability) relative to the control condition (95%±0.57) (Figure 2A). In a previous work [2], we demonstrated mmu-miR-222 over-expression on day four of the Balb/c 3T3 transformation assay in cells treated with the As-Cd-Pb metal mixture. Here, we corroborate the result by RT-qPCR and observed a significant elevation in the levels of mmu-miR-222 ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}} = 29.04\pm0.55$) relative to the control condition ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}} = 1.0\pm0.10$) (Figure 3A).

Rad51c mRNA and protein expression in cells treated with the metal mixture

Once we confirmed the up-regulation of miR-222 during metal-induced cellular initiation, we investigated the expression levels of its predicted target. First, by end-point RT-PCR, we measured the expression of Rad51c and observed the down-regulation of its mRNA by approximately 50% (Band Intensity (BI)=0.46±0.16) compared to the control (BI=1.0±0.09) (Figure 4A). Second, immunoblotting of the Rad51c protein was reduced by 10-fold (BI=0.09±0.02) compared with the control condition (BI=1.0±0.08) (Figure 5A).

Rad51c is a direct target of miR-222

Given the correlation between the up-regulation of miR-222 expression with the down-regulation of the Rad51c gene and protein expression, we tested whether this correlation could be attributed to the direct negative regulation of Rad51c by miR-222 by transfecting the Vero strain with a luciferase reporter plasmid containing the 3'UTR of the gene in question. The pEZXTM05-Rad51c-3'UTR plasmid was co-transfected with the synthetic mmu-miR-222 mature sequence, and a plasmid lacking the Rad51c 3'UTR sequence (pEZXTM05) was used as negative control. Our results revealed an approximately 80% decrease in Gluc activity when the cells were transfected with miR-222 but no significance differences when the pEZXTM05 plasmid was co-transfected with the miRNA sequence (Figure 6).

Precursor-induced miR-222 over-expression exerts the same effects on Rad51c

Our work demonstrated that miR-222 is over-expressed in Balb/c 3T3 cells treated with the As-Cd-Pb mixture and that miR-222 is a direct negative regulator of Rad51c mRNA translation through its complementarity to the 3'UTR. Next, we wanted to determine the biological function and impact of this small RNA outside of the context of metal-induced initiation on cellular transformation. To answer this question, we induced the up- or down-regulation of miR-222 by transfecting Balb/c 3T3 cells with pre-miR-222 or anti-miR-222 for 24 h. The cellular viability assay demonstrated that the transfection of the Pre-miR-222 molecule had no cytotoxic effect (92.22%±0.88 viability) compared to the siPORT (transfection reagent) condition (89.66%±1.69) (Figure 2B). Seventy-two hour after transfection, on day four, we evaluated the expression of miR-222 by RT-qPCR and observed a significant elevation in the levels of this miRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}} = 39.21\pm0.44$) relative to the siPORT condition ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}} = 1.0\pm0.09$) (Figure 3B). Cells over-expressing miR-222 exhibited a decrease in Rad51c mRNA of approximately 50% (BI=0.47±0.04) compared with the siPORT condition (1.0±0.11) (Figure 4B) as well as a significant decrease, of around 80%, in the Rad51c protein expression (BI=0.17±0.04) relative to the siPORT condition (1.0±0.13) (Figure 5B). The same effect on Rad51c protein but not mRNA was observed in cells transfected with anti-miR-222 (BI=0.13±0.01) (Figure 5B). When pre-transfected cells were submitted to the 4 h metal mixture initiator treatment, only those over-expressing miR-222 showed a minor level of the Rad51c mRNA (BI=0.57±0.08) (Figure 4B) but not in its protein levels (Figure 5B). Finally, as we observed in Figure 5A, the cells treated with the transfection reagent before the metal mixture (siPORT/Metals condition) showed a decrement in the protein of Rad51c (BI=0.15±0.02) compared to the siPORT condition (Figure 5B). Full-size gel and blot images are shown in supplementary figure 2.

DNA DSBs in cells over-expressing miR-222

Having demonstrated that miR-222-induced overexpression causes the same effect as the metal mixture on the mRNA and protein levels of Rad51c, we attempted to investigate the consequence of such regulation on HR-mediated DNA damage repair. Therefore, we evaluated the presence of DNA DSBs in cells transfected with the pre-miR-222 or anti-miR-222 and/or irradiated with gamma radiation at a dose of 3 Gy to challenge the HR mechanism response. We performed a neutral comet assay, measuring DNA DSBs as OTM and observed that this value was higher (7.76±0.49) in cells over-expressing miR-222 at 5 min (Pre-miR-222/3 Gy) (10.01±0.44, control (3Gy)=6.47±0.5) and 24 h post-irradiation (Pre-miR-222/24 h Post-3 Gy) (15.94±0.45), control (24 h) =11.6±0.6) relative to the control. Significant increases in DNA damage were also observed in the 24 h Post-3 Gy condition compared with the control (Figure 7).

Treatment with the precursor of miR-222 as an initiator stimulus

Finally, we evaluated the role of the regulation of Rad51c through this small RNA at the end-point (morphological transformation) of the Balb/c 3T3 assay by replacing the initiator and/or promoter metal-mixture stimulus (which induces cellular transformation on day 16 of the model [5,6]) with transfection with the pre-miR-222 molecule and following the cultures until transformation, which occurred on day 13 of the assay. Then, we calculated the RCFE (No. foci/dish of each experimental condition/No. foci per dish of the control of day 16 or day 13) (Figure 8C). As expected, we observed an increase in the number of cells (1.3±0.12) initiated and promoted by the As-Cd-Pb mixture (Metals/Metals) on day 16. Employing pre-miRNA as an initiator combined with a known promoter (TPA) increased the RCFE more significantly (1.9±0.2 and 2.19±0.09, respectively). We observed in figure 8B that percentage of foci formation in the Pre-miR-222/Pre-miR-222 condition (%=168.46±0.09) was larger than in the Metals/Metals condition (%=130±0.01) (Figure 8A).

Discussion

The cell viability of the Balb/c 3T3 cultures during the initiation stage of the transformation assay did not exhibit differences upon metal exposure relative to the control, (Figure 2A), thereby indicating that the results presented in this manuscript are due to the initiation process and not due to the cytotoxic effect of the 2 μM NaAsO₂, 2.4 μM CdCl₂, and 4.8 μM Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O treatment, as demonstrated in previous works of our laboratory exposing the human hepatocyte WRL-68 cells to the same metal-mixture [34].

Little is known about the induction mechanisms of miRNA transcription under certain stimuli, and even less is known about the induction of miRNA transcription in response to metals treatment; to date, there are only correlations between exposure and the

elevated levels of expression [2]. Nevertheless, our finding of the ability of the mixture of 2 μM NaAsO_2 , 2.4 μM CdCl_2 , and 4.8 μM $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ to induce miR-222 expression in the initiation stage of the Balb/c 3T3 cell transformation assay (Figure 3A) may be explained in part by the significant evidence regarding how these metals may regulate mRNA expression. Some of the recognized mechanisms include genetic mutation, transcription factor and cell signaling deregulation, and epigenetic events [39-42]. Because the genomic background of miR-222 is intergenic and has its own regulatory sequences [43], and since this kind of miRNA behaves like protein-coding genes [44], we suggest that the metal-associated mRNA regulation mechanisms may apply. Furthermore, Cd favors MAPK (mitogen-activated protein kinases) signaling [45] and is known to induce miR-222 expression [46]. We observed a decrease in the mRNA (Figure 4A) and protein (Figure 5A) levels of Rad51c in cells treated with the metal mixture; this result is consistent with the literature data demonstrating that As and Pb inhibit Rad51-dependent HR repair of DNA DSBs [3,47]. Furthermore, we demonstrated the inhibition of Rad51c directly through the complementarity of its 3'UTR with the miR-222 sequence using a luciferase activity reporter assay (Figure 6), confirming our bioinformatics prediction and validating a novel target for this small RNA.

When we took the miR-222/Rad51c regulation system out of the metal-initiation context, manipulating the expression of the miRNA without compromising the cell viability (Figure 2B), we observed the importance of miR-222 expression specifically; a significant decrease in Rad51c gene and protein expression (Figures 4B and 5B, respectively) was observed when we induced its expression with pre-miR-222 transfection (Figure 3B), allowing us to conclude that miR-222 has the same effects as the As-Cd-Pb mixture. As expected, the cells transfected with the anti-miR-222 molecule did not induce changes in the mRNA expression of Rad51c (Figure 4B) but did provoke an inhibition at the protein level (Figure 5B); this result is difficult to explain, but we can speculate that this miRNA down-regulation should trigger the impairment of several gene and cellular functions, including the up-regulation of the ubiquitin or proteasome members that may affect Rad51c and other targets [48], although studies of this response are needed.

After confirming the miR-222 up-regulation and Rad51c down-regulation, we tested for HR-mediated DNA repair in Balb/c 3T3 under those conditions by inducing DSBs with gamma radiation and testing its presence or absence at 5 min, 1 h and 24 h after the challenge (Figure 7). We observed an increase in DNA damage in cells over-expressing the miRNA alone, indicating that miR-222 plays a determinant role during the initiation of the transformation process through Rad51c inhibition and the consequent HR repair inhibition. This inhibition may lead to the characteristic damage accumulation and genomic instability of this stage of the process [7,8]. This effect was also detected in the cells 5 min and 24 h post-irradiation, confirming the role of miR-222 as demonstrated by the exacerbation on DNA damage. Furthermore, the increase at 24 h post-irradiation may reflect the unrepaired DNA damage once cells have passed at least one cycle of division (according to the information provided by ATCC for the A31-1-1 clone), which is consistent with the fact that genomic instability is required for initiation of cellular carcinogenesis.

Finally, we needed to elucidate whether the effects of miR-222 are relevant to the cellular transformation endpoint assessed by morphological changes and foci formation in our Balb/c 3T3 model [2,5,6], where we have observed transformation on day 16 of the 25-day assay. When we replaced the metal mixture, administering the pre-miR-222 molecule as initiator and/or promoter stimulus, and compared foci formation with that observed using the As-Cd-Pb mixture as an initiator and promoter (Metals/Metals). We observed that the use of the pre-miR-222 as an initiator (combined with the known promoter TPA [49]) accelerates transformation and generates such foci 72 h earlier (on day 13) than treatment with metals (Figure 8). Furthermore, pre-miR-222 also exacerbates the number of foci when it is used as a promoter stimulus, but not when is used only as a promoter stimulus (along with the known MNNG [49]), confirming the cellular consequences of elevated levels of this miRNA during the initiation process.

In conclusion, our results suggest that miR-222 plays an important role as an initiator of the carcinogenesis. Thus, miR-222 plays an essential role early in the process of carcinogenesis and is not merely a marker of various established cancers [26-29]. Together, our data further our understanding of metal mixture carcinogenesis.

Conclusions

The mixture of As-Cd-Pb induces miR-222 up-regulation in the initiation process of the Balb/c 3T3 in vitro model of transformation and directly regulates the mRNA and protein expression of the recombinase Rad51c, which participates in DNA DSB repair through the homologous recombination to maintain genomic stability. We were able to demonstrate this regulation in the absence of metal-induced cellular transformation and demonstrate that miR-222 expression has serious repercussions; overexpression of miR-222 impairs homologous recombination-mediated DNA DSB repair as well as the acceleration and exacerbation of morphological transformation in the Balb/c 3T3 in vitro model. Our results suggest that an increase in miR-222-mediated Rad51c inhibition contributed to the loss of genomic stability, initiating the carcinogenesis process.

Acknowledgments

We thank PAPIIT (IN214310) and CONACyT (152473) for financial support. MPM is a recipient of the CONACyT scholarship 229336, and this publication represents a large part of her doctoral thesis as student of the Biomedical Sciences PhD Program of the National Autonomous University of Mexico.

Conflict of interest statement

None declared.

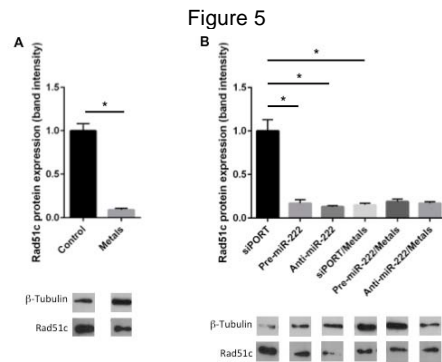
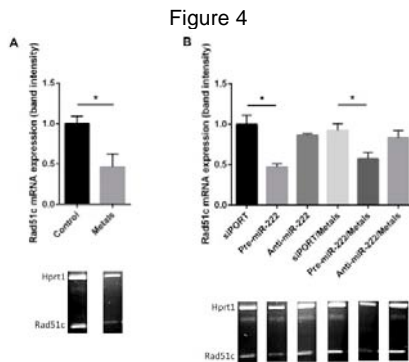
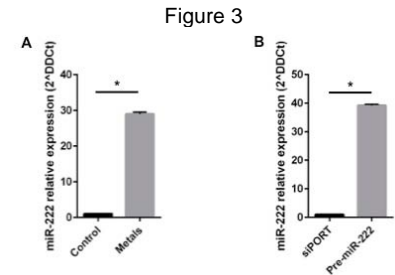
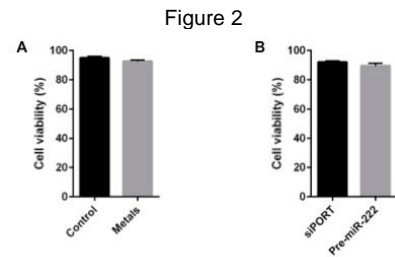
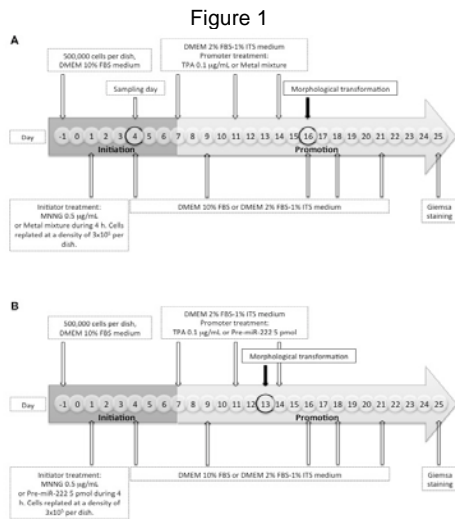
References

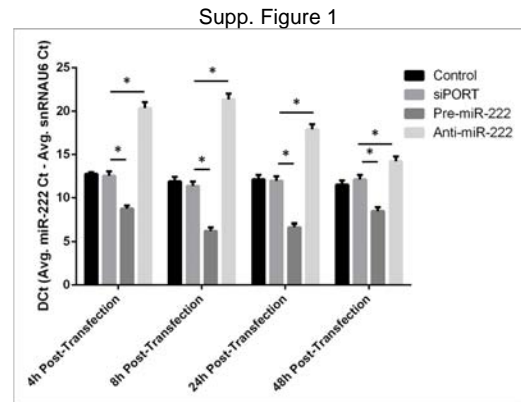
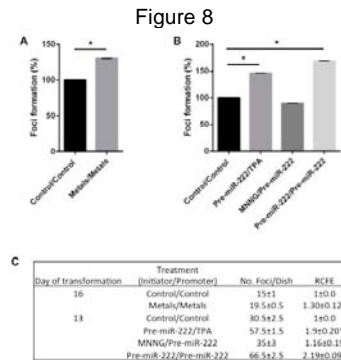
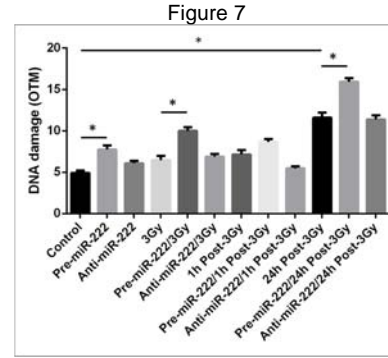
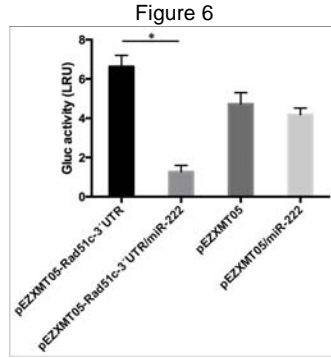
1. ATSDR. Interaction Profile for: Arsenic, Cadmium, Chromium and Lead. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry 160. 2004.
2. Martinez-Pacheco M, Hidalgo-Miranda A, Romero-Cordoba S, Valverde M, Rojas E. mRNA and miRNA expression patterns associated to pathways linked to metal mixture health effects. *Gene* 2014;533(2):508-514.
3. Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of toxicology* 2008;82(8):493-512.
4. Leonard SS, Bower JJ, Shi X. Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Molecular and cellular biochemistry* 2004;255(1-2):3-10.
5. Martin SA, Emilio R, Mahara V. Role of oxidative stress in transformation induced by metal mixture. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2011;2011:935160.

6. Rodriguez-Sastre MA, Rojas E, Valverde M. Assessing the impact of As-Cd-Pb metal mixture on cell transformation by two-stage Balb/c 3T3 cell assay. *Mutagenesis* 2014;29(4):251-257.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-674.
8. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411(6835):366-374.
9. Hu H, Gatti RA. MicroRNAs: new players in the DNA damage response. *Journal of molecular cell biology* 2011;3(3):151-158.
10. Hegre SA, Saetrom P, Aas PA, Pettersen HS, Otterlei M, Krokan HE. Multiple microRNAs may regulate the DNA repair enzyme uracil-DNA glycosylase. *DNA repair* 2013;12(1):80-86.
11. Crosby ME, Kulshreshtha R, Ivan M, Glazer PM. MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress. *Cancer research* 2009;69(3):1221-1229.
12. Xie QH, He XX, Chang Y et al. MiR-192 inhibits nucleotide excision repair by targeting ERCC3 and ERCC4 in HepG2.2.15 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2011;410(3):440-445.
13. Valeri N, Gasparini P, Braconi C et al. MicroRNA-21 induces resistance to 5-fluorouracil by down-regulating human DNA MutS homolog 2 (hMSH2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107(49):21098-21103.
14. Zhong Z, Dong Z, Yang L, Chen X, Gong Z. MicroRNA-31-5p modulates cell cycle by targeting human mutL homolog 1 in human cancer cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2013;34(3):1959-1965.
15. Valeri N, Gasparini P, Fabbri M et al. Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107(15):6982-6987.
16. Gasparini P, Lovat F, Fassan M et al. Protective role of miR-155 in breast cancer through RAD51 targeting impairs homologous recombination after irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014;111(12):4536-4541.
17. Huang JW, Wang Y, Dhillon KK et al. Systematic screen identifies miRNAs that target RAD51 and RAD51D to enhance chemosensitivity. *Molecular cancer research : MCR* 2013;11(12):1564-1573.
18. Wang Y, Huang JW, Calses P, Kemp CJ, Taniguchi T. MiR-96 downregulates REV1 and RAD51 to promote cellular sensitivity to cisplatin and PARP inhibition. *Cancer research* 2012;72(16):4037-4046.
19. Song L, Dai T, Xie Y et al. Up-regulation of miR-1245 by c-myc targets BRCA2 and impairs DNA repair. *Journal of molecular cell biology* 2012;4(2):108-117.
20. Sun C, Li N, Yang Z et al. miR-9 regulation of BRCA1 and ovarian cancer sensitivity to cisplatin and PARP inhibition. *Journal of the National Cancer Institute* 2013;105(22):1750-1758.
21. Xu K, Chen Z, Qin C, Song X. miR-7 inhibits colorectal cancer cell proliferation and induces apoptosis by targeting XRCC2. *Oncotargets and therapy* 2014;7:325-332.
22. Cerbinskaite A, Mukhopadhyay A, Plummer ER, Curtin NJ, Edmondson RJ. Defective homologous recombination in human cancers. *Cancer treatment reviews* 2012;38(2):89-100.
23. Lu W, Wang X, Lin H, Lindor NM, Couch FJ. Mutation screening of RAD51C in high-risk breast and ovarian cancer families. *Familial cancer* 2012;11(3):381-385.
24. Pelttari LM, Nurminen R, Gylfe A, Aaltonen LA, Schleutker J, Nevanlinna H. Screening of Finnish RAD51C founder mutations in prostate and colorectal cancer patients. *BMC cancer* 2012;12:552.
25. Scheckenbach K, Baldus SE, Balz V et al. RAD51C--a new human cancer susceptibility gene for sporadic squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *Oral oncology* 2014;50(3):196-199.
26. Pineau P, Volinia S, McJunkin K et al. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107(1):264-269.
27. Manikandan J, Aarthi JJ, Kumar SD, Pushparaj PN. Oncomirs: the potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer. *Bioinformation* 2008;2(8):330-334.
28. Dias F, Teixeira AL, Santos JI et al. Renal cell carcinoma development and miRNAs: a possible link to the EGFR pathway. *Pharmacogenomics* 2013;14(14):1793-1803.
29. Puerta-Gil P, Garcia-Baquero R, Jia AY et al. miR-143, miR-222, and miR-452 are useful as tumor stratification and noninvasive diagnostic biomarkers for bladder cancer. *The American journal of pathology* 2012;180(5):1808-1815.
30. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *Journal of biomedical informatics* 2011;44(5):839-847.
31. Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome biology* 2010;11(8):R90.
32. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research* 2011;39(Database issue):D152-157.
33. Group INEW. 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 research* 1985;45:2395-2399.
34. Hernandez-Franco P, Silva M, Valverde M, Rojas E. Induction of oxidative stress by low doses of lead in human hepatic cell line WRL-68. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 2011;24(5):951-958.
35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-408.
36. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979;76(9):4350-4354.
37. Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 1999;722(1-2):225-254.
38. Olive PL. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *International journal of radiation biology* 1999;75(4):395-405.

39. Arita A, Costa M. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium. *Metallomics : integrated biometal science* 2009;1(3):222-228.
40. Hou L, Wang D, Baccarelli A. Environmental chemicals and microRNAs. *Mutation research* 2011;714(1-2):105-112.
41. Salnikow K, Zhltkovich A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chemical research in toxicology* 2008;21(1):28-44.
42. Wang G, Fowler BA. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicology and applied pharmacology* 2008;233(1):92-99.
43. Oszolak F, Poling LL, Wang Z et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & development* 2008;22(22):3172-3183.
44. Mahony S, Corcoran DL, Feingold E, Benos PV. Regulatory conservation of protein coding and microRNA genes in vertebrates: lessons from the opossum genome. *Genome biology* 2007;8(5):R84.
45. Jonak C, Nakagami H, Hirt H. Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant physiology* 2004;136(2):3276-3283.
46. Cardinali B, Castellani L, Fasanaro P et al. Microrna-221 and microrna-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells. *PloS one* 2009;4(10):e7607.
47. Kryeziu K, Jungwirth U, Hoda MA et al. Synergistic anticancer activity of arsenic trioxide with erlotinib is based on inhibition of EGFR-mediated DNA double-strand break repair. *Molecular cancer therapeutics* 2013;12(6):1073-1084.
48. Bennett BT, Knight KL. Cellular localization of human Rad51C and regulation of ubiquitin-mediated proteolysis of Rad51. *Journal of cellular biochemistry* 2005;96(6):1095-1109.
49. Tsuchiya T, and Umeda, M. Relationship between exposure to TPA and appearance of transformed cells in MNNG-initiated transformation of BALC/c 3T3 cells. *Int J Cancer* 1997;73:271-276.

Figures





Supp. Figure 2

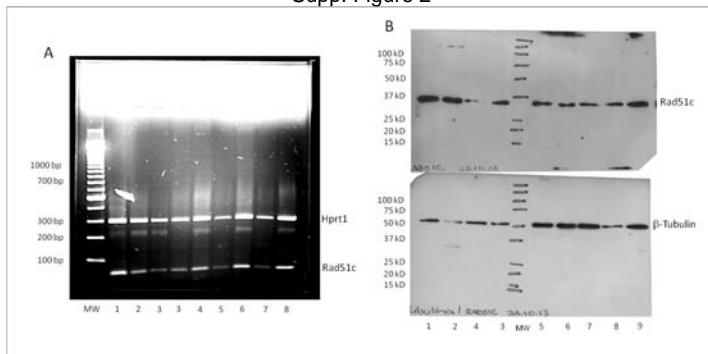


Figure legends

Fig. 1 (A) Scheme of the conventional two-stage Balb/c 3T3 cellular transformation assay with the metal mixture. Metal mixture: 2 μ M NaAsO₂, 2 μ M CdCl₂, and 5 μ M Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O; MNNG: positive initiator; TPA: positive promoter. Modified from Tsuchiya et al., 2005 and Silva-Aguilar et al., 2011. (B) Scheme of the two-stage Balb/c 3T3 cellular transformation assay for miR-222 as initiator and/or promoter test. Pre-miR-222: 5 pmol; MNNG: positive initiator; TPA: positive promoter.

Fig. 2 Percentage of cellular viability, measured using the FDA/EtBr method, of Balb/c 3T3 cells on day 4 (initiation phase) of the transformation assay. (A) Cells treated with the metal mixture; n=3, two-tailed unpaired t-test. (B) Cells treated with the transfection reagent (siPORT) alone and with the Pre-miR-222 molecule; mean±s.e., n=3, two-tailed unpaired t-test.

Fig. 3 Relative expression of mmu-miR-222 in Balb/c 3T3 cells on day 4 (initiation phase) of the transformation assay. (A) Cells initiated with the metal mixture, and (B) Cells treated with the Pre-miR-222 molecule. The results of RTqPCR are represented in terms of 2- $\Delta\Delta$ CT (DCT=Avg. CT miR222-Avg. CT snRNAU6; DDCT=DCT Metals or Pre-miR-222-DCT Control); endogenous control: snRNA U6, n=3, mean±s.e., two-tailed unpaired t-test, *p<0.05.

Fig. 4 Relative gene expression of Rad51c assessed by RT-PCR in Balb/c 3T3 cells on day 4 (initiation phase) of the transformation assay. (A) Cells treated with the metal mixture, and (B) Cells transfected with the precursor (Pre-miR-222) or inhibitory (Anti-miR-222) molecules of miR-222 with or without the metal mixture. Band intensity was normalized against the Control or siPORT (transfection reagent) condition; endogenous control: Hprt1; n=3, mean±s.e., two-tailed unpaired t-test, *p<0.05. Full-size gel image is presented in supplementary figure 2.

Fig. 5 Relative protein expression of Rad51c measured by immunoblot in Balb/c 3T3 cells on day 4 (initiation phase) of the transformation assay. (A) Cells treated with the metal mixture, and (B) Cells transfected with the precursor (Pre-miR-222) or inhibitory (Anti-miR-222) molecules of miR-222 with or without the metal mixture. Band intensity was normalized against the Control or siPORT (transfection reagent) condition; endogenous control: β -tubulin; n=3, mean \pm s.e., two-tailed unpaired t-test, *p<0.05. Full-size gel image is presented in supplementary figure 2.

Fig. 6 Gaussia Luciferase (Gluc) activity in Vero cells transfected with a plasmid containing the 3'UTR of Rad51c downstream the Gluc gene (pEZXT05-Rad51c-3'UTR) co-transfected with or without the mature sequence mimic of miR-222; the results are expressed as Luminescence Relative Units (LRU) and the zero represents the control condition (un-transfected cells). Endogenous control: Alkaline Phosphatase (AP), pEZXT05: negative control, n=3, mean \pm s.e., two-tailed unpaired t-test, *p<0.05.

Fig. 7 DNA DSBs in irradiated Balb/c 3T3 cells previously transfected with pre-miR-222 or anti-miR-222 molecules at 5 min (3 Gy), 1 h and 24 h post-exposure and evaluated with the neutral comet assay protocol. Results are presented in terms of Olive Tail Moment (OTM); dose of gamma radiation=3 Gy, n=2 slides/condition, 50 comets/slide, mean \pm s.e., two-tailed unpaired t-test, *p<0.05.

Fig. 8 Percentage of foci generation (Foci %) in the Balb/c 3T3 cellular transformation assay (RCFEs were divided over the Control/Control condition of the respective day and multiplied by 100). (A) Cellular transformation foci analysis on day 16 of the assay from cultures treated with the metal mixture as an initiator and promoter stimulus, compared to the control condition (Control/Control); and (B) Cellular transformation foci analysis on day 13 of the assay from cultures treated with the miR-222 precursor molecule as initiator stimulus and the known TPA promoter (Pre-miR-222/TPA), with the known initiator MNNG and the miR-222 precursor molecule as promoter stimulus (MNNG/Pre-miR-222) or with the miR-222 precursor molecule as initiator and promoter stimulus (Pre-miR-222/Pre-miR-222), compared to the control condition (Control/Control). n=2, mean \pm s.e., one-way ANOVA F(5,6)=49043 *p<0.0001, Tukey post-hoc comparisons of the groups 95% CI. (C) Relative colony formation efficiency (RCFE) of Balb/c 3T3 cells on day 16, for cells treated with the metal mixture as initiator and promoter stimulus, or day 13, for cells treated with the pre-miR-222 molecule as an initiator and/or promoter stimulus. n=2, mean \pm s.e., two-tailed unpaired t-test, *p<0.05.

Supp. Fig. 1 Mmu-miR-222 relative expression curve in Balb/c 3T3 at 4, 8, 24 and 48 h post-transfection with the Pre-miR-222 or Anti-miR-222 molecule. The results of RTqPCR are represented in terms of DCT=Avg. CT miR222-Avg. CT snRNAU6; endogenous control: snRNA U6, siPORT: transfection reagent; n=3, mean \pm s.e., two-tailed unpaired t-test, *p<0.05.

Supp. Fig. 2 (A) Representative full-size gel with Rad51c RT-PCR products and (B) representative full-size immunoblot of Rad51c (upper panel) and β -tubulin (lower panel), both in Balb/c 3T3 cells initiated with the metal mixture and/or transfected with the pre-miR-222 or anti-miR-222 molecules, band intensity was normalized against control condition. 1:Control, 2:siPORT, 3:Pre-miR-222, 4:Anti-miR-222, 5:Metals, 6:siPORT/Metals, 7:Pre.miR-222/Metals, 8:Anti-miR-222/Metals, 9:Irradiated Balb/c 3T3 cells (Rad51c antibody control), MW: molecular weight; endogenous control: Hprt1 (for RT-PCR) and β -tubulin (for immunoblot).

Anexo III: Figura complementaria 1

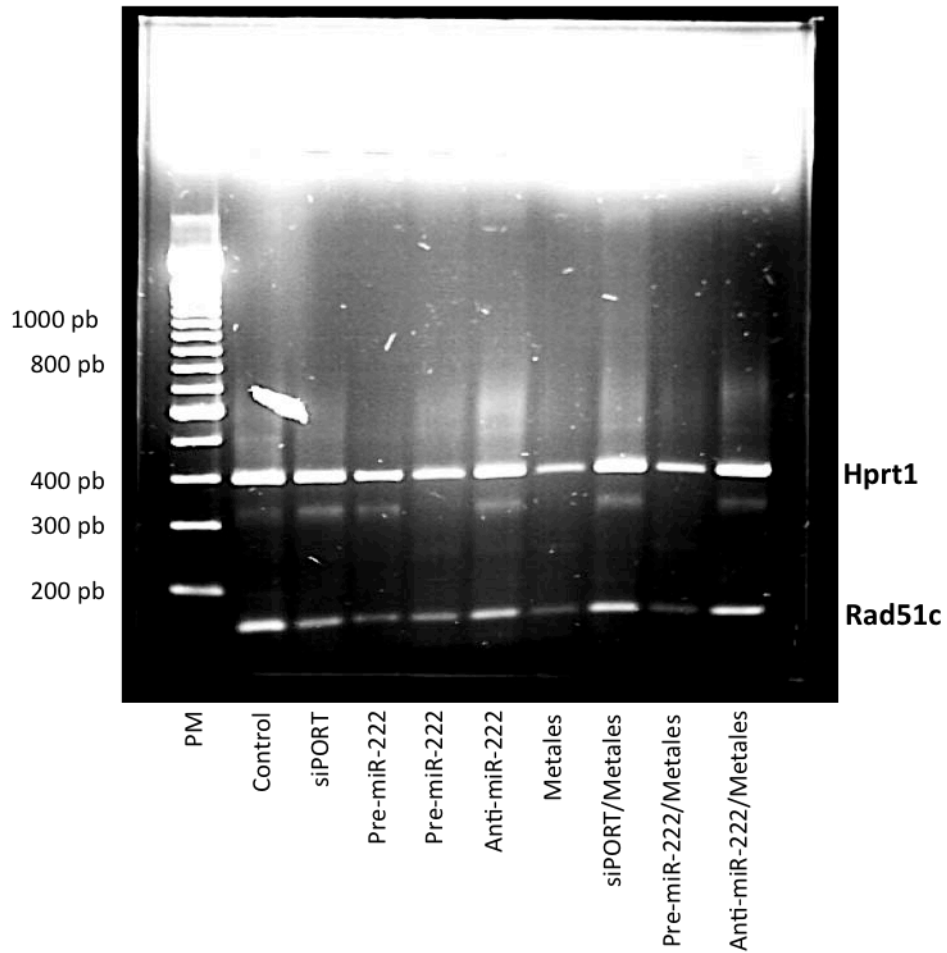


Fig. Comp. 1 Fotografía representativa del gel de agarosa con los productos de la RT-PCR de Rad51c en el día 4 del ensayo en las células Balb/3T3 tratadas con la mezcla de As, Cd y Pb y/o transfectadas con el pre-miR-222 o anti-miR-222. El peso molecular (PM) del amplicón de Rad51c es de 148 pares de bases (pb) y el de Hprt1 (control endógeno) es de 394 pb. Control: condición control, siPORT: agente de transfección, Pre-miR-222: molécula precursora de miR-222, Anti-miR-222: molécula inhibidora de miR-222, Metales: mezcla de metales.

Anexo IV: Figura complementaria 2

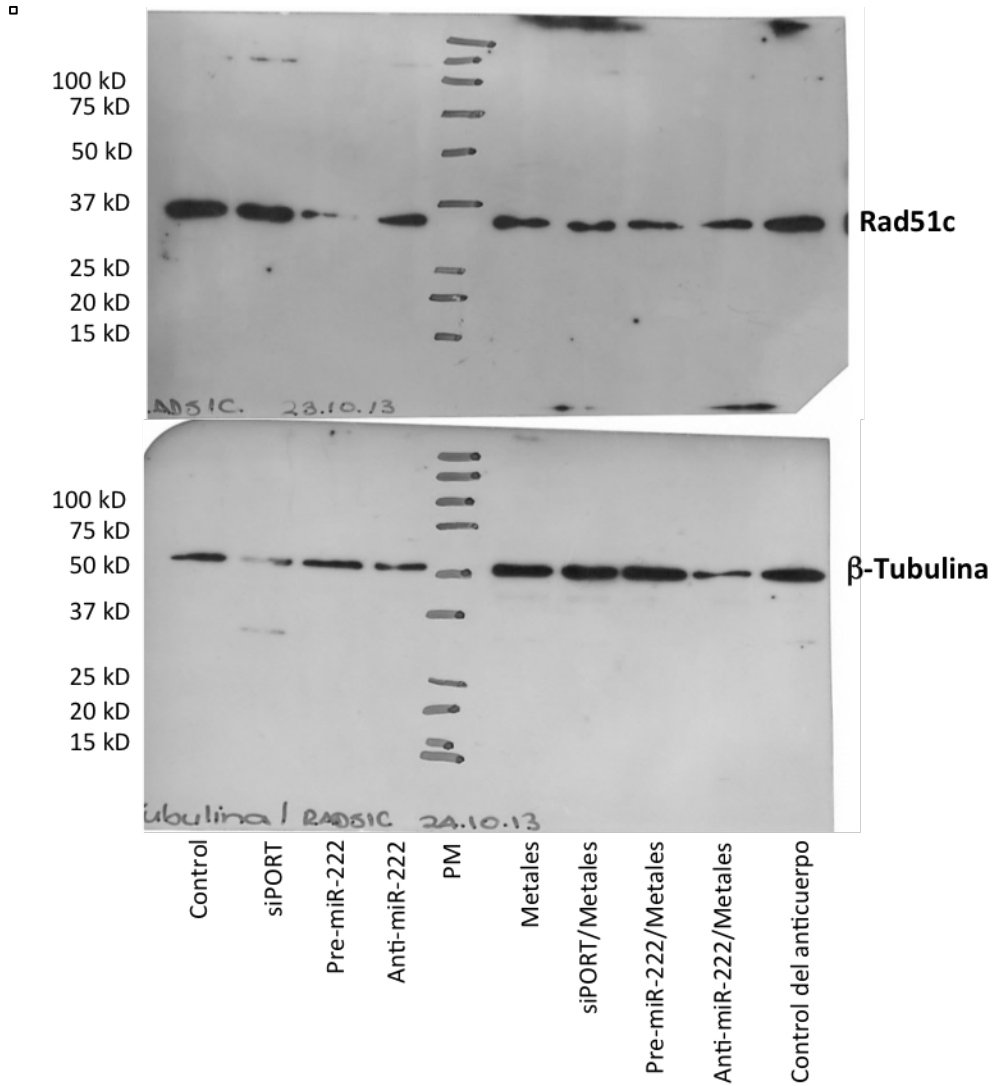


Fig. Comp. 2 Fotografía representativa de la placa de inmunoblot de Rad51c en el día 4 del ensayo en las células Balb/3T3 tratadas con la mezcla de As, Cd y Pb y/o transfectadas con el pre-miR-222 o anti-miR-222. El peso molecular de la proteína de Rad51c es de 42 kilodaltones (kD) y el de β -Tubulina (control endógeno) es de 66 kD. Control: condición control, siPORT: agente de transfección, Pre-miR-222: molécula precursora de miR-222, Anti-miR-222: molécula inhibidora de miR-222, Metales: mezcla de metales, Control del anticuerpo: células Balb/3T3 irradiadas con una dosis de 3 Gy de radiación gamma (inductor de la expresión de Rad51c).