



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PAPEL DE LA PROTEÍNA OLA-1 EN EL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN  
CELULAR INDUCIDO POR LA MEZCLA DE As-Cd-Pb**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Elia Martínez Baeza

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Mahara A. Valverde Ramírez  
**Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Leticia Rocha Zavaleta  
**Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**  
Dr. Alejandro García Carranca  
**Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. NOVIEMBRE 2016



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.

PMDCB/1182/2016

**Ella Martínez Baeza**  
**Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas**  
**Presente**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 15 de agosto del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Papel de la proteína OLA-1 en el proceso de transformación celular inducido por la mezcla de metales, As-Cd-Pb**", dirigida por el/la Dr (a) **Mahara Angélica Valverde Ramírez**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Luis Alonso Herrera Montalvo
VOCAL	Ana María Salazar Martínez
VOCAL	Perla Deyanira Maldonado Jiménez
VOCAL	Marina Macías Silva
SECRETARIO	Elizabeth Langley McCarron

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"Por mi raza hablará el espíritu"**  
**Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 15 de agosto de 2016**  
**Coordinador Académico**

  
**Dr. ROBERTO CORIA ORTEGA**

C.c.p. Tutor  
C.c.p. Archivo  
SFA/igg

contacto:mdcbq@posgrado.unam.mx tel. 56237006

**Formato: dg\_1**  
**VoBo Tutor,**  
**Revisión de tesis de doctorado**

24/06/2016

### **Subcomité Académico**

Yo Dr.( ):  Mahara A. Valverde Ramírez

Tutor (asesor de tesis) del estudiante:  Elia Martínez Baeza

Manifiesto haber leído, revisado y corregido el manuscrito de tesis que lleva como título:

Papel de la proteína OLA-1 en el proceso de transformación celular inducido por la mezcla de As-Cd-Pb.

Por lo que autorizo a que sea entregado para su revisión a los sinodales que el Subcomité Académico asigne para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas por la Universidad Nacional Autónoma de México.

Atentamente



Nombre completo y firma

Tutor

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que es mi segundo hogar y al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por permitirme seguir creciendo profesionalmente.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y a su departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, por permitirme abrirme las puertas para la realización de esta investigación y tesis para obtener el grado de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca de doctorado otorgada (Becario 378224) durante todo el proyecto para poder dedicar tiempo completo a la investigación. Así mismo por el apoyo CONACYT (proyecto 153781) otorgado para el financiamiento de la realización de los experimentos necesarios en esta investigación.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por los apoyos recibidos para asistir a un congreso nacional y uno internacional durante el desarrollo de mi doctorado.

A mi tutora Dra. Mahara Valverde Ramírez por abrirme las puertas de su laboratorio, por la confianza, apoyo y asesoramiento durante la realización de este proyecto, así como a la Dra. Alexandra Rodríguez Sastre, técnico académico del laboratorio.

A los miembros de mi comité tutorial Dra. Leticia Rocha Zabaleta y Dr. Alejandro García Carranca por su asesoría y consejos durante estos años y en cada uno de los tutorales.

A mi comité de examen, gracias por los consejos y correcciones realizadas durante la revisión de mi trabajo escrito y por siempre mostrarse en la mejor disposición.

## **INDICE**

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>3</b>
<b>Índice de figuras, gráficos y tablas</b>	<b>5</b>
<b>Introducción</b>	
• Mecanismos asociados a la carcinogenicidad de los metales	7
• Modelos <i>in vitro</i> para estudiar los mecanismos de carcinogénesis	16
• Efectos de la mezcla As-Cd-Pb en modelos experimentales y humanos.	20
• OLA-1	26
<b>Antecedentes directos de la transformación inducida por la mezcla de metales de As-Cd-Pb en el ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3</b>	<b>31</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>33</b>
<b>Objetivos</b>	
• General	33
• Particulares	34
<b>Estrategia experimental</b>	<b>35</b>
<b>Metodología</b>	
• Ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3	36
• Silenciamiento transitorio de OLA1 por medio de un siRNA	37
• Determinación de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno	38
• Determinación de la expresión proteica de OLA1 por western blot	39
• Medición de la actividad de factores de transcripción asociados al estrés oxidante	40
• Viabilidad celular por la prueba de viabilidad dual de fluorocromos (FDA/EtBr)	41
• Reactivos	42
<b>Resultados</b>	
• Expresión proteica de OLA1 y los niveles intracelulares de ERO en el modelo de transformación dos fases Balb/c 3T3 tratado con la mezcla de metales.	43
• Inducir el silenciamiento de OLA1 mediante un siRNA específico en la fase iniciadora	46

de la transformación celular inducida por la mezcla de metales.	47
• Efectos del silenciamiento de OLA1 sobre la capacidad transformante de la mezcla de metales.	48
• Determinación de los cambios en la expresión proteica de OLA1 y los niveles intracelulares de ERO en el silenciamiento de OLA1 en la fase iniciadora.	51
• Determinación de la capacidad transformante inducida por la mezcla de metales en el protocolo estándar y bajo el silenciamiento de OLA1 ante un reto oxidante adicional.	54
• Efecto del co-tratamiento con N-acetilcisteína (NAC) sobre la transformación celular inducida por la mezcla de metales.	56
• Efecto de la mezcla de metales sobre la actividad de actores de transcripción asociados al estrés oxidante, en el modelo de transformación de dos fases.	
<b>Discusión</b>	<b>59</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>67</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>68</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>69</b>
<b>Anexo</b>	<b>78</b>



## **RESUMEN**

La contaminación ambiental está formada por mezclas complejas de diversos xenobióticos entre los cuales, los metales pesados se encuentran presentes de forma ubicua, ya sea por los yacimientos naturales o como subproducto antropogénico. La mezcla de metales, arsénico (As); cadmio (Cd) y plomo (Pb) es encontrada comúnmente en ambientes laborales como son la metalurgia y el reciclamiento de baterías. Se ha observado que genera diversos efectos sobre la salud tales como enfermedades cardiovasculares, renales y cáncer. Para poder entender estos efectos carcinogénicos, en nuestro grupo de trabajo se ha estudiado anteriormente los efectos de la mezcla de metales ( $\text{NaAsO}_2$  2  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CdCl}_2$  2  $\mu\text{M}$  y  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  5  $\mu\text{M}$ ) en un modelo de transformación celular, habiendo reportado que es capaz de inducir transformación celular mediada por la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), con efectos negativos sobre la viabilidad celular y evasión de la senescencia. Dado que las especies reactivas de oxígeno juegan un papel muy importante en la transformación celular y que existe una proteína Olg-like ATPasa1 (OLA1) descrita como un regulador negativo de la respuesta antioxidante, se planteó como objetivo determinar el papel de OLA1 en la transformación celular de las células Balb/c 3T3 clona A31-1-1 inducida por la mezcla de metales As-Cd-Pb a través de la generación de ERO y bajo el silenciamiento de OLA1 durante la etapa iniciadora usando RNAs pequeños de interferencia (siRNA). En condiciones estándar, se observó que la expresión proteica de OLA1 aumenta a través de la etapa promotora de la transformación celular, así como los niveles de ERO. Bajo el silenciamiento de OLA1 observamos que la capacidad de la mezcla de metales para inducir la transformación celular muestra una disminución con efecto dependiente de los niveles de ERO, dado que durante la etapa iniciadora encontramos una disminución de estos. Asimismo, observamos que el silenciamiento de OLA1 tiene un efecto sinérgico con el co-tratamiento de un antioxidante [N-acetil-cisteína (NAC)]. Para entender los efectos observados por el silenciamiento de OLA1, determinamos si había cambios en la actividad de factores de transcripción asociados al estrés oxidante y encontramos que factores como EGR1, Smad3, AP1, HIF,  $\text{NF}\kappa\text{B}$  y p53 mostraron pérdida en su actividad bajo el silenciamiento de OLA1, los cuales pudieran estar contribuyendo a la inhibición de la transformación celular inducida por la mezcla de metales.

## **ABSTRACT**

Environmental pollution consists of complex mixtures of various xenobiotics including, heavy metals which are present ubiquitously, from natural deposits or anthropogenic subproducts. The metal mixture, arsenic (As), Cadmium (Cd) and lead (Pb) are present in occupational environment such as metallurgy and recycling of batteries. It has been found to cause several health effects such as cardiovascular and renal diseases and cancer. To understand these carcinogenic effects, our work group has previously studied the effects of the metal mixture (NaAsO<sub>2</sub> 2 μM, CdCl<sub>2</sub> 2 μM y Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O 5 μM) in a cell transformation model, in which, we have reported that it is able to induce cell transformation mediated by generation of reactive oxygen species (ROS), negative effects on cell viability and senescence evasion. Since ROS play an important role in cell transformation and there is a Obg-like ATPase1 (OLA1) protein described as a negative regulator of the cellular antioxidant response. We proposed as aim to determine the role of OLA1 in cell transformation of Balb/c 3T3 A31-1-1 clonal cells induced by the metal mixture As-Cd-Pb through ROS generation and knockdown OLA1 during the initiating stage, using small interference RNA (siRNA). Under standard conditions, we observed that protein expression of OLA1 increases in the promotion stage in cell transformation, along with levels of ROS. Knockdown OLA1, we observed a decrease in the ability of the metal mixture to induce cell transformation dependent on the levels of ROS, as was these ROS levels decreased during the initiation stage. We observed that knockdown OLA1 has a synergistic effect with the co-treatment of an antioxidant [N-acetylcysteine (NAC)]. To understand the effects observed by knockdown of OLA1, we determined if there were change in the activity of transcription factors associated with oxidative stress and found that EGR1, Smad3, AP1, HIF and p53 factors showed loss in activity of knockdown OLA1, which may be contributing to rescue of cell transformation induced by the metal mixture.

## ABREVIATURAS

<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>As</b>	Arsénico
<b>ATSDR</b>	Agencia para el registro de sustancias tóxicas y enfermedades
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>Cd</b>	Cadmio
<b>EGR1</b>	Factor de respuesta de crecimiento temprano
<b>EMT</b>	Transición epitelio mesénquima ( <i>Epithelial mesenchymal transition</i> )
<b>ERN</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>EtBr</b>	Bromuro de etidio
<b>cFDA</b>	Diacetato 5(6)-carboxifluoresceína
<b>GPx</b>	Enzima glutatión peroxidasa
<b>GR</b>	Enzima glutatión reductasa
<b>GSH</b>	Glutatión
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>IARC</b>	Agencia internacional para la investigación sobre el cáncer
<b>MAK</b>	Comisión alemana para la investigación de los riesgos para la salud de los compuestos químicos en el área de trabajo
<b>MNNG</b>	N-metil-N-nitrosoguanidina
<b>NAC</b>	N-acetil-cisteína
<b>NO·</b>	Radical óxido nítrico

<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Radical superóxido
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno singulete
<b>OH·</b>	Radical hidroxilo
<b>OLA1</b>	Obg-like ATPasa
<b>OTM</b>	Momento de la cola del cometa
<b>Pb</b>	Plomo
<b>RCFE</b>	Eficiencia relativa formadora de colonias ( <i>Relative colony formation efficiency</i> )
<b>siRNA</b>	RNA pequeños de interferencia
<b>shRNA</b>	RNA de horquilla corta
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TPA</b>	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

## **INDICE DE FIGURAS, GRAFICOS Y TABLAS**

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de carcinogénesis de los metales.	<b>7</b>
<b>Figura 2.</b> Iones metálicos y estrés oxidante como generadores de daño a macromoléculas.	<b>8</b>
<b>Figura 3.</b> Efecto de las ERO sobre vías de señalización y en el proceso multietapas de la carcinogénesis	<b>12</b>
<b>Figura 4.</b> Generación de ERO por los metales y su incremento al riesgo de cáncer.	<b>15</b>
<b>Figura 5.</b> Representación de la carcinogénesis <i>in vivo</i> y transformación celular <i>in vitro</i> .	<b>17</b>
<b>Figura 6.</b> Funciones celulares de la proteína OLA1.	<b>28</b>
<b>Figura 7.</b> Estrategia experimental realizada bajo tres condiciones: Protocolo estándar, silenciamiento de OLA1 y tratamiento oxidante adicional con co-tratamiento con NAC	<b>35</b>
<b>Figura 8.</b> Eventos desencadenados en la transformación celular inducida por la mezcla de metales modulada por OLA1	<b>66</b>
<b>Gráfico 1.</b> Eficiencia relativa formadora de colonias.	<b>43</b>
<b>Gráfico 2.</b> Cuantificación de la proteína de OLA1 por western blot.	<b>44</b>
<b>Gráfico 3.</b> Determinación de los niveles intracelulares de ERO.	<b>45</b>
<b>Gráfico 4.</b> Cuantificación de la proteína de OLA1 por western blot cuando se realiza el silenciamiento de OLA1 por medio de un siRNA específico.	<b>46</b>
<b>Gráfico 5.</b> Efecto del silenciamiento de OLA1 sobre la capacidad transformante de la mezcla de metales.	<b>47</b>
<b>Gráfico 6.</b> Expresión de la proteína de OLA1 en el modelo de transformación de dos fases con el silenciamiento de OLA1.	<b>49</b>
<b>Gráfico 7.</b> Determinación de los niveles intracelulares de ERO cuando se realizó el silenciamiento de OLA1.	<b>50</b>
<b>Gráfico 8.</b> Determinación de la actividad de factores de transcripción asociados al estrés oxidante a través del proceso de transformación celular inducido por la mezcla de metales, bajo el protocolo estándar.	<b>57</b>
<b>Gráfico 9.</b> Determinación de la actividad de factores de transcripción asociados al estrés oxidante a través del proceso de transformación celular inducido por la mezcla de metales, bajo el silenciamiento de OLA1.	<b>58</b>

<b>Figura R1.</b> Relación entre los niveles intracelulares de ERO y la expresión proteica de OLA1 en las células Balb/c 3T3 bajo un estímulo oxidante.	<b>52</b>
<b>Figura R2.</b> Imágenes representativas de los niveles de ERO y OLA1	<b>53</b>
<b>Tabla 1.</b> Ensayos de transformación celular de roedores <i>in vitro</i> .	<b>18</b>
<b>Tabla 2.</b> Estudios en modelos experimentales de la interacción de As, Cd y Pb y los efectos ocasionados.	<b>22</b>
<b>Tabla 3.</b> Estudios en humanos de la exposición a mezclas de As, Cd y Pb y los efectos ocasionados.	<b>23</b>
<b>Tabla R1.</b> Viabilidad celular en el ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3 en condiciones estándar, con el tratamiento adicional con FeCl <sub>3</sub> y con el co-tratamiento de NAC + FeCl <sub>3</sub> .	<b>54</b>
<b>Tabla R2.</b> Datos comparativos de la capacidad transformante, los niveles intracelulares de ERO y la expresión proteica de OLA1 entre el protocolo estándar de dos fases Balb/c 3T3, el reto oxidante adicional (FeCl <sub>3</sub> ) y el co-tratamiento con N-acetilcisteína.	<b>55</b>

# INTRODUCCIÓN

## Mecanismos asociados a la carcinogenicidad de metales.

La carcinogenicidad de los metales se ha explicado a través de diversos mecanismos entre los que destacan los siguiente (Beyersmann et al., 2008) y que se observa en la figura 1:

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

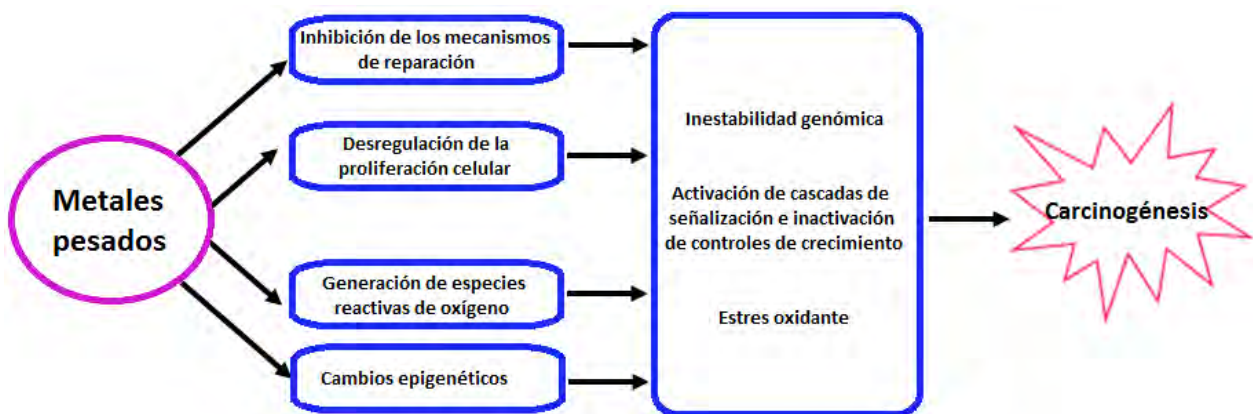
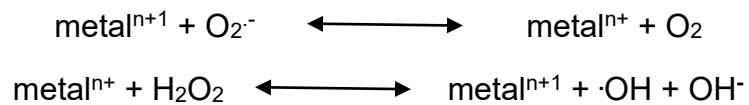


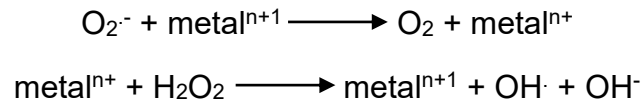
Figura 1. Mecanismo de carcinogénesis de los metales o metaloides (modificado de Beyersmann et al., 2008).

Si bien todos estos mecanismos están involucrados en la carcinogenicidad, se ha observado que la inducción de estrés oxidante es uno de los mecanismos asociados a la carcinogenicidad de metales que también explica los efectos mutagénicos de éstos, dado que frecuentemente se observa la formación de radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) y se asocia su generación a las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Valko et al., 2005):

### 1. Fenton



### 2. Haber-Weiss



Se sabe que estos radicales causan daño oxidante a lípidos, proteínas y DNA, como se ejemplifica en la figura 2 (Beyersmann et al., 2008).



Figura 2. Iones metálicos y estrés oxidante como generadores de daño a macromoléculas (Modificado de Beyersmann et al., 2008).



Dado que las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN) son producto del metabolismo celular o de la exposición a agentes capaces de generarlos. Bajos niveles de ERO y ERN son requeridas para el funcionamiento celular fisiológico, como pueden ser la defensa contra agentes infecciosos y la inducción de la respuesta mitogénica, entre otros. Las principales especies son producto de la ruptura o de la excitación del oxígeno, el ozono y el oxígeno en singulete ( $^1\text{O}_2$ ), y las ERO que están parcialmente reducidas, esto es, el superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical  $\text{OH}\cdot$  (Hansberg, 2002).

Sin embargo, el aumento en la producción de radicales resulta perjudicial para la supervivencia celular, a través del daño que se genera en macromoléculas (Valko et al., 2006). Las proteínas son blanco del ataque de ERO y ERN por peroxidación, daño a residuos de aminoácidos específicos, cambios en la estructura terciaria, degradación y fragmentación, desencadenando la pérdida de la actividad enzimática, alteraciones en las funciones celulares como producción de energía, interferencia con la creación del potencial de membranas y cambios en el tipo y niveles de proteínas celulares. Por otro lado, la interacción de ERO y ERN con el DNA causa varios tipos de daño, entre los que destacan la modificación de las bases, rupturas de cadena sencilla y doble cadena, pérdidas de purinas (sitiosapurínicos, AP), y de uniones DNA-proteínas y daño a los sistemas de reparación del DNA (Kohen & Nyska, 2002).

Niveles bajos de ERO tienen un papel importante en la proliferación celular y se ha observado un incremento de estos niveles en las células cancerosas. Estos efectos proliferativos se asocian con la activación de factores de transcripción como AP-1, NF $\kappa$ B, p53 y HIF entre otros, lo cual ha sido observado durante la progresión del tumor. ERO y los iones metálicos inhiben primariamente a los esteres de serina, treonina y tirosina, así como a las fosfatasa de fosfolípidos, principalmente por la interacción con los grupos sulfhidrilo sobre los residuos de cisteína, conduciendo a cambios estructurales, que alteran la conformación de las proteínas que regulan las cascadas de señalización de los factores de transcripción (Valko et al., 2006; figura 3a).

Dado que se ha demostrado la inducción de daño al DNA por la presencia de ERO y la inestabilidad genómica generada, se cree que tiene un papel múltiple en la iniciación, progresión y mantenimiento de un tumor (Figura 3b).

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

### **Arsénico**

La exposición a As es diversa, dado que puede estar presente ubicuamente en el ambiente, así como en ambientes laborales como la minería y la fundición; sin embargo, también se encuentra presente en diversos productos cosméticos y entra al organismo predominantemente en su forma inorgánica trivalente por difusión. El As pentavalente es capaz de atravesar las membranas celulares por mecanismos de transporte dependientes de energía, y una vez dentro es inmediatamente reducido a arsénico trivalente. El As inorgánico es representado como arsenito [As(III)] y arseniato [As(V)] y ambos pueden ser metabolizados a ácido monometil-arsénico [MMA(V)], ácido monometil-arsenioso [MMA(III)] o ácido dimetil-arsénico [DMA(V)] y ácido dimetil-arsenioso [DMA(III)] (Valko et al., 2016).

Tanto el MMA como el DMA producen estrés oxidante por la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial a través de su unión con la nicotinamida diamida (NAD), resultando en la disminución de ATP. El As genera radicales  $O_2^{\cdot-}$ ,  $^1O_2$ , radical peroxil ( $ROO\cdot$ ), óxido nítrico ( $NO\cdot$ ),  $H_2O_2$ , radicales peroxil dimetilarsénico

$[(\text{CH}_3)_2\text{AsOO}\cdot]$ ), incluyendo al radical dimetilarsénico  $[(\text{CH}_3)_3\text{As}\cdot]$ . Los mecanismos responsables de la generación de estas especies reactivas no están claros, pero algunos estudios proponen la formación de especies intermediarias de arsina ( $\text{AsH}_3$ ) (Beyersmann et al., 2008).

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

## **Cadmio**

El Cd es un metal pesado tóxico que está ampliamente distribuido en el aire, agua y corteza terrestre. Las fuentes principales de exposición son en la comida, el humo de cigarrillo y por las actividades antropogénicas. El tiempo biológico de vida media del Cd es muy largo, alrededor de 20-35 años, se acumula principalmente en pulmones, hígado, páncreas y riñón (Lee et al., 20012) y no es un metal que intervenga en reacciones redox o en reacciones Fenton, por lo cual es incapaz de generar de manera directa radicales libres, sus mecanismos indirectos de estrés oxidante involucran:

- Disminución de antioxidantes: el Cd interactúa principalmente con el antioxidante no enzimático más abundante, el glutatión. Adicionalmente el Cd inhibe significativamente el selenio, por medio de la formación de un complejo de selenio-cadmio que es excretado por la bilis. La deficiencia del selenio da como resultado una disminución en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) (Valko et al., 2016).

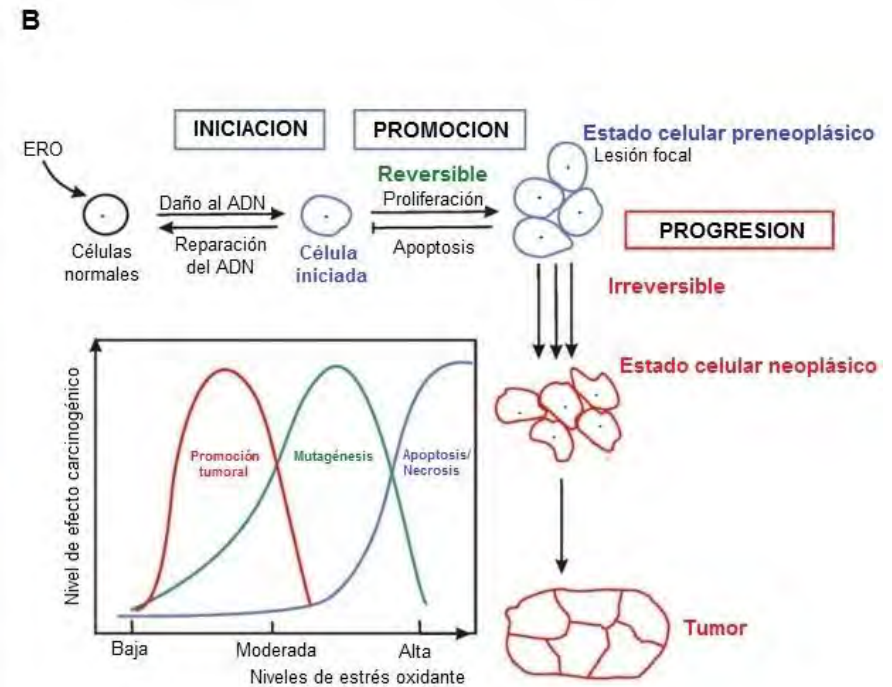
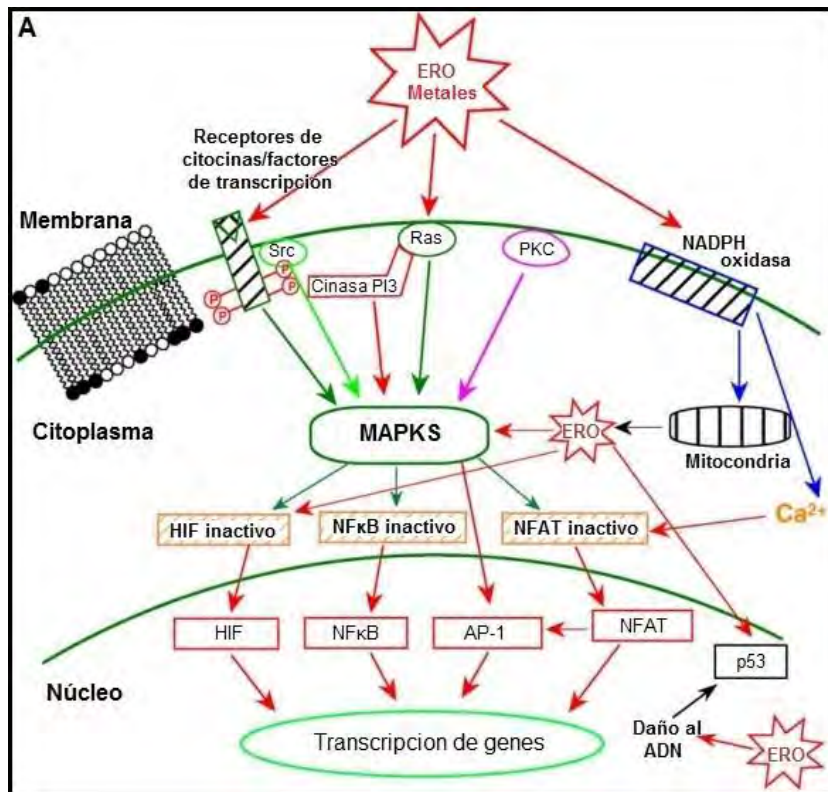


Figura 3. Efecto de las ERO sobre vías de señalización y en el proceso multietapas de la carcinogénesis. A) Inducción de las vías de señalización por la presencia de ERO e iones metálicos; B) Estados del modelo multietapas de carcinogénesis inducido por ERO y niveles de estrés oxidante presentes en distintos procesos biológicos (Modificado de Valko et al., 2006).

- Inhibición de enzimas antioxidantes: tales como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR) y GPx, esto principalmente por el desplazamiento de metales esenciales que son requeridos para la actividad de las enzimas (Beyersmann et al., 2008, Valko et al., 2016).
- Remplazando los iones de hierro y cobre en varias proteínas membranales y citoplásmicas: tales como la ferritina y la apoferritina, incrementando así la cantidad de iones hierro y cobre libres o quelados que pueden participar en el estrés oxidante por reacciones tipo Fenton (Valko et al., 2005).
- Inhibición de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, principalmente por la inhibición de los complejos II y III de la cadena respiratoria, resultando en la formación de una semiubiquinona (o semiquinona) que puede formar el radical  $O_2^-$  a partir del oxígeno molecular por la reacción de transferencia de electrones (Valko et al., 2016).

Otro mecanismo indirecto subyacente en el cual el Cd induce estrés oxidante es por la sustitución que tiene con el hierro, aumentando la cantidad de hierro libre que puede participar en la descomposición catalítica del  $H_2O_2$ , lo que lleva a la formación de radicales OH·, los cuales están implicados en la lipoperoxidación y posterior formación de malondialdehído e hidroxinonenal (Valko et al., 2016).

## **Plomo**

El Pb es un metal pesado que es ampliamente utilizado en varias aplicaciones industriales, dadas sus propiedades fisicoquímicas. Al igual que el As y Cd, el Pb es un metal tóxico que está presente en el ambiente y persiste por largos periodos en agua, polvo y productos manufacturados con plomo, tales como pilas, pinturas y cosméticos, así como el recubrimiento de piezas de joyería (Lee et al., 2012). Wozniak y Blasiak (2003) reportan que la exposición ocupacional a Pb induce cambios en el estado redox celular, mostrando una correlación negativa y significativa entre las rupturas de la hélice

del DNA con los niveles de GSH y muestran una correlación positiva con la producción de ERO. Uno de los mecanismos por los cuales el Pb genera estrés oxidante se debe a la inhibición de la enzima  $\delta$ -aminolevulínico deshidrogenasa (ALAD) y por la subsecuente acumulación de su sustrato el ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA) que puede ser rápidamente oxidado para generar radicales libres como el anión radical  $O_2^{\cdot-}$ , el radical  $OH^{\cdot}$  y  $H_2O_2$ . Se ha observado que el Pb per se tiene la capacidad de excitar al ion ferroso ( $Fe^{2+}$ ), iniciando la lipoperoxidación (Ahamed & Siddiqui, 2007).

Otro mecanismo involucra la disminución de los antioxidantes presentes en la célula; el Pb no solo disminuye los niveles de GSH mediado por la inhibición de la actividad de la enzima GR, además reduce los niveles de las enzimas CAT, SOD y GPx. Este mecanismo ésta relacionado con la capacidad del Pb de aumentar el potencial toxico de otros metales carcinogénicos (Lee et al., 2012).

En la figura 4 se presenta un esquema que muestra como los metales generan ERO, los efectos que estas tienen sobre las macromoléculas, enzimas antioxidantes, antioxidantes totales y el incremento al riesgo de generar cáncer.

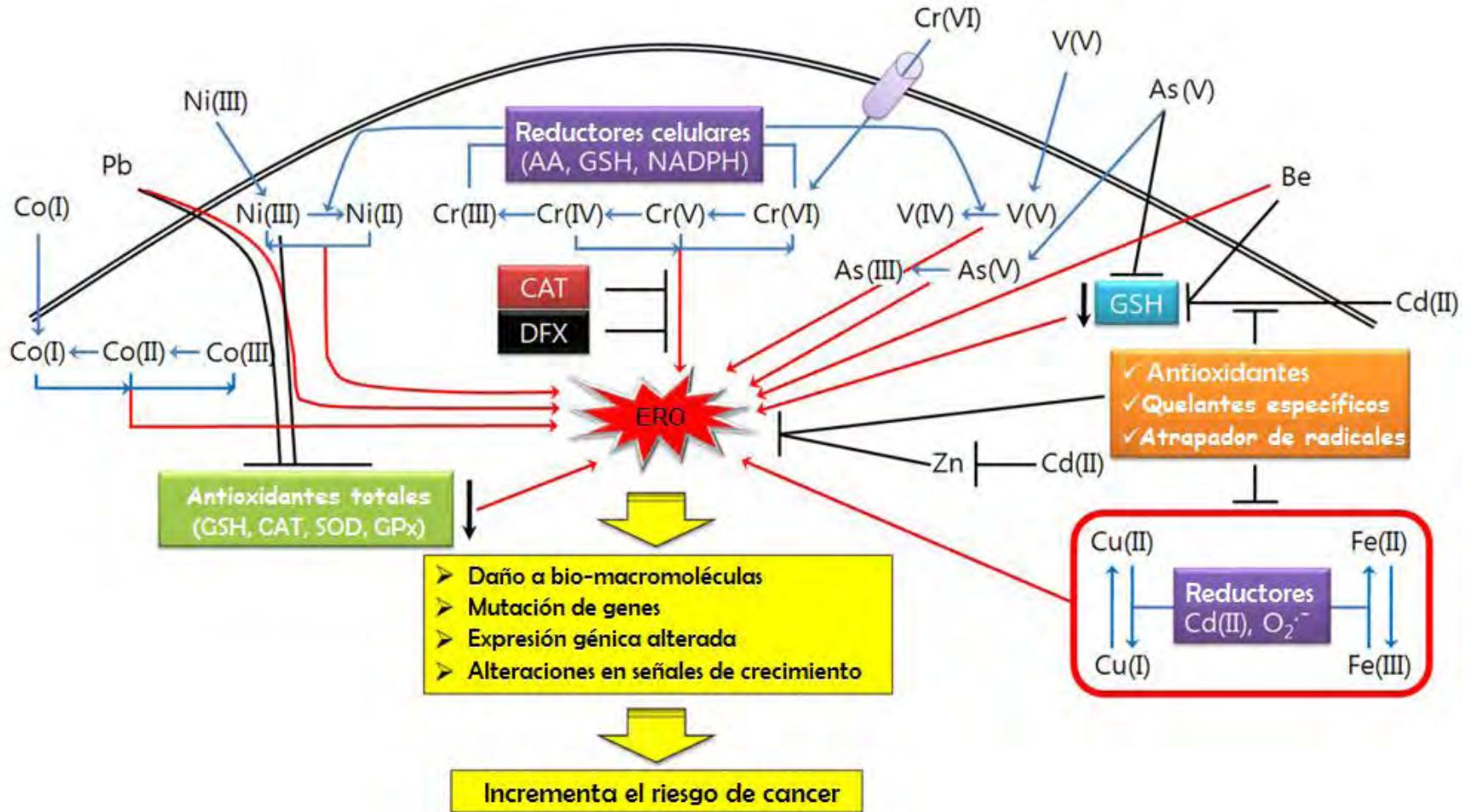


Figura 4. Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) por los metales y su incremento al riesgo de cáncer (modificado de Lee et., al 2012).

## **Modelos *in vitro* para estudiar mecanismos de carcinogénesis**

La transformación celular ha sido definida como la adquisición de ciertas características malignas en morfología, control o funcionamiento del ciclo celular y la adquisición de crecimiento libre de anclaje, inducido por carcinógenos químicos. Dicha transformación ocurre como resultado de una excesiva respuesta al daño directo o indirecto del ADN y maquinaria celular. Los modelos *in vitro* son una herramienta útil para la determinación de compuestos carcinogénicos y mutagénicos, es por ello que se usan ampliamente en el estudio de diversos xenobióticos (Combes et al., 1999).

*In vitro*, la transformación es un proceso caracterizado por una serie de eventos progresivos que a menudo simulan las manifestaciones ocurridas *in vivo* y que son asociadas con neoplasias. Estas manifestaciones incluyen la inmortalidad celular, los cambios fenotípicos, aneuploidias, pérdida del arreglo celular, crecimiento libre de anclaje y tumorigenicidad *in vivo* lo que ha mostrado ser un proceso multifacético con estrecha relación con varios estados en los modelos de carcinogénesis *in vivo* (Schechtman, 2012). Se han reportado 4 estados involucrados en la transformación celular: **i)** cambios en la diferenciación o morfología celular (detectado como transformación morfológica en ensayos con embriones de hámster sirio (SHE); **ii)** adquisición de inmortalidad expresada por una duración de vida ilimitada, un cariotipo aneuploide y una inestabilidad génica; **iii)** adquisición de tumorigenicidad asociada con la formación de focos y crecimiento libre de anclaje (en los sistemas de ensayo de células Balb/c 3T3, C3H10T1/2 y Bhas 42) y **iv)** total malignidad cuando son inyectadas en un animal hospedero (Creton et al., 2012). En la figura 5 se observan las similitudes entre la carcinogénesis *in vivo* y la transformación *in vitro* según Combes y colaboradores (1999).

Los ensayos de transformación han sido propuestos como un método *in vitro* para la identificación de químicos potencialmente carcinogénicos (Creton et al., 2012); por lo cual son relevantes para la detección de carcinógenos animales, capaces de proveer información de los mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis



y detectar varios tipos de carcinógenos (genotóxicos y no-genotóxicos) (Schechtman, 2012).

El uso de líneas celulares de roedores en los sistemas de transformación involucra células con vida ilimitada, como las embrionarias (SHE) o líneas celulares de fibroblastos inmortalizadas (C3H10T1/2 y Balb/c 3T3). Estos tres ensayos han sido ampliamente usados en la evaluación de carcinógenos, mostrando altos valores predictivos para el resultado de bioensayos animales y para predecir carcinógenos humanos (Mazzotti, 2003). En la tabla 1 se muestran las características de los ensayos de transformación *in vitro* utilizados más comúnmente (SHE, C3H10T1/2 y Balb/c 3T3).

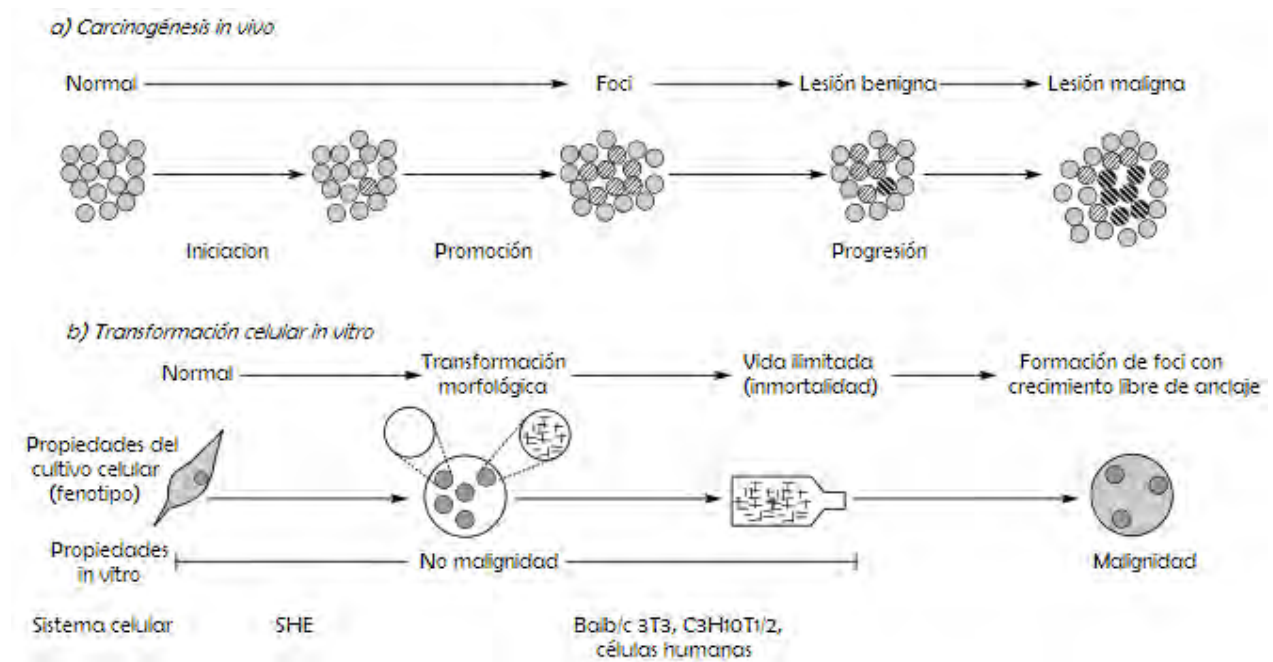


Figura 5. Representación de la carcinogénesis *in vivo* y transformación celular *in vitro* (modificado de Combes et al., 1999).

**Tabla 1. Ensayos de transformación celular en roedores *in vitro*.**

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

**Modificado de Mazzotti 2003 y Meyer, 1983.**

La transformación celular *in vitro* en células SHE es un proceso neoplásico que procede a través de varias etapas identificables, incluyendo la transformación morfológica *in vitro*, la adquisición de inmortalidad, tumorigenicidad y células derivadas de tumor. Las células SHE son células primarias diploides de roedor, con capacidades metabólicas y de baja frecuencia de transformación espontánea en contraste con las líneas celulares establecidas (Isfort et al., 1994). El ensayo con células SHE tiene varias características que limitan su uso en la detección de carcinógenos, incluyendo: **a)** la baja frecuencia de transformación morfológica seguida de la exposición a carcinógenos, que requiere del marcador de grandes números de colonias para permitir el análisis estadístico necesario; **b)** extensas discrepancias en la habilidad de aislar diferentes células y en la disminución de la cantidad de suero para ayudar a la transformación

morfológica químicamente producida; y **c**) dificultades con la selección e identificación de las colonias de células transformadas (Combes et al., 1999).

El uso del ensayo con células C3H10T1/2 involucra el uso de fibroblastos que se inhiben al contacto con una baja saturación de densidad y una frecuencia extremadamente baja de transformación espontánea. Las células deben ser primero sincronizadas para exponerse a agentes alquilantes por corta duración y luego tratadas durante la fase S o en el límite de la fase G<sub>1</sub>-S del ciclo celular. (Combes et al., 1999).

También existen ensayos de transformación de células humanas que pueden servir como un sistema ideal para la identificación de agentes cancerígenos que promueve la transformación en un contexto más fisiológico. Sin embargo, el número de eventos genéticos necesarios para transformar células humanas es mayor que en los roedores. Por ejemplo, la introducción de pares de oncogenes, tales como el SV40 del antígeno T (LT) y un alelo oncogénico de H-ras, es suficiente para transformar células de roedores, pero ha fallado en inducir la transformación tumorigénica en células humanas. Esta discrepancia tal vez explique por qué un ensayo de transformación basado en células humanas aún no se ha establecido para su uso rutinario (Creton et al., 2012).

El sistema de transformación celular Balb/c 3T3 está basado en una línea celular inmortalizada espontáneamente e inicialmente derivada de un embrión de ratón por repetidos pases y subsecuentes subclonas para generar la línea (Aaronson et al., 1968a, b). La línea celular Balb/c 3T3 A31-1-1, de origen mesenquimal, ha sido elegido como uno de los sistemas recomendados para estudiar los aspectos básicos de la respuesta a carcinógenos en células de mamíferos, también es una prueba a corto plazo, prevalidada como una herramienta útil para la búsqueda de nuevos carcinógenos. Este sistema de transformación nos permite validar tanto cualitativa como cuantitativamente la respuesta dosis-dependiente de diversos agentes cancerígenos (Bertolero et al., 1987; Tanaka et al., 2012).

Este ensayo provee información que nos ayuda a elucidar la comunicación celular en el contexto de los mecanismos de acción de agentes iniciadores y

promotores, de ahí que se le conozca como “modelo de transformación de dos fases”. La transformación químicamente inducida en células Balb/c 3T3 establece la relación de la transformación *in vitro* y la citotoxicidad, carcinogenicidad y genotoxicidad, mostrando alta especificidad y sensibilidad para la detección de carcinógenos citotóxicos y no-citotóxicos (Matthews, 1990).

Las células Balb/c 3T3 subclona A31 poseen ciertas propiedades que hacen que sea un efectivo sistema de transformación celular, que incluyen: **a)** sensibilidad de división celular por inhibición a post-confluencia (inhibición por contacto); **b)** adhesión de las células al sustrato; **c)** baja densidad de saturación ( $1.2-1.3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>); **d)** alta eficacia de clonación (50-55%); **e)** tiempo de duplicación relativamente corto (aprox. 19 h); **f)** *in vitro* tienen una duración de vida infinita; **g)** alto grado de sensibilidad a transformación química y **h)** una tasa espontánea de transformación (Schechtman, 2012) entre  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  (Saffiotti et al., 1984). Asimismo, una característica importante que destaca sobre el modelo SHE es su capacidad para observar las etapas iniciadora y promotora, que nos sirve para determinar la capacidad que posee un compuesto en particular. La transformación celular en esta línea celular se observa mediante los focos de transformación, que consisten en colonias de células que son capaces de crecer de forma desorganizada y crecimiento multicapa.

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

Las exposiciones humanas a sustancias químicas ambientales se caracterizan por ocurrir en forma de mezclas, particularmente en el caso de los metales que tienen una larga vida en el ambiente como es el caso del As, Cd y Pb. Entre los mecanismos en común que comparten estos metales y que explican su toxicidad se encuentran: la producción de estrés oxidante, reacciones con grupos sulfhidrilo e interferencia con metales esenciales. Asimismo, proteínas de estrés y enzimas antioxidantes han sido

propuestas como mecanismo común es que protegen de su toxicidad. Estas propuestas surgen de varias décadas de investigación basadas en exposiciones individuales a estos metales. La exposición concurrente a As-Cd-Pb puede producir interacciones sinérgicas o aditivas, incluso efectos no reportados aún por la exposición a éstos de manera individual. La evaluación de interacciones en mecanismos básicos es esencial para ensayos de evaluación de riesgo y manejo de esta mezcla de metales en particular. Al respecto, se han realizado revisiones detalladas de los trabajos que reportan efectos ocasionados por la mezcla de As-Cd-Pb en diferentes modelos experimentales (Tabla 2) y humanos (Tabla 3) (Wang y Fowler 2008; Kosowska et al., 2013). Las conclusiones generales de los estudios experimentales de co-exposición a As-Cd-Pb en el primer caso, exposición a bajas concentraciones de los metales, los efectos se observan a nivel de biomarcadores específicos como el estrés oxidante, parámetros de alteración de biosíntesis de grupo hemo y proteínas de estrés; por otro lado, los efectos tóxicos sistémicos se presentan a exposiciones a altas concentraciones.

Referente a los estudios en humanos expuestos a la mezcla de As, Cd y Pb, cabe señalar que se realizaron bajo el contexto epidemiológico clásico, es decir, que las muestras biológicas fueran obtenidas de forma no invasiva y que reflejaran parámetros de funcionalidad a nivel de proteína alterados por la exposición ocupacional. La revisión del grupo polaco concluye que los efectos a la salud más severos ocasionados por la mezcla de metales son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Asimismo, hace hincapié en que, a pesar de que las exposiciones laborales no rebasaron las normas de exposición (la exposición a Pb fue menor a 500 µg/l (sangre), As menor a 35 µg/g (orina) y de Cd menores a 5 µg/l (sangre)), aun así, fue posible identificar alteraciones bioquímicas generadas por estrés oxidante al igual que alteraciones en proteínas de bajo peso molecular (Kossowska et al., 2013).

**Tabla 2. Estudios en modelos experimentales de la interacción de As, Cd y Pb y los efectos ocasionados**

Elementos	Tipo de experimento	Biomarcadores/criterios de evaluación	Referencia
As, Cd, Pb	In vivo	ALA, porfirinas urinarias	Mahaffey and Fowler, 1977
As, Cd, Pb	In vivo	ALA, porfirinas urinarias	Fowler and Mahaffey, 1978
As, Cd, Pb	In vivo	ALA, porfirinas urinarias	Mahaffey et al., 1981
As, Cd	In vivo	Proteinuria	Liu et al., 2000
As, Cd, Pb	In vivo	ZPP, ALAD	Fowler et al., 2004
As, Cd, Pb	In vivo	HSPs, MT, ZPP	Wang et al., 2003
As, Cd	In vivo	Lipoperoxidación, GSH, MT	Yañez et al., 1991
Pb	In vitro	Uniones de cromatina, PbBPs	Mistry et al., 1985
Ca, Cd, Fe, Pb, Zn	In vitro	PbBPs, desplazamiento del metal en la absorción nuclear.	Mistry et al., 1986
Pb	In vitro	ALAD	Goering and Fowler, 1984
Pb	In vitro	ALAD	Goering and Fowler, 1985
Pb	In vitro	ALAD	Goering et al., 1986
Pb, Zn	In vivo	ALAD, MT	Goering and Fowler, 1987a
Cd, Pb, Zn	In vivo	ALAD, MT	Goering and Fowler, 1987b
As, Cd	In vitro	HSPs, MT	Madden et al., 2002
As, Cd, Pb	In vitro	GSH, SOD, CAT	Sánchez-Valle et al., 2013

**Abreviaturas:** ALA ácido  $\delta$ -aminolevulínico; ZPP protoporfirinas de zinc; ALAD enzima  $\delta$ -aminolevulínico deshidrogenasa; CAT catalasa; HSPs proteínas de choque térmico; MT metalotioneinas; GSH glutatión; PbBPs proteínas de unión a plomo (Tomado de Wang y Fowler, 2008; Sánchez-Valle et al., 2013; Kossowska et al., 2013).

Otro estudio en personas ocupacionalmente expuestas fue realizado por Poręba y colaboradores (2011) en personas ocupacionalmente expuestas a plomo y con una alta frecuencia de complicaciones de hipertensión, evaluando la exposición ocupacional a plomo y el aumento en la presión arterial con disfunción diastólica en el ventrículo izquierdo. Se observó que las personas ocupacionalmente expuestas al plomo tuvieron una concentración más alta de porfirinas de zinc en la sangre. En resumen, se señala que el grupo de personas expuestas manifestaron una disfunción diastólica del

ventrículo izquierdo significativamente más alta, así como un aumento en la rigidez de las arterias locales.

**Tabla 3. Estudios en humanos de la exposición a mezclas de As, Cd y Pb y los efectos ocasionados**

Elementos	Sitio de exposición	Biomarcadores/criterios de evaluación	Referencia
Cd, Hg, Pb	Ambiental	Proteinuria	deBurbe et al., 2003
As, Cd, Hg, Pb	Ambiental	Prolactina sérica, ácido homovanílico	deBurbe et al., 2006
Cd, Pb	Ocupacional	Aumento en orina de la $\alpha$ -glutación transferasa, ZPP y malondialdehído	Garcon et al., 2007
Cd, Pb	Ocupacional	Aumento en orina de la $\alpha$ -glutación transferasa	Garcon et al., 2004
Cd, Co, Pb	Ambiental	Rompimientos de cadena del ADN, 8-OH DG	Hengstler et al., 2003
As, Cd	Ambiental	Proteinuria	Hong et al., 2004
As, Cd	Ocupacional	Proteinuria, MT	Nordberg et al., 2005
Cd, Pb	Ocupacional	Aumento de micronúcleos, rompimientos de cadena del ADN	Palus et al., 2003
Cd, Hg, Pb	Ocupacional	Proteinuria	Roels et al., 1999
Pb, Cd	Ambiental	Enfermedad periférica arterial	Navas-Acien et al., 2004
Pb, Cd, As	Ocupacional	Marcadores de estados tempranos de falla crónica renal y pronóstico del factor de enfermedad cardiovascular (cistina C) en suero	Poręba et al., 2011
Cd, Pb	Ocupacional	Decremento de glutación peroxidasa (GPx), incremento de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)	Wasowicz et al., 2001

**Abreviaturas:** ZPP protoporfirinas de zinc; MT metalotioneinas (Tomado de Wang y Fowler, 2008; Sánchez-Valle et al., 2013; Kossowska et al., 2013).

Recientemente se ha publicado la postura de un grupo de investigación internacional que propone mecanismos celulares para adquirir las características del

cáncer a partir de la exposición crónica a bajas concentraciones de mezclas de compuestos químicos. Poco se ha hecho para determinar si la exposición a químicos en el medio ambiente (en bajas concentraciones) tiene un potencial carcinogénico. Se sabe que muchos productos químicos se acumulan en los tejidos corporales a través del tiempo, pero se sabe poco acerca de sus efectos a nivel de mecanismos, relacionados con el cáncer (Goodson et al., 2015).

Dicho grupo adopta la propuesta de Hanahan y Weinberg (2013) para explicar los fenotipos relacionados con el cáncer, es decir, reportan la adquisición de marcadores del cáncer desencadenadas por la exposición a bajas concentraciones de mezclas de químicos ambientales. Abordan a la inestabilidad genética, la promoción tumoral por inflamación, la proliferación celular sostenida, la evasión a señales anticrecimiento, la resistencia a la muerte celular, la angiogénesis, la invasión de tejidos y metástasis, el microambiente tumoral y la evasión de respuesta inmune como fenómenos celulares identificables que se relacionan a químicos ubicuos en el medio ambiente (Goodson et al., 2015).

Bajo el mismo enfoque, se ha postulado que la adquisición de marcadores del cáncer se facilita cuando se adquiere inestabilidad genómica, la cual se genera por la exposición a bajas concentraciones de mezclas. La inestabilidad genómica es un requisito previo para el desarrollo de cáncer, el cual se produce cuando los sistemas de mantenimiento del genoma fallan para salvaguardar su integridad, ya sea como consecuencia de defectos hereditarios o inducida a través de la exposición a agentes ambientales (productos químicos, agentes biológicos y radiación). Por lo tanto, la inestabilidad genómica se puede definir como una tendencia para adquirir mutaciones; que van desde cambios en la secuencia de nucleótidos y ganancia, pérdida o reordenamientos de cromosomas (Langie et al., 2015).

Los mecanismos para promover este tipo de inestabilidad del genoma son la incapacidad de identificar y reparar lesiones en el DNA, cambios epigenéticos, la función mitocondrial y del huso mitótico durante la división celular o la integridad de los telómeros. Se ha observado que el cáncer se desarrolla por las múltiples interacciones



a largo plazo, causales entre factores epigenéticos, ambientales y genéticos (Langie et al., 2015).

La evaluación de la pertinencia de una dosis interna de las sustancias químicas que alteran el genoma debe hacerse en el contexto del exposoma (este término fue acuñado en el 2005 por Paul Christopher Wild, que abarca en su totalidad todas las exposiciones ambientales a las que se encuentra el ser humano, incluyendo las de su estilo de vida, y que se engloban desde el periodo prenatal (Siroux et al., 2016; Wild, 2005). En este contexto, es relevante señalar que el impacto de la inestabilidad del genoma varía a lo largo de la vida; en particular, en las células germinales, así como en el feto, se incrementa la sensibilidad a agentes genotóxicos y moderadas exposiciones (en el útero) pueden ser asociadas con un incremento significativo en la tasa de mutaciones o cambios en el epigenoma de la descendencia humana. Los problemas de salud pública asociados con sustancias cancerígenas o promotores de tumores son cada vez más complejos teniendo en cuenta los posibles efectos de dosis bajas de sustancias químicas presentes en nuestra vida diaria (Langie et al., 2015).

Se debe prestar atención a los efectos de la exposición combinada que puede, a través de efectos co-cancerígenos, conducir a un aumento en el riesgo de cáncer. Un estudio epidemiológico interesante mostró que los individuos con múltiples tipos de aductos de DNA pueden tener 10 veces mayor riesgo de cáncer, lo que implica que la exposición a una mezcla de genotóxicos podría inducir el desarrollo del cáncer. Los metales como el plomo, arsénico, cadmio y cromo constituyen una mezcla cuaternaria que ocurre con frecuencia en sitios de desechos peligrosos, laborales y medio ambientales. No se conocen efectos de salud pertinentes, ni existen modelos fisiológicos de la farmacocinética de una mezcla de este tipo. Sin embargo, la mayoría de todos los efectos tóxicos generados por la mezcla de metales tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* que se observan, están generados o mediados por la capacidad que tienen los metales de generar ERO y que a su vez intervengan al alterar diversos procesos celulares que desencadenan diferentes enfermedades, entre las cuales se encuentra el cáncer (Langei et al., 2015).

## OLA1

El gen que codifica para la proteína OLA1 (Obg-like ATPasa 1) tiene varios alias entre los que destacan GTPBP9 y DOC45 y esta conservado tanto en humanos (DOC45), como en chimpancé, cebra, perro, vaca, rata, pollo, pez, mosca de la fruta, mosquito y levaduras ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/67059](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/67059)). Este gen se encontró sobreexpresado en un modelo celular de blastocitos carente del gen de la gamma glutamil cisteína sintetasa ( $\gamma$ GCS) o ligasa (GCLC) (Shi et al., 2000; Rojas et al., 2003). OLA1 es una proteína que tiene un peso molecular de 45 KDa y tiene localización citoplasmica principalmente, aunque se ha predicho una región que permite se pueda exportar a núcleo (Koller-Eichhrom et al., 2007; Sun et al., 2010).

La proteína tiene 396 aminoácidos y cuenta con diversas regiones, sitios o dominios.

- Caja G1: es el motivo de unión al bucle de fosfato, también se le conoce como bucle-P y motivo caminante A. Ayuda a posicionar el trifosfato a la mitad del nucleótido unido ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_080218.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_080218.1); Koller-Eichhorn et al., 2007).
- Sitio de unión GTP/Mg<sup>2+</sup> ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_080218.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_080218.1)).
- Región “switch” 1 (52..59 aa): es uno de los dos bucles de la superficie que se someten a cambios conformacionales tras la unión a GTP. También se le conoce como región efectora<sup>1</sup> ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_080218.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_080218.1)).
- Caja G2 (56): es un motivo T; únicamente el aminoácido treonina (Thr) esta conservado a lo largo de la superfamilia, pero los residuos circundantes se conservan dentro de la familia. Se traslapa con la región switch 1 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_080218.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_080218.1)).
- Región “switch” 2: es uno de los dos bucles de la superficie que se someten a cambios conformacionales tras la unión a GTP ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_080218.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_080218.1)).
- Caja G3 (92..95): es el motivo DXXG. Se traslapa con la región switch 2, que incluye el motivo caminante B. Es una región conservada en todas las GTPasas. Este motivo está involucrado en la coordinación del Mg<sup>2+</sup> que se requiere para la

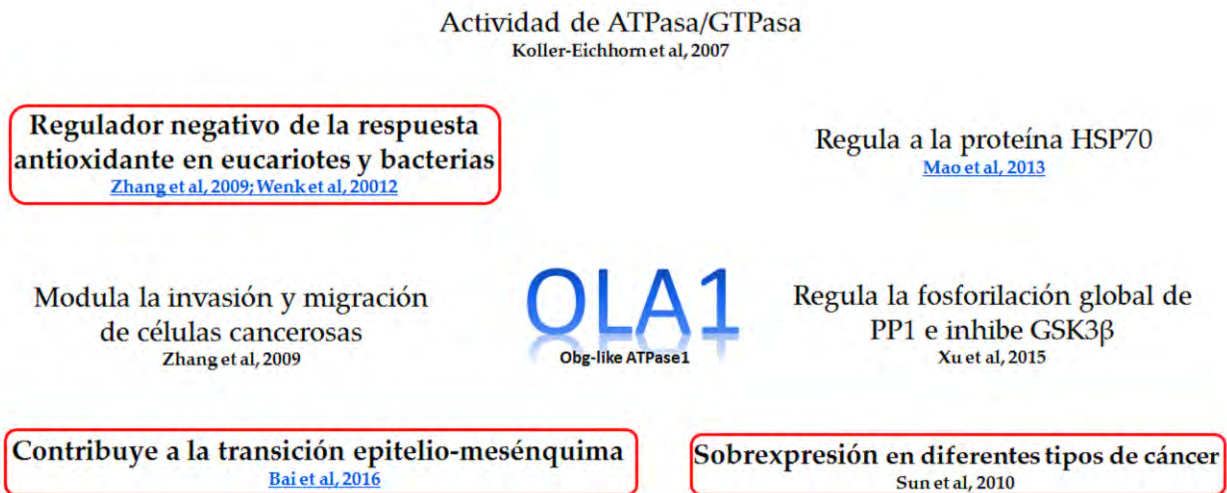
unión a nucleótidos y la hidrólisis ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_080218.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_080218.1); Koller-Eichhorn et al., 2007).

- Caja G4 (230..233): es un motivo [N/T]KXD. Este motivo confiere la especificidad de unión a los nucleótidos por tener una secuencia [N/T]KXD en el nucleótido de unión a guanina de las P-loop NTPasas ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_080218.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_080218.1); Koller-Eichhorn et al., 2007).
- Caja G5 (264..266): es un motivo [C/S]A[K/L/T] y ayuda al reconocimiento de bases de guanina para su unión ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_080218.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_080218.1); Koller-Eichhorn et al., 2007).

Con la finalidad de caracterizar funcionalmente a la proteína OLA1, se identificó su expresión basal en 17 líneas celulares humanas entre las que se encontraban HeLa (cancerosa) y BEAS2B (sana). El silenciamiento de OLA1 en dichas células incrementa la resistencia a agentes oxidantes como terbutil hidroperóxido (tBH) y diamida (agente que reduce tioles celulares) sin afectar la proliferación, apoptosis basal o sensibilidad a otros agentes citotóxicos cuyos blancos fueran mitocondria, citoesqueleto o DNA (Zhang et al., 2009a). Con base en estos hallazgos es que OLA1 se propuso como una proteína que regula negativamente la respuesta antioxidante, independiente del factor transcripcional Nrf2. Si bien los reportes asociados a la proteína OLA1 son pocos, las líneas de investigación son diversas, por tal motivo se presentan los antecedentes de ésta proteína cronológicamente. En células cancerosas de mama MDA-MB-231 el silenciamiento de OLA1, inhibió la motilidad e invasión de la línea celular altamente metastásica, a través de mecanismos que involucran la regulación intracelular de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Zhang et al., 2009b) (Figura 6).

La proteína humana OLA1 o DOC45 se ha encontrado sobreexpresada en diversos tipos de cáncer, como colon, recto, estómago, ovario, pulmón y útero. Se reporta que es regulada por daño al DNA, al igual que su expresión es incrementada por estímulos oncogénicos de Ras y su expresión está relacionada con la vía de

señalización de PI3K (Sun et al., 2010). El papel que se le atribuye como regulador negativo de la respuesta antioxidante se observa también en bacterias, cuyo homólogo YchF, regula y protege en respuesta al estrés oxidativo; asimismo la sobreexpresión de YchF causa hipersensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en *Escherichia coli* y al reprimir su expresión se observa menor daño oxidante (Wenk et al., 2012) (Figura 6).



**Figura 6. Funciones celulares de la proteína OLA1.** Se observan las funciones celulares que se han asociado a la proteína OLA1 y los diferentes efectos que tiene sobre diversos procesos celulares, destacando principalmente en la regulación negativa de la respuesta antioxidante y su presencia durante el desarrollo y presencia el cáncer.

Un reporte posterior (Mao et al., 2013) indica que OLA1 también interactúa con HSP70, una proteína de respuesta a estrés, con la cual se une a través de su dominio C-terminal, evitando la degradación de la misma, ya que desplaza a la proteína ubiquitinadora, CHIP; observando que la unión HSP70-OLA1 genera una resistencia a estrés térmico por lo que se considera que la proteína OLA1 tiene un papel central en el mantenimiento de la homeostasis celular. Estudios recientes también sugieren que OLA1 juega un papel importante en la regulación del centrosoma junto con BRCA1, dado que OLA1 es capaz de unirse al carboxilo terminal de BARD1, al amino terminal de BRCA1 y a  $\gamma$ -tubulina. Asimismo, se observó que el silenciamiento de OLA1 causa sobreduplicación de centriolos (Chiba et al., 2014). Jeyabal y colaboradores (2014)

observaron que OLA1 juega un papel negativo sobre la adhesión y propagación celular, a través de la regulación de la expresión de FAK, esto es, cuando OLA1 está presente o sobreexpresada, disminuyen los niveles de proteína total y aumenta la fosforilación de cofilina, una proteína de unión a actina y un regulador clave en la dinámica de los filamentos de actina, generando pérdida en la adhesión y propagación celular.

Hasta ahora, OLA1 es una proteína reguladora de eIF2 que inhibe la síntesis de proteína y promueve la respuesta integrativa a estrés, mediante su unión con eIF2, hidrolizando GTP e interfiriendo la formación de complejo ternario, representando un nuevo mecanismo de control de la traducción que afecta la síntesis de *ново* del complejo ternario, dado que no ocurre la fosforilación de eIF2. La disminución de OLA1 causa una hipoactividad de la respuesta integrativa a estrés y una mayor supervivencia de células estresadas. *In vivo*, el silenciamiento de OLA1 generó células cancerosas deficientes de la respuesta integrativa al estrés y del efector proapoptótico, CHOP, promoviendo el crecimiento tumoral y la metástasis. Estos resultados sugieren que OLA1 desempeña un papel supresor de la traducción y la supervivencia celular (Chen et al., 2015).

Se ha publicado un reporte en el que se explica un poco más las funciones de OLA1 y que demuestra que una proteína que interacciona con GSK3 $\beta$ , inhibiendo su actividad a través de la fosforilación de la serina 9. Estos datos sugieren que OLA1 contribuye a la transición epitelio mesénquima (EMT por sus siglas en inglés, *Epithelial mesenchymal transition*) a través de la modulación de la señalización GSK3 $\beta$ /snail/E-cadherina, mientras que su sobreexpresión está asociada con la progresión clínica y pobre supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón (Bai et al., 2016) (Figura 6).

Ding Z y colaboradores (2016) recientemente han publicado nuevas evidencias de la función de la proteína OLA1, mostrando que embriones de ratón carentes de OLA1 muestran retraso en el crecimiento y desarrollo, que conduce a la inmadurez de órganos, especialmente de pulmones al momento de nacer y una frecuente letalidad perinatal. En fibroblastos embrionarios de ratón OLA1(-/-) se observa un deterioro debido a defectos de la progresión del ciclo celular, asociados con la reducción de ciclinas D1 y E1, una disminución de la fosforilación de RB y un incremento en p21. Esta

acumulación de p21 se debe a una mejor traducción del RNA mensajero y se puede prevenir por la regeneración de la expresión de OLA1 o tratando con un inhibidor de la desfosforilación de eIF2 $\alpha$ , sugiriendo que OLA1 regula a p21 a través de un mecanismo traduccional que involucra a eIF2. Con todo ello, se mostró por primera vez, que OLA1 es requerida para una progresión normal en el desarrollo de mamíferos. OLA1 juega un papel importante en la promoción de la proliferación celular en parte, a la supresión de p21 y la organogénesis a través de factores que aún no han sido descubiertos.

Sin embargo, dado los efectos observados de OLA1 sobre el cáncer, sugieren que las funciones protectoras de OLA1 son de mayor relevancia cuando se encuentra inhibida; mientras que su sobreexpresión está relacionada a la transformación celular y el proceso cancerígeno

## **Antecedentes directos de la transformación inducida por la mezcla de As-Cd-Pb en el ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3**

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

Umeda (2004) demostró que el uso del ensayo de transformación de dos fases con células Balb/c 3T3 es sensible, reproducible, confiable y relevante para la detección de promotores tumorigénicos.

Martín SA y colaboradores (2011) estudiaron la capacidad transformante de la mezcla de As-Cd-Pb ( $\text{NaAsO}_2$  2 $\mu\text{M}$ ,  $\text{CdCl}_2$  2 $\mu\text{M}$  y  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  5 $\mu\text{M}$ ) a concentraciones similares a las determinadas en poblaciones ocupacionalmente expuestas y el papel del estrés oxidante en el modelo de dos fases Balb/c 3T3. En dicho estudio, se reportó la capacidad iniciadora y promotora del proceso de transformación ocasionado por la exposición a la mezcla de metales y su relación positiva con los niveles de especies reactivas de oxígeno y negativa a la viabilidad celular. Adicionalmente al realizar un co-tratamiento con el antioxidante, N-acetilcisteína (NAC), se observó la disminución de la capacidad transformante de la mezcla de metales.

Por otro lado, se ahondó en la relación negativa entre la viabilidad celular y la capacidad transformante de la mezcla de metales de As-Cd-Pb ( $\text{NaAsO}_2$  2 $\mu\text{M}$ ,  $\text{CdCl}_2$  2 $\mu\text{M}$  y  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  5 $\mu\text{M}$ ) en el mismo modelo (Rodríguez-Sastre et al., 2014). De este trabajo se observó que la viabilidad celular en la etapa de promoción es la que determina la expansión clonal de las células con capacidad transformante en la que participa de manera importante el arresto del ciclo celular en G0/G1, la senescencia celular y los niveles intracelulares de ERO independientes del daño al ADN (Rodríguez-Sastre et al., 2014).

A través de un análisis de predicción de vías, Martínez-Pacheco y colaboradores (2014), mostraron que en el mismo modelo de transformación, la mezcla de metales de As-Cd-Pb ( $\text{NaAsO}_2$   $2\mu\text{M}$ ,  $\text{CdCl}_2$   $2\mu\text{M}$  y  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$   $5\mu\text{M}$ ) genera un perfil de expresión de microRNAs y RNAs mensajeros específicos que al ser sometidos a un análisis integral de vías (IPA, Ingenuity Pathway Analysis) permitió predecir el riesgo de adquirir enfermedades cardiovasculares y cáncer a través del establecimiento de procesos celulares como la muerte celular y la respuesta inflamatoria.

En conjunto todos estos antecedentes conforman la búsqueda de nuestro grupo de investigación para entender los mecanismos moleculares que conducen a la transformación celular por la exposición a la mezcla de As-Cd-Pb. Nuestro interés por estudiar el papel de OLA1 se enfoca en que se ha descrito como un regulador negativo de la respuesta antioxidante (Zhang et al., 2009a) y dado que la transformación celular inducida por la mezcla de As-Cd-Pb está directamente ligado a la presencia de ERO (Martín SA et al., 2011) y cambios en la barrera antioxidante (Sánchez-Valle et al., 2013), quisimos observar si el silenciamiento de OLA1 modula los niveles intracelulares de ERO.

El presente proyecto plantea estudiar si una inhibición de la expresión proteica OLA1, al funcionar como regulador negativo de la respuesta oxidante, es capaz de disminuir la transformación celular dependiente de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno inducidas por la mezcla de metales, As-Cd-Pb



## ***HIPOTESIS***

- ❖ El silenciamiento de la proteína OLA1 disminuirá la capacidad transformante de la mezcla de metales ( $\text{NaAsO}_2$   $2\mu\text{M}$ ,  $\text{CdCl}_2$   $2\mu\text{M}$  y  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$   $5\mu\text{M}$ ) a través de la disminución de los niveles intracelulares de ERO.

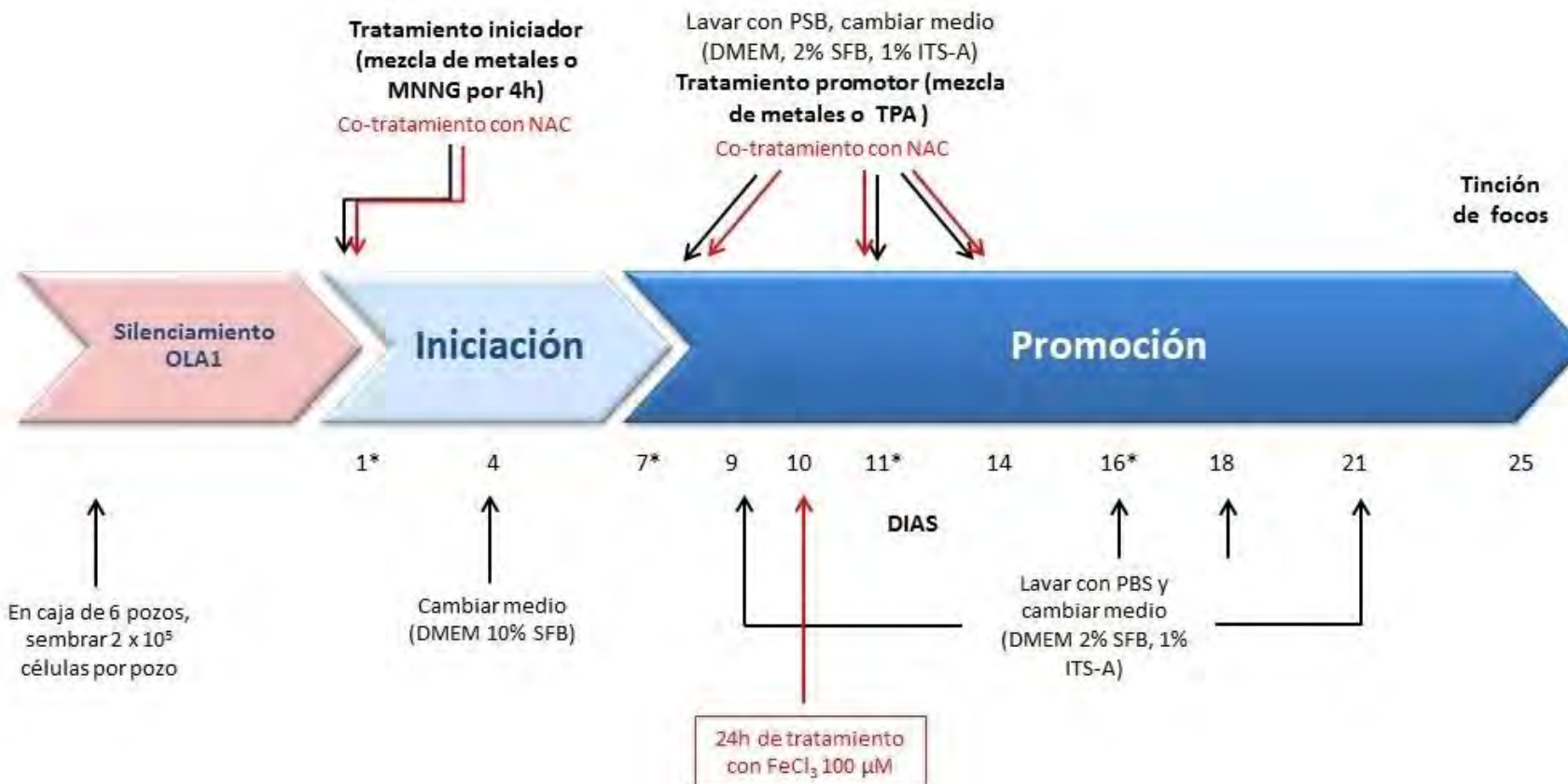
## ***OBJETIVO GENERAL***

- ❖ Identificar el papel de la proteína OLA1 en el proceso de transformación inducido por la mezcla de metales, As-Cd-Pb, en concentraciones de importancia epidemiológica.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar la expresión proteica de OLA1 y los niveles intracelulares de ERO en el modelo de transformación de dos fases Balb/c 3T3 tratado con la mezcla de metales.
2. Inhibir la expresión de la proteína OLA1 mediante un siRNA, en las etapas iniciales del modelo de transformación de dos fases.
3. Determinar la capacidad transformante de la mezcla de metales As-Cd-Pb aunado al silenciamiento de OLA1.
4. Determinar los cambios en la expresión proteica de OLA1 y los niveles intracelulares de ERO en el modelo de transformación de dos fases con el silenciamiento de OLA1.
5. Determinar si un reto oxidativo adicional es capaz de modificar la capacidad transformante inducida por la mezcla de metales en el protocolo estándar y bajo condiciones del silenciamiento de OLA1.
6. Determinar si el co-tratamiento con un agente antioxidante, como la N-acetilcisteína (NAC), modifica la capacidad transformante inducida por la mezcla de metales bajo el silenciamiento de OLA1.
7. Determinar la actividad de factores de transcripción asociados al estrés oxidante (tales como AP1, ATF4, CBF/NFY, EGR1, ETS, FOXO1, HIF, HSF, IRF, NFAT, NFkB, Nrf2/ARE, p53, Smad3, SRF Y Stat3) en el modelo de transformación de dos fases tratado con la mezcla de metales.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



**Figura 7. Estrategia experimental realizada bajo tres condiciones:** 1) **Protocolo estándar** en el cual se da un estímulo iniciador el día 1 de 4 horas con la mezcla de metales o N-metil-N-nitrosoguanidina (MNNG, 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Posteriormente las células son cosechadas en cada una de las condiciones experimentales, el día 7, 11 y 14 se dan los estímulos promotores con la mezcla de metales o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) las células son llevadas hasta el día 25 para la visualización de la transformación celular morfológica, mediante la tinción de las células con Giemsa; 2) **Protocolo del silenciamiento de OLA1 durante la fase iniciadora**, en la cual, 12 horas posteriores a la inhibición de OLA1, se comienza a trabajar bajo el protocolo estándar hasta los 25 días; y 3) **Protocolo del silenciamiento de OLA1 y co-tratamiento adicional de un antioxidante como la N-acetil-cisteína (NAC) y un estímulo oxidante adicional con  $\text{FeCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  durante 24**. Este protocolo consiste en un co-tratamiento adicional con NAC durante los días en los que se da tratamiento con la mezcla de metales (esto se representa con las flechas en color rojo) y un estímulo oxidante adicional con  $\text{FeCl}_3$  por 24 h al día 10, pero siguiendo la misma metodología para el protocolo estándar. Los \* representan los días que se toman muestras, siendo el 1 y 7 las muestras representativas para la fase iniciadora y los días 11 y 16 para la fase promotora.

## **METODOLOGIA**

### **Ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3**

El protocolo de transformación constó de 25 días dividido en dos fases: la fase iniciadora entre los días 1-7 y la fase promotora entre los días 7-25: Las células Balb/c 3T3 fueron sembradas 48 h antes del tratamiento a una densidad de  $5 \times 10^5$  células en cajas de 100 mm de diámetro con medio DMEM suplementado al 10% con SFB. Transcurridas las 48 h de incubación, las células se expusieron a la mezcla As-Cd-Pb ( $\text{NaAsO}_2$   $2 \mu\text{M}$ ,  $\text{CdCl}_2$   $2 \mu\text{M}$  y  $\text{Pb} (\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$   $5 \mu\text{M}$ ) o N-metil-N-nitrosoguanidina (MNNG,  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Este es un compuesto alquilante, que tiene efectos principalmente sobre el O-6 y N-7 de la guanina y O-4 de la timina, formando alteraciones en las uniones de las bases (Fang et al., 2001)) como estímulo iniciador durante 4 h. Transcurrido este tiempo, las células fueron resembradas a una confluencia de  $1 \times 10^4$  células por caja de 100mm para los controles negativos y positivos (MNNG-TPA) y las condiciones: metales como iniciadores (Metales-TPA), los metales como promotores (MNNG-Metales) y los metales como iniciador-promotor (Metales-Metales). En el día 7 se cambió medio fresco DMEM suplementado con SFB 2% e Insulina-transferrina-selenio (ITS-A) 1, dando el primer estímulo promotor con la mezcla de metales o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA,  $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Este compuesto es un éster de forbol, capaz de activar a PKC y estimular así ciclo celular (Rebois y Patel, 1985)). Los días 11 y 14 se administró el segundo y tercer estímulo promotor con cambio de medio. Los días 9, 16, 18 y 21 se cambió el medio DMEM + SFB 2% + ITS-A 1%.

En el día 25, las células fueron lavadas y fijadas con etanol frío al 70% y teñidas posteriormente con solución Giemsa para visualizar los focos, los cuales son los que determinan el potencial transformante de los metales. Los criterios que se usaron para determinar la presencia de los focos son: **a)** alta tinción del colorante (Kajiwara et al., 2003; Tsuchiya et al., 2005; Sakai, 2007); **b)** 2mm de diámetro (Tsuchiya et al., 2005;

Sakai, 2007); **c)** crecimiento multicapa (Kajiwara et al., 2003; Tsuchiya et al., 2005; Sakai, 2007); **d)** orientación azarosa de las células en los bordos del foco (Kajiwara et al., 2003; Tsuchiya et al., 2005; Sakai, 2007); y **e)** agregados de células fusiformes (Sakai, 2007).

Una vez identificados los focos, se cuantificaron y se determinó la eficiencia relativa formadora de colonias (RCFE, por sus siglas en inglés, *Relative colony formation efficiency*) mediante la relación existente con respecto a la condición de control negativo.

### **Silenciamiento transitorio de OLA1 por medio de un siRNA**

El silenciamiento de OLA1 por medio de un siRNA se realizó de acuerdo al protocolo establecido por la marca del producto, en este caso por Santa Cruz Biotechnology, Inc.

- En una caja de 6 pozos se sembraron  $2 \times 10^5$  células con 2 mL de medio DMEM suplementado con SFB 10% y sin antibióticos. Se incubaron a 37°C en incubadora con CO<sub>2</sub> 5% por 24 horas, esto para tener una confluencia del 60-80%.
- Se prepararon dos soluciones: una solución A en la cual por cada transfección se diluyeron 5 µL del siRNA dúplex en 100 µL de medio de transfección; solución B en la cual se diluyeron 6 µL de reactivo de transfección en 100 µL de medio de transfección. Se mezcló la solución A y B por pipeteo, incubándose a temperatura ambiente 45 min. Por cada transfección se adicionaron 800 µL de medio de transfección a la mezcla A+B, lavando las células con medio de transfección y adicionando la mezcla del siRNA con el reactivo de transfección.
- Se incubaron las células por 7 h a 37°C en incubadora con CO<sub>2</sub> 5%. Transcurrido este tiempo se adiciono 1 mL de medio normal DMEM con SFB 20% y antibióticos 2%, sin remover la mezcla de transfección, incubando por 18 horas

a 37°C en incubadora con CO<sub>2</sub> 5%. Trascurridas las 18 horas de incubación se cambió el medio normal DMEM con SFB 10% y antibióticos 1%. A partir de este cambio se tomó el tiempo 0 y las células se manejaron entre un rango de 24-72 h post-tratamiento con siRNA.

- El protocolo del ensayo de transformación se llevó a cabo a las 12 h post-tratamiento con el siRNA. Los tratamientos iniciadores, MNNG/Metales se dieron en las células de la caja de 6 pozos, siguiendo el protocolo descrito anteriormente, bajo las mismas condiciones, dejando que transcurrieran los 25 días del ensayo para posteriormente hacer el conteo de número de focos de transformación por condición experimental.

### **Determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO)**

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

Las células fueron cosechadas los días 1 y 7 para fase iniciadora y 11 y 16 para la fase promotora del ensayo de transformación, fueron lavadas y posteriormente levantadas con PBS+EDTA, tomando una alícuota correspondiente a 100,000 células, se centrifugaron en frío a 1,200 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y a cada condición se le adiciono 180 µL de buffer A (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.8 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, glucosa 5 mM y HEPES 15 mM) y 20 µL de una solución de dihidrorrodamina 123 10 µM (1 µM), se resuspendieron y transfirieron a una placa de 96 pozos y se incubo por 2 min. Se preparó una curva de Rodamina 123 y se leyó en lector de placas de 96 pozos a 505 nm. Los resultados se interpolaron en la curva de Rodamina 123.

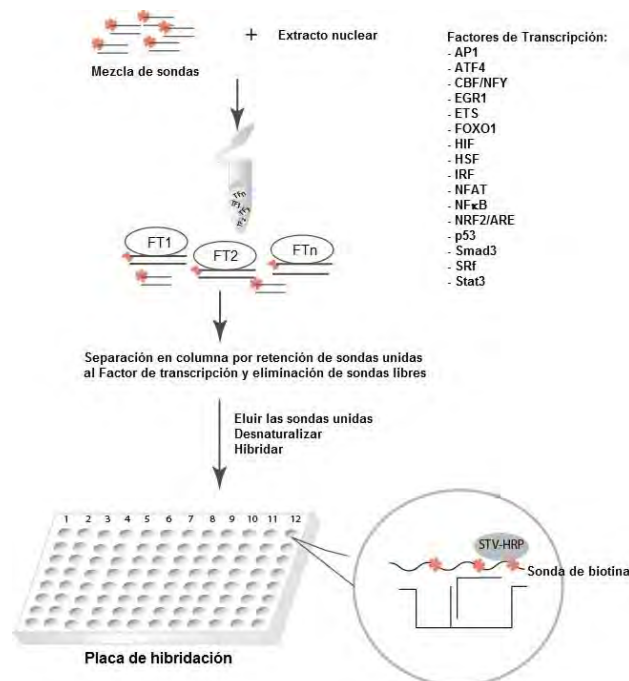
### **Determinación de la proteína de OLA1 por Western Blot**

Las células se cosecharon los días de muestreo y fueron lisadas con buffer RIPA (NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% y TRIS 50 mM, buffer de lisis), suplementado con fluoruro de fenilmetanosulfonil (PMSF) y un coctel de inhibidores de proteasas. Se realizó la cuantificación de la proteína total usando el kit de ácido bicinónico. La determinación de la proteína en las muestras se realizó por la separación de proteínas por medio de electroforesis, en geles de gradiente de agarosa (4-15%), cargando una muestra equivalente a 20 µg proteína por pozo y corriendo a un voltaje inicial de 50 V por 30 min para linearizar las muestras, transcurrido ese tiempo se aumentó el voltaje a 100 V por 1 h 15 min para poder separar las proteínas. Una vez llevada a cabo la electroforesis se realizó la transferencia en cámara húmeda, con buffer fresco de transferencia a 100 V por 1 h. Terminada la transferencia se bloquearon las membranas con solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente con agitación constante o toda la noche a 4°C con agitación. Se retiró la solución de bloqueo y se lavó la membrana 3 veces (2 veces con TBS+Tween y 1 vez con TBS), 5 min por cada lavado.

Una vez concluido el lavado, se adiciono el anticuerpo primario contra OLA1 y se dejó incubar toda la noche a 4°C con agitación constante. Transcurrido el tiempo se retiró el anticuerpo y se lavó la membrana 3 veces y colocando el anticuerpo secundario por 2 h a temperatura ambiente con agitación constante. Posterior a la incubación se retiró el anticuerpo secundario y se lavó la membrana 3 veces nuevamente. Al terminar el último lavado se revelo la membrana por medio del método de quimioluminiscencia. Una vez que se visualizaron las bandas, se lavó la membrana y se bloqueó durante 1 h con solución de bloqueo. Posteriormente se lavó 3 veces la membrana y se incubo con anticuerpo primario de β-tubulina a 4°C toda la noche con agitación constante y se siguió el mismo procedimiento que con el anticuerpo contra OLA1. Una vez obtenidas ambas bandas se analizaron por medio de densitometrías, para así poder cuantificar la cantidad de proteína OLA1 presente en cada una de las muestras

## Actividad de Factores de transcripción asociados al estrés oxidante

La actividad de los factores de transcripción se determinó mediante placas de "Oxidative Stress TF Activation Profiling Plate Array" (Signosis), el diagrama general se muestra abajo. Esta técnica se basa en una serie de 16 sondas marcadas con biotina con las secuencias consenso del ADN de los sitios de unión de los factores de transcripción asociados a estrés oxidante. El procedimiento consto de varios pasos, primero se realizó la extracción nuclear (NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Thermo) y se confirmó la pureza de los extractos mediante western blots para lamina y actina). Posteriormente, dicho extracto nuclear se mezcló con las sondas para propiciar la formación del complejo ADN-factor de transcripción, realizando dos ciclos de lavado, centrifugando en columnas y eluyendo el complejo. Se llevó a cabo la hibridación del complejo en la placa, adicionando de manera individual en cada uno de los pozos la muestra e incubando a 42°C durante toda la noche. Posterior a la hibridación se realizó la detección del complejo por medio de estreptavidina-HRP y leyendo la placa en un luminómetro. Los valores emitidos por el luminómetro son los valores de la actividad de cada uno de los factores de transcripción.





## **Viabilidad**

Se determinó la viabilidad por medio de la prueba dual de fluorocromos (FDA/EtBr). Esta técnica requirió de una solución de trabajo mezclando una solución A (FDA 10.86 mM) y una solución B (EtBr 0.507 mM), en este caso para 1 ml de solución de trabajo se usarón 6  $\mu$ L de solución A y 40  $\mu$ L de solución B en 960  $\mu$ L de PBS. Para determinar la viabilidad de cada una de las muestras, se mezcló en proporción 1:1 las muestras celulares y la solución de trabajo, colocando la mezcla en un portaobjetos y cubriendo con cubreobjetos. Posteriormente se observan al microscopio de fluorescencia empleando un filtro combinado que detecta la fluorescencia de ambos compuestos. Bajo el microscopio de fluorescencia fue posible diferenciar las células vivas (verdes) de las células muertas (rojo), realizando un conteo de 100 células por muestra estableciendo un porcentaje de viabilidad. Por cada muestra, se tomaron 10  $\mu$ L de suspensión celular y se colocaron en un tubo eppendorf de 100  $\mu$ L en hielo mientras se recolectaban las muestras para posteriormente procesarlas. La mezcla 1:1 con la solución se realizó al momento de la determinación.

## Reactivos

Los reactivos empleados en la metodología del proyecto son los siguientes:

- Acetato de plomo ( $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) Cat. 2271 de J. T. Baker
- Antibiotico-antimicótico Cat. 15240-062 de Gibco/Invitrogen
- Arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) Cat. 57400 de Sigma-Aldrich
- Bromuro de etidio Cat. E-8751 de Sigma-Aldrich
- Cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) Cat. 3996 de Sigma-Aldrich
- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) Cat. C-1016 de Sigma-Aldrich
- Cloruro de potasio (KCl) Cat. 3040-01 de J. T. Baker
- Cloruro de sodio (NaCl) Cat. 3624-01 de J. T. Baker
- Deoxicolato de sodio Cat. D-6750 de Sigma-Aldrich
- Diacetato 5(6)-carboxifluoresceína (cFDA) Cat. 21879 de Sigma-Aldrich
- Dihidrorrodamina 123 Cat. 309825 de Calbiochem
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) Cat. 161-0302 de BioRad
- Fluoruro de fenilmetanosulfonil (PMSF) Cat. P-7626 de Sigma-Aldrich
- HEPES Cat. H-9136 de Sigma-Aldrich
- Insulina-transferrina-selenio A (ITS-A) Cat. 51300-044 de Gibco/Invitrogen
- Medio DMEN Cat. 31600-034 de Gibco/Invitrogen
- N-metil-N-nitrosoguanidina (MNNG) Cat. 342122 de Sigma-Aldrich
- Rodamina 123 Cat. R-8004 de Sigma-Aldrich
- Suero fetal bovino (SFB) de Byproducts
- Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) Cat. M-2643 de Sigma-Aldrich
- 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) Cat. P-8139 de Sigma-Aldrich
- TRIS Cat. 75825 de USB corporation
- Triton x-100 Cat. T-9284 de Sigma-Aldrich

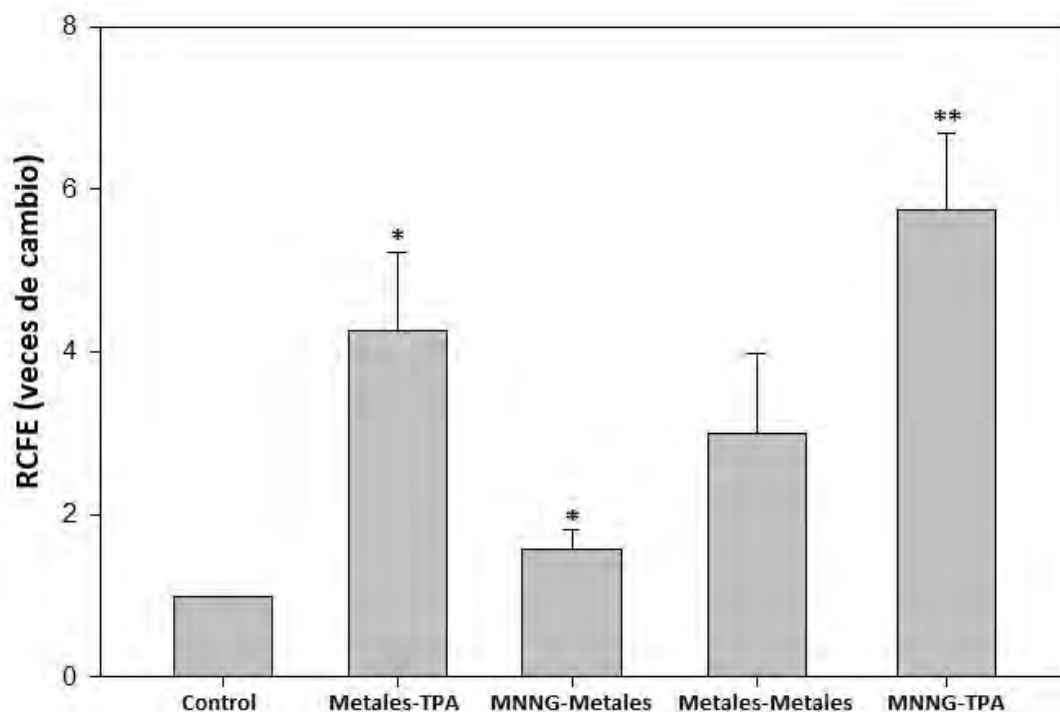
## RESULTADOS

### Expresión proteica de OLA1 y niveles intracelulares de ERO en el modelo de transformación dos fases Balb/c 3T3 tratado con la mezcla de metales.

La capacidad transformante de la mezcla de metales As-Cd-Pb se determinó mediante la eficiencia relativa formadora de colonias (RCFE) que se calcula de la siguiente manera:

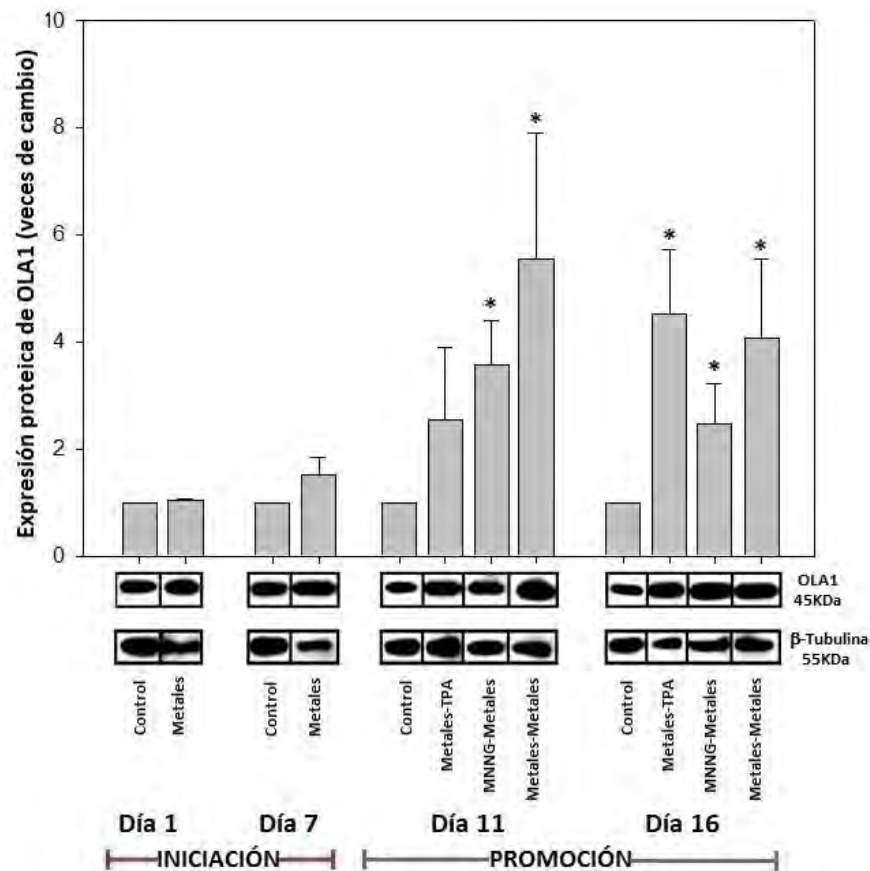
$$\text{RCFE} = \frac{\text{número de focos en condiciones experimentales}}{\text{número de focos en condición control}}$$

Con base en el RCFE (focos de transformación tipo III) al finalizar el ensayo (día 25), se observó que la mezcla de metales como estímulo iniciador (Metales-TPA) tiene un mayor potencial transformante (Gráfico 1).



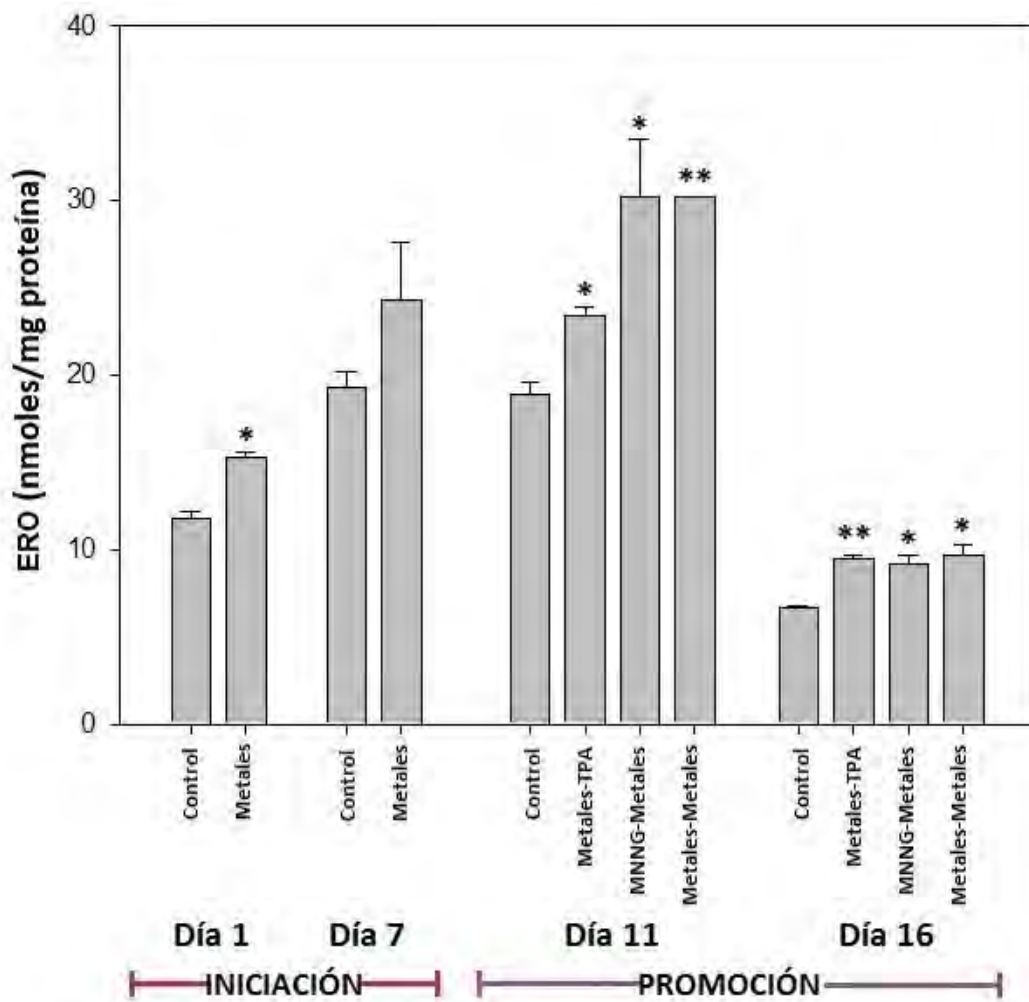
**Gráfico 1. Eficiencia relativa formadora de colonias.** Los valores que se muestran son la media de 3 experimentos independientes. Los \* representan las diferencias estadísticamente significativas relativas a la condición control. El análisis se realizó por una prueba t-Student, \* p<0.05, \*\*p<0.01.

La determinación de la expresión proteica de OLA1 se muestra como los valores relativos a la expresión de la  $\beta$ -tubulina y con respecto al control (Gráfico 2). Durante la fase de iniciación la expresión de OLA1 no se observa modificada por el tratamiento con la mezcla de metales, sin embargo, se identificaron patrones diferentes de expresión en la fase de promoción, dependiendo de la condición experimental, sin embargo, la tendencia de la expresión proteica de OLA1 es a aumentar, independientemente de la estadística que se presenta. La mezcla de metales como estímulo iniciador (Metales/TPA) mostró un ligero incremento gradual a través del proceso de transformación teniendo los valores más elevados el día 16 en la etapa de promoción. Mientras que el tratamiento con la mezcla de metales como estímulo promotor (MNNG/Metales o Metales/Metales) indujo significativamente la expresión de OLA1 desde el día 11 del ensayo de transformación.



**Gráfico 2. Cuantificación de la proteína de OLA1 por western blot.** Los valores que se muestran son la media de 3 experimentos independientes. Se muestran las bandas de la proteína OLA1 y el control de carga,  $\beta$ -tubulina. Los \* representan las diferencias estadísticamente significativas en base a la condición control. El análisis se realizó por un t-student, \*  $p < 0.05$ .

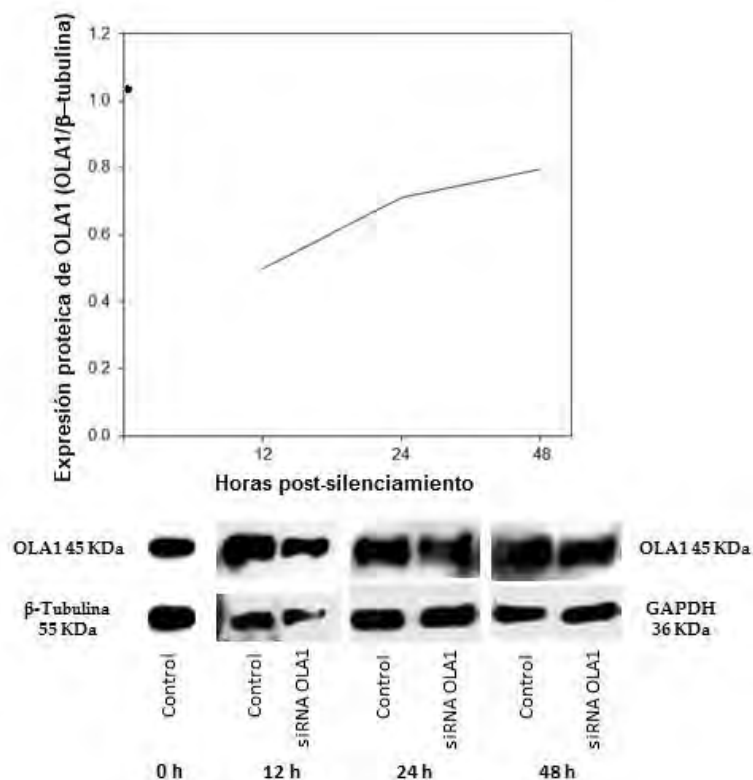
En el gráfico 3 se reportan los niveles intracelulares de ERO a través del proceso de transformación inducido por la mezcla de metales y relativos a la cantidad de proteína total. Encontramos que la mezcla de metales induce incremento de los niveles de ERO desde la iniciación, alcanzando un nivel máximo el día 11 del ensayo de transformación. Durante el día 16 los niveles de ERO decaen, pero aún se muestran significativamente por arriba respecto a la condición control.



**Gráfico 3. Determinación de los niveles intracelulares de ERO por la oxidación de dihidrorrodamina 123 a rodamina 123.** Los valores que se muestran son la media de 3 experimentos independientes. Los \* representan las diferencias estadísticamente significativas en base a la condición control. El análisis se realizó por un t-student, \* p<0.05, \*\* p<0.01.

## Inducir el silenciamiento de la proteína OLA1 mediante un siRNA específico en la fase iniciadora de la transformación celular inducida por la mezcla de metales.

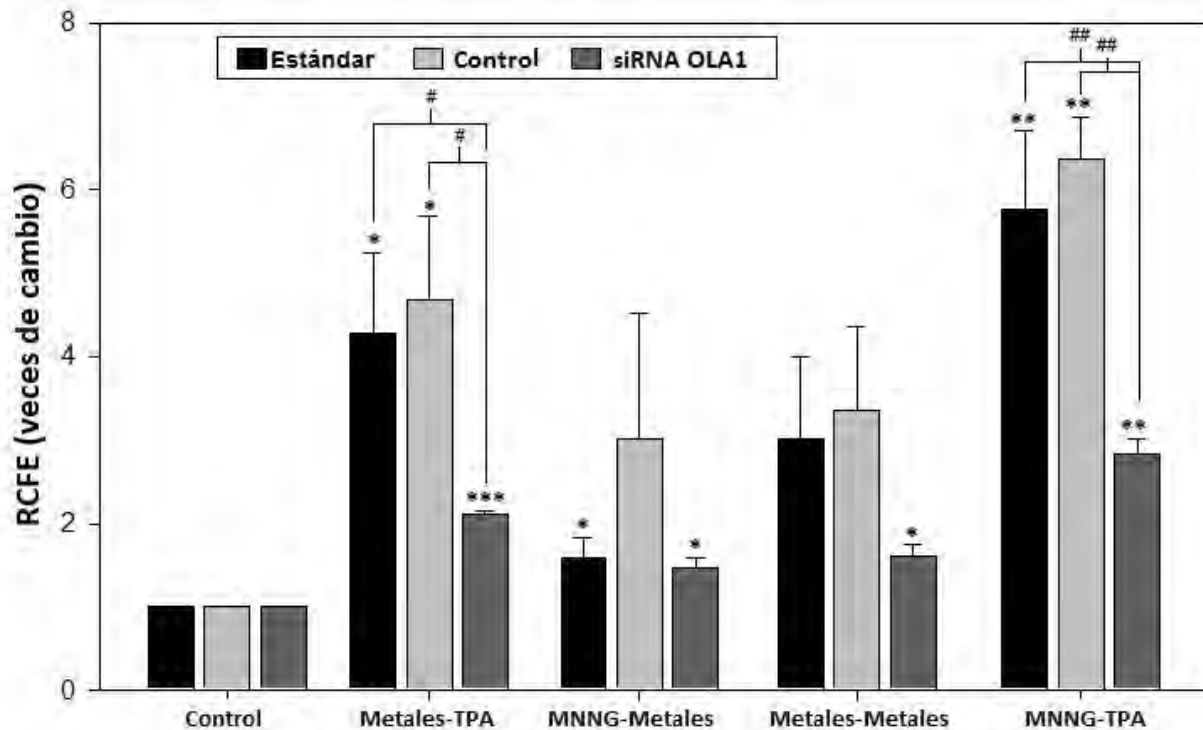
Como primer paso se realizó la estandarización del silenciamiento de OLA1 por medio de un siRNA específico. Se tomaron muestras a las 12, 24 y 48 h post-transfección y se determinó la expresión proteica de OLA1 para establecer el protocolo con el cual se obtiene una mayor inhibición de la proteína. En el grafico 4, se muestra un curso temporal del silenciamiento de OLA1, a través del cual se estableció que a las 12 h post-transfección, se obtiene una mejor inhibición de la proteína (50%). El silenciamiento es transitorio durante la fase iniciadora del proceso de transformación inducido por la mezcla de metales con la finalidad de modificar la expresión del OLA1 al inicio del protocolo de transformación.



**Gráfico 4. Cuantificación de la proteína de OLA1 por western blot cuando se realiza bajo el silenciamiento de OLA1 por medio de un siRNA específico.** Los valores que se muestran son los niveles de la expresión proteica de OLA1 cuando se realiza el silenciamiento. El punto representa el tiempo cero, sin adicionar reactivo de transfección ni siRNA. n=3

## Efectos del silenciamiento de OLA1 sobre la capacidad transformante de la mezcla de metales.

Una vez establecidas las condiciones de silenciamiento de OLA1, se prosiguió con el protocolo de transformación de dos fases tratado con la mezcla de metales para determinar la capacidad transformante bajo el silenciamiento de OLA1 durante la fase iniciadora del protocolo de transformación. Se cuantificaron los focos de transformación tipo III al día 25 del ensayo empleando como control una secuencia scrambled (denominada control) al día 25 (Gráfico 5). Se determinó que el control de este protocolo se comportó de manera similar al protocolo estándar (Gráfico 1) y también que la capacidad transformante de la mezcla de metales fue modulada por la inhibición de OLA1 antes del estímulo iniciador.



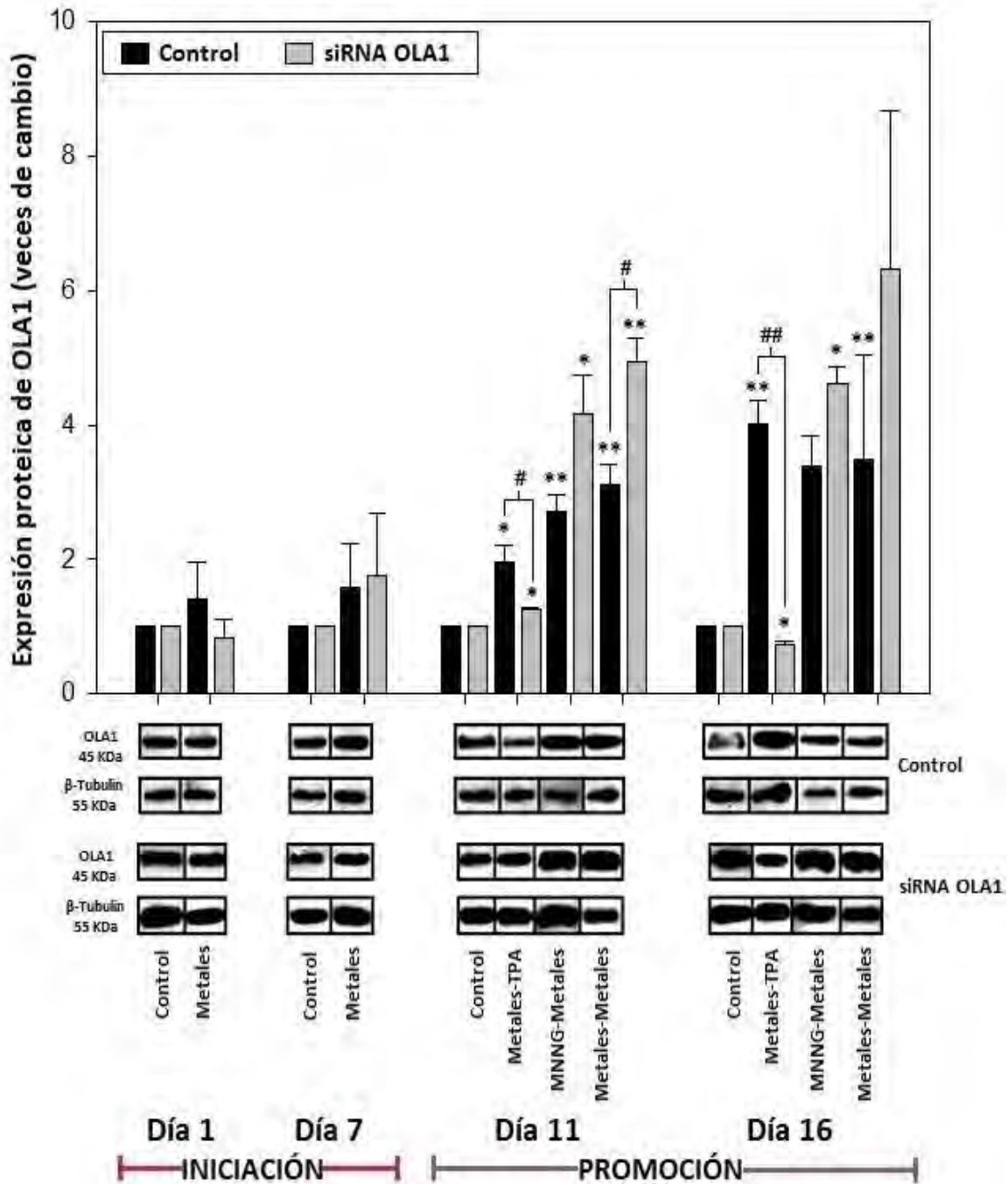
**Gráfico 5. Efecto del silenciamiento de OLA1 sobre la capacidad transformante de la mezcla de metales.** Los valores que se muestran son la media de 3 experimentos independientes. Los \* representan las diferencias estadísticamente significativas en base a la condición control. El análisis se realizó por un t-student, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Los # indican las diferencias estadísticamente significativas en comparación con el ensayo estándar, control y el silenciamiento de OLA1 #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ .

## **Determinación de los cambios en la expresión proteica de OLA1 y los niveles intracelulares de ERO en el silenciamiento de OLA1 en la fase iniciadora.**

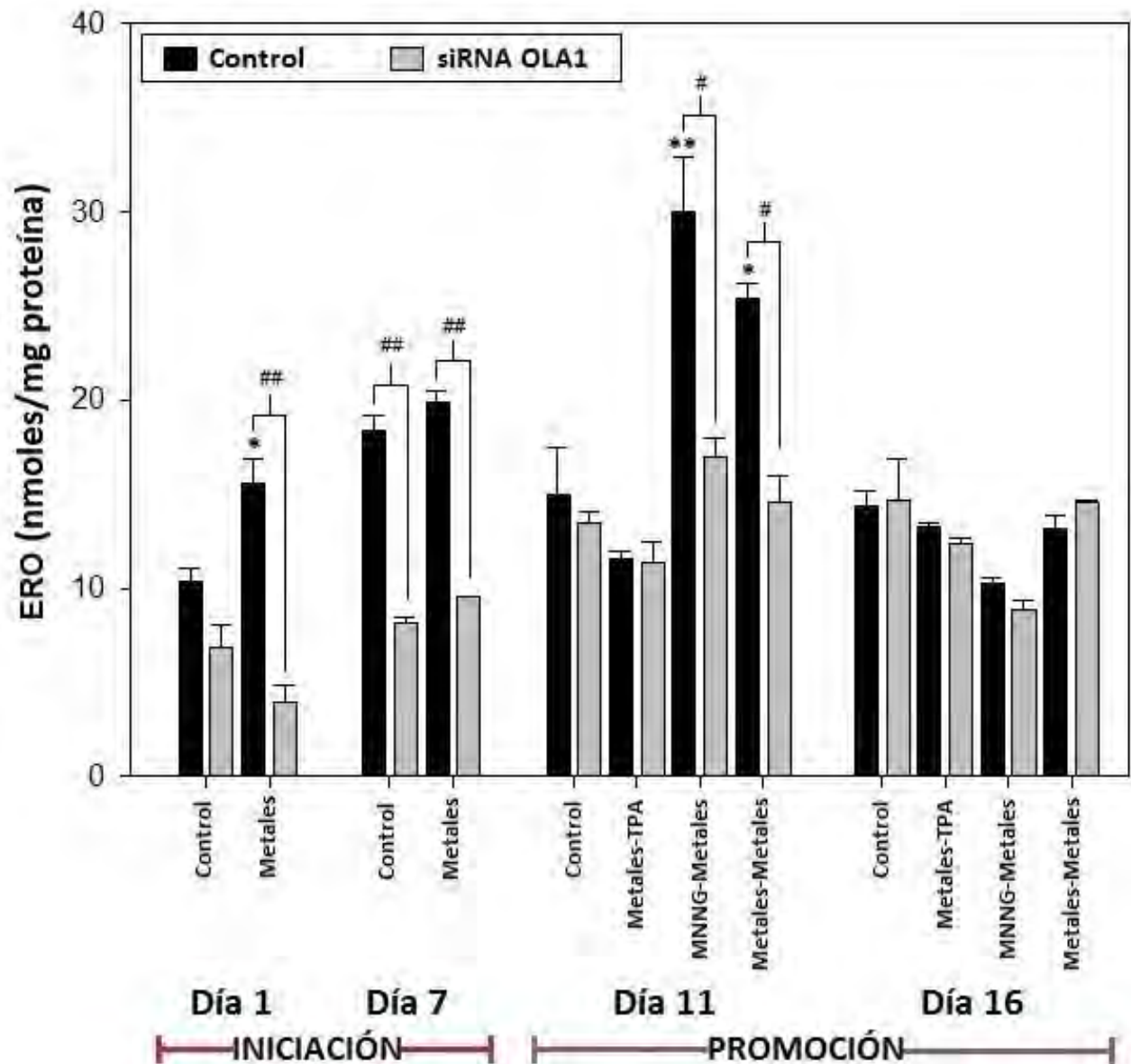
La expresión proteica de OLA1 se reporta relativa a la expresión de  $\beta$ -tubulina y con respecto al control (Gráfico 6). Se observó que el control se comporta similar a lo reportado en el protocolo estándar (Gráfico 2), es decir, el tratamiento con la mezcla de metales induce incrementos en la expresión de OLA1 relativos al progreso del ensayo de transformación. Mientras que en el protocolo del silenciamiento de OLA1 se observa un decremento de la expresión proteica de OLA1 durante la fase promotora, únicamente cuando la mezcla de metales se dio como estímulo iniciador. Cabe mencionar que la transformación celular en la condición Metales/TPA también disminuyó significativamente.

Los niveles de ERO comparando el control y el silenciamiento de OLA1 se muestran en el gráfico 7. Estos datos indican que el control tuvo el mismo comportamiento que el control del ensayo del protocolo estándar, por lo que no hay implicaciones metodológicas para la interpretación de los datos relacionados a la transformación celular inducida por la mezcla de metales. Se encontró que los niveles de ERO disminuyeron durante la fase iniciadora por el silenciamiento de OLA1, mientras que, en la promoción, específicamente el día 11, solo disminuyeron los ERO cuando se emplea la mezcla de metales como estímulo promotor (MNNG/Metales y Metales/Metales). El uso de la mezcla de metales como estímulo iniciador generó más focos de transformación, indicando que la modulación de ERO por medio del silenciamiento de OLA1 es un factor importante para rescatar el fenotipo transformante, especialmente en el día 11 del ensayo de transformación. Los niveles de ERO durante el día 16 no cambiaron entre el control y el silenciamiento de OLA1 tal como se había observado en el protocolo estándar (Gráfico 3).





**Gráfico 6. Expresión de la proteína de OLA1 en el modelo de transformación de dos fases Balb/c 3T3 con el silenciamiento de OLA1 durante la fase de iniciación.** Los valores que se muestran son la media de 3 experimentos independientes. Las barras negras corresponden a la secuencia "scrambled" y las barras grises corresponden a la del silenciamiento de OLA1. Los \* representan las diferencias estadísticamente significativas en base a la condición control. El análisis se realizó por un t-student, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y los # indican las diferencias estadísticamente significativas en comparación del control con el silenciamiento de OLA1 #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ .



**Gráfico 7. Determinación de los niveles intracelulares de ERO cuando se realizó el silenciamiento de OLA1 durante la fase de iniciación.** Los valores que se muestran son la media de 3 experimentos independientes. Las barras negras corresponden a la secuencia "scrambled" y las barras grises corresponden al silenciamiento de OLA1. Los \* representan las diferencias estadísticamente significativas en base a la condición control. El análisis se realizó por un t-student, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y los # indican las diferencias estadísticamente significativas en comparación de la condición control con el silenciamiento de OLA1 #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ .

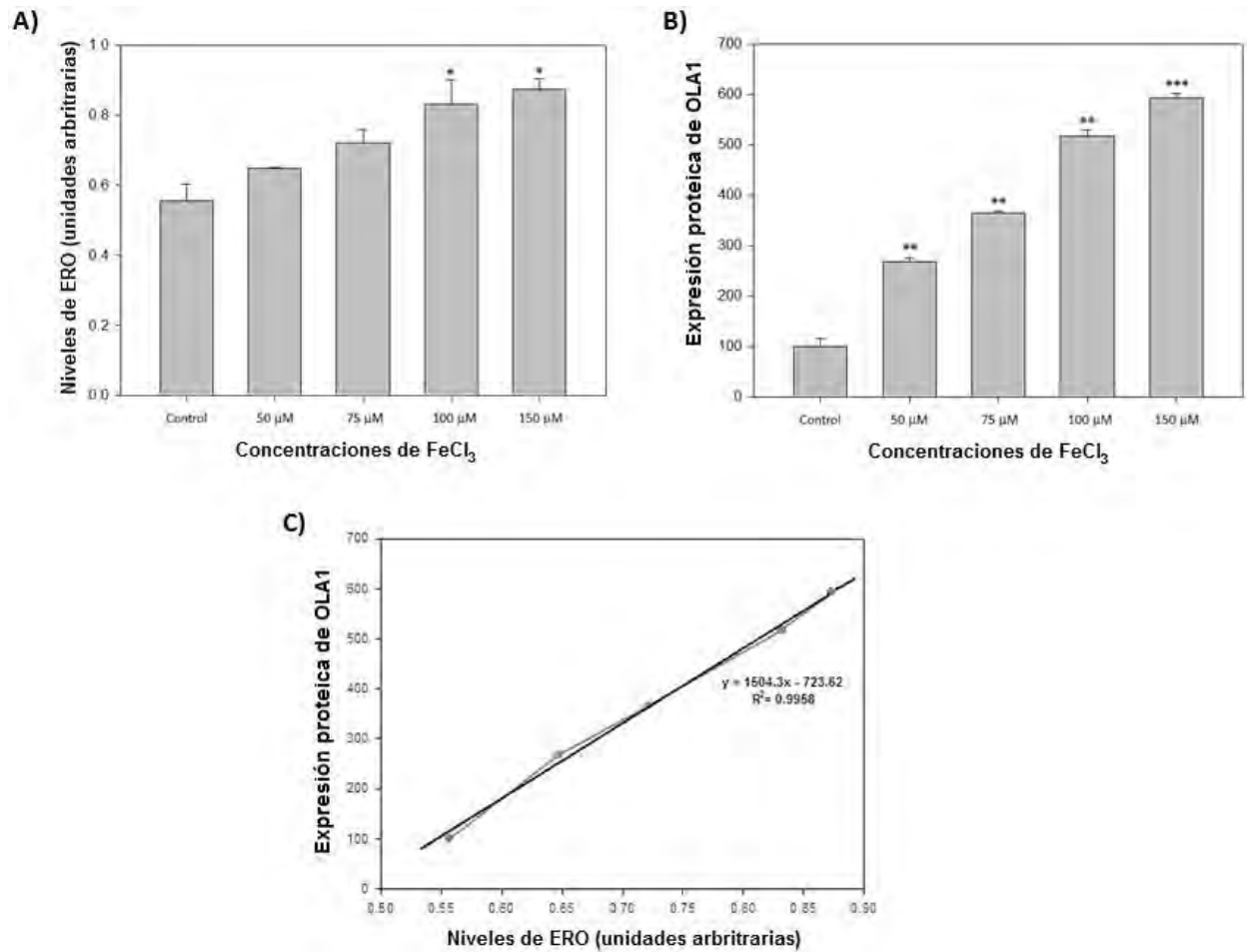
## **Determinación de la capacidad transformante inducida por la mezcla de metales en el protocolo estándar y bajo el silenciamiento de OLA1 ante un reto oxidante adicional.**

Los resultados anteriores muestran que los niveles ERO juegan un papel muy importante en la transformación celular inducido por la mezcla de metales y que el silenciamiento de OLA1 modula los niveles de ERO y la capacidad transformante de la mezcla de metales al tener una menor formación de focos de transformación, aunado a que la mayoría de los cambios ocurren en el día 11. Por ello nos planteamos la idea de que un estímulo oxidante adicional como el tratamiento con FeCl<sub>3</sub> pudiera restituir el efecto transformante de la mezcla de metales observado en el silenciamiento de OLA1.

Para estandarizar la concentración de FeCl<sub>3</sub>, las células se trataron durante 24 h a diferentes concentraciones, 0, 50, 75, 100 y 150 µM de FeCl<sub>3</sub>. Se tomaron muestras para determinar los niveles de ERO (Figura R1A y R2A) realizando también inmunocitoquímicas para cuantificar la expresión de OLA1 en las células (Figura R1B y R2B). Se determinó una relación lineal entre dichas variables a través de una correlación de Pearson (Figura R1C).

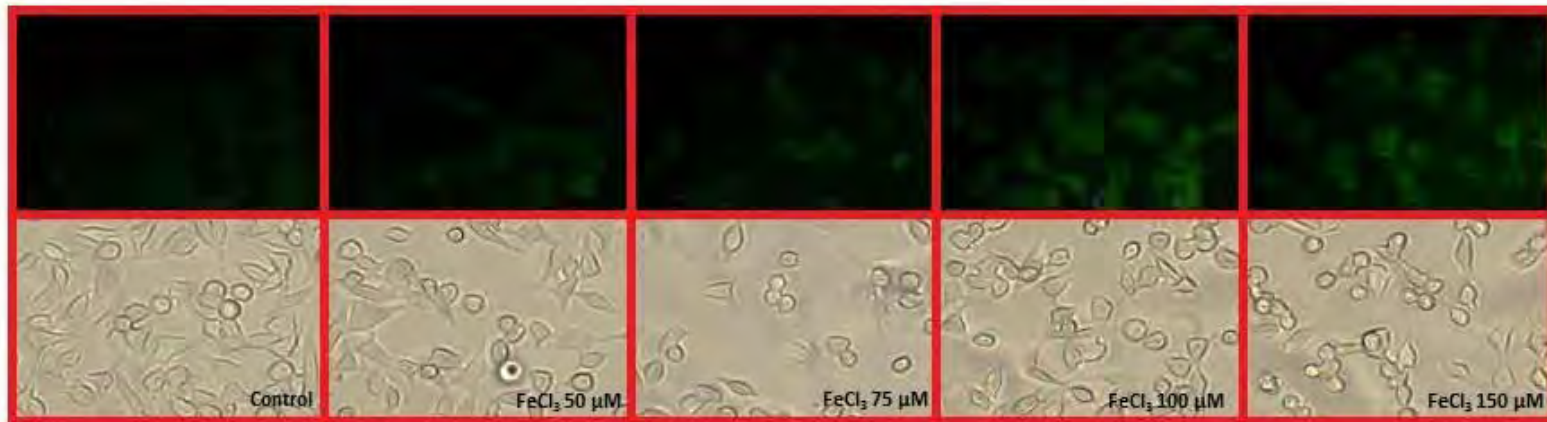
Se eligió el tratamiento de FeCl<sub>3</sub> 100 µM por 24 h para inducir un reto oxidante adicional, ya que generó inducción elevada de ERO y OLA1. Los resultados de esta estrategia indican que no hay efectos a nivel de viabilidad celular determinada al día 11 del ensayo de transformación por efecto del reto oxidante adicional (Tabla R1).

Lo que se pudo documentar, es que la intervención oxidante del FeCl<sub>3</sub> incrementó los niveles de ERO, al igual que la expresión de OLA1 (Tabla R2) en los tratamientos de Metales/TPA y también su capacidad transformante (control-scrambled). Este resultado sugiere que en la etapa de promoción hay una relación directa entre dichas variables. Sin embargo, aún con estos cambios en los niveles de ERO y OLA1 seguimos observando que el silenciamiento de OLA1 disminuye la capacidad transformante de la condición Metales/TPA (Tabla R2).

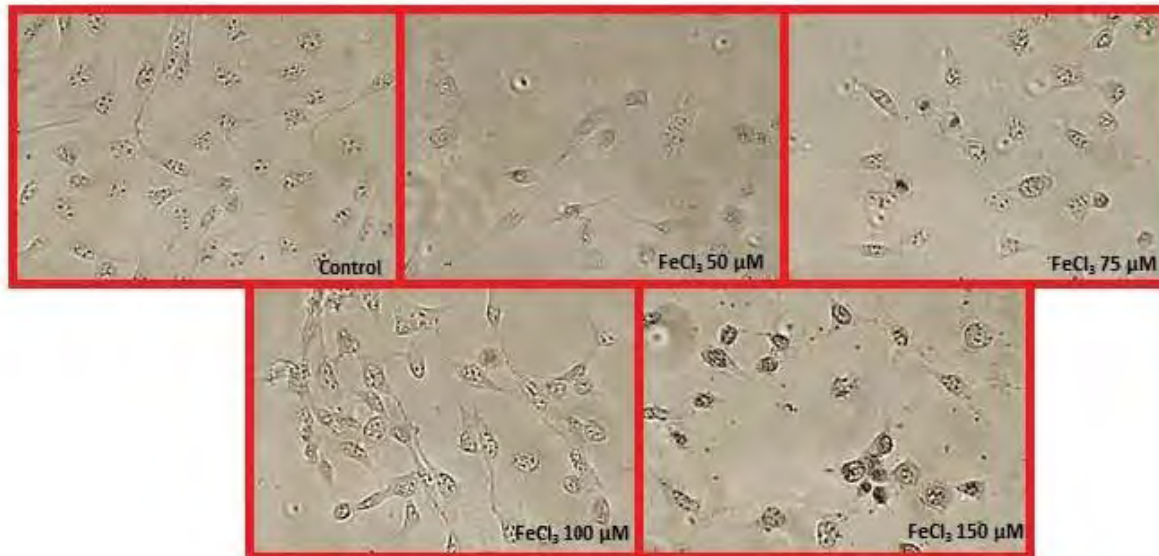


**Figura R1. Relación entre los niveles intracelulares de ERO y la expresión proteica de OLA1 en las células Balb/c 3T3.** Las células fueron sembradas en cajas con cubreobjetos de 18x18 mm y tratadas por 24 h diferentes concentraciones de FeCl<sub>3</sub> (0 a 150 μM) y cosechadas posteriormente. **A)** El grafico muestra la cuantificación de los niveles intracelulares de ERO como unidades arbitrarias por análisis densitométrico 24 h después del tratamiento con FeCl<sub>3</sub> a diferentes concentraciones. Las células fueron visualizadas en microscopio de epifluorescencia. **B)** El grafico muestra el análisis cualitativo de la expresión de OLA1 por medio de inmunocitoquímicas 24 h después del tratamiento con FeCl<sub>3</sub> a diferentes concentraciones **C)** Correlación lineal de Pearson entre los niveles intracelulares de ERO y la expresión proteica de OLA1 en las células BalB/c 3T3 tratadas a diferentes concentraciones de FeCl<sub>3</sub> ( $p < 0.000114$ ,  $r = 0.9979$ ).

A)



B)



**Figura R2. Imágenes representativas de los niveles de ERO y OLA1. A)** Las imágenes muestran la presencia de ERO en imágenes de fluorescencia y de luz a las diferentes concentraciones de FeCl<sub>3</sub> (40x). **B)** Imágenes representativas de las inmunocitoquímicas de OLA1 24 h después del tratamiento con FeCl<sub>3</sub> a diferentes concentraciones (40x).

**Tabla R1. Viabilidad celular en el ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3 en condiciones estándar, con el tratamiento adicional con FeCl<sub>3</sub> y con el co-tratamiento de NAC + FeCl<sub>3</sub>.**

	Condición	Protocolo estándar <sup>A</sup>	FeCl <sub>3</sub> (100µM/24h) <sup>B</sup>	NAC + FeCl <sub>3</sub> <sup>C</sup>
<b>Control</b>	Control	88.2 <sup>C</sup> ± 1.35	89.1 ± 1.27	92.5 <sup>A</sup> ± 0.71
	Metales-TPA	89.5 ± 4.78	88.8 ± 1.06	94.9 ± 3.89
	MNNG-Metales	60.0 <sup>C</sup> ± 2.57	60.0 ± 3.61	84.4 <sup>A</sup> ± 0.92
	Metales-Metales	66.3 <sup>C</sup> ± 7.85	58.9 ± 0.99	88.0 <sup>A</sup> ± 2.90
	MNNG-TPA	85.6 ± 5.28	83.8 ± 3.75	91.9 ± 4.10
<b>siRNA OLA1</b>	Control	90.5 ± 2.18	89.1 ± 1.34	91.1 ± 1.48
	Metales-TPA	88.6 <sup>C</sup> ± 3.34	88.9 ± 1.91	96.9 <sup>A</sup> ± 0.28
	MNNG-Metales	59.5 <sup>C</sup> ± 6.43	59.3 ± 1.27	84.3 <sup>A</sup> ± 1.77
	Metales-Metales	61.7 <sup>C</sup> ± 4.66	59.5 ± 0.78	89.1 <sup>A</sup> ± 1.27
	MNNG-TPA	86.7 ± 8.92	88.9 ± 3.11	94.7 ± 2.33

Los resultados representan la media de tres experimentos independientes, ± la desviación estándar y las diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos ( $P \leq 0.05$  <sup>A, B o C</sup>) y las diferencias entre condición control y siRNA de OLA1

<sup>A</sup> Protocolo estándar, donde se lleva la transformación celular como lo indica la figura 7.

<sup>B</sup> Tratamiento oxidante adicional con FeCl<sub>3</sub> 100 µM, que se dio el día 10 durante 24 h, como se indica en la figura 7.

<sup>C</sup> Co-tratamiento con NAC mas tratamiento oxidante adicional con FeCl<sub>3</sub> 100 µM, que se dio el día 10 durante 24 h.

### **Efecto del co-tratamiento con N-acetilcisteína (NAC) sobre la transformación celular inducida por la mezcla de metales.**

También se evaluó el efecto que se tiene el co-tratamiento con el antioxidante NAC y la mezcla de metales en la viabilidad del ensayo, los niveles de ERO y la expresión proteica de OLA1 en el día 11 del ensayo de transformación de dos fases. Cabe mencionar que además se determinó la capacidad transformante al día 25 del ensayo bajo este protocolo. En la tabla 1 se muestran los datos de viabilidad al día 11 del ensayo bajo los diferentes protocolos empleados, observando que no ocurren cambios en la viabilidad entre el ensayo estándar y el que fue sujeto al reto oxidante adicional. Mientras que en el ensayo de co-tratamiento con NAC, aún con el reto

oxidante, se incrementa significativamente este parámetro en el modelo celular y bajo el silenciamiento de OLA1.

Los resultados de la capacidad transformante, los niveles intracelulares de ERO y la expresión proteica de OLA1 se agruparon de forma comparativa en la tabla R2. La capacidad transformante de la mezcla de metales disminuye aun cuando se aplicó el reto oxidante con FeCl<sub>3</sub> al mismo tiempo que el co-tratamiento con NAC; indicando un efecto sinérgico en el protocolo del silenciamiento de OLA1. Se observó un comportamiento semejante en los niveles de ERO y la expresión de OLA1 en la condición de Metales/TPA entre el reto oxidante, aunado al co-tratamiento con NAC. Se encontró que el silenciamiento de OLA1 presenta los valores más bajos. Esto sugiere que el estado oxidativo y antioxidante que se presenta en la fase de iniciación del proceso transformante es un elemento clave del cual se desconocemos su regulación.

**Tabla R2. Datos comparativos de la capacidad transformante, los niveles intracelulares de ERO y la expresión proteica de OLA1 entre el protocolo estándar de dos fases Balb/c 3T3, el reto oxidante adicional (FeCl<sub>3</sub>) y el co-tratamiento con N-acetilcisteína.**

RCFE	Condición	Protocolo estándar <sup>A</sup>	FeCl <sub>3</sub> (100µM/24h) <sup>B</sup>	NAC + FeCl <sub>3</sub> <sup>C</sup>
Control	Control	1.00	1.00	1.00
	Metales-TPA	4.67* <sup>C</sup>	6.50** <sup>C</sup>	2.50 <sup>A,B</sup>
	MNNG-Metales	3.00	2.00	1.00
	Metales-Metales	3.33	3.50*	1.00
	MNNG-TPA	6.33** <sup>C</sup>	7.50** <sup>C</sup>	3.00 <sup>A,B</sup>
siRNA OLA1	Control	1.00	1.00	1.00
	Metales-TPA	2.10* <sup>C</sup>	2.50*	0.50 <sup>A</sup>
	MNNG-Metales	1.44	1.00***	0.75
	Metales-Metales	1.58	1.25*	1.00
	MNNG-TPA	2.82** <sup>C</sup>	2.25**	1.25 <sup>A</sup>
<b>Niveles de ERO</b>				
Control	Control	15.03 ± 3.53	17.67 ± 2.12	21.57 ± 0.85
	Metales-TPA	11.61 <sup>B,C</sup> ± 0.55	23.68 <sup>A</sup> ± 0.58	23.20 <sup>A</sup> ± 1.57
	MNNG-Metales	30.04 <sup>C</sup> ± 4.02	28.08 <sup>C</sup> ± 2.37	18.25 <sup>A,B</sup> ± 0.96
	Metales-Metales	25.44 <sup>B</sup> ± 1.05	40.21 <sup>A,C</sup> ± 1.08	21.36 <sup>A,B</sup> ± 0.42
siRNA OLA1	Control	13.51 ± 0.73	15.65 ± 0.32	14.32** ± 0.32
	Metales-TPA	11.39 <sup>B,C</sup> ± 1.54	20.04 <sup>A,C</sup> ± 1.56	15.20** <sup>B</sup> ± 0.0
	MNNG-Metales	16.45* <sup>B,C</sup> ± 1.44	21.40 <sup>A,C*</sup> ± 0.60	9.78** <sup>A,B</sup> ± 1.01
	Metales-Metales	14.57* <sup>B,C</sup> ± 1.96	21.67 <sup>A,C**</sup> ± 1.38	10.79*** <sup>A,B</sup> ± 0.33

<b>Expresión proteica de OLA1</b>				
Control	Control	1.21 <sup>B,C</sup> ± 0.16	3.37 <sup>A,C</sup> ± 0.32	2.64 <sup>B</sup> ± 0.07
	Metales-TPA	2.34 <sup>B,C</sup> ± 0.11	3.63 <sup>A,C</sup> ± 0.10	3.28 <sup>A,B</sup> ± 0.12
	MNNG-Metales	3.29 <sup>B,C</sup> ± 0.86	7.39 <sup>A</sup> ± 0.29	7.49 <sup>A</sup> ± 0.38
	Metales-Metales	3.70 <sup>B,C</sup> ± 0.01	7.86 <sup>A,C</sup> ± 0.17	6.49 <sup>A,B</sup> ± 0.29
siRNA OLA1	Control	0.33 <sup>**B,C</sup> ± 0.02	2.72 <sup>A</sup> ± 0.01	2.42 <sup>A</sup> ± 0.36
	Metales-TPA	0.41 <sup>**B,C</sup> ± 0.01	2.18 <sup>**A</sup> ± 0.08	2.32 <sup>**A</sup> ± 0.15
	MNNG-Metales	1.38 <sup>**B,C</sup> ± 0.16	6.69 <sup>*A,C</sup> ± 0.17	7.36 <sup>A,B</sup> ± 0.14
	Metales-Metales	1.65 <sup>**B,C</sup> ± 0.28	7.71 <sup>A</sup> ± 0.29	7.29 <sup>A</sup> ± 0.27

RCFE fue determinada en el control positivo de la transformación, MNNG/TPA. Los valores de ERO están representados como nmol/mg proteína. Análisis cuantitativo de la expresión proteica de OLA1; los valores están representados como veces de cambio respecto a la condición control. Los datos representan la media de tres experimentos independientes ± la desviación estándar y las diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos ( $P \leq 0.05$  <sup>A, B o C</sup>) y las diferencias entre condición control y siRNA de OLA1 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  y \*\*\* $p < 0.001$ ). El análisis estadístico se realizó mediante una t-student.

<sup>A</sup> Protocolo estándar, donde se lleva la transformación celular como lo indica la figura 7.

<sup>B</sup> Tratamiento oxidante adicional con FeCl<sub>3</sub> 100 μM, que se dio el día 10 durante 24 h, como se indica en la figura 7.

<sup>C</sup> Co-tratamiento con NAC mas tratamiento oxidante adicional con FeCl<sub>3</sub> 100 μM, que se dio el día 10 durante 24 h

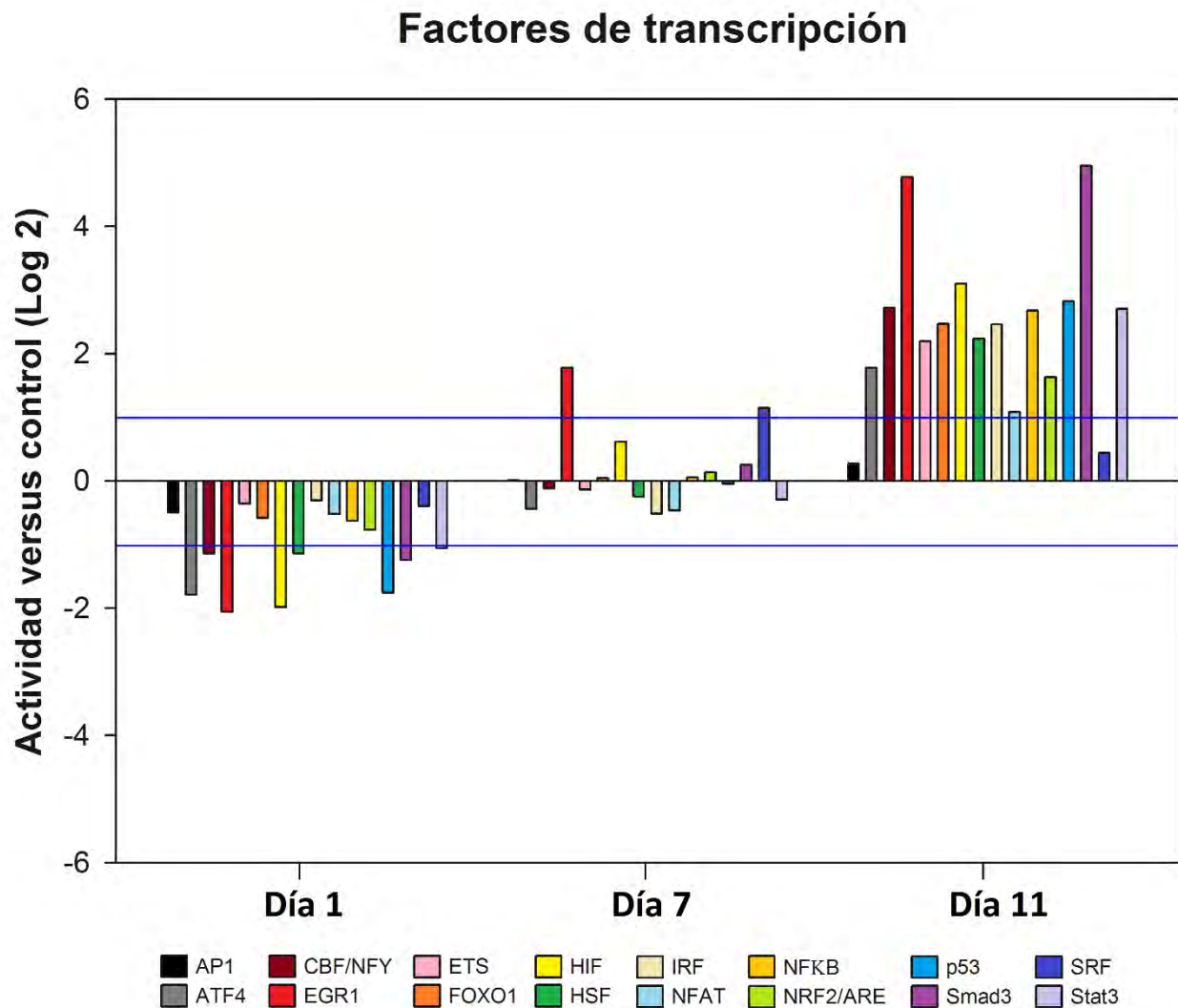
### **Efecto de la mezcla de metales sobre la actividad de factores de transcripción asociados al estrés oxidante, en el modelo de transformación de dos fases bajo condiciones estándar y el silenciamiento de OLA1.**

Con la finalidad de conocer las posibles vías que participan en la modulación del estado redox inducidas por la mezcla de metales en el modelo de transformación de dos fases, se determinó la actividad de 16 factores de transcripción asociados al estrés oxidante. Para ello se realizaron ensayos solo de la condición control negativo y de la mezcla de metales como estímulo iniciador (Metales-TPA) los días 1, 7 y 11, representando la etapa iniciadora y promotora del ensayo de transformación (Gráfico 8). Esto se realizó bajo el protocolo estándar y el silenciamiento de OLA1, para determinar el efecto sobre la actividad de dichos factores de transcripción.

Los resultados se presentan como la actividad de los factores de transcripción inducida por el tratamiento con la mezcla de metales relativos al control negativo. Bajo el protocolo estándar, se observó que la actividad de estos factores de transcripción es

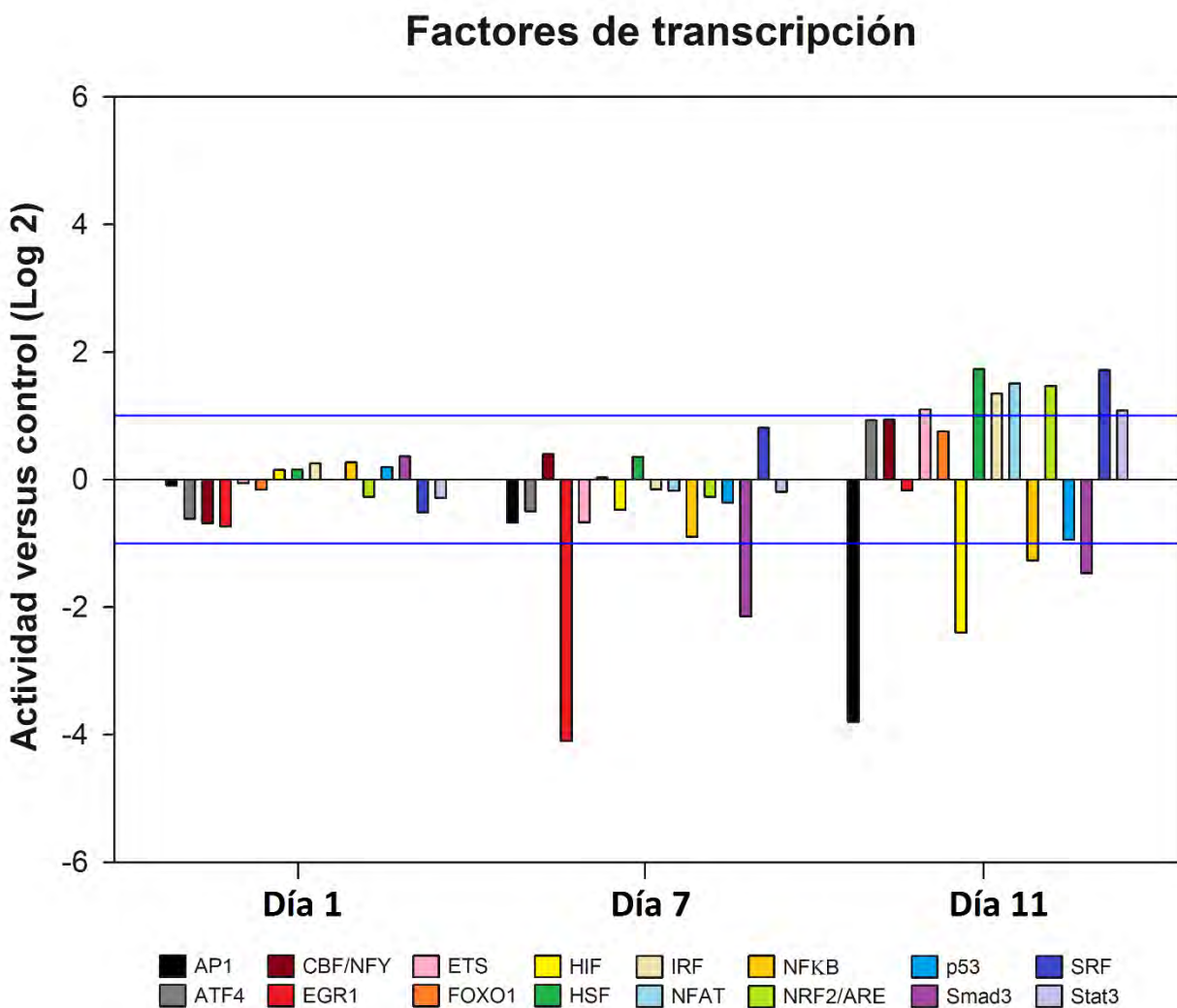


baja durante la fase de iniciación del proceso de transformación y fueron incrementando su actividad de forma considerable durante la fase promotora (día 11). Cabe mencionar que los factores de transcripción EGR1 y SRF mostraron incremento de actividad desde el día 7.



**Gráfico 8. Determinación de la actividad de factores de transcripción asociados al estrés oxidante a través del proceso de transformación celular inducido por la mezcla de metales, bajo el protocolo estándar.** Los valores muestran la media de dos experimentos independientes por duplicado. La línea azul indica las veces de cambio que presentan los factores de transcripción y que son aquellos que tuvieron un cambio significativo.

Mientras que en el silenciamiento de OLA1 se observó que baja la actividad de los factores de transcripción, inducida por la mezcla de metales (Gráfico 9) a través del ensayo de transformación. Solo fue posible detectar ganancia de actividad en 5 factores de transcripción (HSF, IRF, NFAT, NRF2/ARE, SRF) el día 11 del ensayo y pérdida de actividad en 6 factores de transcripción (EGR1, AP1, HIF, NFkB, Smad3, p53).



**Gráfico 9. Determinación de la actividad de factores de transcripción asociados al estrés oxidante a través del proceso de transformación celular inducido por la mezcla de metales, bajo el silenciamiento de OLA1.** Los valores muestran la media de dos experimentos independientes por duplicado. La línea azul indica las veces de cambio que presentan los factores de transcripción y que son aquellos que tuvieron un cambio significativo.

## ***DISCUSION***

La exposición a la mezcla de metales de As-Cd-Pb es una realidad, sin embargo, los efectos relacionados a esta exposición son poco conocidos y estudiados. En este proyecto se pretende aportar conocimiento sobre el papel de la proteína OLA1 en la capacidad transformante de la mezcla de As-Cd-Pb ( $\text{NaAsO}_2$  2  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CdCl}_2$  2  $\mu\text{M}$  y  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  5  $\mu\text{M}$ ) en el modelo de dos fases Balb/c 3T3.

Se encontró que la mezcla de metales es capaz de generar transformación celular morfológica principalmente como estímulo iniciador (Metales-TPA) más que como estímulo promotor (MNNG-Metales) o iniciador/promotor (Metales-Metales) similar a los estudios previos (Martín SA et al., 2011; Rodríguez-Sastre et al., 2014). También se observó que la mezcla de metales en condiciones estándar induce un aumento en los niveles intracelulares de ERO durante la fase iniciadora, específicamente en el día 1, demostrando que el mecanismo de toxicidad de los metales esta mediado por la generación de ERO, como lo reportó Valko (2007), alcanzando el máximo nivel durante el día 11 de la fase de promoción. En el día 16 se observó que hay una disminución en cuanto a los niveles intracelulares de ERO, sin embargo, las condiciones experimentales se encuentran aún por arriba de los niveles del control. Esto se puede explicar debido a que la generación de ERO es un proceso dinámico, que dependiendo de la etapa de la transformación celular en la que se encuentra, aumentarán o disminuirán los valores, tal como lo explica Valko (2006) en donde muestra el modelo multietapas de la carcinogénesis (Figura 3B) en correlación al estrés oxidante generado a través de todo el proceso. Nuestros hallazgos concuerdan con la explicación de carcinogenicidad de Fiaschi y Chiarugi (2012) con base a la creciente evidencia de que

el estrés oxidativo subyace en varias características definidas en el cáncer (Hanahan et al., 2011).

Fiaschi y Chiarugi (2012) establecieron que las proteínas y genes relacionados con el estrés oxidativo se sobre o subexpresen en los cánceres y, a menudo promueven las medidas necesarias para el establecimiento de la iniciación y progresión del cáncer. En este sentido, será importante encontrar nuevos reguladores de moléculas relacionadas con el estrés oxidativo.

En cuanto a los niveles de la expresión proteica de OLA1 va aumentando a través del ensayo de transformación tratado con la mezcla de metales como estímulo iniciado. Si bien la estadística no muestra cambios significativos en el día 11, la tendencia de la proteína es ir aumentando conforme transcurre la transformación celular, observándose que al día 16 hay un incremento en la proteína en comparación a la observada en el día 11, demostrando este incremento proteico de OLA1 como un posible marcador de transformación; este resultado podría considerarse relacionado a lo observado por Sun (2010), quien encontró que OLA1 se encuentra sobreexpresada en varios tipos de cáncer y asociada al daño generado al DNA.

Para determinar el tiempo máximo de silenciamiento de OLA1 realizamos una cinética de inhibición de OLA1 en un periodo de 12, 24 y 48 h, observando que, a las 12 h, la expresión de la proteína OLA1 disminuyó un 50%. El silenciamiento de OLA1 en la fase de iniciación del ensayo de transformación tuvo efectos sobre la capacidad transformante de la mezcla de metales, dado que disminuyó la eficiencia relativa formadora de colonias en un 50% en todas las condiciones experimentales. Este hallazgo se puede sumar a los mecanismos conocidos de carcinogenicidad de la mezcla de metales, así como el papel de OLA1 en las primeras etapas de la transformación celular, como lo sugerido por Zhang y colaboradores (2009a; 2009b).

Se encontró que el silenciamiento de OLA1, disminuye la transformación celular, sin embargo, no fue abatida hasta los valores del control negativo, observándose una disminución del 50% de los focos de transformación. La disminución en la transformación celular, específicamente en la condición de la mezcla de metales como estímulo iniciador (Metales/TPA) fue más fuerte que cuando se empleó la mezcla de metales como estímulo promotor, lo cual se correlaciona con el efecto previamente observado y descrito en trabajos previos, donde se observa que la mezcla de metales tiene un mayor efecto como estímulo iniciador que como promotor, definiéndolo como un agente iniciador y en donde estamos teniendo el mayor número de cambios. OLA1 puede estar funcionando a través de la traducción de proteínas o vías de degradación post-traduccional (como la fosforilación, ubiquitinación, acetilación, etc) de proteínas que suprimen los niveles de enzimas antioxidantes responsables del balance redox mediadas por tiores, actuando como un supresor, cofactor o inhibidor de estas enzimas antioxidantes (Zhang et al., 2009a), lo que indica la relevancia de los antioxidantes en la carcinogenicidad de los metales (Wang y Fowler, 2008; Martín SA et al., 2011; Rodríguez-Sastre et al., 2014; Sánchez-Valle et al., 2013) así como su relación con varias vías de señalización.

Durante la fase iniciadora del proceso de transformación se observa que no ocurren cambios en la expresión de la proteína OLA1, tanto en el protocolo estándar como cuando se inhibió OLA1, sin embargo, durante la fase promotora se observa que en la condición de la mezcla de metales como estímulo iniciador (Metales-TPA) hay un decremento de la proteína OLA1, con lo cual podríamos entender porque cuando silenciamos OLA1, se observa un mayor decremento de los focos de transformación. El fenotipo transformante generado por la mezcla de metales tuvo un comportamiento diferente entre la fase iniciadora y promotora del proceso de transformación (específicamente Metales/TPA) que depende de los cambios en los niveles de ERO, sin

embargo, durante la condición del siRNA de OLA1 en la fase promotora, la condición de los metales como estímulo iniciador no muestran diferencias significativas en comparación a la condición control y los cambios en los niveles de ERO son diferentes, dependiendo del iniciador utilizado. Observando que no ocurren cambios en los niveles intracelulares de ERO, nos llevó a preguntarnos si existe un umbral de respuesta oxidativo en la condición de los metales como estímulo promotor (Metales/TPA).

Determinamos que la mezcla de metales induce transformación celular y esta transformación esta modulada por el silenciamiento de OLA1, la cual tiene efectos regulatorios sobre los niveles de ERO, con lo cual se podrían explicar algunos efectos como la adhesión de la matriz celular (Jeyabal et al., 2014), motilidad e invasión de las células transformadas (Zhang et al., 2009b) durante la fase promotora, cuyos procesos forman parte de los “hallmarks” del cáncer. Este rescate de la transformación celular debido al silenciamiento de OLA1 en la iniciación también podría estar teniendo efectos sobre dos características esenciales para el establecimiento de cáncer: el microambiente tumoral y la reprogramación metabólica (Hanahan y Weinberg, 2011) por medio de la modulación de ERO, así como lo predicho por Fiaschi y Chiarugi (2012). Este escenario muestra la convergencia de los mecanismos desencadenados por la mezcla de metales y los procesos celulares involucrados en la transformación celular modulada por el silenciamiento de OLA1. La modulación de ERO en el día 11 de la fase promotora es un factor clave que induce la transformación celular a través de la adquisición de un cierto fenotipo, facilitando la motilidad e invasión, que es regulado por OLA1.

Existe una relación entre proteína OLA1 y los niveles de ERO. Para determinar la relación en el modelo de transformación celular de dos fases, se realizó una curva dosis-respuesta con un compuesto inductor de ERO ( $\text{FeCl}_3$ ; a concentraciones de 0, 50,

75, 100 y 150  $\mu\text{M}$  con un tratamiento de 24 horas), describiendo una correlación lineal. El fenotipo transformante generado por la mezcla de metales tuvo un comportamiento diferente entre la fase iniciadora y promotora del proceso de transformación (específicamente Metales/TPA), en donde se observa que no hay cambios en los niveles intracelulares de ERO.

Para asegurar que OLA1 funciona a través de vías post-traduccionales como lo describió Zhang y colaboradores (2009a), regulando a la baja los niveles de enzimas antioxidantes responsables del balance redox dependiente de tioles, analizamos si un estímulo oxidante adicional (con  $\text{FeCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  por 24 h) y un co-tratamiento con un precursor de tioles (NAC) restablecen el rescate de la transformación por el silenciamiento de OLA1, específicamente en la fase promotora (día 11) que es donde se observan los cambios en los niveles de ERO y OLA1. Estos resultados mostraron que los niveles intracelulares de ERO disminuyen con el co-tratamiento de NAC aun cuando se les dio el estímulo oxidante con  $\text{FeCl}_3$  (NAC+ $\text{FeCl}_3$ ), observándose una mayor disminución cuando se silenció OLA1 (siRNA OLA1), indicando una protección redox adicional por este silenciamiento y el co-tratamiento con NAC. Con el estímulo oxidante se observa que hay un incremento de la expresión proteica de OLA1, que no se vio modificada con el co-tratamiento de NAC (NAC- $\text{FeCl}_3$ ), pero la condición de la mezcla de metales como estímulo iniciador indujo una disminución significativa en comparación al control del siRNA. Los cambios en la expresión de la proteína indican que el silenciamiento de OLA1 fue la variable más importante implicada en la capacidad transformante de la mezcla de metales, específicamente en la condición de Metales/TPA. Sin embargo, es importante mencionar que la condición de Metales/TPA, fue la más protegida contra la transformación por NAC+ $\text{FeCl}_3$ , aunado al silenciamiento de OLA1.

Nuestro siguiente interés fue determinar la actividad de diversos factores de transcripción asociados al estrés oxidante que pudieran estar involucrados en la transformación celular inducida por la mezcla de metales. Determinamos la actividad de 16 factores de transcripción durante la interfase de las etapas de iniciación y promoción del protocolo de transformación inducido por la mezcla de metales como estímulo iniciador (Metales/TPA) comparando con la condición control tanto del protocolo estándar como del silenciamiento de OLA1 (siRNA OLA1). Con esto encontramos, que en general el silenciamiento de OLA1 disminuyó la actividad de los factores de transcripción durante la fase iniciadora, observándose que EGR1 y Smad3 son los factores modulados durante esta fase y en la fase promotora, mantiene los niveles de los mismos abajo, pero también los niveles de AP1, NFκB, HIF y p53, pero aumenta la actividad de factores como ETS, IRF, HSF, NFAT, NRF2, SRF, Stat3. Los cambios en la actividad de EGR1 durante la fase iniciadora (que es donde los metales tienen un mayor efecto) podría tener efectos sobre la vía de TGF-β/Smad3, ya que este factor de transcripción participa sobre esta vía, pudiendo regular al alta la expresión de genes de colágeno y jugando un papel crítico en la mediación de la estimulación de TGF-β (Chen et al., 2006; Wakefield et al., 2002; Massague et al., 2005). Las respuestas biológicas moduladas por EGR1 y Smad3 incluyen el crecimiento celular, senescencia, diferenciación, supervivencia, angiogénesis y la EMT (Chen et al., 2006; Wakefield et al., 2002; Massague et al., 2005). Cambios en estos factores de transcripción se han asociado con la carcinogénesis. EGR1 es considerado un supresor o promotor tumoral, dependiendo de si esta sub o sobreexpresado. Smad3 forma parte de la vía de TGF-β, cuya vía se ha encontrado sobreexpresada regulando la EMT que ayuda a contribuir en la invasión, migración y metástasis de las células cancerosas.

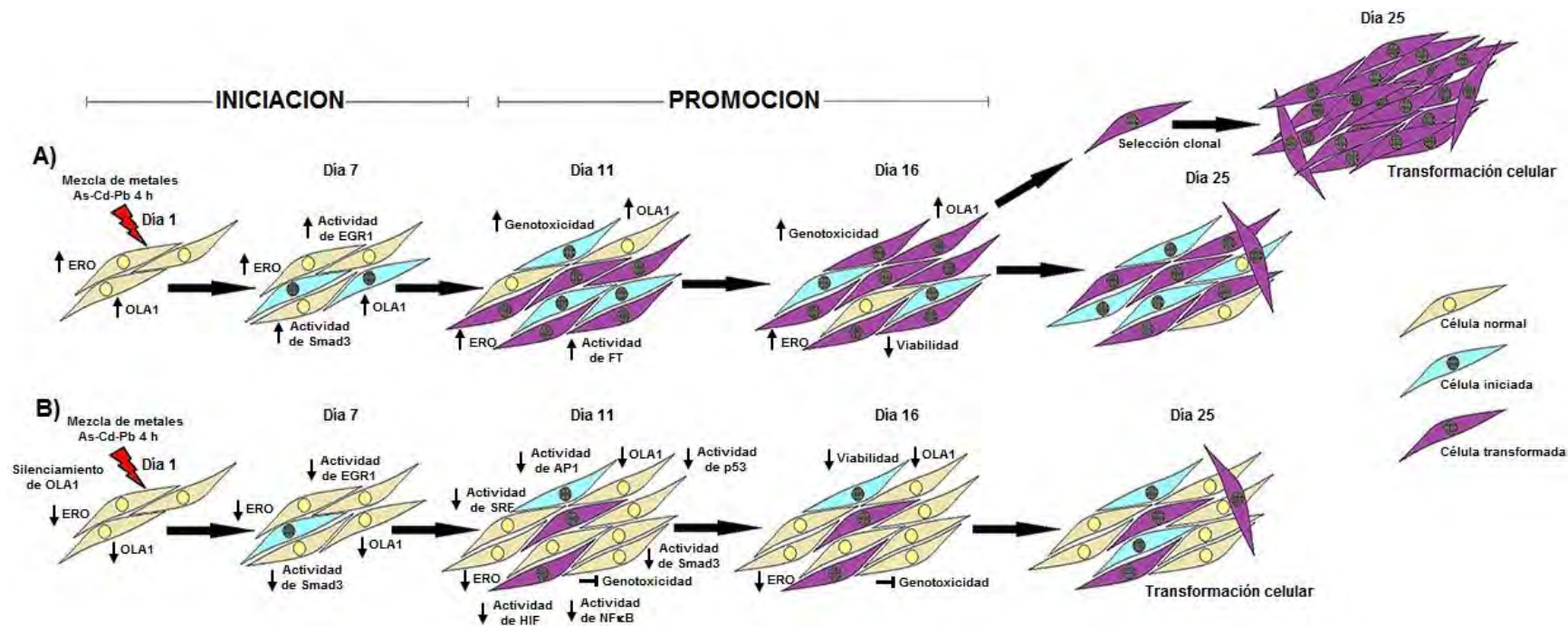
Las respuestas biológicas moduladas por los factores AP1, HIF, NFκB y p53 involucran procesos moleculares como angiogénesis, reparación del DNA, inflamación,



respuesta inmune y regulación del ciclo celular, alteraciones en estos factores de transcripción se han asociado al establecimiento y progresión del cáncer. La inducción de factores como HIF induce la expresión de numerosos genes blancos, como VEGF, que resulta en la angiogénesis requerida para el crecimiento tumoral. Dadas las funciones del factor p53 sobre la regulación del ciclo celular, reparación, senescencia y apoptosis se ha observado que cambios en la expresión de p53 conllevan a la carcinogénesis. Factores como NFκB, que involucran la respuesta inflamatoria, se ha visto que cuando esta sobre-expresado interfiere en varios hallmarks del cáncer, por la modulación o activación de genes que modulan procesos como inmortalidad celular, proliferación celular, señales antiapoptóticas, promoción tumoral, metástasis y angiogénesis.

Estos hallazgos sugieren que el rescate de la capacidad transformante de la mezcla de metales como estímulo iniciador (Metales/TPA) involucra la inhibición de la actividad de los factores de transcripción EGR1 y Smad3 durante la fase iniciadora y aún durante la fase promotora y la inhibición de la actividad de los factores de transcripción AP1, NFκB, HIF y p53 durante la etapa promotora.

En la figura 8 se observa un resumen de todos los eventos desencadenados en la transformación celular inducida por la mezcla de metales modulada por la expresión de la proteína OLA1.



**Figura 8. Eventos desencadenados en la transformación celular inducida por la mezcla de metales modulada por la expresión de OLA1.** A) Protocolo estándar del ensayo de transformación de dos fases Balb/c 3T3. El escenario muestra los incrementos intracelulares de ERO, sin cambios en la expresión proteica de OLA1 durante la fase de iniciación. En la fase de promoción se observa un incremento de los niveles intracelulares de ERO, expresión proteica de OLA1 y genotoxicidad, así como un decremento de la viabilidad celular a través del día 11. También se observa que incrementa la actividad de todos los factores de transcripción (FT). En el día 16 se observan aun niveles de ERO por arriba del control, así como incremento en la expresión proteica de OLA1, así como decremento de la viabilidad celular, que promueve la selección clonal de las células transformadas y observándose al día 25 una transformación celular morfológica, por la presencia de focos de transformación tipo III. B) Modulación de la transformación celular por medio del silenciamiento de OLA1. Durante el silenciamiento de OLA1 en la fase de iniciación, se observa un decremento de los niveles intracelulares de ERO y un mantenimiento de la expresión proteica de OLA1. Durante la fase de promoción los niveles de ERO y la expresión proteica de OLA1 son similares a los valores de la condición control a través del ensayo de transformación celular. Se observa que el silenciamiento de OLA1 disminuye la formación de focos de transformación tipo III al día 25 del ensayo de transformación.

## **CONCLUSIONES**

- La transformación celular inducida por la mezcla de metales como estímulo iniciador está relacionada con el incremento en los niveles de ERO y la expresión proteica de OLA1.
- El silenciamiento de OLA1 disminuye la capacidad transformante de la mezcla de metales como estímulo iniciador y este efecto es independiente de los niveles intracelulares de ERO.
- El co-tratamiento con un precursor de tioles, NAC, disminuye la capacidad transformante de la mezcla de metales como estímulo iniciador aún en presencia de un reto oxidante adicional.
- La mezcla de metales durante la fase iniciadora modifica la actividad de los factores de transcripción asociados al estrés oxidante observándose una baja actividad de los mismos e incrementando su actividad durante la fase promotora en la condición de los metales como estímulo iniciador (Metales-TPA).
- La disminución de la capacidad transformante de la mezcla de metales como estímulo iniciador en un escenario del silenciamiento de OLA1, involucra la pérdida de actividad de factores de transcripción asociados al estrés oxidante a través de todo el proceso de transformación celular inducido por la mezcla de metales.

## ***PERSPECTIVAS***

Con base a los resultados mostrados, surgen nuevas incógnitas que nos podrían ayudar a entender mejor el mecanismo por el cual esta mezcla de metales y su generación de ERO están induciendo transformación celular y como OLA1 regula esos mecanismos para disminuir el proceso transformante, las cuales son:

- ❖ Determinar si el silenciamiento estable de OLA1 (por medio de shRNAs y partículas lentivirales) es capaz de abatir completamente la transformación celular inducida por la mezcla de metales As-Cd-Pb.
- ❖ Determinar cómo estos factores de transcripción asociados al estrés oxidante intervienen en la transformación celular inducida por la mezcla de metales As-Cd-Pb.
- ❖ Establecer los posibles mecanismos por los cuales OLA1 está modificando la actividad de los factores de transcripción asociados al estrés oxidante.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Aaronson SA and Todaro GJ. Development of 3T3-like line from Balb/c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. *J Cell Physiol.* 74: 141-148; 1968a.
2. Aaronson SA and Todaro GJ. Basis for the acquisition of malignant potential by cell cultivated in vitro. *Science* 162: 1024-1026; 1968b.
3. Ahamed M and Siddiqui MKJ. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clinica Chemica Acta.* 383: 57-64; 2007.
4. Bai L, Yu Z, Zhang J, Yuan S, Liao C, Jeyabal PVS, Rubio V, Chen H, Li Y and Shi ZZ. OLA1 contributes to epithelial-mesenchymal transition in lung cancer by modulating the GSK3 $\beta$ /snail/E-cadherin signaling. *Oncotarget.* 1; 7(9): 10402-10413; 2016.
5. Bertolero F, Pozzi G, Sabbioni E and Saffiotti U. Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation. *Carcinogenesis* 8: 803-808; 1987.
6. Beyersmann D and Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol.* 82: 493-512; 2008.
7. Chen H, Song R, Wang G, Ding Z, Yang C, Zang J, Zeng Z, Rubio V, Wang L, Zu N, Weiskoff AM, Minze LJ, Jeyabal PVS, Mansour OC, Bai L, Merrick WC, Zheng S and Shi ZZ. OLA1 regulates protein synthesis and integrated stress response by inhibiting eIF2 ternary complex formation. *Sci Rep.* doi: 10.1038/srep13241: 1-17; 2015.
8. Chen SJ, Ning H, Ishida W, Sodin-Semri S, Takagaw S, Mori Y and Varga J. The early immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor-b and mediates stimulation of collagen gene expression. *J Biol Chem.* 281: 21183-21197; 2006.

9. Chiba N, Matsuzawa A, Kano S, Nakayama M, Mochiduki H, Wei L, Shimaoka T, Furukawa Y, Kato K, Shibata S, Yasui A and Ishioka C. The BRCA1/BARD1-interacting protein OLA1 functions in centrosome regulation. *Mol Cell*. 53: 101-114, 2014.
10. Combes R, Balls M, Curren R, Fischbach M, Fusening N, Kirkland D, Lasne C, Landolph J, LeBoeuf R, Marquardt H, McCormick J, Müller L, Rivedal E, Sabbioni E, Tanaka N, Vasseur P and Yamasaki H. Cell transformation assays as predictors of human carcinogenicity. *Atla* 27: 745-767; 1999.
11. Creton S, Aardema M, Carmichel P, Harvey J, Martin F, Newbold R, O'Donovan K, Pant K, Poth A, Sakai A, Sasaki K, Scott A, Schechtman L, Shen R, Tanaka N, Yasaei H. Cell transformation assays for prediction of carcinogenic potential: state of the science and future research needs. *Mutagenesis* 27: 93-101; 2012.
12. Ding Z, Liu Y, Rubio V, He J, Minze LJ, Shi ZZ. OLA1, a translational regulator of p21, Maintains optimal cell proliferation necessary for developmental progression. *Mol Cell Biol*. doi: 10.1128/MCB.00137-16; 2016.
13. Fang MZ, Mar WC, Cho MH. Cell cycle was disturbed in the MNNG-induced initiation stage during in vitro two-stage transformation of Balb/3T3 cells. *Toxicology* 163: 175-184; 2001.
14. Fiaschi T and Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *Int J Cell Biol*. doi:10.1155/2012/762825; 2012.
15. Goodson WH, Lowe L, Carpenter DO, Gilbertson M, Ali AM, Salsamendi ALC, Lasfar A, Carnero A, Azqueta A, Amedei A, Charles AK, Collins AR, Ward A, Salzberg AC, Colacci AM, Olsen AK, Berg A, Barclay BJ, Zhou BP, Blanco-Aparicio B, Baglioni CJ, Dong C, Mondello C, Hsu CW, Naus CC, Yedjou C, Curran CS, Laird DW, Koch DC, Carlin DJ, Felsher DW, Roy D, Brown DG, Ratovitski E, Ryan EP, Corsini E, Rojas E, Moon EY, Laconi E, Marongiu F, Al-Mulla F, Chiaradonna F, Darroudi F, Martin FL, Schooten FJV, Goldberg GS, Wagemaker G, Nangami GN, Calaf GM, Williams GP, Wolf GT, Koppen G,

Brunborg G, Lyerly HK, Krishnan H, Hamid HA, Yasaei H, Sone H, Kondoh H, Salem HK, Hsu HY, Park HH, Koturbash I, Miousse IR, Scovassi AL, Klaunig JE, Vondráček J, Raju J, Roman J, Wise JP, Whitfield JR, Woodrick J, Christopher JA, Ochieng J, Martinez-Leal JF, Weisz J, Kravchenko J, Sun J, Prudhomme KR, Narayanan KB, Cohen-Solal KA, Moorwood K, Gonzalez L, Soucek L, Jian L, D'Abronzio LS, Lin LT, Li L, Gulliver L, McCawley LJ, Memeo L, Vermeulen L, Leyns L, Zhang L, Valverde M, Khatami M, Romano MF, Chapellier M, Williams MA, Wade M, Manjili MH, Leonart ME, Xia M, Guzman MJG, Karamouzis MV, Kirsch-Volders M, Vaccari M, Kuemmerle NB, Singh N, Cruickshanks N, Kleinstreuer N, Larebeke NV, Ahmed N, Ogunkua O, Krishnakumar PK, Vadgama P, Marignani PA, Ghosh PM, Ostrosky-Wegman P, Thompson PA, Dent P, Heneberg P, Darbre P, Leung PS, Nangia-Makker P, Cheng Q, Robey RB, Al-Temaimi R, Roy R, Andrade-Vieira R, Sinha RK, Mehta R, Vento R, Di Fiore R, Ponce-Cusi R, Dornetshuber-Fleiss R, Nahta R, Castellino RC, Palorini R, Hamid RA, Langie SAS, Eltom SE, Brooks SA, Ryeom S, Wise SS, Bay SN, Harris SA, Papagerakis S, Romano S, Pavanello S, Eriksson S, Forte S, Casey SC, Luanpitpong S, Lee TJ, Otsuki T, Chen T, Massfelder T, Sanderson T, Guarnieri T, Hultman T, Dormoy V, Odero-Marah V, Sabbisetti V, Maguer-Satta V, Rathmel WK, Engström W, Decker WK, Bisson WH, Rojanasakul Y, Luqmani Y, Chen Z and Hu Z. Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: the challenge ahead. *Carcinogenesis* 36 (S1): S254-S296; 2015.

16. Hammand MS, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R and Hannon GJ. Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293 (5532): 1146-1150; 2001.
17. Hanahan D. and Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646-674; 2011.
18. Hansberg Torres W. Biología de las especies reactivas de oxígeno. Facultad de Medicina, Depto. de Bioquímica, 2002.

19. Isfort RJ, Cody DB, Doersen CJ, Kerckaert GA and Leboeuf RA. Alterations in cellular differentiation, mutagenesis, cytoskeleton and growth characteristics during Syrian hamster embryo cell multistep in vitro transformation. *Int J Cancer* 59: 114-125; 1994.
20. Jeyabal PVS, Rubio V, Chen H, Zhang J and Shi ZZ. Regulation of cell-matrix adhesion by OLA1, the Obg-like ATPase 1. *Biochem Biophys Acta* 444: 568-574, 2014.
21. Kajiwara Y and Ajimi S. Verification of the Balb/c 3T3 cell transformation assay after improvement by using an ITES-medium. *Toxicol in vitro* 17: 489-496; 2003.
22. Kohen R and Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol pathol.* 30: 620-650; 2002.
23. Koller-Eichhorn R, Marquardt T, Gail R, Wittinghofer A, Kostrewa D, Kutay U and Kambach C. Human OLA1 Defines an ATPase subfamily in the Obg family of GTP-binding proteins. *J Biol Chem.* 282(27): 19928-19937; 2007
24. Kossowska B, Dudka I, Bugla-Płoskońska G, Szymańska-Chabowska A, Doroszkiewicz W, Gancarz R, Andrzejak R and Antonowicz-Juchniewicz J. Proteomic analysis of serum of workers occupationally exposed to arsenic, cadmium, and lead for biomarker research: a preliminary study. *Sci Total Environ.* 408: 5317–5324; 2010.
25. Kossowska B, Dudka I, Gancarz R and Antonowicz-Juchniewicz J. Application of classic epidemiological studies and proteomics in research of occupational and environmental exposure to lead, cadmium and arsenic. *Int J Hyg Environ Health.* 216: 1–7; 2013.
26. Langie SAS, Koppen G, Desaulniers D, Al-Mulla F, Al-Temaimi R, Amedei A, Azqueta A, Bisson WH, Brown DG, Brunborg G, Charles AK, Chen T, Colacci AM, Darroudi F, Forte S, Gonzalez L, Hamid RA, Knudsen LE, Leyns L, Salsamendi ALC, Memeo L, Mondello C, Mothersill C, Olsen AK, Pavanello S,



- Raju J, Rojas E, Roy R, Ryan EP, Ostrosky-Wegman P, Salem HK, Scovassi AL, Singh N, Vaccari M, Schooten FJV, Valverde M, Woodrick J, Zhang L, Larebeke N, Kirsch-Volders M and Collins AR. Causes of genomic instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis* 36(S1): S61-S88; 2015.
- 27.** Lee JC, Son YO, Pratheeshkumar P and Shi X. Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 53: 742-757; 2012.
- 28.** Mao RF, Rubio V, Chen H, Bai L, Mansour OC and Shi ZZ. OLA1 protects cells in heat shock by stabilizing HSP70. *Cell Death Dis.* 14; 4: e491 doi: 10.1038/cddis.2013.23; 20113.
- 29.** Martín SA, Emilio R and Mahara V. Role of oxidative stress in transformation induced by metal mixture. *Oxid Med Cell Longev.* doi: 10.1155/2011/935160; 2011.
- 30.** Martínez Baeza Elia. Efecto de OLA1 en la transformación celular inducida por la mezcla de Arsénico, Cadmio y Plomo. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias, 2012.
- 31.** Martínez-Pacheco M, Hidalgo-Miranda A, Romero-Córdoba S, Valverde M and Rojas E. mRNA and miRNA expression patterns associated to pathways linked to metal mixture health effects. *Gene* 533(2): 508-514; 2014.
- 32.** Mascolo M, Perdichizzi S, Rotondo F, Morandi E, Guerrini A, Silingardi P, Vaccari M, Grilli S and Colacci A. Balb/c 3T3 cell transformation assay for the prediction of carcinogenic potential of chemicals and environmental mixtures. *Toxicol in vitro* 24: 1292-1300; 2010.
- 33.** Massague J, Seoane J and Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19:2783-2810; 2005

34. Matthews EJ. Chemical-induced transformation in Balb/3T3 cells: relationships between *in vitro* transformation and cytotoxicity, carcinogenesis and genotoxicity. *Prog Clin Biol Res.* 340D: 229-238; 1990.
35. Mazzotti F. *In vitro* rodent models as alternative methods in assessing cytotoxicity and carcinogenic potential of metal compounds. Tesis para obtener el grado de doctor, Barcelona 2003.
36. Meyer AL. *In vitro* transformation assays for chemical carcinogens. *Mutat Res.* 115: 323-338; 1983.
37. Palus J, Rydzyński K, Dziubałowska E, Wyszynska K, Natarajan AT and Nilsson R. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat Res.* 504(1): 19-28; 2003.
38. Poręba R, Gać P, Poręba M, Antonowicz-Juchniewicz J, and Andrzejak R. Relation between occupational exposure to lead, cadmium, arsenic and concentration of cystatin C. *Toxicology* 283: 88–95; 2011.
39. Ramos-Espinosa P, Rojas E and Valverde M. Differential DNA damage response to UV and hydrogen peroxide depending of differentiation stage in a neuroblastoma model. *Neurotoxicology* 33(5): 1086-1095; 2012.
40. Rebois RV and Patel J. Phorbol ester causes desensitization of gonadotropin-responsive adenylate cyclase in a murine Leydig tumor cell line. *J Biol Chem.* 260(13): 8026-8031; 1985.
41. Rodríguez SMA, Rojas E and Valverde M. Assessing the impact of As-Cd-Pb metal mixture on cell transformation by two-stage Balb/c 3T3 cell assay. *Mutagenesis* 29 (4): 251-257; 2014.
42. Rojas E, Shi ZZ, Valverde M, Paules RS, Habib GM and Lieberman MW. Cell survival and changes in gene expression in cells unable to synthesize glutathione. *Biofactors* 17:13-19; 2003.

- 43.**Saffiotti U, Bignami M, Bertolero F, Cortesi F, Ficarella C and Kaighn ME. Studies on chemically induced neoplastic transformation and mutation in the BALB/3T3 C1 A31-1-1 cell line in relation to the quantitative evaluation of carcinogens. *Toxicol Pathol.* 12(4): 383-390; 1984.
- 44.**Sánchez-Valle V, Valverde M, Carrizale L, Mejia J, Zepeta N, Rojas E. A metal mixture induces transformation upon antioxidant depletion in a hepatic cell line. *Ann Hepatol.* 12(2): 315-324; 2013.
- 45.**Sakai A. Balb/c 3T3 cell transformation assays for the assessment of chemical carcinogenicity. *AATEX* 14: 367-373; 2007.
- 46.**Schechtman ML. Rodent cell transformation assays – A brief historical perspective. *Mutat Res.* 744: 3-7; 2012.
- 47.**Shi ZZ. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5101-5106; 2000.
- 48.**Siroux V, Agier L and Slama R. The exposome concept: a challenge and potential driver for environmental health research. *Eur Respir Rev.* 25(140): 124-129; 20016
- 49.**Sun H, Luo X, Montalnano J, Jin W, Shi J, Sheikn MS and Huang T. DOC45, a Novel DNA Damage-Regulated nucleocytoplasmic ATPase that is overexpressed in multiple human malignancies. *Mol Cancer Res.* 8(1); 57-66; 2010.
- 50.**Tanaka N, Bohnenberger S, Kunkelmann T, Munaro B, Ponti J, Poth A, Sabbioni E, Sakai A, Salovaara S, Sasaki K, Thomas BC and Umeda M. Prevalidation study of the BALB/c 3T3 cell transformation assay for assessment of carcinogenic potential of chemicals. *Mutat Res.* 744(1): 20-9. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.12.008; 2012
- 51.**Tsuchiya T, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Tokunaga H, Sakimoto K, Ando M and Umeda M. Inorganic arsenic compounds and methylated metabolites induce

- morphological transformation in two-stage Balb/c 3T3 cell assay and inhibit metabolic cooperation in V79 cell assay. *Toxicol Sci.* 84: 344-351; 2005.
- 52.** Umeda M. Cell transformation assay using Balb/c 3T3 cells or Bhas 42 cells for the efficient detection of tumor promoters. *Atla* 32: 673-677; 2004.
- 53.** Valko M, Morris H and Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 12(10): 1161-1208; 2005.
- 54.** Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovich M, and Mazaur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interac.* 16: 1-40; 2006.
- 55.** Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1): 44-84; 2007
- 56.** Valko M, Jomovo K, Rhodes CJ, Kuča K and Musílek K. Redox-and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol.* 90: 1-37; 2016.
- 57.** Wang G and Fowler B. Roles of biomarkers in evaluation interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol App Pharmacol.* 233(1): 92-99; 2008.
- 58.** Wenk M, Ba Q, Erichsen V, MacInnes K, Wiese H, Warscheid B and Koch HG. A universally conserved ATPase regulates the oxidative stress response in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 282(52): 43585-43598; 2012.
- 59.** Wild CP. Complementing the genome with and “exposome”: the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14(8):1847-1850; 2005.

- 60.**Wozniak K and Blasiak J. In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links; *Mutat Res.* 535(2): 127-139; 2003
- 61.**Zhang J, Rubio V, Lieberman MW and Shi ZZ. OLA1, an Obg-like ATPase, suppresses antioxidant response via nontranscriptional mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* doi: 10.1073/pnas.0907213106; 2009
- 62.**Zhang J, Rubio V, Zheng S and Shi ZZ. Knockdown of OLA1, a regulator of oxidative stress response, inhibits motility and invasion of breast cancer cells. *J Zhejiang Univ Sci. B.* 10(11): 796-804; 2009b.

# ANEXO

## Original Manuscript

# Metal mixture (As–Cd–Pb)-induced cell transformation is modulated by OLA1

Elia Martínez-Baeza, Emilio Rojas and Mahara Valverde\*

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, DF, México

\* To whom correspondence should be addressed. Tel: +52 55 56229176; Fax: +52 55 56229182; Email: [mahara@biomedicas.unam.mx](mailto:mahara@biomedicas.unam.mx)

Received 11 January 2016; Revised 12 February 2016; Accepted 16 February 2016.

## Abstract

Environmental pollutants are complex mixtures in which metals are ubiquitous. Metal mixtures of arsenic, cadmium and lead are present in the occupational environment and generate health effects such as cardiovascular, renal and cancer diseases. Cell transformation induced by metal mixtures that depend on reactive oxygen species (ROS) generation, cell viability maintenance and avoidance of senescence was previously reported by our group. The aim of the present study was to explore the role of a Olg-like ATPase1 (OLA1) in the cell transformation of BALB/c 3T3 A31-1-1 clonal cells induced by a metal mixture (2  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub>, 2  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> and 5  $\mu$ M Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O) through ROS generation. The interest in OLA1 is justified because this protein has been proposed to be a negative regulator of the cellular antioxidant response. Small interfering RNA (siRNA) was used to knockdown OLA1 before the initiation stage of the transformation assay. We evaluated (ROS) and OLA1 protein expression throughout the initiation and promotion stages of transformation. OLA1 knockdown modulated metal mixture-induced cell transformation more strongly when the metal mixture was an initiator stimulus than when it was a promoter. The ability of the metal mixture to initiate cell transformation was diminished by OLA1 knockdown, an effect that depended on intracellular ROS levels. The effect of OLA1 was synergistic with *N*-Acetyl-l-cysteine (NAC) co-treatment. Oxidative stress-associated transcription factors Egr1 and Smad were also down-regulated by the OLA1 knockdown, contributing to the rescue of metal mixture cell transformation.

## Introduction

Arsenic (As), cadmium (Cd) and lead (Pb) have been listed in the top 10 hazardous elements present in toxic wastes. They have been proposed as components of a mixture for use in interaction profile studies by the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1,2). These metals can affect multiple aspects of cellular function, including proliferation, apoptosis, differentiation and cell transformation (3,4). Concurrent exposure to As, Cd and/or Pb may produce additive or synergistic interactions or even new effects that are not observed in single-component exposures (5). Several studies in the last decade have referred to health effects in human occupational populations exposed to metal mixtures of As, Cd and Pb (5–9), at similar concentration employed in the present study. Recent studies from our group used a transformation assay validated by

IARC/NCI/EPA to determine the capacity of a metal mixture (2  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub>, 2  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> and 5  $\mu$ M Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O) to induce morphological transformation as a hallmark of carcinogenic activity (10–12). The *in vitro* two-stage transformation assay using the BALB/c 3T3 A31-1-1 cell line is a useful system due to its convenient protocol and high predictability (13). The improved transformation assay proposed by Kajiwara and Ajimi (14) will have a high concordance with the rodent bioassay, a high sensitivity for carcinogens and a high specificity for non-carcinogens. The improved transformation assay seems to detect not only most genotoxic carcinogens but also approximately 50% of non-genotoxic carcinogens. It can be expected that the improved transformation assay will be able to detect a broad range of carcinogens within approximately 3 weeks, and this protocol will be a reliable and useful short-term test procedure to screen for potential carcinogens (15,16). Our interest has

focused on the mechanisms involved in the metal mixture carcinogenicity. We have determined that cell transformation depends on intracellular levels of ROS, cell viability and avoidance of senescence (10,12).

The results of Sun *et al.* (17) indicate that the DNA damage-regulated overexpressed in cancer 45 (DOC45) gene encodes a novel ATPase that is linked to cellular stress response and tumorigenesis, and may also serve as a valuable tumour marker. DOC45 is overexpressed in several human malignancies: colon, rectum, ovary, lung, stomach and uterus cancers (17). DOC45 is an alias of GTPBP9 and PTD004 and was recently named Obg-like ATPase 1 (OLA1). OLA1 functions as a negative regulator of the cellular antioxidant response independent of transcriptional processes. The beneficial effects observed upon OLA1 knockdown suggest that this regulatory ATPase is a potential novel target for antioxidant therapy (18). Knockdown of OLA1 significantly inhibits cell migration and invasion in breast cancer cell line MDA-MB-231, affecting ROS production without cell growth changes (19).

In the present study, we show that cell transformation induced by the metal mixture 2  $\mu\text{M}$  NaAsO<sub>2</sub>, 2  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>, and 5  $\mu\text{M}$  Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O through ROS generation was rescued by OLA1 knockdown during the initiation stage of morphological transformation.

## Materials and methods

### Chemicals

Sodium meta-arsenite (NaAsO<sub>2</sub>, purity 100%, Cat. 57400), cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>, purity 99.5%, Cat. 3996), 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, Cat. P-8139), *N*-methyl-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, Cat. 342122), dihydrorhodamine 123 and *N*-acetyl-l-cysteine (NAC, Cat. A-9165) were purchased from the Sigma–Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Lead acetate (Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O, purity 99.9%, Cat. 2271), insulin-transferrin-selenium-A (ITS-A, Cat. 51300-044) and antibiotic-antimycotic (Cat. 15240-062) were purchased from J. T. Baker (México) and GIBCO/Invitrogen (NY, USA). Sodium chloride (NaCl, Cat. 3624-01) and potassium chloride (KCl, Cat. 3040-01) were from J.T. Baker (México). Magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>, Cat. M-2643), calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>, Cat. C-1016), glucose (Cat. G-7528), HEPES (Cat. H-9136), Triton X-100 (Cat. T-9284), sodium deoxycholate (Cat. D-6750) and phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, Cat. P-7626) were purchased from the Sigma–Aldrich Chemical Co. Sodium dodecyl sulfate (SDS, Cat. 161-0302) was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA), and TRIS (Cat. 75825) was purchased from USB Corporation (Cleveland, USA).

### Cell culture

Morphological transformation experiments were performed using BALB/c 3T3 A31-1-1 clonal cells (ATCC Cat CCL-163). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Cat. 31600-034) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic-antimycotic in a humidified incubator under 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were sub-cultured before reaching confluence, usually once per week. Additional media used during the promotion state of the transformation assay consisted of the following: DMEM supplemented with 2% FBS, 1% antibiotic-antimycotic, and 1% ITS-A (10 mg/ml insulin, 5.5 mg/ml transferrin and 0.0067 mg/ml sodium selenite). All media were obtained from GIBCO/Invitrogen.

The two-stage BALB/c 3T3 cell transformation assay was performed as described previously with slight modifications (20). The transformation protocol consisted of 25 days, divided into two

phases: initiation between Days 1 and 7 and promotion between Days 7 and 25. Cells were plated at a density of 5 × 10<sup>5</sup> cells per 100-mm dish in DMEM supplemented with 10% FBS. After 48 h incubation, on Day 1 of the assay, subconfluent cells were exposed to the initiator stimulus for 4 h. The metal mixture or 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitroso-guanidine (MNNG) was used as a positive control, and untreated cells were used as a negative control (Figure 1). After such initiator treatment, cells were harvested and replated at a density of 1 × 10<sup>4</sup>. On Day 4, cultures were replenished with fresh DMEM supplemented with 10% FBS. On Days 7, 11 and 14, cells were replenished with medium supplemented with 1% ITS-A and 2% FBS, and the metal mixture or 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (positive control) was added as the promoter stimulus (Figure 1). On Day 25, the cells were fixed with ethanol and stained with Giemsa solution. Samples used for analysis of the initiation stage were collected on Day 1 after 4 h of treatment and Day 7 before the promoter treatment. Promotion samples were obtained on Days 11 and 21. Transformed foci type III were scored according to five morphological characteristics: (i) foci of more than 2 mm in diameter, (ii) deep basophilic staining, (iii) dense multilayering of cells, (iv) random orientation and (v) domination of spindle-shaped cells at the edge of the foci (10,13,14,21,22). To evaluate the relative colony formation efficiency (RCFE), we counted the number of transformed foci type III per dish for each experimental condition and adjusted it with respect to the number foci per negative-control dish.

### Viability

Fluorescein diacetate (FDA, Sigma, Cat. 21879)/ethidium bromide (Sigma, Cat. E-8751) dual-stain assay was carried out to determine lysosomal metabolism. Briefly, the cells harvested were mixed with a fluorochrome solution containing 0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ethidium bromide and 0.015  $\mu\text{g}/\text{ml}$  FDA. Cells were analysed under a fluorescence microscope (Olympus BX-60); green-stained cells were identified as metabolically active (live), while red-stained cell were identified as dead cells. One hundred randomly chosen cells were evaluated per condition, and the results are expressed as percentages.

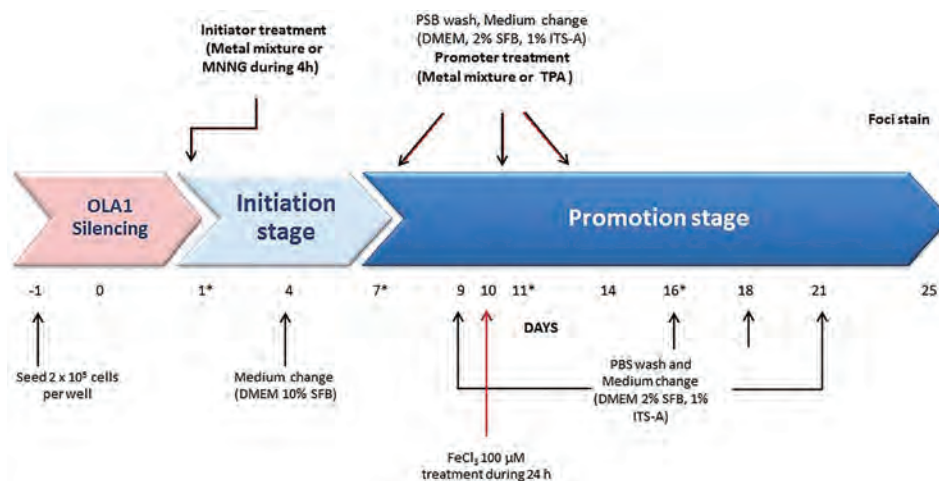
### Reactive oxygen species

This technique is based on the reactive oxygen species (ROS) dependent oxidation of dihydrorhodamine 123 (DHR123, Calbiochem, Cat. 309825) to rhodamine 123 (Sigma, Cat. R-8004). BALB/c 3T3 A31-1-1 cells were grown on 100 mm dishes under the conditions of transformation assay. The medium was removed and washed with PBS. Cells were harvested and counted in a Moxi automated cell counter (ORFLO, Montana, USA). Aliquots equivalent to 100 000 cells were collected and centrifuged at 1200 rpm for 5 min. The supernatant was poured, and 180  $\mu\text{l}$  of buffer A (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 15 mM HEPES) and 20  $\mu\text{l}$  of dihydrorhodamine 123 (1 mM) were added to the pellet. This mixture was placed in a 96-well plate and read using a micro-plate reader (Bio-Rad) at a wavelength of 505 nm. The results were interpolated in a curve of rhodamine 123 in buffer A at concentrations of 0–10  $\mu\text{M}$ .

### OLA1 knockdown

This technique was performed according to the small interfering RNA (siRNA) transfection protocol of Santa Cruz Biotechnology, Inc. (OLA1 or GTPBP9 siRNA: sc-145833; control siRNA: scrambled sc-37007). In a six-well tissue culture plate, we seeded 2 × 10<sup>5</sup> cells per well in 2 ml antibiotic-free normal growth medium supplemented with





**Figure 1.** Two-stage BALB/c 3T3 cell transformation assay protocol. The assay consisted of 25 days: initiator stage between Days 1 and 7 and promotion stage between Days 7 and 25. *Standard protocol:* on Day 1, subconfluent cells were treated with the initiator stimulus, metal mixture (2  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$ , 2  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  and 5  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) or 0.5  $\mu\text{M}$  MNNG (positive control) for 4h. Cells ( $1 \times 10^4$ ) were reseeded in DMEM medium supplemented with 10% FBS. On Day 4, medium was changed. In the promotion stage, medium was changed to DMEM supplemented with 2% FBS and 1% ITS-A. Day 7, 11 and 16 cells were treated with the metal mixture or 0.1  $\mu\text{M}$  TPA (positive control). On Days 9, 16, 18 and 21, medium was changed. *OLA1 silencing:* before the standard protocol of transformation assay, we knocked down OLA1 by a specific siRNA or scrambled sequence (control). On Day -1, in a six-well plate we seeded  $2 \times 10^5$  cells per well. Sub-confluent cell cultures were treated with 5  $\mu\text{L}$  siRNA-OLA1 and 6  $\mu\text{L}$  of siRNA transfection reagent per well and incubated for 7h at  $37^\circ\text{C}$  in a  $\text{CO}_2$  incubator. Then, we added DMEM supplemented with 20% FBS for 12h. Cell cultures were treated with an initiator stimulus, either metal mixture or 0.5  $\mu\text{M}$  MNNG (positive control) for 4h, and we followed the standard protocol. Sampling days were 1 and 7 for the initiation stage and 11 and 16 for the promotion stage (represented by \*). These both treatments were performed in standard protocol and OLA1 silencing protocol with their respective controls. *FeCl<sub>3</sub> treatment* was an additional oxidative challenge ( $\text{FeCl}_3$  100  $\mu\text{M}$ ) administered for 7h at  $37^\circ\text{C}$  in a  $\text{CO}_2$  incubator. Then, we added DMEM supplemented with 20% FBS for 12h. Cell cultures were treated with an initiator stimulus, either metal mixture or 0.5  $\mu\text{M}$  MNNG (positive control) for 4h, and we followed the standard protocol. Sampling days were 1 and 7 for the initiation stage and 11 and 16 for the promotion stage (represented by \*). These both treatments were performed in standard protocol and OLA1 silencing protocol with their respective controls. *FeCl<sub>3</sub> treatment* was an additional oxidative challenge ( $\text{FeCl}_3$  100  $\mu\text{M}$ ) administered for 7h at  $37^\circ\text{C}$  in a  $\text{CO}_2$  incubator. Then, we added DMEM supplemented with 20% FBS for 12h. Cell cultures were treated with an initiator stimulus, either metal mixture or 0.5  $\mu\text{M}$  MNNG (positive control) for 4h, and we followed the standard protocol. Sampling days were 1 and 7 for the initiation stage and 11 and 16 for the promotion stage (represented by \*). These both treatments were performed in standard protocol and OLA1 silencing protocol with their respective controls. *NAC + FeCl<sub>3</sub> treatment* was a co-treatment with NAC 10mM with the metal mixture or 0.5  $\mu\text{M}$  MNNG on Days 1, 7, 11 and 14 (double arrows) in addition to  $\text{FeCl}_3$  challenge on Day 10 and harvested on Day 11. Additional cultures were analysed at Day 25 to determine RCFE.

FBS, then incubated the cells for 24h at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ . The following solutions were prepared: (A) for each transfection, we diluted 5  $\mu\text{L}$  siRNA duplex into 100  $\mu\text{L}$  siRNA transfection medium; (B) for each transfection, we diluted 6  $\mu\text{L}$  siRNA transfection reagent into 100  $\mu\text{L}$  siRNA transfection medium. We mixed the solution A + B and incubated the mixture for 45 min at room temperature. After this time, we added 800  $\mu\text{L}$  siRNA transfection medium, mixed gently, overlaid the mixture onto the cells, and incubated for 7h at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ . We then added 1 ml of normal growth medium (20% SFB and 2% antibiotics) without removing the transfection mixture. After incubating the cells for an additional 18h, we aspirated the medium and replaced it with fresh normal medium (10% SFB and 1% antibiotics). Strong OLA1 silencing (50%) was obtained 12h post-transfection. The same procedure was performed for the control siRNA (scrambled).

### Western blot analysis

Cell lysates were prepared in RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and 50 mM TRIS) supplement with phenylmethanesulfonyl fluoride 200mM and protease inhibitor cocktail (Calbiochem, Cat. 539131). Total protein was quantified using a bicinchoninic acid kit (Thermo Fischer Scientific Inc. Cat. 23225). Proteins were separated by SDS-PAGE in Mini-PROTEAN TGX gels of 4–15% polyacrylamide (BioRad Cat. 456-1084) and transferred to a PVDF membrane (dry transfer). The membrane was blocked with 5% non-fat milk solution and sequentially incubated with primary antibody and secondary antibody. The bands were visualised using the chemiluminescence method according to the manufacturer's guidelines (Thermo. Cat. 32132). Antibodies were purchased from the following suppliers: OLA1 from Abcam (Cat. Ab51077, Cambridge, UK)  $\beta$ -tubulin from Invitrogen (Cat. 322600, Invitrogen CA, USA), and HRP-conjugated anti-rabbit and anti-mouse IgG from Zymed (Cat. 816120 and 626520, Zymed, Invitrogen).

### Transcription factor activity

The transcription factor activity was measured using an oxidative stress TF activation profiling plate array (Signosis, Santa Clara, CA. Cat. FA-1005). In this technology, a series of biotin-labelled probes are made based on consensus sequences of TF DNA-binding sites. When the probe mix incubates with nuclear extracts, individual probes find their corresponding TFs and form TF/probe complexes, which can be easily separated from free probes through simple spin-column purification. The bound probes are detached from the complex and analysed through hybridisation with a plate; each well is specifically pre-coated with complementary sequences of the probes. The captured DNA probe is further detected with streptavidin-HRP and read in a luminometer. The nuclear extracts were obtained with NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo. Cat. 78833).

### Statistical analysis

Statistical significance was determined by the unpaired Student's *t*-test. Values of  $P < 0.05$  were considered significant. Experiments were conducted at least three independent times in duplicate, obtaining consistent results.

## Results

### Metal mixture cell transformation on two-stage BALB/c 3T3 assay, ROS and OLA1 implications

The two-stage BALB/c 3T3 transformation assay is a tool to assay morphological cell transformation following parameters accepted by the IARC and NCI (15). In the present study, we found that the metal mixture had transforming capacity principally as an initiator stimulus, almost as strongly as the positive transforming control (MNNG as initiator, TPA as promoter) (Figure 2A). Transforming

capacity of the metal mixture as a promoter (MNNG–Metals) or both initiator and promoter stimuli (Metals–Metals) was not so evident (Figure 2A). In the present study, where the number of cells seeded was the same for all experimental conditions through 25 days of the assay without plate changes, cell medium changes during the promotion stage on Days 9, 16, 18 and 21 improves cell viability when metals were employed as a promoter (MNNG–Metals and Metals–Metals).

In the present study, we measured intracellular ROS levels during the transforming processes and found that the metal mixture induced a slight ROS increase during the initiation stage. ROS reached the maximum level at the beginning of the promotion stage on Day 11. ROS fell after that but were still higher than in the control condition (Figure 2B).

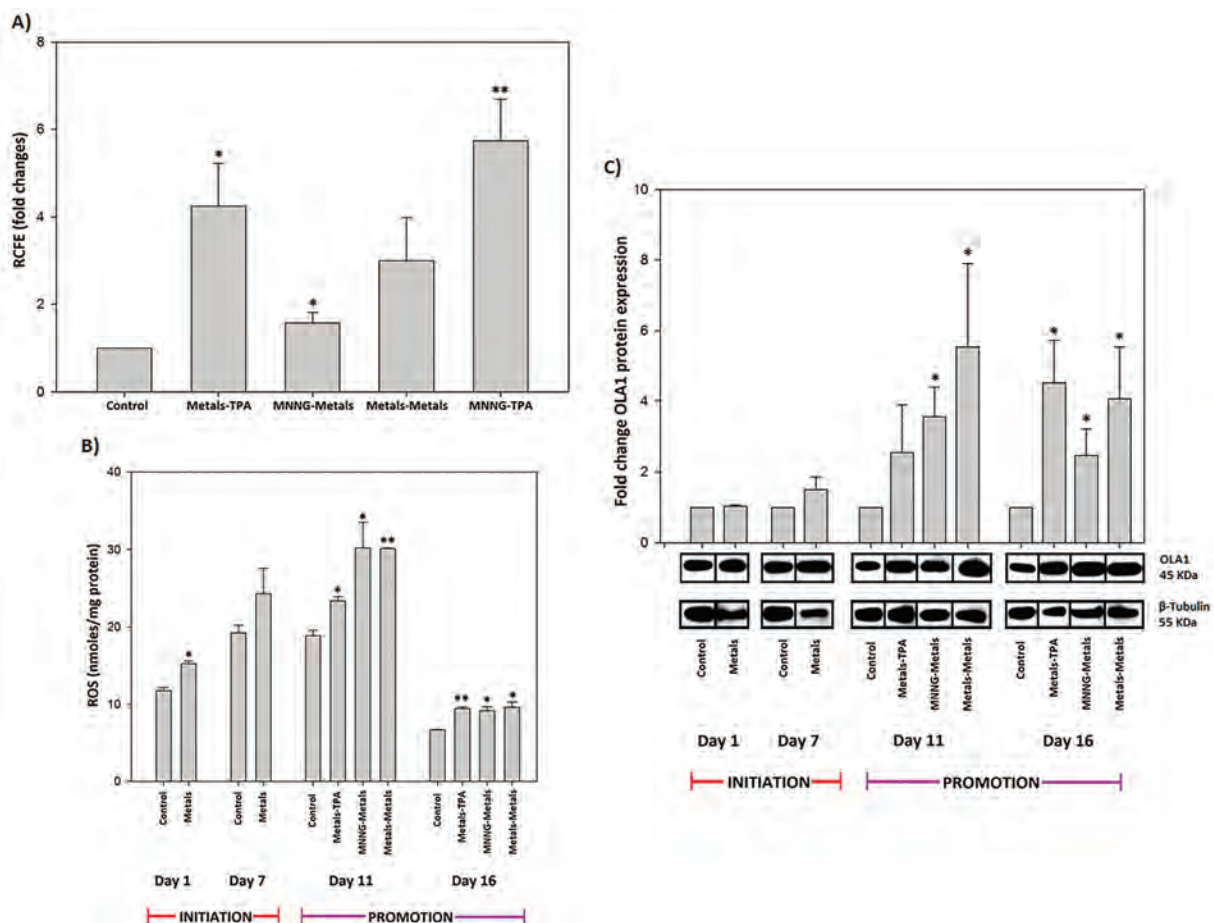
At this point, our interest was to explore the role of OLA1, a negative regulator of the cellular antioxidant response in the metal mixture two-stage BALB/c 3T3 transformation assay. We determined the protein expression of OLA1 to track its variations through the transformation assay. These data are presented in Figure 2C as relative values with respect to  $\beta$ -tubulin. We found that OLA1 expression was not modified by the metal mixture during the initiation stage; however, we identified differential expression patterns in the

promotion stage depending on the experimental conditions. The metal mixture as an initiator stimulus (Metals–TPA) showed a discrete increase at Day 11, which became significantly different on Day 16. In contrast, the metal mixture treatment as a promoter (MNNG–Metals, Metals–Metals) induced OLA1 expression statistically significantly on Day 11 of the promotion stage, with higher values in the Metals–Metals condition (Figure 2C).

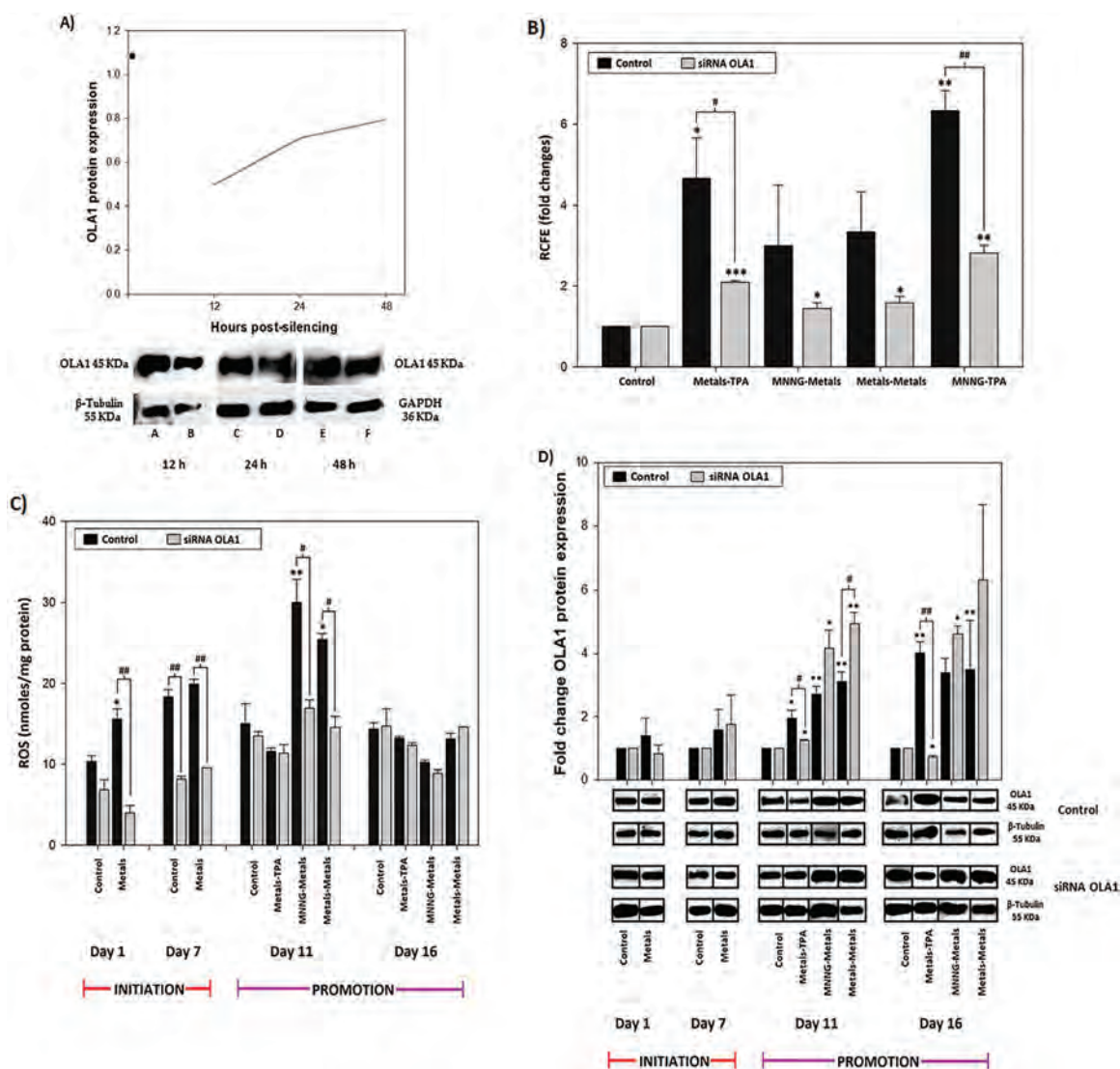
### OLA1 modulates the metal mixture's cell transformation capacity

We achieved OLA1 knockdown by specific siRNA before the two-stage BALB/c 3T3 cell transformation assay outlined in Figure 1 (details are in the Material and Methods).

We determined in a time course (Figure 3A) the siRNA construct that achieved the best OLA1 knockdown 12h post-transfection: siRNA-OLA1 silenced OLA1 protein expression to approximately 50% (Figure 3A). For this approach, we used a scrambled siRNA, called 'control', as a negative control and siRNA-OLA1 to knockdown OLA1 (Figure 3). The metal mixture's cell transformation capacity was modulated by siRNA-OLA1 (Figure 3B). OLA1 knockdown decreased the RCFE several-fold under all experimental conditions, including the positive control of transformation (MNNG–TPA). This finding suggests



**Figure 2.** Metal mixture-induced cell transformation in two-stage BALB/c 3T3 assay, ROS and OLA1 implications. (A) Transforming capacity was determined by the RCFE evaluated on Day 25 by quantitation of type III transformation foci per dish; values are presented as the fold change with respect to control values. (B) Intracellular levels of ROS. ROS values are presented as nmol/mg protein through the transformation assay for every experimental condition. (C) OLA1 protein expression. Quantitative analysis of OLA1 protein expression; values are presented as the experimental conditions fold change with respect to control. Representative western blot images by OLA1 and  $\beta$ -tubulin expression performed by samples of standard protocol for the indicated days. Data represent the mean of three independent experiments performed in duplicate. Student's *t*-test versus control condition \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.



**Figure 3.** OLA1 modulates metal mixture's-cell transformation capacity. (A) OLA1 silencing by siRNA-OLA1 in BALB/c 3T3 cells. The graph represented OLA1 protein expression at 12, 24 and 48h post-transfection with siRNA-OLA1 follow provider instructions. Western blot representative images for OLA1 silencing; A, C and E represent control condition; B, D and F represent OLA1 knockdown at 12, 24 and 48h post-transfection. OLA1 basal expression is represented by a point (·) in the "y" axis. (B) Metal mixture-induced cell transformation modulated by OLA1 knockdown. RCFE fold change decrease by siRNA-OLA1 versus control (scrambled). (C) Intracellular ROS levels. Data comparison between control (scrambled) and siRNA-OLA1 presented as nmol/mg protein throughout transformation assay. (D) OLA1 protein expression throughout the cell transformation assay of control (scrambled) and siRNA-OLA1. Quantitative analysis of OLA1 protein expression; values are presented as the fold change experimental conditions with respect control condition. Representative western blot images for OLA1 and  $\beta$ -tubulin for the indicated days. All plots represent the mean of three independent experiments performed by duplicate. Statistical differences versus control condition per day \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Statistical differences between control (scrambled) and siRNA-OLA1 is represented by #.

an alternative to the known mechanisms of metal mixture carcinogenicity as well as OLA1's role in the early steps of cell transformation, as has been suggested by other groups (18,19). To know if intracellular ROS levels were modulated by OLA1 knockdown in a different way than described in the standard process (Figure 2B), we compared the behaviour between control and siRNA-OLA1 (Figure 3C). We found that control had the same behaviour as the earlier control, indicating that there are no methodological implications of knockdown on data interpretation related to metal mixture cell transformation. In addition, we found that ROS levels were decreased during the initiation stage by OLA1 knockdown, but during the promotion stage we observed that Day 11 showed a ROS decrease only when the metal mixture was employed as a promoter stimulus (MNNG–Metals, Metals–Metals). The use of the metal mixture as an initiation stimulus generated more

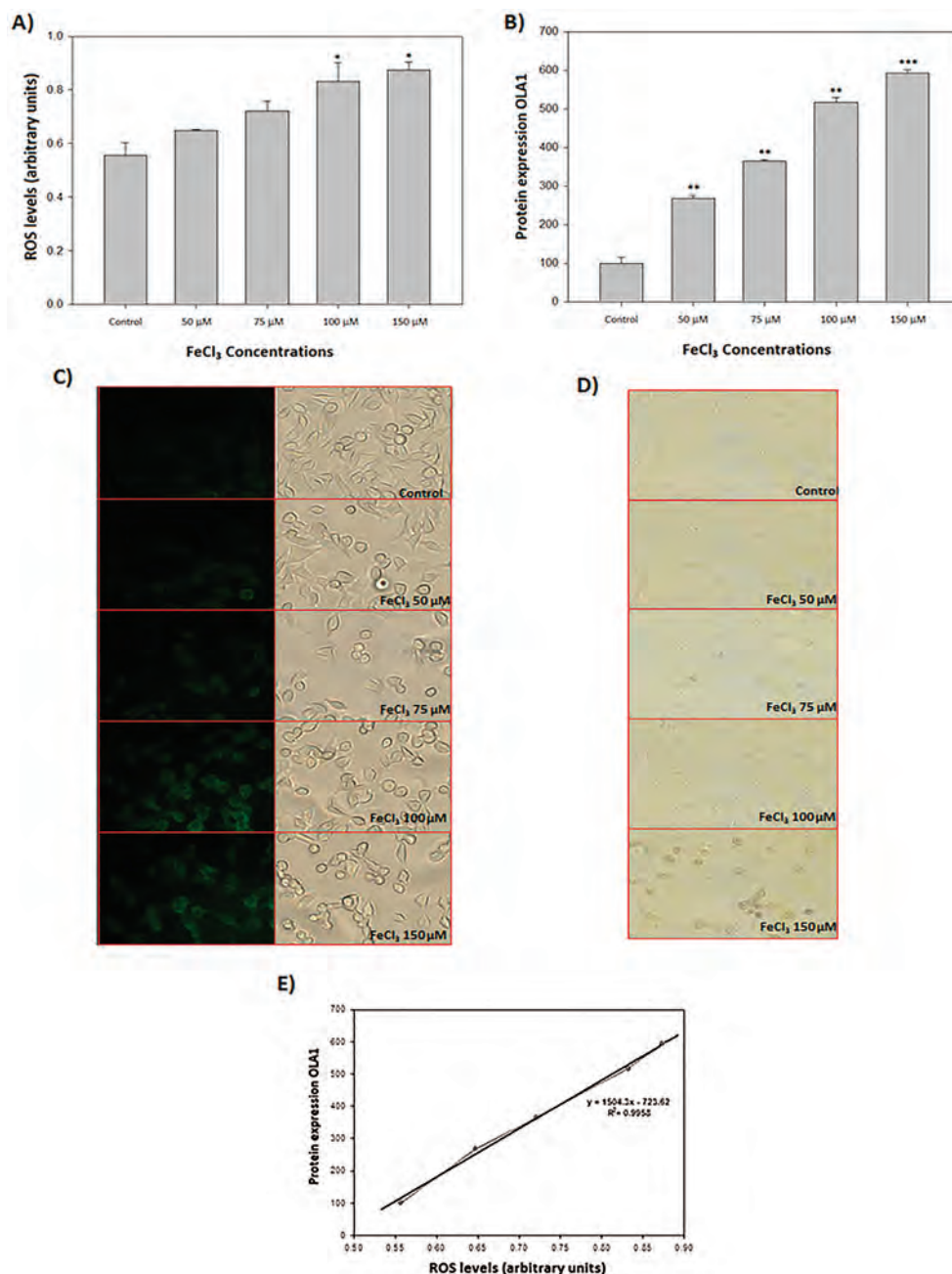
transformation foci, indicating that ROS modulation by siRNA-OLA1 is an important factor to rescue the transforming phenotype, especially to Day 11 of transformation assay. ROS levels determined at Day 16 of the promotion stage were not changed by OLA1 knockdown under any experimental condition, showing the same behaviour as the standard protocol (Figure 2B).

We found that siRNA-OLA1 knocked down OLA1 protein just for metal mixture as initiation stimulus (Figure 3D). Even under OLA1 knockdown, it is important consider that metal mixture-induced cell transformation was not abolished (Figure 3B). However, their rescue for cell transformation specifically in the condition of Metals–TPA was stronger than when the metal mixture was employed as a promoter stimulus, indicating that there are additional mechanisms involved. Additionally, the relationship between ROS and OLA1 in our cell model

was confirmed by a dose response with a ROS inductor ( $\text{FeCl}_3$ ; 0, 50, 75, 100 and 150  $\mu\text{M}$  for 24h), describing a linear correlation between intracellular ROS levels and OLA1 protein expression (Figure 4).

To determine whether the oxidative balance threshold is involved in metal mixture-induced cell transformation rescue in OLA1-knockdown cells under the Metals-TPA condition, in which ROS levels did not change on Day 11 and OLA1 protein was strongly down-regulated, we used an alternative protocol (Figure 1,  $\text{FeCl}_3$  treatment). ROS are regulated by OLA1, indicating that OLA1 may

function through post-transductional pathways to down-regulate antioxidant enzymes responsible for thiol redox balance (18,19). We submitted our cell model to an oxidative challenge ( $\text{FeCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  during 24h, previously tested in Figure 4) on Day 10 of the promotion stage to determine if extra ROS generation in that moment would re-establish the transforming phenotype observed in the standard protocol, dependent on OLA1 status. Alternatively, to regulate the thiol redox balance, we applied a metal mixture co-treatment with NAC (10mM) as indicated in Figure 1. Following



**Figure 4.** Relationship between intracellular ROS levels and OLA1 protein expression in BALB/c 3T3 cells. Subconfluent cell cultures seeded on plates over 18 mm  $\times$  18 mm sterile coverslips were treated 24h with different concentrations of  $\text{FeCl}_3$  (0–150  $\mu\text{M}$ ) and harvested. Cells in the coverslips were visualised by epifluorescence microscope after ROS stain (dihydrorhodamine 123 oxidation); in addition, OLA1 immunocytochemistry was visualised by light microscope both stains were analysed in a Zeiss microscope with Axio-Vision software. (A) Quantitation of intracellular ROS levels as arbitrary units of densitometry analysis after  $\text{FeCl}_3$  treatment. (B) Qualitative protein expression analysis of OLA1 immunocytochemistry. (C) Images shows the presence of ROS as fluorescence and light microscopy of the same field at different concentrations of  $\text{FeCl}_3$  (images magnification of  $\times 40$ ). (D) Images of OLA1 immunocytochemistry after 24h of  $\text{FeCl}_3$  treatment at different concentrations (images magnification of  $\times 40$ ). (E) Linear correlation of Pearson between intracellular ROS levels and OLA1 protein expression in BALB/c 3T3 cells ( $P < 0.000114$ ,  $r = 0.9979$ ).

this approach, we determine a viability improvement by oxidative challenge plus NAC co-treatment (Table 1). In addition we found that intracellular ROS levels and OLA1 protein expression

correlated with transformation capacity changes (Table 2). Globally, the effect of the oxidative challenge (FeCl<sub>3</sub>) indicated that ROS levels increased in all experimental conditions, as did OLA1 protein

**Table 1.** Cell viability of two-stage Balb/c 3T3 cell transformation assay comparatively to protocol challenge with FeCl<sub>3</sub> and with *N*-acetyl-cystein co-treatment

OLA1	Condition	Standard protocol <sup>a</sup>	FeCl <sub>3</sub> (100 μM/24 h) <sup>b</sup>	NAC + FeCl <sub>3</sub> <sup>c</sup>
Control	Control	88.2 <sup>c</sup> ± 1.35	89.1 ± 1.27	92.5 ± 0.71
	Metals-TPA	89.5 ± 4.78	88.8 ± 1.06	94.9 ± 3.89
	MNNG-Metals	60.0 <sup>c</sup> ± 2.57	60.0 ± 3.61	84.4 ± 0.92
	Metals-Metals	66.3 <sup>c</sup> ± 7.85	58.9 ± 0.99	88.0 ± 2.90
	MNNG-TPA	85.6 ± 5.28	83.8 ± 3.75	91.9 ± 4.10
siRNA-OLA1	Control	90.5 ± 2.18	89.1 ± 1.34	91.1 ± 1.48
	Metals-TPA	88.6 <sup>c</sup> ± 3.34	88.9 ± 1.91	96.9 ± 0.28
	MNNG-Metals	59.5 <sup>c</sup> ± 6.43	59.3 ± 1.27	84.3 ± 1.77
	Metals-Metals	61.7 <sup>c</sup> ± 4.66	59.5 ± 0.78	89.1 ± 1.27
	MNNG-TPA	86.7 ± 8.92	88.9 ± 3.11	94.7 ± 2.33

Data represent the mean ± SD of at least three experiments statistically differences between the experimental conditions of control and siRNA-OLA1. <sup>a, b</sup> or <sup>c</sup> statistical difference between treatments.

<sup>a</sup>Standard protocol, Balb/c 3T3 cells follow two-stage cell transformation assay as shows Figure 1.

<sup>b</sup>Balb/c 3T3 cells challenge with FeCl<sub>3</sub> 100 μM 24 h on Day 10 and harvested Day 11, in addition to cell transformation assay (Figure 1).

<sup>c</sup>Balb/c 3T3 cells were co-treated with 10 mM NAC to every stimulus and treated with FeCl<sub>3</sub> 100 μM 24 h on Day 10 and harvested Day 11.

**Table 2.** Comparative transforming capacity, intracellular ROS levels and OLA1 protein expression between standard protocol of two-stage Balb/c 3T3 cell transformation assay; challenged with FeCl<sub>3</sub> and *N*-acetylcyteine co-treatment

	Condition	Standard protocol <sup>a</sup>	FeCl <sub>3</sub> (100 μM/24 h) <sup>b</sup>	NAC + FeCl <sub>3</sub> <sup>c</sup>	
Transforming capacity (RCFE)	Control	Control	1.00	1.00	
		Metals-TPA	4.67*	6.50**	2.50 <sup>a,b</sup>
		MNNG-Metals	3.00	2.00	1.00
		Metals-Metals	3.33	3.50*	1.00
		MNNG-TPA	6.33**	7.50**	3.00 <sup>a,b</sup>
	siRNA-OLA1	Control	1.00	1.00	1.00
		Metals-TPA	2.10*	2.50*	0.50 <sup>a</sup>
		MNNG-Metals	1.44	1.00***	0.75
		Metals-Metals	1.58	1.25*	1.00
		MNNG-TPA	2.82**	2.25**	1.25 <sup>a</sup>
ROS intracellular levels	Control	Control	15.03 ± 3.53	17.67 ± 2.12	21.57 ± 0.85
		Metals-TPA	11.61 <sup>b,c</sup> ± 0.55	23.68 ± 0.58	23.20 ± 1.57
		MNNG-Metals	30.04 <sup>c</sup> ± 4.02	28.08 ± 2.37	18.25 <sup>a,b</sup> ± 0.96
		Metals-Metals	25.44 <sup>b</sup> ± 1.05	40.21 ± 1.08	21.36 <sup>a,b</sup> ± 0.42
		MNNG-TPA	6.33**	7.50**	3.00 <sup>a,b</sup>
	siRNA-OLA1	Control	13.51 ± 0.73	15.65 ± 0.32	14.32** ± 0.32
		Metals-TPA	11.39 <sup>b,c</sup> ± 1.54	20.04 ± 1.56	15.20*** ± 0.0
		MNNG-Metals	16.45 <sup>a,b</sup> ± 1.44	21.40* ± 0.60	9.78*** <sup>a,b</sup> ± 1.01
		Metals-Metals	14.57 <sup>a,b</sup> ± 1.96	21.67** ± 1.38	10.79*** <sup>a,b</sup> ± 0.33
		MNNG-TPA	6.33**	7.50**	3.00 <sup>a,b</sup>
OLA1 protein expression	Control	Control	1.21 <sup>b,c</sup> ± 0.16	3.37 ± 0.32	2.64 <sup>b</sup> ± 0.07
		Metals-TPA	2.34 <sup>b,c</sup> ± 0.11	3.63 ± 0.10	3.28 <sup>b</sup> ± 0.12
		MNNG-Metals	3.29 <sup>b,c</sup> ± 0.86	7.39 ± 0.29	7.49 ± 0.38
		Metals-Metals	3.70 <sup>b,c</sup> ± 0.01	7.86 ± 0.17	6.49 <sup>b</sup> ± 0.29
		MNNG-TPA	6.33**	7.50**	3.00 <sup>a,b</sup>
	siRNA-OLA1	Control	0.33** <sup>b,c</sup> ± 0.02	2.72 ± 0.01	2.42 ± 0.36
		Metals-TPA	0.41** <sup>b,c</sup> ± 0.01	2.18** ± 0.08	2.32** ± 0.15
		MNNG-Metals	1.38** <sup>b,c</sup> ± 0.16	6.69* ± 0.17	7.36 <sup>b</sup> ± 0.14
		Metals-Metals	1.65** <sup>b,c</sup> ± 0.28	7.71 ± 0.29	7.29 ± 0.27
		MNNG-TPA	6.33**	7.50**	3.00 <sup>a,b</sup>

RCFE was determined in the positive control MNNG/TPA. ROS values are presented as nmol/mg protein. Quantitative analysis of OLA1 protein expression; values are presented as the fold change experimental conditions with respect control condition. Data represent the mean ± SD of at least three experimental determinations. Statistical differences with respect to same experimental between control and siRNA-OLA1  $P < 0.05^*$ ,  $P < 0.001^{**}$ ,  $P < 0.001^{***}$ . Statistical differences between protocols  $P < 0.05^a$ ,  $b$  or  $c$ .

<sup>a</sup>Standard protocol.

<sup>b</sup>Challenge with FeCl<sub>3</sub> 100 μM 24 h applied on Day 10 of promotion stage.

<sup>c</sup>NAC co-treatment applied with metal mixture and FeCl<sub>3</sub> challenge on Day 10 (Figure 1).

expression. However, transformation capacity increased only when control-OLA1 was used and stayed constant under siRNA-OLA1 treatment, indicating protection by knockdown of OLA1 in spite of the  $\text{FeCl}_3$  challenge. This approach defines a particular behaviour of the Metals-TPA condition.  $\text{FeCl}_3$  induced an increase in ROS in both control and siRNA-OLA1 conditions also compared with the standard protocol. In contrast, OLA1 protein expression was increased by  $\text{FeCl}_3$  challenge compared with standard protocol, but it stayed constant in siRNA-OLA1 condition (2.72 control vs. 2.18 Metals-TPA) indicating that knockdown was the factor that rescued transformation capacity (Table 2).

To ensure that OLA1 functioned through post-transductional pathways to down-regulate antioxidant enzymes responsible for thiol redox balance (18,19), we analysed whether oxidative challenge and NAC co-treatment re-established the transformation rescue by OLA1 knockdown. The results are presented comparing ROS levels, OLA1 expression and transforming capacity (Table 2). Intracellular ROS were decreased by NAC +  $\text{FeCl}_3$  co-treatment, showing lower values under siRNA-OLA1 experimental conditions, indicating an additive redox protection by OLA1 knockdown and NAC. OLA1 protein expression was not influenced by each control condition but did vary with equivalent experimental conditions of the standard protocol, being more evident under Metals-TPA. OLA1 protein expression indicated that OLA1 knockdown was the most important variable implicated in the metal mixture's transforming capacity, especially the Metals-TPA condition. However, it is important to mention that the Metals-TPA condition more strongly protected against transformation by the NAC +  $\text{FeCl}_3$  approach in addition to OLA1 knockdown (Table 2).

Our next interest was to determine the activity of oxidative stress-associated transcription factors involved in OLA1's modulation of cell transformation induced by the metal mixture. We determined the activity of 16 transcription factors during the interphase of initiation and promotion stages of the transformation protocol induced by Metals-TPA compared with the control condition of the siRNA-OLA1 (Figure 5). Interestingly, when we determined the activity of the same transcription factors between control and siRNA-OLA1 cells on Days 7 and 11 of the Metals-TPA treatment (Figure 5), we found that in general the activity of transcription factors was slightly

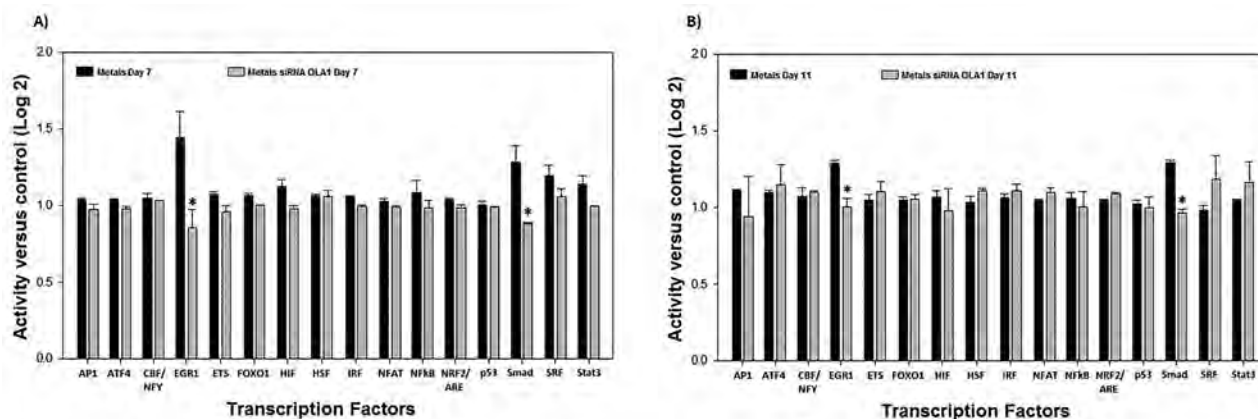
increased by Metals-TPA, even under OLA1 knockdown, with the exception of EGR1 and Smad.

## Discussion

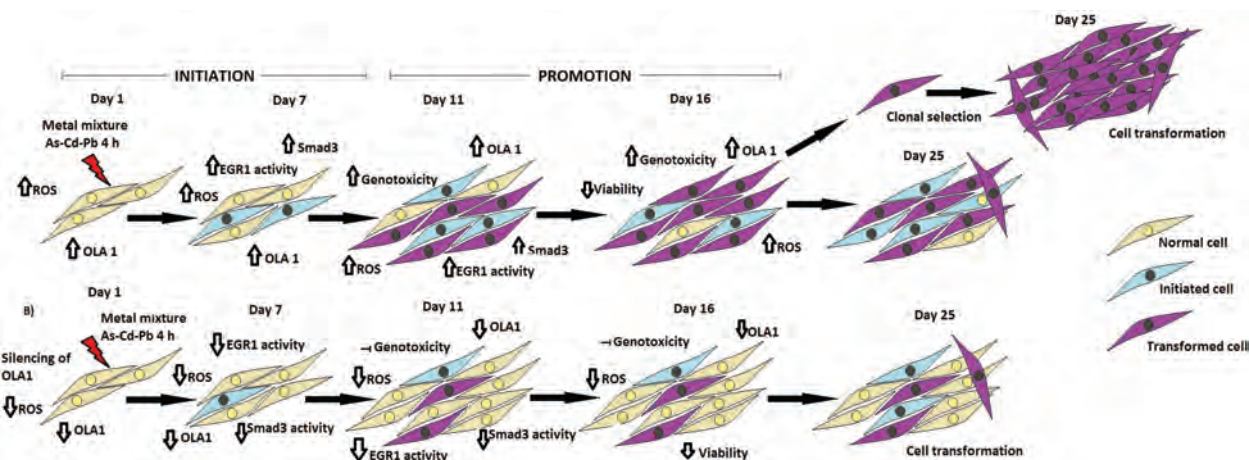
The two-stage BALB/c 3T3 transformation assay is a tool to assay morphological cell transformation following parameters accepted by the IARC and NCI (15). Previously, our group has determined the transformation capacity of the metal mixture in this assay as a hallmark of carcinogenic activity (10–12). In the present study, we found that the metal mixture had transforming capacity principally as an initiator stimulus. Transforming capacity of the metal mixture as a promoter (MNNG-Metals) or both initiator and promoter stimuli (Metals-Metals) was not so evident, similar to our previous studies (10–12). In the present study, where the number of cells seeded was the same for all experimental conditions through 25 days of the assay without plate changes, cell medium changes during the promotion stage on Days 9, 16, 18 and 21 improves cell viability when metals were employed as a promoter (MNNG-Metals and Metals-Metals).

The effects of chemical mixtures on cellular processes are important to understand without assumptions about their components (8). The metal mixture transforms cells by a mechanism that depends on intracellular ROS levels and cell viability (10). These biological responses are close to the molecular and cellular functions predicted by miRNA expression profiling under metal mixture exposure, such as cell development, cell growth and proliferation, cell death, cell cycle and cellular movement (11). In the present study, we found that the metal mixture induced a slight ROS increase during the initiation stage. ROS reached the maximum level at the beginning of the promotion stage on Day 11. ROS fell after that but were still higher than in the control condition.

Our findings accord with the carcinogenicity explanation of Fiaschi and Chiarugi (21) based on mounting evidence that oxidative stress underlies several hallmarks of cancer defined (22). Fiaschi and Chiarugi established that oxidative stress-related molecules are over- or underexpressed in cancers and often promote the necessary steps of cancer initiation and progression. In this sense, it will be important to find new regulators of oxidative stress-related molecules.



**Figure 5.** Transcription factors activity associated to metal mixture's initiator capacity modulated by OLA1. Comparative transcription factor activity induced by Metals-TPA between scrambled transfected cells, denominated 'metals' and siRNA-OLA1 transfected cells denominated 'metals siRNA-OLA1' in two-stage BALB/c 3T3 assay. (A) Oxidative stress associated transcription factors activity on initiation stage (Day 7). (B) Oxidative stress associated transcription factors activity on promotion stage (Day 11). The values represent logarithm base 2 of luminescence emitted by 16 different transcription factor activities experimental condition/control condition. The plots represented the mean of two independent experiments by duplicate. \* $P < 0.05$ , ANOVA between Metals control and Metals siRNA-OLA1.



**Figure 6.** Representation of metal mixture's initiator capacity modulated by OLA1. (A) Standard protocol of the two-stage BALB/c 3T3 cell transformation assay. The scenario documented indicates a discrete increment of intracellular ROS without OLA1 protein expression changes during the initiation stage. In the promotion stage, intracellular ROS, OLA1 protein expression and genotoxicity maintain low increases at Day 11, but at Day 16 the values clearly increase and cell viability decreased, which promoted clonal selection of the transformed cells, phenotypically recognized as type III foci on Day 25. (B) OLA1 knockdown modulated the Metal-TPA-induced cell transformation. siRNA-OLA1 during the initiation stage decreased intracellular ROS levels and maintain OLA1 protein expression. In the promotion stage, ROS levels and OLA1 protein expression still similar to control values throughout the cell transformation assay. OLA1 knockdown decreased formation of foci at Day 25.

Our interest was to explore the role of OLA1, a negative regulator of the cellular antioxidant response in the metal mixture two-stage BALB/c 3T3 transformation assay. OLA1 expression was not modified by the metal mixture during the initiation stage; however, we identified differential expression patterns in the promotion stage depending on the experimental conditions as our previous study at respect to senescence (12).

The increased OLA1 protein expression during the transformation process agrees with Sun *et al.* (17), who found that the DNA damage-regulated overexpressed in cancer 45 (alias OLA1) gene encodes a novel ATPase that is linked to cellular stress response and tumorigenesis, and may also serve as a valuable tumour marker. We found that higher OLA1 protein expression was induced by Metals-TPA at Day 16 of the promotion stage, the same experimental condition that induced a higher number of transformation foci.

Finding showed in Figure 2, make sense with approaches where knockdown of OLA1 significantly inhibited cell migration and invasion in breast cancer cell line MDA-MB-231, affecting ROS production without cell growth changes (18). siRNA-OLA1 silenced OLA1 protein expression to approximately 50% modulating metal mixture's cell transformation capacity. This finding suggests an alternative to the known mechanisms of metal mixture carcinogenicity as well as OLA1's role in the early steps of cell transformation, as has been suggested by other groups (18,19).

We found that siRNA-OLA1 knocked down OLA1 protein just for metal mixture as initiation stimulus. Even under OLA1 knockdown, it is important consider that metal mixture-induced cell transformation was not abolished. However, their rescue for cell transformation specifically in the condition of Metals-TPA was stronger than when the metal mixture was employed as a promoter stimulus, indicating that there are additional mechanisms involved. This phenomenon was reported in our previous study (12), though due to low viability it was impossible determine the mechanism. OLA1 may function through post-transductional pathways to down-regulate antioxidant enzymes responsible for thiol redox balance (18), indicating the relevance of antioxidants in metal carcinogenicity (5,10,12,23) as well as their relationship with several signalling pathways. Independently

of the experimental condition, is clear that lack of OLA1 results in diminished ROS (18,19). Additionally, the relationship between ROS and OLA1 in our cell model was confirmed by a dose response with a ROS inducer ( $\text{FeCl}_3$ ; 0, 50, 75, 100 and 150  $\mu\text{M}$  for 24 h), describing a linear correlation.

The transforming phenotype generated by the metal mixture had differential behaviour between the initiation and promotion stages of the transformation process (especially Metals-TPA). siRNA-OLA1 decreased ROS levels, genotoxicity and OLA1 protein expression. OLA1 expression correlated directly with the RCFE value ( $r = 0.816$ ,  $P < 0.05$ ), indicating that OLA1 functions in the transformation model as predicted by Sun *et al.* (17) who proposed that DOC45 could be a cancer biomarker.

To ensure that OLA1 functioned through post-transductional pathways to down-regulate antioxidant enzymes responsible for thiol redox balance (18,19), we analysed whether oxidative challenge and NAC co-treatment re-established the transformation rescue by OLA1 knockdown. Intracellular ROS were decreased by NAC +  $\text{FeCl}_3$  co-treatment, showing lower values under siRNA-OLA1 experimental conditions, indicating an additive redox protection by OLA1 knockdown and NAC. OLA1 protein expression was not influenced by each control condition but did vary with equivalent experimental conditions of the standard protocol, being more evident under Metals-TPA. OLA1 protein expression indicated that OLA1 knockdown was the most important variable implicated in the metal mixture's transforming capacity, especially the Metals-TPA condition. However, it is important to mention that the Metals-TPA condition more strongly protected against transformation by the NAC +  $\text{FeCl}_3$  approach in addition to OLA1 knockdown. NAC protection, similarly to OLA1 knockdown, inhibits motility and invasion of breast cancer cells (18). It is probably true that in the metal mixture cell transformation induction, OLA1 knockdown modulates the transforming phenotype by regulating ROS levels, regulating cell-matrix adhesion (24), and inhibiting motility and invasion (18) during the promotion stage, all of which are implicated as hallmarks of cancer. However, the rescue of the metal mixture-induced cell transformation by OLA1 knockdown could impact the

acquisition of two essential hallmarks of cancer: tumour microenvironment and metabolic reprogramming (22) by ROS modulation, as predicted by Fiaschi and Chiarugi (21).

This scenario shows the convergence of mechanisms triggered by the metal mixture and cellular processes involved in the cell transformation modulation by OLA1 knockdown (10,11,18). ROS modulation at Day 11 of the promotion stage is the key factor that induces cell transformation through the acquisition of a certain phenotype, facilitated by cell motility and invasion, which are regulated by OLA1. Our next interest was to determine the activity of oxidative stress-associated transcription factors involved in OLA1's modulation of cell transformation induced by the metal mixture. We determined the activity of 16 transcription factors during the interphase of initiation and promotion stages of the transformation protocol induced by Metals-TPA compared with the control condition of the siRNA-OLA1. Interestingly, we found that in general the activity of transcription factors was slightly increased by Metals-TPA, even under OLA1 knockdown, with the exception of EGR1 and Smad. EGR1 is a novel TGF- $\beta$ /Smad target that up-regulates the expression of collagen genes and plays a critical role in mediating TGF- $\beta$  stimulation (25–27). The biological responses modulated by EGR1 and Smad include cell growth, senescence, differentiation, survival, angiogenesis and connective tissue metabolism (25–27). These findings suggest that rescue of transformation capacity of Metals-TPA involve the inhibition of both transcription factors EGR1 and Smad.

## Conclusions

The metal mixture (2  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub>, 2  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> and 5  $\mu$ M Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O) had a cell transformation capacity in the two-stage BALB/c 3T3 model that is strongly dependent on ROS modulation in the initiation and promotion stages, a modulation that correlates with OLA1 protein expression (Figure 6).

OLA1 protein expression increases in the promotion stage, indicating that it could be considered a transformation biomarker, as previously determined by Sun *et al.* (17) in different types of cancer.

Even though metals of the mixture (As, Cd and Pb) are redox-inactive (28), the findings of the present study indicate that as a mixture, they modulate ROS intracellular levels, directly or indirectly facilitating the acquisition of hallmarks of cancer (21). In addition, a negative regulator of antioxidant capacity, OLA1, is involved in the cell transformation induction capacity of the metal mixture as an initiator stimulus. OLA1 knockdown, though intracellular ROS modulation, specifically in the promotion stage, can reverse the transformation process (Figure 6). This effect is potentiated by NAC co-treatment. This phenomenon triggered by OLA1 knockdown involves the modulation of cell adhesion molecules such as collagen, as well as cell motility and migration, to modulate the establishment of a transforming phenotype through the EGR1 and Smad transcription factors.

## Funding

This work was supported by CONACyT [153781]. E.M.B. was a recipient of CONACyT scholarship 378224.

## Acknowledgements

This publication is part of the Doctoral thesis of EMB in the Biochemical Sciences PhD program of the National Autonomous University of Mexico.

Conflict of interest statement: None declared.

## References

1. ATSDR (2007) *Priority List of Hazardous Substances*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, USA.
2. ATSDR (2004) *Interaction Profile for: Arsenic, Cadmium, Chromium, and Lead*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, USA.
3. Gibson, S., Widmann, C. and Johnson, G. L. (1999) Differential involvement of mek kinase 1 (mekk1) in the induction of apoptosis in response to microtubule-targeted drugs versus DNA damaging agents. *J. Biol. Chem.*, 274, 10916–10922.
4. Schaeffer, H. J. and Weber, M. J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biol.*, 19, 2435–2444.
5. Wang, G. and Fowler, B. A. (2008) Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 233, 2–99.
6. Palus, J., Lewińska, D., Dziubaltowska, E. *et al.* (2006) Genotoxic effects in C57Bl/6J mice chronically exposed to arsenate in drinking water and modulation of the effects by low-selenium diet. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, 69, 1843–1860.
7. Kossowska, B., Dudka, I., Bugla-Płoskońska, G., Szymańska-Chabowska, A., Doroszkiewicz, W., Gancarz, R., Andrzejak, R. and Antonowicz-Juchniewicz, J. (2010) Proteomic analysis of serum of workers occupationally exposed to arsenic, cadmium, and lead for biomarker research: a preliminary study. *Sci. Total Environ.*, 408, 5317–5324.
8. Kossowska, B., Dudka, I., Gancarz, R. and Antonowicz-Juchniewicz, J. (2013) Application of classic epidemiological studies and proteomics in research of occupational and environmental exposure to lead, cadmium and arsenic. *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, 216, 1–7.
9. Poręba, R., Gać, P., Poręba, M., Antonowicz-Juchniewicz, J. and Andrzejak, R. (2011) Relation between occupational exposure to lead, cadmium, arsenic and concentration of cystatin C. *Toxicology.*, 283, 88–95.
10. Silva, A. M., Rojas, E. and Valverde, M. (2011) Role of oxidative stress in transformation induced by metal mixture. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2011, 935160.
11. Martínez, P. M., Hidalgo, M. A., Romero, C. S., Valverde, M. and Rojas, E. (2014) mRNA and miRNA expression patterns associated to pathways linked to metal mixture health effects. *Gene.*, 533, 508–514.
12. Rodríguez, S. M. A., Rojas, E. and Valverde, M. (2014) Assessing the impact of As-Cd-Pb metal mixture on cell transformation by two-stage Balb/c 3T3 cell assay. *Mutagenesis.*, 29, 251–257.
13. LeBoeuf, R. A., Kerckaert, G. A., Aardema, M. J., Gibson, D. P., Brauning, R. and Isfort, R. J. (1996) The pH 6.7 Syrian hamster embryo cell transformation assay for assessing the carcinogenic potential of chemicals. *Mutat. Res.*, 356, 85–127.
14. Kajiwara, Y. and Ajimi, S. (2013). Verification of the Balb/c 3T3 cell transformation assay after improvement by using an ITES-medium. *Toxicol. In Vitro.*, 17, 489–496.
15. IARC/NCI/EPA Working Group (1985) 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, 2395–2399.
16. Fang, M. Z., Kim, D. Y., Lee, H. W. and Cho, M. H. (2001) Improvement of in vitro two-stage transformation assay and determination of the promotional effect of cadmium. *Toxicol. In Vitro.*, 15, 225–231.
17. Sun, H., Lou, X., Montalbano, J., Jin, W. and Shi, J. (2010) DOC45, a novel DNA damage-regulated nucleocytoplasmic ATPase that is overexpressed in multiple human malignancies. *Mol. Cancer Res.*, 8, 57–66.
18. Zhang, J., Rubio, V., Zheng, S. and Shi, Z. Z. (2009a) Knockdown of OLA1, a regulator of oxidative stress response, inhibits motility and invasion of breast cancer cells. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 10, 796–804.
19. Zhang, J., Rubio, V., Lieberman, M. W. and Shi, Z. Z. (2009b) OLA1, an Obg-like ATPase, suppresses antioxidant response via nontranscriptional mechanisms. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, 106, 15356–15261.



20. Tsuchiya, T., Tanaka, T., Jinno, H., Tokunaga, H., Sakimoto, K., Ando, M. and Umeda, M. (2005) 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, 344–351.
21. Fiaschi, T. and Chiarugi, P. (2012) Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *Int. J. Cell Biol.*, 762825, 8.
22. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.*, 144, 646–674.
23. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 160, 1–40.
24. Jeyabal, P. V. S., Rubio, V., Chen, H., Zhang, J. and Shi, Z. Z. (2014) Regulation of cell-matrix adhesion by OLA1, the Olg-like ATPase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 444, 568–574.
25. Chen, S. J., Ning, H., Ishida, W., Sodin-Semri, S., Takagaw, S., Mori, Y. and Varga, J. (2006) The early immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor- $\beta$  and mediates stimulation of collagen gene expression. *J. Biol. Chem.*, 281, 21183–21197.
26. Wakefield, L. M. and Roberts, A. B. (2002) TGF- $\beta$  signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12, 22–29.
27. Massague, J., Seoane, J. and Wotton, D. (2005) Smad transcription factors. *Genes Dev.*, 19, 2783–2810.
28. Jomova, K. and Valko, M. (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.*, 283, 65–87.