



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Papel de la barrera antioxidante en un modelo de  
hepatocarcinoma**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
ARACELI PONCE ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Emilio Rojas del Castillo

Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez  
Dra. Soledad Funes Argüello

Instituto de Fisiología Celular  
Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México. Diciembre, 2017



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.



Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Emilio Rojas del Castillo, en el laboratorio C-238 del Departamento de Toxicogenómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

---

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría 585357.

A la Dra. María Alexandra Rodríguez Sastre, por su apoyo técnico durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Pablo Hernández Franco por su apoyo en la generación y obtención de las células estables.

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A la vida por seguir aquí.

A mis padres por apoyarme cuando decidí volver a estudiar.

A mi familia, a mi tío Víctor y mi abuela por todo su apoyo durante todo este tiempo.

A Lili, Lupita, Dani y Guadalupe, quienes fueron las primeras personas a quienes les dije que iba a hacer el examen para la maestría; por ayudarme, a la vez de darme ánimos y hacer que tuviera más confianza en mí. Muchas gracias chicas.

A Elia por hacerme sentir no tan fuera de lugar cuando llegue al laboratorio y los consejos que me diste.

A mis compañeros de laboratorio, Alex, Pablo y Ricardo por este último año, por los ánimos y consejos que me dieron

A Lety, Ara y Jorge, con quienes compartí varias clases, pláticas en el pasillo y muchas alitas.

A Ana y Arturo, mis amigos químicos de alemán. Juntos compartimos nuestro gusto por la química, el ser un tanto “solitarios” y el estrés en los exámenes.

A mi tutor el Dr. Emilio Rojas y a la Dra. Mahara Valverde, por su apoyo y confianza, así como por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos pese a que hacía muchos años no hacía trabajo de investigación.

A mi comité tutorial, Dra. Victoria Chagoya de Sánchez y Dra. Soledad Funes Argüello por todos sus comentarios, sugerencias y paciencia, así como por su tiempo invertido en cada sesión

---

---

## DEDICATORIAS

A esa parte de mí que aún sigue viva y no se rindió.

A ti AC, quien sigues siendo una de las razones por las que quiero seguir superándome académicamente. Gracias.

---



...

*Muchas veces nos hemos preguntado si vale la pena levantarnos de nuevo, y solo puedo contestar una cosa: hagamos que nuestra vida valga la pena.*

*Vale la pena sufrir, porque he aprendido a amar con todo el corazón.*

*Vale la pena estar en la oscuridad y caer hasta lo más profundo, porque ya no puedo ir más abajo, de ahí en adelante todo va a ser hacia arriba hasta que vea la luz.*

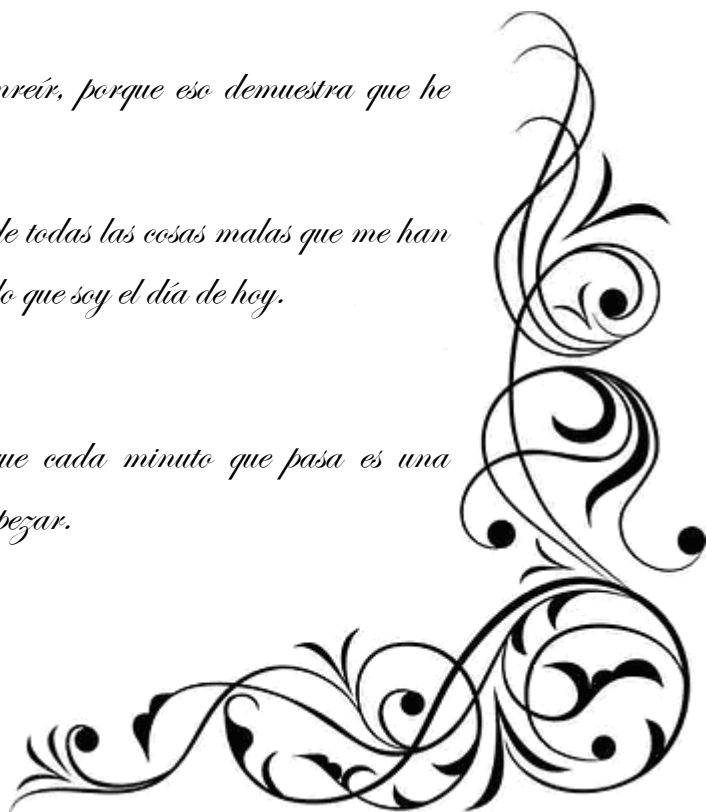
...

*Vale la pena volver a sonreír, porque eso demuestra que he aprendido algo más.*

*Vale la pena acordarme de todas las cosas malas que me han pasado, porque ellas forjan lo que soy el día de hoy.*

...

*Vale la pena vivir, porque cada minuto que pasa es una oportunidad de volver a empezar.*







---

## ÍNDICE

|                                                 |     |
|-------------------------------------------------|-----|
| ABREVIATURAS .....                              | III |
| RESUMEN .....                                   | V   |
| ABSTRACT.....                                   | VI  |
| INTRODUCCIÓN.....                               | 1   |
| Especies reactivas.....                         | 1   |
| Barrera antioxidante .....                      | 2   |
| • Superóxido dismutasa .....                    | 3   |
| • Catalasa .....                                | 4   |
| • Glutación.....                                | 4   |
| Transformación celular .....                    | 7   |
| • Migración celular.....                        | 7   |
| • Transición epitelio mesénquima.....           | 8   |
| E-cadherina .....                               | 9   |
| Actina de músculo liso alfa 2 .....             | 10  |
| • Gama-glutamyltranspeptidasa.....              | 10  |
| Mecanismos moleculares As, Cd y Pb.....         | 11  |
| ANTECEDENTES .....                              | 13  |
| HIPÓTESIS.....                                  | 17  |
| OBJETIVOS .....                                 | 17  |
| Objetivo General.....                           | 17  |
| Objetivos Particulares.....                     | 17  |
| MATERIAL Y MÉTODOS.....                         | 18  |
| Células y Cultivo celular .....                 | 18  |
| Bloqueo de la expresión de Gclc y CAT .....     | 18  |
| Exposición a la mezcla de As, Cd y Pb.....      | 19  |
| Viabilidad celular.....                         | 20  |
| Detección de especies reactivas de oxígeno..... | 21  |
| Determinación de la actividad de catalasa ..... | 21  |
| Cuantificación de glutación reducido.....       | 22  |

---

|                                          |    |
|------------------------------------------|----|
| Ensayo de herida.....                    | 22 |
| Obtención del RNA total .....            | 22 |
| RT-PCR.....                              | 23 |
| RESULTADOS.....                          | 24 |
| Inhibición transcripcional .....         | 24 |
| Barrera antioxidante abatida.....        | 26 |
| Inhibición de enzimas antioxidantes..... | 32 |
| ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS ..... | 39 |
| CONCLUSIONES.....                        | 45 |
| PERSPECTIVAS .....                       | 45 |
| REFERENCIAS .....                        | 46 |

---

## ABREVIATURAS

|         |                                                                |
|---------|----------------------------------------------------------------|
| Acta2   | Actina de músculo liso alfa 2                                  |
| ALA     | Ácido D-aminolevulínico                                        |
| ALAD    | Ácido D-aminolevulínico deshidratasa                           |
| ATP     | Adenosín trifosfato                                            |
| ATSDR   | Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades  |
| C9      | Clona 9                                                        |
| CAT     | Catalasa                                                       |
| cDNA    | DNA complementario                                             |
| di      | Días de incubación                                             |
| DNA     | Ácido desoxirribonucleico                                      |
| dNTP's  | Desoxinucleótidos trifosfatados                                |
| ENTs    | Enfermedades no transmisibles                                  |
| ERN     | Especies reactivas de nitrógeno                                |
| EROs    | Especies reactivas de oxígeno                                  |
| GCL     | Glutamato cisteín ligasa (proteína)                            |
| gcl     | Glutamato cisteín ligasa (gen)                                 |
| GCLc    | subunidad catalítica de la glutamato cisteín ligasa (proteína) |
| gclc    | subunidad catalítica de la glutamato cisteín ligasa (gen)      |
| GGT     | $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa (proteína)                    |
| ggt     | $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa (gen)                         |
| GS      | Glutación sintetasa                                            |
| GSH     | Glutación reducido                                             |
| HPRT    | Hipoxantina fosforribosil transferasa                          |
| HSPs    | Proteínas de choque térmico                                    |
| Kb      | Kilobases                                                      |
| Kg      | Kilogramos                                                     |
| MEC     | Matriz extracelular                                            |
| $\mu$ g | Microgramos                                                    |
| $\mu$ l | Microlitros                                                    |

---

|               |                                                             |
|---------------|-------------------------------------------------------------|
| $\mu\text{M}$ | Micromolar                                                  |
| mg            | miligramo                                                   |
| ml            | mililitro                                                   |
| mM            | milimolar                                                   |
| MT            | Metalotioneína                                              |
| MVI           | Índice de la viabilidad de Moxi                             |
| N             | Normal                                                      |
| ng            | nanógramos                                                  |
| nm            | nanómetros                                                  |
| OPT           | o-ftalaldehído                                              |
| pb            | Pares de bases                                              |
| PbBPs         | Proteínas de unión a Pb                                     |
| PBS           | amortiguador de fosfatos salino pH 7.4                      |
| PCR           | Reacción en cadena de la polimerasa                         |
| RNA           | Ácido ribonucleico                                          |
| RNAm          | Ácido ribonucleico mensajero                                |
| RT-PCR        | Reverso transcriptasa y reacción en cadena de la polimerasa |
| SFB           | Suero fetal bovino                                          |
| shRNA         | RNA de horquilla pequeña                                    |
| SOD           | Superóxido dismutasa                                        |
| TBARS         | Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico                |
| TEM           | Transición epitelio mesénquima                              |
| TME           | Transición mesenquimal epitelial                            |
| TPG           | Tiempo promedio de generación                               |
| ZPP           | Protoporfirina de zinc                                      |

---

---

## RESUMEN

En la homeostasis celular, la barrera antioxidante realiza un papel esencial evitando el establecimiento de estrés oxidativo. Diversos procesos celulares que conducen a estados patológicos inician por la desregulación de la barrera antioxidante, como es el caso de la transformación celular. Este proceso celular ha mostrado ser inducido por metales, que frecuentemente están en el ambiente, mediante la inducción de estrés oxidante. Por tanto el presente trabajo se enfocó en evaluar la participación de la barrera antioxidante en el proceso de transformación celular, inducida por la mezcla de As-Cd-Pb.

Para ello se abatió la respuesta antioxidante mediante la inhibición transcripcional de catalasa y glutamato cisteín ligasa en el modelo murino hepático no transformado Clona 9. La caracterización biológica de dicho modelo, se enfocó en evaluar la viabilidad celular, el tiempo de proliferación, la concentración de especies reactivas de oxígeno, la actividad de catalasa y la concentración de glutatión, así como la expresión de E-cadherina, actina de músculo liso alfa 2 y la capacidad de cierre de herida en células control y expuestas al a mezcla de As-Cd-Pb.

Nuestros resultados muestran que la línea Clona 9 es viable bajo el abatimiento transcripcional de catalasa y glutamato cisteín ligasa. *Per se*, el abatimiento no es suficiente estímulo para establecer la transformación celular; sin embargo, aunado a la mezcla de metales, se inducen la migración celular y la expresión de actina de músculo liso alfa 2, mientras que los niveles de E-cadherina disminuyen, en conjunto estos cambios son indicadores de transformación celular.

---

## ABSTRACT

In cellular homeostasis, the antioxidant barrier plays an essential role avoiding the establishment of oxidative stress. Several cellular processes that lead to pathological states start by deregulation of the antioxidant barrier, as is the case of cell transformation. This cellular process has been shown to be induced by metals, which are frequently in the environment, through the induction of oxidative stress. Therefore, the present study focused on evaluating the participation of the antioxidant barrier in the process of cell transformation induced by the mixture of As-Cd-Pb.

Antioxidant response was reduced by the transcriptional inhibition of catalase and glutamate cysteine ligase in liver untransformed murine model Clone 9. The biological characterization of this model, focused on evaluating the cell viability, the proliferation time, the reactive oxygen species concentration, catalase activity and glutathione concentration, as well as E-cadherin and alpha smooth muscle actin expression and the capacity of wound closure in control and exposed to the mixture of As-Cd-Pb cells.

Our results show that Clone 9 line is viable under the transcriptional abatement of catalase and glutamate cysteine ligase. *Per se*, the reduction is not enough stimulus to establish cellular transformation; however, combined with the mixture of metals, cell migration and alpha smooth muscle actin expression are induced, while the levels of E-cadherin decrease, together these changes are indicators of cellular transformation.

---

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad es bien sabido que los seres vivos nos encontramos expuestos de forma general a una amplia variedad de agentes físicos, químicos y biológicos que pueden afectar la salud y con ello disminuir nuestra calidad de vida. Esto es importante si consideramos que cada vez la esperanza de vida va en aumento; sin embargo, también la incidencia de enfermedades no transmisibles (ENTs) como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Las ENTs son causa principal de muerte y discapacidad representando el 63% del total de muertes en el mundo. Asimismo, se ha calculado que éstas representan el 90% de las muertes prematuras asociadas a los efectos de la contaminación ambiental. En el año 2013, se calculó que en México aproximadamente 50,000 muertes fueron relacionadas con la contaminación ambiental<sup>1</sup>.

Se han propuesto una gran cantidad de mecanismos por los cuales los diferentes contaminantes pueden generar sus efectos nocivos. A nivel molecular estos mecanismos van desde la inducción de mutaciones hasta la regulación epigenética; sin embargo, la mayoría de los contaminantes comparten la generación de especies reactivas como principal mecanismo de acción.

### Especies reactivas

En los últimos años ha habido un gran interés en el estudio de las especies reactivas, tanto de las especies reactivas de oxígeno (ERO) como de las especies reactivas de nitrógeno (ERN), dado que son producidas por los organismos vivos como resultado del metabolismo normal de la célula, así como de factores ambientales<sup>2</sup>.

Estas moléculas juegan un papel dual dentro de los organismos tanto benéfico como perjudicial. De concentraciones bajas a moderadas tienen funciones dentro de la célula en procesos fisiológicos; sin embargo, en altas concentraciones producen modificaciones adversas en componentes celulares como son lípidos, proteínas y DNA<sup>3</sup>. Dichas modificaciones pueden estar relacionadas con algunos procesos biológicos, mencionados anteriormente.

Las ERO se derivan principalmente del oxígeno molecular (O<sub>2</sub>), el cual tiene una configuración electrónica única, que puede hacerlo así mismo un radical. Pero la mayoría de sus derivados surgen de procesos metabólicos y pueden interaccionar con otras moléculas<sup>2</sup>.



---

Por su parte, las especies reactivas de nitrógeno tienen como origen el óxido nítrico vasodilatador muy abundante, el cual es generado por la óxido nítrico sintasa (NOS); que presenta la capacidad de combinarse con aniones superóxido, desencadenando reacciones de nitrosilación y la síntesis del anión peroxinitrito. Aun cuando ambas especies reactivas son de importancia biológica, los radicales derivados del oxígeno son los que representan a la clase más importante de especies reactivas generadas por los sistemas vivos<sup>2</sup>.

Las ERO se pueden dividir en dos grupos: radicales libres y no radicales. Los primeros son aquellas moléculas que contienen uno o más electrones desapareados que le dan reactividad a la molécula, como en el caso del radical peroxil (ROO<sup>•</sup>). Mientras que las formas no radicales, principalmente se forman cuando dos radicales libres comparten sus electrones desapareados, por ejemplo el peróxido de hidrógeno<sup>3</sup>. En general, estas moléculas son extremadamente reactivas y tienen una vida media corta<sup>4</sup>. Uno de sus principales efectos es el daño que generan a macromoléculas como son lípidos, DNA y proteínas, además de provocar cambios en la expresión de varios genes, la sobreexpresión de factores de transcripción sensibles al estado redox y la remodelación de la cromatina por alteraciones en la acetilación/desacetilación de histonas<sup>3</sup>.

### Barrera antioxidante

Los organismos al estar expuestos a una gran variedad de radicales libres desarrollaron una serie de mecanismos de defensa contra éstos. En particular, los mamíferos tienen un sistema de defensa bioquímico formado por antioxidantes (barrera antioxidante), el cual sirve para contrarrestar el efecto adverso de los oxidantes. De manera general un antioxidante puede ser clasificado como un compuesto capaz de prevenir el proceso pro-oxidativo o el daño biológico oxidativo<sup>4</sup>. Este sistema de defensa incluye tanto captadores de radicales libres de bajo peso molecular, así como sistemas complejos de enzimas<sup>5</sup>.

Los antioxidantes se pueden clasificar en dos grupos: enzimáticos y no enzimáticos (Tabla 1). Los antioxidantes enzimáticos están conformados por proteínas que minimizan el daño oxidativo, las cuales pueden actuar directamente sobre los radicales libres, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y miembros de la familia peroxidasa incluyendo a la glutatión peroxidasa, las peroxiredoxinas, etc.

---

**Tabla No. 1. Clasificación de los antioxidantes.**

| <b>Antioxidantes</b>  |                             |
|-----------------------|-----------------------------|
| <b>Enzimáticos</b>    | Superóxido dismutasa (SOD)  |
|                       | Catalasa (CAT)              |
|                       | Glutación peroxidasa (GPx)  |
|                       | Tiorredoxina (TRX)          |
|                       | Peroxirredoxina (PRX)       |
|                       | Glutación transferasa (GST) |
| <b>No enzimáticos</b> | Vitamina A                  |
|                       | Vitamina C                  |
|                       | Vitamina E                  |
|                       | Glutación (GSH)             |

El grupo de los antioxidantes no enzimáticos contiene numerosos compuestos capaces de prevenir el daño oxidativo por su interacción directa o indirecta con las ERO. La forma indirecta involucra la quelación de los metales de transición previniendo así su participación en reacciones de Fenton y Haber-Weiss. De forma directa, las moléculas comparten características químicas que les permiten donar electrones a los radicales previniendo de este modo que interaccionen con moléculas importantes<sup>4</sup>. Dentro de este grupo se encuentran moléculas que pueden ser liposolubles o hidrosolubles, por ejemplo, vitaminas como la C y la E,  $\beta$ -caroteno, ácido úrico y glutación (GSH).

- **Superóxido dismutasa**

La SOD pertenece a una familia de metaloenzimas encargadas de catalizar la dismutación de dos moléculas de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (Figura 1), que difieren respecto al ion metálico, el cual interacciona con las moléculas de superóxido, la cadena proteica, el número de subunidades y el lugar donde se encuentran. Estas enzimas están presentes en prácticamente todos los organismos aerobios y son altamente reconocidas por sus funciones reguladoras en el crecimiento, metabolismo y respuesta al estrés oxidativo.

En el caso de los mamíferos hay tres tipos diferentes de enzimas, las cuales son: SOD1 (Cu/ZnSOD), SOD2 (MnSOD) y SOD3 (ecSOD o extracelular). SOD1 es la principal forma intracelular de SOD, SOD2 se encuentra exclusivamente en la matriz mitocondrial mientras que SOD3 es la forma secretada y es asociada con la matriz extracelular de diferentes tejidos<sup>6,7</sup>.

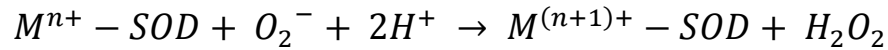
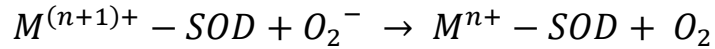


Figura 1. Reacción de dismutación catalizada por la SOD. Donde M puede ser: Cu (n=1), Mn (n=2), Fe (n=2) o Ni (n=2).

- **Catalasa**

La catalasa es una enzima formada por un homotetrámero, donde cada monómero contiene un grupo *hemo b* responsable de su actividad catalítica. Es codificada por un solo gen, el cual está altamente conservado a lo largo del árbol filogenético; los mamíferos expresan catalasa en todos los tejidos, y se pueden encontrar altas concentraciones en hígado, riñones y eritrocitos<sup>8</sup>. Dentro de la célula se encuentra principalmente en los peroxisomas.

Es una enzima que participa en la desintoxicación del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dentro de la célula ya que cataliza el rompimiento del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua y oxígeno molecular (Figura 2). Tiene un papel esencial en la defensa celular contra el estrés oxidativo ya que tiene la capacidad de remover altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, disminuyendo los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la cercanía<sup>8</sup>.

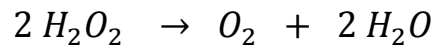


Figura 2. Reacción catalizada por la catalasa.

Además de su reacción de catalasa, esta enzima puede realizar una actividad de peroxidasa, la cual consiste en el rompimiento del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar otras moléculas pequeñas como el metanol o el etanol<sup>9</sup>.

- **Glutación**

El GSH es un tripéptido también conocido como  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinyl-glicina (Figura 3), que se sintetiza en la célula. El GSH es el tiol de bajo peso molecular más abundante en las células. El grupo sulfidriilo (-SH) presente en la cisteína participa en las reacciones de reducción

---

y conjugación, consideradas las más importantes entre las funciones del GSH. Tiene un papel importante en la protección de la célula contra el daño oxidativo, de la toxicidad de xenobióticos electrófilos y/o sus metabolitos y en el mantenimiento redox homeostático. También está involucrado en la regulación del ciclo celular y apoptosis, así como en el almacenamiento de cisteína<sup>10,11</sup>. Es cofactor de varias enzimas detoxificantes, como la GSH peroxidasa y transferasa y participa en la conversión de las vitaminas C y E a sus formas activas<sup>3</sup>.

La síntesis de GSH se lleva a cabo por dos reacciones secuenciales, primero es la combinación de cisteína con glutamato mediada por la glutamato cisteín ligasa (**GCL**, también llamada  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa), formada por una subunidad catalítica (GCLc) y una subunidad modificadora (GCLm). En esta primera reacción, para formar el enlace amida entre el glutamato y la cisteína se requiere la hidrólisis de una molécula de ATP; seguido por la adición de la glicina al dipéptido, previamente formado, por acción de la glutatión sintetasa (**GS**) con la hidrólisis de otra molécula ATP (Figura 4)<sup>10</sup>. Adicionalmente a la reacción de síntesis, la GSH reductasa (GR) se encarga de recuperar el GSH a partir del GSSG (glutatión oxidado).

El enlace entre el glutamato y la cisteína del GSH se da a través del grupo carboxilo  $\gamma$  en vez del grupo carboxilo  $\alpha$ . Este enlace en particular sólo puede ser hidrolizado por una enzima,  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa (GGT), la cual se encuentra presente únicamente en la superficie externa de cierto tipo de células<sup>12</sup>.

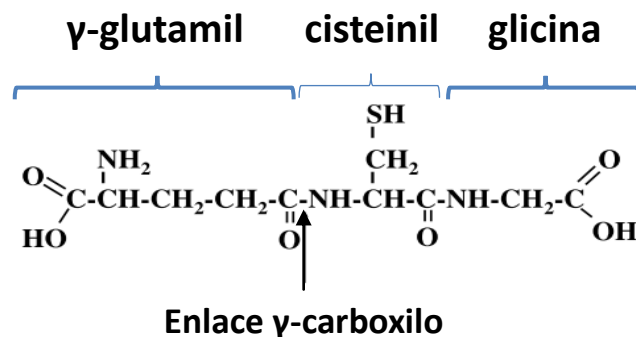


Figura 3. Estructura del glutatión.

Se sabe que el contenido intracelular de GSH varía ante diferentes condiciones como: la presencia de metales pesados, concentraciones altas de glucosa y choque térmico. Por lo que la exposición crónica a agentes que desregulan el estado redox de la célula se traduce en un mayor requerimiento de síntesis de GSH<sup>13</sup>.

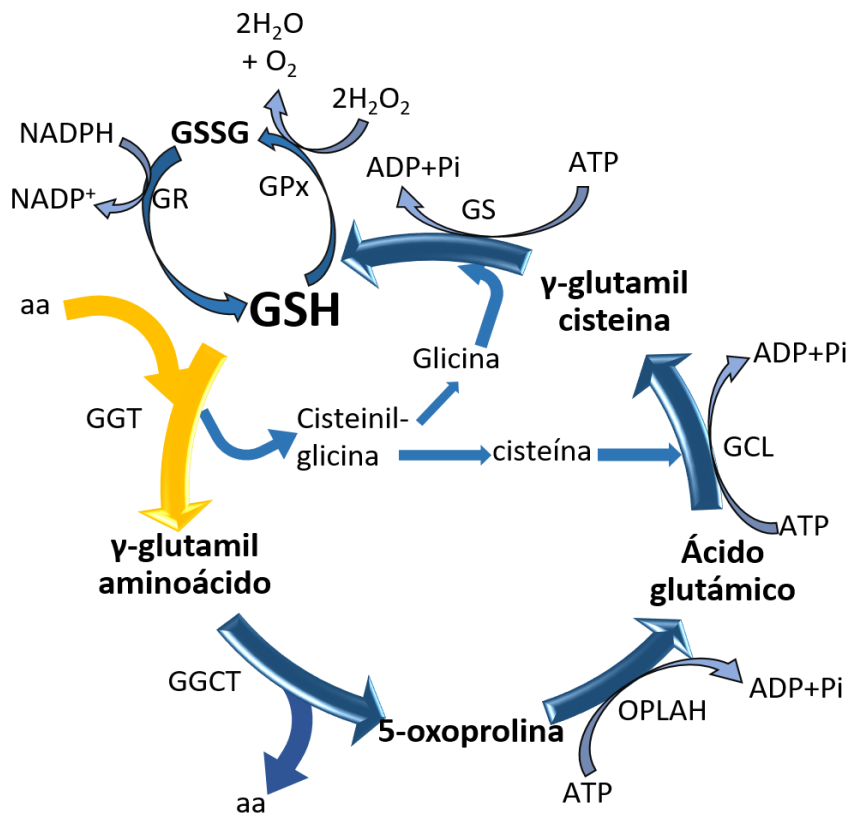


Figura 4. Ciclo del glutatión. En color amarillo se muestran las reacciones que se llevan a cabo hacia el exterior de la célula y en color azul las reacciones que se llevan a cabo en el interior de la célula. Donde GCL es glutamato cisteín ligasa, GS es Glutatión sintetasa, GGT es  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa, GGCT es  $\gamma$ -glutamilciclotransferasa, OPLAH es oxoprolinasa, OPLAH es oxoprolinasa, GPx es glutatión peroxidasa, GR es glutatión reductasa y GSSG es glutatión oxidado.

Por lo anterior la barrera antioxidante juega un papel importante en el balance entre oxidantes y su eliminación por los antioxidantes. Pero si este balance se rompe, da lugar a la generación de “**estrés oxidativo**”<sup>3,14</sup>. Se ha observado que el estrés oxidante puede generar mutaciones o cambios epigenéticos en el DNA que conllevan a una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos, los cuales alteran la homeostasis normal del cuerpo. Esto puede conducir al desarrollo de una variedad de patologías, dentro de las cuales puede estar involucrada la transformación celular<sup>5</sup>.

---

## Transformación celular

La transformación celular es definida como la adquisición de ciertas características que modifican la morfología, tasa de proliferación, así como la susceptibilidad a señales externas, expresión de ciertas proteínas y activación de vías que normalmente no se expresan. Esto provoca que las funciones de la célula cambien<sup>15</sup>, y por tanto la célula deja de ser normal e inicia un proceso que conlleva a la formación de células tumorales. En otras palabras, la célula sufre cambios moleculares, morfológicos y modificaciones en su tasa de proliferación. Durante este proceso la célula afectada presenta varios cambios que le confieren ciertas ventajas, y por tanto han sido asociados como indicativos de que una célula se está transformando. Algunos de los marcadores que se han utilizado para determinar si hay o no transformación celular son: cambios en la capacidad de migración, la transición epitelio mesénquima y cambios en la expresión de algunas proteínas como la gama-glutamiltanspeptidasa, solo por mencionar algunos ejemplos.

- Migración celular

La migración celular es un fenómeno biológico complejo que se refiere al desplazamiento de la célula en el espacio. Está involucrado en procesos fisiológicos fundamentales como la morfogénesis, la formación y regeneración de tejidos, así como la respuesta inmune. También juega un papel primordial en la patología y progresión del cáncer<sup>16</sup>.

La migración celular es gobernada fundamentalmente por dos procesos dinámicos fundamentales, los cuales involucran la remodelación de actina del citoesqueleto que conduce a modificaciones en la estructura, forma y polaridad de la célula, así como cambios en las condiciones de adhesión de las células con los tejidos circundantes<sup>17</sup>.

De forma general se puede clasificar en dos grandes categorías: individual y colectiva. La migración individual se puede subdividir en mesenquimal y ameboide. La primera se caracteriza por ser de baja velocidad, de alta adherencia, presentar extensiones de largas proyecciones y reorganización y/o degradación de la matriz extracelular (MEC). La migración ameboide, se caracteriza porque las células son más rápidas con menos adherencia, presentan pequeñas proyecciones y son mucho más contráctiles<sup>16</sup>. La migración colectiva por otro lado, se refiere al movimiento de varias células que se desplazan ya sea como una hoja, fila o agregado de células.

---

Específicamente en el cáncer, el modo de migración depende del origen del tumor. En el caso de aquellos con origen epitelial, estos migran principalmente de forma mesenquimal. La hipótesis más predominante respecto al inicio de la migración involucra la transición epitelio mesénquima, durante la cual se activan genes que le permiten a la célula migrar de forma mesenquimal<sup>17</sup>.

- Transición epitelio mesénquima

Parte fundamental para que una célula se convierta en una célula transformada es la transición epitelio mesénquima (TEM). La TEM es un proceso que se da de manera normal durante la embriogénesis y la cicatrización de heridas (reparación de tejidos), la cual puede ser reversible dando lugar a la transición mesenquimal epitelial o TME. Cuando la TEM es alterada en tiempo y función puede contribuir en patologías como fibrosis y cáncer<sup>18</sup>. Durante este proceso las células epiteliales son reprogramadas transcripcionalmente<sup>19</sup>; es decir, hay una transdiferenciación de las células epiteliales en células mesenquimales móviles.

La TEM es un proceso multi-etapa que comprende el remodelamiento gradual de la arquitectura celular y de las capacidades funcionales del epitelio<sup>20</sup>. En el desarrollo o en una patología, la TEM sigue un programa común y conservado<sup>21</sup>. Los eventos principales en la TEM son la disolución de las uniones célula-célula, la pérdida de la polaridad apico-basal y la adquisición de polaridad frontal-distal; la reorganización de la arquitectura del citoesqueleto y cambios en la forma de la célula. También se encuentran una regulación a la baja en la firma de la expresión génica y activación de genes que ayudan a definir el fenotipo mesenquimal, el incremento en las protrusiones celulares y la movilidad y en muchos casos, la capacidad para degradar la MEC. Cabe mencionar que las células que han sufrido TEM adquieren resistencia a la senescencia y a la apoptosis<sup>21</sup>.

Los cambios en la expresión génica que contribuyen a la represión del fenotipo epitelial y activación del fenotipo mesenquimal involucran reguladores maestros y factores de transcripción como SNAIL, TWIST y ZEB. Los factores de transcripción de TEM coordinan la represión de genes epiteliales y la inducción de genes mesenquimales<sup>21</sup>. Durante la TEM la expresión de proteínas epiteliales es fuertemente reprimida, o su función es seriamente comprometida. Uno de los principales blancos de los factores de transcripción inductores de TEM es la E-cadherina, destacando su papel en la supresión de la migración celular<sup>7</sup> por lo que su regulación a la baja es considerada un marcador de TEM.

---

## E-cadherina

Uno de los principales grupos de proteínas involucrados en la morfogénesis tisular y en la coordinación del movimiento celular es el formado por las cadherinas. Estas son glicoproteínas transmembranales que median la adhesión célula-célula dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>19</sup>. Las cadherinas presentan tres principales regiones estructurales: una región extracelular larga conformada por cinco dominios, un segmento único que atraviesa la membrana y un dominio citoplasmático corto (Figura 5)<sup>22</sup>.

La conformación normal de las cadherinas sólo es estable en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microambiente. El  $\text{Ca}^{2+}$  se une con la porción extracelular de la cadena polipeptídica, lo cual es un prerequisite para la unión/adhesión célula-célula mediada por éstas<sup>22</sup>.

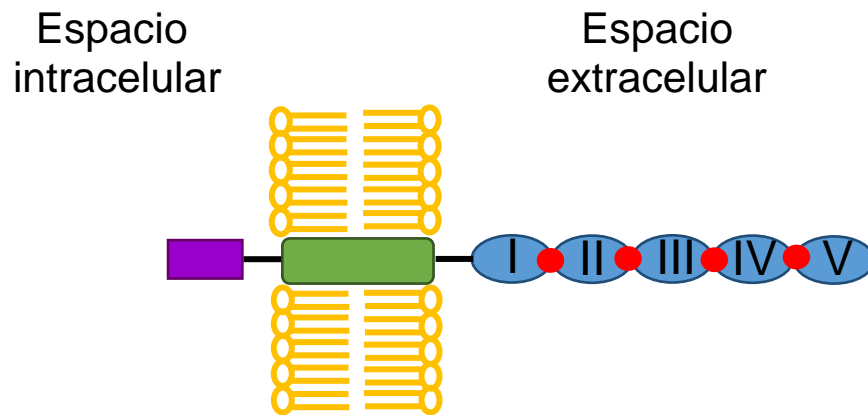


Figura 5. Estructura general de las cadherinas. En color azul se observan los cinco dominios extracelulares, en verde el segmento transmembranal, en morado la región intracelular corta y en rojo los sitios donde se une el  $\text{Ca}^{2+}$ .

La familia de las cadherinas está principalmente compuesta por tres grupos 1) cadherinas clásicas, principales componentes de las uniones adhesivas; 2) cadherinas no clásicas, que incluyen cadherinas desmosomales; y 3) protocadherinas, que están implicadas en la plasticidad neuronal. El ejemplo clásico de la familia de las cadherinas es la cadherina epitelial, E-cadherina ( $\text{Cdh1}$ )<sup>19</sup>, que se encuentra dentro de la subfamilia de las cadherinas clásicas tipo 1 no neurales<sup>22</sup>.

La E-cadherina se expresa en la mayoría de las células epiteliales, participando en el establecimiento de la polaridad celular y en mantener la estructura del tejido normal<sup>23</sup>. Es la



---

principal integrante de las uniones adherentes en el epitelio y participa en procesos como la diferenciación y señalización celular<sup>24</sup>.

Se ha sugerido que la pérdida de E-cadherina tiene un papel causal en la TEM y su ausencia puede favorecer la proliferación celular, migración e invasión por la activación de vías de EGFR (por sus siglas en inglés, Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico)<sup>24</sup>. Procesos altamente asociados al establecimiento del cáncer.

#### Actina de músculo liso alfa 2

La actina de músculo liso alfa 2 (Acta2), como su nombre lo indica, es una proteína que pertenece a la familia de las actinas, las cuales, de manera general juegan un papel importante en varios procesos celulares que incluyen movilidad, estructura, integridad y división celular<sup>25</sup>. Acta2 está relacionada con la TEM ya que se encuentra implicada en la progresión tumoral y en la metástasis. Debido a esto se le ha considerado como un marcador de invasión celular<sup>26</sup>.

Se ha encontrado que la sobreexpresión de Acta2 está asociada con el aumento en la movilidad al compararla con la expresión normal en fibroblastos<sup>25</sup>. Por otra parte, en muestras procedentes de tumores su expresión está aumentada<sup>27</sup>. Por ejemplo, en muestras de cáncer de mama se observó que niveles altos de Acta2 provocaban la movilidad de las células cancerosas, acelerando la invasión y la metástasis<sup>26</sup>.

Aunados a estos marcadores generales de transformación, podemos encontrar otros marcadores para el caso de transformación celular hepática.

- Gama-glutamyltranspeptidasa

La gama-glutamyltranspeptidasa (GGT) es una enzima clave en el metabolismo del glutatión<sup>28</sup>, está presente en la membrana plasmática de prácticamente todas las células<sup>29</sup> y su sitio activo se encuentra orientado hacia el exterior de la célula. Cataliza el primer paso en la vía de salvamento del GSH extracelular; es decir, la hidrólisis del enlace gamma glutamil entre el glutamato y la cisteína (Figura No. 3). En este proceso, la GGT libera cisteinilglicina, con la subsecuente escisión de la cisteína y la glicina por la actividad de dipeptidasas de la membrana plasmática<sup>29</sup>. La GGT es considerada como un miembro de los sistemas antioxidantes celulares

---

ya que favorece la reconstitución del GSH intracelular, dado que la cisteína resultante del metabolismo mediado por GGT es esencial para la síntesis de *ново* del GSH intracelular<sup>29</sup>.

Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han mostrado que las células que sobre expresan GGT pueden utilizar el GSH extracelular como fuente de cisteína más eficientemente, resultando en una ventaja de crecimiento selectivo tanto a concentraciones fisiológicas como limitantes de cisteína<sup>28</sup>. Diferentes estudios han mostrado que GGT se encuentra incrementada en diferentes tipos celulares en respuesta a la exposición de agentes oxidantes. Esto sugiere que su expresión está modulada en respuesta a EROs/electrofilicos; lo que podría explicar el aumento en su expresión descrita en varios tumores. Por ejemplo, en cáncer de ovario, colon, hígado, glioma astrocítico, sarcoma de tejido blando, melanoma y también leucemias<sup>28</sup>.

Se ha propuesto que GGT juega un papel importante en la utilización de GSH por parte de los tumores. Se ha observado que un enriquecimiento de las células en GGT resulta en un aumento en la resistencia contra daños tóxicos y prooxidantes, por lo que diferentes trabajos han sugerido que GGT tiene un papel en los mecanismos de resistencia a fármacos dependientes de GSH<sup>19</sup>, lo cual podría conferirle ventajas de crecimiento y supervivencia a las células tumorales<sup>20</sup>. Aún cuando GGT se ha visto sobre expresada en varios tumores, sólo se ha validado su incremento de expresión como un marcador temprano de transformación, para aquellas células de las cuales eventualmente se desarrollarán hepatomas, tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>30</sup>.

Como se mencionó anteriormente, la transformación celular es el resultado de cambios fisiológicos, los cuales no ocurren de manera espontánea, sino que son causados por diversos factores, ya sean endógenos o exógenos. En lo que respecta a estos últimos podemos encontrar a los metales o iones metálicos, los cuales juegan un papel preponderante en la transformación celular, dadas las características de éstos.

### Mecanismos moleculares As, Cd y Pb

La forma en que interaccionan los metales con las biomoléculas es bastante compleja. Iones metálicos como el hierro (Fe), cobre (Co), cadmio (Cd), mercurio (Hg), níquel (Ni), plomo (Pb) y arsénico (As) pueden inducir la generación de especies reactivas y causar daño a la

---

célula a través de la depleción de la actividad de enzimas, vía lipoperoxidación y reaccionando con proteínas nucleares y el DNA<sup>3</sup>.

El As, Cd y Pb son algunos de los principales agentes tóxicos detectados en el ambiente y se encuentran dentro de las primeras diez sustancias peligrosas según la Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades (ATSDR, por sus siglas en inglés). Sobre los efectos toxicológicos, genotóxicos y carcinogénicos de cada uno de estos metales hay una gran cantidad de reportes y mecanismos de acción propuestos<sup>31-35</sup>.

De manera normal los seres humanos estamos expuestos a metales como consecuencia de varias actividades tanto antropogénicas como naturales. Estas exposiciones se dan principalmente con mezclas complejas de metales.

La exposición a la mezcla de As, Cd y Pb puede producir interacciones aditivas, sinérgicas o nuevos efectos que no son observables con la exposición individual a estos elementos. Esto debido a que comparten varios mecanismos de acción incluyendo la **generación de estrés oxidativo**, interacción con grupos –SH, interferir con la reparación del DNA, reemplazar metales esenciales, unión directa a proteínas<sup>35</sup>, alterando así múltiples aspectos de las funciones celulares, como son: proliferación, apoptosis, diferenciación y transformación celular entre otros<sup>37,38</sup>.

La exposición a la mezcla de As-Cd-Pb a bajas dosis de forma crónica es de interés para la salud pública<sup>39</sup>. Trabajos recientes de diferentes grupos de investigación indican que la exposición a la mezcla de metales altera diversos biomarcadores asociados al estrés oxidativo (Tablas 2 y 3), el cual juega un papel importante en la generación de efectos adversos a la salud<sup>36-40</sup>.

Por su parte la ATSDR publicó un perfil de interacciones para As, Cd, Cr y Pb, donde menciona que el efecto de la mezcla trinaría (As, Cd y Pb) es igual al efecto de las mezclas binarias (Tabla 4)<sup>41</sup>.

**Tabla No. 2. Estudios de interacciones entre As, Cd y Pb en sistemas experimentales.**

| Referencia                            | Tipo de experimento | Elementos               | Biomarcador                      |
|---------------------------------------|---------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Mahaffey and Fowler, 1977             | In vivo             | Pb, Cd, As              | ALA, porfirinas urinarias        |
| Fowler and Mahaffery, 1978            | In vivo             | Pb, Cd, As              | ALA, porfirinas urinarias        |
| Mahaffery et al., 1981                | In vivo             | Pb, Cd, As              | ALA, porfirinas urinarias        |
| Liu et al., 2000                      | In vivo             | Cd, As                  | Proteinuria                      |
| Fowler et al., 2004                   | In vivo             | Pb, Cd, As <sup>a</sup> | ZPP, ALAD                        |
| Wang et al., 2003                     | In vivo             | Pb, Cd, As <sup>a</sup> | HSPs, MT, ZPP                    |
| Yáñez et al., 1991                    | In vivo             | Cd, As                  | Peroxidación de lípidos, GSH, Mt |
| Mistry et al., 1985                   | In vitro            | Pb                      | Unión a cromatina, PbBPs         |
| Mistry et al., 1986                   | In vitro            | Pb, Cd, Ca, Fe, Zn      | PbBPs,                           |
| Goering and Fowler, 1984              | In vitro            | Pb                      | ALAD                             |
| Goering and Fowler, 1985              | In vitro            | Pb                      | ALAD                             |
| Goering et al, 1986                   | In vitro            | Pb                      | ALAD                             |
| Goering and Fowler, 1987 <sup>a</sup> | In vitro            | Pb, Zn                  | ALAD, MtT                        |
| Goering and Fowler, 1987b             | In vitro            | Pb, Cd, Zn              | ALAD, MT                         |
| Madden et al., 2002                   | In vitro            | Cd, As                  | HSPs, MT                         |

<sup>a</sup> niveles de dosis LOEL (*menor nivel de efecto observado*). Modificado de Wang, 2008.

ALA ácido d-aminolevulínico, ALAD ácido d-aminolevulínico deshidratasa, HSPs proteínas de choque térmico, MT metalotioneína, PbBPs proteínas de unión a Pb, ZPP protoporfirina de zinc.

## ANTECEDENTES

En un estudio previo de nuestro grupo, donde se utilizó un modelo de transformación celular murino, se encontró que la mezcla As-Cd-Pb disminuye la viabilidad celular, aumenta el potencial transformante y la respuesta antioxidante. Pero al co-tratarla con un potente antioxidante (N-acetil cisteína, NAC) el potencial transformante se reducía, sugiriendo la participación del estrés oxidativo en este proceso<sup>42</sup>. Posteriormente, se investigó la relación entre la viabilidad celular y la capacidad transformante de la mezcla de metales en el mismo

modelo. En dicho estudio, se observó que durante la etapa de promoción había una selección clonal, en donde sólo aquellas células con capacidad transformante lograban evadir la senescencia celular mediada por los niveles intracelulares de EROs, todo esto de forma independiente al daño al DNA<sup>43</sup>.

**Tabla No. 3. Estudios en humanos de exposiciones a mezclas de As, Cd y Pb.**

| Referencia             | Sitio de exposición | Elemento       | Biomarcador/Punto final                                 |
|------------------------|---------------------|----------------|---------------------------------------------------------|
| deBurbure et al., 2003 | Ambiental           | Pb, Cd, Hg     | Proteinuria                                             |
| deBurbure et al., 2006 | Ambiental           | Cd, Pb, Hg, As | Prolactina en suero, ácido homovanílico                 |
| Garcon et al., 2007    | Ocupacional         | Pb, Cd         | ↑α Glutación transferasa en orina, ZPP, malondialdehído |
| Garcon et al., 2004    | Ocupacional         | Pb, Cd         | ↑α Glutación transferasa en orina                       |
| Hengstler et al., 2003 | Ocupacional         | Cd, Pb, Co     | Rompimientos de DNA, 8-OH DG                            |
| Hong et al., 2004      | Ambiental           | Cd, As         | Proteinuria                                             |
| Nordbeng et al., 2005  | Ambiental           | Cd, As         | Proteinuria, MT                                         |
| Palus et al., 2003     | Ocupacional         | Pb, Cd         | ↑micronúcleos, rompimientos de DNA                      |
| Roels et al., 1999     | Ocupacional         | Pb, Cd, Hg     | Proteinuria                                             |
| Wasowicz et al., 2001  | Ocupacional         | Pb, Cd         | Decremento en GPx, Incremento en TBARS                  |

Modificado de Wang, 2008. GPx Glutación peroxidasa, MT metalotioneína, TBARS sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, ZPP protoporfirina de zinc, 8-OH DG 8-hidroxideoxiguanosina.

**Tabla No. 4. Efectos crónicos de mezclas binarias de metales.**

| Mezcla                                                                                      | Efecto de punto final                                                                       | Resultados           |                                                           |                      | Conclusión                                                                                                      | Referencia                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                                                                                             |                                                                                             | Mayor que la aditiva | Aditiva/no efecto                                         | Menor que la aditiva |                                                                                                                 |                                                       |
| Exposición oral (mg/Kg/día)                                                                 |                                                                                             |                      |                                                           |                      |                                                                                                                 |                                                       |
| Influencia de Plomo en la toxicidad/carcinogenicidad del arsénico por exposición simultánea | Hematológico (hemosiderosis esplénica que indica la destrucción de glóbulos rojos)          |                      |                                                           | 18+ 6.3 (r)          | < Aditivo                                                                                                       | Fairhall and Miller 1941                              |
|                                                                                             | Renal (cilindros hialinos en túbulos)                                                       |                      |                                                           | 18+6.3 (r)           | < Aditivo                                                                                                       | Fairhall and Miller 1941                              |
|                                                                                             | Cáncer                                                                                      |                      | 22+7.8 (r)                                                |                      | Indeterminado: no hay efecto de As o de As+Pb a la misma dosis de As como en la mezcla; no hay grupo de Pb solo | Kroes et al. 1974                                     |
| Influencia de plomo en concentraciones en tejido del arsénico por exposición simultánea     | Niveles de arsénico en riñón                                                                |                      |                                                           | 18+6.3 (r)           | < Aditivo                                                                                                       | Fairhall and Miller 1941                              |
|                                                                                             | Niveles de As en hígado, hueso                                                              |                      | 18+6.3 (r)                                                |                      | Aditivo                                                                                                         | Fairhall and Miller 1941                              |
| Influencia de arsénico en la toxicidad/carcinogenicidad del plomo por exposición simultánea | Hematopoyético (mielosis esplénica)                                                         |                      |                                                           | 6.3+18 (r)           | < Aditivo                                                                                                       | Fairhall and Miller 1941                              |
|                                                                                             | Renal (células de los túbulos contorneados inflamadas, cuerpos de inclusión intranucleares) |                      |                                                           | 6.3+18 (r)           | < Aditivo                                                                                                       | Fairhall and Miller 1941                              |
|                                                                                             | Cáncer                                                                                      |                      | 7.8+22(r)                                                 |                      | Indeterminado: no hay efecto de As o de As+Pb a la misma dosis de As como en la mezcla; no hay grupo de Pb solo | Kroes et al. 1974                                     |
| Influencia de arsénico en concentraciones en tejido del plomo por exposición simultánea     | Niveles de Pb en hueso, riñón                                                               |                      |                                                           | 6.2+18 (r)           | < Aditivo                                                                                                       | Fairhall and Miller 1941                              |
|                                                                                             | Niveles hepáticos de Pb                                                                     |                      | 6.3+18 (r)                                                |                      | Aditivo                                                                                                         | Fairhall and Miller 1941                              |
| Influencia de plomo en la toxicidad/carcinogenicidad del cadmio por exposición simultánea   | Mortalidad cardiovascular relativa                                                          |                      | Biomarcadores de exposición: Pb aórtico, Cd hepático (ha) |                      | ¿Aditivo?                                                                                                       | Voors et al. 1982                                     |
|                                                                                             | Cardiovascular (incremento en la presión sanguínea sistólica)                               |                      | 0.67+0.67 (r)                                             | 0.67+0.67 (r)        | Aditivo<br>< Aditivo                                                                                            | Koop et al. 1980a<br>1980b<br>Perry and Erlanger 1978 |
|                                                                                             | Cardiovascular (incremento en la presión sanguínea sistólica)                               |                      | 0.67+0.67 (r)                                             |                      | ¿Aditivo?<br>Presión sanguínea igual para 0.4 de Cd solo; no hay grupo de Pb solo                               | Perry et al 1983                                      |
| Influencia de plomo en concentraciones en tejido del cadmio por exposición simultánea       | Niveles de Cd en cerebro                                                                    |                      | 0.62+0.62 (r)                                             |                      | Aditivo                                                                                                         | Lockett and Leary 1986                                |

|                                                                                           |                                                                                    |               |                                                           |               |                      |                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------------------------|---------------|----------------------|-------------------------------------------------------|
| Influencia de cadmio en la toxicidad/carcinogenicidad del plomo por exposición simultánea | Mortalidad cardiovascular relativa                                                 |               | Biomarcadores de exposición: Pb aórtico, Cd hepático (ha) |               | ¿Aditivo?            | Voors et al. 1982                                     |
|                                                                                           | Cardiovascular (incremento en la presión sanguínea sistólica)                      |               | 0.67+0.67 (r)                                             | 0.67+0.67 (r) | Aditivo<br>< Aditivo | Koop et al. 1980a<br>1980b<br>Perry and Erlanger 1978 |
|                                                                                           | Neurológico (actividad)                                                            | 0.62+0.62 (r) |                                                           |               | > Aditivo            | Lockett and Leary 1986                                |
| Exposición por inhalación (PbB µg/dL; CdU µg/g creatinina)                                |                                                                                    |               |                                                           |               |                      |                                                       |
| Influencia de plomo en la toxicidad/carcinogenicidad del cadmio por exposición simultánea | Renal (proteinuria)                                                                |               | 43.5+6.57 a (ha)<br>38.7+7.08 (ha)                        |               |                      | Roels et al. 1978<br><br>Buchet et al. 1981           |
| Influencia de cadmio en la toxicidad/carcinogenicidad del plomo por exposición simultánea | Hematológico (hematocrito hemoglobina, Eritrocito libe de porfirina, ALA urinaria) |               | 6.57+43.5 (ha)<br>7.08+38.7 (ha)                          |               | Aditivo              | Roels et al. 1978<br>Buchet et al. 1981               |

La primera dosis enlistada es para el químico influenciando en la toxicidad/carcinogenicidad del otro químico. Donde r – rata; ha – humano adulto.

Sin embargo, a pesar de los estudios relacionados con la disminución de algún integrante de la barrera antioxidante, poco se sabe respecto a lo que ocurre cuando más de un elemento de la barrera es reducido de manera simultánea. En el trabajo realizado por Sánchez-Valle, et al., 2013, se utilizó como modelo experimental la línea celular hepática embrionaria (WRL-68) tratada con la mezcla de As-Cd-Pb y con inhibidores farmacológicos para la síntesis del GSH (L-butionina-S,R-Sulfoximina, BSO) y de catalasa (3-Aminotriazol, AZT), observando que se inducía la transformación celular después de un tratamiento crónico demostrando el papel fundamental que juega el balance entre el estrés oxidativo y la barrera antioxidante<sup>44</sup>.

Si bien en ese estudio se observaron cambios, la inhibición farmacológica por el uso de BSO y ATZ no es específica, ya que se han reportado que estos compuestos presentan otros efectos como la activación de transportadores de Cd y Pb, aumentando la absorción de dichos metales, pudiendo ser una variable confundente al mecanismo inducido por la mezcla de metales. Por lo anterior, este proyecto de investigación se enfocó en analizar el papel de la inhibición a nivel transcripcional de la barrera antioxidante en la transformación celular inducida por la mezcla de metales en un modelo hepático de rata.

---

## **HIPÓTESIS**

La disminución de la barrera antioxidante a través de la inhibición transcripcional de la Gclc y catalasa favorecerá la transformación de células hepáticas tratadas con la mezcla de metales de As, Cd y Pb.

## **OBJETIVOS**

### Objetivo General

Caracterizar los procesos involucrados en la transformación de células hepáticas cuando se inhibe transcripcionalmente la barrera antioxidante.

### Objetivos Particulares

- Bloquear la expresión de Gclc y catalasa en la línea celular CLONA 9 mediante el empleo de shRNA.
- Determinar la disminución de la barrera antioxidante.
- Evaluar la migración celular, mediante el ensayo de herida.
- Determinar cambios en la expresión de los genes cdh1 y acta2, relacionados a la transición epitelio mesénquima.
- Evaluar los cambios en la expresión de la gama-glutamyltranspeptidasa.
- Valorar la capacidad de transformación de células hepáticas con abatimiento de la barrera antioxidante.



---

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Células y Cultivo celular

Se utilizó la línea celular Clona 9 (C9, ATCC® CRL-1439), derivada de células epiteliales de hígado de rata. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células, se dejaron crecer y se mantuvieron en medio F-12K suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina y 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina. Se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  por 36 días.

### Bloqueo de la expresión de Gclc y CAT

Se realizó la represión de la expresión de catalasa y Gcl por medio de un shRNA (RNA de horquilla pequeña). Las secuencias de los shRNAs se diseñaron con base en la secuencia del RNAm de los respectivos genes (Figuras 6 y 7), particularmente en el caso de Gcl la secuencia fue dirigida hacia la subunidad catalítica de esta enzima (Gclc). Las secuencias fueron sintetizadas en IDT® (Coralville, IA, EUA). En la figura 8 se observa la secuencia de los oligonucleótidos sentido y antisentido que se utilizaron para cada gen. Los oligos se empalman tras un ciclo de  $95^\circ\text{C}$  por 30 s,  $72^\circ\text{C}$  por 2 min,  $37^\circ\text{C}$  por 2 min y  $25^\circ$  por 2 min. Por su parte el plásmido pLVx-shRNA1 (Figura 9) se digirió con las enzimas de restricción EcoR1 y BamHI y se realizó por separado la ligación de cada shRNA con el plásmido digerido usando una T4 DNA ligasa (NEB). Posteriormente, se transformaron las células de *E.coli* (GCL-5a) por medio de choque térmico con cada una de las ligaciones. Las células transformadas se seleccionaron con ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) en medio sólido LB (Luria-Bertani), las células positivas se expandieron y se purificó el plásmido, tras lo cual se corroboró la inserción del sh con una digestión enzimática con Mlu1 (NEB). Una vez corroborada la inserción, se utilizó el plásmido para transfectar las células C9 utilizando una mezcla 3:1 de FuGENE 6 transfection Reagent:DNA (Promega), las cuales se seleccionaron posteriormente con puromicina (2  $\mu\text{g/ml}$ ). Se cosecharon las células y se expandieron.

Al final de la transfección se obtuvieron 4 diferentes tipos celulares: 1) **vector**, aquellas que contienen el plásmido original, 2) **shCAT**, células con el silenciamiento de la expresión de catalasa, 3) **shGSH**, las que tienen el silenciamiento en la expresión de Gclc y 4) **shC/shG**, aquellas que fueron tratadas con ambos plásmidos clonados.

**Rattus norvegicus catalase (Cat), mRNA**  
 NCBI Reference Sequence: NM\_012520.2  
 LOCUS NM\_012520 2564 bp mRNA linear  
 REFERENCE 4 (bases 1 to 2564)  
 Functions as a hydrogen peroxide:hydrogen peroxide reductase

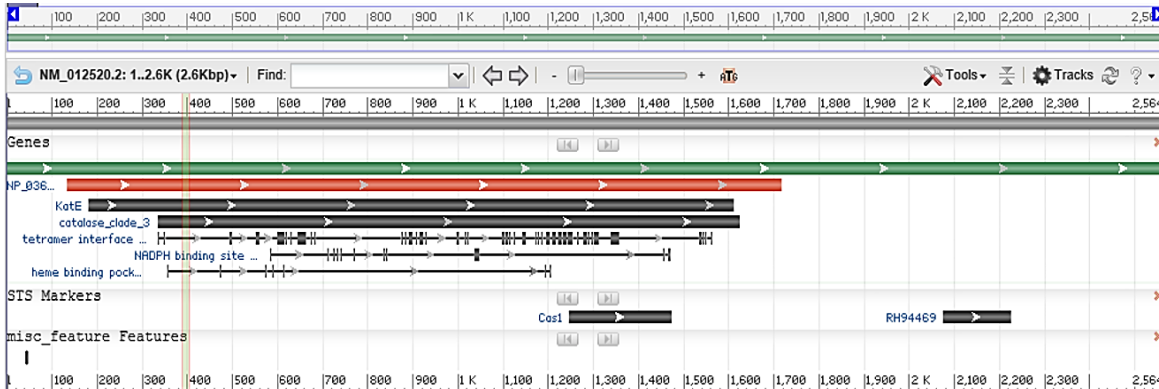


Figura 6. RNAm para catalasa. La línea vertical atraviesa la zona en donde se encuentra la secuencia blanco. La secuencia AGG TCA CCC ACG ATA TTA para el shRNA1 CAT se encuentra a partir de la base 389 a 406.

**Rattus norvegicus glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (Gclc), mRNA**  
 NCBI Reference Sequence: NM\_012815.2  
 LOCUS NM\_012815 3079 bp mRNA linear  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 3079)  
 Catalyzes the first step in the synthesis of glutathione

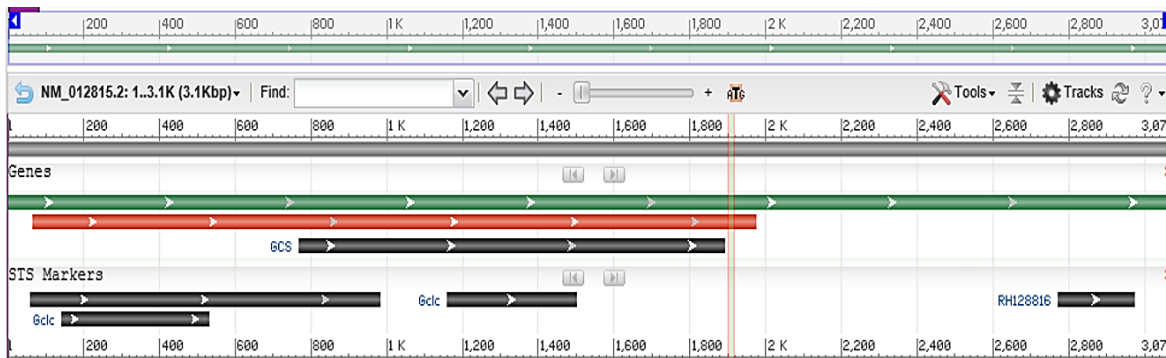


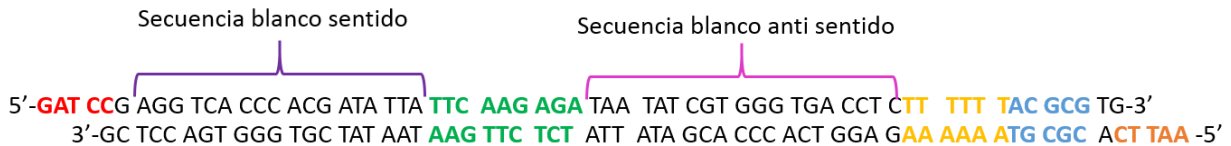
Figura 7. RNAm para la subunidad catalítica de la GcL. La línea vertical atraviesa la zona en donde se encuentra la secuencia blanco. La secuencia TGT GAA TGT CCA GAG TTA para el shRNA GSH1 se encuentra a partir de la base 1900 a 1917.

### Exposición a la mezcla de As, Cd y Pb

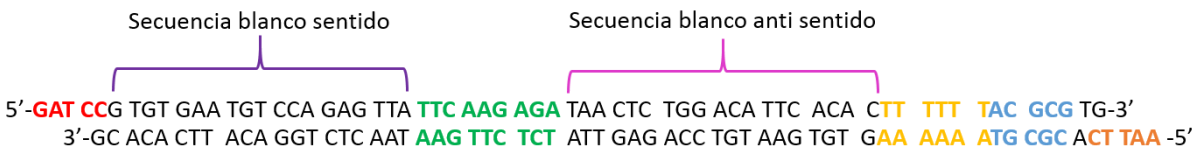
Tanto para las células transfectadas con el shRNA como para las no transfectadas se tuvo un grupo en condiciones control, que fue cultivado como ya se describió, con un cambio de medio

cada 72 h y un grupo tratado con mezcla de metales (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) cada 72 h a una concentración que es equivalente a la exposición ocupacional. Se hicieron subcultivos cada 6 días (144 h).

### shRNA1 CAT



### shRNA1 GSH



Sitio de corte de EcoR1

Sitio de corte de BamHI

Hairpin loop

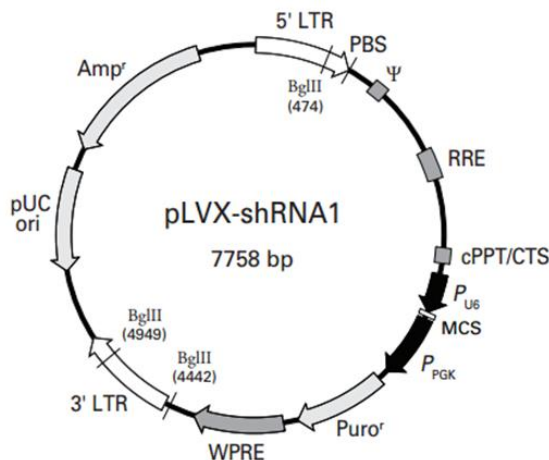
Terminador

Sitio de corte de MLU1

Figura 8. Secuencia de los oligos para el silenciamiento. Muestra la estructura y los elementos de los oligos a emplear tanto para catalasa en la parte de arriba, como para Gclc en la parte de abajo.

### Viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular se utilizó un contador de células automatizado Moxi™ Z, ORFLO, empleando 75 μL de una dilución 1:10 de las células cosechadas. El equipo genera un valor MVI (Moxi Viability Index), el cual es generado por un algoritmo matemático que considera el tamaño y la distribución de las células con respecto al total de partículas contadas. De esta manera el contador automatizado clasifica las poblaciones en: partículas de desecho, células necróticas y células vivas<sup>45</sup>.



BamHI
EcoRI  
 2431 AAGGACGAGG ATCCGGACAA GCTTCGAATT CTACCGGGTA  
 TTCCTGCTCC TAGGCCTGTT CGAAGCTTAA GATGGCCCAT

Figura 9. Mapa del vector pLVX-shRNA1.

### Detección de especies reactivas de oxígeno

Se utilizó el método de oxidación de 123-dihidrorodamina a 123-rodamina por especies reactivas de oxígeno<sup>46</sup>. De las muestras cosechadas,  $1 \times 10^5$  células fueron centrifugadas a 100 g por 5 min. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 180  $\mu$ L de Buffer A (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.8 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, glucosa 5 mM, HEPES 15 mM) y 20  $\mu$ L de 123-dihidrorodamina (1 mM). Las muestras se leyeron a 505 nm. Los resultados se interpolaron en una curva estándar de 0-10  $\mu$ M de 123-rodamina en Buffer A. Esta metodología es sensible a la detección del anión peroxinitrito y el peróxido de hidrógeno entre otras especies<sup>47</sup>.

### Determinación de la actividad de catalasa

La actividad de la catalasa se midió de acuerdo al protocolo descrito por Aebi<sup>48</sup>. Se utilizaron  $1 \times 10^6$  células, que fueron sonicadas por 10 ciclos de 10 s a una amplitud de 20 MHz. Posteriormente se centrifugaron a 9,600 g por 5 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad de la catalasa y la concentración de la proteína. La actividad de la catalasa se determinó siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 240 nm a temperatura ambiente, ajustando a cero con amortiguador de fosfatos 50 mM. Se adicionaron 500  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM a 100  $\mu$ L del sobrenadante y 400  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos, midiendo la absorbancia a 15 y 30 segundos.

---

### Cuantificación de glutatión reducido

Se empleó un método fluorométrico para la determinación de glutatión usando o-ftalaldehído (OPT) como reactivo fluorescente<sup>49</sup>. De las células cosechadas se tomaron 100 µL, se les agregaron 100 µL de la solución de precipitación de ácido meta fosfórico y se centrifugaron a 1000 g por 10 min. Al sobrenadante se le adicionó 1 mL de buffer para GSH (0.1 mol NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0.005 mol EDTA) y 100 µL de OPT, se incubó por 15 min protegido de la luz y las muestras se leyeron a 420 nm. Los resultados se interpolaron en una curva estándar de 5 µM a 1 mM de GSH en agua.

### Ensayo de herida

Se empleó un cultivo a un 85 - 90% de confluencia, el cual se dejó la noche previa a realizar el ensayo en un medio con restricción de suero (SFB 2%). Después de dejarlo incubar toda la noche se procedió a realizar una herida a la mitad de la caja, se retiró el medio y se lavó con PBS para eliminar todas las células que hubieran quedado en la herida. Se colocó medio nuevo con restricción de suero. En el caso de las células tratadas con la mezcla de metales, éstos se adicionaron y se dejaron por un periodo de 4 h. Posteriormente se volvió a cambiar el medio (SFB 2%). Finalmente se procedió a tomar fotografías a distintos tiempos para ver el cierre de la herida. Modificado de Liang, 2007<sup>50</sup>.

### Obtención del RNA total

La extracción del RNA total se realizó a partir de  $1 \times 10^6$  células que se centrifugaron, eliminando todo el medio y mezclando con 1 ml de Trizol. Se incubaron por 5 min a temperatura ambiente, adicionando 200 µl de cloroformo dejando incubar por 10 min a temperatura ambiente. Las muestras se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 13,800 g por 15 min a 4°C. La fase acuosa se pasó a un tubo nuevo y se le adicionaron 500 µl de isopropanol mezclando por inversión. Las muestras se incubaron por 10 min a temperatura ambiente y centrifugando a 13,800 g por 10 min, 4 °C. La pastilla obtenida se lavó con 1 ml de 75% etanol/agua libre de RNasas, centrifugando por 5 min a 17,000 g. Se eliminó todo el lavado y se dejó secar la pastilla por aproximadamente 10 min, resuspendiendo posteriormente en 40 µl de agua libre de RNasas. La concentración de RNA fue cuantificada en un NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer y se guardaron a -20°C. La calidad del RNA fue analizada con la relación de absorbancia  $260/280 = 2.0 \pm 0.15$ . Las muestras con una pureza menor a la mencionada fueron descartadas.

---

## RT-PCR

Las reacciones de RT-PCR se realizaron a partir de 200 ng de RNA total, 5 µl de buffer de reacción AMV/T fl 5X, 1 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTP's, 1 µl de 10 mM oligonucleótido sentido y 1 µl de 10 mM oligonucleótido antisentido, 0.5 µl de enzima reverso transcriptasa (RT), 0.5 µl de DNA polimerasa, en una reacción final de 25 µl. En la Tabla 5 se muestran las secuencias de los oligos utilizadas para la amplificación. Los productos fueron visualizados en un gel de 1.5% de agarosa teñido con bromuro de etidio. Las bandas se analizaron por densitometría utilizando el programa KODAK 1D (Scientific Imaging Systems).

**Tabla No.5. Secuencia de los oligos.**

| <b>Gen</b>   | <b>Oligo</b> | <b>Secuencia</b>       | <b>Tm</b> | <b>No. Ciclos</b> | <b>Tamaño del producto (pb)</b> |
|--------------|--------------|------------------------|-----------|-------------------|---------------------------------|
| <b>HPRT1</b> | Sentido      | GGACAGGACTGAAAGACTTG   | 60        | 30                | 387                             |
|              | Antisentido  | GTATCCAACACTTCGAGAGG   |           |                   |                                 |
| <b>cdh1</b>  | Sentido      | AGACCAACGAGGGCATTCTG   | 60        | 30                | 352                             |
|              | Antisentido  | TCAGCCCGAGTGGAAATGAC   |           |                   |                                 |
| <b>acta2</b> | Sentido      | TGCTAACAACGTCCTCTCGG   | 60        | 30                | 352                             |
|              | Antisentido  | GAAAAGAAGCTGAAGGCGCTGA |           |                   |                                 |
| <b>ggt1</b>  | Sentido      | GTGGCAGTTCCTGGTGAAAT   | 60        | 30                | 249                             |
|              | Antisentido  | GGCCAACCTTCGGCATAGTTA  |           |                   |                                 |

Muestra la secuencia de los oligos, así como su temperatura de alineamiento y tamaño esperado del producto amplificado en la RT-PCR. HPRT1: Hipoxantina fosforribosil transferasa, cdh1: E-cadherina, acta2: Alfa-SMA, ggt1: Glutamiltranspeptidasa.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para cdh1, acta2 y ggt1 fueron diseñadas de acuerdo con la secuencia reportada en Genebank NM\_012520.2, NM\_012815.2, NM\_031334.1, NM\_031004.2 y NM\_053840.2 respectivamente.

---

## RESULTADOS

La barrera antioxidante juega un papel de gran importancia al contrarrestar el daño causado por el estrés oxidante, el cual puede favorecer la transformación celular. Varios son los modelos biológicos que se han empleado para poder estudiar la participación del estrés oxidante en la transformación celular, dentro de los cuales se encuentra el uso de líneas celulares.

En este trabajo utilizamos una línea celular no transformada (C9), que al ser tratada con la mezcla de As-Cd-Pb de forma crónica no presentó cambios en los parámetros evaluados, por lo que asumimos que bajo estas condiciones las células son capaces de contener el daño causado por estrés oxidativo. En vista de eso, se procedió a abatir la barrera antioxidante de estas células, para lo cual se realizó el silenciamiento de dos genes de enzimas importantes para la barrera antioxidante, utilizando shRNA. Los genes silenciados fueron la catalasa, que es una enzima antioxidante y la Gclc que forma parte de la primera enzima que participa en la síntesis de *ново* del glutatión.

### Inhibición transcripcional

Los sh apareados se ligaron en el plásmido digerido con las enzimas de restricción. Las bacterias se transformaron con el plásmido clonado, se seleccionaron con ampicilina y se expandieron para extraer el plásmido. Se purificó el plásmido y se verificó la incorporación del shRNA por digestión con la enzima Mlu1 la cual genera dos fragmentos de: 6589 y 1216 pb, únicamente si el shRNA está presente. En la figura 10 se muestran los fragmentos obtenidos tras la digestión con Mlu1.

Posteriormente se realizó la transfección de las células C9, obteniendo cuatro diferentes tipos celulares: 1) **vector**, 2) **shCAT**, 3) **shGSH** y 4) **shC/shG**. En la figura 11 se muestran las cuatro nuevas clonas obtenidas, donde se puede apreciar que su morfología es la misma que la de las células C9.

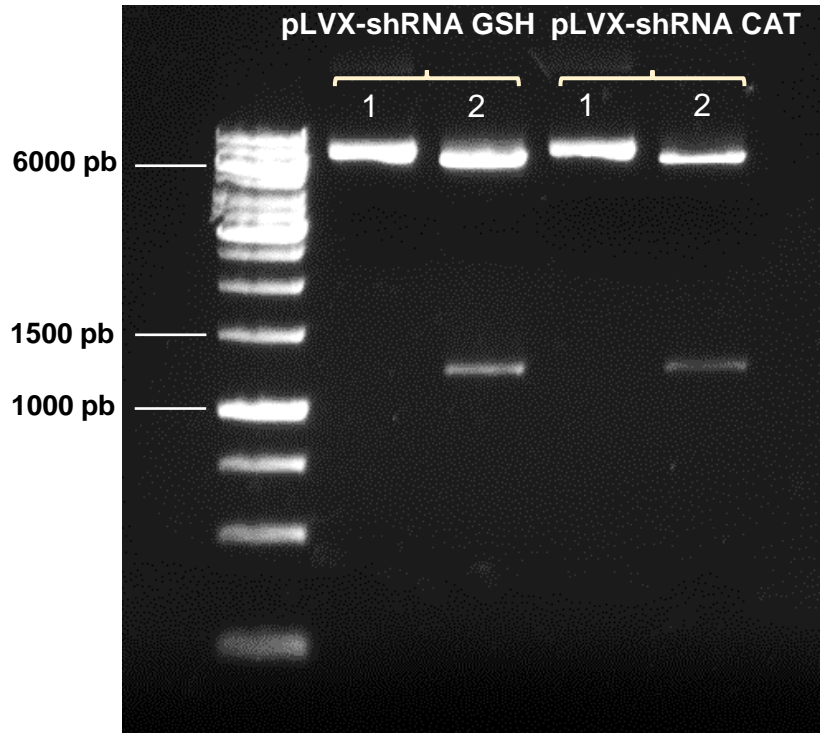


Figura 10. Digestión con Mlu1 de los plásmidos clonados. Muestra un gel de agarosa al 0.8 % en donde se observan las muestras tratadas con Mlu1, con sus respectivos controles. Donde 1 se refiere al control y 2 a la muestra tratada con la enzima.

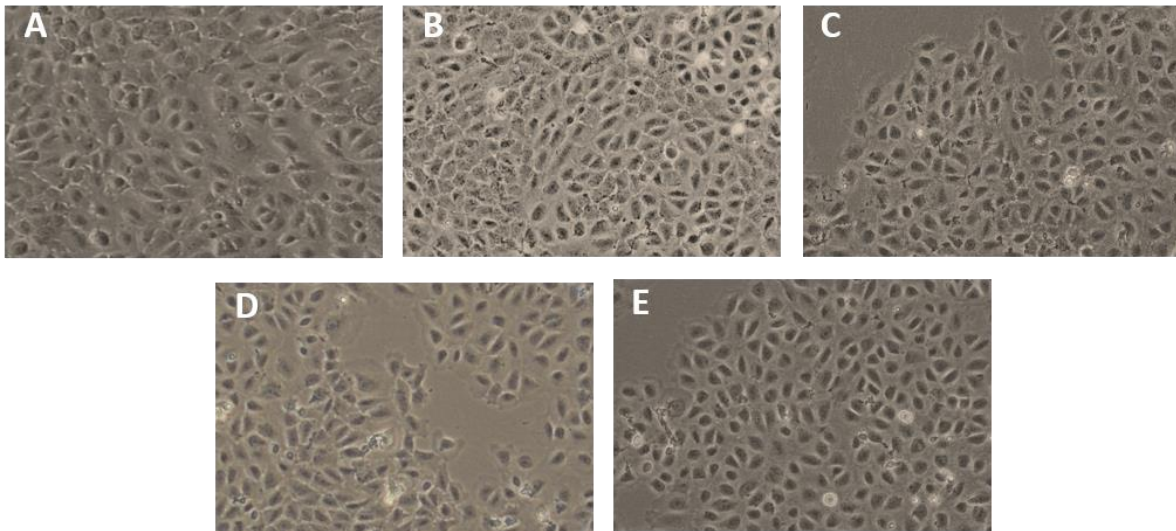


Figura 11. Morfología de las células C9 y las cuatro clonas obtenidas a 10x. **A.** Células C9. **B.** Células Vector. **C.** Células shCAT. **D.** Células shGSH y **E.** Células shC/shG.



## Barrera antioxidante abatida

Como parte de nuestro principal objetivo, se procedió a caracterizar a las células con la barrera antioxidante abatida (shC/shG). Se evaluó la actividad de catalasa, por el método descrito por Abei<sup>44</sup>, observando que la actividad de catalasa en las células shC/shG (Figura 12 A y B) bajo condiciones control (A) y con el tratamiento con metales (B), se encuentra siempre disminuida con respecto a las células vector. Por otro lado, la determinación de la inhibición de Gclc se realizó de forma indirecta, mediante la cuantificación del GSH. En la figura 12 C y D se observa que durante aproximadamente 18 días la concentración de GSH en las células shC/shG, fue menor respecto a las células vector en ambas condiciones, sin embargo, el aumento que presentan las células tratadas con la mezcla de metales a los 24 y 30 días es mucho mayor.

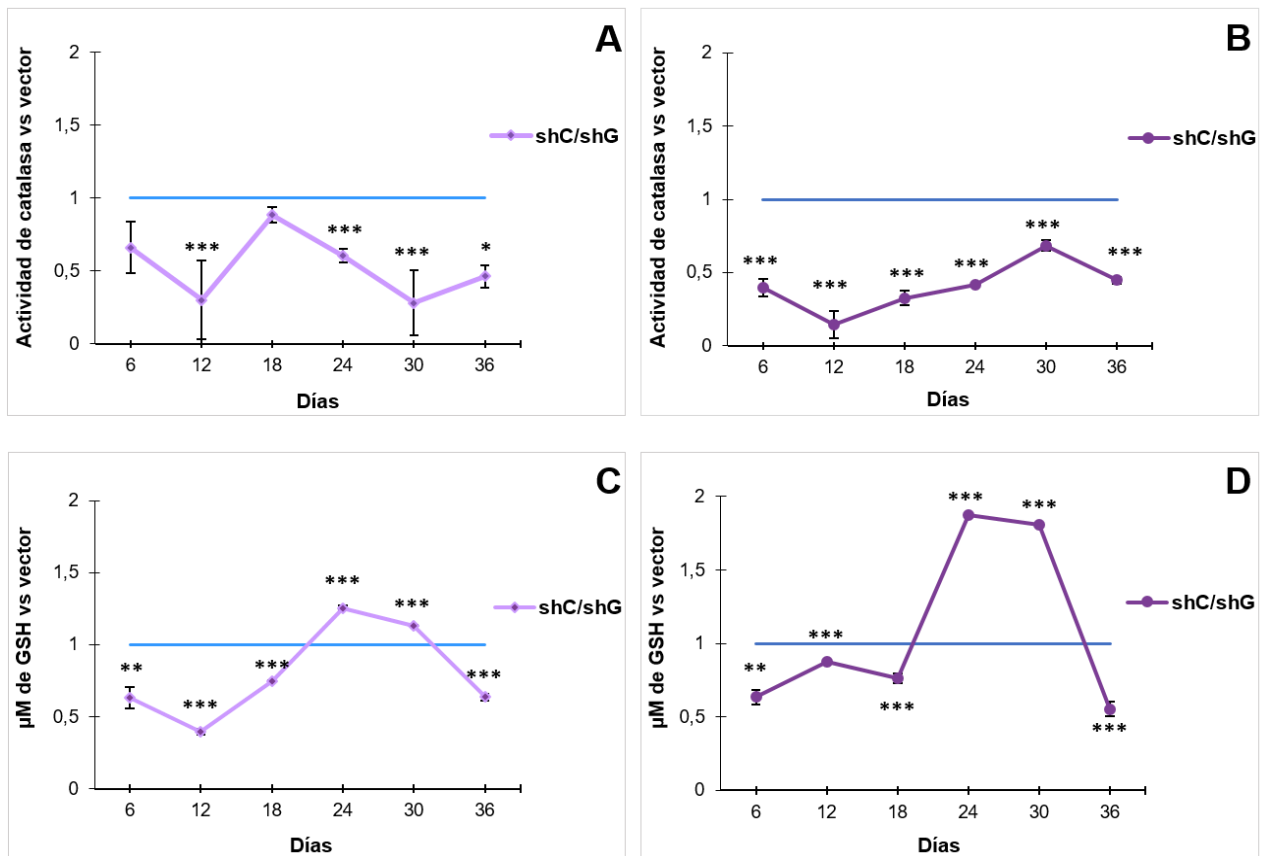


Figura 12. Inhibición de catalasa y Gclc. A y B muestran la inhibición normalizada en la actividad de catalasa de las células shC/shG con respecto a las células vector, sin y con tratamiento de metales respectivamente; mientras que C y D muestran la inhibición normalizada en la síntesis de GSH en las células shC/shG con respecto a las células vector, sin y con tratamiento de metales respectivamente. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Posteriormente se procedió a evaluar la viabilidad, así como el tiempo de generación (TPG). En la figura 13 A, se observa que bajo condiciones control la viabilidad para las células con la barrera abatida fue muy similar y constante, además de encontrarse por arriba del 85%, lo que indica que la inserción de los sh no afecta la viabilidad de las células. Adicionalmente el TPG fue ligeramente mayor con respecto a las células vector (Figura 13 C). Al dar el tratamiento con la mezcla de metales (Figura 13 B y D) observamos que los cambios más drásticos se observan al día 6, en el cual la viabilidad decae hasta el 50% mientras que el tiempo de replicación aumenta casi al doble de tiempo, valor que va disminuyendo a lo largo del tiempo.

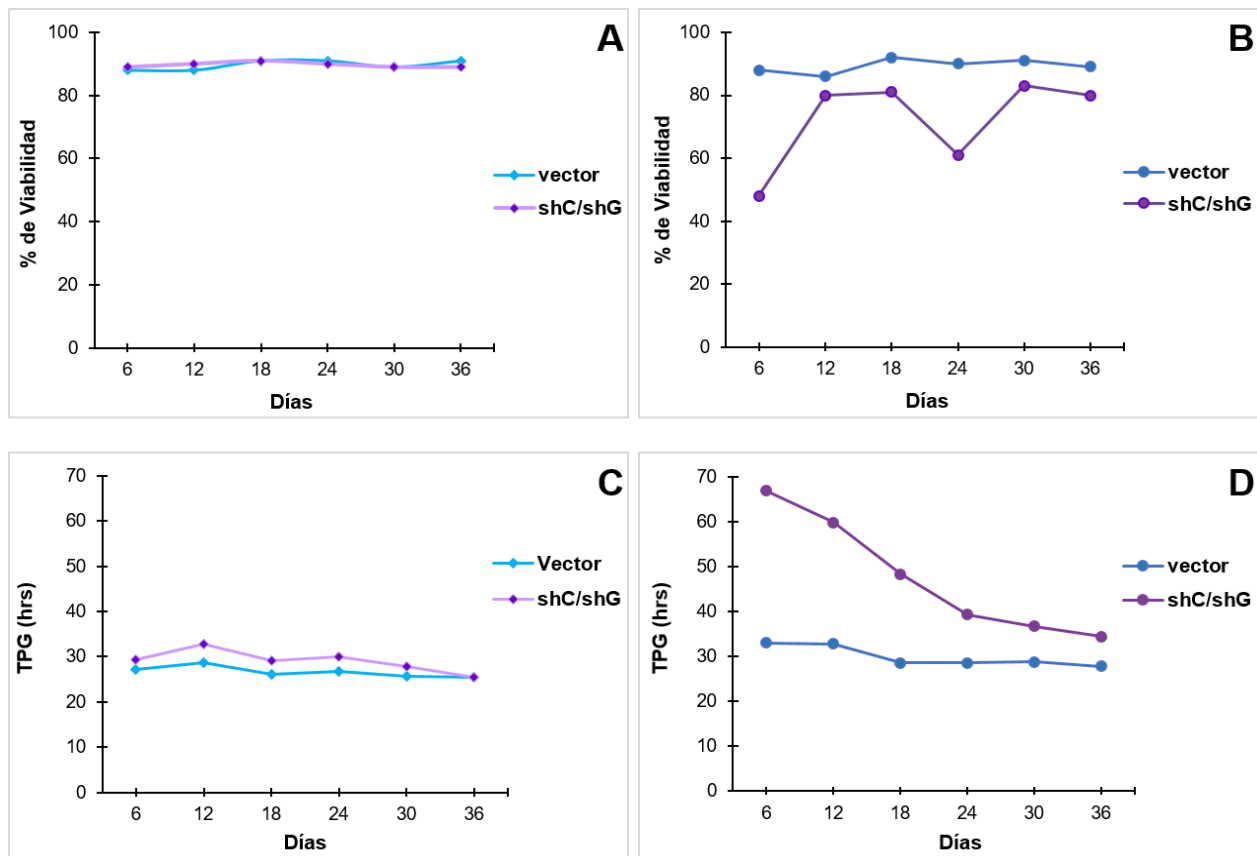


Figura 13. Porcentaje de viabilidad celular y tiempo de generación de las células con la barrera antioxidante abatida. A y B muestran el porcentaje de viabilidad a lo largo del tiempo sin y con tratamiento de metales respectivamente. C y D muestran el tiempo que tardan en dividirse una vez las células obtenidas, a lo largo del tiempo sin y con tratamiento de metales respectivamente.

Respecto a la producción de EROs (Figura 14 A y B), se observó que los valores obtenidos en general fueron bajos en condiciones control (A), pero al tratarlas con la mezcla de metales (B) observamos aumento de EROs durante la mayor parte del tiempo, siendo el día 12 cuando se presenta la mayor producción de especies reactivas de oxígeno.

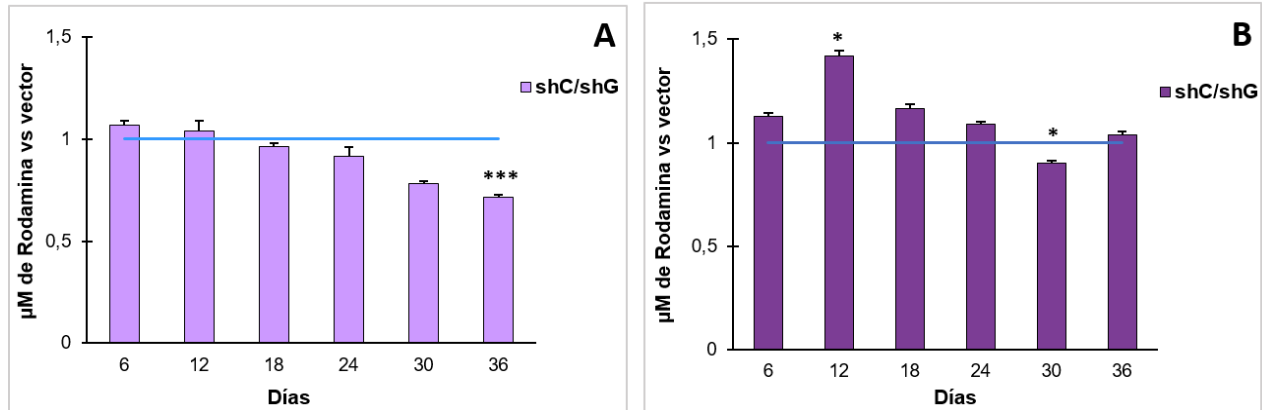


Figura 14. Generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en células shC/shG. Muestra los valores obtenidos de EROs normalizados cuantificados por la oxidación de la 123-dihidrorodamina en las células shC/shG con respecto a las células vector. Donde A son las células en condiciones control y B las células con la mezcla de metales. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

La figura 15 muestra la morfología de las células vector y las células con la barrera antioxidante abatida con y sin tratamiento de metales a lo largo del tiempo (6, 18 y 36 días). Se observa que bajo condiciones control en las células shC/shG a los 36 días en los cultivos encontramos la presencia de algunas células cuya morfología es alargada. En contraste, cuando estas mismas células son tratadas con la mezcla de metales observamos desde el día 18 la presencia de células cuya morfología es alargada y en mayor proporción respecto a la condición control.

Posteriormente se realizó el ensayo de herida (Figura 16) en el cual observamos que con el tratamiento de metales las células shC/shG empiezan a migrar a las 24 h, tiempo en el cual también se observa la presencia de células con morfología alargada similar a la que encontramos con el tratamiento crónico con la mezcla de metales a los 18 días. A las 48 h la herida se ha cerrado prácticamente. Esto contrasta con las células en condiciones control, ya que a las 48 h bajo las condiciones control aún podemos observar la zona donde se llevó a cabo la herida.

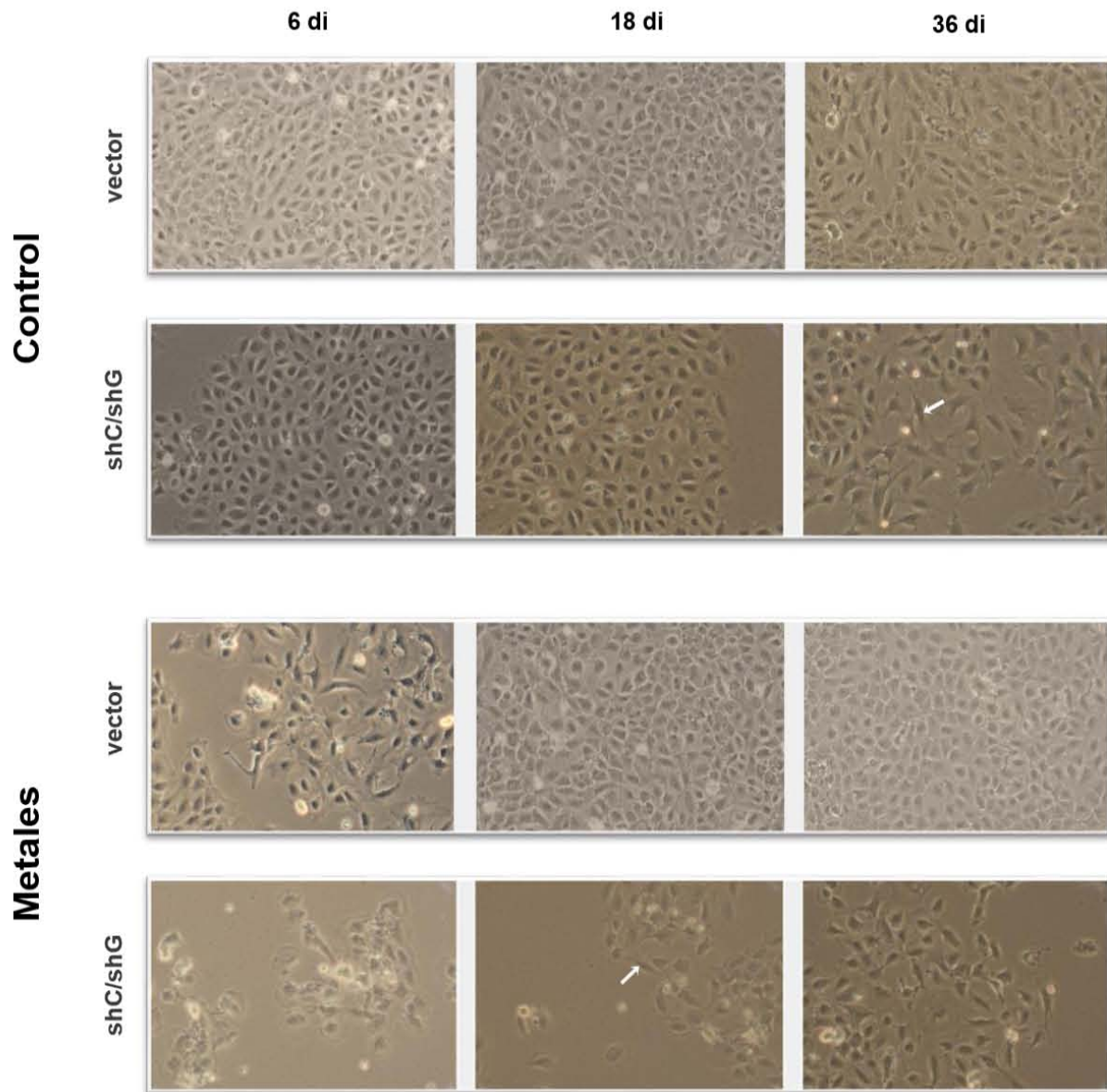


Figura 15. Morfología de las células vector y shC/shG. Muestra la morfología de ambas células transfectadas a lo largo del tiempo sin y con la mezcla metales a 10x. Las flechas señalan la presencia de células alargadas.

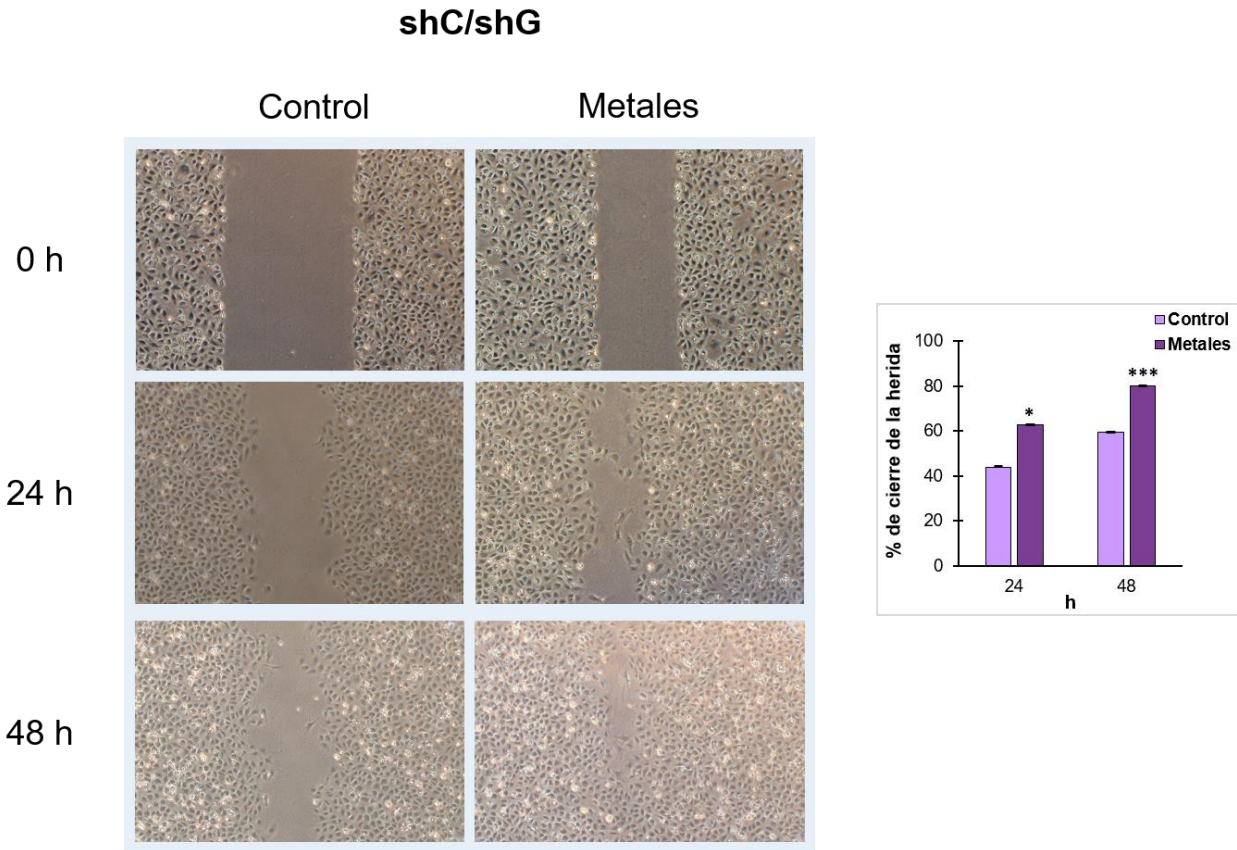


Figura 16. Ensayo de herida de las células shC/shG. Muestra las células observadas por microscopia de luz a 4X, mientras que la gráfica muestra el porcentaje del cierre de la herida. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

De forma adicional al ensayo de herida, se determinaron a lo largo del tiempo los niveles de expresión del RNAm de *cdh1*, *acta2* y *ggt*. Cabe recordar que este último es utilizado como marcador de transformación hepática<sup>30</sup>, mientras que *cdh1* y *acta2* participan en la TEM. En la figura 17 A y B, podemos observar que la expresión de *cdh1* durante todo el tiempo en las células shC/shG es baja de manera general en ambas condiciones. Por su parte la expresión de *acta2* sí presenta cambios (Figura 17 C y D). Bajo condiciones control (C) hay bajos niveles, pero con el tratamiento con metales (D) incrementa su expresión a partir de los 12 días. Por su parte, la expresión de *ggt* fue baja en la condición control (Figura 18 A), mientras que el tratamiento con metales provocó un aumento a los 12 días (Figura 18 B) por lo que convendría evaluar y determinar si los niveles de la proteína correlacionan con los niveles de expresión génica.

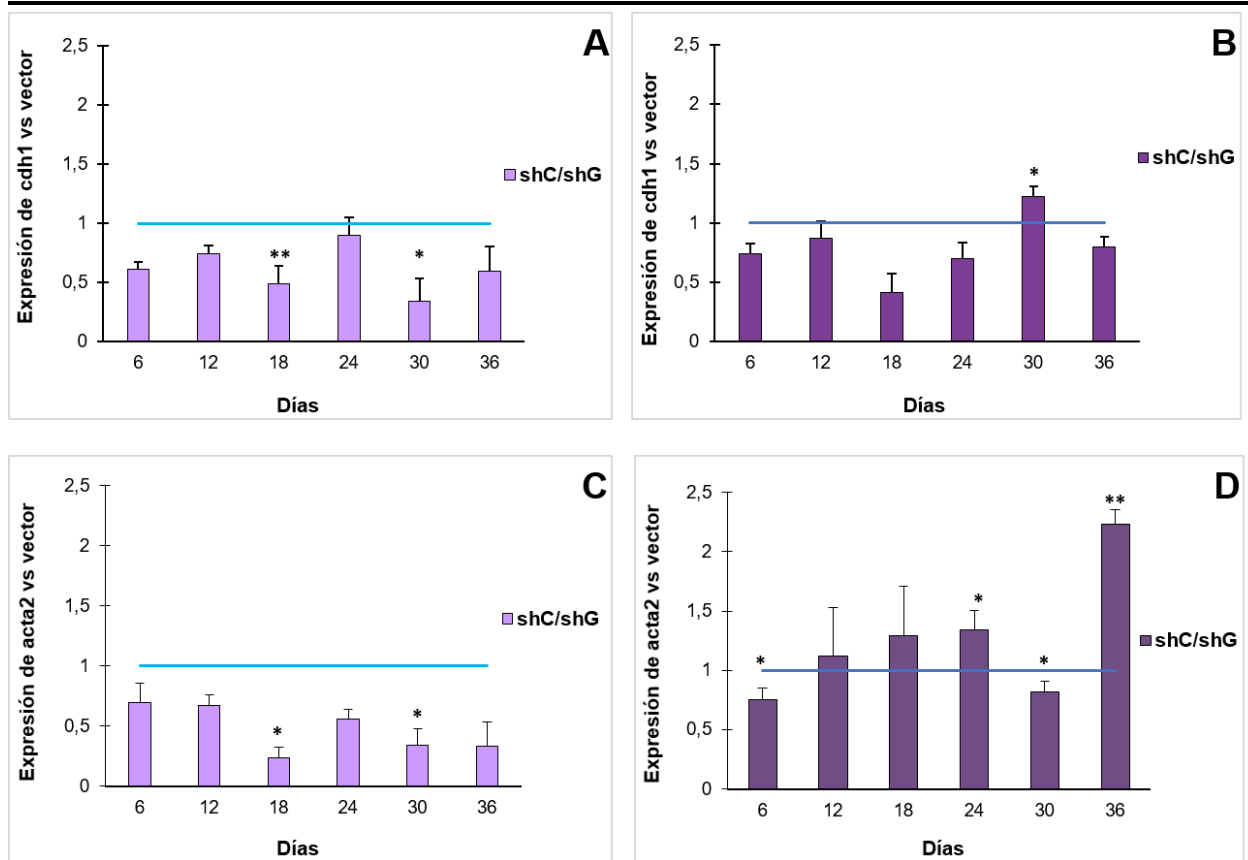


Figura 17. Expresión del RNAm de cdh1 y acta2 de las células con la barrera abatida. Donde A y B muestran los valores normalizados obtenidos para cdh1 de las células shC/shG con respecto a las células vector, a lo largo del tiempo sin y con tratamiento de metales respectivamente. Mientras que C y D muestran los valores normalizados de acta2 en las células shC/shG con respecto a las células vector, a lo largo del tiempo sin y con tratamiento de metales respectivamente. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

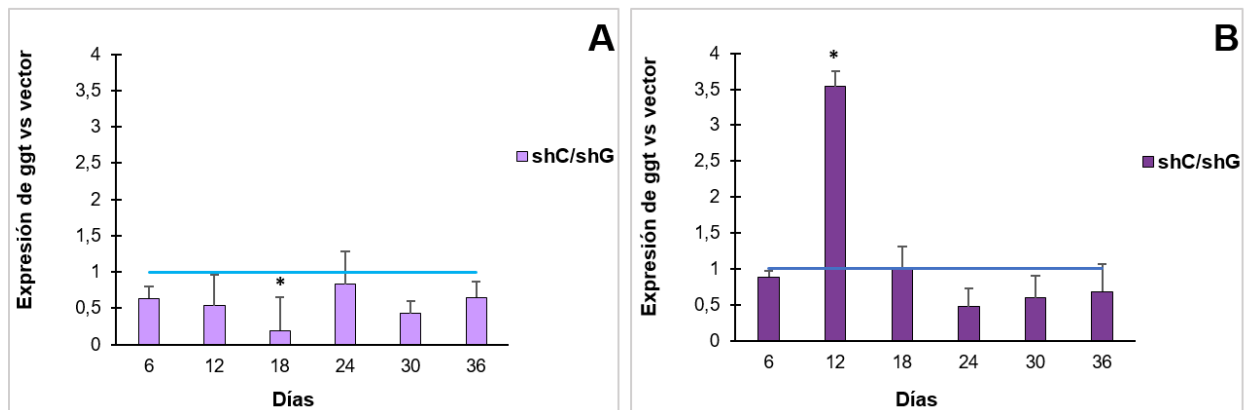


Figura 18. Expresión del RNAm de ggt de las células con la barrera abatida. Muestra los niveles de expresión de ggt normalizados de las células shC/shG con respecto a las células vector. Donde A son las células en condiciones control y B las células con la mezcla de metales. \*  $p < 0.05$ .

## Inhibición de enzimas antioxidantes

Adicionalmente a las células shC/shG se obtuvieron células donde sólo una de las enzimas (catalasa o Gclc) era inhibida, a dichas células se les evaluaron los mismos parámetros que a las células con la barrera antioxidante abatida. Al cuantificar la inhibición en la actividad de catalasa y en la síntesis de GSH, observamos que durante la mayor parte del tiempo según el sh correspondiente, se encuentran disminuidas dichas funciones bajo condiciones control (Figura 19 A y C). Por otro lado, al darles el tratamiento con la mezcla de metales (Figura 19 B y D) observamos que a los 18 días hay una recuperación en la actividad de catalasa (B) en las células shCAT, pero volvió a disminuir posteriormente; por su parte, la concentración de GSH (D) aumenta casi al doble a los 30 días para ambas clonas.

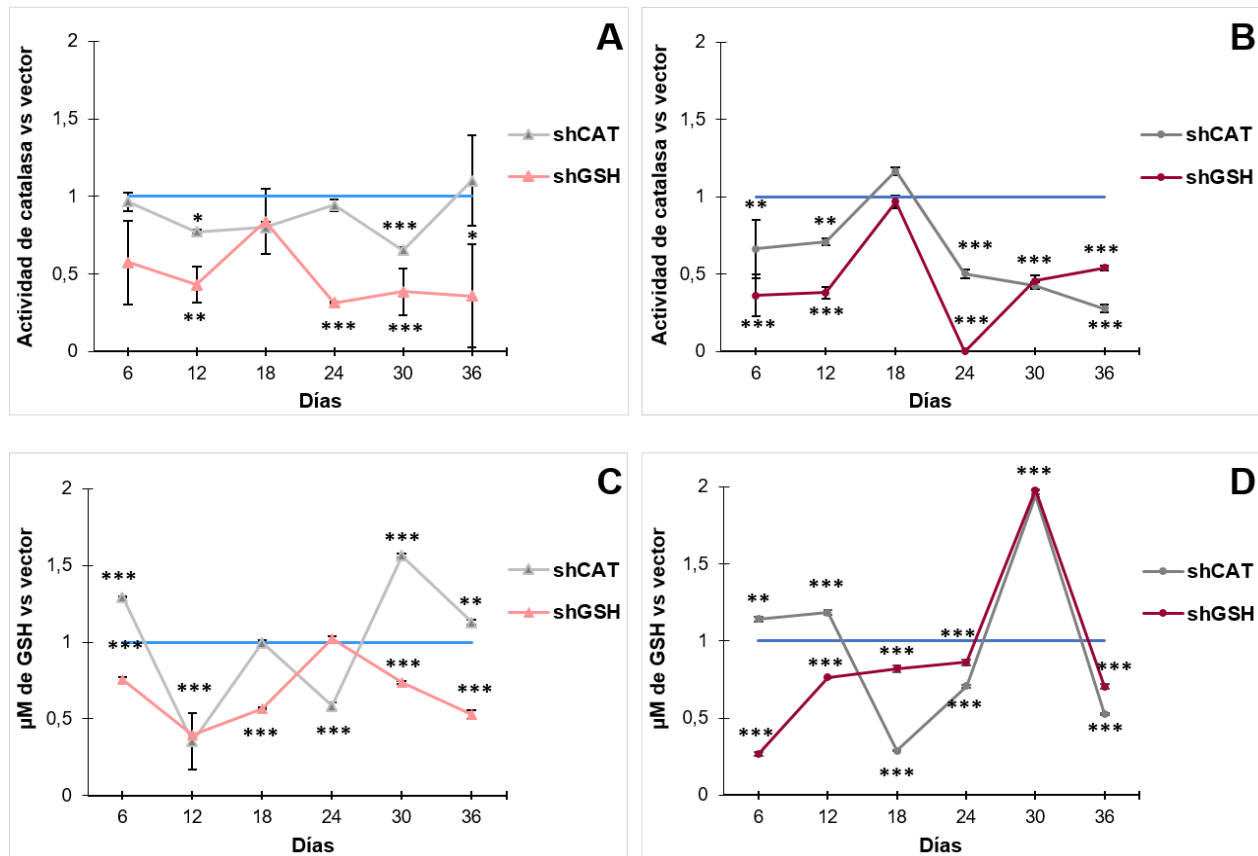


Figura 19. Inhibición de catalasa y Gclc de las células shCAT y shGSH. A y B muestran la inhibición normalizada de la actividad de catalasa de las células transfectadas con respecto a las células vector, sin y con tratamiento de metales respectivamente; mientras que C y D muestran la inhibición normalizada en la síntesis de GSH en las células transfectadas con respecto a las células vector, sin y con tratamiento de metales respectivamente. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



En lo que respecta a viabilidad y al valor de TPG observamos que los valores fueron muy similares con respecto a las células vector en condiciones control (Figura 20 A y C); pero cuando fueron tratadas con la mezcla de metales, la viabilidad de las células shGSH disminuyó únicamente a los 6 y 24 días (Figura 20 B) al igual que lo hicieron las células shC/shG. En lo que respecta a los valores de TPG, este aumentó en las tres condiciones donde los valores para las shGSH son mayores que los del vector (Figura 20 D).

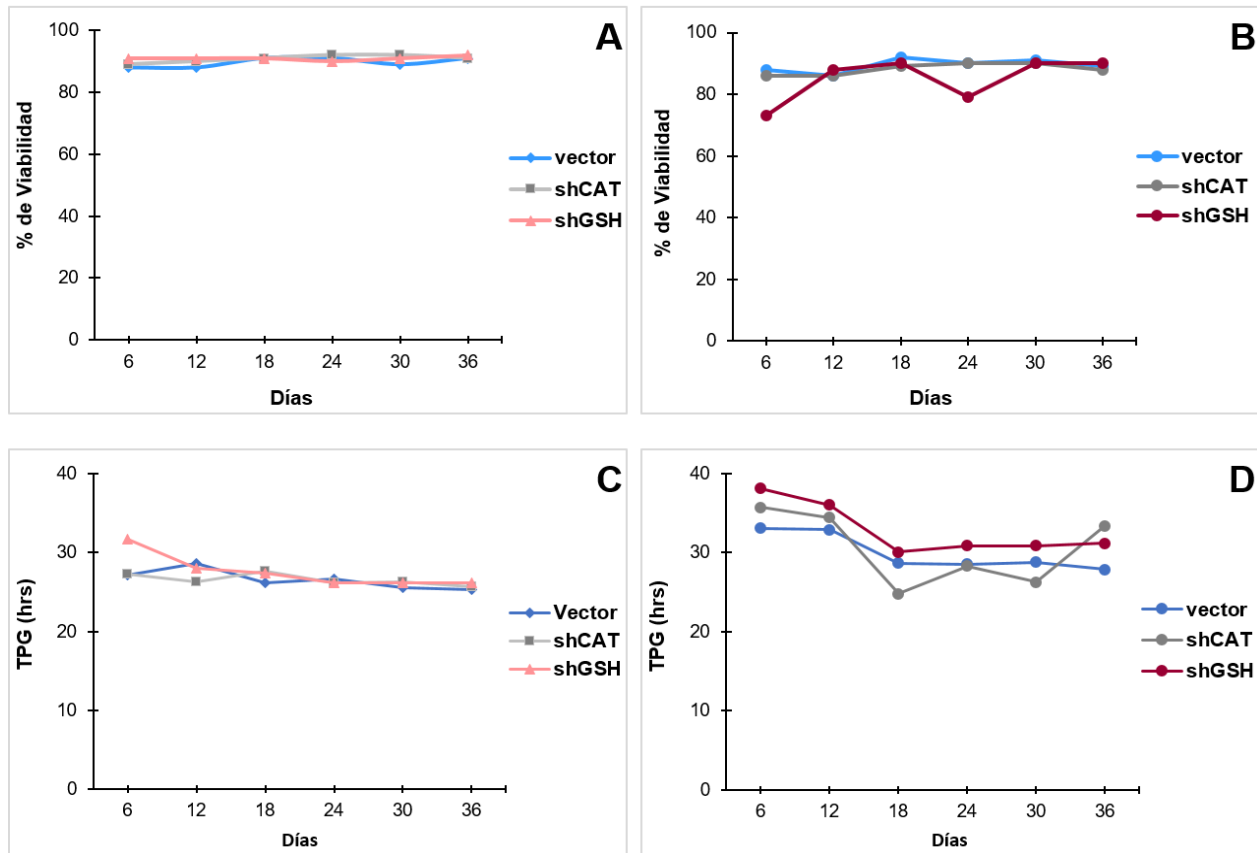


Figura 20. Porcentaje de viabilidad y tiempo de generación de las células con inhibición de enzimas antioxidantes. A y B muestran los datos de viabilidad expresados en porcentaje, a lo largo del tiempo sin y con tratamiento de metales respectivamente. C y D muestran el tiempo de generación de las clonas obtenidas, a lo largo del tiempo sin y con tratamiento de metales respectivamente.

Al cuantificar la generación de EROs (Figura 21 A y B), encontramos que bajo condiciones control (A) no hubo un aumento de éstas; sin embargo, a los 36 días hay un incremento en las células shCAT. Por su parte, cuando dimos el tratamiento con metales (B), únicamente se observa un incremento en las células shGSH a los 12 días.



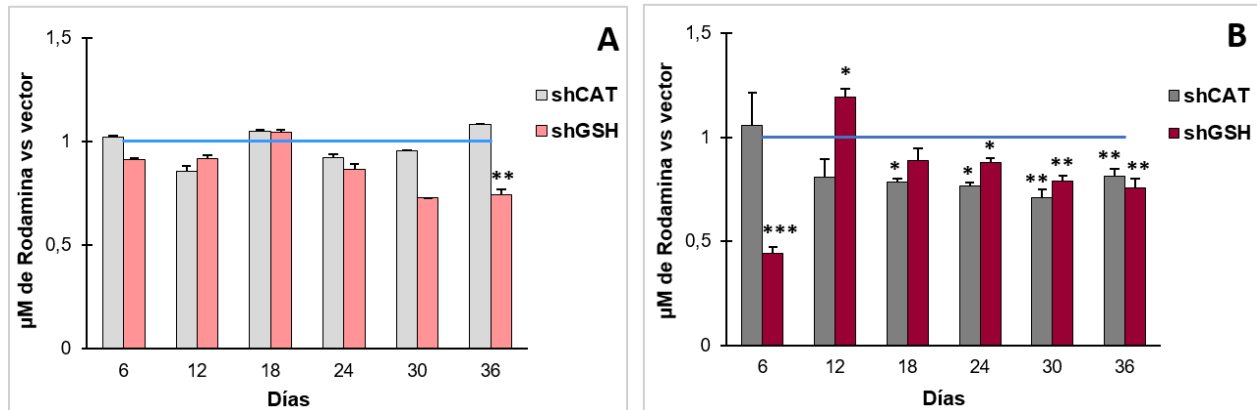


Figura 21. Generación de especies reactivas de oxígeno (EROs). Muestra los valores normalizados obtenidos de EROs cuantificadas por la oxidación de la 123-dihidrorodamina en las células transfectadas shCAT y shGSH respecto a las células vector. Donde A son las células sin tratamiento y B las células con la mezcla de metales. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Por su parte, la morfología de las células shCAT y shGSH (Figura 22) en condiciones control no presenta cambios a lo largo del tiempo, pero cuando se administra la mezcla de metales observamos que a los 18 días los cultivos de shGSH ya presentaban algunas células con una morfología alargada, mientras que a los 36 días en ambas clonas encontramos la presencia de células alargadas que asemejan la morfología de células mesenquimales.

En la figura 23 se muestran los resultados obtenidos para el ensayo de herida, en donde podemos apreciar que las células tratadas con la mezcla de metales migran a las 48 h. Cabe resaltar que las células shGSH tienen la capacidad de migrar más rápido dado que hubo una diferencia significativa con respecto a las células shCAT.

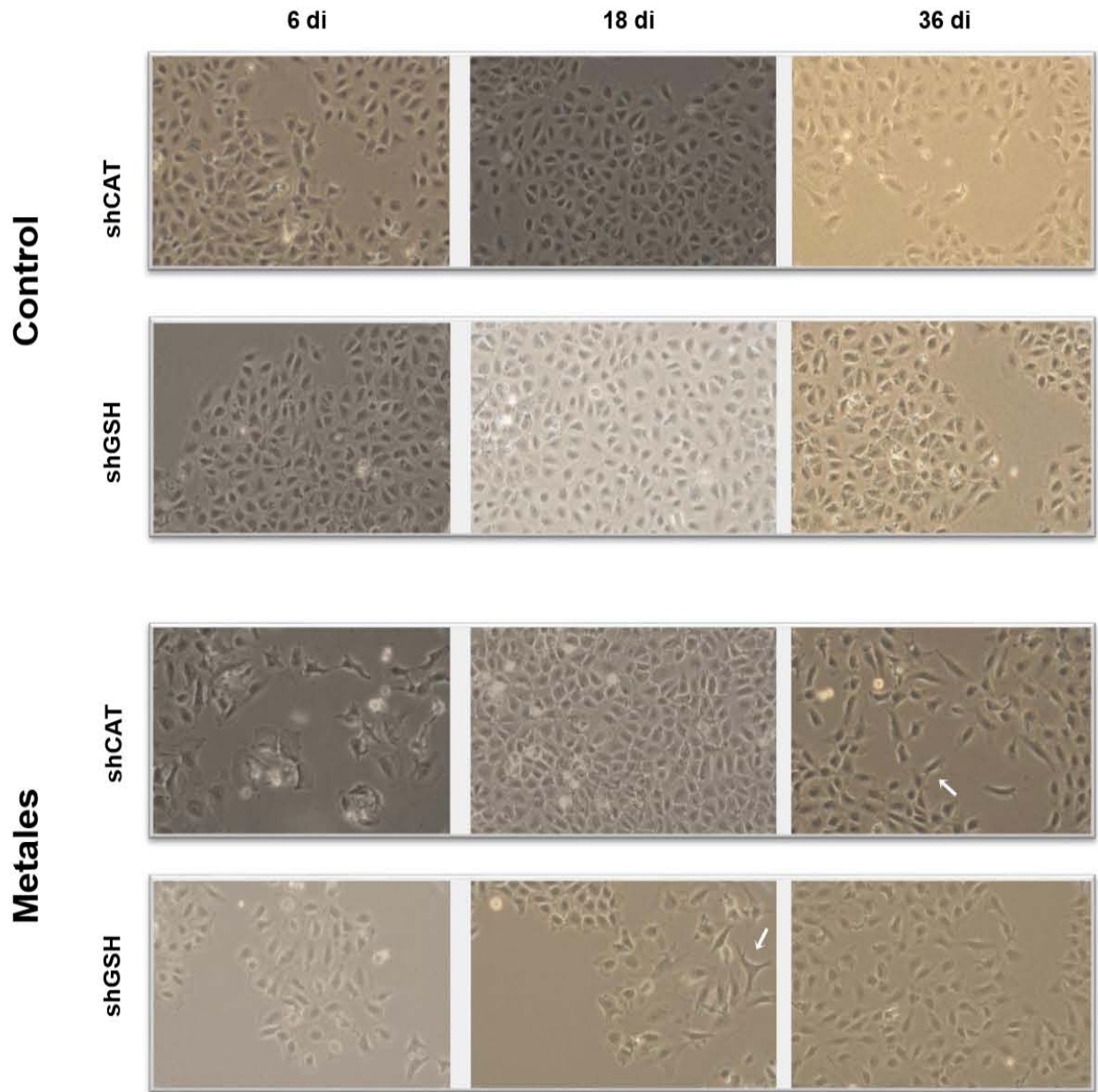


Figura 22. Morfología de las células shCAT y shGSH. Muestra la morfología de ambas clonas a lo largo del tiempo sin y con la mezcla metales a 10x. Las flechas señalan la presencia de células alargadas.

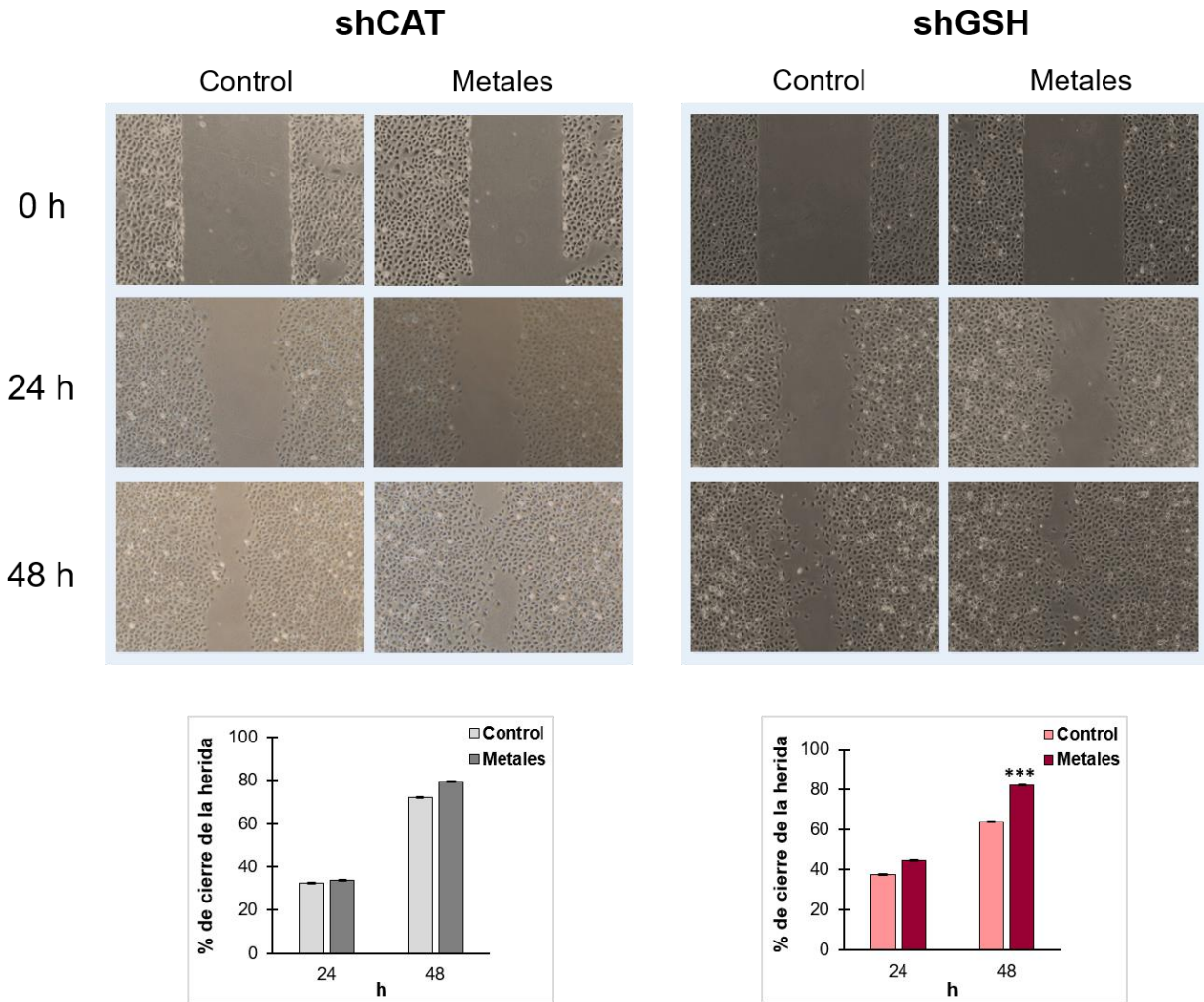


Figura 23. Ensayo de herida para las células shCAT y shGSH. Muestra las células observadas por microscopía de luz a 4X, mientras que en la parte de abajo muestra los resultados de la evaluación del cierre de la herida. \*\*\*  $p < 0.01$ .

Adicionalmente, evaluamos la expresión de marcadores de TEM (cdh1 y acta2). En lo que respecta a cdh1 (Figura 24 A) vimos que bajo condiciones control, las células shCAT durante todo el tiempo presentaron los niveles más altos; por el contrario, las células shGSH presentaron una baja expresión al principio, pero conforme pasa el tiempo ésta va aumentando. Mientras que en condiciones control la expresión de acta2 (Figura 24 C) fue baja, a excepción de las últimas semanas donde hay un aumento para las células shGSH. Una vez que dimos el tratamiento con la mezcla de metales (Figura 24 B y D), observamos que las células shCAT se comportan como esperábamos, disminuyendo sus niveles de cdh1 y aumentando los de acta2, pero no así para las shGSH que presentaron únicamente la disminución en los niveles de cdh1.

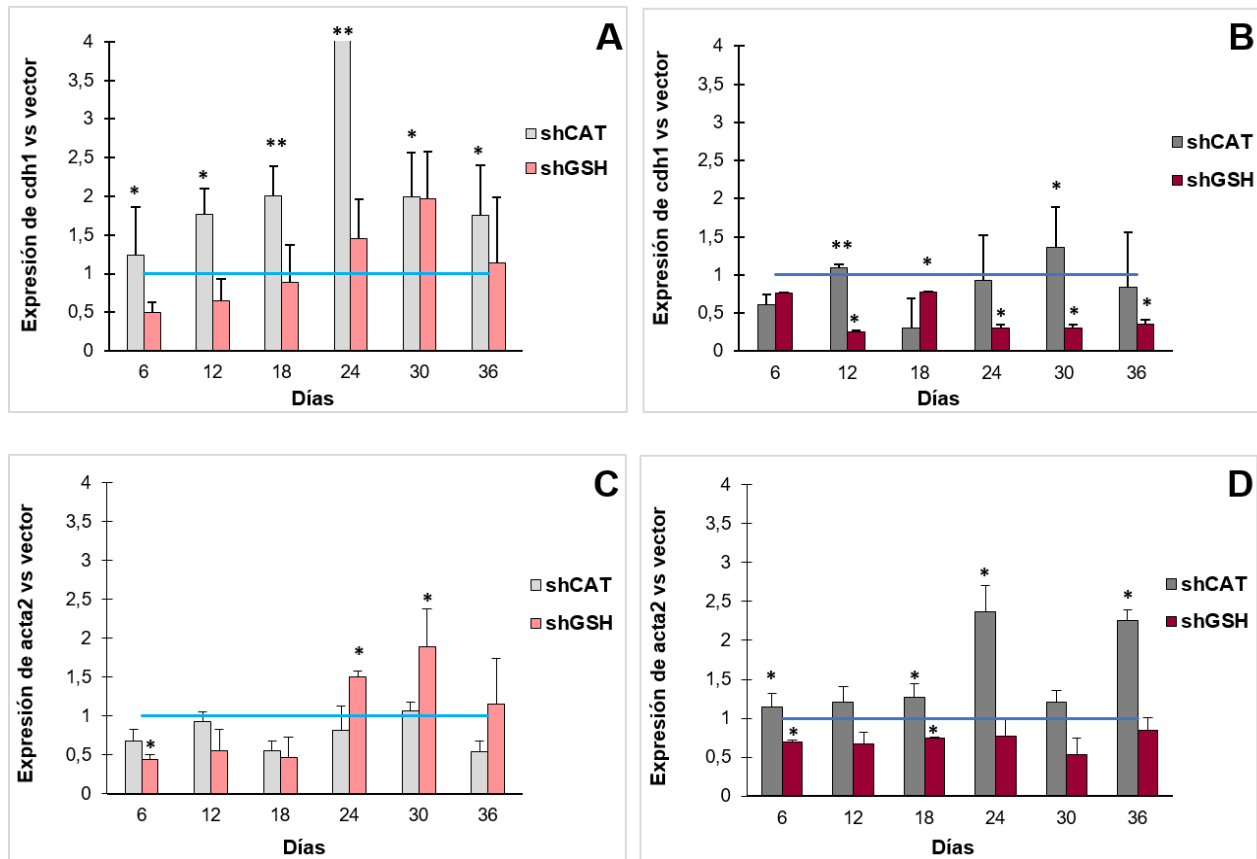


Figura 24. Expresión del RNAm de *cdh1* y *acta2* de las transfectadas sencillas. Donde A y B muestran los valores normalizados obtenidos para *cdh1* de las células shCAT y shGSH con respecto a las células vector, a lo largo del tiempo sin y con tratamiento de metales respectivamente. Mientras que C y D muestran los valores normalizados de *acta2* de las células shCAT y shGSH con respecto a las células vector, a lo largo del tiempo sin y con tratamiento de metales respectivamente. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Finalmente, en lo que respecta a los niveles de expresión *ggt* para las células shCAT y shGSH los resultados se muestran en la figura 25. Observamos que bajo condiciones control (A), los niveles para las células shCAT estuvieron bajos durante todo el tiempo, pero las shGSH presentaron principalmente un incremento a los 30 días. Por otro lado, al dar tratamiento con la mezcla de metales (B) observamos que la expresión en las células shGSH fue baja durante todo el tratamiento y no así para las shCAT, las cuales al igual que las células con la barrera abatida presentan un aumento a los 12 días.

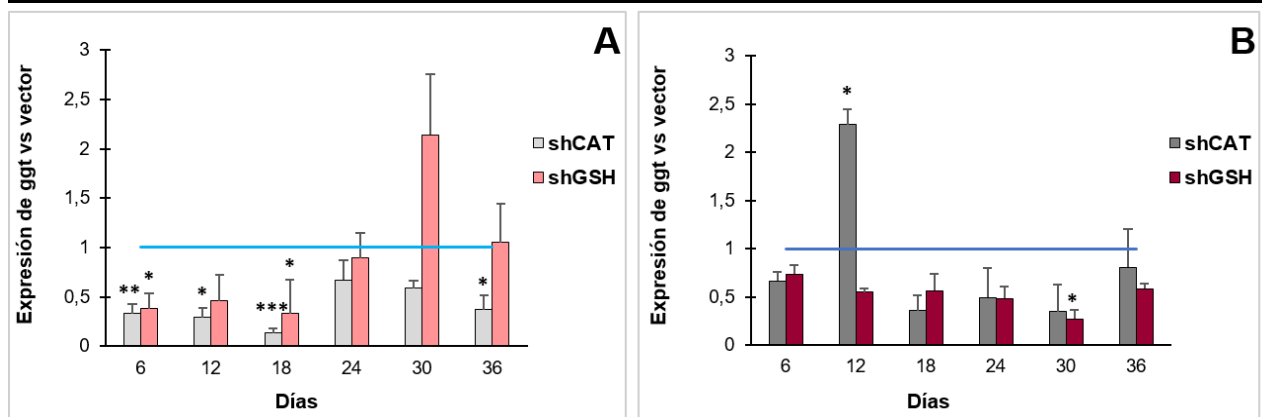


Figura 25. Expresión del RNAm de ggt de las células shCAT y shGSH. Se muestran los valores normalizados para ggt de las células shCAT y shGSH con respecto a las células vector. Donde A son condiciones control y B con la mezcla de metales. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

---

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De forma general nos encontramos expuestos a una gran variedad de agentes que pueden afectar nuestra salud, algunos de los cuales pueden generar cambios que conlleven a la transformación celular. Por fortuna la célula posee diferentes mecanismos para contrarrestar el daño causado por dichos agentes, como la barrera antioxidante. Muchos datos en la literatura sugieren que el balance entre la generación de especies reactivas y la defensa antioxidante juega un papel fundamental en el destino que tienen las células ante una exposición a xenobióticos<sup>3,5,14</sup>. Los metales son xenobióticos considerados como contaminantes con una gran capacidad para producir alteraciones en la homeostasis celular principalmente por la generación de especies reactivas<sup>3,36</sup>. Sin embargo, solo en los últimos años se han empezado a estudiar los efectos que presentan las mezclas de estos compuestos a bajas dosis y de forma crónica<sup>36</sup>.

Experimentos en nuestro laboratorio han demostrado que las células WRL-68, derivadas de células embrionarias de hígado humano, al ser tratadas con la mezcla de metales As, Cd y Pb presentan transformación morfológica, sólo si dos de los componentes principales de la barrera antioxidante, como el GSH y la catalasa, se inhiben de manera simultánea<sup>44</sup>.

Sin embargo, en dicho estudio la barrera antioxidante se inhibió farmacológicamente. Esta estrategia tiene como desventaja que la inhibición no es específica y puede tener interacciones con otros sistemas. Resulta importante generar un modelo que nos permita estudiar de manera más clara la participación que tiene la barrera antioxidante durante el proceso de transformación celular. Con eso en mente, se decidió crear un modelo que nos permitiera obtener células estables que tuvieran disminuida la síntesis de moléculas que formaran parte importante de la barrera antioxidante, empleando una horquilla pequeña de RNA (shRNA) que favorece la degradación del RNAm de interés.

Por lo anterior se decidió utilizar la línea celular C9, derivada de células de hígado de rata. Se sabe que estas células bajo condiciones normales de cultivo de hasta seis meses no generan tumores<sup>51</sup>. Por tal motivo, las sometimos a un reto oxidante mediante la exposición a la mezcla de metales de As-Cd-Pb, ya que como se mencionó anteriormente, se ha evaluado previamente en nuestro laboratorio<sup>42,43</sup>. Las células C9 tras ser expuestas por más de un mes a esta mezcla de metales no presentaron cambios en los parámetros estudiados, lo que sugiere que el reto con la mezcla de metales no es suficiente para favorecer su transformación (datos no mostrados).

---

Una vez que determinamos que las células C9 no se transformaban tras ser expuestas a la mezcla de metales, se prosiguió a realizar el silenciamiento de enzimas que participan en la barrera antioxidante (en este caso catalasa y Gclc) obteniendo células estables; tras lo cual se procedió a evaluar si la disminución en catalasa y Gclc tenía algún efecto sobre la célula, principalmente si dicha disminución favorecía su transformación.

Las células transfectadas que tienen ambas enzimas disminuidas presentaron un ligero aumento en su tiempo de generación en los primeros días, posteriormente las células presentaron tiempos de generación muy semejantes a las células vector, así como algunos cambios morfológicos a partir de los 36 días de cultivo. No obstante, la disminución de estas moléculas no modificó los valores de viabilidad, los cuales fueron muy cercanos a los obtenidos en las células vector. Estos resultados son similares a los reportados en estudios previos donde se observó que bajo condiciones control (sin exposición a algún tipo de reto) ratones *Cat<sup>+/−</sup>* y *Cat<sup>−/−</sup>* tienen un desarrollo normal y morfológicamente no presentan cambios drásticos<sup>52</sup>; de manera similar se observó que en células GCS-2 (deficientes en  $\gamma$ GCS) con bajos niveles de GSH no se afectaba su crecimiento<sup>53</sup>.

Posteriormente al tratar las células shC/shG con la mezcla de metales de forma crónica observamos una disminución importante en la viabilidad celular, estos resultados correlacionan con lo encontrado en el estudio de Liu et al., 2015<sup>54</sup>, en el cual se observó una disminución drástica de la viabilidad en una línea celular de adenocarcinoma humano tratada con nano partículas de un metal después de disminuir la expresión del RNAm de Gclc. Es importante mencionar que las células transfectadas solamente con el sh para Gclc muestran también una disminución de la viabilidad. Esto nos podría indicar que bajo estas condiciones de inhibición la exposición a la mezcla de metales tiene un efecto que podría estar vinculado a la disminución en sus reservas internas de GSH, lo que favorece la activación de vías de muerte celular<sup>53</sup>, dando lugar a una posible selección clonal.

Al exponer las células con la barrera antioxidante abatida a la mezcla de metales, encontramos una importante disminución del 50% en su capacidad proliferativa en la primera semana del tratamiento; sin embargo, después de 30 días de tratamiento su capacidad proliferativa regresó a valores muy parecidos a los que presentan las células vector. Esto demuestra que tanto la catalasa como el GSH además de sus funciones bien conocidas como antioxidantes, también tienen un papel importante durante la proliferación, como se ha sugerido en otros estudios. Por ejemplo, Zhao, et al., 2013<sup>55</sup>, al obtener células deficientes para catalasa de un insecto (*S. litura*), encontraron que las células se arrestaban y había un incremento en la

---

apoptosis; o como en el caso de los hongos, donde la catalasa tiene un papel importante durante el crecimiento, específicamente en la diferenciación celular y la germinación de las esporas<sup>56</sup>. Esto sugiere que dicha enzima puede tener más funciones y su participación resulta importante para el desarrollo en diferentes especies. Así mismo, se sabe que el GSH está involucrado no solo en la defensa antioxidante, sino que también está implicado en una gran variedad de funciones en mamíferos que tienen que ver con el metabolismo, transducción de señales, expresión de genes, proliferación celular y apoptosis, entre otras<sup>57</sup>.

Este resultado podría deberse a dos posibles escenarios, al estar ambos parámetros disminuidos, la célula se compromete en mayor grado tomándole más tiempo para poder adaptarse a su ambiente y por ende tener afectaciones en algunas de las señales involucradas en la proliferación celular particularmente aquellas que sean susceptibles a cambios redox y que después de 30 días de tratamiento se hayan adaptado, o bien un segundo escenario en donde la exposición a los metales sea una presión de selección muy fuerte y después de 30 días de tratamiento las células presentes en el cultivo, sean el resultado de una selección clonal. En este sentido, la disminución en la viabilidad celular observada en el cultivo a través del tiempo de tratamiento apoyaría más al escenario de la selección clonal.

Considerando lo anterior y dado que la disminución de la barrera antioxidante modifica la concentración de EROs, nosotros evaluamos la generación de éstas en las células. Observando que bajo condiciones control las células no presentaron una mayor producción con respecto a las células vector, pero al ser tratadas con la mezcla de metales hubo un incremento durante la mayor parte del tiempo, siendo el día 12 cuando se presentó el pico más alto con respecto a las células vector.

El proceso carcinogénico es dependiente de diversos factores entre los que destaca la participación del estrés oxidativo<sup>34</sup>. Este juega un papel importante durante la transformación celular. Se han utilizado diferentes marcadores para determinar la transformación celular, por ejemplo: cambios en la capacidad de migración, la transición epitelio mesénquima, cambios en la expresión de genes y crecimiento desordenado que forma cúmulos de células. Dado que las células C9, utilizadas para generar las células estables, al ser de tipo epitelial no forman cúmulos de células (focis), esto dificulta evaluar de manera certera y rápida si hay transformación celular. Por lo tanto, nosotros evaluamos otros parámetros como su capacidad de migración, así como cambios en la expresión de genes involucrados en la transición epitelio mesénquima como *cdh1* y *acta2*, así como el aumento en la expresión de *ggt*, el cual se



---

considera como un marcador de transformación hepática, todos estos parámetros son considerados marcadores de transformación<sup>16,58,59,26,30</sup>.

Existen varias técnicas que permiten evaluar la capacidad de migración de las células. Entre ellas se encuentra el ensayo de herida que por medio de una evaluación rápida y sencilla nos permite apreciar dicha capacidad<sup>58</sup>. Al evaluar la capacidad de migración en las células shC/shG, observamos que el comportamiento de éstas era muy similar al de las células vector en condiciones control; por el contrario, al tratar estas células con la mezcla de metales encontramos que había una disminución en el tamaño de la herida y que ésta no se cerraba de forma regular. Este desplazamiento se observa desde las 24 h, junto con la presencia de células alargadas. Así mismo, al evaluar las células transfectadas con solamente uno de los sh, notamos que aquéllas que presentaron una mayor disminución en el tamaño de la herida contenían el sh para Gclc. De modo que la disminución en los niveles de GSH podría estar favoreciendo la capacidad de migración de las células.

La TEM es reconocida como paso importante durante la transformación celular, la cual está acompañada de numerosos cambios celulares que le permiten a las células obtener un fenotipo mesenquimal. Por ejemplo, puede estar acompañada por la pérdida de marcadores epiteliales como la E-cadherina (Cdh1) y la inducción de marcadores mesenquimales como Acta2<sup>60</sup>. La disminución en la expresión de Cdh1 es el marcador por excelencia de la TEM, dado que favorece la pérdida de las uniones adherentes, causando así la pérdida de la morfología poligonal y permitiendo con ello la movilidad de las células<sup>61</sup>. Mientras que la presencia de Acta2 se ha reportado como uno de los marcadores de células mesenquimales<sup>26</sup>.

Particularmente en nuestro caso, al evaluar los niveles de ambos RNA mensajeros, observamos que nuestras células con la barrera antioxidante abatida presentaban de manera general bajos niveles de cdh1 tanto con y sin tratamiento, lo que sugiere que estas células se encuentran en un estado metaestable que predispone a la transformación. Sin embargo, este estado no es suficiente estímulo, que conlleve a la transformación *per se*, dado que bajo condiciones control presentan de manera general una morfología normal, así como bajos niveles de expresión de acta2. En cambio, cuando damos el tratamiento con la mezcla de metales su expresión aumenta a partir de los 12 días. Por consiguiente, para observar cambios considerables en la morfología de las células es necesario que haya no solo una disminución en marcadores epiteliales sino también un aumento en los marcadores mesenquimales.

---

Los cambios en la expresión génica tanto de *cdh1* como de *acta2*, correlacionan con los cambios morfológicos que presentaron las células ya que, al tratar nuestras células de interés con la mezcla de metales de forma crónica, encontramos a partir de los 18 días de tratamiento la presencia de células cuya morfología asemeja células mesenquimales; lo que sugiere un compromiso de éstas hacia la transformación celular y que los metales solo favorecen ese cambio.

Si tomamos en cuenta los resultados obtenidos tanto de migración, expresión génica y morfología, podemos observar la gran correlación que hay entre ellas. Con base en lo observado, podemos decir que el desplazamiento que mostraron las células es consistente con el esperado para el tipo de células epiteliales, las cuales presentan una migración de tipo mesenquimal. Estos resultados sugieren que la TEM es un requisito para que el desplazamiento de las células pueda darse. Adicionalmente, datos en la bibliografía reportan que la presencia de GSH o el precursor de este (NAC) previenen la generación de EROs inhibiendo así la TEM en las células<sup>62</sup>, lo que concuerda con nuestros resultados.

Estudios anteriores demuestran que GGT es un marcador de transformación específico para células de origen hepático<sup>30</sup>. Al evaluar este marcador en nuestras células con la barrera antioxidante abatida, observamos que a lo largo de la condición control presentan una baja expresión con respecto a las células vector, pero al dar el tratamiento con metales hay aumento en la expresión del RNA mensajero. De igual forma, las células shCAT presentaron un aumento en la expresión de *ggt* al ser tratadas con la mezcla, mientras que las células shGSH mantuvieron niveles bajos de expresión. Estos resultados sugieren que la disminución en los niveles de cisteína está involucrada en la expresión de GGT, puesto que esta enzima se encarga de aumentar los niveles de cisteína dentro de la célula<sup>63</sup>.

Sin embargo, aun cuando GGT se encuentra aumentada en diferentes tipos de tumores, existen varios trabajos en los que no se ha encontrado una correlación entre su expresión y la presencia de un proceso tumorigénico. Así mismo, se ha encontrado que algunas líneas celulares tras ser sometidas a un proceso de transformación, no muestran aumentos en GGT<sup>30</sup>. Por lo que resulta importante seguir estudiando su participación durante el proceso de transformación, dado que la variabilidad en su expresión puede que esté correlacionada con otros factores externos, como el medio ambiente<sup>28</sup>.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que la disminución en la síntesis de catalasa y GSH tiene un efecto muy particular en cada uno de los parámetros evaluados,

---

considerando que ambos son elementos que juegan un papel muy importante en la barrera antioxidante y adicionalmente cuentan con otras funciones que repercuten en otros procesos celulares. Por ejemplo, la disminución en la síntesis de GSH puede aumentar el tiempo de proliferación de las células, favorecer la presencia de células tipo mesenquimales (alargadas), así como la capacidad de migración de las células. Por otro lado, la disminución en la síntesis de catalasa puede favorecer aumentos en la expresión de *acta2* y puede estar relacionada con la expresión de *ggt*. De ahí que, al tener ambos parámetros disminuidos, las células shC/shG sean las que presenten el mayor número de cambios, y por consiguiente sean las que tengan un mayor compromiso hacia la transformación celular.

Finalmente, nuestros datos corroboran los datos obtenidos anteriormente por nuestro grupo<sup>44</sup> y permiten tener una mejor idea del papel que juega la barrera antioxidante durante el proceso de transformación mediado por la mezcla de metales. Aunque aún se requieren más estudios que ayuden a complementar la información aquí generada, una aportación relevante de este trabajo fue la generación de un modelo celular para entender las diferentes vías de señalización involucradas en la transformación celular.

---

## CONCLUSIONES

- Se logró obtener un modelo celular estable que tuviera disminuida la síntesis de catalasa y glutatión, para el estudio del efecto de la disminución en la barrera antioxidante.
- En el modelo con la barrera antioxidante abatida, se observaron cambios en la capacidad de migración de las células, la presencia de células con una morfología tipo mesenquimal que correlacionan con los cambios en la expresión de cdh1 y acta2. Lo que indica que bajo estas condiciones, las células C9 se encuentran comprometidas hacia la transformación celular.
- Corroboramos el importante papel que tiene la barrera antioxidante en respuesta a xenobióticos, especialmente a la mezcla de metales.

## PERSPECTIVAS

- Determinar la concentración intracelular de los metales.
- Evaluar la expresión y actividad de otras enzimas antioxidantes, como la SOD1, GPx, glutatión reductasa, peroxiredoxinas, entre otras. Esto para ver si las adaptaciones que sufren las células se deben a modificaciones en la expresión y/o actividad de estas enzimas que podrían compensar la disminución en catalasa y GSH.
- Evaluar daño al DNA por medio de un ensayo de electroforesis en gel de células individuales.
- Realizar un análisis proteico de catalasa, GCLc, GGT, con la finalidad de ver si hay correspondencia entre la expresión génica y proteica.
- Estudiar profundamente la TEM, mediante el estudio de marcadores de citoesqueleto, así como el metaboloma del proceso.
- Inocular las células shC/shG tras el tratamiento a ratones desnudos, para determinar si estas células son capaces de generar tumores.

---

## REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. (2014). Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2014. [Documento electrónico]. URL <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/es/> [accedido en 2017].
2. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, MTD., M., Mazur, M., Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007. 39, 44-84.
3. Briden, E., Murat, U., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012. 5, 9-19.
4. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006. 160, 1-40.
5. Kaushik, S., Kaur, J. Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. *Clin Chim Acta.* 2003. 333, 69-77.
6. Che, M., Wang, R., Li, X., Wang, H., Steven Zheng, X.F. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov Today.* 2016. 21, 143-149.
7. Miller, A. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.* 2012. 586, 585-595.
8. Nishikawa, M., Hashida, M., Takakura, Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009. 61, 319-326.
9. Jaeschke, H. Antioxidant defense mechanisms. *Comprehensive Toxicology.* 2a ed. 2010. 9, 319-337.
10. Forman, H., Zhang, H., Rinna, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2009. 30, 1-12.
11. Lu, S. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013. 1830, 3143-3153.
12. Lu, S. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009. 30, 42-59.
13. Dickinson, A., Forman, H. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol.* 2002. 64, 1019-1026.
14. Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C., Kuča, K., Musílek, K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol.* 2016. 90, 1-37.
15. Sakai, A. Balb/c3T3 cell transformation assays for the assessment of chemical carcinogenicity. *AATEX (Special issue)* 2008. 367-373.

- 
16. Dubrez, L., Rajalingam, K. IAPs and cell migration. *Semin Cell Dev Biol.* 2015. 39, 124-131.
  17. Ortega-Carrion, A., Feo-Lucas, L., Manzanares, M.V. Cell Migration. Reference Module in Biomedical Sciences. 2016. 720-730.
  18. Li, L., Li, W. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: Comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacol Ther.* 2015. 150, 33–46.
  19. Gheldof, A.; Berx, G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013. 116, 317-336.
  20. Diepenbruck, M., Christofori, G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? *Curr Opin Cell Biol.* 2016. 43, 7 -13.
  21. Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014. 15, 178-196.
  22. Paredes, J., Figueiredo, J., Albergaria, A., Oliveira, P., Carvalho, J., Ribeiro, AS., Caldeira, J., Costa, AM., Simões-Correia, J., Oliveira, MJ., Pinheiro, H., Pinho, SS.; Mateus, R., Reis, CA., Leite, M., Fernandes, MS., Schmitt, F., Carneiro, F., Figueiredo, C., Oliveira, C., Seruca, R. Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2012. 1826, 297-311.
  23. Chaw, SY., Abdul Majeed, A., Dalley, AJ., Chan, A., Stein, S., Farah, CS. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers – E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin – in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncol.* 2012. 48, 997–1006.
  24. Gonzalez-Sanchez, E., Vaquero, J., Fouassier, L., Chignard, N. E-Cadherin, guardian of liver physiology. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2015. 39, 3-6.
  25. Rockey, D., Weymouth, N., Shi, Z. Smooth Muscle  $\alpha$  Actin (*Acta2*) and Myofibroblast function during hepatic wound healing. *PLoS One.* 2013. 8, e77166.
  26. Jeon, M., You, D., Bae, SY., Kim, SW., Nam, SJ., Kim, HH., Kim, S., Lee, JE. Dimerization of EGFR and HER2 induces breast cancer cell motility through STAT1-dependent ACTA2 induction. *Oncotarget.* 2016. 10.
  27. Verrill, C., Cerundolo, L., Mckee, C., White, C., Kartsonaki, C., Fryer, E., Morris, E., Brewster, S., Ratnayaka, I., Marsden, L., Lilja, H., Muschel, R., Lu, X., Hamdy, F., Bryant, RJ. Altered expression of epithelial-to-mesenchymal transition proteins in extraprostatic prostate cancer. *Oncotarget.* 2016. 7, 1107-1119.
-

- 
28. Corti, A., Franzini, M., Paolicchi, A., Pompella, A. Gamma-glutamyltransferase of Cancer Cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting. *Anticancer Res.* 2010. 30, 1169-1182.
  29. Pompella, A., De Tata, V., Paolicchi, A., Zunino, F. Expression of  $\gamma$ -glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem Pharmacol.* 2006. 71, 231–238.
  30. Manson, MM., Green, JA. Effect of microsomally activated AFB<sub>1</sub> on GGT activity in 3 rat liver cell lines. *Br. J. Cancer.* 1982. 45, 945–952.
  31. Duker, A., Carranza, E., Hale, M. Arsenic geochemistry and health. *Environ Int.* 2005. 31, 631-641.
  32. Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A., Munters, E., Artois, T., Nawrot, T., Vangrosveld, J., Smeets, K. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals.* 2010. 23, 927-940.
  33. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology.* 2003. 192, 95-117.
  34. Jomova, K., Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011. 283, 65-87.
  35. Beyersmann, D., Hartwig, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol.* 2008. 82, 493-512.
  36. Wang, G., Fowler, B. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008. 233, 92-99.
  37. Gibson, S., Widmann, C., Johnson, GL. 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.* 1999. 274, 10916-10922.
  38. Schaeffer, HJ., Weber, MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* 1999. 19, 2435-2444.
  39. Kossowska, B., Dubka, I., Gancarz, R., 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.* 2013. 216, 1-7.
  40. Poręba, R., Gać, P., Poreba, M., Antonowicz-Juchniewicz, J., Andrzejak, R. Relation between occupational exposure to lead, cadmium, arsenic and concentration of cystatin C. *Toxicology.* 2011. 283, 88–95.
  41. ATSDR. Interaction profile for: Arsenic, Cadmium, Chromium, and Lead. 2004.
-

- 
42. Silva-Aguilar, M., Rojas, E., Valverde, M. Role of oxidative stress in transformation induced by metal mixture. *Oxid Med Cell Longev.* 2011. 935160.
  43. Rodríguez-Sastre, M.A., Rojas, E., Valverde, M. Assessing the impact of As-Cd-Pb metal mixture on cell transformation by two-stage Balb/c 3T3 cell assay. *Mutagenesis.* 2014. 29, 251-257.
  44. Sánchez-Valle, V., Valverde, M., Carrizales, L., Mejía, J., Zepeta, N., Rojas, E. A metal mixture induces transformation upon antioxidant depletion in a hepatic cell line. *Ann Hepatol.* 2013. 12, 315-324.
  45. Dittami, G.M., Sethi, M., Rabbitt, R.D., Ayliffe, H.E. Determination of mammalian cell counts, cell size and cell health using the Moxi Z mini automated cell counter. *J Vis Exp.* 2012. 64, e3842.
  46. Lee, V.M., Quinn, P.A., Jennings, S.C., Leong, L Ng. NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblasts used as models. *Hypertension.* 2003. 41, 925-931.
  47. Oyama, Y., Hayashi, A., Ueha, T., Maekawa, K. Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. *Brain Res.* 1994. 635, 113-117
  48. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984. 105, 121-126.
  49. Browne, R.W., Armstrong, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. In *Free radical and antioxidant protocols.* (Armstrong D., ed.) Humana Press, Totowa, NJ. 1998. vol 108. 347-352.
  50. Liang, C.C., Park, A.Y., Guan, J.L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro.* *Nat Protoc.* 2007. 2, 329-333.
  51. Weinstein, I.B.; Orenstein, J.M.; Gebert, R.; Kaighn, M.E.; Stadler, U.C. Growth and structural properties of epithelial cell cultures established from normal rat liver and chemically induced hepatomas. *Cancer Res.* 1975. 31, 253-263.
  52. Ho, Y.-S.; Xiong, W.Ma; Spector, A.; Ho, D.S. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to other oxidant tissue injury, *J Biol Chem.* 2004. 279, 32804-32814
  53. Valverde, M.; Rojas, E.; Kala, S.V.; Kala, G.; Lieberman, M. Survival and cell death in cells constitutively unable to synthesize glutathione. *Mutat Res.* 2006. 594, 172-180
  54. Liu, M.; Zhao, Y.; Zhang, X. Knockdown of glutamate cysteine ligase catalytic subunit by siRNA causes the gold nanoparticles-induced cytotoxicity in lung cancer cells. *PLoS One.* 2015. 10, e0118870.
-



- 
55. Zhao, H.; Yi, X.; Hu, Z.; Hu, M.; Chen, S.; Muhammad, R.D.; Dong, X.; Gong, L. RNAi-Mediated Knockdown of catalase causes cell cycle arrest in SL-1 cells and results in low survival rate of *Spodoptera litura* (Fabricius). *PLoS One*. 2013. 8, e59527.
  56. Hansberg, W.; Salas-Lizana, R.; Domínguez, L. Fungal catalases: Function, phylogenetic origin and structure. *Arch Biochem Biophys*. 2012. 525, 170-180
  57. Wu, G.; Fang, Y-Z.; Yang, S.; Lupton, J.R.; Turner, N.D. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004. 134, 489-492.
  58. Kramer, N.; Walzl, A.; Unger, C.; Rosner, M.; Krupitza, G.; Hengstschläger, M.; Dolznig, H. *In vitro* cell migration and invasion assays. 2013. 752, 10-24
  59. Fiaschi, T.; Chiarugi, P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: A diabolic liaison. *Int J Cell Biol*. 2012. 2012, 762825.
  60. Felton, V.M.; Borok, Z.; Willis, B.C. *N*-acetylcysteine inhibits alveolar epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009. 297, L805-L812.
  61. Tothhawng, L.; Deng, S.; Pervaiz, S.; Yap, C.T. Redox regulation of cancer cell migration and invasion. *Mitochondrion*. 2013. 13, 246-253
  62. Guarino, M.; Rubino, B.; Ballabio, G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*. 2007. 39, 305-318.
  63. Hanigan, M.H. Gamma-glutamyl transpeptidase: redox regulation and drug resistance. *Adv Cancer Res*. 2014. 122, 103-141.

