



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DEL ARSÉNICO EN LA FUNCIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN
GATA3 EN CÉLULAS DEL EPITELIO MAMARIO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

CRISTIAN ALBERTO VERGARA GERÓNIMO

TUTOR PRINCIPAL

DRA ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ

[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO

[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES

[Instituto de Medicina Genómica, SSA](#)

Ciudad de México. noviembre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

VERGARA GERÓNIMO CRISTIAN ALBERTO
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria **de agosto de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctor en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Efecto de la exposición a arsénico en la función del factor de transcripción GATA3 en células luminales del epitelio mamario**", dirigida por el/la Dr(a). **SALAZAR MARTÍNEZ ANA MARÍA**.

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

ROJAS DEL CASTILLO EMILIO	PMDCBQ	PRESIDENTE
CAMACHO ARROYO IGNACIO	PMDCBQ	SECRETARIO
ARRIAGA CANON CRISTIAN GABRIEL OLIVERIO	PMDCBQ	VOCAL
GARCÍA LÓPEZ PATRICIA	PMDCBQ	VOCAL
OSORIO YÁÑEZ CITLALLI	PMDCBQ	VOCAL

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de agosto de 2023



Coordinadora
Dra. Claudia Lydía Treviño Santa Cruz

Reconocimientos

Este trabajo se realizó bajo la asesoría de la Dra. Ana María Salazar Martínez en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), en el marco del Doctorado en Ciencias Bioquímicas (UNAM).

El jurado que evaluó esta tesis estuvo conformado por los investigadores:

- Dr. Rojas Del Castillo Emilio
- Dr. Camacho Arroyo Ignacio
- Dr. Arriaga Canon Cristian Gabriel Oliverio
- Dra. García López Patricia
- Dra. Osorio Yáñez Citlalli

El apoyo financiero para la realización de este trabajo fue otorgado por:

- CONACyT: Beca otorgada por estudios de doctorado
- PAPIIT-UNAM (Proyecto IN211619)
- Programa Institucional de Cáncer de Mama del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM)
- Programa Institucional Salud y Ambiente del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM)

Agradecemos el apoyo técnico a Lourdes Monserrat Sordo Cedeño, así como a los técnicos académicos Salvador Ramírez Jiménez (Banco de Células de Cáncer de Mama), Miguel Tapia Rodríguez (Unidad de Microscopía), Jaime David Rico Malfavón (Unidad de Cómputo) y Omar Rangel Rivera (Unidad de Cómputo).

Índice

Abreviaturas.....	6
Resumen.....	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
<i>Complejidad estructural de la glándula mamaria.....</i>	<i>10</i>
<i>El carcinoma mamario es una enfermedad heterogénea.....</i>	<i>10</i>
<i>Las líneas celulares son un modelo del cáncer de mama.....</i>	<i>12</i>
<i>Factores que contribuyen al desarrollo del cáncer de mama.....</i>	<i>13</i>
<i>Mecanismos de la carcinogénesis por el arsénico.....</i>	<i>15</i>
<i>GATA3 es una proteína relacionada con el desarrollo del cáncer de mama..</i>	<i>16</i>
Justificación.....	20
Pregunta de investigación.....	20
Hipótesis.....	20
Objetivos.....	21
<i>Objetivo general.....</i>	<i>21</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>21</i>
Materiales y métodos.....	22
<i>Cultivo de líneas celulares.....</i>	<i>22</i>
<i>Tratamientos con NaAsO₂.....</i>	<i>22</i>
<i>Lisados celulares.....</i>	<i>23</i>
<i>SDS-PAGE y Western blot cuantitativo.....</i>	<i>23</i>
<i>Extractos de RNA total.....</i>	<i>25</i>
<i>PCR cuantitativa (RT-qPCR).....</i>	<i>25</i>
<i>Ensayos de proliferación celular.....</i>	<i>25</i>
<i>Ensayo de migración celular.....</i>	<i>25</i>
<i>Ensayo de invasión celular.....</i>	<i>26</i>

<i>Generación de E. coli termocompetentes por el método de CaCl</i>	26
<i>Clonación de plásmidos</i>	27
<i>Transfección transitoria de plásmidos</i>	27
<i>Análisis estadístico</i>	27
Resultados.....	29
<i>Citotoxicidad de NaAsO₂ en líneas celulares del epitelio mamario</i>	29
<i>Efecto del NaAsO₂ en los niveles de proteína de GATA3 en líneas celulares del epitelio mamario</i>	29
<i>Efecto del NaAsO₂ en la proliferación, migración e invasión celular en líneas celulares del epitelio mamario</i>	31
<i>Efecto del NaAsO₂ en la expresión de blancos transcripcionales de GATA3</i> ..	35
<i>Sobreexpresión de GATA3 en células MCF-10A</i>	38
Discusión.....	41
Conclusiones.....	46
Referencias.....	47
Anexo 1.....	56
Publicaciones durante los estudios de doctorado.....	57

Abreviaturas

AS3MT – arsenito metiltransferasa

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

E2 – estradiol

EGF – factor de crecimiento epidérmico

EMT- transición epitelio-mesénquima

ER- α – receptor de estrógenos alfa

FDA – diacetato de fluoresceína

FBS – suero fetal bovino

GSH – glutatión

GSTO – glutatión sulfhidrilo transferasa omega

HER2 – receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

HR – receptor hormonal

HRP- peroxidasa de rábano

HS – suero de caballo

IARC – Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer

ILC2 – células linfoides innatas tipo 2

MMA (As[III]) – monometil arsenito

MMC – mitomicina C

NaAsO₂ – arsenito de sodio

P4 – progesterona

PBS – buffer de fosfatos salino

PR – receptor de progesterona

PVDF – fluoruro de polivinilideno

RNA PolII – RNA polimerasa 2

RT-qPCR – PCR cuantitativa

SC – suero de caballo

SDS- dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE - electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

SFB – suero fetal bovino

Th2 – células T auxiliares tipo 2

Zn – zinc

ZnF – dedos de zinc

Resumen

La exposición a arsénico está asociada con el desarrollo de cáncer de mama. Sin embargo, los mecanismos moleculares de por los que el arsénico contribuye al desarrollo de cáncer de mama no están completamente definidos. La interacción con motivos de dedos de zinc (ZnF) en proteínas es uno de los mecanismos de toxicidad del arsénico. Por otro lado, GATA3 es un factor de transcripción que regula la transcripción de genes asociados con la proliferación celular, la diferenciación celular y la transición epitelio-mesénquima (EMT) en células luminales del epitelio mamario. Debido a que GATA3 posee motivos ZnF esenciales para la función de esta proteína y a que el arsénico podría alterar la función de GATA3 a través de la interacción con estos motivos estructurales, evaluamos el efecto del arsenito de sodio (NaAsO_2) en la función de GATA3 y su relevancia en el desarrollo de cáncer de mama inducido por arsénico. Se utilizaron líneas celulares de mama derivadas de epitelio mamario normal (MCF-10A) y en células derivadas de cáncer de mama luminal (T-47D y MDA-MB-453). Observamos una reducción en los niveles de proteína GATA3 a concentraciones no citotóxicas de NaAsO_2 en MCF-10A y T-47D, pero no en células MDA-MB-453. Esta reducción se asoció con un aumento en la proliferación y la migración celular en MCF-10A, pero no en T-47D o MDA-MB-453. La evaluación de marcadores moleculares de proliferación celular y de EMT (FOXA1, E-cadherina, N-cadherina, receptor de estrógenos alfa, receptor de progesterona, Zeb2) indica que la reducción de los niveles de proteína GATA3 por el arsénico altera la función de este factor de transcripción. Nuestros datos sugieren que GATA3 es un supresor de tumores en el epitelio mamario normal y que el arsénico podría actuar como iniciador del cáncer de mama al alterar la función de GATA3.

Abstract

Arsenic exposure is associated with the development of breast cancer. However, the molecular mechanisms by which arsenic contributes to the development of breast cancer are not fully defined. Interaction with zinc finger (ZnF) motifs in proteins is one of the mechanisms of arsenic toxicity. On the other hand, GATA3 is a transcription factor that regulates the transcription of genes associated with cell proliferation, cell differentiation, and the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in luminal cells of the mammary epithelium. Because GATA3 possesses ZnF motifs essential for the function of this protein and because arsenic could alter GATA3 function through interaction with these structural motifs, we evaluated the effect of sodium arsenite (NaAsO₂) on GATA3 function and its relevance in the development of arsenic-induced breast cancer. We used cell lines derived from normal mammary epithelium (MCF-10A) and from luminal breast cancer (T-47D and MDA-MB-453). We observed a reduction in GATA3 protein levels at non-cytotoxic concentrations of NaAsO₂ in MCF-10A and T-47D, but not in MDA-MB-453 cells. This reduction was associated with an increase in cell proliferation and cell migration in MCF-10A cells, but not in T-47D or MDA-MB-453 cells. The evaluation of molecular markers of cell proliferation and EMT (FOXA1, E-cadherin, estrogen receptor alpha, progesterone receptor, Zeb2) indicates that the reduction of GATA3 protein levels by arsenic alters the function of this transcription factor. Our data show that GATA3 is a tumor suppressor in normal breast epithelium and that arsenic might act as a breast cancer initiator by altering GATA3 function.

Introducción

Complejidad estructural de la glándula mamaria

El epitelio mamario es un tejido epitelial estratificado que posee dos capas celulares y que forma un sistema de lóbulos y ductos ramificados que se extiende a través de las mamas humanas. La capa interna del epitelio mamario posee células troncales mamarias y células mioepiteliales con capacidad contráctil, mientras que la capa externa posee células luminales progenitoras y células luminales maduras que secretan leche en los lóbulos de la glándula mamaria (Inman et al., 2015; Macias & Hinck, 2012) (Figura 1). El epitelio mamario se encuentra rodeado de un estroma formado por matriz extracelular y que posee adipocitos, fibroblastos, leucocitos y células endoteliales (Dontu & Ince, 2015; Eiro et al., 2019) (Figura 1). Por lo tanto, el epitelio mamario es un tejido epitelial complejo.

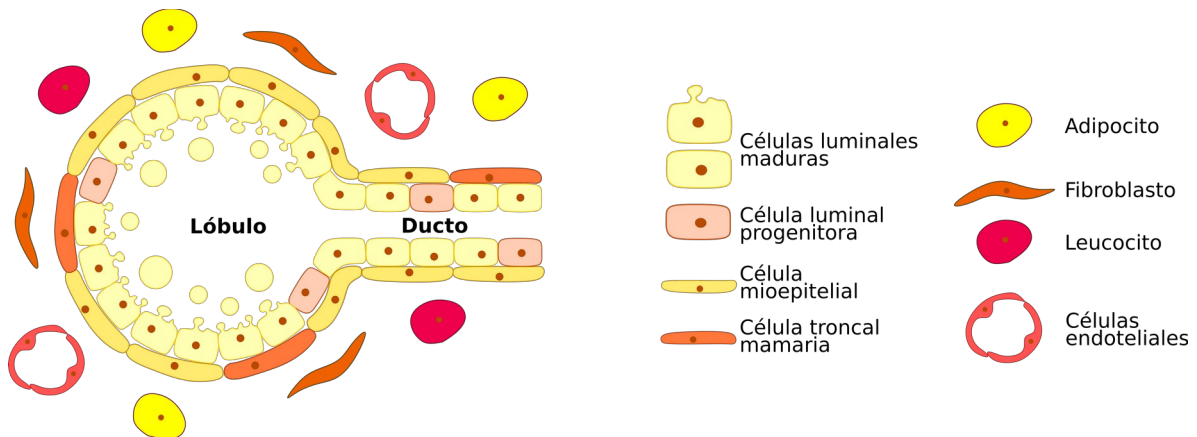


Figura 1. Esquema de la estructura de los lóbulos y ductos mamarios. Ambas estructuras están formadas por una capa de células luminales que secretan los componentes de la leche materna y por una capa de células mioepiteliales y células troncales mamarias. Este epitelio mamario está rodeado por un estroma que posee adipocitos, fibroblastos, diversos tipos de leucocitos y por células endoteliales.

El carcinoma mamario es una enfermedad heterogénea

El carcinoma mamario comprende a un conjunto heterogéneo de enfermedades tumorales que se caracterizan por la proliferación descontrolada de un conjunto de células anormales

en el epitelio mamario (Hanahan & Weinberg, 2011; Harbeck et al., 2019). Existen diversas clasificaciones del carcinoma mamario basadas en análisis a nivel histológico, molecular y clínico (Harbeck et al., 2019). Los subtipos histológicos del carcinoma mamario son el carcinoma *in situ* y el carcinoma invasivo. Existen múltiples clasificaciones basadas en el análisis de marcadores moleculares a nivel genómico (TCGA, 2012), transcriptómico (TCGA, 2012) y proteómico (Bouchal et al., 2019; TCGA, 2012). La clasificación clínica divide el carcinoma mamario en los subtipos luminal A, luminal B, HER2 enriquecido y triple negativo (Harbeck & Gnant, 2017).

El cáncer de mama luminal A se caracteriza presenta células que expresan el ER- α , el PR, y que tienen una baja tasa de proliferación celular y una baja expresión del marcador de proliferación celular Ki67. El subtipo luminal B también comprende a tumores que expresan el ER- α y el PR, pero que tienen una mayor expresión de Ki67 y una mayor proliferación celular. El carcinoma mamario HER2 enriquecido se caracteriza por la sobreexpresión del receptor HER2, que promueve la proliferación celular. Finalmente, el subtipo triple negativo es el conjunto más heterogéneo y comprende una serie de tumores que comparten la característica de no expresar el ER- α , el PR ni a HER2 (Cuadro 1) (Feeley et al., 2013; Harbeck & Gnant, 2017; Harbeck et al., 2019; Höller et al., 2023). Los subtipos de carcinoma mamario luminal A y luminal B tienen una expresión génica similar a las células lumbales ER- α +/PR+ maduras y el subtipo triple negativo tienen una expresión génica similar a las células troncales mamarias, por lo que estas podrían ser las células de origen de estos tumores (Cuadro 1) (Tharmapalan et al., 2020). Este panorama sugiere que los diferentes subtipos de carcinoma mamario tienen diferentes orígenes celulares, y que esto constituye uno de los factores de la heterogeneidad de esta enfermedad (Tharmapalan et al., 2019).

Cuadro 1. Características principales de los subtipos clínicos de cáncer de mama.

Subtipo	Características principales	Posibles células de origen
Luminal A	ER- α +/PR+(\geq 1% de positividad celular) Expresión baja de Ki67 (\leq 14% de positividad celular)	Luminales maduras
Luminal B	ER- α +/PR+ (\geq 1% de positividad celular) Expresión elevada de Ki67 (\geq 14% de positividad celular)	Luminales maduras
Her2 enriquecido	Sobreexpresión del receptor HER2	Desconocido
Triple negativo	ER- α - PR- HER2-	Células troncales mamarias

Las líneas celulares son un modelo del cáncer de mama

La caracterización molecular de distintas líneas celulares de cáncer de mama indica que estas se pueden categorizar en grupos similares a los subtipos luminal A, luminal B, HER2 enriquecido y triple negativo del cáncer de mama. Esto se debe a que la expresión génica y las alteraciones genéticas y epigenéticas de las líneas celulares de cáncer de mama son similares a las que se encuentran en los diferentes subtipos de tumores mamarios. Por este motivo, las líneas celulares son un modelo de los tumores mamarios (Dai et al., 2017; Neve et al., 2006). La línea celular de cáncer de mama T-47D es similar al cáncer de mama luminal porque expresa los receptores hormonales ER- α y PR, tiene un bajo potencial metastásico y por las alteraciones genéticas que presenta (Holliday & Speirs, 2011; Qu et al., 2015). La línea celular MDA-MB-453 es una línea celular de cáncer de mama luminal que no expresa los receptores hormonales ER- α y PR (Lukey et al., 2019). Sin embargo, también existen líneas celulares que son modelos experimentales del epitelio mamario normal. La línea celular MCF-10A está derivada de células de mama fibroquística inmortalizadas artificialmente que, por no ser tumorigénica, por carecer de la capacidad de crecer independientemente de un sustrato, y por ser dependiente de factores de crecimiento,

de forma similar a las células del epitelio mamario en cultivos primarios, es frecuentemente utilizada como un modelo del epitelio mamario no transformado (Qu et al., 2015). En su conjunto, MCF-10A, T-47D y MDA-MB-453 son líneas celulares que permiten estudiar la función del epitelio mamario y del cáncer de mama.

Factores que contribuyen al desarrollo del cáncer de mama

Los factores que contribuyen al desarrollo del cáncer de mama son diversos, pero pueden clasificarse en dos grupos principales: factores genéticos y factores ambientales. Entre los factores genéticos se encuentra la predisposición genética conferida por mutaciones germinales, como diversas mutaciones registradas en los genes supresores de tumores *BRCA1* y *BRCA2* (Harbeck et al., 2019). Las mutaciones somáticas causadas por los errores de la maquinaria de duplicación del DNA durante la división celular también constituyen un factor genético del desarrollo del cáncer de mama. Estas mutaciones, que pueden ser de baja penetrancia para el desarrollo del cáncer de mama, se acumulan y comprometen la homeostasis de la glándula mamaria (Tharmapalan et al., 2019). Los genes con mutaciones somáticas más frecuentemente detectados en secuenciaciones del exoma en tumores mamarios son los genes *PIK3CA*, *TP53*, y *GATA3*. Los factores ambientales relacionados con el desarrollo del cáncer de mama son la exposición a las hormonas estradiol (E2), progesterona (P4) y a sus análogos sintéticos, la obesidad, el tabaquismo, el alcoholismo, y la exposición crónica al metaloide arsénico (Harbeck et al., 2019; Pullella & Kotsopoulos, 2020; Tharmapalan et al., 2019).

El arsénico es un metaloide relacionado con el desarrollo del cáncer de mama

El arsénico es un metaloide presente en el ambiente como un componente natural de la corteza terrestre y como un contaminante producto de diversas actividades industriales como la minería y la agricultura (IARC, 2012; Smedley & Kinniburgh, 2002). El agua de

bebida contaminada por minerales del arsénico es la principal vía de exposición a este metaloide en múltiples localidades alrededor del mundo, principalmente en países como Argentina, Bangladesh, Chile, China e India, y en algunas regiones como en el norte de México, donde los niveles de arsénico en agua pueden superar los 300µg As/L (IARC, 2012; López-Carrillo et al., 2014). Se estima que entre 200 y 300 millones de personas alrededor del mundo están crónicamente expuestas a concentraciones superiores a los 10µg As/L a través del agua de bebida, el límite permisible establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (IARC, 2012). Sin embargo, también existe la exposición a arsénico a través del aire que, en áreas contaminadas, puede llegar a 1µg As/día, la exposición ocupacional y la exposición a través de alimentos cultivados en suelos contaminados con arsénico (IARC, 2012). La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasifica al arsénico como un carcinógeno para humanos, pues existe evidencia epidemiológica sólida sobre la relación entre la exposición a arsénico y el desarrollo de cáncer de piel, de pulmón, de riñón y de vejiga (IARC, 2012). Sin embargo, estudios epidemiológicos recientes relacionan la exposición a arsénico con el desarrollo de cáncer de mama (Pullella & Kotsopoulos, 2020). Específicamente, se encontró en un estudio ambiental que la exposición a arsénico en aire se relaciona con el desarrollo de cáncer de mama ($\beta=5.21[1.72-8.7]$) (Vu et al., 2019). López-Carrillo y colaboradores encontraron en un estudio de casos y controles que mujeres que tienen una menor capacidad de metilación del monometil arsenito MMA(As[III]) tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama ($OR=4.05[1.63-10.04]$) (López-Carrillo et al., 2020). En un estudio de cohorte prospectivo, se encontró que una mayor concentración atmosférica de arsénico se relaciona directamente con el riesgo de desarrollar cáncer de mama de tipo receptor hormonal negativo (HR-) ($HR=1.7[1.1-2.5]$) (Liu et al., 2015).

También, se encontró que una mayor concentración total de arsénico en sangre incrementa significativamente el riesgo de desarrollar cáncer de mama (HR=13.2[4.02-43]) (Marciniak et al., 2019). Sin embargo, los mecanismos carcinogénicos del arsénico que contribuyen al desarrollo de cáncer de mama aún no están completamente definidos.

Mecanismos de la carcinogénesis por el arsénico

El arsénico tiene múltiples mecanismos de toxicidad que se pueden relacionar con el desarrollo del cáncer de mama. El arsénico causa estrés oxidativo porque su metabolismo consume glutatión (GSH), alterando el balance redox en la célula. Tras su ingreso a la célula, el arsénico se metaboliza antes de su eliminación. La metilación oxidativa es el principal mecanismo de metabolización del arsénico (Kumagai & Sumi, 2007), y consiste en una serie de metilaciones oxidativas y óxido-reducciones del arsénico a cargo de las enzimas arsenito metiltransferasa (*AS3MT*) y glutatión sulfhidrilo transferasa omega (*GSTO*). La actividad de estas enzimas genera dimetil arsenito [DMA(As[III])], que es el metabolito del arsénico más abundante en la orina (Kumagai & Sumi, 2007; López-Carrillo et al., 2014). En esta serie de reacciones, se consumen dos moléculas de GSH por cada molécula de arsénico, lo que genera el estrés oxidativo y puede incrementar las mutaciones y los aductos en el DNA, además de inhibir la actividad de la maquinaria de respuesta al daño a DNA (Kumagai & Sumi, 2007). Adicionalmente, la metilación oxidativa por la *ASM3T* consume S-adenosil metionina y reduce este importante sustrato de las DNA metiltransferasas y de las metiltransferasas de histonas, lo que puede causar alteraciones epigenéticas como la activación de la expresión génica de oncogenes o el silenciamiento de genes supresores de tumores, promoviendo el desarrollo tumoral (Q. Y. Chen et al., 2019).

El arsénico también actúa como un disruptor endócrino *in vitro* e *in vivo* en células y tejidos endócrinos (Davey et al., 2007; Chatterjee & Chatterji, 2010; Ronchetti et al.,

2016). En el caso del epitelio mamario, el arsénico actúa como un inhibidor de la actividad del ER- α y del PR (Davey et al., 2007; Bodwell et al., 2006), receptores hormonales que son fundamentales en el desarrollo del epitelio mamario al contribuir a regular la proliferación de las células del epitelio mamario (Hannan et al., 2022). El arsénico se une al sitio de unión al ligando del ER- α (Stoica et al., 2000) y a los motivos de dedos de zinc (ZnF) de receptores hormonales como el ER- α y el PR (Gosse et al., 2014), lo que sugiere que este metaloide altera la actividad dependiente de ligando y la unión de estos factores de transcripción a sus secuencias de unión al DNA.

La interacción del arsénico con los motivos de dedos de zinc (ZnF) en las proteínas es un mecanismo de toxicidad del arsénico (Zhou et al., 2011; Shen et al., 2013; Vergara-Gerónimo et al., 2021). El arsénico desplaza el zinc en los ZnF, altera la estructura de estos motivos estructurales y abate la función de las proteínas blanco (Kitchin & Wallace, 2005; Sun et al., 2014; Zhou et al., 2011). Además, el arsénico puede interactuar con regiones de las proteínas que poseen residuos de cisteína próximas entre sí en el espacio tridimensional, como en el caso de p53, que posee tres cisteínas que pueden interactuar con arsénico (Chen et al., 2021; Kitchin & Wallace, 2005; Stoica et al., 2000). Debido a que la alteración en la función de las proteínas con motivos ZnF es un factor en el desarrollo del cáncer (Cassandri et al., 2017; Jen & Wang, 2016; Krishna et al., 2003), se ha propuesto que la interacción del arsénico con motivos ZnF es un factor en el desarrollo de cáncer (Vergara-Gerónimo et al., 2021).

GATA3 es una proteína relacionada con el desarrollo del cáncer de mama

Los factores de transcripción GATA comprenden una familia de proteínas con seis genes parálogos, de GATA1 a GATA6. Los factores GATA poseen una región N-terminal con uno o dos dominios de activación, un dominio de unión a DNA con dos motivos con ZnF, y

una región C-terminal variable (Romano & Miccio, 2020). La función de los dominios de activación es contribuir a la regulación de la actividad transcripcional. Los motivos con ZnF de los factores GATA son importantes para la interacción directa con DNA con la secuencia consenso 5'-WGATAR-3' y para la interacción proteína-proteína con proteínas correguladoras de la transcripción como el ER- α y el PR. Finalmente, la región C-terminal es una región variable que contribuye a regular la degradación de la proteína por el proteasoma (Y. Chen et al., 2012; Romano & Miccio, 2020; Tanaka et al., 2020). Otras secuencias importantes en las proteínas GATA son la secuencia de importación nuclear canónica y la secuencia de homodimerización (Du et al., 2015; Ho et al., 2009).

Todos los factores GATA se expresan en múltiples tejidos y todos los factores GATA, excepto GATA5, son genes esenciales cuya delección en el modelo murino causa letalidad en el estadio embrionario. Además, múltiples enfermedades humanas están relacionadas con las mutaciones en los factores GATA, como la leucemia linfocítica aguda y el síndrome HDR (hipoparatiroidismo, sordera neurosensorial y enfermedad renal) relacionadas con mutaciones en GATA3, o la enfermedad cardíaca congénita, relacionada con mutaciones en GATA4, GATA5 o GATA6 (Tremblay et al., 2018). Sin embargo, solo la alteración en la función del factor de transcripción GATA3 en el epitelio mamario está relacionada con el desarrollo del cáncer de mama (Yu et al., 2019). El factor de transcripción GATA3 se expresa en las células luminales del epitelio mamario (Romano & Miccio, 2020) y es esencial para el desarrollo embrionario de la glándula mamaria, para el proceso de diferenciación celular de las células luminales progenitoras y para el mantenimiento del estado diferenciado de las células luminales maduras (Asselin-Labat et al., 2007; Kouros-Mehr et al., 2006, 2008). GATA3 es un factor de transcripción pionero, en el sentido de que es un factor de transcripción que tiene la capacidad interaccionar con la

cromatina compacta y que es necesario para la introducción de marcas epigenéticas y el reclutamiento de otros factores de transcripción y de la RNAPolIII durante el proceso de transcripción (Romano & Miccio, 2020; Takaku et al., 2020; Theodorou et al., 2013). GATA3 es un factor de transcripción que se une principalmente a secuencias enhancer, que están distantes de los promotores y que se ubican en regiones intrónicas e intergénicas. Por lo tanto, se considera a GATA3 como un factor pionero que regula la arquitectura de la cromatina y la actividad transcripcional (Adomas et al., 2014; Romano & Miccio, 2020).

GATA3 promueve la diferenciación de las células luminales progenitoras del epitelio mamario y mantiene el estado diferenciado de las células luminales maduras porque promueve la transcripción de genes relacionados con un fenotipo epitelial, aunque también se ha demostrado que reprime la expresión de genes relacionados con un fenotipo mesenquimatoso (Asselin-Labat et al., 2007; Kouros-Mehr et al., 2006, 2008; Si et al., 2015). Como ejemplos, GATA3 promueve la expresión del gen *CDH1*, que codifica la E-cadherina, una proteína de uniones adherentes que además es un importante marcador de tejido epitelial (Wheelock et al., 2008; Yan et al., 2010); además, GATA3 reprime la expresión del gen *ZEB2*, que codifica el factor de transcripción que promueve la transición epitelio-mesénquima (EMT) Zeb2 (Si et al., 2015).

La reducción en los niveles de expresión de GATA3 en el epitelio mamario promueve la EMT e incrementa la migración e invasión celular, lo que incrementa el desarrollo tumoral (Kouros-Mehr et al., 2006; Yan et al., 2010). Esto se refleja en el hecho de que los niveles de expresión de GATA3 se encuentra alterada en algunos tipos de tumores mamarios en comparación con el epitelio mamario sano, con niveles mayores en el cáncer de mama luminal, pero con menores niveles de expresión en el cáncer de mama triple negativo (Takaku et al., 2018; Yu et al., 2019). Sin embargo, no solo los niveles de

expresión alterados de GATA3 se relacionan con el cáncer de mama, ya GATA3 está mutado hasta en un 11% de los tumores mamarios, donde puede actuar como gen supresor de tumores o como oncogen (Harbeck et al., 2019; Pereira et al., 2016; Takaku et al., 2015). Por lo tanto, GATA3 es un factor de transcripción esencial en la homeostasis de las células luminales del epitelio mamario cuya función está alterada en los subtipos de cáncer de mama luminal y triple negativo.

Justificación

GATA3 es un factor esencial en la homeostasis del epitelio mamario y un posible blanco del arsénico debido a los motivos ZnF que posee, por lo que es plausible que la función de GATA3 se altere durante la carcinogénesis en el epitelio mamario inducida por la exposición a arsénico.

Pregunta de investigación

¿Se altera la función de GATA3 en líneas celulares del epitelio mamario expuestas a arsénico?

Hipótesis

El arsénico reducirá la expresión y la función de GATA3, y ocasionará una disminución de la diferenciación celular y un incremento en la proliferación celular en líneas celulares derivadas del epitelio mamario.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto del arsénico en la función del factor de transcripción GATA3 en líneas celulares del epitelio mamario.

Objetivos específicos

- Determinar la máxima concentración de exposición no citotóxica de arsenito de sodio (NaAsO_2), en las líneas celulares derivadas del epitelio mamario humano.
- Evaluar el efecto de la exposición a concentraciones no citotóxicas de NaAsO_2 en los niveles de proteína de GATA3.
- Determinar el efecto del tratamiento con NaAsO_2 en la proliferación celular, la migración y la invasión celular dependientes de GATA3.
- Evaluar el efecto de la exposición a NaAsO_2 en la expresión génica de blancos transcripcionales de GATA3.
- Evaluar el efecto de la exposición a NaAsO_2 en la expresión génica de blancos transcripcionales de GATA3 en un modelo de sobreexpresión.

Materiales y métodos.

Cultivo de líneas celulares.

Se utilizaron las líneas celulares MCF-10A, T-47D, y MDA-MB-453, que se obtuvieron de la ATCC®. Las células MCF-10A se cultivaron en medio DMEM/F-12 (GIBCO®) suplementado con 5% de suero de caballo (GIBCO®) inactivado por calor, 20 ng/mL factor de crecimiento epidérmico (EGF, SIGMA®), 500 ng/mL hidrocortisona (SIGMA®), 100 ng/mL toxina colérica (SIGMA®) y 10 µg/mL insulina bovina (SIGMA®). La línea celular T-47D se cultivó en medio RPMI-1640 (GIBCO®) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO®) inactivado por calor, 2 mM L-glutamina (BioWest®) y 1% piruvato de sodio (GIBCO®). El cultivo de MCF-10A y T-47D se realizó a 37°C en una incubadora con atmósfera humificada y con 5% de CO₂. La línea celular MDA-MB-453 se cultivó en medio Leibovitz L-15 (GIBCO®) suplementado con 10% de SFB (GIBCO®) inactivado por calor. El cultivo de MDA-MB-453 se realizó a 37°C en una incubadora con atmósfera humificada y sin CO₂. Solo se usaron células anteriores al pase 10.

Tratamientos con NaAsO₂.

Se preparó NaAsO₂ 1M (SIGMA®) en agua bidestilada y el día de los tratamientos se prepararon diluciones frescas. Se sembraron las células en cajas de cultivo de tamaño adecuado para cada experimento a una densidad celular de 7,500 células cm⁻² para MCF-10A, 30,000 células cm⁻² para T-47D, y de 120,000 células cm⁻² para MDA-MB-453. 24 horas después, se inició un tratamiento de 72 horas con NaAsO₂. A menos que se especifique algo diferente en los siguientes experimentos, siempre se usaron estas densidades celulares para la siembra.

Ensayos de viabilidad celular.

Se sembraron las células en cajas de cultivo de 96 pozos. 24 horas después de la siembra, se inició un tratamiento de 72 horas con NaAsO₂ en concentraciones de 0.1 a 5 µM. Al finalizar el tratamiento, las células se tiñeron con FDA (diacetato de fluoresceína, SIGMA®) y se determinó el porcentaje de viabilidad celular por fluorometría a 355 nm de excitación y 460 nm de emisión. Las células sin tratamiento fueron usadas para la normalización. Se usó como control positivo de citotoxicidad el tratamiento con 1 µM de mitomicina C (SIGMA®).

Lisados celulares.

Todo el procedimiento se realizó a 4°C. Se eliminó el medio de cultivo por aspiración y se realizó un lavado con PBS 1X (137 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄, 2 mM de KH₂PO₄) estéril. Las células se despegaron de la caja de cultivo con un gendarme de plástico usando amortiguador de lisis (PBS 1X, 1% SDS, 1% Tritón X-100) adicionado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific™). El lisado celular se transfirió a un microtubo, se sonicó realizando tres rondas de diez pulsos a una amplitud del 30%. Los lisados obtenidos se almacenaron a -80°C hasta su uso. La proteína en las muestras se cuantificó usando el kit DC™ Protein Assay (Bio-Rad®).

SDS-PAGE y Western blot cuantitativo.

Se realizó Western blot cuantitativo, en el que la intensidad de las bandas es directamente proporcional a la concentración de la proteína diana en la muestra. Las condiciones especificadas en el Cuadro 2 permitieron detectar alteraciones en la abundancia proteica en el rango de 0.5-2 veces de cambio respecto al control para los anticuerpos GATA3 (Invitrogen, 14996682), FOXA1 (abcam, ab23738), ER-α (Invitrogen, MA5-13191), PR (Santa Cruz Biotechnology, sc-166169), E-cadherina (BD Biosciences, 24E10), N-caderina

(abcam, ab18203), Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7382). Los lisados celulares se incubaron a 85°C durante 5 minutos en buffer de muestra (concentración final 50 mM de Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 0.01% azul de bromofenol, 2% β-mercaptoetanol) para desnaturalizar las proteínas. Las muestras se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 12% y se realizó la electroforesis usando amortiguador de corrida (25 mM de Tris, 200 mM de glicina, 1% SDS). Al finalizar la electroforesis, el gel obtenido se lavó en amortiguador de transferencia (25 mM de Tris, 200 mM de glicina, 20% metanol) durante 20 minutos usando agitación ligera. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a 15V, por el método semiseco, a una membrana de nitrocelulosa (Amersham™ Protran™ Premium 0.45 μm NC) o PVDF (Immobilon®-P, Millipore®). La membrana obtenida se bloqueó con amortiguador TBS-T (50 mM de Tris pH 7.6, 150 mM de NaCl, 0.1% de Tween-20) con leche al 4% durante una hora y se incubó con el anticuerpo primario y con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano (ver en Cuadro 2). El gel de SDS-PAGE se teñió con azul de Coomassie brillante R-250 (BIO-RAD) al 0.1% durante 15 minutos en agitación ligera, y se destiñó durante 1 hora. Se revelaron los complejos inmunes usando el kit Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE HealthCare) y se detectó la señal de quimioluminiscencia usando el C-DIGIT® de LI-COR®. La señal obtenida se cuantificó usando el software Image Studio Lite Ver 5.2 de LI-COR®. Como controles de carga, cuantificamos la densidad óptica de los carriles de los geles SDS-PAGE teñidos con azul brillante de Coomassie (CBB), ya que este es un método sensible para evaluar la cantidad de proteína cargada en geles de SDS-PAGE (McDonough et al., 2014; Welinder & Ekblad, 2011).

Extractos de RNA total.

Se eliminó el medio de cultivo por aspiración y se realizó un lavado a las células usando PBS 1X estéril. Para extraer el RNA total de las células se utilizó el kit RNeasy de Qiagen. La muestra de RNA total se almacenó a -80°C hasta su uso. El contenido de RNA en las muestras se cuantificó usando el NanoVue Plus Spectrophotometer (GE HealthCare).

PCR cuantitativa (RT-qPCR).

Se utilizó el kit SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen™) para la síntesis de cDNA a partir de los extractos de RNA total. Se utilizó el kit TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Thermo Scientific™) y las sondas TaqMan™ Gene Expression Assay para los genes *GATA3* (Hs00231122), *FOXA1* (Hs04187555), *CDH1* (Hs01023895), *ESR1* (Hs01046816), *PGR* (Hs01556702), *BCL2* (Hs00608023) para realizar la PCR cuantitativa en 40 ciclos. Se usó el gen *GUSB* (Hs00939627) como control endógeno porque sus niveles de mRNA no se alteran por la exposición a arsénico (Udensi et al., 2011).

Ensayos de proliferación celular.

Se sembraron las células en cajas de cultivo de 96 pozos. 24 horas después de la siembra, se inició un tratamiento de 72 horas con concentraciones no citotóxicas de NaAsO₂. Al finalizar el tratamiento, las células se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Thermo® Scientific) y se determinó el porcentaje de proliferación celular por fluorometría a 355 nm de excitación y 460 nm de emisión. Las células sin tratamiento fueron usadas para la normalización.

Ensayo de migración celular.

Las células se trataron durante 72 horas con dosis no citotóxicas de NaAsO₂ en cajas de 12 pozos. Al finalizar el tratamiento, se inició un ayuno con 1% de SC (MCF-10A) o 1% de SFB (T-47D y MDA-MB-453). Después de 4 horas, la monocapa de células se rasgó

usando una punta de micropipeta estéril y se tomaron fotografías en las mismas zonas de la caja de cultivo cada 24 horas. El área de la herida se midió como pixeles cuadrados usando el software ImageJ y el porcentaje de migración celular se determinó usando la fórmula $\% = 100 * ((\text{Área}_{i0} - \text{Área}_{t0}) / \text{Área}_{t0})$.

Ensayo de invasión celular.

La línea celular MCF-10A fue tratada durante 72 horas con NaAsO₂. Al finalizar el tratamiento, las células fueron tripsinizadas y sembradas en insertos cubiertos con Matrigel® (CORNING®) a una densidad de 84,000 células por cm² en medio de cultivo sin SC. Se usó medio de cultivo suplementado con SC en el fondo del pozo para inducir la quimiotaxis. Además, se usó medio de cultivo sin SC como control negativo de la invasión de Matrigel®. Tras 24 horas, las células que no invadieron se removieron usando cotonetes de algodón, y las células que invadieron se fijaron con metanol, se tiñeron con azul de toluidina al 1%, y se contaron usando un microscopio óptico.

Generación de E. coli termocompetentes por el método de CaCl

Se utilizó la cepa RC39 de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α (Thermo Scientific™) donada por el Dr. Rafael Camacho Carranza. Se realizó un precultivo de la cepa RC39 en 5 mL de medio LB incubado a 37°C en agitación constante toda la noche. A la mañana siguiente se inocularon 500 mL de medio LB fresco usando el precultivo de RC39 y se incubaron a 37°C en agitación constante hasta obtener una DO₆₀₀=0.3. El cultivo se centrifugó a 1,500 g durante 5 minutos y a 4°C y el botón de células obtenido se resuspendió en 30 mL de solución de MgCl₂-CaCl₂ (80 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂). Las células se centrifugaron a 1,500 g durante 5 minutos y a 4°C y el botón de células obtenido se resuspendió en 20 mL de CaCl₂ 0.1 M. Se hicieron alícuotas de 500 µL de mezcla que se congelaron usando nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Clonación de plásmidos.

Se transformaron por medio de choque térmico células termocompetentes de la cepa RC39 utilizando los plásmidos GATA3-pCDNA3.1 y RSV/hGATA3. La cepa RC39 fue donada por el Dr. Rafael Camacho Carranza, el plásmido GATA3-pCDNA3.1 fue donado por Arne S. Schaefer (Addgene plasmid #115271; <http://n2t.net/addgene:115271>; RRID:Addgene_115271) y el plásmido RSV/hGATA3, por Douglas Engel (Addgene plasmid #83814; <http://n2t.net/addgene:83814>; RRID:Addgene_83814) (Ko et al., 1991). Se extrajo el DNA plasmídico de las células obtenidas por medio de minipreps y se digirió usando las enzimas de restricción EcoRI (New England Biolabs®, para GATA3-pCDNA3.1) y HindIII (New England Biolabs®, para RSV/hGATA3), siguiendo las instrucciones del fabricante, para determinar la presencia del plásmido y su tamaño aproximado. Se obtuvieron muestras de DNA plasmídico de las clonas utilizando el QIAGEN Plasmid Maxi Kit siguiendo las instrucciones del fabricante.

Transfección transitoria de plásmidos.

La línea celular MCF-10A se sembró en cajas de seis pozos (CORNING®) a una densidad de 60,000 células cm⁻². Tras 24 horas de la siembra, se transfectaron los plásmidos GATA3-pCDNA3.1 y RSV/hGATA3 utilizando el reactivo para transfección Lipofectamine™ 3000 (Thermo Scientific™) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico.

Se utilizó el software R 4.0.2 y los paquetes ggplot2, ggpubr y DescTools para realizar las gráficas y los análisis estadísticos. Las pruebas de normalidad se realizaron con tests Shapiro-Wilcoxon. Las pruebas de homocedasticidad se realizaron con la prueba de Bartlett. Se utilizaron t-test, ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías para identificar diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tratamientos. Se usaron las

pruebas post-hoc de Dunnett o de Tukey para determinar la significancia estadística de la diferencia del promedio entre el control y los tratamientos.

Resultados

Citotoxicidad de NaAsO₂ en líneas celulares del epitelio mamario

Se realizaron curvas de citotoxicidad de NaAsO₂ en las líneas celulares MCF-10 (Figura 1A), T-47D (Figura 1B) y MDA-MB-453 (Figura 1C) tratadas durante 72 horas con concentraciones en el rango de 0.5-5 μ M de NaAsO₂. Se encontró que 2.5 μ M de NaAsO₂ fue la concentración más alta que no generó citotoxicidad para ninguna de las tres líneas celulares, mostrando que no se redujo la viabilidad celular respecto al control sin tratamiento (Figura 1).

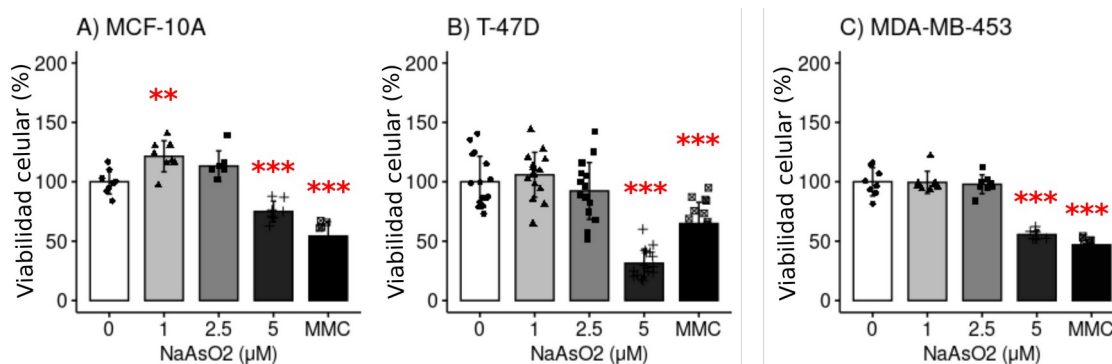


Figura 1. *Efecto citotóxico del NaAsO₂ en líneas celulares de epitelio mamario*. Se muestran las gráficas del porcentaje de viabilidad celular en células tratadas con NaAsO₂ en comparación con el control sin tratamiento en A) MCF-10A, B) T-47D, y C) MDA-MB-453. Las células fueron tratadas durante 72 horas con 1 μ M, 2.5 μ M y 5 μ M de NaAsO₂. Como control positivo de citotoxicidad se usó 1 μ M de MMC. Se realizaron tres experimentos independientes con triplicado técnico. Se realizaron ANOVA de una vía y prueba de Dunnett para determinar la significancia estadística de la diferencia del promedio entre las células control y las células tratadas (* p < 0.05; ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Efecto del NaAsO₂ en los niveles de proteína de GATA3 en líneas celulares del epitelio mamario

Para conocer si la exposición a concentraciones no citotóxicas de NaAsO₂ altera la abundancia proteínica de GATA3, se realizaron experimentos de Western blot cuantitativo. Para ello, fue necesario estandarizar el Western blot cuantitativo para el anticuerpo GATA3 en las tres líneas celulares. Se encontró que, al usar las condiciones resumidas en el Anexo

1, fue posible detectar confiablemente alteraciones en la abundancia proteínica de GATA3 de entre 0.5 y 2 veces de cambio en MCF-10A (Figura 2A), T-47D (Figura 2B), y MDA-MB-453 (Figura 2C).

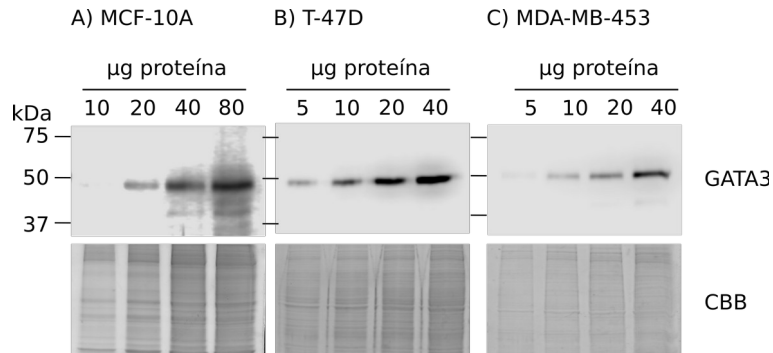


Figura 2. *Western blot cuantitativo de GATA3 en las líneas celulares A) MCF-10A, B) T-47D y C) MDA-MB-453.* Se realizaron curvas de proteína total de las líneas celulares y se analizaron por medio de SDS-PAGE y Western blot. Se usó el gel teñido con azul de Coomassie como control de carga.

Con las condiciones del Western blot cuantitativo estandarizadas para el anticuerpo de GATA3, se procedió a analizar el efecto del tratamiento con dosis no citotóxicas de NaAsO₂ en la abundancia proteínica de GATA3. Se encontró que los tratamientos de 72 horas con 1 y 2.5 µM de NaAsO₂ redujeron los niveles de proteína de GATA3 en MCF-10A (Figura 3A). En T-47D, solo el tratamiento con 2.5 µM de NaAsO₂ redujo de forma estadísticamente significativa los niveles de GATA3 (Figura 3B). Los tratamientos con NaAsO₂ no alteraron significativamente la abundancia de GATA3 en MDA-MB-453 (Figura 3C).

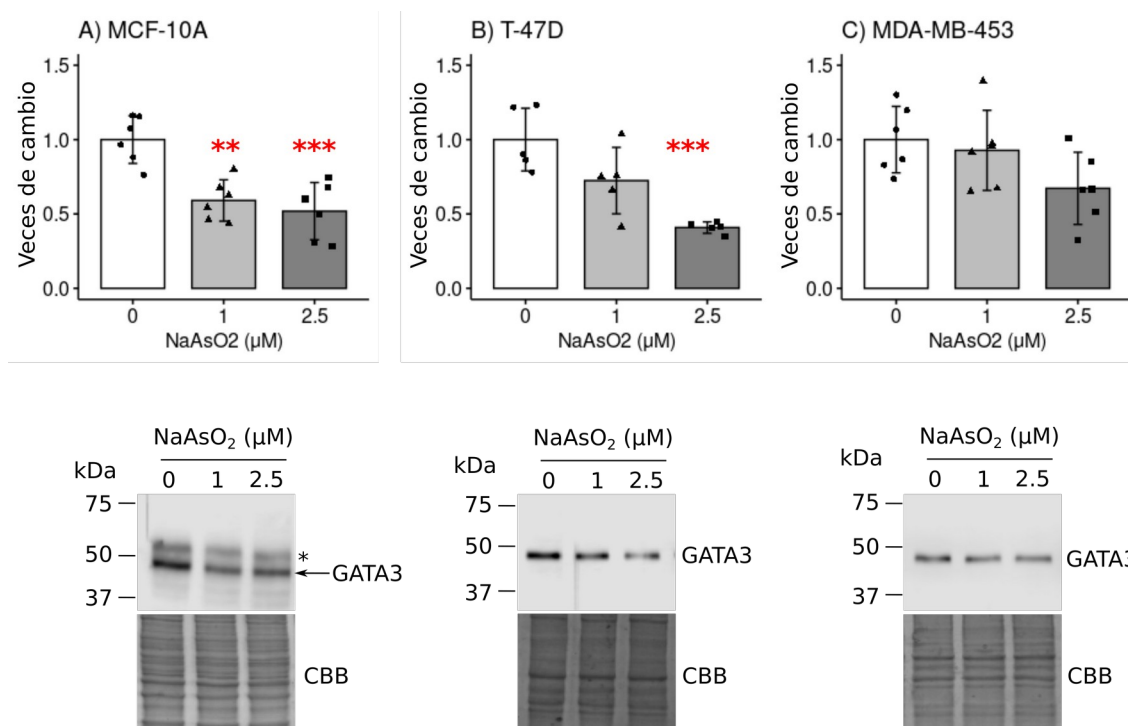


Figura 3. El NaAsO₂ redujo los niveles de proteína de GATA3 en MCF-10A y en T-47D. Western blot cuantitativo en las líneas celulares MCF-10A (A), T-47D (B) y MDA-MB-453 (C), con su respectiva gráfica de veces de cambio. El gel teñido con azul de Commassie se usó como control de carga. Las células se trataron durante 72 horas con 1 o 2.5 μM de NaAsO₂ para obtener un lisado celular. Se realizaron tres experimentos independientes con duplicado técnico. Se realizaron ANOVA de una vía y pruebas de Dunnett para determinar la significancia estadística de la diferencia del promedio entre las células control y las células tratadas (*p≤0.05; **p≤0.01, ***p≤0.001). El asterisco en el blot de GATA3 en MCF-10A indica una banda inespecífica.

Efecto del NaAsO₂ en la proliferación, migración e invasión celular en líneas celulares del epitelio mamario

Para evaluar si la reducción en los niveles de proteína de GATA3 estaba relacionada con alteraciones en la proliferación celular, se realizó una tinción con DAPI en las líneas celulares. Se encontró que el tratamiento con 1 μM de NaAsO₂ incrementó la proliferación de las células MCF-10A (Figura 4A) y T-47D (Figura 4B). Sin embargo, el tratamiento con 2.5 μM no alteró la proliferación celular en MCF-10A (Figura 4A), mientras que redujo la proliferación respecto al control en T-47D (Figura 4B). Los tratamientos con NaAsO₂ no alteraron la proliferación celular en la línea celular MDA-MB-453 (Figura 4C).

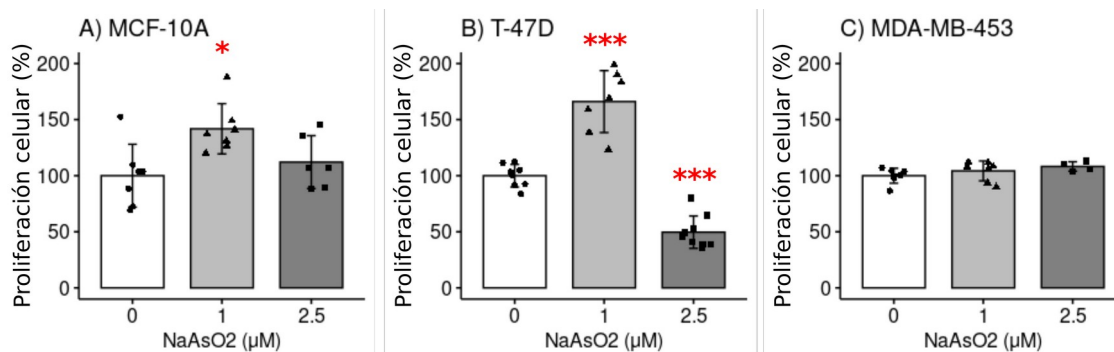


Figura 4. El NaAsO_2 incrementa la proliferación en células MCF-10A y T-47D. Las gráficas muestran el porcentaje de proliferación en células tratadas durante 72 horas con 1 o 2.5 μM de NaAsO_2 en las líneas celulares A) MCF-10A, B) T-47D y C) MDA-MB-453. Se realizaron ANOVA de una vía y pruebas de Dunnett para determinar la significancia estadística de la diferencia del promedio entre las células control y las células tratadas (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

A continuación, se realizaron ayunos de suero para determinar el porcentaje de suero en el medio de cultivo que detiene la proliferación celular, como un requisito previo al análisis de la migración celular. En estos ensayos, se encontró que un ayuno de 24 y 48 horas con 1% de SC detiene la proliferación celular en MCF-10A (Figura 5A, 5B), mientras que el ayuno con 1% de SFB detiene la proliferación celular tanto en T-47D (Figura 5C, 5D) como en MDA-MB-453 (Figura 5E, 5F). De esta manera, se logró abatir la proliferación celular en los análisis de migración celular por medio de experimentos de cierre de herida.

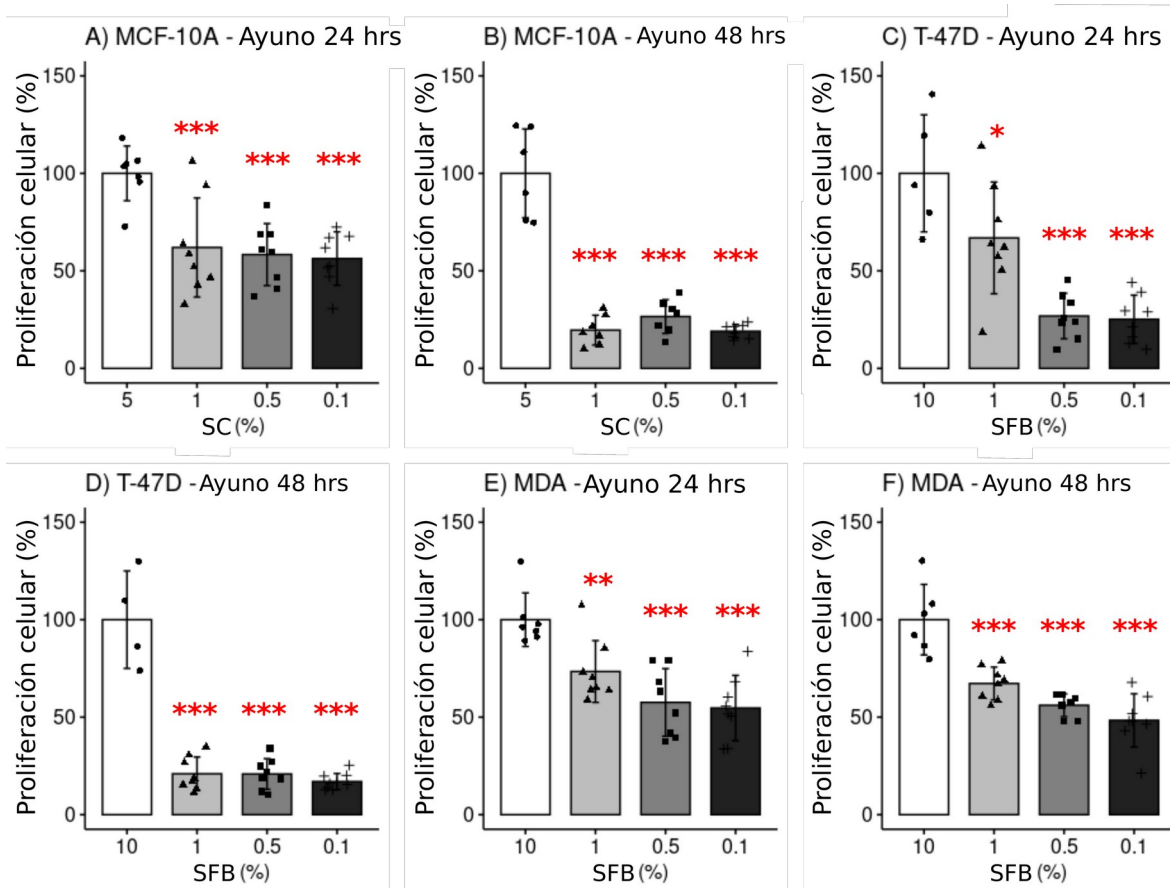


Figura 5. El ayuno de suero en el medio de cultivo detiene la proliferación celular. Las gráficas muestran el porcentaje de proliferación en células MCF-10A (A y B), T-47D (C y D) y MDA-MB-453 (E y F) cultivadas con porcentajes reducidos de suero durante 24 o 48 horas. Se realizaron tres experimentos independientes con triplicado técnico. Se realizaron ANOVA de una vía y pruebas de Dunnett para determinar la significancia estadística de la diferencia del promedio entre las células control y las células tratadas (*p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001). SC: suero de caballo; SFB: suero fetal bovino.

Se procedió a realizar los ensayos de cierre de herida durante un ayuno de suero. Se encontró que los tratamientos con 1 y 2.5 M de NaAsO₂ incrementaron la migración celular en MCF-10A 24 y 48 horas después de la herida (Figura 6A, 6D). Sin embargo, estos tratamientos no alteraron la migración celular respecto al control sin tratamiento en T-47D (Figura 6B, 6E) ni en MDA-MB-453 (Figura 6C, 6F).

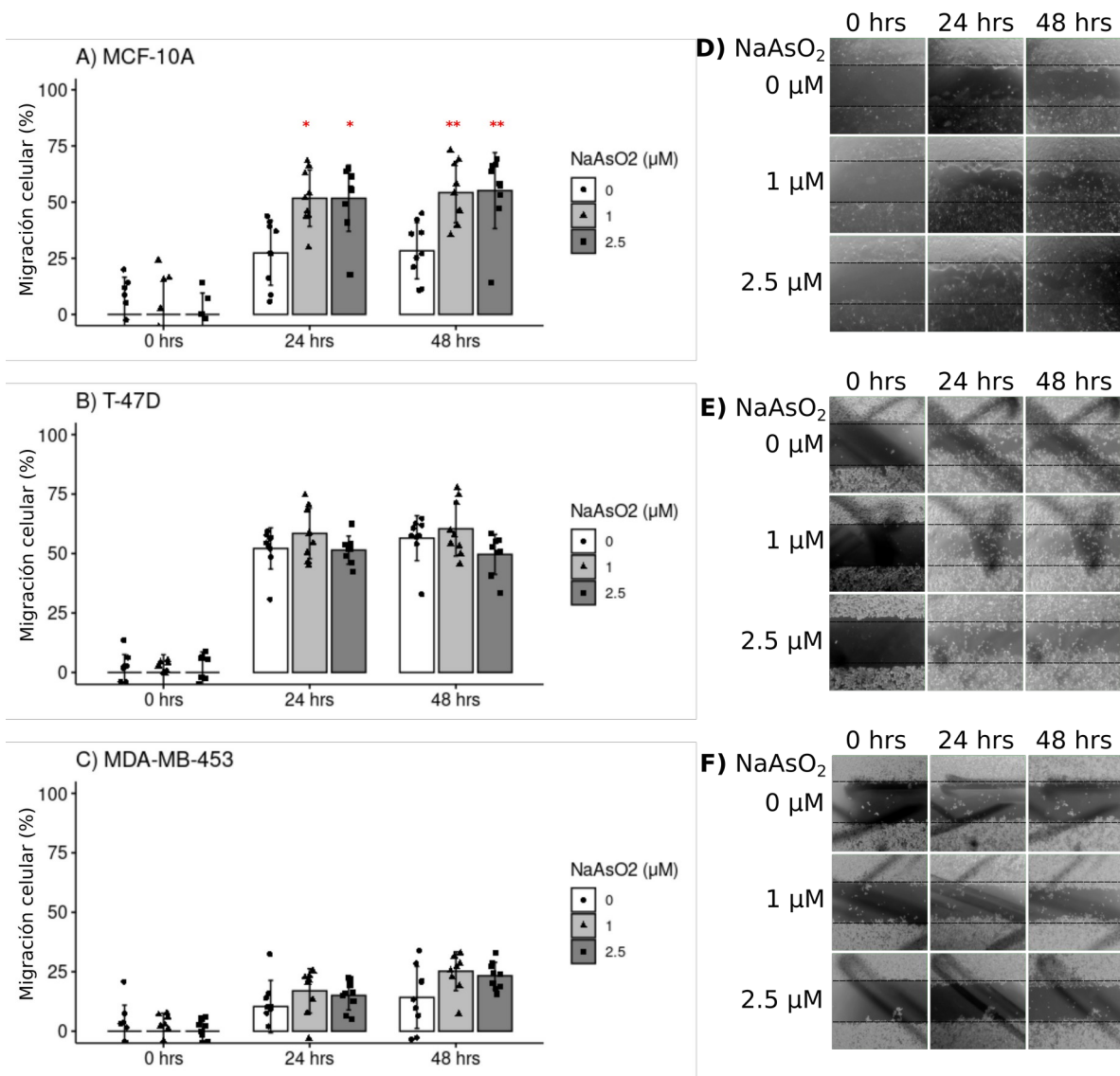


Figura 6. Los tratamientos con NaAsO_2 incrementaron la migración celular en MCF-10A. Las gráficas muestran el porcentaje de migración celular en células tratadas con 1 o 2.5 μM de NaAsO_2 en comparación con el control sin tratamiento en A) MCF-10A, B) T-47D y C) MDA-MB-453. Se realizaron tres experimentos independientes con triplicado técnico. Se realizaron pruebas de ANOVA de dos vías y Tukey HSD para determinar la significancia estadística de la diferencia entre el promedio de los tratamientos y el control sin tratamiento (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). También se muestran imágenes representativas de las heridas en la monocapa de D) MCF-10A, E) T-47D, y F) MDA-MB-453.

A continuación, se analizó el efecto de un tratamiento con concentraciones no citotóxicas de NaAsO_2 en la invasión de Matrigel® en la línea celular MCF-10A. Los tratamientos con 1 y 2.5 μM de NaAsO_2 redujeron la invasión de Matrigel respecto al control sin tratamiento (Figura 7).

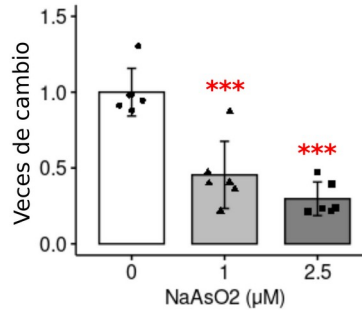


Figura 7. *El tratamiento con NaAsO₂ reduce la invasión celular de Matrigel®.* Gráfica de las veces de cambio de invasión de Matrigel® en células MCF-10A tratadas durante 72 horas con 1 µM o 2.5 µM de NaAsO₂. Se realizaron tres experimentos independientes con triplicado técnico. Se realizaron ANOVA de una vía y pruebas de Dunnett para determinar la significancia estadística de la diferencia del promedio entre las células control y las células tratadas (*p≤0.05; **p≤0.01, ***p≤0.001).

Efecto del NaAsO₂ en la expresión de blancos transcripcionales de GATA3

Existen múltiples blancos transcripcionales de GATA3 identificados en estudios de ChIP-seq usando líneas celulares de cáncer de mama y tumores mamarios primarios (Romano & Miccio, 2020). Entre estos blancos transcripcionales, seleccionamos los genes *CDH1*, *FOXA1*, *ESR1*, *PGR*, *ZEB2*, *CDH2*, y *BCL2* (Cuadro 2), para analizarlos por PCR cuantitativa (RT-qPCR) y Western blot cuantitativo con el objetivo de evaluar una reducción en la función de GATA3 inducida por los tratamientos con NaAsO₂.

En MCF-10A, los tratamientos con NaAsO₂ redujeron los niveles de las proteínas de la E-cadherina y de Bcl-2 (Figura 8A, 8C). Los tratamientos con NaAsO₂ no alteraron a FOXA1, la N-cadherina, ni al ER-α36 (Figura 8A, 8C). Los niveles de proteína del PR y de Zeb2 estuvieron por debajo del límite de detección del Western blot cuantitativo en MCF-10A. En la línea celular T-47D, el tratamiento con 2.5 µM de NaAsO₂ incrementó los niveles de proteína de FOXA1, y redujo la abundancia de las isoformas del ER-α y del PR (Figura 8B, 8D). Los niveles de proteína de Bcl-2, Zeb2 y de la N-cadherina estuvieron debajo de los límites de detección del Western blot cuantitativo en T-47D.

Cuadro 2. Blancos transcripcionales de GATA3 seleccionados.

Gen	Proteína	Función	Regulación por GATA3	Referencias
<i>CDH1</i>	E-cadherina	Proteína de uniones adherentes en tejido epitelial	Positiva	Yan et al., 2010
<i>FOXA1</i>	FOXA1	Factor de transcripción que promueve un fenotipo epitelial	Positiva	Bernardo et al., 2010
<i>ESR1</i>	ER- α	Receptor hormonal que regula proliferación celular	Positiva	Eeckhoute et al., 2007
<i>PGR</i>	PR	Receptor hormonal que regula proliferación celular	Positiva	Izzo et al., 2014
<i>ZEB2</i>	Zeb2	Factor de transcripción que promueve EMT	Negativa	Si et al., 2015
<i>CDH2</i>	N-cadherina	Proteína de uniones adherentes en tejido mesenquimatoso	Negativa	Si et al., 2015
<i>BCL2</i>	Bcl-2	Proteína antiapoptótica	Negativa	Cohen et al., 2014

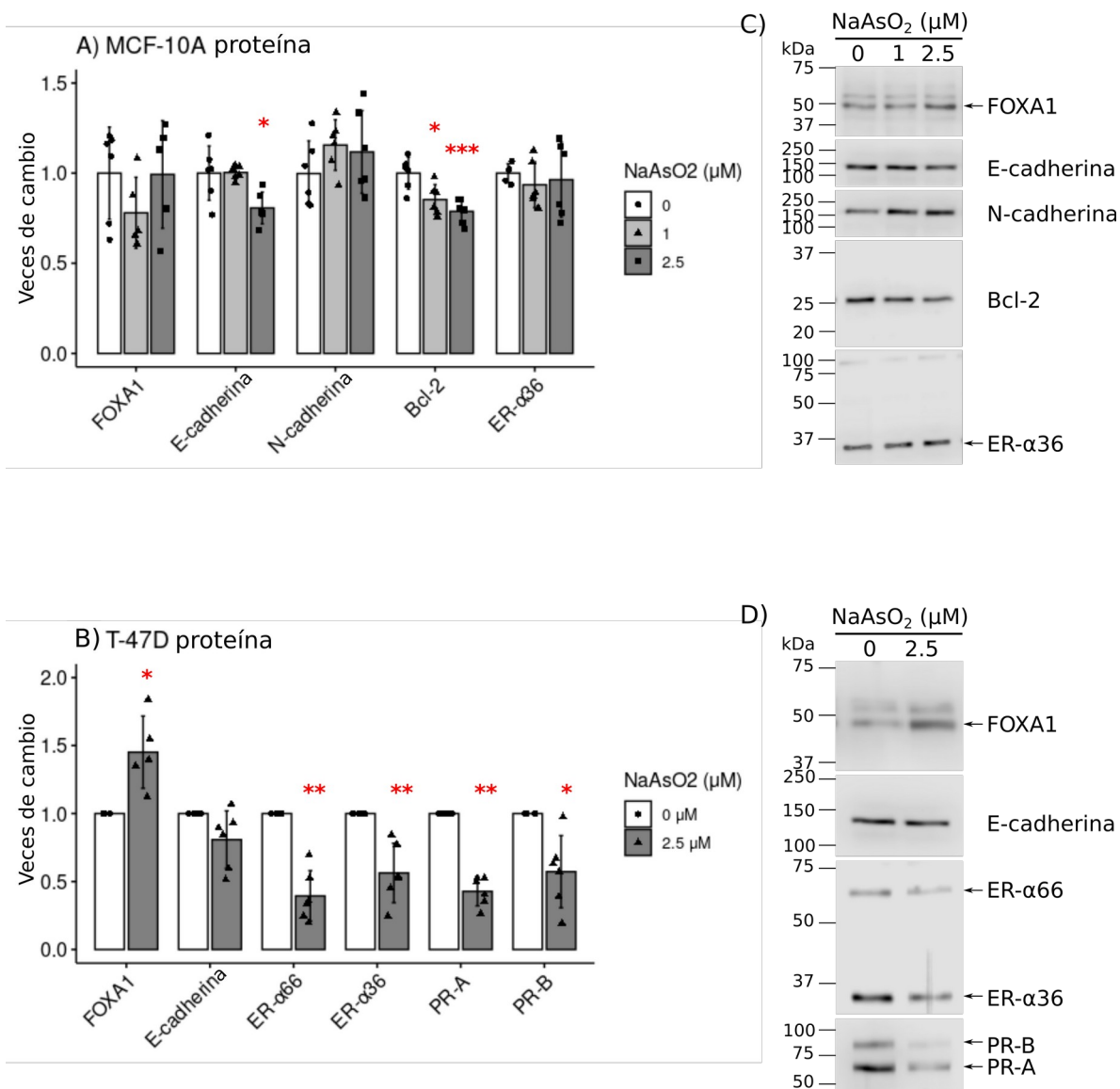


Figura 8. El tratamiento con NaAsO_2 altera los niveles de proteína de blancos transcripcionales de GATA3 en MCF-10A y en T-47D. Las gráficas muestran las veces de cambio de proteínas reguladas transcripcionalmente por GATA3 en A) MCF-10A y B) T-47D. Las células fueron tratadas por 72 horas con 1 o 2.5 μM de NaAsO_2 para obtener lisados celulares. Se realizó Western blot cuantitativo usando muestras de tres experimentos independientes analizadas por duplicado técnico. El gel teñido con azul de Commassie se usó como control de carga. Se realizaron ANOVA de una vía y pruebas de Dunnett (para MCF-10A) o pruebas t (para T-47D) para determinar la significancia estadística de la diferencia entre el promedio de los tratamientos comparados con el control (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). Se muestran imágenes representativas de los blots correspondientes a C) MCF-10A y D) T-47D.

En los análisis de niveles de mRNA por PCR cuantitativa, se encontró una reducción en los mRNAs de *GATA3*, *DCH1*, *ZEB2*, y *BCL2*, y un incremento en los niveles

de *FOXA1* y de *ESR1* inducidos por los tratamientos con NaAsO_2 en la línea celular MCF-10A (Figura 9A). En las células T-47D, el tratamiento con $2.5 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 incrementó los niveles de mRNA de *CDH1* y redujo los niveles de mRNA *ESR1* y *PGR*. Sin embargo, los niveles de mRNA de *GATA3*, *FOXA1*, y de *BCL2* no se alteraron (Figura 9B).

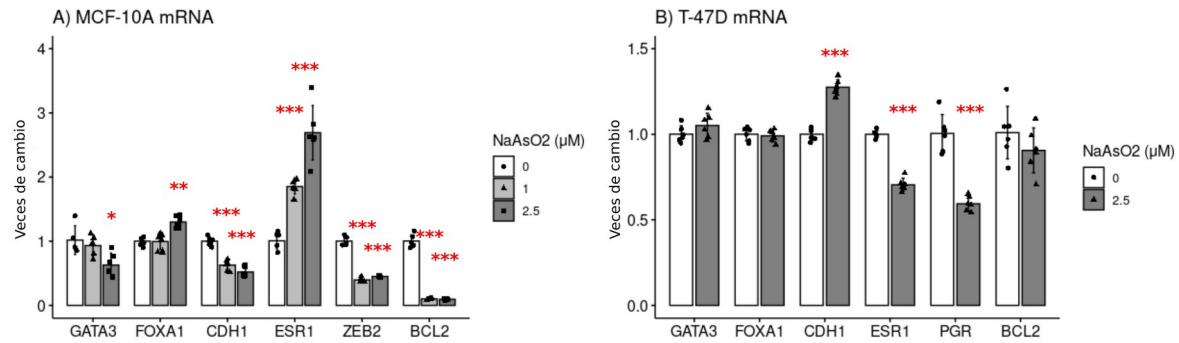


Figura 9. El tratamiento con NaAsO_2 altera los niveles de mRNA de blancos transcripcionales de *GATA3* en MCF-10A y T-47D. Las gráficas muestran las veces de cambio de los mRNAs regulados transcripcionalmente por *GATA3* en A) MCF-10A y B) T-47D. Las células fueron tratadas durante 72 horas con 1 o $2.5 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 para obtener muestras de RNA total. Se realizaron experimentos de RT-qPCR usando muestras de RNA de dos experimentos independientes, usando sondas TaqMan y siguiendo el método $\Delta\Delta\text{C}_T$. Se usó el mRNA de *GUSB* como control endógeno. Se realizaron ANOVA de una vía y pruebas de Dunnett (para MCF-10A) o pruebas t (para T-47D) para determinar la significancia estadística de la diferencia entre el promedio de los tratamientos comparados con el control (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

Sobreexpresión de *GATA3* en células MCF-10A

Se clonaron los plásmidos RSV/hGATA y *GATA3*-pCDNA3.1 y los plásmidos obtenidos se transfectaron transitoriamente en las células MCF-10A. Se evaluó la sobreexpresión de *GATA3* por medio de Western blot cuantitativo y se encontró que el uso exclusivo del reactivo de transfección (Figura 9, columna 2), de *GATA3*-pCDNA3.1 (Figura 9, columna 3) o de RSV/hGATA3 (Figura 9, columna 4) no indujo la sobreexpresión de *GATA3* respecto al control negativo (Figura 9, columna 1). Sin embargo, sí se sobreexpresó a *GATA3* al usar el reactivo de transfección en conjunto con

los plásmidos GATA3-pCDNA3.1 (Figura 9, columna 5) y RSV/hGATA3 (Figura 9, columna 6).

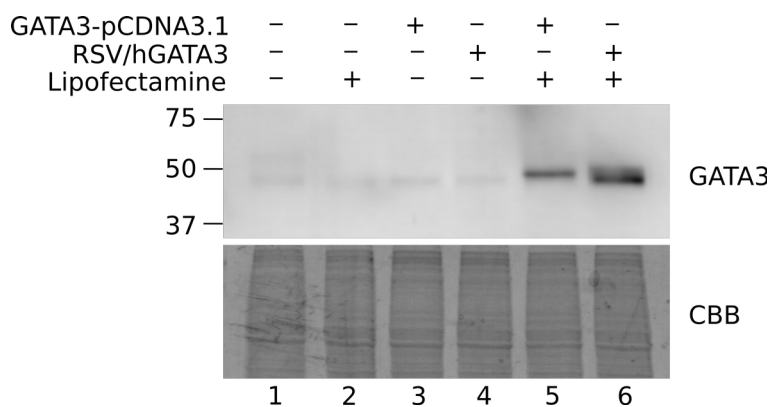


Figura 10. Sobreexpresión de GATA3 en MCF-10A. Se transfectaron células MCF-10A y se obtuvieron lisados celulares para analizar por Western blot cuantitativo. Se utilizó un control negativo, sin reactivo de transfección (Lipofectamine™ 3000) ni plásmidos (columna 1). Se usaron controles del reactivo de transfección (columna 2) y de los plásmidos GATA3-pCDNA3.1 (columna 3) y RSV/hGATA3 (columna 4). En las columnas 5 y 6 se presentan las muestras de las células MCF-10A transfectadas con los plásmidos GATA3-pCDNA3.1 y RSV/hGATA3, respectivamente.

A continuación, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de GATA3 en los niveles de mRNA analizados previamente para determinar la contribución de la reducción en la abundancia proteínica de GATA3 en las alteraciones inducidas por el tratamiento con NaAsO₂. Por ello, se realizó un tratamiento de 72 horas con 1 o 2.5 μ M de NaAsO₂ en las células MCF-10A y a continuación se realizó una transfección transitoria con el plásmido RSV/hGATA3 para sobreexpresar GATA3. Se encontró que la sobreexpresión de GATA3 incrementó los niveles del mRNA de *GATA3* en las células MCF-10A (Figura 12A). La sobreexpresión de GATA3 incrementó los niveles de mRNA de *CDH1* (Figura 12C), de *ESR1* (Figura 12D), de *ZEB2* (Figura 12E) y redujo el mRNA de *BCL2* (Figura 12F). Notablemente, la sobreexpresión de GATA3 revirtió la disminución en los niveles de mRNA de *ZEB2* inducida por el tratamiento con NaAsO₂ (Figura 10A), sugiriendo que el arsénico reduce la función de GATA3 en la línea celular MCF-10A.

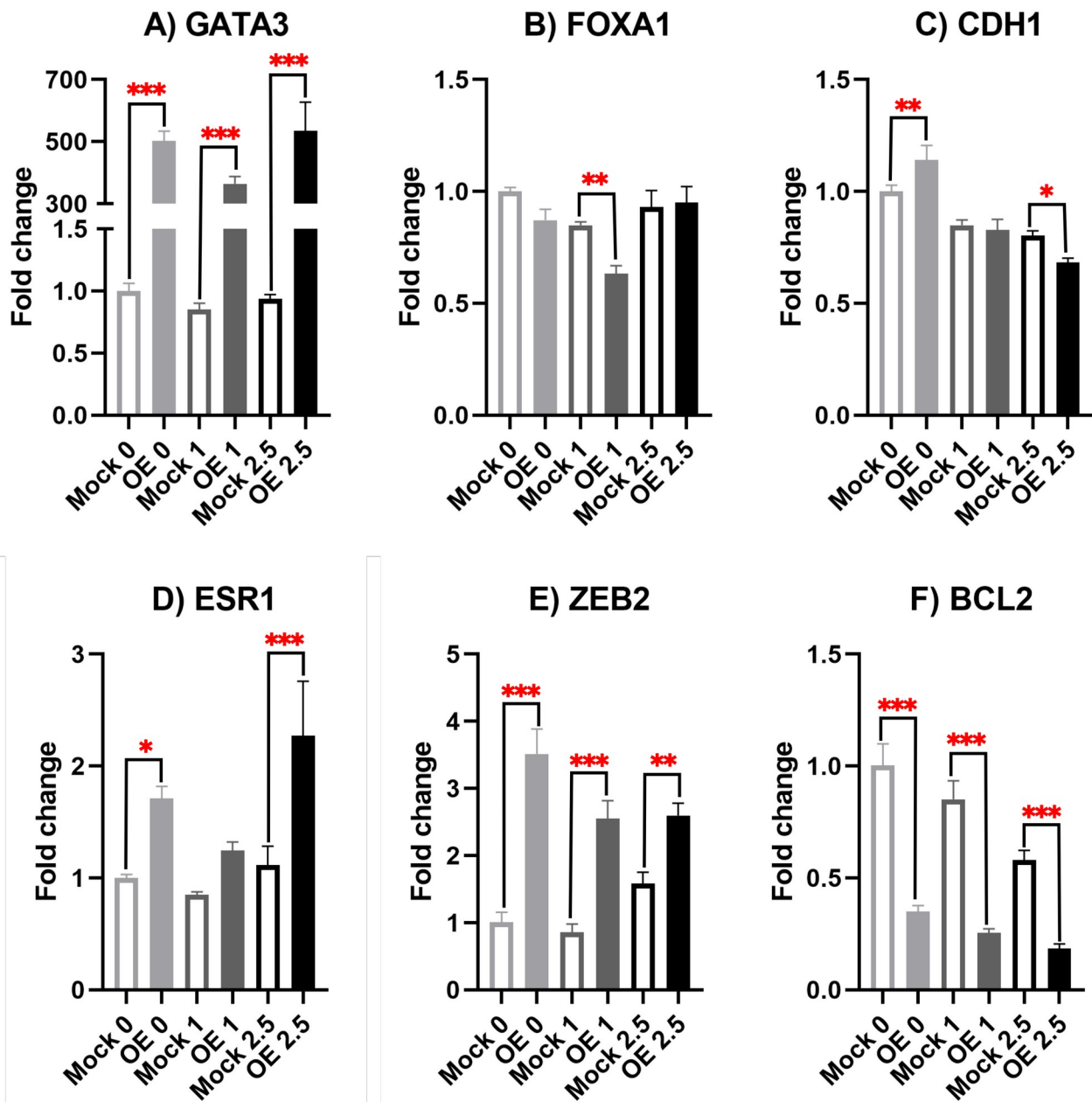


Figura 12. Efecto de la sobreexpresión de GATA3 en los niveles de mRNA de blancos transcripcionales de GATA3 en células MCF-10A tratadas con NaAsO₂. Gráfica de veces de cambio de los mRNA de A) *GATA3*, B) *FOXA1*, C) *CDH1*, D) *ESR1*, E) *ZEB2*, y F) *BCL2*. Al final de un tratamiento de 72 horas con 1 o 2.5 μ M de NaAsO₂, las células MCF-10A fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido RSV/hGATA3 para sobreexpresar GATA3. Después de 24 horas de transfección, se obtuvieron muestras de RNA total. Se realizó RT-qPCR en muestras de RNA de 2 experimentos independientes, usando sondas TaqMan® y empleando el método $\Delta\Delta C_T$. Se usó el mRNA de *GUSB* como control endógeno. Se realizó ANOVA de dos vías y prueba Tukey HSD para determinar la significancia estadística de la diferencia entre el promedio de las células control y las que sobreexpresan a GATA3 (OE) (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

Discusión

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) clasifica al arsénico como un carcinógeno para humanos porque se considera que existe evidencia suficiente que relaciona la exposición a arsénico con el desarrollo de cáncer de piel, pulmón, riñón, y vejiga en personas expuestas a arsénico a través del agua para beber (IARC, 2012). Recientemente, la exposición ambiental al arsénico también se ha relacionado con el desarrollo de cáncer de mama en estudios epidemiológicos (Pullella & Kotsopoulos, 2020). En este estudio, se caracterizó el efecto de la exposición a arsénico en los niveles de proteína de GATA3, un factor de transcripción que es esencial para el desarrollo de la glándula mamaria y para la diferenciación de las células luminales progenitoras, cuya función se encuentra alterada durante el desarrollo de cáncer de mama (Kouros-Mehr et al., 2008). Encontramos que un tratamiento de 72 horas con concentraciones no citotóxicas de 1 y 2.5 μM de NaAsO_2 redujo los niveles de proteína de GATA3 en las líneas celulares MCF-10A y T-47D, pero no en MDA-MB-453. Este resultado sugiere una reducción en la función de GATA3 en MCF-10A y T-47D. Se ha reportado que los niveles de arsénico en agua para beber pueden alcanzar los 300 $\mu\text{g As/L}$ en localidades con fuentes de agua contaminadas por minerales de arsénico, y que estos niveles de arsénico en suelo y en agua para beber pueden ser mayores en localidades cercanas a instalaciones mineras (IARC et al., 2012; López-Carrillo et al., 2014; Ongley et al., 2007). Debido a que 2.5 μM de NaAsO_2 corresponde aproximadamente a 200 $\mu\text{g As/L}$, nuestros tratamientos utilizan concentraciones de arsénico que son ambientalmente relevantes. No se determinó la razón de la ausencia de efecto de los tratamientos con NaAsO_2 en los niveles de proteína de GATA3. Sin embargo, una característica común entre MCF-10A y T-47D es la expresión del ER- α (Hevir et al., 2011; Lee et al., 2014), ausente

en MDA-MB-453 (Lukey et al., 2019). Nuestros resultados sugieren que el arsénico reduce los niveles de proteína de GATA3 solo en células ER- α + y que podría afectar la función de GATA3 principalmente en células del epitelio mamario que expresan el ER- α .

La reducción en los niveles de GATA3 está relacionada con un incremento en la proliferación y migración celular en MCF-10A, nuestro modelo del epitelio mamario normal, pero no en T-47D, nuestro modelo de células de cáncer de mama. Debido a que GATA3 contribuye a controlar la proliferación celular en el epitelio mamario normal (Kouros-Mehr et al., 2006, 2008), podría existir una relación directa entre la reducción de niveles de proteína de GATA3 y el incremento en la proliferación celular en MCF-10A. En contraste, la reducción en los niveles de proteína de GATA3 con el tratamiento con 2.5 μ M de NaAsO₂ coincidió con una reducción en la proliferación celular en T-47D. A diferencia de lo que ocurre en el epitelio mamario normal, GATA3 promueve el progreso en el ciclo celular y la proliferación en células de cáncer de mama, al favorecer la transcripción de los receptores nucleares mitogénicos ER- α and PR (Izzo et al., 2014; Lee et al., 2014), por lo que la reducción en GATA3 con el tratamiento con 2.5 μ M de NaAsO₂ podría estar asociada a la reducción en la proliferación celular observada. Este tratamiento redujo los niveles de proteína y de mRNA del ER- α y del PR en T-47D, sugiriendo que la reducción en la expresión de GATA3 está asociada también con la reducción en la expresión de estos receptores hormonales, plausiblemente debido a una disminución en la transcripción. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que GATA3 inhibe la proliferación celular en células mamarias normales y que la promueve en células de cáncer de mama. También, que GATA3 podría actuar como un gen supresor de tumores en MCF-10A, pues la reducción de su expresión se relaciona con un incremento en la proliferación celular, pero como un oncogén en T-47D, pues la disminución en su abundancia proteínica está relacionada con

una disminución en la proliferación celular. Coincidentemente con esta conclusión, se ha sugerido que GATA3 puede actuar como un gen supresor de tumores en células del epitelio mamario y que puede promover el desarrollo tumoral en células de cáncer de mama, pues GATA3 inhibe la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en células epiteliales mamarias normales (HMEC) pero la promueve en células de cáncer de mama MCF-7 (Cohen et al., 2014). En células MCF-10A, los tratamientos con NaAsO₂ incrementaron la migración celular, sugiriendo que el arsénico incrementa la EMT. Este incremento en migración celular también podría estar relacionado a los niveles de proteína disminuidos de GATA3 y de la E-cadherina, proteínas que promueven la diferenciación de las células luminales progenitoras e inhiben la EMT y la metástasis en células de cáncer de mama (Asselin-Labat et al., 2007; Kouros-Mehr et al., 2006, 2008; Yan et al., 2010). Sin embargo, el incremento en la migración celular coincidió con una reducción en la invasión de Matrigel®. Estos resultados sugieren una reducción en la capacidad de degradar la membrana basal inducida por los tratamientos con NaAsO₂ en MCF-10A. Se ha observado previamente que la migración y la invasión celular son dos procesos que pueden estar desacoplados durante la EMT (Schaeffer et al., 2014), y posiblemente en nuestros experimentos la migración y la invasión celular también están desacopladas.

Se ha propuesto que GATA3 promueve la transcripción de su propio mRNA y también de los mRNAs de *ESR1*, *PGR* y *CDH1*, mientras que reprime los mRNAs de *ZEB2* y *BCL2* en las líneas celulares MCF-7 y T-47D (Bernardo et al., 2010; Cohen et al., 2014; Eeckhoutte et al., 2007; Izzo et al., 2014; Si et al., 2015; Yan et al., 2010). Con base en esta propuesta generada con líneas celulares de cáncer de mama, los niveles de mRNA sugieren una reducción en la función de GATA3 en T-47D, pues el tratamiento con NaAsO₂ reduce los mRNAs de *ESR1* y *PGR*, regulados positivamente por GATA3. Sin

embargo, el análisis de los niveles de mRNA en MCF-10A no indica claramente una reducción en la función de GATA3 inducida por los tratamientos con NaAsO₂. Una posibilidad que podría explicar esto es que la regulación de la transcripción por GATA3 es diferente en MCF-10A y en las líneas celulares de cáncer de mama, como puede sugerirlo las diferencias en la estructura de la cromatina y sus implicaciones para la regulación transcripcional entre diferentes líneas celulares (Pellacani et al., 2019). Sin embargo, para determinar la contribución de GATA3 a la regulación de los mRNA analizados, se sobreexpresó a GATA3 en células MCF-10A tratadas con NaAsO₂. Los resultados obtenidos sugieren que GATA3 promueve la transcripción de *CDH1* y de *ESR1*, mientras que reprime la expresión de *BCL2*, de forma similar a lo propuesto anteriormente (Adomas et al., 2014; Lee et al., 2014; Yan et al., 2010). Sin embargo, mientras que en células MCF-7 GATA3 reprime la transcripción de *ZEB2* (Si et al., 2015), nosotros encontramos que la sobreexpresión de GATA3 incrementó los niveles del mRNA de *ZEB2* en MCF-10A. Este resultado sugiere que la regulación de la transcripción de *ZEB2* por GATA3 podría ser diferente en MCF-10A respecto a lo previamente reportado en MCF-7. Además, encontramos que la sobreexpresión de GATA3 revirtió el efecto de los tratamientos de NaAsO₂ en el mRNA de *ZEB2*, sugiriendo que el arsénico reduce la función de GATA3 en la regulación de la transcripción de *ZEB2*.

Adicionalmente, queda por determinar si la reducción en la invasión celular de Matrigel® es compatible con el incremento en la migración celular y si ambos patrones son congruentes con un incremento en la EMT y en el desarrollo tumoral. La falta de un efecto significativo en los niveles de proteína de GATA3 en la línea celular MDA-MB-453 está probablemente relacionada a la falta de expresión del ER- α y del PR, pero esto requiere ser evaluado experimentalmente. Los tratamientos con NaAsO₂ incrementan tanto la

proliferación como la migración celular solo en MCF-10A, nuestro modelo del epitelio mamario normal, lo que sugiere que la exposición a arsénico es un iniciador del desarrollo de cáncer de mama y que su mecanismo carcinogénico incluye la reducción en la expresión de GATA3 en células del epitelio mamario. Esto también explicaría la falta de un efecto significativo en las líneas celulares de cáncer de mama T-47D y MDA-MB-453, que ya están transformadas. Se ha observado anteriormente que el arsénico interacciona con GATA1 y GATA2 en células del linaje eritro-megakariocítico, reduciendo la función de estos factores de transcripción y contribuyendo a inducir alteraciones asociadas con desordenes hematológicos (Medina et al., 2022; Zhou et al., 2020). Nuestros datos sugieren que el arsénico reduce la función de GATA3, otro miembro de la familia de factores de transcripción GATA, en células MCF-10A y T-47D, e incrementa la proliferación y la migración celular en MCF-10A, indicando un incremento en el desarrollo de cáncer de mama.

Conclusiones

En este trabajo se evaluó la función de GATA3 en líneas celulares derivadas del epitelio mamario expuestas a NaAsO₂ y su relación con los cambios fenotípicos inducidos por el tratamiento, como un modelo del desarrollo de cáncer de mama inducido por la exposición a arsénico. Se encontró que el tratamiento con NaAsO₂ redujo la expresión de GATA3 en MCF-10A e incrementó la proliferación y la migración celular en esta línea celular. El tratamiento con NaAsO₂ también alteró la expresión génica de diversos marcadores moleculares relevantes en el contexto del cáncer de mama y que están regulados transcripcionalmente por GATA3, sugiriendo un incremento en el desarrollo tumoral. Estos datos sugieren que la exposición a NaAsO₂ reduce la función de GATA3 en células derivadas del epitelio mamario y genera alteraciones relacionadas directamente con el desarrollo de cáncer de mama.

Referencias

- Adomas, A. B., Grimm, S. A., Malone, C., Takaku, M., Sims, J. K., & Wade, P. A. (2014). Breast tumor specific mutation in GATA3 affects physiological mechanisms regulating transcription factor turnover. *BMC Cancer*, *14*(1), 278. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-27>
- Asselin-Labat, M.-L., Sutherland, K. D., Barker, H., Thomas, R., Shackleton, M., Forrest, N. C., Hartley, L., Robb, L., Grosveld, F. G., van der Wees, J., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nature Cell Biology*, *9*(2), 201–209. <https://doi.org/10.1038/ncb1530>
- Bernardo, G. M., Lozada, K. L., Miedler, J. D., Harburg, G., Hewitt, S. C., Mosley, J. D., Godwin, A. K., Korach, K. S., Visvader, J. E., Kaestner, K. H., Abdul-Karim, F. W., Montano, M. M., & Keri, R. A. (2010). FOXA1 is an essential determinant of ERalpha expression and mammary ductal morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, *137*(12), 2045–2054. <https://doi.org/10.1242/DEV.043299>
- Bodwell, J. E., Gosse, J. A., Nomikos, A. P., & Hamilton, J. W. (2006). Arsenic disruption of steroid receptor gene activation: Complex dose - Response effects are shared by several steroid receptors. *Chemical Research in Toxicology*, *19*(12), 1619–1629. <https://doi.org/10.1021/tx060122q>
- Bouchal, P., Schubert, O. T., Faktor, J., Capkova, L., Imrichova, H., Zoufalova, K., Paralova, V., Hrstka, R., Liu, Y., Ebhardt, H. A., Budinska, E., Nenutil, R., & Aebersold, R. (2019). Breast Cancer Classification Based on Proteotypes Obtained by SWATH Mass Spectrometry. *Cell Reports*, *28*(3), 832-843.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.046>
- Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., Melino, G., & Raschellà, G. (2017). Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery*, *3*(1). <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.71>
- Chatterjee, A., & Chatterji, U. (2010). Arsenic abrogates the estrogen-signaling pathway in the rat uterus. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *8*, 80. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-80>
- Chen, Q. Y., DesMarais, T., & Costa, M. (2019). Metals and Mechanisms of Carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *59*(1), 537–554. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021031>
- Chen, Y., Bates, D. L. L., Dey, R., Chen, P.-H. H., Machado, A. C. D. C. D., Laird-Offringa, I. A. A., Rohs, R., & Chen, L. (2012). DNA Binding by GATA Transcription Factor Suggests Mechanisms of DNA Looping and Long-Range Gene

- Regulation. *Cell Reports*, 2(5), 1197–1206.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.012>
- Chen, S., Le Wu, J., Liang, Y., Tang, Y.G., Song, H.X., Wu, L.L., Xing, Y.F., Yan, N., Li, Y. T., Wang, Z.Y., Xiao, S.J., Lu, X., Chen, S.J., Lu, M., 2021. Arsenic trioxide rescues structural p53 mutations through a cryptic allosteric site. *Cancer Cell* 39, 225–239e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.11.013>.
- Cohen, H., Ben-Hamo, R., Gidoni, M., Yitzhaki, I., Kozol, R., Zilberberg, A., & Efroni, S. (2014). Shift in GATA3 functions, and GATA3 mutations, control progression and clinical presentation in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 16(1).
<https://doi.org/10.1186/s13058-014-0464-0>
- Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., & Li, J. (2017). Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, 8(16), 3131–3141.
<https://doi.org/10.7150/jca.18457>
- Davey, J. C., Bodwell, J. E., Gosse, J. A., & Hamilton, J. W. (2007). Arsenic as an Endocrine Disruptor: Effects of Arsenic on Estrogen Receptor–Mediated Gene Expression In Vivo and in Cell Culture. *Toxicological Sciences*, 98(1), 75–86.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm013>
- Dontu, G., & Ince, T. A. (2015). Of Mice and Women: A Comparative Tissue Biology Perspective of Breast Stem Cells and Differentiation. In *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* (Vol. 20, Issues 1–2, pp. 51–62). Springer New York LLC.
<https://doi.org/10.1007/s10911-015-9341-4>
- Du, F., Yuan, P., Wang, T., Zhao, J., Zhao, Z., Luo, Y., & Xu, B. (2015). The Significance and Therapeutic Potential of GATA3 Expression and Mutation in Breast Cancer: A Systematic Review. *Medicinal Research Reviews*, 35(6), 1300–1315.
<https://doi.org/10.1002/med.21362>
- Eeckhoute, J., Keeton, E. K., Lupien, M., Krum, S. A., Carroll, J. S., & Brown, M. (2007). Positive Cross-Regulatory Loop Ties GATA-3 to Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer. *Cancer Research*, 67(13), 6477–6483. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0746>
- Eiro, N., Gonzalez, L. O., Fraile, M., Cid, S., Schneider, J., & Vizoso, F. J. (2019). Breast Cancer Tumor Stroma: Cellular Components, Phenotypic Heterogeneity, Intercellular Communication, Prognostic Implications and Therapeutic Opportunities. *Cancers*, 11(5), 1–26. <https://doi.org/10.3390/CANCERS11050664>
- Feeley, L. P., Mulligan, A. M., Pinnaduwege, D., Bull, S. B., & Andrulis, I. L. (2013). Distinguishing luminal breast cancer subtypes by Ki67, progesterone receptor or TP53 status provides prognostic information. *Modern Pathology* 2014 27:4, 27(4), 554–561.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.153>

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hannan, F. M., Elajnaf, T., Vandenberg, L. N., Kennedy, S. H., & Thakker, R. V. (2022). Hormonal regulation of mammary gland development and lactation. *Nature Reviews Endocrinology* 2022 19:1, 19(1), 46–61. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00742-y>
- Harbeck, N., & Gnant, M. (2017). Breast cancer. *The Lancet*, 389(10074), 1134–1150. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 1–31. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Hevir, N., Trošt, N., Debeljak, N., & Lanišnik Rižner, T. (2011). Expression of estrogen and progesterone receptors and estrogen metabolizing enzymes in different breast cancer cell lines. *Chemico-Biological Interactions*, 191(1–3), 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.12.013>
- Ho, I. C., Tai, T. S., & Pai, S. Y. (2009). GATA3 and the T-cell lineage: Essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 9, Issue 2, pp. 125–135). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri2476>
- Höller, A., Nguyen-Sträuli, B. D., Frauchiger-Heuer, H., & Ring, A. (2023). “Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Luminal Breast Cancer: Where are We Now?” *Breast Cancer* (Dove Medical Press), 15, 525–540. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S340741>
- Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13(4), 215. <https://doi.org/10.1186/bcr2889>
- IARC. (2012). Arsenic, metals, fibres, and dusts. In International Agency for Research on Cancer & Weltgesundheitsorganisation (Eds.), *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer* (Vol. 100, Issue Pt C). IARC. <https://doi.org/10.9789/283213208>
- Inman, J. L., Robertson, C., Mott, J. D., & Bissell, M. J. (2015). Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development*, 142(6), 1028–1042. <https://doi.org/10.1242/dev.087643>
- Izzo, F., Mercogliano, F., Venturutti, L., Tkach, M., Inurrigarro, G., Schillaci, R., Cerchietti, L., Elizalde, P. V., & Proietti, C. J. (2014). Progesterone receptor activation downregulates GATA3 by transcriptional repression and increased protein turnover promoting breast tumor growth. *Breast Cancer Research*, 16(6), 491. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0491-x>

- Jen, J., & Wang, Y. C. (2016). Zinc finger proteins in cancer progression. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 23, Issue 1, p. 53). BioMed Central Ltd.
<https://doi.org/10.1186/s12929-016-0269-9>
- Kitchin, K. T., & Wallace, K. (2005). Arsenite binding to synthetic peptides based on the Zn finger region and the estrogen binding region of the human estrogen receptor- α . *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206(1), 66–72.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.12.010>
- Kouros-Mehr, H., Bechis, S. K., Slorach, E. M., Littlepage, L. E., Egeblad, M., Ewald, A. J., Pai, S. Y., Ho, I. C., & Werb, Z. (2008). GATA-3 Links Tumor Differentiation and Dissemination in a Luminal Breast Cancer Model. *Cancer Cell*, 13(2), 141–152.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.01.011>
- Kouros-Mehr, H., Slorach, E. M., Sternlicht, M. D., & Werb, Z. (2006). GATA-3 Maintains the Differentiation of the Luminal Cell Fate in the Mammary Gland. *Cell*, 127(5), 1041–1055. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.048>
- Krishna, S. S., Majumdar, I., & Grishin, N. V. (2003). Structural classification of zinc fingers. *Nucleic Acids Research*, 31(2), 532–550. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg161>
- Kumagai, Y., & Sumi, D. (2007). Arsenic: Signal Transduction, Transcription Factor, and Biotransformation Involved in Cellular Response and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 243–262.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105144>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>
- Lee, J., Tiwari, A., Shum, V., Mills, G. B., Mancini, M. A., Igoshin, O. A., & Balázsi, G. (2014). Unraveling the regulatory connections between two controllers of breast cancer cell fate. *Nucleic Acids Research*, 42(11), 6839–6849.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKU360>
- Liu, R., Nelson, D. O., Hurley, S., Hertz, A., & Reynolds, P. (2015). Residential exposure to estrogen disrupting hazardous air pollutants and breast cancer risk: the California Teachers Study. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 26(3), 365–373.
<https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000277>
- López-Carrillo, L., Hernández-Ramírez, R. U., Gandolfi, A. J., Ornelas-Aguirre, J. M., Torres-Sánchez, L., & Cebrian, M. E. (2014). Arsenic methylation capacity is associated with breast cancer in Northern Mexico. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280(1), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.07.013>

- Lukey, M. J., Cluntun, A. A., Katt, W. P., Lin, M. chong J., Druso, J. E., Ramachandran, S., Erickson, J. W., Le, H. H., Wang, Z. E., Blank, B., Greene, K. S., & Cerione, R. A. (2019). Liver-Type Glutaminase GLS2 Is a Druggable Metabolic Node in Luminal-Subtype Breast Cancer. *Cell Reports*, 29(1), 76. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.08.076>
- Macias, H., & Hinck, L. (2012). Mammary gland development. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* (Vol. 1, Issue 4, pp. 533–557). Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. <https://doi.org/10.1002/wdev.35>
- Marciniak, W., Derkacz, R., Muszyńska, M., Baszuk, P., Gronwald, J., Huzarski, T., Cybulski, C., Jakubowska, A., Falco, M., Dębniak, T., Lener, M., Oszurek, O., Pullella, K., Kotsopoulos, J., Sun, P., Narod, S. A., & Lubiński, J. (2019). Blood arsenic levels and the risk of familial breast cancer in Poland. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.32595>
- McDonough A, Veiras LC, Minas JN & Ralph DL 2014 Considerations when quantitating protein abundance by immunoblot. *American Journal of Physiology: Cell Physiology* 308 C426–C433. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00400.2014>
- Medina, S., Zhang, H., Santos-Medina, L. v., Wan, G., Bolt, A. M., Zhou, X., Burchiel, S. W., & Liu, K. J. (2022). Arsenic impairs the lineage commitment of hematopoietic progenitor cells through the attenuation of GATA-2 DNA binding activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 452, 116193. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2022.116193>
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J. P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P. T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N. J., Kuo, W. L., Stilwell, J. L., Pinkel, D., Albertson, D. G., ... Gray, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10(6), 515–527. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008>
- Ongley, L. K., Sherman, L., Armienta, A., Concilio, A., & Salinas, C. F. (2007). Arsenic in the soils of Zimapán, Mexico. *Environmental Pollution*, 145(3), 793–799. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2006.05.014>
- Pellacani, D., Tan, S., Lefort, S., & Eaves, C. J. (2019). Transcriptional regulation of normal human mammary cell heterogeneity and its perturbation in breast cancer. *The EMBO Journal*, 38(14), e100330. <https://doi.org/10.15252/emj.2018100330>
- Pereira, B., Chin, S.-F., Rueda, O. M., Vollan, H.-K. M., Provenzano, E., Bardwell, H. A., Pugh, M., Jones, L., Russell, R., Sammut, S.-J., Tsui, D. W. Y., Liu, B., Dawson, S.-J., Abraham, J., Northen, H., Peden, J. F., Mukherjee, A., Turashvili, G., Green, A. R., ... Caldas, C. (2016). The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refine their

- genomic and transcriptomic landscapes. *Nature Communications*, 7(1), 11479.
<https://doi.org/10.1038/ncomms11479>
- Pullella, K., & Kotsopoulos, J. (2020). Arsenic exposure and breast cancer risk: A re-evaluation of the literature. *Nutrients*, 12(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nu12113305>
- Qu, Y., Han, B., Yu, Y., Yao, W., Bose, S., Karlan, B. Y., Giuliano, A. E., & Cui, X. (2015). Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. *PLOS ONE*, 10(7), e0131285.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131285>
- Romano, O., & Miccio, A. (2020). GATA factor transcriptional activity: Insights from genome-wide binding profiles. In *IUBMB Life* (Vol. 72, Issue 1, pp. 10–26). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/iub.2169>
- Ronchetti, S. A., Novack, G. V., Bianchi, M. S., Crocco, M. C., Duvilanski, B. H., & Cabilla, J. P. (2016). In vivo xenoestrogenic actions of cadmium and arsenic in anterior pituitary and uterus. *Reproduction*, 152(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1530/REP-16-0115>
- Schaeffer, D., Somarelli, J. A., Hanna, G., Palmer, G. M., & Garcia-Blanco, M. A. (2014). Cellular migration and invasion uncoupled: increased migration is not an inexorable consequence of epithelial-to-mesenchymal transition. *Molecular and Cellular Biology*, 34(18), 3486–3499. <https://doi.org/10.1128/MCB.00694-14>
- Shen, S., Li, X. F., Cullen, W. R., Weinfeld, M., & Le, X. C. (2013). Arsenic binding to proteins. In *Chemical Reviews* (Vol. 113, Issue 10, pp. 7769–7792). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/cr300015c>
- Si, W., Huang, W., Zheng, Y., Yang, Y., Liu, X., Shan, L., Zhou, X., Wang, Y., Su, D., Gao, J., Yan, R., Han, X., Li, W., He, L., Shi, L., Xuan, C., Liang, J., Sun, L., Wang, Y., & Shang, Y. (2015). Dysfunction of the Reciprocal Feedback Loop between GATA3- and ZEB2-Nucleated Repression Programs Contributes to Breast Cancer Metastasis. *Cancer Cell*, 27(6), 822–836. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.04.011>
- Smedley, P. L., & Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. In *Applied Geochemistry* (Vol. 17, Issue 5, pp. 517–568). Pergamon. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00018-5](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00018-5)
- Stoica, A., Pentecost, E., & Martin, M. B. (2000). Effects of arsenite on estrogen receptor- α expression activity in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*, 141(10), 3595–3602.
<https://doi.org/10.1210/endo.141.10.7704>
- Sun, X., Zhou, X., Du, L., Liu, W., Liu, Y., Hudson, L. G., & Liu, K. J. (2014). Arsenite binding-induced zinc loss from PARP-1 is equivalent to zinc deficiency in reducing

- PARP-1 activity, leading to inhibition of DNA repair. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274(2), 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.11.010>
- Takaku, M., Grimm, S. A., De Kumar, B., Bennett, B. D., & Wade, P. A. (2020). Cancer-specific mutation of GATA3 disrupts the transcriptional regulatory network governed by Estrogen Receptor alpha, FOXA1 and GATA3. *Nucleic Acids Research*, 48(9), 4756–4768. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa179>
- Takaku, M., Grimm, S. A., Roberts, J. D., Chrysovergis, K., Bennett, B. D., Myers, P., Perera, L., Tucker, C. J., Perou, C. M., & Wade, P. A. (2018). GATA3 zinc finger 2 mutations reprogram the breast cancer transcriptional network. *Nature Communications*, 9(1), 1059. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03478-4>
- Takaku, M., Grimm, S. A., & Wade, P. A. (2015). GATA3 in Breast Cancer: Tumor Suppressor or Oncogene? *Gene Expression*, 16(4), 163–168. <https://doi.org/10.3727/105221615X14399878166113>
- Tanaka, H., Takizawa, Y., Takaku, M., Kato, D., Kumagawa, Y., Grimm, S. A., Wade, P. A., & Kurumizaka, H. (2020). Interaction of the pioneer transcription factor GATA3 with nucleosomes. *Nature Communications*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17959-y>
- TCGA. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Tharmapalan, P., Mahendralingam, M., Berman, H. K., & Khokha, R. (2019). Mammary stem cells and progenitors: targeting the roots of breast cancer for prevention. *The EMBO Journal*, 38(14). <https://doi.org/10.15252/embj.2018100852>
- Theodorou, V., Stark, R., Menon, S., & Carroll, J. S. (2013). GATA3 acts upstream of FOXA1 in mediating ESR1 binding by shaping enhancer accessibility. *Genome Research*, 23(1), 12–22. <https://doi.org/10.1101/gr.139469.112>
- Tremblay, M., Sanchez-Ferras, O., & Bouchard, M. (2018). Gata transcription factors in development and disease. *Development (Cambridge)*, 145(20). <https://doi.org/10.1242/dev.164384>
- Udensi, U. K., Cohly, H. H. P., Graham-Evans, B. E., Ndebele, K., Garcia-Reyero, N., Nanduri, B., Tchounwou, P. B., & Isokpehi, R. D. (2011). Aberrantly expressed genes in HaCaT keratinocytes chronically exposed to arsenic trioxide. *Biomarker Insights*, 6, 7–16. <https://doi.org/10.4137/BMI.S6383>
- Vergara-Gerónimo, C. A., León Del Río, A., Rodríguez-Dorantes, M., Ostrosky-Wegman, P., & Salazar, A. M. (2021). Arsenic-protein interactions as a mechanism of arsenic toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 431. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2021.115738>

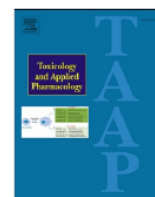
- Welinder, C., & Ekblad, L. (2011). Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *Journal of Proteome Research*, *10*(3), 1416–1419.
https://doi.org/10.1021/PR1011476/ASSET/IMAGES/MEDIUM/PR-2010-011476_0001.GIF
- Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., & Johnson, K. R. (2008). Cadherin switching. *Journal of Cell Science*, *121*(6), 727–735.
<https://doi.org/10.1242/jcs.000455>
- Yan, W., Cao, Q. J., Arenas, R. B., Bentley, B., & Shao, R. (2010). GATA3 inhibits breast cancer metastasis through the reversal of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(18), 14042–14051.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.105262>
- Yu, S., Jiang, X., Li, J., Li, C., Guo, M., Ye, F., Zhang, M., Jiao, Y., & Guo, B. (2019). Comprehensive analysis of the GATA transcription factor gene family in breast carcinoma using gene microarrays, online databases and integrated bioinformatics. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40811-3>
- Zhou, X., Sun, X., Cooper, K. L., Wang, F., Liu, K. J., & Hudson, L. G. (2011). Arsenite interacts selectively with zinc finger proteins containing C3H1 or C4 motifs. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(26), 22855–22863.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.232926>
- Zhou, X., Medina, S., Bolt, A. M., Zhang, H., Wan, G., Xu, H., Lauer, F. T., Wang, S. C., Burchiel, S. W., & Liu, K. J. (2020). Inhibition of red blood cell development by arsenic-induced disruption of GATA-1. *Scientific Reports*, *10*(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-76118-x>

Anexo 1.

Condiciones del Western blot cuantitativo para las diferentes proteínas analizadas en este estudio, en las líneas celulares MCF-10A, T-47D y MDA-MB-453. Se indican las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios y el sustrato en el que fueron transferidas las proteínas tras la SDS-PAGE.

Línea celular	Anticuerpo primario				Anticuerpo secundario				Transferencia	
	Nombre	Dilución	Incubació	Nombre	Dilución	Incubació	Membrana	Tiempo		
MCF-10A	GATA3	1:250	72 hrs	Anti-rata HRP	1:250	1 hr	PVDF	90 min		
	ER- α	1:400	72 hrs	Anti-ratón HRP	1:5,000	1 hr	PVDF	90 min		
	Bcl-2	1:100	72 hrs	Anti-ratón HRP	1:5,000	1 hr	PVDF	90 min		
	E-cadherina	1:500	72 hrs	Anti-conejo HRP	1:10,000	1 hr	PVDF	90 min		
	N-cadherina	1:500	72 hrs	Anti-conejo HRP	1:2,500	1 hr	PVDF	90 min		
	FOXA1	1:500	72 hrs	Anti-conejo HRP	1:2,500	1 hr	PVDF	90 min		
T-47D	GATA3	1:500	24 hrs	Anti-rata HRP	1:2,000	1 hr	Nitrocelulosa	50 min		
	ER- α	1:800	24 hrs	Anti-ratón HRP	1:2,500	1 hr	Nitrocelulosa	50 min		
	PR	1:200	24 hrs	Anti-ratón HRP	1:2,500	1 hr	Nitrocelulosa	50 min		
	E-cadherina	1:2,000	24 hrs	Anti-conejo HRP	1:5,000	1 hr	Nitrocelulosa	50 min		
	FOXA1	1:1,000	24 hrs	Anti-conejo HRP	1:5,000	1 hr	Nitrocelulosa	50 min		
	GATA3	1:500	24 hrs	Anti-rata HRP	1:2,000	1 hr	Nitrocelulosa	50 min		
MDA-MB-453	N-cadherina	1:500	24 hrs	Anti-conejo HRP	1:5,000	1 hr	Nitrocelulosa	50 min		
	FOXA1	1:1,000	24 hrs	Anti-conejo HRP	1:5,000	1 hr	Nitrocelulosa	50 min		
	FOXA1	1:1,000	24 hrs	Anti-conejo HRP	1:5,000	1 hr	Nitrocelulosa	50 min		

Publicaciones durante los estudios de doctorado



Invited Review Article

Arsenic-protein interactions as a mechanism of arsenic toxicity

Cristian A. Vergara-Gerónimo^a, Alfonso León Del Río^a, Mauricio Rodríguez-Dorantes^b,
Patricia Ostrosky-Wegman^a, Ana María Salazar^{a,*}

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70228, Ciudad de México, Mexico

^b Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Editor: Lawrence Lash

Keywords:

Arsenic
Protein
Interaction
Cysteine
Zinc finger

ABSTRACT

Millions of people worldwide are exposed to arsenic, a metalloid listed as one of the top chemical pollutants of concern to human health. Epidemiological and experimental studies link arsenic exposure to the development of cancer and other diseases. Several mechanisms have been proposed to explain the effects induced by arsenic. Notably, arsenic and its metabolites interact with proteins by direct binding to individual cysteine residues, cysteine clusters, zinc finger motifs, and RING finger domains. Consequently, arsenic interactions with proteins disrupt the functions of proteins and may lead to the development and progression of diseases. In this review, we focus on current evidence in the literature that implicates the interaction of arsenic with proteins as a mechanism of arsenic toxicity. Data show that arsenic-protein interactions affect multiple cellular processes and alter epigenetic regulation, cause endocrine disruption, inhibit DNA damage repair mechanisms, and deregulate gene expression, among other adverse effects.

1. Introduction

Arsenic is a metalloid that occurs naturally in diverse Earth environments and is also a pollutant produced by several industrial activities (IARC, 2012). Human populations are exposed to arsenic through contact with contaminated air, soil, water, food, and occupational exposure (Chen and Costa, 2021; IARC, 2012). However, drinking water extracted from underground sources contaminated by arsenic minerals is considered the major source of arsenic exposure (Chen and Costa, 2021). Through the consumption of drinking water, over 200–300 million people are exposed worldwide to dangerous amounts of arsenic, because aquifers in multiple regions have a concentration of arsenic above 10 µg/L, the current guideline for the concentration of arsenic in water recommended by the World Health Organization (Chen and Costa, 2021; IARC, 2012).

Arsenic is classified as a human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer because there is sufficient evidence linking chronic arsenic exposure and cancer development in skin, lung,

kidney, liver, and bladder (IARC, 2012). Moreover, epidemiological studies support an association between arsenic exposure and the development of cancer in the breast, stomach, pancreas, brain, prostate, buccal cavity, pharynx, esophagus, colorectal cancer and non-Hodgkin lymphoma (Pullella and Kotsopoulos, 2020; García-Esquinas et al., 2013; Núñez et al., 2016; Roh et al., 2017). Furthermore, epidemiological studies link arsenic exposure to the development of nonmalignant diseases, including cardiovascular diseases (Xu et al., 2020), anemia (Parvez et al., 2017), type 2 diabetes (Feseke et al., 2015), neuropathy (Tolins et al., 2014), skin lesions (Hunt et al., 2014), nephrotoxicity (Robles-Osorio et al., 2015), and immunotoxicity (Dangleben et al., 2013). Due to the adverse and pleiotropic effects of arsenic exposure on human health and due to widespread arsenic exposure, this metalloid is one of the ten chemical pollutants of major concern for public health (WHO, 2019).

Abbreviations: APL, acute promyelocytic leukemia; AS3MT, arsenite methyl transferase; As₂O₃, arsenic trioxide; DICS, DNA interstrand crosslinks; DMA(III), dimethyl arsenite; DMA(V), dimethyl arsenate; DSB, DNA double strand breaks; ER α , estrogen receptor alpha; ER β , estrogen receptor beta; GSTO1, glutathione S-transferase omega 1; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; iAs, inorganic arsenic; iAs(III), arsenite; iAs(V), arsenate; MMA(III), monomethyl arsenite; MMA(V), monomethyl arsenate; NaAsO₂, sodium arsenite; PKM2, pyruvate kinase M2; SAM, S-adenosyl methionine; ZnF, zinc finger.

* Corresponding author at: Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 04510, Mexico

E-mail address: anamsm@biomedicas.unam.mx (A.M. Salazar).

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115738>

Received 23 July 2021; Received in revised form 28 September 2021; Accepted 30 September 2021

Available online 4 October 2021

0041-008X/© 2021 Published by Elsevier Inc.

2. Metabolism of arsenic in the human body

Inorganic arsenic (iAs) molecules are the main forms of arsenic in drinking water. Trivalent arsenite [iAs(III)] and pentavalent arsenate [iAs(V)] are the most abundant arsenic molecules in drinking water under reducing and oxidizing conditions, respectively (IARC, 2012). iAs (III) is generally considered more cytotoxic than iAs(V) in human cells, although cellular sensitivity depends on the physiology of the different tissues and the individual capacity to metabolize and eliminate iAs (Minatel et al., 2018). Arsenic is metabolized mainly in the human liver prior to mobilization and excretion. However, as arsenic metabolites can be more cytotoxic than iAs, the physiological role of arsenic metabolism is not fully understood (Sattar et al., 2016). The process of arsenic metabolism starts after the entry of iAs into liver cells. iAs(III) enters the cell through aquaglyceroporin 7, aquaglyceroporin 9, and glucose transporter type 1 (GLUT1), whereas iAs(V) enters the cell through the phosphate transporter (Yang et al., 2012; Garbinski et al., 2019). After entry into liver cells and prior to the metabolic process, iAs(V) is reduced to iAs(III) through the activity of the enzyme arsenate reductase (Fig. 1). In the first steps of arsenic metabolism, the enzyme arsenite methyltransferase, encoded by the *AS3MT* gene, catalyzes the oxidative methylation of iAs(III) into pentavalent monomethyl arsenate [MMA(V)], and the enzyme glutathione S-transferase omega 1, encoded by the *GSTO1* gene, reduces MMA(V) into trivalent monomethyl arsenite [MMA(III)]. In the last steps, the enzymes *AS3MT* and *GSTO1* generate pentavalent dimethyl arsenate [DMA(V)] and trivalent dimethyl arsenite [DMA(III)] through oxidative methylation and reduction, respectively. Compounds DMA(III) and DMA(V) are delivered from the liver to the kidney and are the major organic arsenic compounds excreted in urine (Sattar et al., 2016).

Arsenic metabolism is one of the crucial aspects underlying the adverse effects of this metalloid, since methylated arsenic compounds can be more cytotoxic than iAs. Furthermore, arsenic metabolism by oxidative methylation can induce DNA demethylation to maintain an optimal level of intracellular S-adenosylmethionine (SAM), the methyl group donor used by the *AS3MT* enzyme (Chen et al., 2019). The demethylation of DNA caused by arsenic exposure can induce epigenetic alterations in sequences that regulate gene transcription, with consequences such as the activation of oncogenes and the repression of tumor suppressor genes (Benbrahim-Tallaa et al., 2005; Paul et al., 2017). Additionally, the reduction of inorganic and methylated As(V) molecules by the *GSTO* enzyme consumes GSH and alters the redox balance of the cells. The depletion of GSH impairs the activity of proteins related to diverse cellular functions, including enzymes that participate in DNA damage repair (Chen et al., 2019; Druwe and Vaillancourt, 2010; Hu et al., 2020). Thus, the metabolism of arsenic poses a challenge to the homeostasis of cells in different tissues, increasing the risk of developing diseases associated with arsenic exposure.

3. Main effects of arsenic exposure on cell homeostasis

Epidemiological evidence suggests an association between chronic

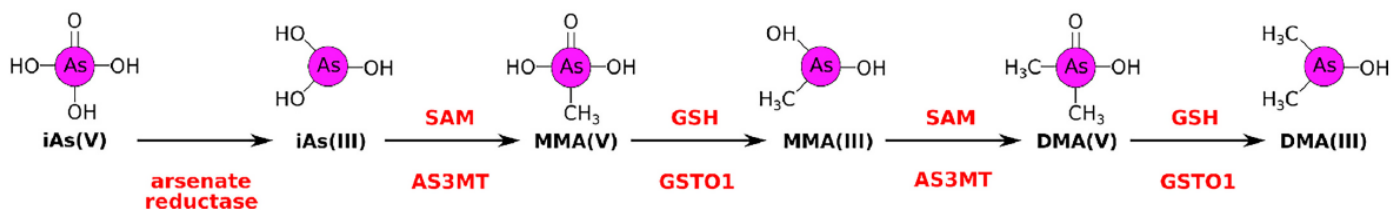


Fig. 1. Steps of arsenic metabolism in liver cells. The arsenate reductase enzyme reduces inorganic arsenate [iAs(V)] into inorganic arsenite [iAs(III)]. Arsenite methyltransferase (*AS3MT*) methylates iAs(III) into pentavalent monomethyl arsenate [MMA(V)], using S-adenosyl methionine (SAM) as a methyl group donor. Glutathione S-transferase omega 1 (*GSTO1*) reduces MMA(V) into trivalent monomethyl arsenite [MMA(III)]. Glutathione may provide reducing equivalents to the reaction catalyzed by *GSTO1*. *AS3MT* methylates MMA(III) into pentavalent dimethyl arsenate [DMA(V)]. *GSTO1* reduces DMA(V) to trivalent dimethyl arsenite [DMA(III)].

arsenic exposure and the development of cancer (IARC, 2012). The proposed molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis include oxidative stress (Cantoni et al., 2021; Hu et al., 2020; Medda et al., 2021), comutagenesis (Tam et al., 2020b; Zhou et al., 2021), chromosome and genomic instability (Salazar and Ostrosky-Wegman, 2015), dysregulation of cell proliferation (Medda et al., 2021), epigenetic alterations (Bjørklund et al., 2018), endocrine disruption (Chen et al., 2019), alteration of signal transduction pathways (Druwe and Vaillancourt, 2010), and the disruptive interaction of arsenic with proteins (Chen et al., 2019; Shen et al., 2013). These mechanisms may also be involved in the development of arsenic-induced noncancerous diseases such as anemia and type 2 diabetes (Castriota et al., 2020; Pánico et al., 2019; Zhou et al., 2020).

4. Arsenic interaction with proteins

Only trivalent arsenic molecules interact with proteins, and the interaction is established exclusively through cysteine residues (Jiang et al., 2003; Kitchin and Wallace, 2005). Thus, arsenic binds to proteins through interactions with individual cysteine residues, zinc finger (ZnF) motifs, and RING finger domains. The protein targets of arsenic depend on the methylation status of the arsenic molecule, the number of cysteine residues in the target protein, and the microenvironment (Shen et al., 2013). The evidence supporting these interactions is shown below:

4.1. Arsenic interaction with individual cysteine residues

Different arsenic molecules bind to individual cysteine residues of proteins in a predictable way. For example, Jiang et al. identified through high-performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) that iAs(III) binds to three cysteine residues of the human metallothionein, MMA(III) binds to two cysteine residues, and DMA(III) binds to one cysteine residue, whereas iAs(V) and its methylated compounds cannot bind to this protein. Human metallothionein, having 20 cysteine residues, can bind up to 6 iAs(III) molecules, 10 MMA(III) molecules, and 20 DMA(III) molecules (Jiang et al., 2003), and a similar protein-binding behavior can be expected for arsenic and individual cysteines in different proteins (Shen et al., 2013). Kitchin and Wallace determined the dissociation constant (K_d) between iAs(III) and 2 peptides that possess an individual cysteine residue, and found affinities with K_d of 124 and 190 μ M, respectively, for the two different peptides. Additionally, individual and far-separated cysteine residues in proteins may interact with arsenic in a similar fashion, as the interaction affinity between iAs(III) and a peptide possessing two cysteines separated by 17 amino acid residues is similar to the interaction affinity between iAs(III) and peptides with just one cysteine. These results suggest that the spatial distribution of cysteines in the three-dimensional structure of the protein influences the affinity and stoichiometry of the interaction between arsenic and proteins (Kitchin and Wallace, 2005). Indeed, the characterization of the biochemical properties of the interaction between iAs(III) and individual cysteines in proteins requires further clarification. Recently, Qi et al.

found by isothermal titration calorimetry (ITC) that the stoichiometry of iAs(III) binding to metallothionein is 0.378 iAs(III) ions per metallothionein molecule in *Rattus norvegicus*, which has 20 cysteines as its human homolog (Qi et al., 2021), suggesting that the experimental conditions are important in the determination of the behavior of arsenic interactions with individual cysteines.

4.2. Arsenic interaction with zinc finger motifs

ZnF motifs are structural motifs in proteins that coordinate a zinc ion through residues closely located in the three-dimensional structure of the protein. There are three different types of ZnF motifs: C2H2 ZnF motifs (which coordinate zinc ions through two cysteines and two histidines), C3H1 ZnF motifs and C4 ZnF motifs (Krishna et al., 2003). In cell-free experiments, trivalent sodium arsenite (NaAsO_2) and arsenic trioxide (As_2O_3) bind to apo-peptides of C3H1 and C4 ZnF motifs, whereas MMA(III) and DMA(III) bind to apo-peptides of C2H2, C3H1, and C4 ZnF motifs (Zhou et al., 2014) and iAs(III), MMA(III), and DMA(III) can bind to individual cysteines (Fig. 2) (Jiang et al., 2003; Kitchin and Wallace, 2005; Kluska et al., 2018; Sun et al., 2014; Zhao et al., 2012; Zhao et al., 2014; Zhou et al., 2011; Zhou et al., 2014; Zhou et al., 2015). These data suggest that arsenic can target different proteins depending on the arsenic molecular structure. Zhao et al. determined that the interaction affinity between iAs(III) and the apo-peptides of different ZnF motifs follows this decreasing order: C4 ZnF > C3H1, ZnF > C2H2 ZnF with a lower $K_d = 2.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$ for the iAs(III)-C4 ZnF motif interaction, and a higher $K_d = 235 \pm 9 \mu\text{M}$ for the iAs(III)-C2H2 ZnF motif interaction. This suggests that a higher cysteine number in the ZnF motifs increases the affinity of arsenic (Zhao et al., 2012). In a similar finding, Kitchin and Wallace identified that the interaction between arsenic and a C4 ZnF motif peptide derived from estrogen receptor alpha ($\text{ER}\alpha$) has a higher affinity than the interaction between arsenic and the same ZnF motif with a Cys to Gly substitution (Kitchin and Wallace, 2005). Whereas arsenic molecules can interact with different ZnF apo-peptides in cell-free assays with characterized affinities, arsenic cannot interact with ZnF motifs complexed with Zn ions in cell-free assays, as the affinity of ZnF motifs to Zn is higher than the affinity to arsenic (Zhao et al., 2014). Nevertheless, arsenic can displace Zn and interact with ZnF motifs *in vivo*, and this difference between affinities *in vivo* and in cell-free assays may be related to the presence of small molecules or an acidic pH in the microenvironment of cells. GSH, Cys, or a pH = 6 decreases the affinity of Zn to ZnF motifs, favoring the interaction between proteins and iAs(III) in the concentrations of iAs(III) found in arsenic-exposed cells. Additionally, GSH, Cys, and a low pH increase the affinity of interaction between iAs(III) and C2H2 ZnF motifs in cell-free assays (Zhao et al., 2014). The influence of the microenvironment on

arsenic-ZnF motif interactions contributes to explaining how this metalloid can compete with Zn *in vivo* and *in vitro* to disrupt the function of every type of ZnF motif present in different proteins.

Several protein families have ZnF motifs that are involved in diverse biological functions (Cassandri et al., 2017; Krishna et al., 2003). As previously mentioned, iAs(III) interacts with C4 and C3H1 ZnF motifs, whereas MMA(III) interacts with C4, C3H1, and C2H2 ZnF motifs (Zhao et al., 2012, 2014; Zhou et al., 2011, 2014, 2015). These arsenic molecules replace the zinc ion in the ZnF motifs and disrupt both protein folding and function (Sun et al., 2014; Zhou et al., 2015; Zhou et al., 2014; Zhou et al., 2011). In fact, Wang et al. identified that MMA(III) may have a stronger binding affinity to thiol groups in proteins than iAs(III), and a wider repertoire of protein targets in cells (Wang et al., 2015). As the roles of proteins with ZnF motifs involve DNA repair, RNA transcription, splicing and other functions related to the homeostasis in several tissues, the interaction of arsenic with ZnF motifs in proteins emerges as one of the factors of higher risk in arsenic exposure and pathogenesis (Jen and Wang, 2016).

The NaAsO_2 compound interacts with the C3H1 ZnF motif of PARP1 and with the C4 ZnF motif of XPA1, enzymes that belong to the DNA damage repair machinery, disrupting the enzymatic function and increasing the susceptibility of cells to mutagenic agents. The disruption of the DNA repair machinery through these arsenic-protein interactions contributes to explain the comutagenic properties of this metalloid (Ding et al., 2009; Sun et al., 2014; Zhou et al., 2011). Arsenic can influence the epigenetic regulation of gene expression through the indirect depletion of the methyl groups in DNA as previously mentioned. In addition, NaAsO_2 can affect the formation of 5-carboxylcytosine, an epigenetic repressive modification catalyzed by the activities of the Tet1, Tet2 and Tet3 enzymes. The direct binding of arsenic to the C3H1 ZnF motifs of this group of proteins reduces the enzymatic activity (Liu et al., 2015a). This indicates that the epigenotoxicity of arsenic goes beyond the altered methylation of DNA and includes the reduction of the catalytic activities of enzymes involved in the formation of 5-carboxylcytosine. The hMOF enzyme is the main acetyl transferase that generates the H4K16ac epigenetic modification in the H4 histone, and its activity is reduced by the direct binding of As_2O_3 to its C3H1 ZnF motif (Liu et al., 2015b). Additionally, NaAsO_2 affects the activity of the histone acetyltransferase TIP60 and the acetylation of H4 histones by the direct binding of arsenic to the ZnF motif of this enzyme. The NaAsO_2 -TIP60 interaction reduces the H4K16ac epigenetic mark in the HEK293T cell line and decreases the accessibility of chromatin to the DNA repair machinery, potentially increasing the risk of mutagenesis in arsenite-exposed cells (Tam et al., 2017). These studies indicate that the epigenotoxicity of arsenic includes the alteration of the regulation of histone H4 acetylation through direct interaction with proteins.

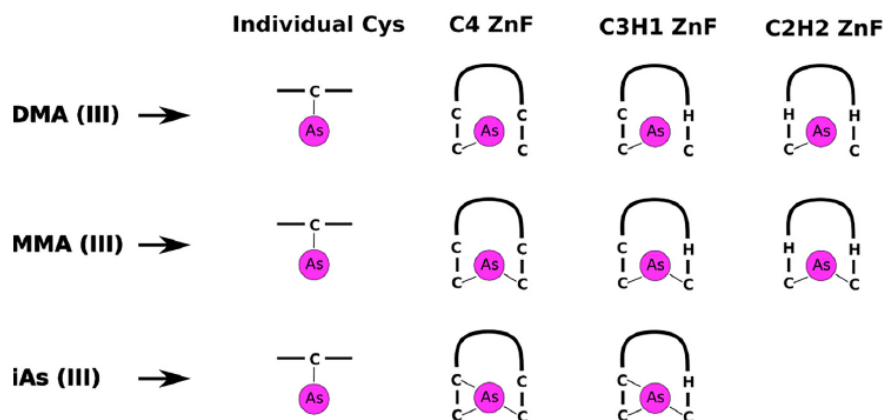


Fig. 2. Outline of arsenic interaction with cysteine residues in proteins. Only trivalent arsenic molecules bind to zinc finger motifs (ZnF) or individual cysteines in proteins. Trivalent inorganic arsenic [iAs(III)] binds to C4 and C3H1 ZnF motifs. Trivalent monomethyl arsenite [MMA(III)] binds to C4, C3H1, and C2H2 ZnF motifs. Trivalent dimethyl arsenite [DMA(III)] binds to C4, C3H1, and C2H2 ZnF motifs. iAs(III), MMA(III) and DMA(III) can bind to individual cysteines in proteins.

The function of transcription factors with ZnF motifs is important for cell homeostasis because they contribute to the regulation of cell proliferation, apoptosis, cell migration and invasion (Jen and Wang, 2016). The function of ZnF transcription factors is disrupted during the pathogenesis of malignant and nonmalignant diseases, and transcription factors with ZnF motifs are potential targets of arsenic, linking arsenic exposure to pathogenesis (Jen and Wang, 2016; Ogawa et al., 2020; Zhou et al., 2020). For example, the transcription factor GATA-1 possesses two C4 ZnF motifs that are targeted by NaAsO₂ in mouse hematopoietic stem cells during red blood cell development and in the human leukemic cell line K562. The ZnF motifs of GATA-1 interact with NaAsO₂, resulting in the displacement of the Zn ions and the disruption of the functions of both ZnF motifs. Consequently, the interaction of GATA-1 with the transcriptional coactivator FOG1 and its DNA binding sequence are impaired. Thus, erythropoiesis is affected, and this arsenic-GATA-1 interaction may contribute to explaining the high prevalence of anemia in populations chronically exposed to arsenic (Zhou et al., 2020). Moreover, NaAsO₂ interacts with the transcription factor EVI1 in the K562 cell line and reduces the function of the C3H1 ZnF motif that participates in EVI1 DNA binding, impairing the genomic function of this transcription factor (Ogawa et al., 2020). Interestingly, premRNA splicing is a process of gene expression that is related to cancer development, and arsenic exposure disrupts the function of the splicing factor ZRANB2 in the HaCaT cell line. Banerjee and colleagues found that NaAsO₂ interacts with the C4 ZnF motif of ZRANB2 and displaces the Zn ion from this motif, affecting the regulation of splicing and promoting malignant development (Banerjee et al., 2020). Previous examples demonstrate that arsenic impairs several aspects of gene expression, but other cellular processes are affected by arsenic exposure.

The CLIP70 protein is associated with the plus end of microtubules and regulates microtubule dynamics. The As₂O₃ compound binds directly to the two C3H1 ZnF motifs of CLIP70 in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). This interaction displaces the Zn ion from these structural motifs and reduces the protein abundance of CLIP70, decreasing the β -tubulin polymerization and the metastatic potential of HNSCC cell lines (Gao et al., 2020). Hence, the interaction of arsenic with ZnF motifs depends on the arsenic molecular structure, the number of cysteine residues in the ZnF motif, and the microenvironment, and commonly causes displacement of the zinc ion, alteration of the ZnF motif structure and a reduction in the function of the protein target.

4.3. Arsenic interaction with RING finger domains

Arsenic directly interacts with the RING finger domain of multiple proteins. The RING finger domains are a type of ZnF domain that coordinates two zinc atoms through C3H1-C4 ZnF motifs. For example, RNF20 and RNF40 are proteins that form heterodimers and catalyze the ubiquitination of the H2B histone during the DNA repair response to DNA double strand breaks (DSBs). The interaction of NaAsO₂ with the RING finger domains of RNF20 and RNF40 impairs the ubiquitination of H2B and the recruitment of the DBS repair machinery, increasing the mutational burden and the transformation of cells by acting as a comutagen (Zhang et al., 2014). In addition, NaAsO₂ binds to the RING finger domain of the E3 ubiquitin ligase FANCL and inhibits the ubiquitylation of FANCD2, a protein that belongs to the Fanconi anemia DNA interstrand crosslinks (DICs) repair pathway. The interaction with NaAsO₂ impairs the recruitment of FANCD2 to DICs, increasing the sensitivity of cells to DICs and contributing to explaining the comutagenic role of arsenic exposure (Jiang et al., 2017). The NaAsO₂ compound interacts with the RING finger domain of the E3-ubiquitin ligase ZNF598, displaces zinc ions from this structural domain, and inhibits the enzymatic activity and ubiquitylation of the ribosomal proteins RPS10 and RPS20. The interaction of arsenic with ZNF598 leads to the inhibition of ribosome stalling in poly-A sequences during ribosome-associated protein quality control, increasing ribosomal read-through

and the risk of synthesis of misfolded proteins and proteotoxic stress, likely contributing to explaining the involvement of arsenic in the development of neurodegenerative disorders associated with both protein misfolding and aggregation (Tam et al., 2020a). Additionally, NaAsO₂ interacts with the RING finger domain of the E3 ubiquitin ligase Rbx1, a protein that belongs to the Nrf2-Keap1 pathway, the main route for the response to oxidative stress. The interaction of NaAsO₂ with the RING finger domain of Rbx1 inhibits the activity of Rbx1 and the ubiquitination of Nrf2. Consequently, the protein stability and transcriptional function of Nrf2 were increased during the oxidative stress response (Jiang et al., 2018). As₂O₃ is a cytotoxic drug for the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL) (Soignet et al., 2001). The mechanisms of As₂O₃ cytotoxicity in APL cells include the interaction of As₂O₃ with the RING finger domain of the promyelocytic leukemia protein (PML) in protein fusion with retinoic acid receptor alpha (RAR α) PML-RAR α , an oncogenic polypeptide that promotes the proliferation of APL cells (Miller et al., 2002). The interaction between As₂O₃ and PML-RAR α promotes a conformational change in the PML moiety, oligomerization of PLM-RAR α , SUMOylation and proteasomal degradation of the fusion protein. This leads to cellular differentiation and a reduction in APL progression (Zhang et al., 2010). In fact, the interaction of As₂O₃ with the RING finger domain of PML has an affinity high enough to overcome the interaction of As₂O₃ with other proteins in APL cells, contributing to explaining the specific targeting of the oncoprotein PML-RAR α and the success of APL therapy using As₂O₃ (Kaiming et al., 2018). Both MMA(III) and DMA(III) can bind to the PML-RAR α oncoprotein and are cytotoxic to APL cells, because MMA(III) and DMA(III) increase apoptosis in the APL cell line NB4. The binding of MMA(III) or DMA(III) to PML-RAR α does not lead to oncoprotein degradation or cellular differentiation, suggesting that APL therapy using arsenic does have multiple mechanisms in the remission of malignant disease (Wang et al., 2015). Accordingly, most of the previous studies focused on individual proteins clearly show that the interaction of arsenic with RING finger domains disrupts the function of proteins that are involved in several cellular processes and can increase the potential of malignant and nonmalignant disease development or, as in the case of As₂O₃ and APL, contribute to cancer therapy.

Most of the previous studies focused on individual proteins and provided an exhaustive characterization of the effects of arsenic on protein target function. Additionally, there are several massive studies that have detected multiple arsenic-binding proteins. A study found that biotin-arsenic binds to 360 different proteins using a human proteome microarray (Zhang et al., 2015b), so more cases of arsenic-protein interactions detrimental to protein function in human cells are expected. Another study identified over 40 different proteins that bind to biotin-arsenic in APL cell line NB4 (Zhang et al., 2015a). Moreover, a study found that arsenic binds to 50 different proteins in MCF-7 breast cancer cells (Zhang et al., 2007). Notably, iAs(III) inactivates ~200 different enzymes in human cells (Abernathy et al., 1999), and it is highly likely that arsenic-protein interaction events are detrimental to both protein function and cell homeostasis (Hunt et al., 2014; Shen et al., 2013). Of note, pyruvate kinase M2 (PKM2) was identified as an arsenic-binding protein in NB4 APL cells. PKM2 is a glycolytic enzyme that promotes anaerobic glycolysis and the growth of malignant cells in hypoxic microenvironments. Arsenic suppresses the activity of PKM2 and reduces NB4 cell proliferation, suggesting that the inhibition of PKM2 activity and the alteration of cell metabolism by arsenic may contribute to the inhibition of APL by As₂O₃ (Zhang et al., 2015a). Furthermore, PKM2 and β -tubulin were identified as arsenic-binding proteins in MCF-7 cells. Nevertheless, in this study arsenic did not affect PKM2 activity, likely because the cysteine residues in this protein are located distant to the active site (Zhang et al., 2007). In breast cancer and APL cells treated with As₂O₃, the C12 and C213 residues of β -tubulin likely bind to arsenic, blocking the GTP-binding site and affecting β -tubulin polymerization and microtubule dynamics (Li and Broome, 1999; Zhang et al., 2015b; Zhang et al., 2007). Hexokinase 2 is a glycolytic enzyme

overexpressed in many cancers and arsenic binds directly to hexokinase 2, reducing enzymatic activity and disrupting the regulation of glycolysis in malignant cells (Zhang et al., 2015b). One of the more recently reported cases of arsenic binding to proteins is the identification of the interaction of As₂O₃ with purified p53 protein. Data show that As₂O₃ binds to p53 through the C124, C135 and C141 cysteine residues clustered in a region adjacent to the DNA binding domain of p53. The interaction of As₂O₃ and p53 rescues the tumor suppressor function of a mutated p53 protein (Chen et al., 2021). The arsenic-p53 interaction indicates that p53 may be one of the most promising therapeutic targets of arsenic, because p53 is the most frequently mutated gene in different types of cancer (Martínez-Jiménez et al., 2020). Therefore, arsenic binding to proteins is widely distributed and may target proteins with individual cysteines, cysteine clusters, ZnF motifs and RING finger domains.

5. Endocrine disruption by arsenic is related to arsenic interaction with nuclear receptors

Arsenic is an endocrine disruptor that alters the physiology of hormonally regulated tissues and may promote cancer development. In fact, epidemiological studies suggest that chronic exposure to arsenic may be involved in the development of cancer in hormonally regulated tissues such as breast cancer (Pullella and Kotsopoulos, 2020). There is experimental evidence that arsenic acts as an endocrine disruptor *in vivo*, *in vitro*, and in cell-free assays. In the rat uterus, NaAsO₂ acts *in vivo* as an endocrine disruptor of ER α , affecting the protein abundance and the genomic function of ER α (Chatterjee and Chatterji, 2010; Ronchetti et al., 2016). Prenatal exposure to arsenic can increase the transformation potential of the mammary gland and the risk of breast cancer development, because NaAsO₂ acts as an endocrine disruptor *in utero*, affecting the prepubertal development of the mammary gland and increasing the postpubertal expression of ER α in the mammary epithelium (Parodi et al., 2015). The NaAsO₂ compound acts as an endocrine disruptor *in vitro* and reduces the ligand-dependent genomic function of the nuclear receptor family members thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor (Davey et al., 2008), progesterone receptor, mineralocorticoid receptor (Bodwell et al., 2006), glucocorticoid receptor (Bodwell et al., 2004; Meakin et al., 2020), ER α and ER β (Davey et al., 2007). Additionally, Meakin et al. found that MMA(III) and DMA(III) act *in vitro* as endocrine disruptors of the glucocorticoid receptor (Meakin et al., 2020), and Gosse et al. identified that MMA(III) and monomethylarsonic diglutathione disrupt the function of the progesterone and the glucocorticoid receptors (Gosse et al., 2014).

In MCF-7 cells, NaAsO₂ binds to the ligand binding site of ER α through the cysteine residues C381 and C447 and competes with the

binding of estradiol (E2) (Fig. 3). These amino acid residues are in close spatial proximity in the three-dimensional structure of ER α , and arsenite binding reduces the genomic function of this hormonal receptor. This suggests that the mechanism of underlying the inhibition of the genomic activity of ER α by arsenic may be related to the inhibition of ligand binding (Stoica et al., 2000). Nevertheless, NaAsO₂ binds to ZnF motifs in the DNA binding domain of ER α (Fig. 3), potentially impairing its binding to DNA and its transcriptional regulatory functions in the human genome (Kitchin and Wallace, 2005; Zhao et al., 2012). In fact, monomethylarsonic diglutathione and MMA(III) compounds reduce the DNA binding of the progesterone receptor and the glucocorticoid receptor (Gosse et al., 2014), although a direct binding of arsenic to the DBD of these nuclear receptors has not been detected. This suggests that arsenic acts as a general disruptor of nuclear hormone receptor transactivation through direct binding to their ligand-binding domain and to the DNA-binding domain, impairing the interaction between hormone nuclear receptors and their response elements in DNA (Fig. 3). The physiological consequences of hormonal disruption by arsenic may vary depending on the tissue and cell type. In MCF-7 cells, NaAsO₂ inhibits the E2-dependent transcriptional function of ER α *in vitro* (Davey et al., 2007) but increases the expression and activity of ER α in the rat pituitary gland and uterus *in vivo* (Ronchetti et al., 2016). In contrast, arsenic exposure in MCF-7 cells promotes E2-independent cell proliferation and increases the mesenchymal phenotype, increasing cell transformation (Danes et al., 2020; Selmin et al., 2019). As₂O₃ can also revert the ER α -negative phenotype of the breast cancer cell line MDA-MB-231 into an ER α -positive phenotype, because As₂O₃ depletes SAM and down-regulates the DNA methyltransferase DNMT1, leading to demethylation of the *ESR1* gene promoter and an increase in ER α expression. These molecular changes turn MDA-MB-231 into an ER-positive cell line that requires E2 for cell growth, and sensitize these cells to the antiestrogen tamoxifen, suggesting a way to induce antiestrogen sensitivity for use in endocrine therapy in ER α -negative breast cancer (Du et al., 2012). In summary, arsenic interacts with ZnF motifs in the DNA binding domain and with a pair of cysteine residues in the ligand binding domain in several members of the nuclear receptor family, and these interactions contribute to explaining the endocrine disruption by arsenic in hormonally regulated tissues.

6. Conclusions

Arsenic interactions with proteins may be one of the mechanisms to understand the toxicity of this metalloloid. Trivalent arsenic molecules interact with different structures in proteins in a predictable way, including accessible individual cysteines, spatial clusters of individual cysteines, ZnF motifs and RING finger domains. The interaction of arsenic with proteins affects the function of the protein targets in human cells and disrupts different cellular processes including DNA and histone epigenetic modifications, mRNA transcriptional regulation, premRNA splicing, DNA damage repair, the transcriptional response to oxidative stress, ribosome-associated protein quality control, glycolysis and microtubule dynamics (Fig. 4). The identified arsenic-protein interactions are related to mutagenesis, epigenotoxicity, endocrine disruption, altered control of gene expression, and metabolism disruption. Studies on arsenic-protein interactions suggest that the disruptive interaction of arsenic with proteins is a mechanism related to the development of diseases associated with chronic arsenic exposure.

Funding

This work was supported by the PAPIIT (DGAPA)-UNAM grant IN211619 (2019) and by the Programa Institucional de Cáncer de Mama and Programa de Salud y Ambiente of the Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM).

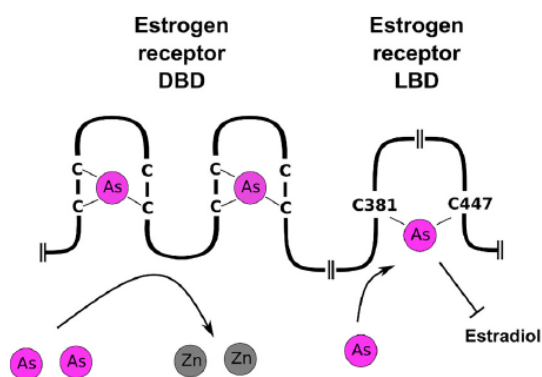


Fig. 3. Arsenic binds to both the ER α DNA-binding domain (DBD) and ligand-binding domain (LBD). Arsenic binding to the DBD displaces the zinc ions coordinated by the two C4 ZnF motifs, whereas arsenic inhibits ligand binding in the LBD.

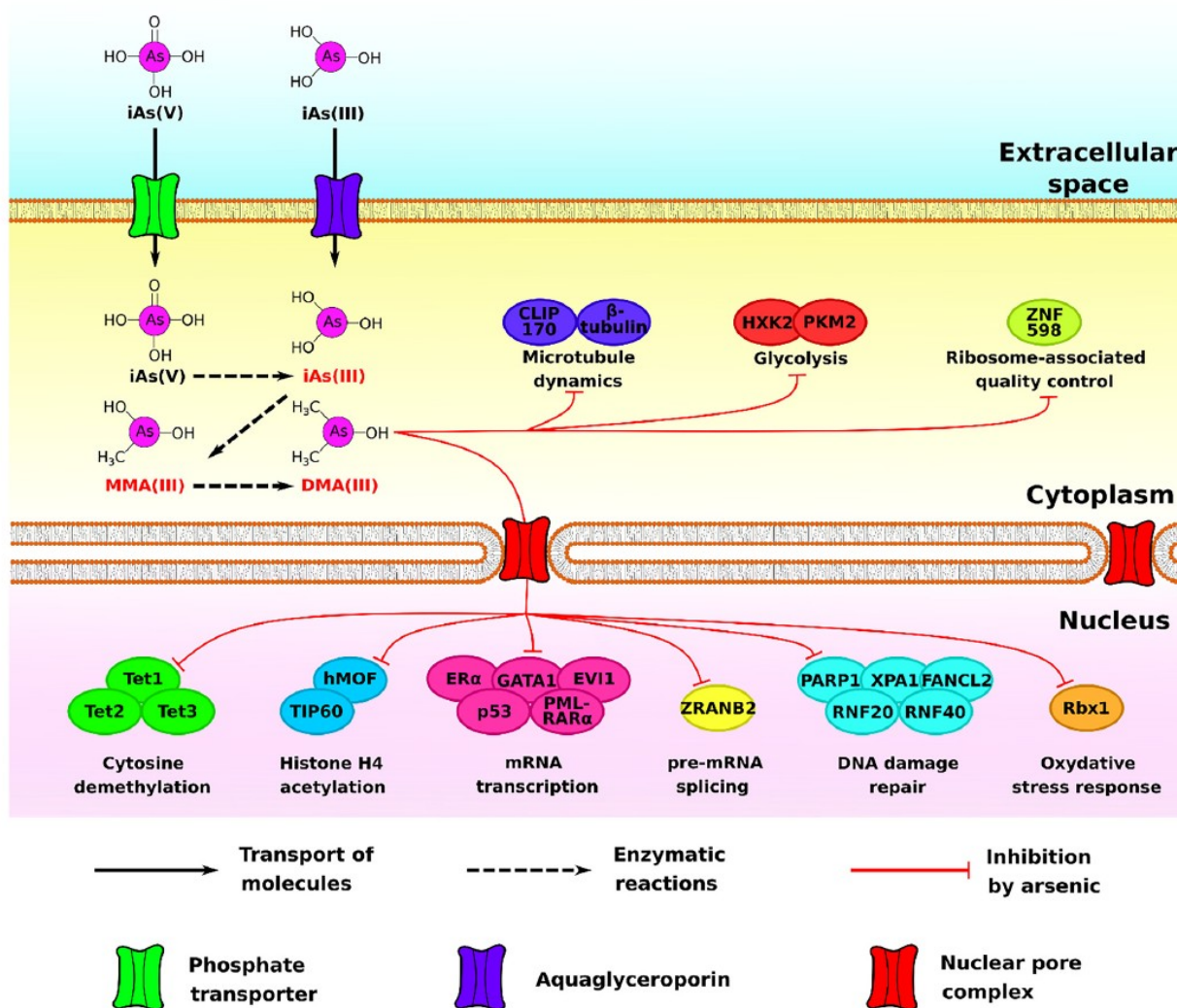


Fig. 4. Arsenic-protein interactions and the cellular processes affected. Pentavalent arsenate [iAs(V)] and trivalent arsenite [iAs(III)] enter the cell. iAs(III) and its trivalent metabolites (in red) interact with proteins in different cell compartments. The interaction of arsenic with proteins inhibits the function of the protein targets and alters the associated cellular processes. Recent reports of arsenic targets and their main cellular functions are highlighted. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Cristian A. Vergara-Gerónimo is a doctoral student from Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 817253 from CONACYT.

References

- Abernathy, C.O., Liu, Y.P., Longfellow, D., Aposhian, H.V., Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzer, R., Rossman, T., Thompson, C., Waalkes, M., 1999. Meeting on Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues, Hunt Valley, Maryland, 22-24 September 1997. In: Environmental Health Perspectives. National Institute of Environmental Health Sciences, pp. 593-597. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107593>.
- Banerjee, M., Ferragut Cardoso, A.P., Lykoudi, A., Wilkey, D.W., Pan, J., Watson, W.H., Garbett, N.C., Rai, S.N., Merchant, M.L., States, J.C., 2020. Arsenite exposure displaces zinc from ZRANB2 leading to altered splicing. *Chem. Res. Toxicol.* 33, 1403-1417. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00515>.
- Benbrahim-Tallaa, L., Waterland, R.A., Styblo, M., Achanzar, W.E., Webber, M.M., Waalkes, M.P., 2005. Molecular events associated with arsenic-induced malignant transformation of human prostatic epithelial cells: aberrant genomic DNA methylation and K-ras oncogene activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 288-298. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.017>.
- Bjørklund, G., Aaseth, J., Chirumbolo, S., Urbina, M.A., Uddin, R., 2018. Effects of arsenic toxicity beyond epigenetic modifications. *Environ. Geochem. Health* 40, 955-965. <https://doi.org/10.1007/s10653-017-9967-9>.
- Bodwell, J.E., Kingsley, L.A., Hamilton, J.W., 2004. Arsenic at very low concentrations alters glucocorticoid receptor (GR)-mediated gene activation but not GR-mediated gene repression: complex dose-response effects are closely correlated with levels of activated GR and require a functional GR DNA binding d. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1064-1076. <https://doi.org/10.1021/tx0499113>.
- Bodwell, J.E., Gosse, J.A., Nomikos, A.P., Hamilton, J.W., 2006. Arsenic disruption of steroid receptor gene activation: complex dose - response effects are shared by several steroid receptors. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1619-1629. <https://doi.org/10.1021/tx060122q>.
- Cantoni, O., Zito, E., Fiorani, M., Guidarelli, A., 2021. Arsenite impinges on endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk to elicit mitochondrial ROS formation and downstream toxicity. *Semin. Cancer Biol.* <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2021.06.002>.
- Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., Melino, G., Raschella, G., 2017. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Dis.* 3 <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.71>.
- Castriota, F., Rieswijk, L., Dahlberg, S., La Merrill, M., Steinmaus, C., Smith, M., Wang, J., 2020. A state-of-the-science review of Arsenic's effects on glucose

- homeostasis in experimental models. *Environ. Health Perspect.* 128 <https://doi.org/10.1289/EHP4517>.
- Chatterjee, A., Chatterji, U., 2010. Arsenic abrogates the estrogen-signaling pathway in the rat uterus. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8, 80. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-80>.
- Chen, Q.Y., Costa, M., 2021. Arsenic: a global environmental challenge. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 61, 47–63. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-030220-013418>.
- Chen, Q.Y., DesMarais, T., Costa, M., 2019. Metals and mechanisms of carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 59, 537–554. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021031>.
- Chen, S., Le Wu, J., Liang, Y., Tang, Y.G., Song, H.X., Wu, L.L., Xing, Y.F., Yan, N., Li, Y. T., Wang, Z.Y., Xiao, S.J., Lu, X., Chen, S.J., Lu, M., 2021. Arsenic trioxide rescues structural p53 mutations through a cryptic allosteric site. *Cancer Cell* 39, 225–239 e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.11.013>.
- Danes, J.M., Abreu, A.L.P., Kerketta, R., Huang, Y., Palma, F.R., Gantner, B.N., Mathison, A.J., Urrutia, R.A., Bonini, M.G., 2020. Inorganic arsenic promotes luminal to basal transition and metastasis of breast cancer. *FASEB J.* 34, 16034–16048. <https://doi.org/10.1096/fj.202001192R>.
- Dangleben, N.L., Skibola, C.F., Smith, M.T., 2013. Arsenic immunotoxicity: a review. *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source* 12. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-12-73>.
- Davey, J.C., Bodwell, J.E., Gosse, J.A., Hamilton, J.W., 2007. Arsenic as an endocrine disruptor: effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture. *Toxicol. Sci.* 98, 75–86. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm013>.
- Davey, J.C., Nomikos, A.P., Wunjiiranirum, M., Sherman, J.R., Ingram, L., Batki, C., Lariviere, J.P., Hamilton, J.W., 2008. Arsenic as an endocrine disruptor: arsenic disrupts retinoic acid receptor– and thyroid hormone receptor–mediated gene regulation and thyroid hormone–mediated amphibian tail metamorphosis. *Environ. Health Perspect.* 116, 165–172. <https://doi.org/10.1289/ehp.10131>.
- Ding, W., Liu, W., Cooper, K.L., Qin, X.J., de Souza Bergo, P.L., Hudson, L.G., Lui, K.J., 2009. Inhibition of poly(ADP-ribose) Polymerase-1 by Arsenite interferes with repair of oxidative DNA damage. *J. Biol. Chem.* 284, 6809–6817. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805566200>.
- Druwe, L.L., Vaillancourt, R.R., 2010. Influence of arsenate and arsenite on signal transduction pathways: an update. *Arch. Toxicol.* <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0554-4>.
- Du, J., Zhou, N., Liu, H., Jiang, F., Wang, Y., Hu, C., Qi, H., Zhong, C., Wang, X., Li, Z., 2012. Arsenic induces functional re-expression of estrogen receptor α by demethylation of DNA in estrogen receptor-negative human breast cancer. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035957>.
- Feseke, S.K., Laurent, J.S., Anassour-Sidi, E., Ayyote, P., Bouchard, M., Levallois, P., 2015. Arsenic exposure and type 2 diabetes: results from the 2007–2009 Canadian health measures survey. *Heal. Promot. Chronic Dis. Prev. Canada* 35.
- Gao, L., Xue, B., Xiang, B., Liu, K.J., 2020. Arsenic trioxide disturbs the LIS1/NDEL1/dynein microtubule dynamic complex by disrupting the CLIP170 zinc finger in head and neck cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 403 <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115158>.
- Garbinski, L.D., Rosen, B.P., Chen, J., 2019. Pathways of arsenic uptake and efflux. *Environ. Int.* 126, 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.058>.
- García-Esquinas, E., Pollán, M., Umans, J.G., Francesconi, K.A., Goessler, W., Guallar, E., Howard, B., Farley, J., Best, L.G., Navas-Acien, A., 2013. Arsenic exposure and cancer mortality in a US-based prospective cohort: the strong heart study. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 22, 1944–1953. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0234-T>.
- Gosse, J.A., Taylor, V.F., Jackson, B.P., Hamilton, J.W., Bodwell, J.E., 2014. Monomethylated trivalent arsenic species disrupt steroid receptor interactions with their DNA response elements at non-cytotoxic cellular concentrations. *J. Appl. Toxicol.* 34, 498–505. <https://doi.org/10.1002/jat.2898>.
- Hu, Y., Li, J., Lou, B., RWu, R., Wang, G., Lu, C., Wang, H., Pi, J., Xu, Y., 2020. The role of reactive oxygen species in arsenic toxicity. *Biomolecules* 10. <https://doi.org/10.3390/Biom10020240>.
- Hunt, K.M., Srivastava, R.K., Elmetts, C.A., Athar, M., 2014. The mechanistic basis of arsenicosis: pathogenesis of skin cancer. *Cancer Lett.* <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.08.016>.
- IARC, 2012. *Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. IARC. Doi:10.978 92 832 1320 8.
- Jen, J., Wang, Y.C., 2016. Zinc finger proteins in cancer progression. *J. Biomed. Sci.* <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0269-9>.
- Jiang, G., Gong, Z., Li, X.F., Cullen, W.R., Le, X.C., 2003. Interaction of trivalent arsenicals with metallothionein. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 873–880. <https://doi.org/10.1021/tx034053g>.
- Jiang, J., Bellani, M., Li, L., Wang, P., Seidman, M.M., Wang, Y., 2017. Arsenite binds to the RING finger domain of FANCL E3 ubiquitin ligase and inhibits DNA Interstrand crosslink repair. *ACS Chem. Biol.* 12, 1858–1866. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01135>.
- Jiang, J., Tam, L.M., Wang, P., Wang, Y., 2018. Arsenite targets the RING finger domain of Rbx1 E3 ubiquitin ligase to inhibit proteasome-mediated degradation of Nrf2. *Chem. Res. Toxicol.* 31, 380–387. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00062>.
- Kaiming, C., Sheng, Y., Zheng, S., Yuan, S., Huang, G., Liu, Y., 2018. Arsenic trioxide preferentially binds to the ring finger protein PML: understanding target selection of the drug. *Metallomics* 10, 1564–1569. <https://doi.org/10.1039/C8MT00202A>.
- Kitchin, K.T., Wallace, K., 2005. Arsenite binding to synthetic peptides based on the Zn finger region and the estrogen binding region of the human estrogen receptor- α . *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.12.010>.
- Kluska, K., Adamczyk, J., Krężel, A., 2018. Metal binding properties, stability and reactivity of zinc fingers. *Coord. Chem. Rev.* 367, 18–64. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.04.009>.
- Krishna, S.S., Majumdar, I., Grishin, N.V., 2003. Structural classification of zinc fingers. *Nucleic Acids Res.* 31, 532–550. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg161>.
- Li, Y.M., Broome, J.D., 1999. Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells. *Cancer Res.* 59, 776–780.
- Liu, D., Wu, D., Zhao, L., Yang, Y., Ding, J., Dong, L., Hu, L., Wang, F., Zhao, X., Cai, Y., Jin, J., 2015b. Arsenic trioxide reduces global histone H4 acetylation at lysine 16 through direct binding to histone acetyltransferase hMOF in human cells. *PLoS One* 10, e0141014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141014>.
- Liu, S., Jiang, J., Li, L., Amato, N.J., Wang, Z., Wang, Y., 2015a. Arsenite targets the zinc finger domains of Tet proteins and inhibits Tet-mediated oxidation of 5-Methylcytosine. *Environ. Sci. Technol.* 49, 11923–11931. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03386>.
- Martínez-Jiménez, F., Muñios, F., Sentís, I., Deu-Pons, J., Reyes-Salazar, I., Arnedo-Pac, C., Mularoni, L., Pich, O., Bonet, J., Kranas, H., Gonzalez-Perez, A., Lopez-Bigas, N., 2020. A compendium of mutational cancer driver genes. *Nat. Rev. Cancer* 20, 555–572. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0290-x>.
- Meakin, C.J., Szilagyi, J.T., Avula, V., Fry, R.C., 2020. Inorganic arsenic and its methylated metabolites as endocrine disruptors in the placenta: mechanisms underpinning glucocorticoid receptor (GR) pathway perturbations. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 409, 115305. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115305>.
- Medda, N., De, S.K., Maiti, S., 2021. Different mechanisms of arsenic related signaling in cellular proliferation, apoptosis and neo-plastic transformation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208, 111752. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111752>.
- Miller, W.H., Schipper, H.M., Lee, J.S., Singer, J., Waxman, S., 2002. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.* 15, 3893–3903.
- Minatel, B.C., Sage, A.P., Anderson, C., Hubaux, R., Marshall, E.A., Lam, W.L., Martinez, V.D., 2018. Environmental arsenic exposure: from genetic susceptibility to pathogenesis. *Environ. Int.* <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.017>.
- Núñez, O., Fernández-Navarro, P., Martín-Méndez, I., Bel-Lan, A., Locutura, J.F., López-Abente, G., 2016. Arsenic and chromium topsoil levels and cancer mortality in Spain. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 17664–17675. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6806-y>.
- Ogawa, M., Okamoto, Y., Himeno, S., Suzukawa, K., Sumi, D., 2020. Arsenite suppresses the transcriptional activity of EVI1 through the binding to CCHC-type Zn finger domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 529, 910–915. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.024>.
- Pánico, P., Juárez-Nájera, A., Iturriaga-Goyon, E., Ostrosky-Wegman, P., Salazar, A., 2019. Arsenic impairs GLUT1 trafficking through the inhibition of the calpain system in lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 380 <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114700>.
- Parodi, D.A., Greenfield, M., Evans, C., Chichura, A., Alpaugh, A., Williams, J., Martin, M.B., 2015. Alteration of mammary gland development and gene expression by in utero exposure to arsenic. *Reprod. Toxicol.* 54, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.12.011>.
- Parvez, F., Medina, S., Santella, R.M., Islam, T., Lauer, F.T., Alam, N., Eunus, M., Rahman, M., Factor-Litvak, P., Ahsan, H., Graziano, J.H., Liu, K.J., Burchiel, S.W., 2017. Arsenic exposures alter clinical indicators of anemia in a male population of smokers and non-smokers in Bangladesh. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 331, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.05.014>.
- Paul, S., Bhattacharjee, P., Giri, A.K., Bhattacharjee, P., 2017. Arsenic toxicity and epimutagenicity: the new LINEage. *BioMetals.* <https://doi.org/10.1007/s10534-017-0021-2>.
- Pullella, K., Kotsopoulos, J., 2020. Arsenic exposure and breast cancer risk: a re-evaluation of the literature. *Nutrients* 12, 1–17. <https://doi.org/10.3390/nu12113305>.
- Qi, Z., Wang, Q., Wang, H., Tan, M., 2021. Metallothionein attenuated arsenic-induced cytotoxicity: the underlying mechanism reflected by metabolomics and Lipidomics. *J. Agric. Food Chem.* 69, 5372–5380. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFPC.1C00724>.
- Robles-Osorio, M.L., Sabath-Silva, E., Sabath, E., 2015. Arsenic-mediated nephrotoxicity. *Ren. Fail.* 37, 542–547. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1013419>.
- Roh, T., Lynch, C.F., Weyer, P., Wang, K., Kelly, K.M., Ludwig, G., 2017. Low-level arsenic exposure from drinking water is associated with prostate cancer in Iowa. *Environ. Res.* 159, 338–343. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.026>.
- Ronchetti, S.A., Novack, G.V., Bianchi, M.S., Crocco, M.C., Duvilanski, B.H., Cabilla, J.P., 2016. In vivo xenoestrogenic actions of cadmium and arsenic in anterior pituitary and uterus. *Reproduction* 152, 1–10. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0115>.
- Salazar, A.M., Ostrosky-Wegman, P., 2015. Genotoxicity. In: *Arsenic: Exposure Sources, Health Risks, and Mechanisms of Toxicity*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 347–367. <https://doi.org/10.1002/9781118876992.CH15>.
- Sattar, A., Xie, S., Hafeez, M.A., Wang, X., Hussain, H.I., Iqbal, Z., Pan, Y., Iqbal, M., Shabbir, M.A., Yuan, Z., 2016. Metabolism and toxicity of arsenicals in mammals. *Toxicol. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.020>.
- Selmin, O.I., Donovan, M.G., Skovan, B., Paine-Murieta, G.D., Romagnolo, D.F., 2019. Arsenic-induced BRCA1 CpG promoter methylation is associated with the downregulation of ER α and resistance to tamoxifen in MCF7 breast cancer cells and mouse mammary tumor xenografts. *Int. J. Oncol.* 54, 869–878. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4687>.
- Shen, S., Li, X.F., Cullen, W.R., Weinfeld, M., Le, X.C., 2013. Arsenic binding to proteins. *Chem. Rev.* <https://doi.org/10.1021/cr300015c>.

- Soignet, S.L., Frankel, S.R., Douer, D., Tallman, M.S., Kantarjian, H., Calleja, E., Stone, R. M., Kalaycio, M., Scheinberg, D.A., Steinherz, P., Sievers, E.L., Coutré, S., Dahlberg, S., Ellison, R., Warrell, J., 2001. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 19, 3852–3860. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.18.3852>.
- Stoica, A., Pentecost, E., Martin, M.B., 2000. Effects of arsenite on estrogen receptor- α expression activity in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 141, 3595–3602. <https://doi.org/10.1210/endo.141.10.7704>.
- Sun, X., Zhou, X., Du, L., Liu, W., Liu, Y., Hudson, L.G., Liu, K.J., 2014. Arsenite binding-induced zinc loss from PARP-1 is equivalent to zinc deficiency in reducing PARP-1 activity, leading to inhibition of DNA repair. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 274, 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.11.010>.
- Tam, L.M., Jiang, J., Wang, P., Li, L., Miao, W., Dong, X., Wang, Y., 2017. Arsenite binds to the zinc finger motif of TIP60 histone acetyltransferase and induces its degradation via the 26S proteasome. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 1685–1693. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00146>.
- Tam, L.M., Jiang, J., Wang, P., Wang, Y., 2020a. Arsenite binds to ZNF598 to perturb ribosome-associated protein quality control. *Chem. Res. Toxicol.* 33, 1644–1652. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00412>.
- Tam, L.M., Price, N.E., Wang, Y., 2020b. Molecular mechanisms of arsenic-induced disruption of DNA repair. *Chem. Res. Toxicol.* 33, 709–726. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00464>.
- Tolins, M., Ruchirawat, M., Landrigan, P., 2014. The developmental neurotoxicity of arsenic: cognitive and behavioral consequences of early life exposure. *Ann. Glob. Heal.* <https://doi.org/10.1016/j.aogh.2014.09.005>.
- Wang, Q.Q., Zhou, X.Y., Zhang, Y.F., Bu, N., Zhou, J., Cao, F.L., Naranmandura, H., 2015. Methylated arsenic metabolites bind to PML protein but do not induce cellular differentiation and PML-RAR α protein degradation. *Oncotarget* 6, 25646–25659. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4662>.
- WHO, 2019. WHO | Ten Chemicals of Major Public Health Concern [WWW Document]. WHO. URL http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/chemicals_phc/en/ (accessed 12.29.20).
- Xu, L., Mondal, D., Polya, D.A., 2020. Positive association of cardiovascular disease (CVD) with chronic exposure to drinking water arsenic (as) at concentrations below the WHO provisional guideline value: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072536>.
- Yang, H.C., Fu, H.L., Lin, Y.F., Rosen, B.P., 2012. Pathways of arsenic uptake and efflux. *Curr. Top. Membr.* 69, 325–358. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00012-4>.
- Zhang, F., Paramasivam, M., Cai, Q., Dai, X., Wang, P., Lin, K., Song, J., Seidman, M.M., Wang, Y., 2014. Arsenite binds to the RING finger domains of RNF20-RNF40 histone E3 ubiquitin ligase and inhibits DNA double-strand break repair. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 12884–12887. <https://doi.org/10.1021/ja507863d>.
- Zhang, H.N., Yang, L., Ling, J.Y., Czajkowsky, D.M., Wang, J.F., Zhang, X.W., Zhou, Y.M., Ge, F., Yang, M.K., Xiong, Q., Guo, S.J., Le, H.Y., Wu, S.F., Yan, W., Liu, B., Zhu, H., Chen, Z., Tao, S.C., 2015b. Systematic identification of arsenic-binding proteins reveals that hexokinase-2 is inhibited by arsenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 15084–15089. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521316112>.
- Zhang, T., Lu, H., Li, W., Hu, R., Chen, Z., 2015a. Identification of arsenic direct-binding proteins in acute promyelocytic leukaemia cells. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 26871–26879. <https://doi.org/10.3390/ijms161125994>.
- Zhang, X., Yang, F., Shim, J.Y., Kirk, K.L., Anderson, D.E., Chen, X., 2007. Identification of arsenic-binding proteins in human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 255, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.03.025>.
- Zhang, X.W., Yan, X.J., Zhou, Z.R., Yang, F.F., Wu, Z.Y., Sun, H. Bin, Liang, W.X., Song, A.X., Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Zhang, Q.Y., Yang, H.Y., Huang, Q.H., Zhou, G.B., Tong, J.H., Zhang, Y., Wu, J.H., Hu, H.Y., De The, H., Chen, S.J., Chen, Z., 2010. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RAR α oncoprotein by directly binding PML. *Science* 328, 240–243. <https://doi.org/10.1126/science.1183424>.
- Zhao, L., Chen, S., Jia, L., Shu, S., Zhu, P., Liu, Y., 2012. Selectivity of arsenite interaction with zinc finger proteins. *Metallomics* 4, 988–994. <https://doi.org/10.1039/c2mt20090b>.
- Zhao, L., Wang, Z., Xi, Z., Xu, D., Chen, S., Liu, Y., 2014. The reaction of arsenite with proteins relies on solution conditions. *Inorg. Chem.* 53, 3054–3061. <https://doi.org/10.1021/ic402891t>.
- Zhou, X., Sun, X., Cooper, K.L., Wang, F., Liu, K.J., Hudson, L.G., 2011. Arsenite interacts selectively with zinc finger proteins containing C3H1 or C4 motifs. *J. Biol. Chem.* 286, 22855–22863. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.232926>.
- Zhou, X., Sun, X., Mobarak, C., Gandolfi, A.J., Burchiel, S.W., Hudson, L.G., Liu, K.J., 2014. Differential binding of monomethylarsonous acid compared to arsenite and arsenic trioxide with zinc finger peptides and proteins. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 690–698. <https://doi.org/10.1021/tx500022j>.
- Zhou, X., Cooper, K.L., Sun, X., Liu, K.J., Hudson, L.G., 2015. Selective sensitization of zinc finger protein oxidation by reactive oxygen species through arsenic binding. *J. Biol. Chem.* 290, 18361–18369. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.663906>.
- Zhou, X., Medina, S., Bolt, A.M., Zhang, H., Wan, G., Xu, H., Lauer, F.T., Wang, S.C., Burchiel, S.W., Liu, K.J., 2020. Inhibition of red blood cell development by arsenic-induced disruption of GATA-1. *Sci. Rep.* 10 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76118-x>.
- Zhou, X., Speer, R., Volk, L., Hudson, L., Liu, K., 2021. Arsenic co-carcinogenesis: inhibition of DNA repair and interaction with zinc finger proteins. *Semin. Cancer Biol.* <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2021.05.009>.



Arsenic reduces the GATA3 expression associated with an increase in proliferation and migration of mammary epithelial cell line MCF-10A

Cristian A. Vergara-Gerónimo^a, Alfonso León-Del-Río^a, Mauricio Rodríguez-Dorantes^b, Rafael Camacho-Carranza^a, Patricia Ostrosky-Wegman^a, Ana María Salazar^{a,*}

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70228, Ciudad de México, Mexico

^b Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Editor: Lawrence Lash

Keywords:

Arsenic
GATA3
Breast cancer
EMT

ABSTRACT

Arsenic is associated with the development of breast cancer. However, the molecular mechanisms of arsenic induction of breast cancer are not fully defined. Interaction with zinc finger (ZnF) motifs in proteins is one of the proposed mechanisms of arsenic toxicity. GATA3 is a transcription factor that regulates the transcription of genes associated with cell proliferation, cell differentiation and the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in mammary luminal cells. Given that GATA3 possesses two ZnF motifs essential for the function of this protein and that arsenic could alter the function of GATA3 through interaction with these structural motifs, we evaluated the effect of sodium arsenite (NaAsO₂) on GATA3 function and its relevance in the development of arsenic-induced breast cancer. Breast cell lines derived from normal mammary epithelium (MCF-10A), hormone receptor-positive and hormone receptor negative breast cancer cells (T-47D and MDA-MB-453, respectively) were used. We observed a reduction on GATA3 protein levels at non-cytotoxic concentrations of NaAsO₂ in MCF-10A and T-47D, but not in MDA-MB-453 cells. This reduction was associated with an increase in cell proliferation and cell migration in MCF-10A, but not in T-47D or MDA-MB-453 cells. The evaluation of cell proliferation and EMT markers indicate that the reduction on GATA3 protein levels by arsenic, disrupts the function of this transcription factor. Our data indicate that GATA3 is a tumor suppressor in the normal mammary epithelium and that arsenic could act as an initiator of breast cancer by disrupting the function of GATA3.

1. Introduction

Breast cancer is a tumor disease that affects the mammary epithelium, it is the cancer with the highest incidence and mortality for women worldwide (Harbeck et al., 2019). There are multiple genetic and environmental risk factors related to breast cancer development (Harbeck et al., 2019), and recent epidemiological studies have identified the chronic exposure to arsenic as a risk factor for breast cancer development (Pullella and Kotsopoulos, 2020). Arsenic accumulates in breast tumors, suggesting an association between breast cancer development and increased arsenic exposure (Garg et al., 1994). However, the molecular mechanisms by which arsenic contributes to the development of breast cancer are not fully defined. Interestingly, arsenic interacts with zinc finger (ZnF) motifs, affecting the function of the target proteins and contributing to the development of diseases associated with arsenic exposure (Shen et al., 2013; Vergara-Gerónimo et al., 2021). For

example, it has been shown that in cells of the erythro-megakaryocytic lineage arsenic interacts with GATA1 and GATA2, transcription factors that contain ZnF motifs, and disrupts the function of these proteins. These findings contribute to explain the development of hematological disorders associated with arsenic exposure, including anemia (Medina et al., 2022; Zhou et al., 2020).

GATA3 is a transcription factor that possess two ZnF motifs important for the interaction with DNA in the consensus sequence 5'-WGA-TAR-3' and with coregulator proteins (Romano and Miccio, 2020). GATA3 promotes the differentiation of the luminal progenitor cells and contributes to hold in check the proliferation of these cells (Asselin-Labat et al., 2007; Kouros-Mehr et al., 2006). Additionally, GATA3 is essential for the development of the mammary gland, from the embryonic stage to lactation (Slepicka et al., 2021). GATA3 acts by promoting the transcription of genes related to a mammary epithelial phenotype (Kouros-Mehr et al., 2006). Notably, GATA3 is one of the genes more

* Corresponding author at: Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 04510, Mexico.

E-mail address: anamsm@biomedicas.unam.mx (A.M. Salazar).

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116573>

Received 27 February 2023; Received in revised form 16 May 2023; Accepted 29 May 2023

Available online 2 June 2023

0041-008X/© 2023 Published by Elsevier Inc.