



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Caracterización de la TEM y el papel de los miRNAs en células
epiteliales hepáticas de rata con la barrera antioxidante abatida y
expuestas a una mezcla de metales**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Biol. EMMANUEL GILBERTO TORREJÓN GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. Emilio Rojas del Castillo

Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Dr. Osbaldo Resendis Antonio

Instituto de Fisiología Celular
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Ciudad de México. Marzo, 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.



CGEP/PHDCB/1751/2021
Asunto: Jurado de examen

Torrejón González Emmanuel Gilberto
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 7 de octubre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestría en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Caracterización de la TEM y el papel de los miRNAs en células epiteliales hepáticas de rata con la barrera antioxidante abatida y expuestas a una mezcla de metales**", dirigida por el Dr. **Rojas del Castillo Emilio**.

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

PRESIDENTE	Lizano Soberón Marcela
VOCAL	García Carrancá Alejandro Manuel
VOCAL	Maldonado Jiménez Perla Deyanira
VOCAL	Flores Jasso Carlos Fabián
SECRETARIO	Rocha Zavaleta Leticia

A LOS MIEMBROS DEL JURADO:

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana.

Tome en cuenta que usted tiene **20 días hábiles** para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias.

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 7 de octubre de 2021
COORDINADORA

Dra. Claudia Lydlá Treviño Santa Cruz

Contacto: mdcbo@posgrado.unam.mx Tel. 55-5623-7006



ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN.....	10
Especies reactivas de oxígeno.....	11
Glutación (GSH)	12
Catalasa.....	14
Transición epitelio mesénquima	16
E-Cadherina.....	17
N-Cadherina	18
Snail	18
Zeb1	19
Vimentina.....	19
Metaloproteinasas de matriz 3 (Mmp3).....	20
Los miRNAs como reguladores de la Transición epitelio-mesénquima	21
Biogénesis de los miRNAs.....	21
Antecedentes directos.....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS.....	28
Objetivo General	28
Objetivos particulares.....	28
MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
Material biológico.....	29
Abatimiento de la barrera antioxidante.....	Error! Bookmark not defined.
Exposición a la mezcla de As, Cd y Pb	30
Cuantificación de células y medición de la viabilidad.....	30
Obtención de RNA total.....	30
RT- PCR.....	31

Cuantificación de ERO	Error! Bookmark not defined.
Ensayo Cometa	33
Ensayo de herida	34
Búsqueda de miRNAs	34
Análisis estadístico	34
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	61
PERSPECTIVAS	62
REFERENCIAS	63

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
α -SMA	Alfa actina del músculo liso
γ -GCL	γ -glutamato cisteín ligasa
μ M	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
As(III)	Arsénico trivalente, estado de oxidación 3
AZT	Aminotriazol
ALA	Ácido δ -aminolevulinico
ALAD	Ácido δ -aminolevulinico deshidratasa
As	Arsénico
ATP	Adenosín trifosfato
ATSDR	Agencia para Substancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades
BSO	Butionina Sulfoximina
C9	Células clona 9
Cat	Catalasa
Cd	Cadmio
Cu	Cobre
DB	Células clona 9 doblemente transfectadas (shGclc/shCat)
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Exp-5	Factor nuclear de exportación 5
FDA	Diacetato de Fluoresceína
Fe	Hierro
Gclc	Subunidad catalítica de la γ -glutamato cisteín ligasa
Gelm	Subunidad moduladora de la γ -glutamato cisteín ligasa
GPX	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación

GSSG	Glutación disulfuro
IARC	Agencia Internacional de Investigación para el Cáncer
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MEC	Matriz extracelular
miRNA	microRNA
Mmp-3	Metaloproteinasa de matriz 3
MPI	Índice de población del MOXI
NAC	N-acetil-L-cisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ng	Nanogramo
Pb	Plomo
Pol	ADN polimerasa
PRX	Peroxiredoxina
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción
RT-Pol	Polimerasa transcriptasa inversa
SFB	Suero fetal bovino
shRNA	RNA de horquilla pequeña
SOD	Superóxido dismutasa
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TRX	Tioredoxina

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURA	PIE DE FIGURA
1	Biosíntesis del glutatión GSH
2	Transición epitelio mesénquima
3	Biogénesis de los miRNAs
4	Esquema del protocolo de toma de muestras
5	Expresión de Catalasa y Gclc en células sh/cat y sh/Gclc
6	Medición de viabilidad mediante el método de FDA
7	Ensayo cometa al día 12 y 24
8	Medición de ERO en el día 6 y 36
9	Expresión de 6 marcadores de TEM en el día 6 y 24
10	Expresión de marcadores de TEM en el día 30 y 36
11	Ensayo de herida en el día 36
12	Vías KEEG enriquecidas con blancos predichos para el miR-3590-3p

CUADRO	DESCRIPCIÓN
1	Oligonucleótidos utilizados en este estudio
2	Nombres de los genes utilizados en la búsqueda con miRWalk
3	miRNAs seleccionados con más de un blanco de la TEM
4	Vías KEEG enriquecidas con los bancos predichos del miR-3590-3p

RESUMEN

El arsénico (As), el cadmio (Cd) y el plomo (Pb) son metales pesados ampliamente utilizados en diversas industrias. De acuerdo con la clasificación de la Agencia Internacional de Investigación para el cáncer (IARC), tanto el As como el Cd son considerados carcinógenos del grupo I mientras que el Pb es clasificado como posible carcinógeno dentro del grupo 2B. El ser humano está expuesto al As, Cd y Pb de manera crónica, a bajas dosis y en forma de mezcla. Los tres metales bajo distintos mecanismos inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).

El comportamiento invasivo y la metástasis son características distintivas del cáncer, la transición epitelio mesénquima (TEM) es un programa celular embrionario que es reactivado durante el proceso de transformación maligna. Durante este proceso las células aumentan su potencial invasivo y su resistencia a la anoikis y a la apoptosis. En trabajos previos de nuestro equipo de investigación se ha encontrado que la mezcla de As, Cd y Pb a concentraciones equimolares de exposición ocupacional induce la transformación maligna y que la disminución de la barrera antioxidante está involucrada en este proceso.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar si el decremento de la defensa antioxidante y la exposición a una mezcla de metales podía inducir la TEM.

Con el fin de determinar si la disminución de la defensa antioxidante era capaz de inducir la TEM, se utilizó una línea comercial de células epiteliales hepáticas (clona 9 o c9) las cuales fueron transfectadas con un vector que contiene secuencias que codifican para RNAs de horquilla pequeña (shRNA) que disminuyeron la expresión de dos importantes enzimas antioxidantes: catalasa y GCLC.

Para este estudio se utilizaron 4 grupos: las células transfectadas con los shRNA y células c9 (control) que fueron expuestas a la mezcla de As, Cd y Pb. Por otro lado, también fueron evaluados otros dos grupos: células transfectadas y células c9 sin ser expuestas a la mezcla de metales. Los 4 grupos se mantuvieron durante 36 días.

La TEM se evaluó mediante RT-PCR de marcadores epiteliales y mesenquimales. La producción de ERO se midió utilizando la técnica de dihidrorodamina 123, mientras que la genotoxicidad se evaluó con el ensayo cometa, por último, la viabilidad se midió cada semana utilizando FDA.

En las células transfectadas y expuestas a la mezcla de metales la viabilidad disminuyó durante los primeros 24 días, inesperadamente la viabilidad se recuperó gradualmente. Así mismo las células transfectadas y expuestas a los metales mostraron una expresión elevada de dichos marcadores, particularmente de los factores de transcripción Snail y Zeb1, sin llegar a ser significativa, en este grupo también se encontró un aumento en el daño al ADN y de ERO.

En conclusión, se observó un incremento del RNAm de marcadores mesenquimales y disminución del marcador epitelial cdh1 que coincide con un aumento de ERO y daño al ADN en células clona 9 transfectadas y expuestas a la mezcla de metales.

ABSTRACT

Arsenic (As), cadmium (Cd) and lead (Pb) are heavy metals widely used in industry. According to the IARC, As and Cd are considered carcinogens of group I, while Pb is classified as possible carcinogen, the human populations are exposed to these metals as mixture, the mechanisms through these metals induce cancer are little known but all, under different mechanisms induce reactive oxygen species (ROS) production.

Invasive behavior is a hallmark of cancer, the Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) is a transdifferentiation program in which cells lose their epithelial markers, acquires mesenchymal markers together with invasive potential, resistance to anoikins and apoptosis. Previous works of our research team have found that the metal mixture is capable of induce cell transformation and the antioxidant barrier is implicated in this process.

For this reason, our aim in this work was to determine if the decrease on the antioxidant barrier and the metal mixture exposition is being able to induce EMT.

In this study, we used rat epithelial cells clone 9. To test the role of the antioxidant barrier, clone 9 cells were transfected with plasmids coding for short hairpin RNA for catalase (sh/cat) and Gclc (sh/Gclc), the knockdown was confirmed using RT-PCR. clone 9 and transfected cells were exposed to As,Cd and Pb mixture during 36 days.

Along the treatment, EMT was evaluated through RT-PCR of characteristic markers of epithelial and mesenchymal cells. ROS production was measured using dihydrorhodamine 123 dye; genotoxicity was measured using comet assay and viability was performed using FDA method.

During the first 24 days the viability was decreased only in transfected clone 9 cells exposed to metal mixture, intriguingly the viability was recovered at the day 36. Also was a trend in the expression of mesenchymal markers, the transfected cells with metal mixture showed the highest expression of mesenchymal markers particularly the transcription factors Snail and Zeb1, also we found increased DNA damage and ROS in this group.

In conclusion, we found an increase of mesenchymal markers associated to increased DNA damage and ROS production in transfected clone 9 cells exposed to metal mixture.

In order to understand the exact mechanisms involved in EMT induced by the metal mixture, the role of antioxidant barrier and his therapeutic potential more studies are needed.

INTRODUCCIÓN

Con el desarrollo de la industria y la urbanización, la contaminación por metales pesados se ha convertido en un problema de la mayor importancia ya que afecta tanto a los organismos como a los ecosistemas debido a su alta toxicidad ¹. El arsénico (As), el cadmio (Cd) y el plomo (Pb), son metales muy utilizados en algunas industrias y la exposición prolongada a ellos afectan la salud humana ^{2,3}. Según datos de la Agencia para Substancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR) de los Estados Unidos, el As, Cd y el Pb están en la lista de las 10 substancias más peligrosas. Por otra parte, la Agencia Internacional de Investigación para el Cáncer (IARC) clasifica al As y al Cd como carcinógenos de clase I, mientras que el Pb está clasificado como posible carcinógeno ⁴.

Los mecanismos por los cuales el As, el Cd y el Pb pudieran promover el proceso de carcinogénesis son muy variados, sin embargo todos comparten la capacidad de inducir la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) las cuales pueden dañar a las biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN ^{5,6}. Se ha documentado que el As genera anion superóxido, ($O_2^{\bullet-}$) Oxígeno singulete, (1O_2), radical peroxilo (ROO^{\bullet}), óxido nítrico (NO^{\bullet}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), aunque aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual se forman ^{5,7,8}. Por otra parte, se ha observado que la exposición a arsenito (As III) disminuye la actividad de la superóxido dismutasa y de catalasa en tejido renal de ratas ⁹. Así mismo, se ha sugerido que el Cd puede elevar los niveles de ERO de manera indirecta a través de la formación de complejos con el glutatión (GSH) y también a través de la inducción de procesos inflamatorios con la subsecuente activación de macrófagos los cuales aumentan la producción de $O_2^{\bullet-}$ ^{10,11}. Además; se ha observado que tanto el Cd como el As pueden desplazar al hierro (Fe) y al cobre (Cu) que forma parte de las proteínas, permitiendo que el Fe y el Cu libres puedan participar en reacciones tipo Fenton que generan al radical hidroxilo (OH^{\bullet}) ¹⁰. El Pb puede incrementar las ERO básicamente de dos formas; la primera es por medio de la inhibición de la enzima ácido δ -aminolevulinico deshidratasa (ALAD) lo que tiene como consecuencia la acumulación del ácido δ -aminolevulínico (ALA) que promueve la formación de ERO mediante reacciones de autoxidación, y una segunda forma es disminuyendo elementos de la barrera antioxidante principalmente el GSH ^{5-8,10-13}.

Debido a que las poblaciones humanas se encuentran expuestas a los metales en forma de mezcla y considerando que de acuerdo con datos publicados por la ATSDR, la mezcla de Pb, As y Cd junto con el cromo es una de las mezclas más comunes ¹⁴, se vuelve relevante estudiar los efectos de la exposición crónica a la mezcla de estos metales a concentraciones de exposición ocupacional, así como determinar sus efectos sobre el proceso de transformación celular.

Parámetros como la toxicidad de los metales puede verse alterada por la interacción entre ellos, ya que un metal puede alterar la biodisponibilidad de un segundo y el resultado puede resultar en el incremento de su toxicidad ¹⁵. De hecho, los estudios epidemiológicos indican que las poblaciones humanas expuestas a mezclas de metales presentan tasas incrementadas en mortalidad asociada a cáncer ¹⁶.

Por otro lado, estudios *in vitro* han determinado que la mezcla de As, Cd y Pb está estrechamente relacionada con la producción de ERO y esto a su vez con la transformación celular maligna ¹⁷⁻¹⁹ sugiriendo que el desbalance en las ERO contribuye en el proceso de transformación inducida por la exposición a la mezcla de metales.

Especies reactivas de oxígeno

Todos los organismos aerobios utilizan oxígeno molecular (O₂) para que se pueda llevar a cabo la síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa. Las reacciones de óxido-reducción o redox, en las cuales los estados de oxidación de los átomos cambian, representan un principio fundamental en muchos procesos bioquímicos, sin embargo la alta reactividad del O₂ implica que también puede ser tóxico para la célula, especialmente cuando está en forma de ERO ²⁰. Las ERO son especies químicas de vida muy corta que se forman por la reducción incompleta del O₂. El término ERO agrupa a radicales libres como el O₂•⁻ y el OH• que pueden convertirse en formas un poco más estables de ERO que no son radicales como el H₂O₂ ^{21,22}.

En células normales las ERO son generadas de una manera altamente regulada y se encuentran involucradas en procesos como la división celular, respuesta inmune, autofagia, inflamación, señalización celular y respuesta al estrés ^{23,24}. Sin embargo, como ya se mencionó, también tienen efectos nocivos sobre las células, es por eso que, a lo largo de la

evolución, los organismos han desarrollado un sistema de defensa mediante la producción de antioxidantes para combatir los efectos deletéreos de las ERO. Este sistema es de suma importancia ya que protege a la célula de los prooxidantes.

Un antioxidante es una sustancia que a concentraciones bajas retarda o reduce la oxidación de un sustrato ²⁵. Para fines prácticos, los antioxidantes de la célula se dividen en 2 grupos: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos ²⁶.

Como ejemplo de antioxidantes enzimáticos pueden mencionarse proteínas que catalizan reacciones que reducen a las ERO, entre ellas se encuentran las enzimas: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), catalasa, hemooxigenasa-1, las tioredoxinas (TRX) y las peroxiredoxinas (PRXs). Los antioxidantes no enzimáticos comprenden compuestos de bajo peso molecular como: vitaminas C y E, β -caroteno, ácido úrico y glutatión (GSH) ²⁶.

Glutatión (GSH)

El Glutatión (L-g-glutamil-L-cisteinil-glicina) es un tripéptido formado por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. Fue descubierto en 1888 por Rey Pailhade a partir de extractos de levadura, sin embargo, su estructura no sería identificada hasta finales de los 1930s ²⁷. El GSH participa en la regulación del ciclo celular, en la señalización celular e incluso en la modulación de la adipogénesis, sin embargo probablemente el papel más importante y mejor descrito del glutatión es el de agente protector frente a prooxidantes y xenobióticos ^{28,29}.

La actividad reductora del glutatión se debe al grupo tiol (-SH) que se encuentra en el residuo de cisteína ya que este grupo actúa como donador de electrones ³⁰⁻³². Adicionalmente el GSH puede disminuir la toxicidad de los metales pesados (entre los que se encuentran el As, Cd y Pb) uniéndose directamente a ellos y estabilizándolos mediante la formación de un complejo no reactivo ²⁹.

En células animales el GSH se encuentra en concentraciones de entre 1 y 10 mM. La mayor parte se encuentra en el citoplasma y en menor medida en las mitocondrias y peroxisomas ³³.

El glutatión puede encontrarse en forma reducida-tiol (GSH) o en forma oxidada-disulfuro (GSSG). La proporción entre estas dos especies a menudo es utilizada como un indicador del estado redox (el cual usualmente es >10 manifestando la gran importancia biológica del glutatión reducido). El GSH total es denotado como la suma del GSH + 2GSSG, del cual una parte significativa (aproximadamente el 15 %) se encuentra unido a proteínas ³³.

La biosíntesis del GSH ocurre en dos pasos y ambas reacciones requieren el consumo de ATP para llevarse a cabo (**Fig. 1**). La primera reacción está catalizada por la enzima γ -glutamato cisteín ligasa (γ -GCL o GCL, EC 6.3.2.2), la GCL es un dímero compuesto por una subunidad catalítica (GCLC) y una subunidad moduladora (GCLM), GCLM no tiene actividad enzimática, pero aumenta la eficiencia catalítica de GCLC. Ésta primera reacción conjuga al aminoácido cisteína con el glutamato, generando el dipeptido γ -glutamilcisteína. La segunda reacción es catalizada por la enzima glutatión sintetasa (GS, EC 6.3.2.3), la cual añade glicina a la γ -glutamilcisteína para formar como producto al GSH ³².

La GCL se considera la enzima limitante en la producción de GSH, ya que la sobreexpresión de la GS no aumenta la velocidad de síntesis del GSH en tanto que la sobreexpresión de GCL si lo hace ^{34,35}.

La expresión de GCLC y GCLM es regulada por el estado redox de la célula, los genes que codifican para estas proteínas poseen en sus promotores sitios de reconocimiento para los factores de transcripción; NF- κ B, Sp-1, AP-1 además de elementos de respuesta antioxidante ARE ³⁶. Así mismo el factor de transcripción Nrf2 es capaz de modular la transcripción del gen *Gclc* ³⁷. Es importante mencionar que la exposición crónica y aguda tanto de As como de Cd ha demostrado ser capaz de inducir la activación de AP-1, NF- κ B y Nrf2 ³⁸⁻⁴⁰.

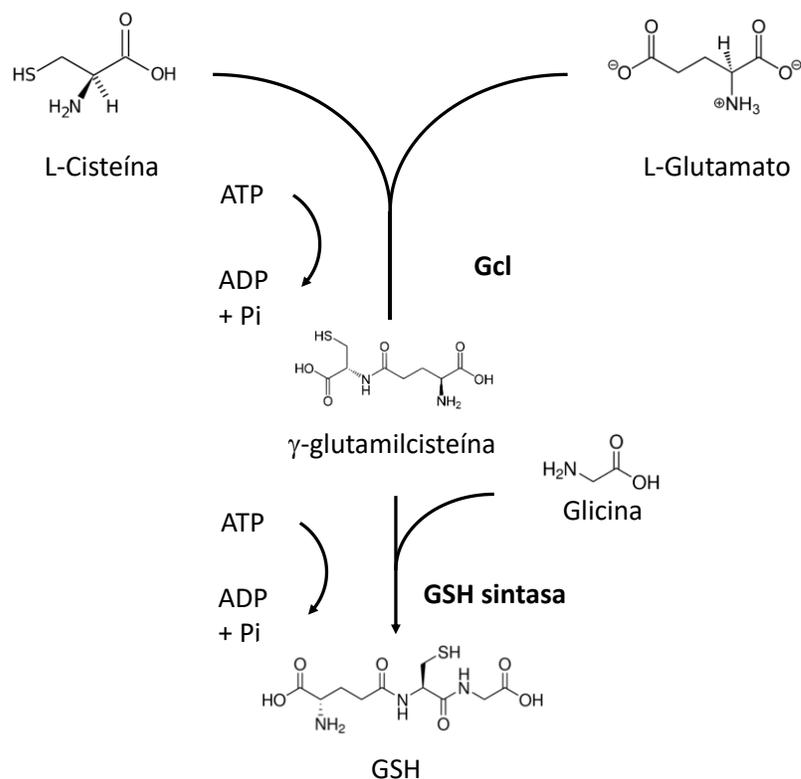


Fig 1. Biosíntesis del glutati3n (GSH)

Catalasa

La catalasa (EC 1.11.1.6) es una enzima con un peso de 210-280 kD encargada de la descomposici3n del H_2O_2 a agua y oxígeno molecular seg3n la siguiente reacci3n ⁴¹:



Con excepci3n de algunos organismos, la mayor parte de las c3lulas aerobias presentan la actividad de catalasa.

Las catalasas pueden ser clasificadas en tres grupos, con base en su estructura y funci3n. El primer y segundo grupos incluyen a las catalasas-peroxidasas y las llamadas catalasas verdaderas o t3picas, las cuales se caracterizan por poseer grupos hemo, en cambio el tercer grupo est3 formado por enzimas que contienen manganeso en lugar del grupo hemo y son llamadas a menudo pseudocatalasas ⁴². Las catalasas-peroxidasas se encuentran

en hongos, arqueobacterias y bacterias, mientras que las pseudocatalasas de manganeso son exclusivas de bacterias, por lo cual en este texto cuando se hable de catalasas se hará referencia a las catalasas denominadas típicas o verdaderas.

En animales la catalasa se localiza en la mayoría de los órganos del cuerpo, pero su actividad se concentra especialmente en el hígado. Su estructura es homotetramérica, cada una de las cuales contiene un grupo hemo-Fe(III) unido a su sitio activo, en algunos casos cada subunidad posee una molécula de NADPH⁴³.

La mayor parte de la catalasa se localiza en los peroxisomas, esto es debido a que allí se encuentran la mayoría de las enzimas que producen H₂O, sin embargo, pequeñas cantidades de catalasa también pueden localizarse en mitocondria y retículo endoplásmico.

Interesantemente, la catalasa se ha encontrado subexpresada en tejidos tumorales tanto de humano como de ratón⁴⁴⁻⁴⁶. La expresión de la catalasa está inversamente relacionadas con los niveles de H₂O₂, que al igual que otras ERO se asocia a la activación de vías de señalización relacionadas con proliferación y migración celular⁴⁷.

Lo anterior señala la importante función que tienen el GSH y la catalasa como parte de la defensa antioxidante ya que permite a la célula evadir los efectos deletéreos de las ERO. De hecho, cuando alguno de estos elementos de la defensa antioxidante falla, ocurre un desbalance entre la producción de ERO y los mecanismos antioxidantes, exponiendo a las células a un ambiente prooxidante denominado estrés oxidativo que puede tener efectos nocivos. El estrés oxidativo se ha relacionado al padecimiento de diversas patologías entre ellas el cáncer^{26,48}.

Diversos trabajos de investigación sugieren que las células tumorales poseen niveles incrementados de ERO comparadas con las células normales, este aumento tiene numerosas fuentes, en parte se debe al incremento en el metabolismo y en parte por la disfunción de sus mitocondrias^{49,50}. Aunado a esto se ha observado que altas cantidades de ERO pueden provocar daño de lípidos, proteínas y ADN causando mutaciones e inestabilidad genómica que eventualmente pueden conducir a la célula hacia el cáncer^{51,52}. Por otra parte, las ERO también actúan como moléculas señalizadoras modulando vías involucradas con la

proliferación celular como PI3K/Akt y MAPK. Se sabe que, la forma en la que las ERO actúan sobre estas vías es a través de la oxidación reversible de grupos tiol de las fosfatasa PTEN y PTP1B las cuales conducen a su inactivación ^{53,54}.

Dentro de las características distintivas del cáncer se encuentra el aumento del potencial invasivo. La transición epitelio mesénquima (TEM) está implicada en la manera en la que las células epiteliales adquieren las características que les confieren la habilidad de invadir los tejidos vecinos y diseminarse ^{55,56}.

Transición epitelio mesénquima

La TEM es un proceso biológico en el cual las células epiteliales polarizadas que se encuentran interactuando mediante uniones celulares con las células vecinas, reprograman su expresión génica, perdiendo por un lado la expresión de marcadores epiteliales y ganando por otro la expresión de marcadores mesenquimales (**Fig. 2**). En dicho proceso las células adquieren nuevas características como son: una nueva morfología fusiforme, resistencia a la apoptosis, incremento en la producción de componentes de la matriz extracelular (MEC), aumento de la capacidad migratoria e invasividad ⁵⁷⁻⁵⁹.

La TEM se clasifica en 3 diferentes tipos dependiendo del proceso biológico en el que se encuentre involucrada. La TEM tipo 1 es aquella que está involucrada en el proceso de embriogénesis y desarrollo de órganos. La TEM tipo 2 se relaciona con la cicatrización y regeneración de tejidos, mientras que la tipo 3 es la que ocurre durante la progresión del cáncer ⁵⁸.

Este proceso de transdiferenciación es de suma importancia durante la embriogénesis en organismos multicelulares ya que les confiere a los tejidos la plasticidad suficiente para formar nuevas estructuras como lo son la cresta neural y el mesodermo ⁶⁰.

Aunque el programa de reactivación de la TEM en carcinomas rara vez es completo, su reactivación parcial es suficiente como para incrementar la movilidad celular y favorecer la invasión y la diseminación ⁶¹. Durante la TEM ocurren cambios en la expresión de ciertas proteínas que se consideran característicos y por lo tanto han sido utilizados como marcadores de este proceso.

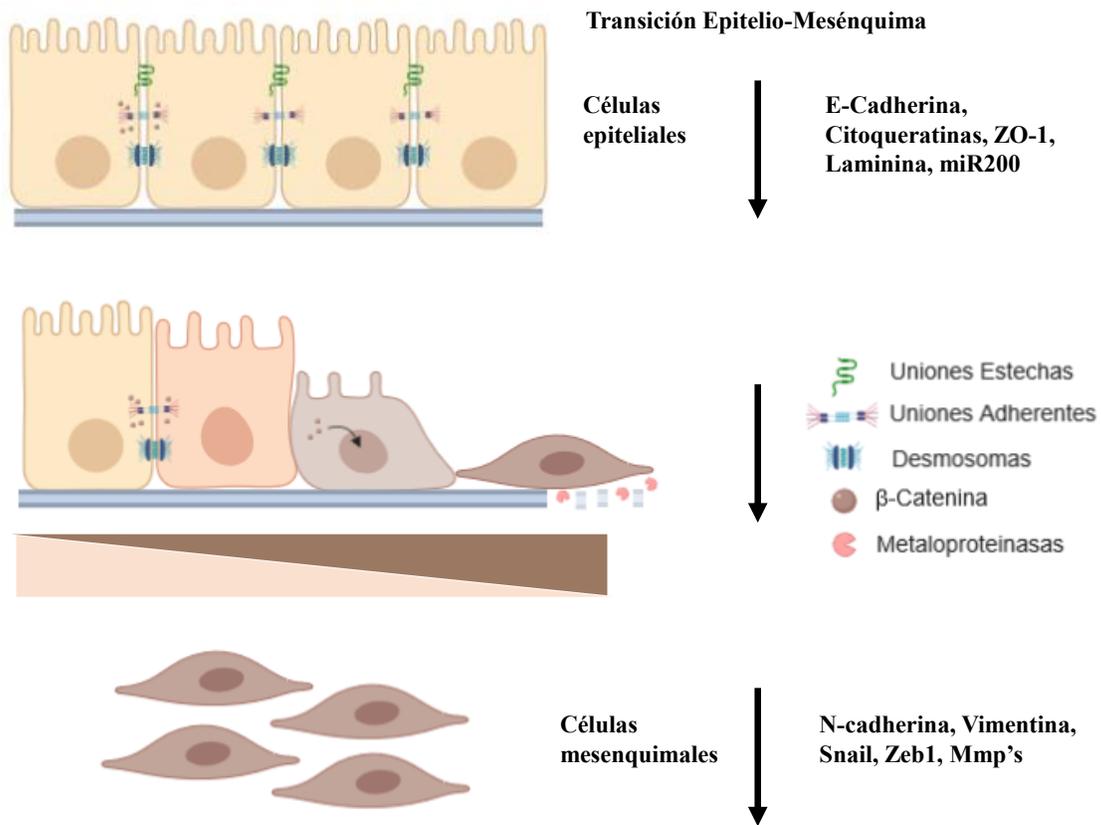


Fig.2 Transición epitelio-mesénquima y algunos de los marcadores epiteliales y mesenquimales más utilizados para evaluar este proceso.

E-cadherina

Las cadherinas están englobadas en una gran familia de glicoproteínas transmembranales que modulan la adhesión celular de manera dependiente de Ca^{2+} . Esta familia se divide en al menos 5 subfamilias de las cuales la subfamilia I alberga a la E-cadherina ⁶².

La E-cadherina forma uniones adherentes mediante interacciones homofílicas en su región extracelular mientras que en su región citoplasmática interactúa de manera indirecta con los microfilamentos de actina a través de la α y la β catenina ^{63,64}. Las interacciones entre células mediadas por E-cadherinas son necesarias para el mantenimiento de la integridad epitelial ya que los anticuerpos que interfieren con esos contactos pueden inducir un fenotipo mesenquimal ⁶⁵. Numerosos estudios indican que existe una correlación entre la disminución de la expresión de E-cadherina y el potencial invasivo de diversos tipos de carcinomas ⁶⁶.

Cambios en la expresión de E-cadherina puede deberse a mutaciones presentes en el gen que codifica para esta proteína, sin embargo, también se ha observado que durante la progresión de ciertos carcinomas la expresión de E-cadherina puede ser regulada a través de mecanismos epigenéticos y por factores de transcripción que reprimen su expresión entre los que se encuentran: Snai1, Slug, ZEB1, Twist, FOXC2 ^{62,67,68}.

Se ha documentado que las ERO pueden producir cambios en la expresión de la E-cadherina a través de alteraciones epigenéticas. Por ejemplo, se ha observado que el H₂O₂ disminuye la expresión de E-cadherina en células de hepatocarcinoma a través de la hipermetilación de su promotor ⁶⁹.

N-Cadherina

La N-cadherina es una molécula de adhesión que pertenece a la familia de las cadherinas clásicas tipo I dependientes de calcio. Consta de 5 dominios extracelulares y un dominio intracelular. La unión entre N-cadherinas de células adyacentes activa la vía de Rho, lo que estimula el ensamblaje de los filamentos de actina y la formación de protusiones invasivas ⁷⁰.

Esta proteína está altamente regulada de manera espacial y temporal. Durante el desarrollo embrionario está involucrada en la osteogénesis, la miogénesis y la maduración de la vasculatura. En la adultez se expresa principalmente en neuronas. En epitelios normales su expresión es baja o está ausente mientras que en carcinomas la expresión aumenta lo que se asocia a un mal pronóstico en algunos tumores ⁷¹. Se ha observado que la expresión ectópica de N-cadherina aumenta la capacidad de formar metástasis en modelos *in vivo* ⁷². Puede parecer contradictorio que una molécula de adhesión se encuentre asociada a incremento de la invasión y metástasis, sin embargo, la N-cadherina promueve estos procesos a través de la modulación de las vías de señalización FGFR y Wnt ⁷⁰.

Snai1

La familia Snail está formada por factores de transcripción con motivos de dedos de zinc e incluye a: Snai1 (Snai1), Snai2 (Slug) y Snai3 (Smuc). Estas moléculas poseen una región en su carboxilo terminal que les confiere la capacidad de unirse a las cajas E (CAGGTG) de

los promotores génicos blanco. Por otra parte, el amino terminal contiene una secuencia que es esencial para la represión transcripcional ⁷³.

Los factores de transcripción Snail fueron los primeros en ser descritos como represores de la expresión del gen de E-cadherina ⁷⁴. Snail se expresa normalmente durante algunas fases del desarrollo embrionario y durante la edad adulta se localiza en fibroblastos, sin embargo, su expresión se ha localizado en células de carcinoma ^{74,75}.

Además de participar en la represión de la expresión génica de E-cadherina, se ha observado que Snail también podría contribuir a promover la agresividad tumoral mediante la modulación de mecanismos de reparación del ADN y por su capacidad de promover la supervivencia celular ^{76,77}.

Zeb1

Zeb1 es otro factor de transcripción que al igual que Snail posee motivos de dedos de zinc que se unen a las cajas E de los promotores de varios genes incluyendo el que codifica para E-cadherina, cuya expresión reprime ^{78,79}.

Además de reprimir la expresión de la E-cadherina, se ha observado que Zeb1 también reprime genes relacionados con el mantenimiento de la polaridad y la diferenciación epitelial, por el contrario la disminución de Zeb1 lleva a un restablecimiento de la polaridad epitelial, es por eso que su expresión en tumores se ha relacionado con una pérdida del fenotipo epitelial y una ganancia del fenotipo invasivo mesenquimal ⁸⁰.

Vimentina

Los filamentos intermedios son uno de los elementos que forman parte del citoesqueleto. El citoesqueleto regula un sinnúmero de actividades entre las que se encuentra movimiento y migración de las células ⁸¹. La vimentina es una proteína que forma parte de los filamentos intermedios, se expresa en células mesenquimales durante el desarrollo embrionario y se encuentra en células como fibroblastos, células endoteliales y macrófagos ⁸².

La Vimentina se ha encontrado sobre expresada en diversos tipos de carcinomas, incluyendo de próstata, de mama, de pulmón, gastrointestinales y también en melanomas, su

sobreexpresión se ha relacionado con un crecimiento acelerado del tumor, invasión y un mal pronóstico en pacientes ⁸³.

Metaloproteinasa de matriz 3 (Mmp3)

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son una familia de enzimas proteolíticas dependientes de zinc y calcio, además de degradar matriz extracelular (MEC) regulan la actividad de factores de crecimiento, citocinas y receptores celulares ⁸⁴.

Particularmente se ha observado que la Mmp-3 se encuentra expresada en células mesenquimales como los fibroblastos localizados en el estroma del tumor donde es capaz de romper las uniones mediadas por E-cadherina generando un fragmento proteico que promueve la invasión, además se ha determinado que es capaz de disparar señales intracelulares que contribuyen al desarrollo de la TEM ^{85,86}.

Interesantemente existe una relación entre las ERO y la inducción de la expresión de Mmp-3. En un estudio se observó que la exposición a H₂O₂ en células epiteliales de glándula mamaria de ratón condujo a la activación de la Mmp-3 y eventualmente al aumento del potencial invasivo ⁸⁷.

Como se puede deducir de los párrafos anteriores, la TEM es un proceso complejo que involucra múltiples funciones por lo que requiere ser altamente regulada a diferentes niveles. En años recientes se ha propuesto que la regulación de la TEM puede categorizarse en 4 tipos de redes: Lejos de ser módulos independientes estas redes se encuentran interconectadas entre sí, el cambio en la actividad de alguna de estas redes tiene impacto en el resto ⁸⁸.

El primer nivel es el postraducciona, el cual involucra la modificación de proteínas involucradas en la TEM, por ejemplo, la fosforilación de Snai1 dada por la cinasa GSK3β. Un segundo nivel es el transcripcional en el cual, como su nombre lo indica participan principalmente factores de transcripción que promueven o inhiben la expresión de genes clave, un ejemplo de estos son los que ya hemos mencionado, Zeb1 y Snai1. El splicing alternativo provee otra capa de regulación, se ha visto que ciertas isoformas son capaces de estimular la TEM. Por último, uno de los niveles menos explorados está dado por los ARN

no codificantes, entre estos se encuentran los miRNAs de los cuales se hablará a profundidad a continuación ⁸⁸.

Los miRNAs como reguladores de la Transición epitelio-mesénquima

Los microRNAs (miRNAs), son RNAs no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos que modulan la expresión génica de manera post-transcripcional mediante la inhibición de los RNA mensajeros (RNAm) ⁸⁹.

El desequilibrio en el funcionamiento de los miRNAs conduce a la generación de una gran variedad de fenotipos entre los que se encuentran: defectos en el desarrollo de diversos órganos y tejidos, así como defectos en la función celular, fisiológicos e incluso conductuales indicando la importancia de la correcta expresión de los miRNAs en el mantenimiento de la homeostasis celular ⁹⁰.

Biogénesis de los miRNAs

Los genes que codifican a los miRNAs generalmente se localizan en regiones intergénicas, aunque también se ha observado que se localizan en regiones intrónicas de regiones codificantes.

En los metazoarios la biogénesis de los miRNAs (**Fig. 3**) comienza cuando una RNA Pol II o III forma un transcrito primario denominado pri-miRNA, este transcrito tiene regiones que se auto complementan lo que resulta en una estructura que contiene horquillas y RNA de doble cadena ^{91,92}. Un complejo heterotrimérico denominado microprocesador formado por una molécula de RNAsa llamada Drosha y dos moléculas de una proteína de unión a RNA de doble cadena llamada DGCR8 procesa el pri-miRNA cortándolo en la base del tallo originando un pre-miRNA ⁹³. El pre-miRNA es reconocido por el factor nuclear de exportación 5 (Exp-5) que con ayuda de una GTP-Ran forma un complejo de transporte que transloca al pre-miRNA hacia el citoplasma ⁹⁴. En el citoplasma el pre-miRNA es cortado por la RNAsa Dicer que produce cadenas de RNA dúplex de aproximadamente 22 nucleótidos que contienen al miRNA maduro y una cadena complementaria (miRNA/miRNA*). El miRNA es incorporado al complejo silenciador inducido por RNA o RISC. El RISC es un complejo formado por Dicer, TRBP, PACT, proteínas Argonauta y el

miRNA que es complementario a la secuencia blanco y sirve como guía para unírsele, lo que tiene como consecuencia la inhibición de la traducción^{95,96}.

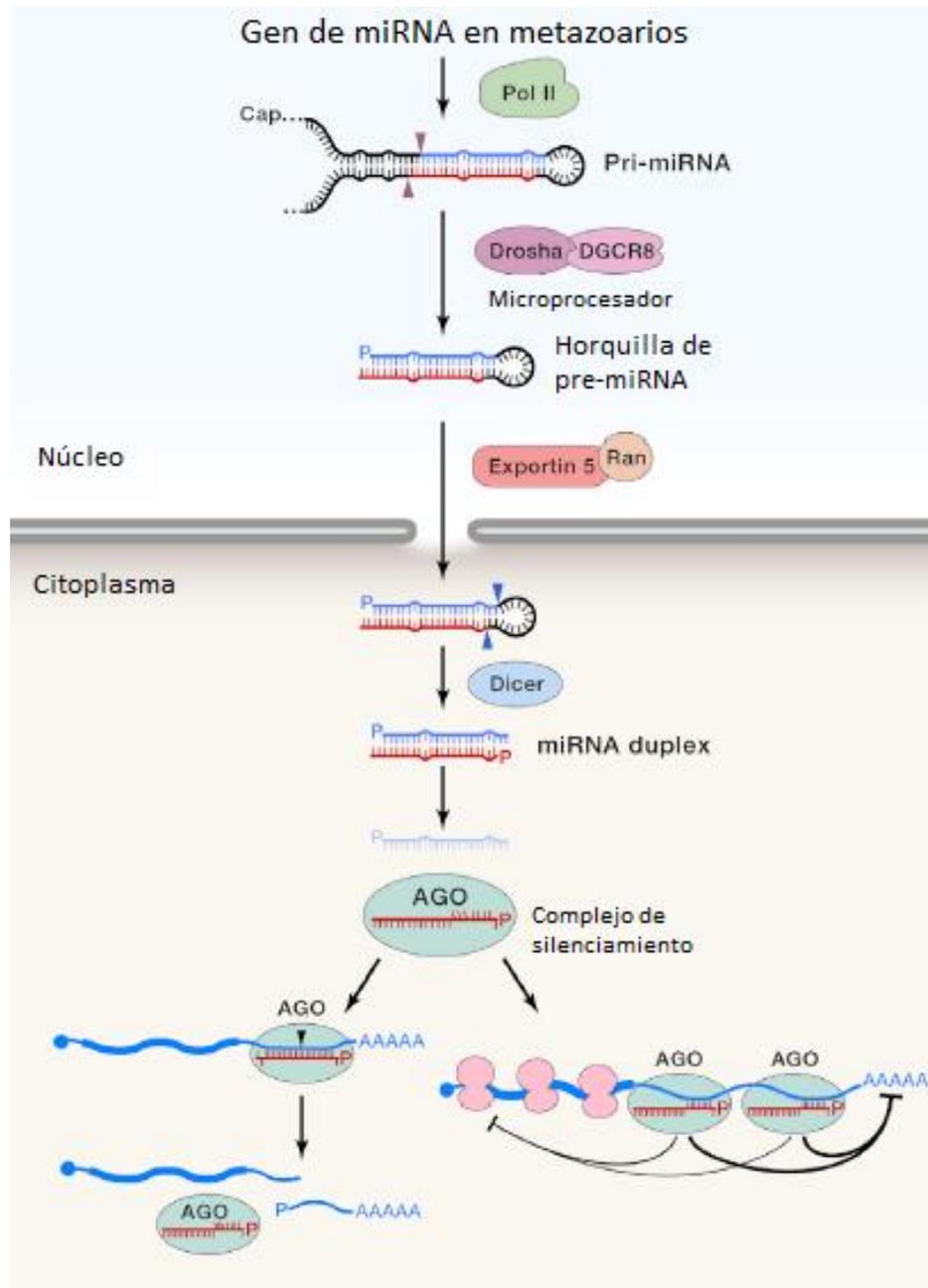


Fig 3. Biogénesis de los miRNAs (modificado de Bartel 2018)¹⁰⁷.

En este punto hay algunas diferencias entre lo que sucede entre plantas y animales, en el caso de plantas la complementariedad entre el miRNA y el RNAm blanco es perfecta o casi perfecta lo que lleva a la ruptura del RNAm y a su subsecuente degradación, en animales la complementariedad puede ser imperfecta lo que conduce simplemente a la inhibición de la traducción del RNAm ^{89,90}.

Se estima que más del 60% de los genes que codifican para proteína tienen uno o más sitios de unión conservados para miRNAs ⁸⁹, por eso no es de sorprender que un cambio en el patrón de expresión de los miRNAs esté asociada al padecimiento de enfermedades, entre ellas el cáncer. El cambio en el patrón de expresión de los miRNAs puede deberse a cambios en el genoma que afecten a su secuencia (amplificación, deleción, mutación y silenciamiento epigenético) o bien a alguna alteración en la vía de procesamiento y formación de los miRNAs ^{97,98}. Desde que en 2002 Calin y su equipo detectaron por primera vez cambios en los niveles de expresión de ciertos miRNAs en leucemia, estos resultados se han replicado en diversos tipos de tumores sólidos ⁹⁹. La función de los miRNAs dentro del desarrollo del cáncer es compleja, ya que dependiendo el blanco que se encuentran regulando pueden ser clasificados como supresores de tumores u oncogenes (a menudo sus productos son denominados oncomirs), así que diferentes familias de miRNAs pueden estar sobre o sub regulados durante el cáncer ^{100,101}.

Ciertas familias de miRNAs han demostrado ser importantes en el desarrollo de la TEM y la invasión tumoral. Por ejemplo, la evidencia indica que la familia miR-200 inhibe la expresión del factor de transcripción Zeb1, además el TGF- β , un potente inductor de la TEM, induce la metilación de miR-200 lo que tiene como consecuencia la disminución de su expresión ¹⁰². Otros miRNAs que podrían poseer efectos anti invasivos son; miR-133q-3p, miR-205 y miR-429 ¹⁰³⁻¹⁰⁵. Entre los miRNA que incrementan el potencial invasivo y la migración están; miR-10b, miR-223, miR-373 y miR-520c ¹⁰⁶.

Antecedentes directos

En estudios previos de nuestro equipo de investigación se observó que una línea celular de fibroblastos de ratón expuesta a una mezcla de metales (As, Cd y Pb) era capaz de incrementar el potencial transformante en estas células asociado a una selección clonal. Más

aún, estos procesos se correlacionaron con la generación de ERO, aumento de la genotoxicidad y peroxidación de las membranas biológicas. Así mismo se logró determinar la participación de las ERO en estos procesos, pues cuando las células fueron cotratadas con un antioxidante (N-acetyl-cisteína, NAC) y la mezcla de metales se observó una disminución del potencial transformante, sin embargo el efecto del tratamiento fue limitado cuando se administró como estímulo iniciador o ambos ¹⁷. Este fenómeno fue estudiado más a fondo y se logró determinar que la mezcla de As, Cd y Pb inducen la transformación solo cuando actúan como estímulo iniciador del proceso ¹⁸.

Posteriormente y con el fin de determinar el papel de la barrera antioxidante en el proceso de transformación, una línea celular hepática embrionaria expuesta a una mezcla de As, Cd y Pb fue tratada con inhibidores de la síntesis de GSH (L-butionina-S,R-Sulfoximina, BSO) y de catalasa (3-Aminotriazol, AZT), dos elementos importantes de la defensa antioxidante, los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que la transformación ocurrió solo en aquellas células expuestas a la mezcla de metales y tratadas con los inhibidores sugiriendo el papel preponderante de la barrera antioxidante durante la transformación celular inducida por la exposición a la mezcla de metales ¹⁰⁸.

Puesto que la actividad del BSO y el ATZ no es específica y aumentan el transporte de metales hacia el interior de la célula, se decidió inhibir la expresión de la catalasa y de Gclc (la enzima limitante en la producción de GSH) mediante el uso de shRNAs ¹⁰⁹. Con esta estrategia, se observó que las células con abatimiento antioxidante y expuestas a una mezcla de As, Cd y Pb por 36 días, presentaban aumento de la migración y de la expresión de α -SMA sumado a una disminución de la expresión de E-Cadherina indicando un posible proceso de TEM, sin embargo, más marcadores y estudios de invasión son necesarios para caracterizar de una manera más profunda la TEM y que función tienen los miRNAs en la regulación postranscripcional durante este proceso.

Estos resultados en conjunto indican que el desbalance entre la defensa antioxidante y la producción de ERO tiene una función importante en el proceso de transformación celular. Además, puesto que la TEM es un proceso crucial para el desarrollo de la malignidad celular, es de suma importancia estudiar los procesos implicados en su inducción y desarrollo. Es

importante mencionar que la TEM es un proceso reversible, por lo que es importante determinar los mecanismos que regulan el cambio en el patrón de expresión genética incluyendo aquellos mediados por miRNAs.

Por estas razones, en este estudio se investigó el efecto de la barrera antioxidante sobre la transición epitelio-mesénquima en células epiteliales de hígado de rata (Clona 9) expuestas a una mezcla de metales (Pb, Cd, y As), así como el posible papel de las ERO durante el desarrollo de este proceso. Además de realizar una búsqueda *in silico* de posibles miRNAs que se encuentren regulando este proceso y determinar su perfil de expresión.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los datos epidemiológicos muestran que la exposición ocupacional a ciertos metales pesados, entre ellos As, Cd y Pb, está relacionada con un mayor riesgo de padecimiento de cáncer. Así mismo, estos tres metales comparten la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno las cuales son capaces de generar alteraciones génicas que potencialmente pueden producir células con un fenotipo maligno.

Uno de los sellos distintivos del cáncer es la activación de un programa que le permite a la célula adquirir un fenotipo invasivo, en este sentido diversos datos indican que la Transición Epitelio-Mesénquima está prominentemente implicada en la manera en la que las células epiteliales adquieren las características que les permiten invadir, resistir la apoptosis y diseminarse a través de los tejidos. La TEM es un proceso reversible que está modulado a diferentes niveles, en el nivel post-transcripcional los miRNAs regulan la traducción de los RNAm apareándose con estos y llevándolos a su degradación.

Tomando lo anterior en consideración el planteamiento del problema se puede reducir en la siguiente pregunta:

¿La exposición a una mezcla de metales (As, Cd y Pb) induce un proceso de TEM en las células clona 9 con la barrera antioxidante abatida?

HIPÓTESIS

La disminución de la barrera antioxidante favorecerá la inducción de la transición epitelio-mesénquima y la capacidad de migración en la línea celular epitelial clona 9 expuesta a una mezcla de metales (As, Cd y Pb).

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar en la línea celular clona 9 con la barrera antioxidante abatida y expuesta a metales el proceso de transición epitelio-mesénquima y detectar miRNAs que sean relevantes durante este proceso mediante una búsqueda *in silico*.

Objetivos particulares

- Determinar la expresión de Gclc y Cat en las células clona 9 control y las células doblemente transfectadas.
 - Determinar la expresión de marcadores característicos de la Transición Epitelio Mesénquima en las células clona 9 control y transfectadas expuestas a una mezcla de Cd, Pb y As a lo largo de 36 días.
 - Determinar la capacidad de migración de las células expuestas a una mezcla de metales con la barrera antioxidante abatida.
 - Cuantificar las especies reactivas de oxígeno
 - Determinar el daño al ADN en las células clona 9 expuestas a la mezcla de metales.
 - Determinar los posibles miRNAs que podrían estar regulando este proceso mediante una búsqueda *in silico*.
-

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Para este estudio se utilizó la línea celular clona 9 (ATCC® CRL-1439™) derivada de células epiteliales de hígado de rata de 4 semanas de la cepa Sprague-Dawley. Se sembraron 2×10^5 células en cajas p100 conteniendo 10 mL de medio F-12K (Gibco®) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Las células clona 9 (C9) que contienen los shRNA contra Catalasa y Gclc (Doble Transfectadas, DB) se cultivaron y seleccionaron en el mismo medio más puromicina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las células fueron incubadas a 37°C, 95 % de O₂ y 5% de CO₂ por 36 días.

Cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia (regularmente una vez por semana) fueron resembradas en una nueva caja. El cambio de medio se realizó cada tercer día (72 horas) y se tomó muestra cada seis días para las pruebas descritas posteriormente.

Abatimiento de la expresión de Catalasa y Gclc

Para este estudio se utilizaron células clona 9 transfectadas con shRNAs (RNA de horquilla pequeña) que inhiben la expresión de catalasa (Cat) y la subunidad catalítica de la γ -glutamyl cistein ligasa (Gclc). Las secuencias de los shRNAs se diseñaron con base en el RNA mensajero de la secuencia blanco: ShRNA1 (AGGTCACCCACGATATTA) hibrida del nucleótido 389 a 406 del RNAm de catalasa, shRNA2 (TGTGAATGTCCAGAGTTA) hibrida del nucleótido 1900 a 1917 del RNAm de Gclc. Las secuencias fueron sintetizadas por IDT™ (Coralville, IA, EUA).

Los shRNA se ligaron a un plásmido pLVx-shRNA. Posteriormente, se transformaron las células *E. Coli* (GCL-5a) por medio de choque térmico con cada una de las ligaciones. Las células transformadas se seleccionaron con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en medio sólido (Luria-Bertani), las células obtenidas se expandieron y se purificó el plásmido, tras lo cual se corroboró la inserción del sh con MluI (NEB). Una vez corroborada la inserción, se utilizó el plásmido para transfectar las células clona 9 utilizando una mezcla 3:1 de FuGENE 6 transfection ReagentDNA (Promega), las cuales se seleccionaron posteriormente con puromicina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se cosecharon las células y se expandieron.

Exposición a la mezcla de As, Cd y Pb

Para la exposición de metales se utilizó: Arsenito de Sodio, (NaAsO_2), cloruro de cadmio (CdCl_2) (Aldrich Chemical Co.) y acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (J.T. Baker (Mexico)).

Las células Clona 9 se expusieron a la mezcla de metales con la siguiente concentración final que equivale a una concentración equimolar a la presentada ocupacionalmente: NaAsO_2 $2\mu\text{M}$, CdCl_2 $2\mu\text{M}$ y $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $5\mu\text{M}$. El tratamiento se adicionó con cada cambio de medio, cada tercer día, de tal manera que la concentración de la mezcla de metales se mantuviera constante durante los 36 días.

Cuantificación de células y medición de la viabilidad

Para la cuantificación de las células se utilizó un contador de células automatizado (Moxi™ Z ORFLO), empleando $75\mu\text{L}$ de una dilución 1:10 de las células cosechadas. La cuantificación de Moxi se basa en un algoritmo matemático que clasifica las partículas totales provenientes de una muestra de acuerdo a su tamaño, Moxi™ Z genera un valor denominado MPI (Moxi Population Index) que es la proporción de la población de células viables con respecto a la distribución total de partículas en la muestra (células vivas, células muertas y detritos).

Para la medición de la viabilidad se utilizó el método de diacetato de fluoresceína [3',6'-diacetilfluoresceína] (FDA) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) el cual se basa en la actividad de las esterasas. En esta técnica, sólo las células viables convierten FDA en fluoresceína la cual puede visualizarse en el microscopio de fluorescencia. Para el ensayo las células se mezclaron con una solución que contenía $0.02\mu\text{g/mL}$ de bromuro de etidio (BrEt) y $0.015\mu\text{g/mL}$ de FDA. Las células se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus BMX-60 con un filtro UM61002), las células teñidas de verdes se identificaron como vivas, mientras las células teñidas de rojo se identificaron como muertas. Se analizaron 100 células por cada tratamiento y los resultados fueron expresados como porcentaje.

Obtención de RNA total

La extracción de RNA se realizó utilizando el kit Maxwell® simplyRNA Cells Kit (Promega) para RNA total celular. Las células se cosecharon con tripsina al 0.25%, para cada ensayo se

cosecharon 1×10^6 , se centrifugaron a 300 xg por 2 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadieron 200 μL de solución homogenizadora, los tubos se agitaron en el vortex y posteriormente se adicionaron 200 μL de solución de lisis, la mezcla fue depositada en los cartuchos proporcionados por el kit y se siguieron las especificaciones del protocolo de purificación automatizada por el equipo Maxwell®. La cantidad de RNA obtenida fue cuantificada en un NanoDrop™ ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific), la calidad del RNA se analizó con relación a la absorbancia $260/280 = 2.0 \pm 0.15$. Las muestras con una pureza menor a este parámetro fueron descartadas. Las muestras aptas para PCR se almacenaron a -20°C .

RT- PCR

Las reacciones de RT-PCR se realizaron utilizando el kit Access RT-PCR system (Promega, Madison, WI, USA) a partir de 200 ng de RNA total. Para cada reacción se utilizaron: 5 μL de Buffer de reacción AMV/T fl 5X, 1 μL de MgCl_2 , 1 μL de dNTP's, 1 μL de cada uno de los oligonucleótidos sentido y antisentido (Stock a 10 mM), 0.5 μL de la enzima reverso transcriptasa (RT-Pol) y 0.5 μL de la enzima ADN polimerasa, el volumen final se ajustará a 25 μL con H_2O RNase Free. Este kit permite realizar la retrotranscripción y la PCR en una sola reacción. Las condiciones fueron las siguientes: 1 ciclo de síntesis de cDNA que comenzó a 94°C , 45°C 45 minutos y 94°C 2 minutos. 30 ciclos: 94°C , 55°C y 72°C 2 minutos. La extensión final fue de 72°C por 2 minutos y terminó a 4°C .

Los primers utilizados para cada gen se muestran en la **tabla x**

Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. La intensidad de las bandas se analizó por densitometría utilizando el programa KODAK 1D (Scientific Imaging System).

Gen	Número de acceso	Nombre del gen	Primer Forward	Primer Reverso	Tm °C	Amplificación [bp]
Snai1	NM_053805.1	Snail represor transcripcional 1	5'-TCCGATGAGGACAGTGGCA	5'-CAGTGGGAGCAGGAGAAAGG	60	365
Vim	NM_031140.1	Vimentina	5'-TCCTTCGAAGCCATGTCCAC	5'-GTGGTCACATAGCTCCGGTT	60	110
Mmp3	NM_133523.3	Metaloproteinasa de matriz 3	5'-CCTCTATGGACCTCCCACAGAATC	5'-GTGCCAATGCCTGGAAAGTTC	60	522
Zeb1	NM_001308265.1	zinc finger E-box binding homeobox 1	5'-AGCCAAATGGAAACCAGGATGA	5'-AGGTCACATGCGTACATCCC	60	136
Cdh2	NM_031333.1	N-cadherina	5'-GACCCAGAAGATGATGTAAG	5'-CTCAGCGTGGATAGGC	55	171
Cdh1	NM_031334.1	E-cadherina	5'-AGACCAACGAGGGCATTCTG	5'-TCAGCCCGAGTGGAATGAC	60	352
GAPDH	NM_017008	gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	5'-ACAAGATGGTGAAGGTCGGTG	5'-GCATCAAAGGTGGAAGAATGG	54	889
GCLC	NM_012815	glutamil-cisteina ligasa (subunidad catalítica)	5'-TGGAGCCCCTGAAGAACAATC	5'-AAACATCCCCTGTAAGACGGC	52	512
CAT	NM_012520	catalasa	5'-TGTGGTTTTACCGACGAGAT	5'-GCTTGAAGGTGTGTGAGCCAT	52	503

Ensayo de dihidrorodamina 123

La detección de ERO se basó en la capacidad de oxidación de la dihidrorodamina 123 hacia rodamina 123. Las células se cultivaron en las condiciones descritas anteriormente. El medio fue removido y las células se lavaron con PBS. Las células se cosecharon con tripsina al 0.25% (p/v). Posteriormente, las células se contaron utilizando el cuantificador de células automático MOXI (ORFLO, Montana, US). Se obtuvieron alícuotas equivalentes a 2×10^5 células (200,000 células) las cuales fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue desechado y a la pastilla resultante se le adicionó un volumen de 180 μ L de buffer A (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.8 mM $CaCl_2$, 5 mM de glucosa y 15 mM de HEPES) y 20 μ L de dihidrorodamina 123 (1 mM). Esta mezcla fue puesta en una placa de 96 pozos y la absorbancia fue leída a una longitud de onda de 505 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan™ GO, Thermo Scientific™, Waltham, MA.). La concentración de rodamina se obtuvo interpolando los datos con una curva estándar de rodamina 123 en buffer A a diferentes concentraciones (de 0 a 10 μ M). Los datos se expresaron como concentración de rodamina por 200000 células (μ M de rodamina 123/2 x 10^5).

Ensayo Cometa

Se cosecharon 1×10^5 células para cada tratamiento, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. La pastilla resultante se resuspendió en 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 %, la mezcla fue colocada en un portaobjetos con una capa de agarosa regular, después de colocar la muestra se añadió otra capa de agarosa de bajo punto de fusión. Después de incubar en Buffer de lisis (NaCl 2.5 M, 100 mM EDTA disódico, 10 mM TRIS-BASE pH 10), las laminillas se depositaron en una cámara durante 10 minutos con buffer de electroforesis (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13), pasado este tiempo se corrió la electroforesis durante 10 minutos a 300 mA y 25 V (0.8 V/cm). Posteriormente las laminillas se lavaron 2 veces con buffer de neutralización (0.4 M Tris, pH 7.5), se deshidrataron con etanol al 96% y se secaron a temperatura ambiente. Para visualizar los núcleos se añadió 20 μ L de BrEt (2 μ g/ml) y se observaron en un microscopio utilizando el objetivo 20x. Las imágenes se procesaron utilizando el programa KOMET v.31 (Kinetic Imaging) y se utilizó el Olive Tail Moment (OTM) como parámetro para evaluar el daño.

Ensayo de herida

Se utilizó un cultivo a 85-90% de confluencia, 24 horas previo a realizar la herida las células fueron incubadas con medio F-12K con restricción de suero fetal bovino (SFB 2%). Pasado este tiempo se realizó una herida a la mitad de la caja utilizando una punta de micropipeta de 100 μ L, se realizó un lavado con PBS para retirar los detritos y se agregó medio F-12K con restricción de suero (SFB 2%), el proceso del cierre de la herida se documentó mediante fotografías a diferentes tiempos (0, 4, 8 12 y 24 horas). La cuantificación del cierre de la herida se realizó utilizando el plugin MRI Wound Healing Tool del programa de distribución libre ImageJ/Fiji.

Búsqueda de miRNAs

Para la búsqueda de miRNAs que pudiesen estar regulando este proceso se utilizaron diversos genes de la TEM reportados por la literatura. Con el símbolo oficial de los genes se realizó una búsqueda en la base de datos miRWalk 2.0 para identificar miRNA capaces de unirse a la región 3'UTR de los RNA mensajeros blanco. Se eligieron aquellos miRNAs con un valor de p menor a 0.05 y que tuviesen más de un blanco de los marcadores de la TEM mencionados previamente:

Con la lista de los miRNAs obtenidos se realizó una búsqueda de blancos utilizando TargetScan7.2. Para determinar en qué vías de señalización participaban dichos genes, los nombres oficiales de los genes blanco obtenidos se introdujeron a la herramienta bioinformática DAVID con la cual se obtuvieron las vías KEGG en las que se encuentran involucrados los productos de los genes blanco.

Análisis estadístico

Los datos se encuentran expresados como las medias \pm el error estándar (EE). Para determinar la normalidad de los datos se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. En el caso de los datos con distribución normal las diferencias estadísticas fueron determinadas por medio de una prueba de t de Student. La significancia estadística se estableció a un nivel de $p < 0.05$ de una cola. Las diferencias estadísticas entre más de dos grupos fueron determinadas mediante una ANOVA de una vía (95% CI), seguido de una prueba de Dunnet *post hoc*. En el caso de los datos que no presentaron distribución normal se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis

seguida por una prueba *post hoc* de Dunn. El procesamiento de datos se realizó con GraphPad Prism 7.0.

Diseño experimental y toma de muestras

La recolección de RNA total, las muestras para los ensayos cometa y lipoperoxidación, así como la medición de la viabilidad y la cantidad de ERO fueron tomadas de acuerdo al protocolo que se muestra en la **Figura 4**.

Toma de las muestras

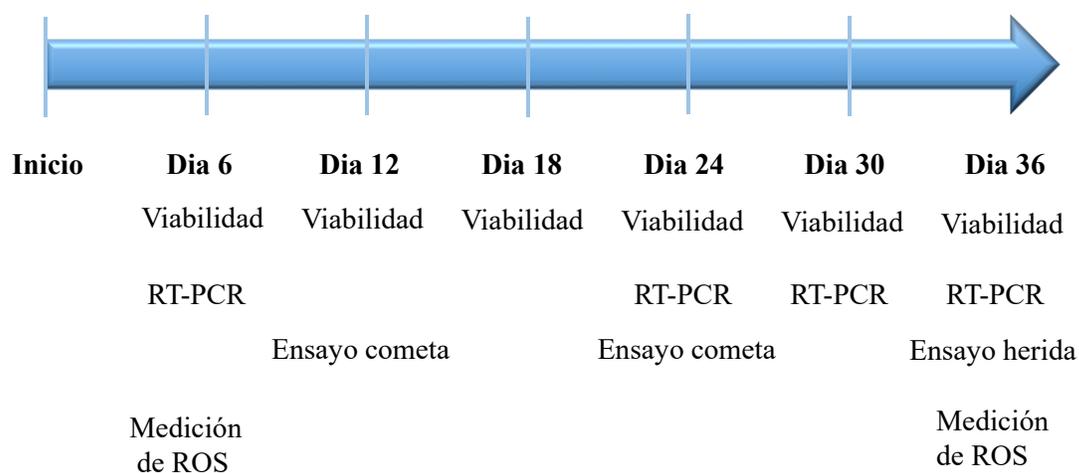


Fig 4. Esquema del protocolo de toma de muestras

RESULTADOS

Abatimiento de la barrera antioxidante

Con el fin de corroborar el abatimiento de la expresión de Catalasa y Gclc se determinó el nivel de expresión del RNAm mediante RT-PCR. En la **Figura 5**, se muestra la cuantificación de las densitometrías, en donde puede observarse una disminución de la expresión tanto de Gclc como de catalasa con respecto al control.

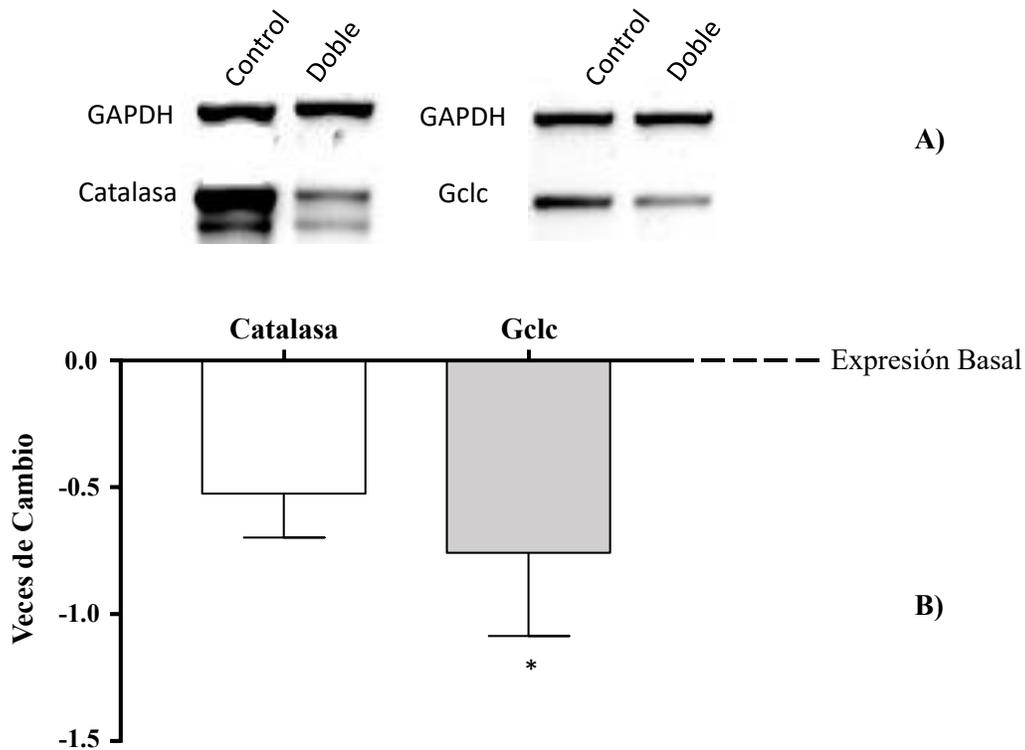


Fig. 5 A) Se muestra la expresión del RNAm de catalasa y Gclc en las células clona 9 control comparadas con las células clona 9 (C9) que poseen el sh/cat y sh/gclc (doble mutante o DB). **B)** Se muestra la cuantificación de la expresión del RNAm de catalasa y Gclc en las células clona 9 control comparadas con las células clona 9 que poseen el sh/cat y sh/gclc. Puede observarse una disminución de aproximadamente 52 % de la expresión en el caso de catalasa y de 75 % en el caso de Gclc. Los datos se encuentran normalizados con respecto a la expresión del control (clona 9 silvestre) la cual se consideró como basal (* $p < 0.05$, $n = 3$, las barras muestran el error estándar o E.E.).

Medición de la viabilidad

Al medir la viabilidad con el método de FDA y mediante el parámetro MPI (moxi population index) se observaron diferencias en los resultados obtenidos entre ambos métodos. Cabe mencionar que el valor de MPI está basado en la esfericidad de las partículas medidas y la viabilidad determinada mediante el FDA se basa en actividad de las enzimas esterases. En la **Figura 6**, Puede observarse que tanto en el caso del MPI como de la viabilidad obtenida con el método FDA en los grupos C9, C9+met y DB no se observaron diferencias. En el caso de las células DB+met el MPI se mantuvo por debajo del resto de los grupos, mientras que en las mediciones de viabilidad utilizando FDA la viabilidad se recuperó paulatinamente a lo largo de los 36 días en el grupo DB+ metales.

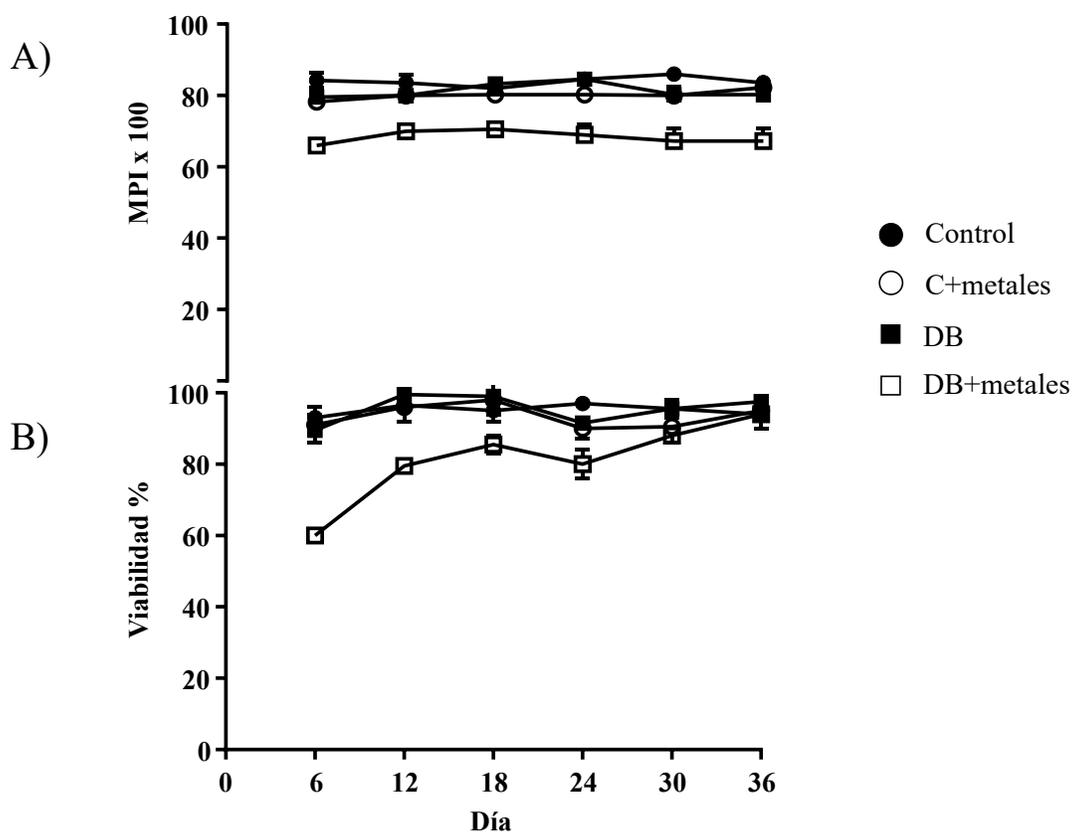


Fig. 6 Medición de la viabilidad en células Control (C9), C9+metales, DB y DB expuesta a los metales utilizando el parámetro Moxi Population Index A) y el método de FDA que mide la actividad de las esterases B) $n=3$.

Evaluación de daño al ADN mediante el ensayo cometa

Para determinar si el abatimiento de la barrera antioxidante y la exposición a la mezcla de metales tenía un efecto genotóxico se realizó el ensayo cometa en el día 12 y 24. El análisis se realizó con los datos de Olive Tail Moment (OTM), en las gráficas estos datos fueron normalizados con respecto al control (células clona 9 sin exposición a metales) el cual se consideró el 100% de daño o daño basal. Mediante la prueba de Shapiro-Wilk se determinó que los datos no se ajustaban a una distribución normal por lo que se procedió a realizar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba *post hoc* de Dunn.

En la **Figura 7** se muestra la gráfica de los datos obtenidos durante el día 12 y el día 24. Durante el día 12 se observó un aumento significativo del daño al ADN sólo en las células DB y expuestas a la mezcla de As, Cd y Pb con respecto al resto de los grupos (células control clona 9, C9+met y DB). En las células DB + metales se observó 67 % más daño con respecto al control, en el caso del resto de los grupos no se observaron diferencias entre ellos. Interesantemente en el día 24 se mantuvo la misma proporción del daño, siendo el tratamiento DB+met el que presentó daño significativo con respecto al resto de los grupos (58% más daño con respecto al control).

En el caso de las células C9 expuestas a metales (C9 + met) se observó un ligero incremento en el daño que no llegó a ser estadísticamente significativo.

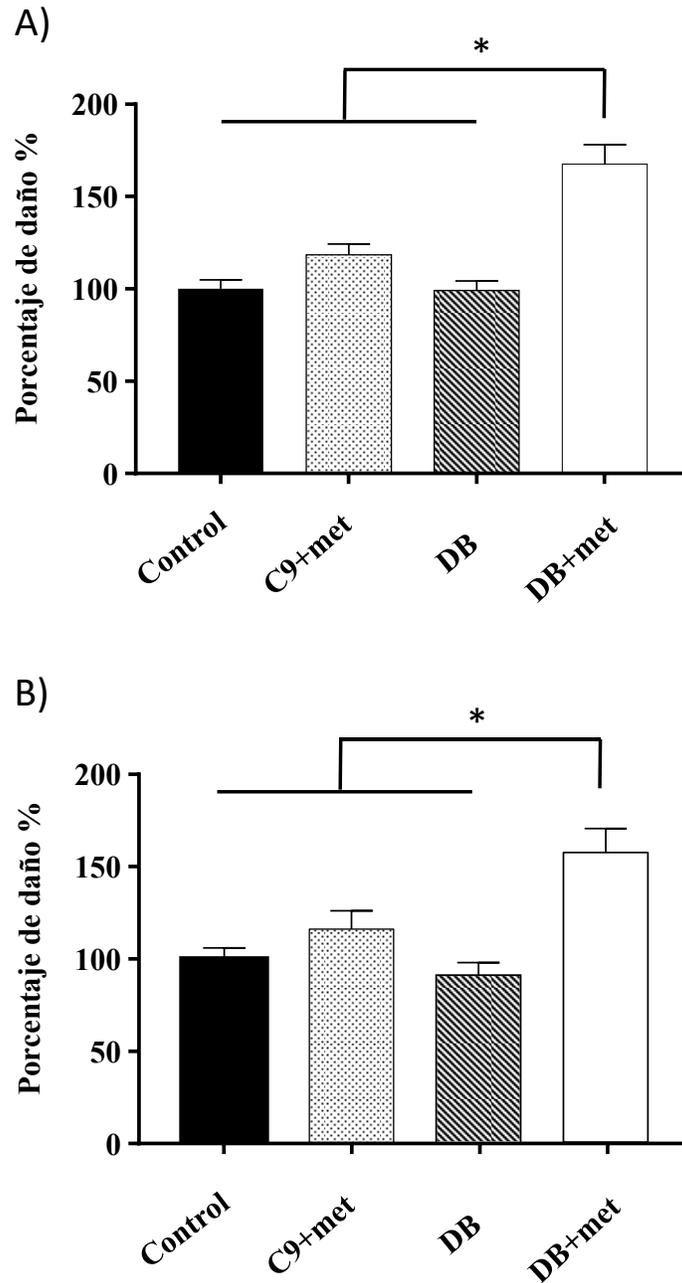


Fig.7 Se muestra el nivel de daño al ADN de los distintos tratamientos en el **día 12(A)** y **día 24 (B)** con respecto al control que fue considerado como el basal (100%). Las claves de los tratamientos son las siguientes Control= clona 9 sin metales, C9+met= células clona 9 que fueron expuestas a la mezcla de As, Cd y Pb, DB=Células que tienen abatida la expresión de Gclc y de Catalasa (* $p < 0.05$, 100 núcleos por tratamiento).

Evaluación de las especies reactivas de oxígeno

Las mediciones de las especies reactivas de oxígeno que se realizaron en los días 6 y 36 revelaron que en la primera semana los grupos que fueron expuestos a la mezcla de metales presentaron un incremento en las ERO (**Fig. 8**). En el día número 6, en el grupo control (células C9 sin exposición a metales) se obtuvo un promedio de 0.38 μM de rodamina, en el grupo C9 + metales 0.83 μM , en el grupo DB 0.52 μM y el grupo DB + metales 0.97 μM . En el día 36 el grupo C9 + metales disminuyó la producción de ERO mientras que en las células DB + metales la concentración de rodamina se incrementó. Para este día la concentración de rodamina promedio para cada grupo fue de: 0.9 μM en las células control C9, de 0.5 μM para las células C9 expuestas a la mezcla de metales (C9+met), de 0.59 μM en las células DB y de 1.44 μM para las células DB+met.

En el día número 6, el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de una prueba de Dunnett reveló un aumento estadísticamente significativo en la producción de ERO en las células C9 y las DB expuestas a la mezcla de As, Cd y Pb (C9+ met y DB+met) con respecto al grupo control. En el día 36 solo el grupo DB + metales mantuvo diferencias significativas. Notoriamente, en el grupo DB+met el comportamiento de la producción de ERO se correlaciona con el daño al ADN mostrado anteriormente mostrando los valores más altos en ambos ensayos. En el día 36 sólo el grupo DB + metales presentó diferencias significativas con respecto al control.

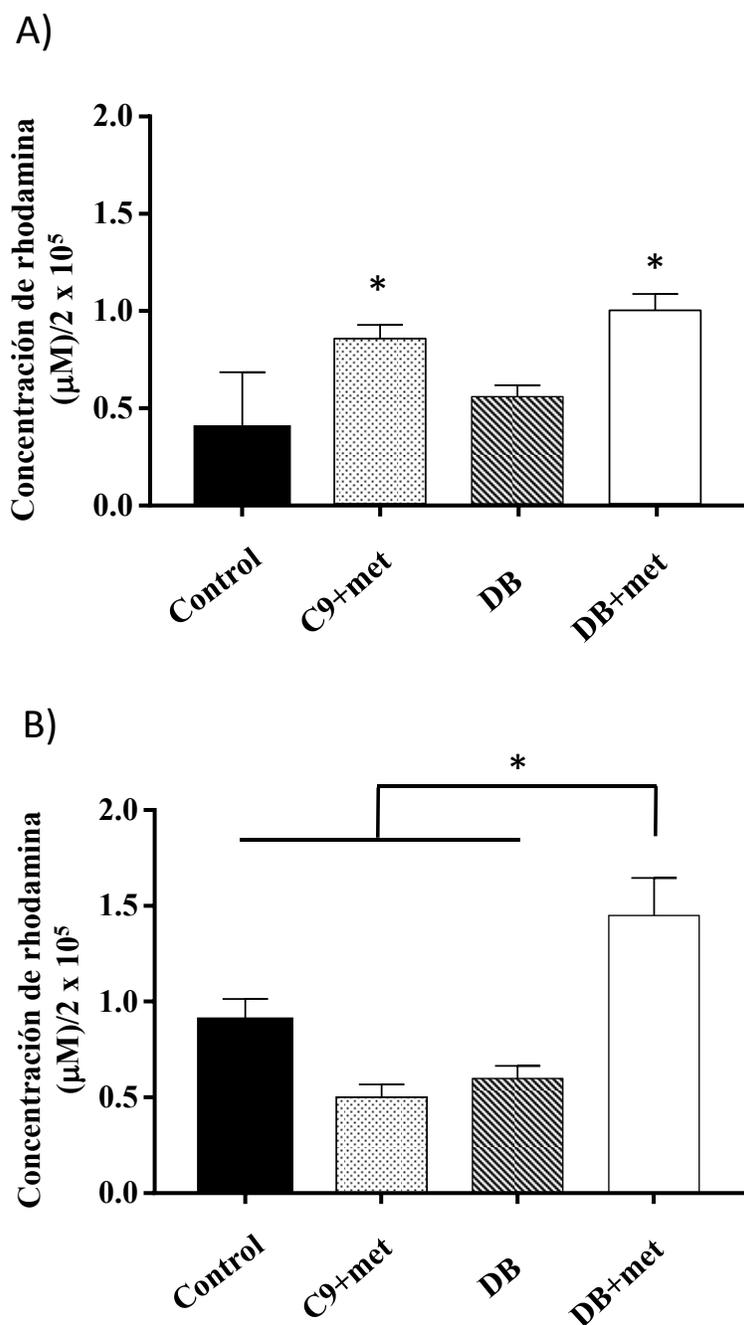


Fig. 8 Se muestran los resultados de la medición de ERO en términos de concentración de rhodamina por cada 200,000 células. El inciso **A)** muestra los resultados del día 6 y el inciso **B)** los del día 36. Los datos se encuentran expresados como el promedio \pm Error Estándar (E.E.) (* $p < 0.05$, $n=3$).

Expresión de los marcadores de TEM

Para determinar si la disminución de la barrera antioxidante y/o el tratamiento con la mezcla de metales era capaz de inducir un fenotipo mesenquimal en la línea celular epitelial clona 9, se evaluó la expresión de 6 marcadores de la TEM.

En el día 6 se observó una tendencia hacia el aumento de la expresión de los marcadores mesenquimales y una disminución de la expresión de Cdh1 en las células DB+met, el marcador que más aumenta su expresión fue Snai1 elevándose más de dos veces su expresión basal. Durante la semana 4 la disminución de Cdh1 continuó, pero en el caso de Snai1 y Cdh2 las células DB aumentaron su expresión.

En el día 24 la tendencia al aumento de Snai1 y la disminución de Cdh1 se mantuvo mientras que la expresión de Zeb1 disminuyó, así mismo las células DB presentaron un aumento en la expresión de estos marcadores.

En el día 30 hay una disminución de la expresión de los factores de transcripción casi a valores basales, mientras que los marcadores considerados tardíos, como vimentina y Cdh2 incrementaron su expresión, interesantemente la disminución de la expresión de Cdh1 se mantuvo en el grupo DB + metales.

Uno de los marcadores evaluados fue Mmp-3, sin embargo, no se observó expresión en ninguno de los tratamientos ni a lo largo del tiempo.

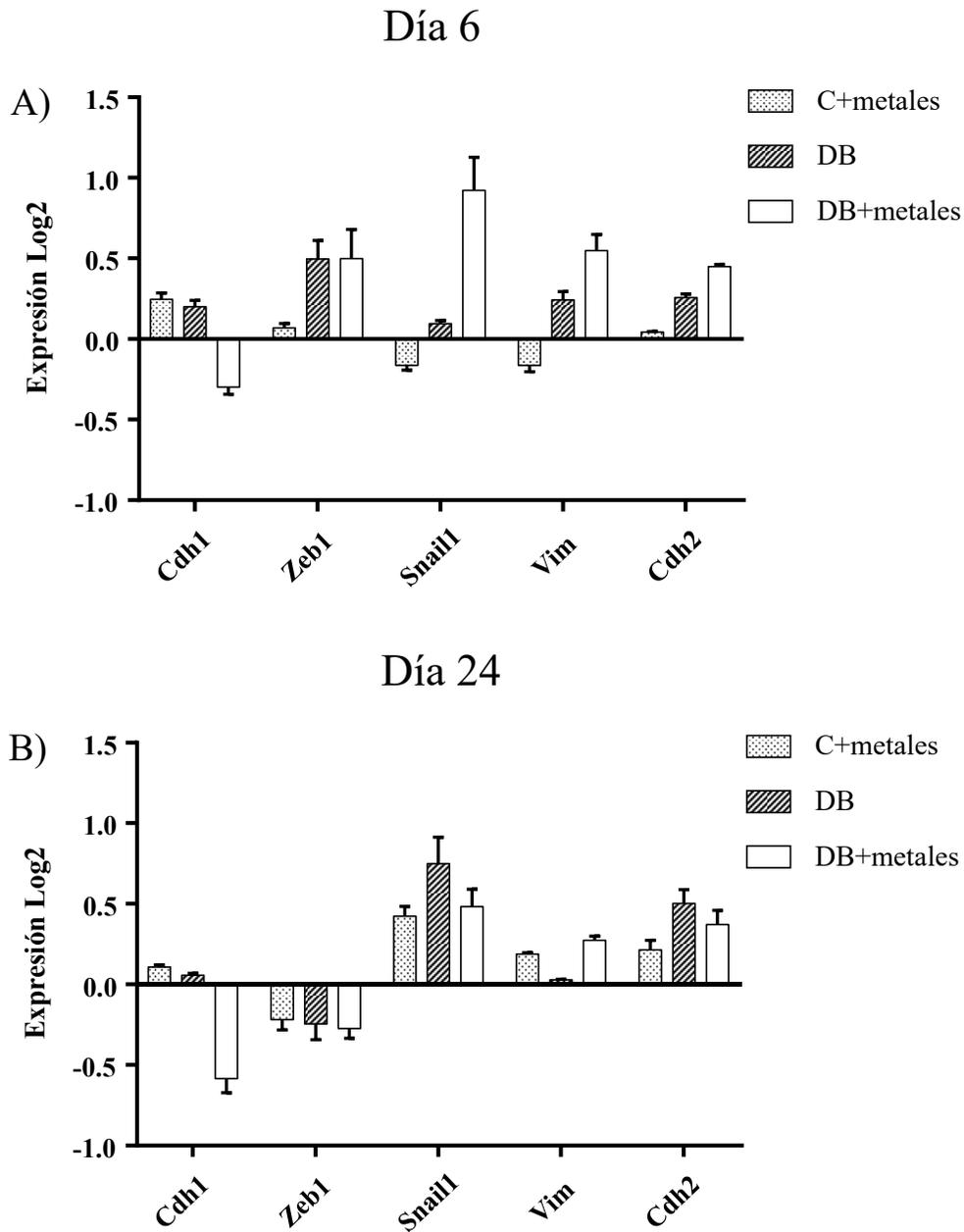


Fig. 9 Cuantificación de las densitometrías obtenidas mediante RT-PCR de 5 marcadores de TEM en el día 6 **A)** y 24 **B)**. Los datos se encuentran expresados como el logaritmo base 2 del promedio normalizado con respecto al control (células clona 9 sin metales) que en este caso está representado por la línea horizontal como 0, las barras representan el error estándar (E.E.) $n=3$.

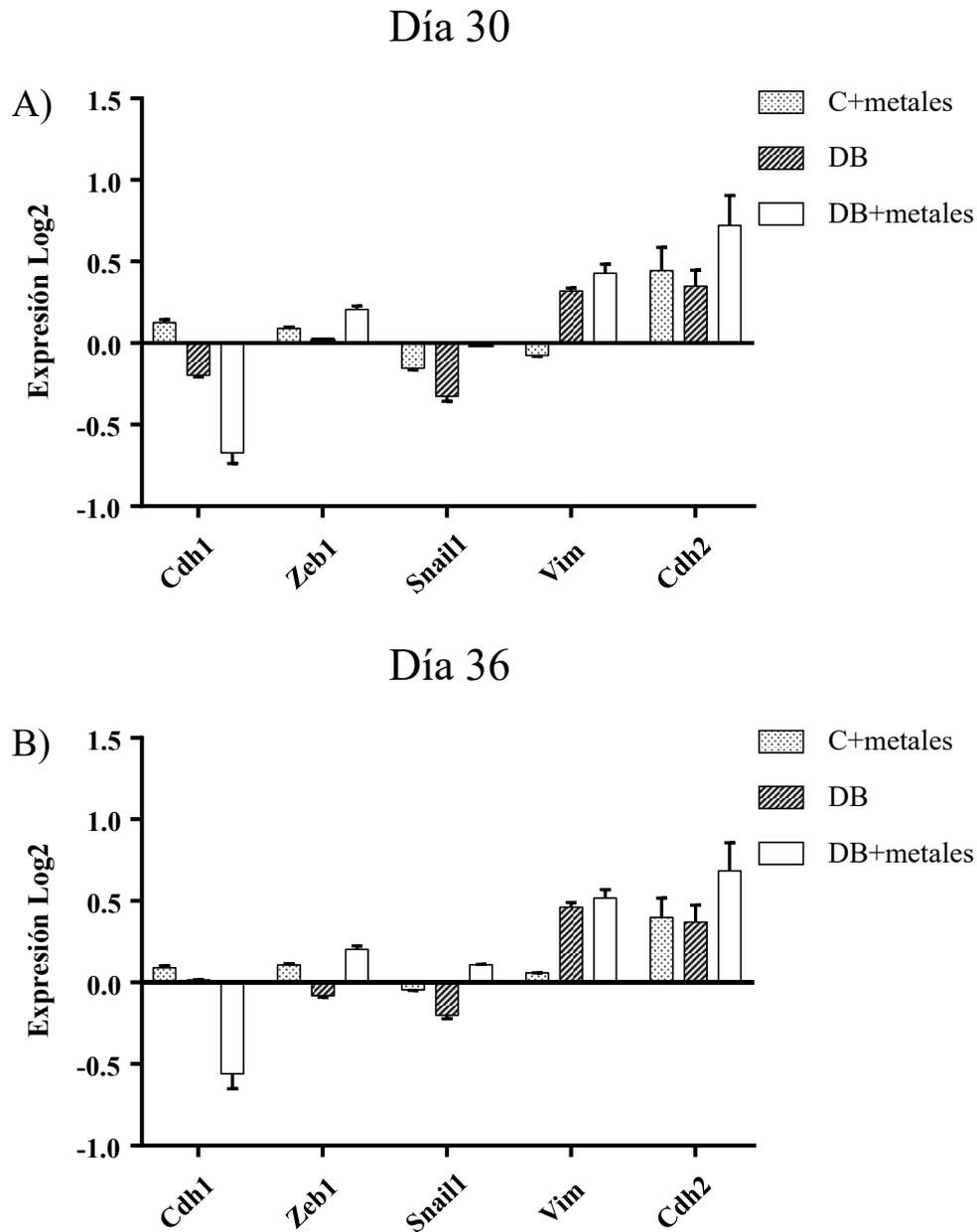


Fig. 10 Cuantificación de las densitometrías obtenidas mediante RT-PCR de 5 marcadores de TEM en el día 30 **A)** y 36 **B)**. Los datos se encuentran expresados como el logaritmo base 2 del promedio normalizado con respecto al control (células clona 9 sin metales) que en este caso está representado por la línea horizontal como 0, las barras representan el error estándar (E.E.) $n=3$.

Ensayo de herida

Adicional a la observación de marcadores de la TEM por medio de RT-PCR se utilizó el ensayo de herida para determinar la capacidad de migración de las células en cultivo expuestas a los diferentes tratamientos. En el día 36 del tratamiento de metales, en las células DB pudo observarse un cierre de la herida más rápido que con el resto de los tratamientos. Las mediciones realizadas entre las 0, 4 y 8 horas no mostraron diferencias por lo cual no se muestran en las imágenes (**Figura 11**).

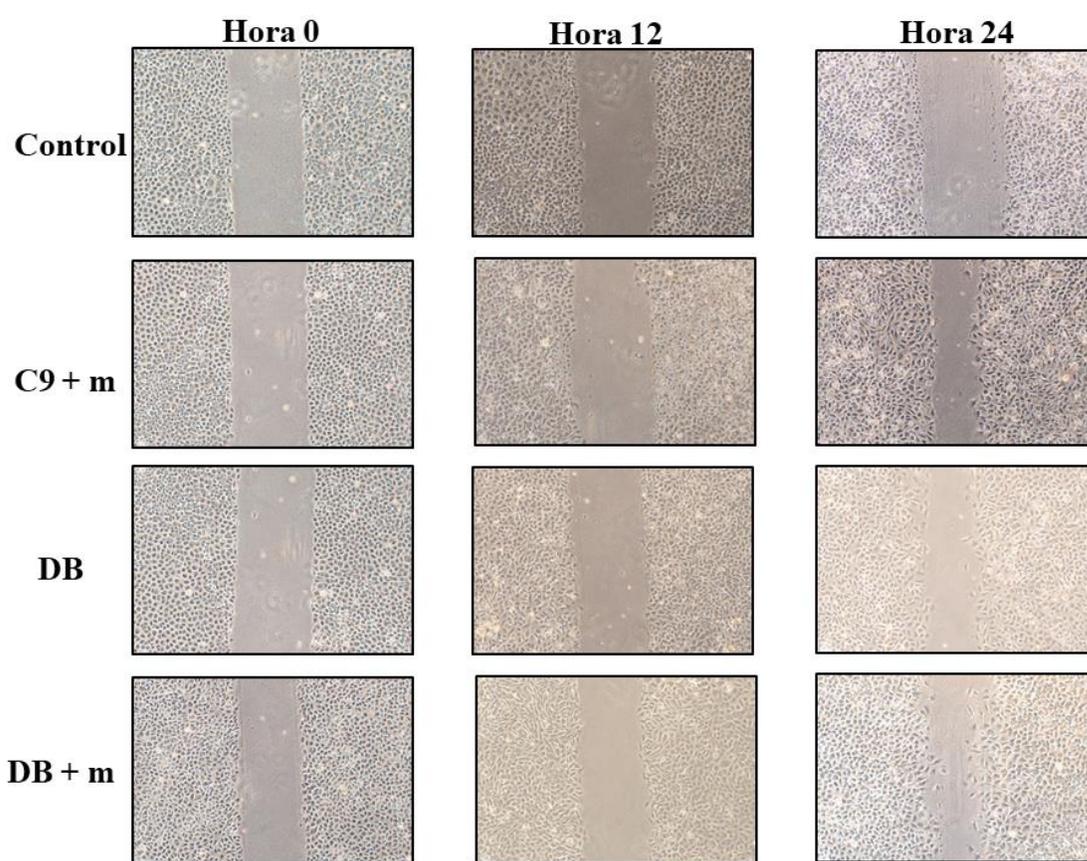


Fig. 11 La imagen muestra el cierre de la herida de los diferentes tratamientos a las 0 a las 12 y 24 horas posteriores a la realización de la herida.

Búsqueda bioinformática de los miRNAs

La búsqueda de miRNAs realizada mediante miRWalk 2.0 se realizó utilizando los siguientes genes:

Cuadro 1. Genes utilizados en la búsqueda de miRWalk	
Genes sobrerregulados durante la TEM (mesenquimales)	Genes a la baja durante la TEM (epiteliales)
Ahnak	Cav2
Cald1	Cdh1
Camk2n1	Dsp
Cdh2	Fgbp1
Col11a2	Illrn
Col3a1	Krt19
Col5a2	Mitf
Fn1	Ocln
Foxc2	Rgs2
Gng11	Spp1
Gsc	Tfpi2
Igfbp4	Tjp1
Itga5	Tspan13
Itgv	-
Mmp2,3,9	-
Msn	-
Serpine1	-
Snail 1,2,3	-
Twist1	-
Vim	-
Zeb1	-

Mediante esta búsqueda se obtuvieron 140 miRNAs que tienen como blancos alguno de los genes mencionados en el **cuadro 1**. De estos 140, se seleccionaron aquellos miRNAs que tenían más de un blanco, con esta agrupación se obtuvo lo siguiente:

Cuadro 2. miRNAs seleccionados con más de un blanco de la TEM		
miRNA	Genes Blanco	Expresión del miRNA esperada durante la TEM
miR-150	Cdh2, Vim	A la baja
miR-200b	Acta2, Cdh2	A la baja
miR-3590-3p	Acta2, Vim, Zeb1, Mmp-3	A la baja
miR-30 (a,b,c,d,e)	Snai1, Vim	A la baja
miR-6325	Cdh1, Ocln	A la alta

Dado que el miR-3590-3p resultó ser el miRNA que más blancos posee de los genes utilizados en el análisis, se procedió a buscar la totalidad de sus blancos predichos mediante la herramienta TargetScan 7.2. Mediante esta búsqueda se obtuvo una lista de 3176 genes predichos como blancos del miR-3590-3p. Para entender el tipo de procesos celulares que modula este miRNA a través de sus blancos predichos los genes obtenidos se analizaron mediante la herramienta bioinformática DAVID 6.8, interesantemente los procesos celulares que se encuentran más enriquecidos fueron los que se muestran en el **cuadro 3**.

Cuadro 3. Vías KEGG enriquecidas con los bancos predichos del miR-3590-3p		
Proceso celular	Número de genes	Valor de P
Vías involucradas en cáncer (crecimiento e invasión)*	73	5.3×10^{-8}
Vía PI3K-Akt*	57	7.1×10^{-5}
Vía MAPK*	45	8.6×10^{-5}
Vía Ras*	44	1.1×10^{-5}
Interacción ligando-receptor neuronal	20	6.8×10^{-3}
miRNAs en cáncer*	40	1.8×10^{-2}
Infección de HTLV-I	39	4.5×10^{-3}
Proteoglicanos en cáncer	38	8.4×10^{-5}
Regulación del citoesqueleto de actina*	38	2.4×10^{-4}
Endocitosis	38	3.3×10^{-3}
Adhesión focal*	36	7×10^{-4}

Las vías involucradas en cáncer o con invasión y metástasis se muestran con asterisco. A continuación, en la **Fig. 12** se muestra la vía KEEG correspondiente a las vías involucradas en cáncer, en esta vía se muestra con una estrella roja los genes regulados por el miR-3590-3p.

DISCUSIÓN

Debido a que la exposición ocupacional al As, Cd y Pb es una realidad cotidiana en numerosos sectores de la población, la investigación sobre este tópico es de suma importancia para tratar de entender los mecanismos mediante los cuales estos metales son capaces de inducir el proceso de transformación. El presente trabajo fue una aproximación experimental para tratar de entender dichos mecanismos. En este estudio se caracterizó el proceso de la transición epitelio-mesénquima en una línea de células epiteliales hepáticas de rata las cuales presentan una disminución de la expresión de catalasa y de Gclc y fueron expuestas a la mezcla de As, Cd y Pb a concentraciones equimolares de exposición ocupacional. Así mismo se realizó una búsqueda *In silico* para determinar los posibles miRNAs que pudiesen estar involucrados en el proceso.

Por un lado, nuestros resultados confirman que la exposición a dicha mezcla tiene efectos sobre la transformación celular e indican que el aumento en las especies reactivas de oxígeno está involucrado en este proceso. Por otro lado, plantean nuevas perspectivas y abren la posibilidad de explorar los posibles mecanismos mediante los cuales la mezcla de As, Cd y Pb pudiesen inducir la TEM.

Si bien la participación de la TEM en la metástasis es controvertida, existe el consenso de que funge un papel muy importante en los primeros pasos de la denominada cascada metastásica, por lo cual es de suma importancia indagar los mecanismos por los que se da este proceso.

En este estudio encontramos una mayor expresión de marcadores mesenquimales asociado a un aumento de especies reactivas de oxígeno y daño al ADN en células clona 9 con la expresión de catalasa y Gclc disminuida y expuestas a una mezcla de As, Cd y Pb. Con base a nuestros resultados y a la información de estudios previos, en los siguientes párrafos se plantearán dos posibles propuestas que pudiesen explicar nuestros resultados, por un lado, se propone que la TEM se da como un mecanismo de defensa frente al estrés a partir del daño al ADN y, por otra parte, también proponemos que las ERO desencadenan este proceso a través de la modificación de vías de señalización y la activación de ciertos factores de transcripción clave para la TEM.

Como se mencionó en la introducción, el As, Cd y el Pb son capaces de inducir ERO. Nosotros corroboramos que hay un aumento en la producción de ERO en las células doblemente transfectadas y expuestas a la mezcla de metales. Uno de los marcadores más característicos de daño oxidativo en el ADN es la formación de 8-oxoguaninas (8-oxoG), lesiones como esta pueden llevar a un estancamiento de la horquilla de replicación en donde la lesión puede ser resuelta o bien puede llevar a un colapso de esta, lo que significa una pérdida de la asociación entre el aparato de replicación y el ADN. A menudo este proceso conduce a la ruptura del ADN, a este proceso se le conoce como estrés replicativo. Normalmente altos niveles de estrés replicativo conllevan a arresto del ciclo celular, sin embargo, aquellas células que son capaces de seguir proliferando lo hacen aun cuando exista daño al ADN, lo que produce una selección clonal de células con inestabilidad genómica^{110,111}. Lo anterior podría explicar los resultados que obtuvimos en la medición de la viabilidad celular por medio del método de FDA en las células transfectadas y expuestas a la mezcla de metales, este grupo mostró una viabilidad muy baja en la primera semana para después presentar un aumento gradual a lo largo de los 36 días, la viabilidad aumentó hasta ser similar al resto de los grupos a pesar de que la medición con la técnica de dihidrorodamina mostró un aumento de ERO en el día 12 que se mantuvo hasta el día 36 y que se correlacionó con el aumento de daño al ADN en el día 12 y 24. Se podría deducir que el aumento de la viabilidad se relaciona con el aumento de las células capaces de sobrevivir pese a que poseen un incremento de ERO y de daño en ADN. Si estas células con mayor inestabilidad genómica se dividen y proliferan pueden surgir poblaciones con un fenotipo invasivo u otras características de las células transformadas.

Por lo tanto, se perfila como una perspectiva interesante el determinar el estado del ciclo celular entre los diferentes tratamientos a los cuales fueron sometidas las células a lo largo del tiempo. Esto con el fin de determinar si al inicio del tratamiento las células entran a arresto celular para posteriormente salir de él. Así mismo sería interesante indagar, por medio de citometría de flujo, si las células presentan cambios en la ploidia al final del tratamiento, lo cual sería una indicación del grado de inestabilidad genómica de las células.

Por otra parte, en el grupo de células transfectadas y expuestas a la mezcla metales, observamos un aumento en la expresión del RNAm de Snail en el día 6. Como ya se mencionó, Snail es uno de los principales factores de transcripción involucrados en la TEM.

Interesantemente, Snail tiene una relación con la respuesta al daño al DNA y los mecanismos de reparación, se ha encontrado que algunas proteínas cinasas relacionadas con estos procesos son capaces de modular la actividad de Snail. Pak1 (cinasa activada por p21), una proteína que es activada frente a la exposición de radiación ionizante y promueve la expresión de genes relacionados con la vía Fanconi/BRCA, es capaz de fosforilar a Snail en la serina 246 promoviendo su localización nuclear y su estabilización^{112,113}. Así mismo, se ha encontrado que, en tejidos de cáncer de mama, la hiperactivación de ATM se correlaciona con la expresión de Snail, además ATM es capaz de fosforilar a Snail en la serina 100 lo cual le confiere resistencia a la degradación¹¹⁴. La cinasa DNA-PKcs, conocida principalmente por su papel en la vía de reparación de unión de extremos no homologos (NHEJ) es capaz de fosforilar a Snail también en la Serina 100, paradójicamente, la estabilización de Snail a su vez inhibe la actividad de DNA-PKc conduciendo a la inestabilidad genómica y un aumento de la agresividad en tumores de cáncer de mama⁷⁷. De manera inversa se ha determinado que Snail modula la expresión de elementos de la reparación, por ejemplo, se ha observado que incrementa la expresión de ERCC1, una endonucleasa que participa en la vía NER y que posiblemente esta regulación se da por la vía de las SMAD^{115,116}.

En términos generales, estos resultados sostienen la existencia de una retroalimentación entre elementos de respuesta al daño al ADN, mecanismos de reparación y Snail. Por lo tanto, los resultados mencionados anteriormente se encuentran en concordancia con nuestros hallazgos y arrojan luz sobre una posible explicación. Nosotros encontramos una elevación de la expresión de Snail durante el día 6 aunado a mayor daño en las células doblemente transfectadas y expuestas a la mezcla de metales. Dicho daño podría inducir una respuesta hacia el daño al ADN, lo que llevaría a la activación de la cinasas mencionadas previamente las cuales a su vez promoverían la estabilidad de Snail contribuyendo con ello a la Transición Epitelio-Mesénquima.

Existe aún más evidencia que refuerza este punto de vista, pues al igual que Snai1, otros marcadores de la TEM parecen estar involucrados también con la respuesta al daño al ADN y los mecanismos de reparación. Se ha observado que ATM también es capaz de fosforilar y con ello estabilizar a Zeb1, al mismo tiempo, Zeb1 retroalimenta la señal por medio de USP7 quien estabiliza a CHK1 lo que sugiere que Zeb1 forma parte de un mecanismo de defensa ¹¹⁷.

Además de su papel establecido en la TEM, Snai1 se considera un potente factor de supervivencia frente al estrés. Por ejemplo, en un estudio se observó que, en células de carcinoma mamario y melanoma, la expresión aberrante de Snai1 promovió la resistencia a la muerte celular programada desencadenada por el daño al ADN el cual fue inducido por un agente genotóxico utilizado en quimioterapia. Por el contrario, la depleción de Snai1 llevó a un incremento de la sensibilidad hacia el daño al ADN y a un aumento de factores proapoptóticos ¹¹⁸. Esta función protectora de Snai1 podría explicar la quimio resistencia y el mal pronóstico asociado a los tumores que presentan marcadores de la TEM como incremento de la expresión de Snai1 y disminución de E-cadherina durante el cáncer.

Lo anterior sugiere que posiblemente el aumento en la expresión de Snai1 se dé como parte de una respuesta integral frente al estrés y un mecanismo de supervivencia. El hecho de tener la barrera antioxidante abatida junto con un estímulo que es capaz de aumentar las ERO como la mezcla de As, Cd y Pb, puede llevar a la célula hacia una situación límite en la que se haga necesaria la expresión de las proteínas previamente mencionadas y la activación del programa de EMT como una respuesta de supervivencia.

Además de Snai1, Zeb 1/2, parece tener una función similar. En un estudio con células de vejiga urinaria se observó que Zeb-2 era capaz de detener el ciclo de la célula en la fase G1/S a través de la represión de la ciclina D1, otorgándole además resistencia a la apoptosis inducida por daño al ADN. Más aún, la expresión ectópica de la ciclina D1 fue capaz de promover el avance del ciclo celular generando células que retuvieron las características invasivas de las células en TEM, pero capaces de continuar proliferando. Esta evidencia es altamente sugerente e informativa, indicando que si la célula enciende el programa de transdiferenciación hacia TEM como un mecanismo de supervivencia y/o defensa y se

enciende en una célula o que ya posee mutaciones que le permitan avanzar a través del ciclo celular de manera descontrolada o bien adquiere dichas mutaciones posteriormente, se puede originar una célula proliferativa con características invasivas y resistente a la anoikis y apoptosis. Esta es una idea que tiende un puente entre un proceso que genera daño al ADN y la activación del programa de TEM y que podría ser una hipótesis explicativa de los resultados que obtuvimos.

Es importante hacer hincapié en que ambos factores de transcripción, Snail y Zeb1 fueron dos de los marcadores que mayormente elevaron su expresión en las células doblemente transfectadas y expuestas a la mezcla de metales.

En conjunto esta información sugiere que es razonable pensar que el daño al DNA y la respuesta que la célula tiene frente al estrés, pudiesen estar involucrados en la inducción de la TEM, el cual sería un mecanismo plausible y digno de explorar mediante el cual se pudiesen explicar los resultados obtenidos en este estudio.

Más allá del papel como causantes de daño oxidativo, las ERO tienen una función bien establecida en la modulación de vías de señalización por medio de proteínas sensibles al estado redox de la célula, la producción exacerbada de ERO se ha relacionado con aumento en la proliferación y como ya se mencionó anteriormente paradójicamente con supervivencia celular, todo esto a través de la modulación de vías como las MAPK, PI3K/AKT y la regulación negativa de PTEN y PTP1B²². Así mismo, existen factores de transcripción que a través de la oxidación de cisteínas son capaces de censar el estado redox de la célula, entre ellos se encuentran NF- κ B, AP-1 e incluso HIF-1.

Se ha demostrado que las ERO son capaces de estabilizar al factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1). Este factor de transcripción es capaz de modular la TEM a través de la regulación de otros factores de transcripción como Twist, Snail, Snail2 y Zeb1, de hecho, la región promotora de Twist posee un elemento de respuesta a la hipoxia donde HIF es capaz de unirse para inducir la transcripción. Otro elemento muy importante en la TEM es TGF- β , el cual modula y es modulado por HIF. Interesantemente, en un estudio en el cual células placentarias fueron expuestas a un tratamiento con Cd, estas células presentaron un incremento en la producción de ERO asociado a un incremento de la expresión de HIF-1 α y

TGF- β ¹¹⁹. Dado que en nuestro estudio la mezcla de metales junto con el abatimiento de la barrera antioxidante produjo un aumento de ERO y que las ERO pueden influir en la estabilidad del factor HIF, puede plantearse como posible explicación provisional que este factor de transcripción se encuentre involucrado en la TEM observada en nuestro modelo.

El gen que codifica para HIF-1 α posee un elemento de respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en inglés) al cual Nrf2 es capaz de unirse y por lo tanto regular su expresión¹²⁰. Puesto que nuestros resultados muestran que hay un incremento de ERO en las células con la barrera antioxidante abatida y expuestas a la mezcla de metales y que un incremento en ERO activa la translocación de Nrf2 al núcleo, puede pensarse que esto tenga como consecuencia la transcripción de HIF-1 α . Por ende, sería interesante determinar si en las células transfectadas y expuestas a los metales existe mayor translocación de Nrf2 al núcleo y si al mismo tiempo existe un incremento en la expresión de HIF-1 α .

El factor de transcripción NF- κ B también es capaz de modular la TEM principalmente a través de Snai1¹²¹. El papel del As en la activación de NF- κ B es polémica, sin embargo se ha demostrado que As(III) en bajas dosis es capaz de activar a NF- κ B posiblemente a través de la producción de ERO¹²², interesantemente, la activación de este factor de transcripción es dependiente del tipo celular y parece ser que las células epiteliales (como las que trabajamos en este estudio) son más responsivas hacia la activación del NF- κ B mediada por As(III)¹²³.

En el caso de AP-1, un factor de transcripción que también se ha implicado en la TEM principalmente a través del incremento de la expresión de Zeb1/2 y TGF- β en células epiteliales mamarias¹²⁴. Cabe señalar que AP-1 es un factor de transcripción sensible al estado redox lo que conecta nuevamente ERO con un factor de transcripción de la TEM como lo es Zeb1 y al cual previamente hemos visto que se activa en respuesta al estrés y daño al ADN.

Tomando en cuenta que estos factores de transcripción son sensibles al estado redox de la célula y que en nuestro modelo observamos un incremento en las especies reactivas de oxígeno y un cambio en el patrón de expresión de los marcadores de TEM cuando las células

eran expuestas a la mezcla de metales, nos lleva a pensar que quizás podrían estar participando en el proceso que se observó en este estudio.

En resumen, estas observaciones apoyan la hipótesis de que posiblemente, el aumento de ERO inducido por la exposición a As, Cd y Pb, aunado a la disminución de la capacidad antioxidante, tiene como efecto la activación de vías de señalización y factores de transcripción los cuales activan en última instancia el programa de TEM. Por ende, se vislumbra interesante, tanto para evaluar los posibles mecanismos como para indagar sobre posibles blancos, la exploración de la expresión y la actividad de los factores de transcripción mencionados previamente en las células con la barrera antioxidante abatida y cotratadas con la mezcla de metales.

No debe pasar desapercibido que nuestros resultados indican que el solo hecho de disminuir la expresión de catalasa y Gclc no es suficiente para inducir ni un aumento en el cierre de la herida ni en el cambio discernible en el perfil de expresión de marcadores TEM, de la misma forma, la mezcla de metales por sí misma fue incapaz de inducir cambio en los marcadores de TEM, daño al ADN o un incremento significativo de ERO durante los 36 días del ensayo. Esto indica que no basta con disminuir la barrera antioxidante, se necesita además un elemento inductor de ERO para promover la TEM. Esto podría ser un dato interesante si se corrobora una semejanza en la parte epidemiológica en poblaciones humanas, ya que se podría inferir que aquellos individuos que presenten polimorfismos o mutaciones que predispongan un mal funcionamiento del sistema antioxidante aunado a una exposición crónica a As, Cd y Pb, presentará un riesgo incrementado a la transformación celular. A pesar de lo anterior, es innegable que el sólo hecho de disminuir la producción del GSH siendo este un intermediario de suma importancia, debe tener efectos profundos en el metabolismo más allá del estado redox.

La disminución en la producción del GSH puede tener efectos que trasciendan su función como antioxidante. Es conocido que las proteínas son susceptibles a sufrir modificaciones postraduccionales, dentro de estas modificaciones se encuentra la glutationilación. Se ha demostrado por ejemplo que esta modificación es capaz de modular la actividad de cinasas relevantes como MEKK1, PKC y cAPK/PKA^{125,126}, por otra parte,

también se ha observado que la presencia de GSH en el núcleo celular es capaz de disminuir la expresión de proteínas de defensa frente al estrés, incluso se ha propuesto que la glutathionilación es capaz de regular la actividad de proteínas nucleares como las histonas ¹²⁷. De lo anterior se puede deducir que su disminución o ausencia en el núcleo puede cambiar el patrón de expresión y tener efectos epigenéticos. Estos resultados hacen notar que cualquier disrupción en la producción de GSH puede tener efectos dentro de la célula que perturben su fisiología normal más allá del desbalance en el estado redox, por tanto, es razonable pensar que la disminución del GSH en las células doblemente transfectadas pudiese tener efectos en el patrón de expresión de varias proteínas y también presentar modificaciones en la actividad de cinasas que forman parte de vías de señalización relevantes en la TEM, además estas modificaciones podrían predeterminar la respuesta de las células cuando estas son expuestas a un estímulo como lo es la mezcla de As, Cd y Pb. Por tanto, se vislumbra interesante el explorar en las células doblemente transfectadas los cambios en la actividad de cinasas pertenecientes a vías de señalización relevantes en el crecimiento y apoptosis, así mismo resulta indudable que un cambio en el metabolismo del GSH tendrá consecuencias en otras vías metabólicas, como ejemplo se encuentra un estudio in vivo en donde ratones fueron tratados con BSO a lo largo de ocho semanas, dichos ratones además de desarrollar hipertensión, presentaron cambios en el patrón de expresión de genes relevantes en el metabolismo energético y síntesis de proteínas ¹²⁸, esto no es de extrañarse dado el papel central que juega el GSH como intermediario metabólico (reservorio de cisteína y glutamato, fuente de esqueletos de carbono como el α -cetoglutarato) y la alta concentración a la que se encuentra en la célula (entre 0.5 and 10 mM), cualquier disrupción que afecte su síntesis y concentración puede alterar el equilibrio del metabolismo.

Es por eso que, una de las principales aportaciones de este estudio es la caracterización de un modelo celular que presenta disminución de la barrera antioxidante, esto es de suma importancia ya que teniendo células con estas características pueden ser utilizadas como herramienta experimental que ayude a plantear y resolver múltiples preguntas.

Una perspectiva que arroja el presente estudio, es llevar el modelo al siguiente paso, si bien se evaluó la expresión de marcadores característicos de TEM y se llevó a cabo un ensayo que mide la capacidad de movimiento de una célula a través del cierre de una

herida, son necesarios estudios más específicos para ahondar en las características invasivas de las células. Mientras que el ensayo de herida se considera un estudio práctico, rápido y de bajo costo, esa simplicidad lo convierte en un ensayo afectado por múltiples variables y que para varios autores se considera cualitativo, además de eso solo es capaz de determinar si una célula tiene una mayor capacidad de movimiento en dos dimensiones. El estándar de oro en la medición de la capacidad invasiva de una célula es el ensayo llevado a cabo en la cámara de Boyden, el cual no sólo permite saber si una célula tiene capacidad motil, sino además mide la capacidad de atravesar una membrana. Si se quiere llevar aún más lejos la caracterización de nuestro modelo, se podría medir su capacidad de formación de metástasis inyectando en ratas desnudas las células de nuestro modelo obtenidas después de los 36 días de exposición a la mezcla de metales, por este método se comprobaría finalmente si la disminución de la barrera antioxidante aunado al tratamiento con metales produce células epiteliales capaces de inducir metástasis *in vivo*.

La segunda parte de este trabajo se basó en la búsqueda *in silico* de posibles miRNAs que pudiesen estar modulando el proceso de la TEM. Cada vez hay más evidencia que indica la participación de los miRNAs en este proceso de transdiferenciación. Mediante la búsqueda realizada nosotros encontramos que el miR-3590-3p tiene como blancos predichos los mRNA de Acta2, Vim, Zeb1 y Mmp-3, además, categorizando en funciones los blancos predichos por miRBase mediante el uso de la plataforma DAVID, nos encontramos que vías como WNT y TGF- β se encontraban enriquecidas lo que fortalece la hipótesis de que el miR-3590-3p tiene una participación durante el proceso de la TEM. Debido a que, según el análisis bioinformático, es probable que el miR-3590-3p se una directamente a los 3'UTR de los mRNA previamente descritos, nosotros hipotetizamos que este miRNA se comportará a manera de un supresor de tumores disminuyendo su expresión durante la TEM, por lo tanto resultaría interesante explorar la expresión del miR-3590-3p en dos condiciones; la primera utilizando un inductor de la TEM como lo es el TGF- β y si se corrobora un cambio en el patrón de expresión del miRNA sería interesante explorar lo mismo durante la TEM inducida por metales en células con la barrera antioxidante abatida. Así mismo, también se vislumbra atractiva la idea de explorar los efectos de la disminución de la expresión de este miRNA utilizando un anti-miR y su correlación con la expresión de marcadores de la TEM ¿La sola

disminución de este miRNA puede tener como efecto el aumento de marcadores mesenquimales y la disminución de los epiteliales? ¿Las células con el anti-miR aumentan su capacidad invasiva? O por el contrario al utilizar un miRNA mimic ¿Se recupera el fenotipo epitelial en células expuestas a TGF- β ? El encontrar al miR-3590-3p mediante la búsqueda *in silico* abre numerosas posibilidades hacia su exploración *in vitro* e incluso *in vivo*.

Por otra parte, en el presente estudio encontramos que la exposición a la mezcla de As, Cd y Pb induce un aumento de los marcadores TEM en células con la barrera antioxidante abatida, así mismo diversos estudios indican la preponderante participación de los miRNAs durante este proceso, por lo tanto, surge la interesante cuestión de determinar si el patrón de expresión de los miRNAs involucrados en la TEM se vería afectado con el abatimiento de la barrera antioxidante y la exposición a la mezcla de metales. De hecho, existe evidencia de que la expresión de ciertos miRNAs se ve afectada por la producción de ERO, particularmente se han observado que el estrés oxidativo produce un decremento en la expresión del miRNA let-7, el cual es un regulador negativo de la TEM¹²⁹, por tanto se puede hipotetizar que el patrón de expresión de los miRNAs se podría estar modificando en nuestro modelo de células clona 9 las cuales tienen una disminución de la expresión de catalasa y Gclc, si a esto se le suma un estímulo productor de ERO como la mezcla de metales el efecto puede ser aún más pronunciado. Estudios previos de nuestro equipo de investigación mostraron que la exposición a la mezcla de As, Cd y Pb a las mismas concentraciones mostradas en este estudio son capaces de modificar el perfil de expresión de los miRNAs en fibroblastos murinos¹³⁰, sin embargo la diferencia con este estudio subyace en el abatimiento de la barrera antioxidante. Por tanto, el explorar la posibilidad de que los metales a través de las ERO pudiesen estar modificando el patrón de expresión de miRNAs que tengan como blancos mRNAs que sean capaces de inducir la TEM es una perspectiva interesante, ya que a pesar de que se conoce que existe la correlación entre la producción de ERO y la expresión de miRNAs los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo aún permanecen oscuros.

La idea de que miRNAs pudieran ser atractivos blancos terapéuticos apremia a un estudio más profundo para comprender sus mecanismos de regulación y los procesos en los

cuales están involucrados para así en un futuro quizás aplicar dicho conocimiento de una manera clínica.

Tomando en consideración todo lo anterior, la caracterización de la TEM en las células clona 9 las cuales tienen disminución de la expresión de catalasa y Gclc abre nuevas perspectivas para estudiar los mecanismos mediante los cuales la mezcla de metales pudiese estar promoviendo este proceso y por otro lado a la utilización del modelo de las células clona 9 con la barrera antioxidante abatida como estrategia experimental para plantear y responder preguntas acerca del papel de las ERO en este proceso.

CONCLUSIONES

De acuerdo a lo resultados presentados en este trabajo, podemos concluir que:

- 1- La exposición a la mezcla de As,Cd y Pb a concentraciones equimolares de exposición ocupacional junto con el abatimiento de la barrera antioxidante induce un incremento de los marcadores de TEM en las células epiteliales hepáticas clona 9.
 - 2- Este incremento de los marcadores TEM está asociado a un incremento de especies reactivas de oxígeno, daño al ADN y un cierre de la herida más rápido en el grupo de células doblemente transfectadas y expuestas a la mezcla de metales.
 - 3- De acuerdo a la búsqueda bioinformática realizada, el miR-3590-3p podría estar involucrado en la modulación de la TEM.
-

PERSPECTIVAS

- 1- Explorar los mecanismos mediante los cuales la exposición a la mezcla de As, Cd y Pb es capaz de inducir la TEM en las células clona 9 con la barrera antioxidante abatida.
 - 2- Indagar el papel y perfil de expresión de los miRNAs en este proceso, particularmente el del miR-3590-3p.
-

REFERENCIAS

1. Yuan, W., Yang, N. & Li, X. Advances in Understanding How Heavy Metal Pollution Triggers Gastric Cancer. *Biomed Res. Int.* **2016**, 7825432 (2016).
 2. Cao, S. *et al.* Health risks from the exposure of children to As, Se, Pb and other heavy metals near the largest coking plant in China. *Sci. Total Environ.* **472**, 1001–1009 (2014).
 3. Pizarro, I., Gómez-Gómez, M., León, J., Román, D. & Palacios, M. A. Bioaccessibility and arsenic speciation in carrots, beets and quinoa from a contaminated area of Chile. *Sci. Total Environ.* **565**, 557–563 (2016).
 4. Atsdr. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR ARSENIC. (2007).
 5. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**, 1–40 (2006).
 6. Jomova, K. & Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* **283**, 65–87 (2011).
 7. Lushchak, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* **224**, 164–175 (2014).
 8. Jomova, K. *et al.* Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J. Appl. Toxicol.* **31**, n/a-n/a (2011).
 9. Maiti & Chatterjee. Differential response of cellular antioxidant mechanism of liver and kidney to arsenic exposure and its relation to dietary protein deficiency. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **8**, 227–235 (2000).
 10. Casalino, E., Sblano, C. & Landriscina, C. Enzyme Activity Alteration by Cadmium Administration to Rats: The Possibility of Iron Involvement in Lipid Peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **346**, 171–179 (1997).
 11. Valko, M., Morris, H. & Cronin, M. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.* **12**, 1161–1208 (2005).
 12. Gurer, H. & Ercal, N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 927–945 (2000).
 13. Matović, V., Buha, A., Đukić-Ćosić, D. & Bulat, Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem. Toxicol.* **78**, 130–140 (2015).
 14. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Interaction Profile for : Arsenic , Cadmium , Chromium , and Lead. *Public Health* (2004).
 15. Madden, E. F. The role of combined metal interactions in metal carcinogenesis: a review. *Rev. Environ. Health* **18**, 91–109 (2003).
-

16. Nordberg, G. F. & Andersen, O. Metal interactions in carcinogenesis: enhancement, inhibition. *Environ. Health Perspect.* **40**, 65–81 (1981).
 17. Martín, S.-A., Emilio, R. & Mahara, V. Role of Oxidative Stress in Transformation Induced by Metal Mixture. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2011**, 1–11 (2011).
 18. Rodríguez-Sastre, M. A., Rojas, E. & Valverde, M. Assessing the impact of As–Cd–Pb metal mixture on cell transformation by two-stage Balb/c 3T3 cell assay. *Mutagenesis* **29**, 251–257 (2014).
 19. Martínez-Baeza, E., Rojas, E. & Valverde, M. Metal mixture (As–Cd–Pb)-induced cell transformation is modulated by OLA1. *Mutagenesis* **31**, 463–473 (2016).
 20. Buonocore, G., Perrone, S. & Tataranno, M. L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **15**, 186–190 (2010).
 21. Chio, I. I. C. & Tuveson, D. A. ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends Mol. Med.* **23**, 411–429 (2017).
 22. Moloney, J. N. & Cotter, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* (2017). doi:10.1016/J.SEMCDB.2017.05.023
 23. Forman, H. J., Maiorino, M. & Ursini, F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* **49**, 835–42 (2010).
 24. Kumari, S., Badana, A. K., G, M. M., G, S. & Malla, R. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomark. Insights* **13**, 1177271918755391 (2018).
 25. Young, I. S. & Woodside, J. V. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* **54**, 176–86 (2001).
 26. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* **5**, 9–19 (2012).
 27. Alanazi, A. M., Mostafa, G. A. E. & Al-Badr, A. A. Glutathione. *Profiles Drug Subst. Excipients Relat. Methodol.* **40**, 43–158 (2015).
 28. Zhang, H. & Rinna, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* **30**, 1–12 (2009).
 29. Zhao, H., Ruan, H. & Li, H. Progress in the research of GSH in cells. *Chinese Sci. Bull.* **56**, 3057–3063 (2011).
 30. Federación de Especialistas de Análisis Biológicos de la Provincia de Buenos Aires., L. A., Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica., A. L. & Tapia, M. O. Homeostasis del glutati6n. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* **47**, ([Federaci6n de Especialistas de Análisis Biológicos de la Provincia de Buenos Aires], 2013).
 31. Njålsson, R. & Norgren, S. Physiological and pathological aspects of GSH metabolism. *Acta Paediatr.* **94**, 132–137 (2005).
-

32. Lu, S. C. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 3143–3153 (2013).
 33. Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J. R. & Turner, N. D. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.* **134**, 489–492 (2004).
 34. Zhang, H. & Rinna, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* **30**, 1–12 (2009).
 35. Lu, S. C. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* **30**, 42–59 (2009).
 36. Dickinson, D. A. *et al.* Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 1152–1159 (2004).
 37. Yang, H. *et al.* Nrf1 and Nrf2 Regulate Rat Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit Transcription Indirectly via NF- κ B and AP-1. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5933–5946 (2005).
 38. Janasik, B. *et al.* Effect of Arsenic Exposure on NRF2-KEAP1 Pathway and Epigenetic Modification. *Biol. Trace Elem. Res.* **185**, 11–19 (2018).
 39. Hu, Y., Jin, X. & Snow, E. T. Effect of arsenic on transcription factor AP-1 and NF- κ B DNA binding activity and related gene expression. *Toxicol. Lett.* **133**, 33–45 (2002).
 40. Souza, V. *et al.* Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology* **197**, 213–228 (2004).
 41. Sepasi Tehrani, H. & Moosavi-Movahedi, A. A. Catalase and its mysteries. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* (2018). doi:10.1016/J.PBIOMOLBIO.2018.03.001
 42. Glorieux, C. & Calderon, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol. Chem.* **398**, 1095–1108 (2017).
 43. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* (Oxford University Press, 2015).
 44. Güner, G., İşlekel, H., Oto, Ö., Hazan, E. & Açikel, Ü. Evaluation of some antioxidant enzymes in lung carcinoma tissue. *Cancer Lett.* **103**, 233–239 (1996).
 45. Kwei, K. A., Finch, J. S., Thompson, E. J. & Bowden, G. T. Transcriptional Repression of Catalase in Mouse Skin Tumor Progression. *Neoplasia* **6**, 440–448 (2004).
 46. Baker, A. M., Oberley, L. W. & Cohen, M. B. Expression of antioxidant enzymes in human prostatic adenocarcinoma. *Prostate* **32**, 229–233 (1997).
 47. Wu, W.-S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* **25**, 695–705 (2007).
-

48. G., M.-S. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev Cuba. Farm* **39**, (2005).
 49. Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S. & Thayyullathil, F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic. Biol. Med.* **104**, 144–164 (2017).
 50. Szatrowski, T. P. & Nathan, C. F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* **51**, 794–8 (1991).
 51. Loft, S. & Poulsen, H. E. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med. (Berl)*. **74**, 297–312 (1996).
 52. Li, R. *et al.* ATM signals to AMPK to promote autophagy and positively regulate DNA damage in response to cadmium-induced ROS in mouse spermatocytes. *Environ. Pollut.* **231**, 1560–1568 (2017).
 53. Kwon, J. *et al.* Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16419–24 (2004).
 54. Salmeen, A. *et al.* Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* **423**, 769–773 (2003).
 55. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
 56. Weinberg, R. *The Biology of Cancer, Second Edition.* (Taylor & Francis Group, 2013).
 57. Thiery, J. P. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 442–454 (2002).
 58. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
 59. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196 (2014).
 60. Caramel, J., Ligier, M. & Puisieux, A. Pleiotropic Roles for ZEB1 in Cancer. *Cancer Res.* **78**, 30–35 (2018).
 61. Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A. & Weinberg, R. A. EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 128–134 (2018).
 62. van Roy, F. & Berx, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3756–3788 (2008).
 63. Kemler, R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* **9**, 317–21 (1993).
 64. Takeichi, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**,
-

- 619–27 (1995).
65. Imhof, B. A., Vollmers, H. P., Goodman, S. L. & Birchmeier, W. Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell* **35**, 667–75 (1983).
 66. Birchmeier, W. & Behrens, J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1198**, 11–26 (1994).
 67. Yoshiura, K. *et al.* Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7416–9 (1995).
 68. Wu, Y. & Zhou, B. P. Snail: More than EMT. *Cell Adh. Migr.* **4**, 199–203 (2010).
 69. Lim, S.-O. *et al.* Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter. *Gastroenterology* **135**, 2128–40, 2140.e1–8 (2008).
 70. Mrozik, K. M., Blaschuk, O. W., Cheong, C. M., Zannettino, A. C. W. & Vandyke, K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* **18**, 939 (2018).
 71. Radice, G. L. N-cadherin-mediated adhesion and signaling from development to disease: lessons from mice. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **116**, 263–89 (2013).
 72. Hazan, R. B., Phillips, G. R., Qiao, R. F., Norton, L. & Aaronson, S. A. Exogenous Expression of N-Cadherin in Breast Cancer Cells Induces Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *J. Cell Biol.* **148**, 779–790 (2000).
 73. Nieto, M. A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 155–166 (2002).
 74. Battle, E. *et al.* The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **2**, 84–89 (2000).
 75. Hotz, B. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 4769–76 (2007).
 76. Kajita, M., McClinic, K. N. & Wade, P. A. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7559–66 (2004).
 77. Pyun, B.-J. *et al.* Mutual regulation between DNA-PKcs and Snail leads to increased genomic instability and aggressive tumor characteristics. *Cell Death Dis.* **4**, e517–e517 (2013).
 78. Zhang, P., Sun, Y. & Ma, L. ZEB1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle* **14**, 481–487 (2015).
 79. Grooteclaes, M. L. & Frisch, S. M. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene* **19**, 3823–3828 (2000).
-

80. Aigner, K. *et al.* The transcription factor ZEB1 (δ EF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* **26**, 6979–6988 (2007).
 81. Wang, N. & Stamenovic, D. Mechanics of vimentin intermediate filaments. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **23**, 535–540 (2002).
 82. Evans, R. M. Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family. *BioEssays* **20**, 79–86 (1998).
 83. Satelli, A. & Li, S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3033–3046 (2011).
 84. Hadler-Olsen, E., Winberg, J.-O. & Uhlén-Hansen, L. Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Tumor Biol.* **34**, 2041–2051 (2013).
 85. Lochter, A. *et al.* Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.* **139**, 1861–72 (1997).
 86. Noë, V. *et al.* Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J. Cell Sci.* **114**, 111–118 (2001).
 87. Mori, K., Shibamura, M. & Nose, K. Invasive Potential Induced under Long-Term Oxidative Stress in Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.* **64**, 7464–7472 (2004).
 88. Craene, B. De & Berx, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 97–110 (2013).
 89. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509–524 (2014).
 90. Bartel, D. P. Metazoan MicroRNAs. *Cell* **173**, 20–51 (2018).
 91. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**, 4051–60 (2004).
 92. Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1097–1101 (2006).
 93. Han, J. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **18**, 3016–27 (2004).
 94. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science (80-)*. **303**, 95–98 (2004).
 95. Kim, Y.-K. & Kim, V. N. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* **26**, 775–83 (2007).
 96. Shukla, G. C., Singh, J. & Barik, S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target
-

- Recognition and Regulatory Functions. *Mol. Cell. Pharmacol.* **3**, 83–92 (2011).
97. Gregory, R. I. & Shiekhattar, R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res.* **65**, 3509–12 (2005).
 98. Calin, G. A. & Croce, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 857–866 (2006).
 99. Calin, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15524–9 (2002).
 100. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 259–269 (2006).
 101. Svoronos, A. A., Engelman, D. M. & Slack, F. J. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res.* **76**, 3666–3670 (2016).
 102. Gregory, P. A. *et al.* An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol. Biol. Cell* **22**, 1686–98 (2011).
 103. Guo, C., Zhao, D., Zhang, Q., Liu, S. & Sun, M.-Z. miR-429 suppresses tumor migration and invasion by targeting CRKL in hepatocellular carcinoma via inhibiting Raf/MEK/ERK pathway and epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Rep.* **8**, 2375 (2018).
 104. Gregory, P. A., Bracken, C. P., Bert, A. G. & Goodall, G. J. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* **7**, 3112–3117 (2008).
 105. Van Roosbroeck, K. & Calin, G. A. Cancer Hallmarks and MicroRNAs: The Therapeutic Connection. in *Advances in cancer research* **135**, 119–149 (2017).
 106. Garzon, R., Calin, G. A. & Croce, C. M. MicroRNAs in Cancer. *Annu. Rev. Med.* **60**, 167–179 (2009).
 107. Bartel, D. P. Metazoan MicroRNAs. *Cell* **173**, 20–51 (2018).
 108. Sánchez-Valle, V. *et al.* A metal mixture induces transformation upon antioxidant depletion in a hepatic cell line. *Ann. Hepatol.* **12**, 315–24 (2013).
 109. Ponce-Ortiz, A. Papel de la barrera antioxidante en un modelo de hepatocarcinoma, Tesis de Maestría. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2018).
 110. Dobbstein, M. & Sørensen, C. S. Exploiting replicative stress to treat cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 405–423 (2015).
 111. Marusyk, A., Wheeler, L. J., Mathews, C. K. & DeGregori, J. p53 mediates senescence-like arrest induced by chronic replicational stress. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 5336–51 (2007).
-

112. Yang, Z. *et al.* Pak1 Phosphorylation of Snail, a Master Regulator of Epithelial-to-Mesenchyme Transition, Modulates Snail's Subcellular Localization and Functions. *Cancer Res.* **65**, 3179–3184 (2005).
 113. Pérez-Yépez, E. A., Saldívar-Cerón, H. I., Villamar-Cruz, O., Pérez-Plasencia, C. & Arias-Romero, L. E. p21 Activated kinase 1: Nuclear activity and its role during DNA damage repair. *DNA Repair (Amst)*. **65**, 42–46 (2018).
 114. Sun, M. *et al.* Activation of the ATM-Snail pathway promotes breast cancer metastasis. *J. Mol. Cell Biol.* **4**, 304–15 (2012).
 115. Hsu, D. S.-S. *et al.* Regulation of Excision Repair Cross-Complementation Group 1 by Snail Contributes to Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 4561–4571 (2010).
 116. Mitra, D. *et al.* Smad4 Loss in Mouse Keratinocytes Leads to Increased Susceptibility to UV Carcinogenesis with Reduced Ercc1-Mediated DNA Repair. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 2609–2616 (2013).
 117. Zhang, P. *et al.* ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nat. Cell Biol.* **16**, 864–875 (2014).
 118. Kajita, M., McClinic, K. N. & Wade, P. A. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7559–66 (2004).
 119. Adebambo, O. A., Shea, D. & Fry, R. C. Cadmium disrupts signaling of the hypoxia-inducible (HIF) and transforming growth factor (TGF- β) pathways in placental JEG-3 trophoblast cells via reactive oxygen species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **342**, 108–115 (2018).
 120. Lacher, S. E., Levings, D. C., Freeman, S. & Slattery, M. Identification of a functional antioxidant response element at the HIF1A locus. *Redox Biol.* **19**, 401–411 (2018).
 121. Cichon, M. A. & Radisky, D. C. ROS-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is mediated by NF- κ B-dependent activation of Snail. *Oncotarget* **5**, 2827–38 (2014).
 122. Barchowsky, A., Dudek, E. J., Treadwell, M. D. & Wetterhahn, K. E. Arsenic induces oxidant stress and NF-kappa B activation in cultured aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **21**, 783–90 (1996).
 123. Hamilton, J. W. *et al.* Molecular basis for effects of carcinogenic heavy metals on inducible gene expression. *Environ. Health Perspect.* **106 Suppl 4**, 1005–15 (1998).
 124. Bakiri, L. *et al.* Fra-1/AP-1 induces EMT in mammary epithelial cells by modulating Zeb1/2 and TGF β expression. *Cell Death Differ.* **22**, 336–350 (2015).
 125. CROSS, J. V. & TEMPLETON, D. J. Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain. *Biochem. J.* **381**, 675–683
-

- (2004).
126. Ward, N. E., Stewart, J. R., Ioannides, C. G. & O'Brian, C. A. Oxidant-Induced S - Glutathiolation Inactivates Protein Kinase C- α (PKC- α): A Potential Mechanism of PKC Isozyme Regulation [†]. *Biochemistry* **39**, 10319–10329 (2000).
 127. Diaz Vivancos, P., Wolff, T., Markovic, J., Pallardó, F. V. & Foyer, C. H. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem. J.* **431**, 169–178 (2010).
 128. Chon, H. *et al.* Gene expression of energy and protein metabolism in hearts of hypertensive nitric oxide- or GSH-depleted mice. *Eur. J. Pharmacol.* **513**, 21–33 (2005).
 129. Bao, B. *et al.* Targeting CSCs in tumor microenvironment: the potential role of ROS-associated miRNAs in tumor aggressiveness. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **9**, 22–35 (2014).
 130. Martínez-Pacheco, M., Hidalgo-Miranda, A., Romero-Córdoba, S., Valverde, M. & Rojas, E. mRNA and miRNA expression patterns associated to pathways linked to metal mixture health effects. *Gene* **533**, 508–514 (2014).
-