



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA**

**MAESTRÍA EN BIOCENCIAS**

**Efecto de la exposición a CdCl<sub>2</sub> sobre la metilación y expresión de los genes  
SOD-2 y GPx-1 en la línea celular HepG2**

**TESIS**

**Para obtener el grado de:**

Maestría en Biociencias

**Presenta:**

QBP. Ana Margarita Dircio Gutiérrez

**Directora:**

Dra. Yaneth Castro Coronel

**Codirector:**

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Chilpancingo de los Bravo Gro., Julio de 2017.



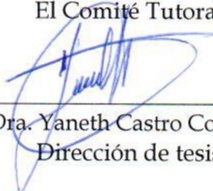
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA**  
**Maestría en Biociencias**

Av. Lázaro Cárdenas S/N. Ciudad Universitaria. Chilpancingo, Gro. C.P. 39090. Tel 01 747 47 1 93 10 ext: 3601

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo el día 1 del mes de junio de dos mil diecisiete, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Biociencias, para examinar la tesis titulada "Efecto de la exposición a CdCl<sub>2</sub> sobre la metilación y expresión de los genes SOD-2 y GPx-1 en la línea celular HepG2", presentada por la alumna Ana Margarita Dircio Gutiérrez, para obtener el Grado de Maestría en Biociencias. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

  
Dra. Yaneth Castro Coronel  
Dirección de tesis

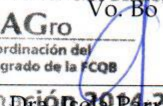
  
Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

  
Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán

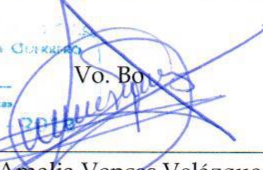
  
Dr. Arturo Ramírez Peralta

  
Dra. Guadalupe Miriam Huerta Pérez

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
 Vo. Bo.  
Coordinación del  
Posgrado de la FCQB

  
Dra. Isela Parra Rojas  
Coordinadora del Posgrado de la Facultad de  
Ciencias Químico Biológicas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
 Vo. Bo.  
Unidad Académica de  
Ciencias Químico Biológicas  
DIRECCIÓN 2014-2018

  
Dra. Amalia Vences Velázquez  
Directora de la Facultad de Ciencias Químico  
Biológicas

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación de Citopatología e Histoquímica y en el Laboratorio de Epigenética del Cáncer de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, de la Universidad Autónoma de Guerrero (FCQB-UAGro).

Bajo la dirección de:

Dra. Yaneth Castro Coronel

En codirección con:

Dr. Daniel Hernández Sotelo

La asesoría de:

Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán

Dr. Arturo Ramírez Peralta

Asesor externo:

Dra. Guadalupe Miriam Huerta Pérez

Este proyecto contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y fortalecimiento del posgrado en Biociencias clave 249671.

La autora fue beneficiaria de una beca otorgada por CONACYT con número de becario 667089.

**Dedicado a:**

Familia Dircio Gutiérrez

Mis padres Ignacia y Cirino por todo su apoyo brindado.

En memoria a Antonio Dircio

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a todas las personas que con su experiencia científica apoyaron y colaboraron en este proyecto de investigación para llevarlo a cabo y concluirlo.

Especialmente a mi directora de tesis: Dra. Yaneth Castro Coronel por su confianza y apoyo invaluable durante este proyecto, por su ejemplo de trabajo, su amistad y por compartir conmigo cada uno de sus conocimientos que me han ayudado y formado en el ámbito de la investigación científica.

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero: por su amistad y sobre todo por la oportunidad de brindarme un espacio en el laboratorio de Citopatología durante estos dos años.

Agradezco al Dr. Daniel Hernández Sotelo por su gran colaboración y apoyo durante mi corta estancia en el laboratorio de Epigenética.

Dra. Ma. Elena Moreno Godínez por sus consejos y su tiempo dedicado en cada una de las etapas del desarrollo de este proyecto.

Dr. Arturo Ramírez Peralta y Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán por sus aportaciones y sugerencias hacia este proyecto.

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo por la oportunidad de trabajar en el laboratorio de cultivo celular.

A los maestros y amigos: M en C. Marco Antonio Ramírez Vargas y M en C. Genaro Salmeron B. y QBP. Juan Carlos Juárez Cruz, por todo el apoyo, amistad y disposición de su tiempo durante el manejo del cultivo celular.

A mis compañeros de generación y del laboratorio: Diana Salazar, Alma Ortega, Lizbeth Tehuitzin, Itzel Martínez, Joseph Guevara, Juan Carlos Juárez y Adán Arizmendi.

QBP. Sonía, QBP. Ilse, estudiantes: Karen, Erika, Claudia, Jhonatan, Néstor y demás personal que labora en el laboratorio de Citopatología.

---

**Efecto de la exposición a CdCl<sub>2</sub> sobre la metilación y expresión de los genes  
SOD-2 y GPx-1 en la línea celular HepG2**

---

## Índice

<b>Resumen .....</b>	<b>8</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>9</b>
<b>Material y métodos .....</b>	<b>12</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>16</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>20</b>
<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>25</b>

## Resumen

**Introducción:** El cadmio (Cd) es un metal altamente tóxico y carcinogénico; los mecanismos por los cuales ejerce sus efectos tóxicos no están del todo dilucidados; especialmente el papel epigenético. El Cd modula los patrones de metilación y altera el nivel de expresión de genes supresores de tumor y con respuesta antioxidante. Los genes que codifican las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peróxidasa (GPx) son la primera línea de defensa antioxidante que responde y actúa contra las especies reactivas del oxígeno (ROS), su represión a través de la metilación implicaría la pérdida total de su función contribuyendo a exacerbar el daño oxidativo. **Objetivo:** En el presente estudio se exploró la metilación y los cambios en la expresión de los genes SOD-2 y GPx-1 en células HepG2 expuestas a concentraciones de Cd biológicamente relevantes. **Metodología:** Las células HepG2 fueron expuestas a concentraciones de 0.5, 0.8, 1 y 3  $\mu\text{M}$  de cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) por 24 h y 48 h. La viabilidad celular se evaluó a través de dos métodos MTT y rojo neutro (RN), el nivel de expresión del RNAm se evaluó a través de RT-qPCR, la producción de las ROS se midió por citometría de flujo, la metilación de los genes SOD-2 y GPx-1 se realizó por PCR-SM. **Resultados:** La exposición a concentraciones de 0.5, 0.8 y 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por 24 y 48 h no son citotóxicas; el tratamiento con  $\text{CdCl}_2$  por 24 h disminuyó la expresión del RNAm de SOD-2 y aumentó a partir de las 48 h; el nivel de expresión de GPx-1 aumentó a las 24 h de exposición a  $\text{CdCl}_2$  y se mantuvo después de las 48 h; la exposición por 24 h a  $\text{CdCl}_2$  no indujo aumento en los niveles de las ROS, sin embargo, el tratamiento por 48 h incrementó las ROS; la exposición a 1 y 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por 24 y 48 h no altera los patrones de metilación del gen SOD-2; se encontró metilado el gen GPx-1 en condiciones basales, al término del tratamiento con 1 y 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por 24 h la metilación desaparece; la exposición por 48 h a  $\text{CdCl}_2$  restablece el estado metilado de GPx-1. **Conclusión:** Nuestros resultados sugieren que la exposición a concentraciones micromolares de  $\text{CdCl}_2$  induce cambios en la expresión de los genes SOD-2 y GPx-1, estos cambios fueron en respuesta a la producción de ROS. Así mismo la exposición a  $\text{CdCl}_2$  puede inducir cambios en la metilación de GPx-1, un gen clave en la función antioxidante.

**Palabras clave:** Cadmio, metilación, SOD-2, GPx-1, ROS



## **Abstract**

**Introduction:** Cadmium (Cd) is a highly toxic and carcinogenic metal. The mechanisms by which it exerts its toxic effects are not fully elucidated; especially the epigenetic role. Cd modulates methylation patterns and alters the expression level of tumor suppressor genes and antioxidant response. The genes encoding the enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) are the first line of antioxidant defense that responds and acts against reactive oxygen species (ROS), their repression through methylation would imply the total loss of their function contributing to exacerbate oxidative damage. **Objective:** The present study explored methylation and changes in the expression of the SOD-2 and GPx-1 genes in HepG2 cells exposed to biologically relevant Cd concentrations. **Methodology:** HepG2 cells were exposed at concentrations of 0.5, 0.8, 1 and 3  $\mu\text{M}$  of cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ) for 24 h and 48 h. Cell viability was assessed using two MTT and neutral red (RN) methods, the level of mRNA expression was assessed through RT-PCR, the production of ROS was measured by flow cytometry, methylation of genes SOD-2 and GPx-1 were performed by PCR-SM. **Results:** Exposure to concentrations of 0.5, 0.8 and 1  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  for 24 and 48 h are not cytotoxic; treatment with  $\text{CdCl}_2$  for 24 h decreased expression of SOD-2 mRNA and increased after 48 h; the expression level of GPx-1 increased at 24 h exposure to  $\text{CdCl}_2$  and was maintained after 48 h. Exposure for 24h to  $\text{CdCl}_2$  did not induce increase in ROS levels; however, treatment for 48 h increased ROS; exposure to 1 and 3  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  for 24 and 48 h does not alter the methylation patterns of the SOD-2 gene; the GPx-1 gene was methylated at baseline, at the end of treatment with 1 and 3  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  for 24 h methylation disappears; the 48 h exposure to  $\text{CdCl}_2$  restores the methylated state of GPx-1. **Conclusion:** Our results suggest that exposure to micromolar concentrations of  $\text{CdCl}_2$  induces changes in expression of SOD-2 and GPx-1 genes, these changes were in response to ROS production. Likewise exposure to  $\text{CdCl}_2$  may induce changes in the methylation of GPx-1, a key gene in the antioxidant function.

**Key words:** Cadmium, methylation, SOD-2, GPx-1, ROS

## Introducción

El Cd es un metal de transición biológicamente tóxico que se encuentra naturalmente en niveles bajos, sin embargo, las actividades antropogénicas lo han convertido en un contaminante ambiental (IARC 2012). Las exposiciones de tipo no ocupacional a través del uso del tabaco e ingestión de alimentos contaminados con Cd (Berglund *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2014; Nookabkaew *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2011) se han asociado con daño al riñón, osteoporosis, osteomalacia, enfermedades cardiovasculares y cáncer (ATSDR, 2008; WHO, 2010; IARC, 2012). La tasa de excreción diaria de Cd es de 0.005% de la carga corporal (Satarug *et al.*, 2010) y la vida media es >20 años, por lo que tiende a bioacumularse en órganos como riñón, hígado, pulmón, próstata, entre otros (Schöpfer *et al.*, 2010; Limpatanachote *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2012). Diversos estudios han demostrado evidencia de la asociación entre la exposición al Cd y el desarrollo de cáncer. El Cd inhibe los mecanismos de reparación del DNA, activa oncogenes, afecta la metilación del DNA y modula la expresión de genes supresores de tumor (p16 y RASSF1A) (Benbrahim-Talaa *et al.*, 2009; Gallagher *et al.*, 2010), por lo que está clasificado por la IARC como carcinógeno humano del Grupo I (IARC 2012). Los mecanismos potenciales de toxicidad descritos hasta el momento incluyen la interacción con grupos sulfhidrilos y alteraciones endocrinas así como la inducción de estrés oxidativo (Johnson, 2003; Hartwig, 2010; Yu y Robinson, 2010; Xu y Chen, 2011). Aunque la asociación positiva entre los niveles de Cd en la orina y los efectos adversos a la salud están bien descritos, los mecanismos por los cuales ejerce sus efectos tóxicos no son del todo claros. La baja capacidad del Cd de interactuar con el DNA lo hace un elemento genotóxico indirecto, sugiriendo que puede afectar mecanismos epigenéticos. En los últimos años varios estudios se han enfocado en las alteraciones epigenéticas asociadas con la exposición a metales tóxicos entre ellos Cd (Filipic, 2012, Cartularu *et al.*, 2015). La metilación es uno de los eventos epigenéticos más importantes, tiene lugar en los residuos de cisteína de dinucleótidos CpG. La metilación consiste en la adición covalente de un grupo metilo (CH<sub>3</sub>) al carbono 5 de las citosinas (C5) en residuos de citosinas que preceden a guaninas hacia el extremo 5', frecuentemente encontradas en las regiones promotoras de genes (Gona *et al.*, 2015).

Se ha reportado que la exposición crónica a Cd aumenta la actividad de las DNA metiltransferasas (DNMTs) aunado a la hipermetilación y silenciamiento de los genes como p16INK4a, RASSF1A y MT-1 (Takiguchi *et al.*, 2003; Nishida y Kudo, 2013). Algunos autores sugieren que la regulación de la expresión de genes antioxidantes puede ser a través de la metilación, así, Min *et al.*, en el 2010 evaluaron la metilación del promotor de los genes con

capacidad antioxidante GPx1 y GPx3 en la línea celular de cáncer gástrico humano y observaron una correlación entre la metilación del DNA y la pérdida de su expresión.

Los genes antioxidantes SOD y GPx contienen un promotor rico en secuencias CG adyacentes al sitio del inicio de la transcripción, característica que confiere a ambos genes ser blancos potenciales de la regulación a través de la metilación del DNA (Cyr *et al.*, 2012) inducida por Cd. El Cd produce de manera indirecta la producción de las ROS, esto conduce al reclutamiento de las DNMTs a secuencias promotoras de genes con respuesta antioxidante, conllevando en algunas ocasiones a la metilación de genes, impidiendo así, la regulación transcripcional y la pérdida de su función (Cyr *et al.*, 2012). Debido a la función que desempeñan los genes SOD-2 y GPx-1, el silenciamiento epigenético de ambos genes implicaría la pérdida total de su función que contribuiría a exacerbar el daño oxidativo al DNA, proteínas y lípidos (Cyr *et al.*, 2012; Skipper *et al.*, 2016).

Es de particular interés el estudio del mecanismo de toxicidad que involucra la regulación epigenética inducida por los contaminantes ambientales en particular de aquellos que son considerados carcinógenos, por lo que en el presente estudio se exploró si la exposición a concentraciones micromolares de Cd está asociado con la metilación de los genes SOD-2 y GPx-1 en células HepG2.

## **2. Material y métodos**

### **2.1 Reactivos**

Medio de cultivo celular DMEM alto en glucosa, antibiótico penicilina-estreptomina (100X), tripsina-EDTA (0.25%), CdCl<sub>2</sub> con una pureza de 99.99%, Terbutil hidroperóxido (TBHP); kit MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y el reactivo rojo neutro fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA); suero fetal bovino (SFB), Cell Rox Green reagent, TRIzol y dimetil sulfoxido (DMSO) son de la compañía Invitrogen Life Technologies (Oregon, USA). El kit KAPPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR es de Kapa Biosystems (Massachusetts, USA); para la extracción de ADN se utilizó el kit de purificación de ADN genómico Wizard de PROMEGA (Madison, USA). Para la evaluación de la metilación se utilizó el kit EZ DNA Methylation- Gold™ (Zymo Research Irvine, CA).

### **2.1 Cultivo celular y tratamiento de CdCl<sub>2</sub>**

La línea celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) (ATTC) fue proporcionado por el Laboratorio de Toxicología Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas Biológicas, Guerrero México. Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico penicilina/estreptomina a una confluencia de 70-80%, en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C.

Las células HepG2 fueron cultivadas en placas de 24 pozos (3x10<sup>5</sup> células/pozo) durante 24 horas antes de la exposición a CdCl<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo, el medio de cultivo fue sustituido por medio fresco con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub>. La solución de trabajo de CdCl<sub>2</sub> (1mM) se preparó con agua MilliQ estéril; antes de realizar los tratamientos se prepararon concentraciones subtóxicas de 0.5, 0.8, 1 y 3 µM de CdCl<sub>2</sub> en medio DMEM con 0.5% de SFB. Posteriormente, las células fueron tratadas con las concentraciones antes mencionadas de CdCl<sub>2</sub> por 24 y 48h, como grupo control las células solo se mantuvieron con medio DMEM sin CdCl<sub>2</sub>.

### **2.3 Evaluación de la viabilidad celular**

Las células HepG2 se cultivaron en medio DMEM enriquecido y tratadas con CdCl<sub>2</sub> como se describió anteriormente. Después del tratamiento, se evaluó la viabilidad celular por el método MTT descrito previamente por Mosmann (Mossmann, 1983), este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT al compuesto azul formazán realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Los resultados del ensayo MTT se confirmaron a través del método del rojo neutro (RN); el ensayo de RN está basado de acuerdo al protocolo de Reppeto (Reppeto, 2008), este consiste en determinar la acumulación del RN en los lisosomas de células viables. Posterior a la exposición con CdCl<sub>2</sub>, las células se incubaron por 2 h con el RN (40 µg ml<sup>-1</sup>) disuelto en medio DMEM libre de suero.

La absorbancia de ambos métodos fue leída en el lector de ELISA Stat Fax 2100 (Awareness Technology), el MTT se leyó a una longitud de onda de 570-630 nm, el RN a una longitud de 540 nm. Los resultados fueron analizados en el programa SigmaPlot versión 10.0 (San Jose, CA), la viabilidad celular se reportó como el valor de la media en porcentaje con respecto a las células NT.

### **2.5 Nivel de expresión del ARNm**

El ARN total fue extraído con TRIzol a partir de las células HepG2 y usado para la síntesis de DNAc. La pureza y concentración de RNA se midió por espectrofotometría (260/280 y 230/280 ratio). Las reacciones de RT-qPCR se realizaron con 100 ng de ARN total empleando el kit KAPPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR (Kapa Biosystem, Massachusetts, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y usando los oligonucleótidos previamente reportados (software MacVector, Solari *et al.*, 2015) (Tabla 1 suplementaria). Las reacciones de RT-qPCR se realizaron por triplicado en el equipo de PCR CFX96 Touch (BioRad) en un volumen final de 10 µl. La reacción de RT-qPCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones: un ciclo de 30 s a 37°C, 5 min a 42°C y 5 min a 95°C; seguido por 40 ciclos de 20 s a 95°C, 30 s a 60°C (Tm de alineamiento) y la curva de disociación de 15 s a 95°C, 1 min a 60°C y 15 s a 60°C.

Los resultados fueron normalizados con el gen endógeno gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los niveles de expresión se determinaron usando el método comparativo de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

## 2.6 Detección de ROS

La producción de las ROS se determinó a través de la prueba fluorogénica CellROX® Green (Life Technologies, CA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron en placas de 24 pozos y fueron expuestas a concentraciones de 0.5, 0.8, 1 y 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por 24 y 48 h; así mismo las células se trataron con 300  $\mu\text{M}$  de terbutil hidroperóxido (TBHP) durante 1h como inductor de EO (Alía *et al.*, 2005). Posteriormente, se agregó CellROX a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$  y se incubó por 30 min, transcurrido el tiempo se realizaron lavados con PBS 1X y se resuspendieron en un volumen final de 1200  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. La fluorescencia de las células se midió en el citómetro de flujo FACSCanto™ II (Becton-Dickinson, USA) a una longitud de onda de 485/520 nm. Para el análisis se consideró un total de 100,000 eventos por condición. Cada condición se evaluó por triplicado de tres experimentos independientes y se reportó como la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células tratadas y no tratadas (NT).

## 2.7 Metilación de los genes SOD-2 y GPx-1

La región promotora de los genes SOD-2 y GPx-1 se analizaron usando el portal ExpASy y MethPrimer (Figura 1 complementaria). Alrededor de 500 ng de DNA fueron modificados con bisulfito de sodio utilizando el kit EZ DNA Methylation Gold™ en un termociclador modelo 2400 (Applied Biosystems), posteriormente, se realizó la PCR utilizando primers para secuencias metiladas y no metiladas (Tabla 2 suplementaria). Las condiciones de PCR fueron; desnaturalización inicial a 96°C por 3 min, 34 ciclos a 95°C 30 s, 62 °C 30 s y 72 °C 60 s, las temperaturas de alineamiento fueron específicas para cada gen y extensión a 72°C, todos durante 30 s. Con un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 3 minutos y uno final de extensión a 72°C por 5 minutos. Por último, los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

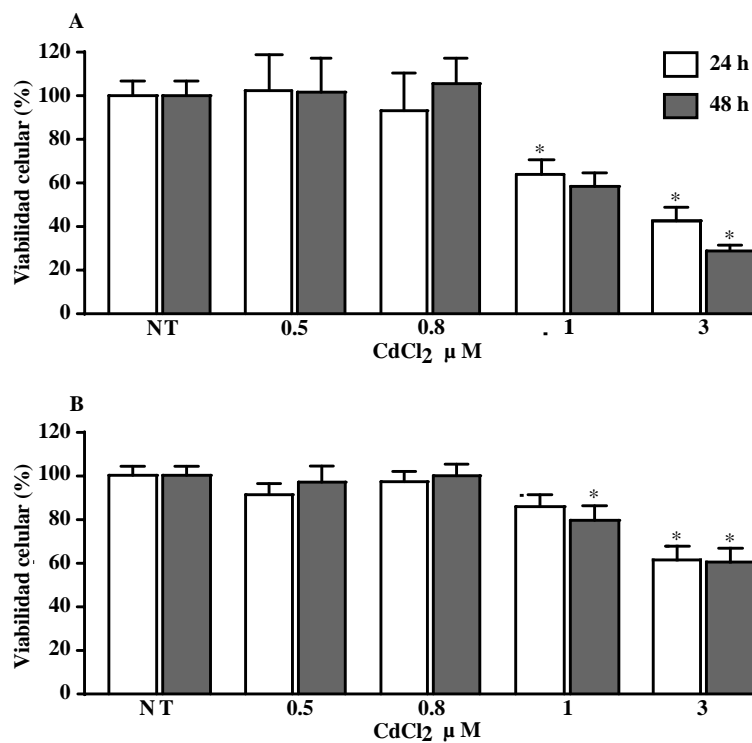
## **2.8 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó en el programa SigmaPlot versión 10.0. Los datos se representaron como la media  $\pm$  E.E. de tres experimentos independientes (análisis de metilación) por triplicado (análisis de expresión, viabilidad celular y determinación de ROS). Se utilizó la prueba *t* de Student para conocer las diferencias entre los grupos experimentales y el control. En todos los casos se consideró  $p < 0.05$  como diferencia significativa.

### 3. Resultados

#### 3.1 Efecto citotóxico de CdCl<sub>2</sub> en las células HepG2

Los resultados del ensayo MTT y RN mostraron una disminución en la viabilidad celular de HepG2 dependiente de la concentración de CdCl<sub>2</sub> (Figura 1A). La viabilidad celular parece ser óptima en un rango de 0.5 y 0.8 μM de CdCl<sub>2</sub> para ambos tiempos de exposición a Cd (Figura 1A y B), sin embargo la concentración de 1 μM reveló una disminución de aproximadamente 45% por el método de MTT (P<0.05) (Figura 1A) por lo que los valores de viabilidad celular se confirmaron a través del método de RN; ambos ensayos mostraron una severa citotoxicidad después del tratamiento con 3μM de CdCl<sub>2</sub> en los dos tiempos con una disminución en la viabilidad de aproximadamente un 60% y 40% por el método de MTT (Figura 1A) y RN (Figura 1B) respectivamente (p<0.05).

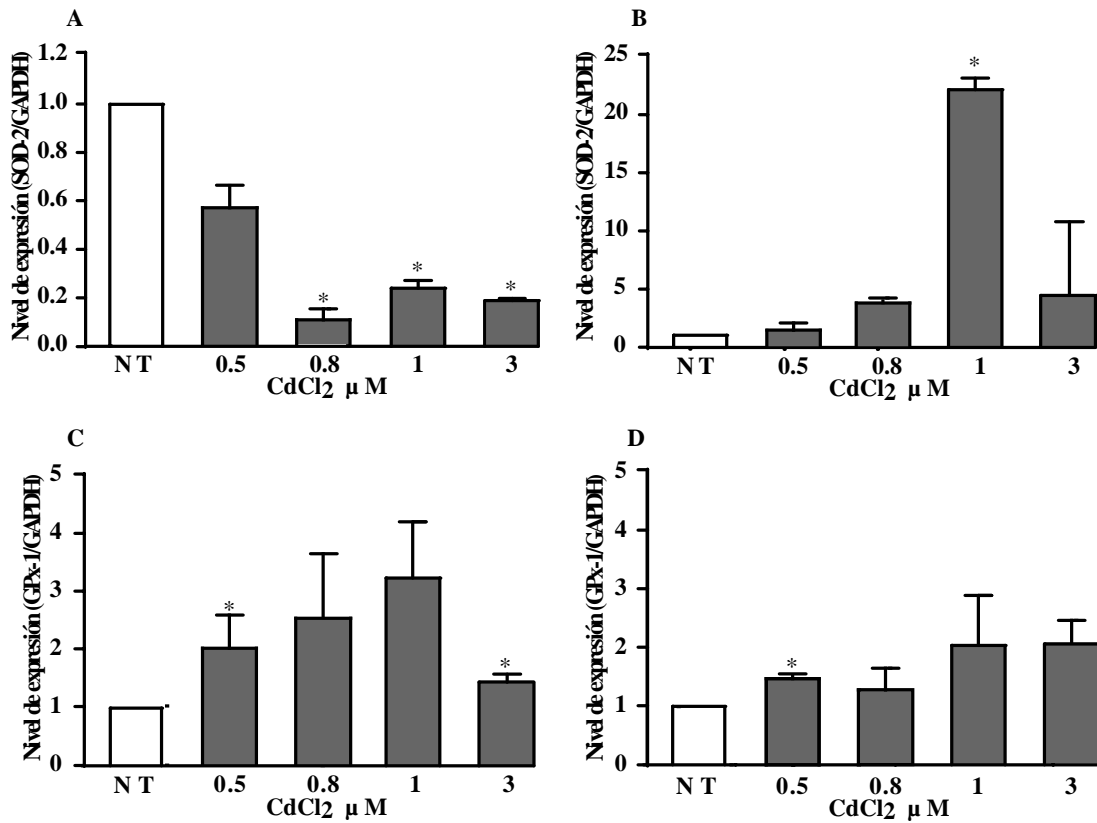


**Figura 1. Efecto de CdCl<sub>2</sub> sobre la viabilidad celular de HepG2.** Se determinó la viabilidad empleando el método de MTT (A) y rojo neutro (B). La viabilidad celular en HepG2 a 24 y 48 h después del tratamiento con CdCl<sub>2</sub> a diferentes concentraciones (0.5, 0.8, 1 y 3 μM). Cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado y son expresados en porcentaje con respecto a los valores registrados en las células NT (media ± E.E.); \*p<0.05 (prueba t-Student). NT, No tratadas.



### 3.2 Nivel de expresión del RNAm de SOD-2 y GPx-1

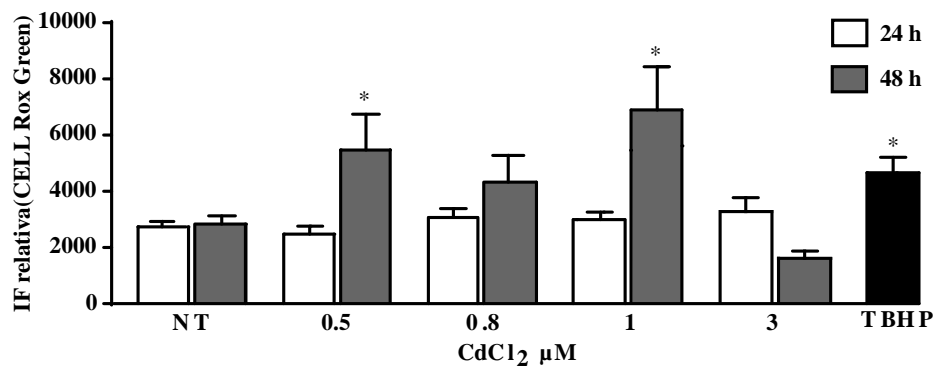
Como se muestra en la Figura 2A, los niveles de expresión de SOD-2 disminuyeron significativamente (0.8, 1 y 3  $\mu\text{M}$ ) después del tratamiento por 24 h con  $\text{CdCl}_2$  comparado con el grupo control ( $p < 0.05$ ) (Figura 2A); contrario a lo observado anteriormente, el tratamiento con  $\text{CdCl}_2$  por 48 h aumenta después de la exposición a 0.5  $\mu\text{M}$ , este aumento es estadísticamente significativo solo a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  ( $p < 0.05$ ) (Figura 2B). Con respecto al RNAm de GPx-1 a 24 h, los resultados revelaron un aumento inmediato después de la exposición a 0.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  ( $p < 0.05$ ) (Figura 2C), este aumento se mantiene a las 48 h de exposición a  $\text{CdCl}_2$ ; no hubo una diferencia significativa entre el grupo tratado con  $\text{CdCl}_2$  (0.8, 1 y 3  $\mu\text{M}$ ) y el grupo NT (Figura 2D).



**Figura 2. Nivel de expresión del RNAm de SOD-2 y GPx-1.** Las células HepG2 fueron tratadas con concentraciones de 0.5, 0.8, 1 y 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por 24 y 48 h. Nivel de expresión de SOD-2, 24 h (2A) y 48 h (2B), nivel de expresión de GPx-1, 24 h (2C) y 48 h (2D). Los experimentos se realizaron por triplicado, cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado comparado con las células NT (Media  $\pm$  E.E.); \* $p < 0.05$  (prueba *t*-Student). NT, No tratadas.

### 3.3 Efecto de CdCl<sub>2</sub> en la producción de ROS

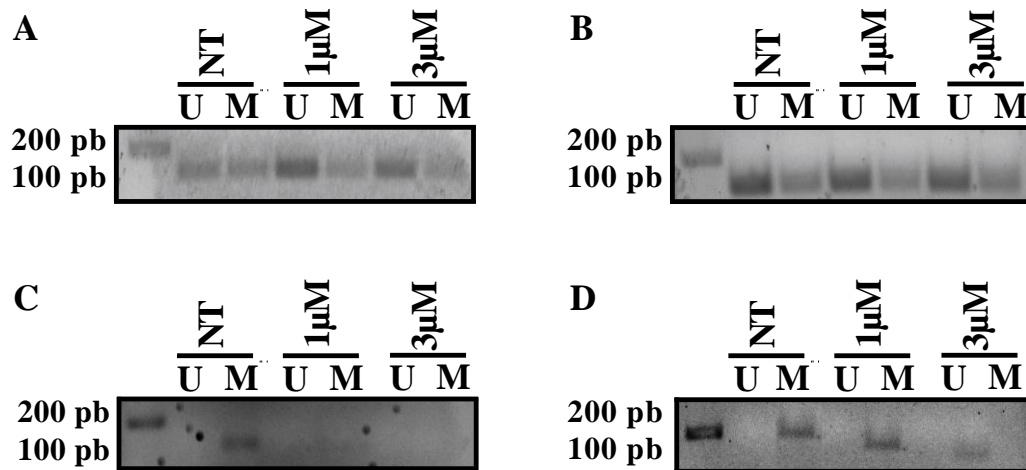
Se exploró el efecto del tratamiento con CdCl<sub>2</sub> sobre la producción de las ROS intracelulares, como control positivo las células HepG2 fueron expuestas a TBHP (300 μM por 1 h) (Alía *et al.*, 2005). El tratamiento de las células HepG2 con 0.5, 0.8, 1 y 3 μM de CdCl<sub>2</sub> por 24 h no generó un aumento significativo en los niveles de las ROS con respecto al control (Figura 3). Las células HepG2 tratadas con CdCl<sub>2</sub> por 48 h mostraron un aumento en los niveles de las ROS, siendo significativo el tratamiento con 0.5 y 1 μM ( $p < 0.05$ ) de CdCl<sub>2</sub> (Figura 3).



**Figura 3. Efecto de CdCl<sub>2</sub> en la producción de ROS.** Las células HepG2 fueron tratadas con diferentes concentraciones (0.5, 0.8, 1 y 3 μM) de CdCl<sub>2</sub> por 24 y 48 h. Las células fueron teñidas con CELL Rox Green. Los niveles de ROS se midieron a través de citometría de flujo. Los experimentos se realizaron por triplicado, cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado comparado con las células NT (Media ± E.E.); \* $p < 0.05$  (prueba t-Student). NT, No tratadas, TBHP, terbutil hidroperóxido.

### 3.4 Efecto de CdCl<sub>2</sub> sobre la metilación de SOD-2 y GPx-1

Para explorar el efecto del CdCl<sub>2</sub> sobre la metilación gen específica de SOD-2 y GPx-1 se eligieron solo dos concentraciones, 1  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> que, de acuerdo a los resultados de viabilidad celular (RN) (Figura 1B) esta concentración no es citotóxica, y la concentración de 3  $\mu$ M para asegurar y visualizar claramente la metilación, (Figura 4). Transcurrido el tiempo de exposición de las células HepG2 con 1 y 3  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> por 24 y 48h, se exploró la metilación. De acuerdo los resultados obtenidos, no se observaron cambios en la metilación del gen SOD-2 en las condiciones de estudio (24 y 48h) (Figura 4A y 4B). Sin embargo, se encontró metilado el gen GPx-1 en su estado basal, un hallazgo muy importante ya que no existen reportes del estado de metilación de este gen en la línea celular HepG2. El tratamiento de las células HepG2 con 1 y 3  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> por 24 h mostró la desmetilación del gen GPx-1 (Figura 4C), la metilación vuelve a recuperarse después del tratamiento por 48 h con 1 y 3  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> (Figura 4D).



**Figura 4. Metilación de los genes SOD-2 y GPx-1.** Las células HepG2 fueron tratadas con 1 y 3  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> por 24 y 48 h. A, B, Metilación de SOD-2 (24 y 48h), C y D metilación de GPx-1 (24 y 48h). Los experimentos se realizaron por triplicado. La presencia del producto de PCR visible en los carriles marcados con "U" indica el gen no metilado, mientras que la presencia de producto en los carriles marcados con "M" indica el gen metilado. NT, No tratadas.

#### 4. Discusión

El Cd es uno de los contaminantes más comunes en el ambiente. La exposición ambiental ha sido considerada un problema mundial que afecta a millones de personas. Diversos reportes indican que la exposición a dosis bajas de Cd (en el orden micromolar), está asociada con el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer entre ellos el de hígado. Uno de los mecanismos moleculares explorado en los últimos años es la capacidad de alterar la maquinaria epigenética.

Algunos reportes revelan la metilación inducida por Cd en genes específicos: Benbrahim *et al* (2007) en una línea celular de próstata (RWPE-1) expuestas por 10 semanas a 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  encontró metilados los genes supresores de tumor RASFF1A y p16; Zhou *et al.*, (2011) reportó metilación específica de hMSH2, ERCC1, XRCC1 y hOGG1, genes que regulan la reparación del ADN en células epiteliales bronquiales humanas (16HBE) transformadas por Cd con 5, 10, y 15  $\mu\text{M/L}$  durante tres meses. Existe poca evidencia acerca del efecto del  $\text{CdCl}_2$  sobre la metilación gen específica. En el presente trabajo analizamos el efecto de la exposición al  $\text{CdCl}_2$ , a concentraciones ambientalmente relevantes, sobre la metilación específica de genes con respuesta antioxidante como SOD-2 y GPx-1 en células de hepatocarcinoma HepG2. Las concentraciones empleadas fueron 0.5, 0.8, 1 y 3  $\mu\text{M}$ , las cuales son comparables a concentraciones encontradas en tejido de hígado de personas ambientalmente expuestas (Hayashi *et al.*, 2012, Baba *et al.*, 2013, Yamanobe *et al.*, 2015).

Para analizar los efectos citotóxicos del  $\text{CdCl}_2$  determinamos la viabilidad celular en las células HepG2 expuestas a las concentraciones anteriormente mencionadas. No se observaron cambios significativos en la viabilidad a 0.5 y 0.8  $\mu\text{M}$  por ninguno de los métodos empleados (el MTT y RN), sin embargo la exposición a 1 y 3  $\mu\text{M}$  disminuyó la viabilidad en un 45% y 20 %, respectivamente con respecto al control por el método del MTT, para no sobreestimar los resultados del MTT dado que puede ser sustrato de diversos sistemas endógenos con actividad oxido-reductora, los resultados fueron corroborados a través del RN donde se observó un efecto citotóxico menor ya que hubo disminución en la viabilidad en menos del 20% en las células expuestas a 1  $\mu\text{M}$ . Lawal *et al.*, (2010) evaluó el efecto citotóxico de  $\text{CdCl}_2$  a concentraciones de 5, 10 y 50  $\mu\text{M}$  por 24h en HepG2 a través del MTT y

demonstró que la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  disminuyó un 50% la viabilidad celular, datos que fueron reproducibles este trabajo (datos no mostrados). El ensayo MTT es uno de los métodos más usados para evaluar la citotoxicidad; sin embargo, puede subestimar la citotoxicidad real (Jo *et al.*, 2015), debido a esto algunos autores optan por utilizar más de un ensayo de citotoxicidad para evaluar la viabilidad celular. Los resultados en este trabajo indican que las concentraciones subtóxicas de  $\text{CdCl}_2$  utilizadas no comprometen la viabilidad celular.

Se sabe que uno de los principales mecanismos de toxicidad del Cd es la inducción de EO, este se define como una producción excesiva de ROS o la carencia de una respuesta adecuada por parte de los mecanismos antioxidantes; es decir, el EO es un desbalance óxido-reductor intracelular con la constante oxidación de biomoléculas (Lawal *et al.*, 2010, Cuypers *et al.*, 2010, Skipper *et al.*, 2016). Por otra parte, el Cd es un tóxico que puede modular los cambios en la expresión de diferentes genes en respuesta al EO (Cartularu *et al.*, 2015, Madejczyk, *et al.*, 2015). Se ha reportado que la exposición de 24 h y 3 semanas a concentraciones micromolares de Cd puede modular la expresión de genes como las metalotioneínas (MTs), CYP3A7, NT5E, y el gen de respuesta temprana al crecimiento (EGR1), glutatión S-transferasa theta 1 (GSTT1), todos ellos involucrados en la desintoxicación de metales y xenobióticos, metabolismo de drogas, proliferación, migración e invasión celular (Cartularu *et al.*, 2015). En este trabajo analizamos si el  $\text{CdCl}_2$  modula la expresión de genes con respuesta antioxidante tales como SOD-2 y GPx-1, los cuales participan en mantener el equilibrio redox celular. La enzima SOD cataliza el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el cual es convertido posteriormente a  $\text{H}_2\text{O}$  por la enzima GPx. La importancia de estos genes radica en la protección que ejercen a la célula para salvaguardarla del daño oxidativo, regulando y neutralizando las ROS. Se analizaron los niveles del ARNm a las concentraciones indicadas en tiempos de 24 y 48 h. Los resultados mostraron una disminución en el ARNm de SOD-2 en todas las concentraciones empleadas con respecto a las 24 h (Figura 2A), sin embargo a las 48 h de exposición a  $\text{CdCl}_2$  los niveles del ARNm aumentaron significativamente (Figura 2B).

En contraste los niveles de expresión del ARNm de GPx-1 se encontraron aumentados con respecto al control después de la exposición a partir de las 24 h en todas las concentraciones empleadas, este aumento se mantiene aún a las 48 h (Figura 2C y 2D). La GPx-1 es una enzima encargada de dismutar el  $H_2O_2$  a oxígeno (O) y agua ( $H_2O$ ), es otra de las enzimas que interviene en la protección celular contra el EO.

Sabemos que cuando la producción celular de ROS excede la capacidad antioxidante de una célula, se genera un daño a macromoléculas celulares como lípidos, proteínas y el ADN (Min *et al.*, 2012). Sin embargo, los niveles bajos de ROS actúan como segundos mensajeros y promueven la expresión de diversos mecanismos de defensa contra el EO (Sauer *et al.*, 2001). La primera etapa crucial en la defensa contra las ROS implica la activación del factor nuclear 2 (derivado de eritroide-2, NRF2) que promueve la expresión de antioxidantes como SOD-2 y 3 y glutatión (GSH) por unión a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) que responden a la presencia de ROS intracelulares (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005). Si el mecanismo de defensa contra las ROS es insuficiente, en consecuencia la célula induce cambios en la expresión de genes antioxidantes como lo sugiere a las 48 h sugiriendo una respuesta adaptativa de la célula ante la presencia de Cd (Figura 2A, B). (Deferme *et al.*, 2013).

Para demostrar que los cambios en la expresión del ARNm de SOD-2 y Gpx-1 fue mediado por las ROS, se investigó la producción de ROS en las células HepG2 expuestas a 0.5, 0.8, 1 y 3  $\mu M$  de  $CdCl_2$ , la presencia de ROS se determinó a través de citometría de flujo. Como se muestra en la figura 3 no hay un aumento en los niveles de ROS a las 24 h después del tratamiento con  $CdCl_2$  a ninguna de las concentraciones empleadas; sin embargo a las 48 h se observó un aumento significativo en los niveles de ROS, es conveniente mencionar que si bien no se detectaron ROS a las 24 h no significa que no se hayan producido a tiempos más cortos de exposición. Se reconoce que el EO inducido por el Cd, está relacionado con la inhibición de enzimas antioxidantes como la CAT, la glutatión reductasa (GR), la GPX, la ascorbato peroxidasa y la SOD dando como resultado la acumulación de ROS. En la línea celular (CRL-1439) derivadas de hígado de rata (Ikediobi *et al.*, 2004) y en cultivo primario de hepatocitos de rata (Liu *et al.*, 2011) expuestas a  $CdCl_2$ , encontraron un incremento en la

generación de ROS y una disminución tanto en el contenido de glutatión (GSH) como en las actividades de la GPx, catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR). Los resultados de nuestro trabajo mostraron una desregulación en los niveles de expresión de genes como SOD-2 y GpX-1 que responden a un ambiente de EO, por lo que estos cambios pueden ser inducidos por las ROS (Figura 2, Figura 3). Esto sugiere que la alteración en la expresión del ARNm de genes antioxidantes en respuesta a la producción de ROS están inducidas por CdCl<sub>2</sub> (Huang *et al.*, 2008, Lawal *et al.*, 2010). Se han propuesto varios mecanismos de toxicidad para Cd, incluyendo la generación de EO, alteración en la expresión de genes y alteración en la metilación global del ADN (Huang *et al.*, 2008, Lawal *et al.*, 2010, Sarkar *et al.*, 2013, Cartularu *et al.*, 2015). Son pocos los estudios que han evaluado la metilación específica de genes, uno de ellos realizado por Ronco y col. reportó que la exposición de las células de coriocarcinoma humano JEG-3 a 0.5 y 1 µM de Cd por 24 h promueve la hipometilación gen específica de HSD11B2 (Ronco *et al.*, 2010); otro estudio realizado por Zhou *et al.*, (2012) determinó el efecto de Cd sobre la metilación de los genes reparadores del ADN, hMSH2, ERCC1, XRCC1 y hOGG1 en la línea celular epitelial bronquial humana (16HBE), las células fueron expuestas de manera crónica por 3 a 4 meses de 5 a 15 µM de CdCl<sub>2</sub> y sus hallazgos revelaron una hipermetilación de los 4 genes. Hasta el momento no se ha explorado la metilación específica en genes con respuesta antioxidante causada por la exposición a tóxicos, pero existe una evidencia de glutatión S-transferasa (GSTP1), un gen de fase II que participa en la desintoxicación de diversos xenobióticos, juega un papel esencial en el mantenimiento de la integridad y protección contra el ADN, catalizando la conjugación del glutatión a una amplia variedad de sustratos electrofílicos. Tal es el caso del gen GSTP1, que se caracteriza por tener una región codificante controlada por una larga isla CpG situada en el inicio de la región promotora, esta característica lo convierte en un gen blanco de modificaciones epigenéticas, como la metilación. En diversos tipos de cáncer se ha encontrado hipermetilada su región promotora y en consecuencia el silenciamiento de GSTP1, estos hallazgos han llevado a proponerlo como un biomarcador para la detección y prognosis del cáncer (Schnekenburger *et al.*, 2014). Esta evidencia nos dio la pauta para estudiar la metilación de otros genes con función antioxidante, SOD-2 y GPx-1, además de

que estos genes pueden ser regulados vía metilación (Becuwe *et al.*,2014, Min *et al.*,2012 ); hay evidencia que indica que Cd altera los patrones de metilación, es por ello que se exploró el estado de metilación de SOD-2 y GPx-1 en la línea celular HepG2 expuesta a concentraciones micromolares de Cd por 24 y 48 h (Figura 4). Los resultados del estado de metilación del gen SOD-2 revelaron que la exposición a 1 y 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por 24 h no altera los patrones de metilación dado que no se observan cambios en la intensidad de las bandas metiladas con respecto a las células control (Figura 3A), incluso la metilación de SOD-2 evaluada a 48 h se mantiene sin cambios comparado con su respectivo control (Figura 3B), los resultados indican bajo estas condiciones de trabajo que el Cd no altera el patrón de metilación de SOD-2. La metilación de GPx-1 mostró un panorama distinto a lo observado en SOD-2, en condiciones basales se encontró metilado el promotor del gen GPX-1 en la línea celular HepG2, al término del tratamiento con 1 y 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por 24 h esta metilación desaparece (Figura 4C) mientras que a 48 h, las concentraciones 1 y 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  restablecen el estado metilado de GPx-1 (Figura 4D), los resultados sugieren que el  $\text{CdCl}_2$  induce la metilación de GPx-1; Min *et al.*, en el 2012 examinó la asociación del silenciamiento y la metilación del promotor de GPx-3 y GPx-1 en células de cáncer gástrico y encontró una hipermetilación aberrante de la región promotora de GPx-3 y GPx-1 como un mecanismo de desregulación de la expresión del ARNm. Los resultados encontrados en este estudio muestran la primera evidencia de que el  $\text{CdCl}_2$  module la expresión de genes con respuesta antioxidantes a través de mecanismos epigenético específicamente la metilación.

En este trabajo determinamos que la exposición al  $\text{CdCl}_2$  a concentraciones ambientalmente relevantes no generó citotoxicidad, solo a partir de concentraciones de 3  $\mu\text{M}$  en las células HepG2. La exposición a concentraciones micromolares de  $\text{CdCl}_2$  indujo cambios en la expresión de los genes SOD-2 y GPx-1 y que estos cambios fueron en respuesta a la producción de ROS a las 48 h. Así mismo la exposición a  $\text{CdCl}_2$  puede inducir cambios en la metilación de GPx-1, un gen clave en la función antioxidante.



## Referencias bibliográficas

IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 100 (2011) 121-145.

M. Berglund, K. Larsson, M. Grandé, L. Casteleyn, M. Kolossa-Gehring, G. Schwedler, Exposure determinants of cadmium in European mothers and their children, *Environ. Res.* 141 (2015) 69–76.

X. Yuan, J. Wang, Y. Shang, B. Sun, Health risk assessment of cadmium via dietary intake by adults in China. *J Sci. Food Agric.* 94 (2014) 373–380.

S. Nookabkaew, N. Rangkadilok, C.A Akib, N. Tuntiwigit, J. Saehun, J. Satayavivad, Evaluation of trace elements in selected foods and dietary intake by young children in Thailand. *Food Addit. Contam Part B, Surveill.* 6 (2013)55–67.

B. Fang, X. Zhu, High content of five heavy metals in four fruits: Evidence from a case study of Pujiang county, Zhejiang province, China. *Food Cont.* 39 (2014) 62–67.

ATSDR, Toxicological Profile for Cadmium. Public Health (2008).

WHO, Quantifying Environmental Health Impacts. WHO (2010).

S. Satarug, S.H. Garrett, M.A. Sens, A.S. Donald A, Cadmium, Environmental Exposure, and Health Outcomes. *Environ. Health Perspec.* 118 (2010) 182-190.

C. Hayashi, N. Koizumi, H. Nishio, N.Koizumi, M. Ikeda, Cadmium and Other Metal Levels in Autopsy Samples from a Cadmium-Polluted Area and Non-polluted Control Areas in Japan, *Biol Trace Elem Res.* 145 (2012) 10-22.

J. Schöpfer, G. Drasch, G.N. Schrauzer, Selenium and cadmium levels and ratios in prostates, livers, and kidneys of nonsmokers and smokers. *Biol Trace Elem Res.* 134 (2010) 180–187.

P. Limpatanachote, W. Swaddiwudhipong, Cadmium-exposed population in Mae Sot District, Tak Province: 4 bone mineral density in persons with high cadmium exposure. *J Med Assoc Thai*, 93 (2010) 1451-7.

Y. Liang, Lei, L, Renal function after reduction in cadmium exposure: an 8-year follow-up of residents in cadmium-polluted areas. *Environ. Health Perspect.* 120 (2) 223-8.

L. Benbrahim-Tallaa, E.J. Tokar, B.A. Diwan, A. L. Dill, J.F. Coppin, M. P. Waalkes, Cadmium malignantly transforms normal human breast epithelial cells into a basal-like phenotype. *Environ. Health Perspect.* 117 (2009) 1847–1852.

C. M. Gallagher, J.J. Chen, J.S. Kovach, Environmental cadmium and breast cancer risk. *Aging*. 2 (2010) 804-814.

A.Hartwig, Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights. *Biometals*, 23 (2010) 951–960.

B. Xu, S. Chen, L. Liu, H. Zhou<sup>1</sup>, W. Chen, T. Shen, X. Han, L. Chen, S.Huang, Calcium signaling is involved in cadmium-induced neuronal apoptosis via induction of reactive oxygen species and activation of MAPK/mTOR network. *PLoS One*. 6 (2011) 1-12.

L. Cartularo, F. Laulicht, H. Sun, T. Kluz, J. Freedman, M. Costa, Gene expression and pathway analysis of human hepatocellular carcinoma cells treated with cadmium. *Toxicol. Appl Pharmacol*. 288 (2015) 399–408.

M. Filipic, Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutat Res. Fundam Mol Mech Mutagen*.733 (2012) 69–77.

S. Gona, A.P. Sanders, M.L. Miranda, R.C. Fry, Prenatal Exposure to Cadmium and Cotinine and CpG island DNA methylation in Mother-Infant Pairs. *Genomics Data*. 5(2015) 378–380.

S.Y. Min, H.S Kim, E.J Jung, C.D, Jee, W.H. Kim, Prognostic significance of glutathione peroxidase 1 (GPX1) down-regulation and correlation with aberrant promoter methylation in human gastric cancer. *Anticancer Res*. 32 (2012) 3169-3175.

N. Nishida, M. Kudo, Oxidative stress and epigenetic instability in human hepatocarcinogenesis. *Dig Dis*. 31 (2013) 447–453.

M. Takiguchi, W.E Achanzar, W. Qu,G. Li, M. Waalkes, P. Michael, Effects of cadmium on DNA- (Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Experimental Cell Research*.286(2003) 355–365.

A.R. Cyr, M.J. Hitchler, F.E. Domann, In Cancer by Histone Modifications and CpG Methylation: Closing the Loop Between Redox Biology and Epigenetics. *Antioxid Redox Signal*. 18 (2012) 1946-1955.

A. Skipper, N.J Sims, C.Y. Yedjou, P.B Tchounwou, Cadmium Chloride Induces DNA Damage and Apoptosis of Human Liver Carcinoma Cells via Oxidative Stress. *Int J Environ Res. Public Health*. 13 (2016) 1-10.

T. Mossmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Meth*. 65 (1983) 55–63

G. Repetto, A. del Peso, J.L. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nat Protoc*. 3 (2008) 1125-1131

C. Solari, C. Vázquez, M.S. Cosentino, M. V.Petrone, A.Waisman, C.Luzzani, M. *et al.*, Manganese Superoxide Dismutase Gene Expression Is Induced by Nanog and Oct4, Essential Pluripotent Stem Cells' Transcription Factors. *PLoS one*, 10 (2015) 1-12

K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time

Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 25 (2001) 402–408.

M. Alía, S. Ramos, R. Mateos, L. Bravo, L. Goya, Response of the Antioxidant Defense System to tert-Butyl Hydroperoxide and Hydrogen Peroxide in a Human Hepatoma Cell Line (HepG2), *J Biochem Mol Toxicol*. 19 (2005) 119–128.

Z. Yiran, J. Chenyang, W.Y. Jiajing, G. Jianhong, B. Jianchun, L. Xuezhong, L. Zongping, Oxidative Stress and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Involved in Cadmium-Induced BRL 3A Cell Apoptosis, *Oxid Med Cell Longev*. 2013 (2013) 1–12.

Y. Yamanobe, Sex differences in shotgun proteome analyses for chronic oral intake of cadmium in mice, *Plos ONE*. 10 (2015) 3.

Z. Zhou, Y. Lei, C. Wang, Analysis of Aberrant Methylation in DNA Repair Genes During Malignant Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells Induced by Cadmium, *Toxicol. Sci*. 125 (2012) 412–417.

M.C. Senut, A. Sen, P. Cingolani, A. Shaik, S.J. Land, D.M. Ruden, Lead Exposure Disrupts Global DNA Methylation in Human Embryonic Stem Cells and Alters Their Neuronal Differentiation, *Toxicol. Sci*. 139(2014) 142–161.

L. Kovatsi, E. Georgiou, A. Ioannou, C. Haitoglou, G. Tzimagiorgis, H. Tsoukal, *et al.*, p16 promoter methylation in Pb<sup>2+</sup> exposed individuals, *Clin. Toxicol*. 48(2010) 124–128.

J. M. Goodrich, N. Basu, A. Franzblau, D.C. Dolinoy, Mercury biomarkers and DNA methylation among Michigan dental professionals, *Environ. Mol. Mutagen*. 54 (2013) 195–203.

H. Baba, K. Tsuneyama<sup>1</sup>, M. Yazaki<sup>1</sup>, K. Nagata, T. Minamisaka, T. Tsuda, *et al.*, The liver in itai-itai disease (chronic cadmium poisoning): pathological features and metallothionein expression, *Mod. Pathol*. 26 (2013) 1228–1234

A.O. Lawal, E. Ellis, Differential sensitivity and responsiveness of three human cell lines HepG2, 1321N1 and HEK 293 to cadmium, *J. Toxicol. Sci*. 35(2010) 465–478.

H.Y. Jo, Y. Kim, H.W. Park, H. E. Moon, S. Bae, J.W. Kim, *et al.*, The Unreliability of MTT Assay in the Cytotoxic Test of Primary Cultured Glioblastoma Cells. *Exp. Neurobiol*. 24 (2015) 235–245.

A. Cuyper, M. Plusquin, T. Remans, M. Jozefczak, E. Keunen, H. Gielen, *et al.*, Cadmium stress: an oxidative challenge *Ann, Biometals*. 23 (2010) 927–940.

M.S. Madejczyk, C.E. Baer, W.E. Dennis, V.C. Minarchick, S.S. Leonard, D.A. Jackson, *et al.*, Temporal Changes in Rat Liver Gene Expression after Acute Cadmium and Chromium Exposure, *PLoS ONE*. 10(2015) 1–27.

L. Deferme, J.J. Briedé, S.M.H. Claessen, D.G.J. Jennen, R. Cavill, J.C.S. Kleinjans, Time series analysis of oxidative stress response patterns in HepG2: A toxicogenomics approach, *Toxicology*. 306 (2013) 24-34.

A.T. Dinkova-Kostova., W.D. Holtzclaw, T.W. Kensler, The role of Keap1 in cellular protective responses, *Chem. Res. Toxicol.* 18 (2005) 1779–1791.

Staudt, L.M, Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb. Perspect.Biol.* 2 (2010)

C.O. Ikediobi, V.L. Badisa, L.T. Ayuk-Takem, L.M. Latinwo, J. West, Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL1439 normal rat liver cells, *Int. J. Mol. Med.* 14 (2004) 87–92

T. Liu, W. He, C. Yan, Y. Qi, Y. Zhang, Roles of reactive oxygen species and mitochondria in cadmium-induced injury of liver cells, *Toxicol. Ind. Healt.* 27 (2011)249-256.

Y.H. Huang, C.M. Shih, C.J. Huang, C.M. Lin, C.M. Chou, M.L. Tsai, *et al.*, Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu, Zn-SOD and oxidative status in neural cells, *J. Cell Biochem.* 98 (2006) 577–589.

A. Obara, T. Kamiya , M.Izumi , H. Hara, H. Yamada, T. Adachi, Extracellular-Superoxide Dismutase expression in COS7 cells exposure to cadmium chloride, *Biol Pharm Bull.* 9 (2011) 1443-1447.

G. Jiang. L. Xub, S. Songa, C. Zhua, Q. Wua, L. Zhanga, L.Wu Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cell, *Toxicology*. 244 (2008) 49–55.

D. Huang, Y. Zhang, Y.Qia, C. Chen, W. Ji, Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation, *Toxicology Letters*. 179 (2008) 43-47.

L. Liu, T. Runhua, J. Huang, H. Xingzhi, Q. Lanya, J. Yuanxiang *et al.*, Hepatic oxidative stress and inflammatory responses with cadmium exposure in male mice, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 1 (2015) 229-236.

A.Sarkar, G. Ravindran, V. Krishnamurthy, A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level, *International Journal of Bio-Technology and Research (IJBT)*. 3 (2013) 17-36.

A. M. Ronco, E. Llaguno, M. J. Epanan, M. N. Llanos, Effect of cadmium on cortisol production and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 expression by cultured human choriocarcinoma cells (JEG-3), *Toxicol. In Vitro.* 24 (2010) 1532–1537.

Z. Zhou, Y. Lei, C.Wang, Analysis of Aberrant Methylation in DNA Repair Genes During Malignant Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells Induced by Cadmium, *Toxicological sciences*. 125(2012) 412–417.

M. Schnekenburger, T.Karius, M. Diederich, Regulation of epigenetic traits of the glutathione S-transferase P1 gene: from detoxification toward cancer prevention and diagnosis, *Front. Pharmacol.* 5 (2014) 1-7.

P. Becuwe, M. Ennen, R. Klotz, C. Barbieux, S. Grandemange. Manganese superoxide dismutase in breast cancer: From molecular mechanisms of gene regulation to biological and clinical significance, *Free Radic. Biol. Med.* 77 (2014) 139-151.

## Anexos

**Tabla 1**

Secuencia de primers usados en la RT-PCR

Gen	Secuencias RT-PCR	
SOD-2	AS	5'-CCATTGAACTTCAGTGCAGGCTG-3'
	S	5'-AAGCACCACGCGGCCTACG-3'
GPx-1	AS	5'-AAGGTACTACTTATCGAGAATGTG-3'
	S	5'GTCAGGCTCGATGTCAATGGTCTG-3'
AS: Antisentido, S: Sentido.		

**Tabla 2**

Secuencia de primers usados en la PCR-SM

Gen	Secuencias PCR-SM		Tamaño del producto
SOD-2	M-AS	5'-TTCGTTTTT TTTAGGAACGGTTAC-3'	114 pb
	M-S	5'-CCTACCCCTAAATTTTAATTACGCT-3'	
	UM-AS	5'-TTGTTTTTTTTTAGGAATGGTTATGG-3'	114 pb
	UM-S	5'-CCTACCCCTAAATTTTAATTACACT-3'	
GPx-1	M-AS	5'-GAGGCGGGATTTTTAGGTTC-3'	154 pb
	M-S	5'-CTAACCGAACAACACACATAACG-3'	
	UM-AS	5'-ATGAGGTGGGATTTTTAGGTTT-3'	152 pb
	UM-S	5'-ACCAAACAACACACATAACACA-3'	
M-AS: Metilado antisentido, M-S:Metilado sentido. UM-AS: No metilado antisentido, UM-S:No metilado sentido			

### Figura 1 complementaria

Islas CpG de la región promotora de los genes SOD-2 y GPx-1

