



Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Unidad Académica de Medicina
Unidad de Investigación Especializada en Microbiología
Maestría en Ciencias Biomédicas

Laboratorio de Biología Celular del Cáncer
Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental

**“Efecto crónico del cadmio sobre marcadores de
transición epitelio-mesenquimal en células de epitelio
mamario no tumoral”**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Biomédicas

Presenta

Q.B.P. Miriam Daniela Zuñiga Eulogio

Directora de tesis

Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

Codirector de tesis

Dr. Napoleón Navarro Tito

Chilpancingo de los Bravo, Gro., noviembre de 2019.

**“Efecto crónico del cadmio sobre marcadores de transición
epitelio-mesenquimal en células de epitelio mamario no
tumoral”**



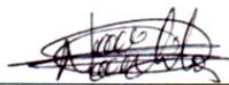
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 12 días del mes de julio de dos mil diecinueve se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada **“Efecto crónico del cadmio sobre marcadores de transición epitelio-mesenquimal en células de epitelio mamario no tumoral”**, presentada por la alumna **Miriam Daniela Zuñiga Eulogio**, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. 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. Ma. Elena Moreno Godínez
Dirección de tesis


Dr. Napoleón Navarro Tito
Codirección de tesis


Dr. Gerardo Huerta Beristáin


Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres


Dra. Teresita Padilla Benavides

Vo. Bo


Dr. Daniel Hernández Sotelo
Coordinador de la Maestría en Ciencias Biomédicas

DIRECCIÓN 2018 - 2021


Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Vo. Bo

DIRECCIÓN 2018 - 2021

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Celular del Cáncer y en el Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo de los Bravo, Gro., MEX.

Bajo la Dirección de

Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

Con la codirección de

Dr. Napoleón Navarro Tito

Y la asesoría de

Dra. Teresita Padilla Benavides
Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres
Dr. Gerardo Huerta Beristáin

Durante el desarrollo del proyecto la C. Zuñiga Eulogio realizó una estancia en el Laboratorio de Inmunotoxicología y Mecanismos Moleculares de Toxicidad a cargo de la **Dra. Emma S. Calderón Aranda**, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, MEX.

Las determinaciones por espectroscopia de absorción atómica se realizaron en colaboración con el departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular (LRB870I) a cargo de la **Dra. Teresita Padilla Benavides**, en la Escuela de Medicina de la Universidad de Massachusetts, Worcester, MA, USA.

En el periodo comprendido del mes de agosto de 2017 a agosto de 2019 la C. Zuñiga Eulogio percibió el apoyo para la formación de recursos humanos, por parte del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** con número (CVU/Becario): 857962/627669.

AGRADECIMIENTOS

Navarro Tito Napoleón, por ser mucho más que un asesor y gran líder, por ser mi amigo. Por brindarme un abrazo cuando más lo necesité y un regaño cuando fue necesario. Por enseñarme a reconstruirme con tu ejemplo.

Moreno Godínez Ma. Elena, gracias por la oportunidad y la confianza. Por ser un gran ejemplo de compromiso con su área de investigación. Por su gran calidad humana y valentía ante la vida.

Padilla Benavides Teresita, es un gran honor trabajar a tu lado, llegaste a fortalecer nuestro pequeño grupo. Eres una mujer extraordinaria, gracias por ser una de mis grandes impulsoras.

Garibay C. Olga L., por compartir en todo momento el conocimiento y la calidez humana que la caracteriza. Gracias por las palabras de aliento siempre sinceras y oportunas.

Huerta B. Gerardo, agradezco sus aportaciones al trabajo, el tiempo invertido y la disposición en todo momento.

A mis amigos, mi sistema de apoyo...

Olea F. Monserrat, sin dudar puedo decir que no hubiera sobrevivido a estos dos años sin ti. Gracias por tu apoyo incondicional, por tus palabras sinceras y por tu lealtad.

Noriega B. Brianda, por ser el atraco más bonito. Encontré en ti un alma compatible. Mi coração.

Dena B. J. L. por estar conmigo en la distancia, siempre incondicional.

Gómez, S. J. Paola. & M. Franco G., invaluable e inverosímiles...

A las excelentes personas que tuve la oportunidad de conocer en este periodo, por los buenos momentos y adversidades que han dejado una enseñanza en mí.

A los integrantes del LBCC y LTSA, gracias a quienes en su momento compartieron conocimientos y experiencias conmigo.

Al creador, infinitas gracias.

DEDICATORIA

A mi familia.

*Zuñiga Eulogio M. E., eres el secreto
detrás de mi éxito. Gracias por
enseñarme a ser. Por respetar y
respaldar mis decisiones... Y seguirme
de cerca para cuidar mis pasos.*

*Zuñiga Eulogio Samuel I., cuando
alguien me pregunta por ti, guardo
silencio... No sé exactamente como
poner un milagro en palabras.*

*Ibarra Zuñiga A. Leonardo, if I climb
the mountains, will I reach the moon?
Will the moon lead me to you?*

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	6
Materiales y Reactivos.....	6
Protocolo de exposición a Cd (CdCl ₂).....	6
Exposición a tiempos cortos para evaluar la activación de FAK.....	6
Exposición crónica para evaluar marcadores de EMT.....	7
Determinación de la concentración intracelular de Cd por medio de espectroscopia de absorción atómica.....	7
Análisis de la viabilidad celular	7
Detección de la activación y los niveles de expresión de proteínas por western blot	8
Morfología celular y distribución citoplasmática de vimentina por microscopía de epifluorescencia.....	8
Evaluación de la migración celular por ensayo de cierre de herida.....	9
Análisis de datos	9
RESULTADOS.....	11
Cadmio induce la activación de la cinasa FAK en la línea celular MCF10A	11
Cadmio se internaliza en células MCF10A expuestas durante 4 semanas	13
Efecto del tratamiento crónico con cadmio sobre la viabilidad celular.....	14
La exposición crónica a cadmio promueve el cambio a una morfología mesenquimal y la formación de fibras de estrés en células MCF10A	15
El tratamiento crónico con cadmio promueve la disminución de los niveles de E-cadherina en células MCF10A	15
El tratamiento crónico con cadmio promueve el incremento en los niveles de expresión de vimentina en células MCF10A	18
La exposición crónica a cadmio promueve la migración en la línea celular MCF10A	18
DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES	27
REFERENCIAS	28
ANEXOS.....	33
Figura complementaria 1.	33

RESUMEN

El cáncer de mama (CaMa) es la neoplasia más frecuente y principal causa de muerte en mujeres a nivel mundial. En la actualidad, además de los factores de riesgo convencionales, se estudian mecanismos relacionados con la exposición a contaminantes ambientales como el cadmio (Cd). Se ha demostrado que el Cd es un metal carcinógeno relacionado con la incidencia y mal pronóstico del CaMa y también un inductor de la transición epitelio-mesenquimal (EMT). La EMT es un proceso de transdiferenciación celular importante para diferentes etapas de la progresión tumoral. La EMT se caracteriza por cambios en la activación y/o expresión de proteínas, como FAK, vimentina y E-cadherina, lo cual tiene como resultado un fenotipo celular migratorio e invasivo. Debido a que los efectos carcinogénicos de la exposición a Cd se observan después de periodos prolongados de exposición, fue de nuestro interés evaluar el efecto de la exposición crónica a Cd sobre marcadores de EMT en células de epitelio mamario no tumoral MCF10A. La activación de FAK y los niveles de expresión de vimentina y E-cadherina se determinaron por western blot. Por medio de espectroscopia de absorción atómica se midió la concentración intracelular de Cd y la viabilidad celular por ensayos MTT. La distribución de vimentina y la morfología celular se observaron por microscopía de fluorescencia y la migración celular se evaluó por ensayos de cierre de herida. Nuestros resultados muestran que Cd induce la activación de FAK entre 5 a 30 minutos de exposición de manera dependiente de la concentración. Después de 4 semanas de exposición a Cd, se demostró la internalización celular del metal, se observaron cambios morfológicos y formación de fibras de estrés; disminución en los niveles de expresión de E-cadherina, aumento en la expresión de vimentina y mayor porcentaje de migración celular. En conjunto, estos resultados indican que Cd induce la activación de FAK como un evento temprano de la activación de EMT y que la exposición crónica a Cd promueve características de un fenotipo mesenquimal y migratorio, relacionado con la progresión del CaMa.

Palabras clave: Cadmio, exposición crónica, Transición epitelio-mesenquimal, Cáncer de mama.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most frequent neoplasia and leading cause of death in Mexican and worldwide women. Besides the well-known risk factors, the exposure to environmental hazards such as cadmium (Cd) is currently being investigated. Chronic Cd exposure is involved with BC incidence and poor prognosis. Cd is also an inductor of epithelial to mesenchymal transition (EMT). EMT is a process of transdifferentiation from an epithelial to a mesenchymal phenotype. During EMT occur changes in activity and expression of several proteins, such as FAK, vimentin and E-cadherin. EMT-related changes enable tumoral cells to migrate and invade. In this context, we aimed to evaluate the effects of chronic Cd exposure in the expression of EMT markers, in a model of non-tumoral epithelial breast cells. Western blot was performed to determine FAK activation and expression of vimentin and E-cadherin. Cd intracellular concentration was measured by atomic absorbance spectroscopy and cellular viability was determined by MTT assay. Cell morphology and vimentin distribution were evaluated by epifluorescence microscopy. Cell migration was determined by wound healing assays. Results showed that cadmium promotes FAK activation. After four weeks of Cd exposure we observed metal internalization and morphological changes were accompanied with stress fibers formation. A decreased E-cadherin levels and increased vimentin expression. A gain of cell migratory properties was observed. These data indicate that Cd exposure promotes early FAK activation and EMT-related changes after prolonged exposure. These features are a key step in BC progression.

Key Words: Cadmium, chronic exposure, Epithelial to Mesenchymal Transition, Breast cancer.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer de mama (CaMa) es el principal tipo de cáncer y causa de muerte por neoplasias en mujeres (Torre *et al.*, 2017). En México, en 2018 se reportaron 27, 283 casos nuevos, una mortalidad de 6, 884 pacientes y una prevalencia de 5 años del 31.4 % de la población afectada (*Mexico Source: Globocan 2018*). Factores como mutaciones en *BRCA1/2*, la terapia hormonal, la obesidad, el alcoholismo y el tabaquismo son considerados los principales factores de riesgo asociados con esta patología (Kamińska *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha demostrado que la exposición a contaminantes ambientales también representa un factor de riesgo relacionado con la incidencia y pronóstico desfavorable de esta enfermedad (Byrne *et al.*, 2013; Forman *et al.*, 2015; Siddique, Kubwabo and Harris, 2016).

El cadmio (Cd) es un metal pesado que se acumula en el ambiente como contaminante, su uso en procesos y productos industrializados incrementa cada año a nivel mundial, por lo que aumenta el riesgo humano de exposición a este metal (Nogawa, 2015; Mezynska and Brzóska, 2018). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasifica al Cd como un carcinógeno del grupo I, dado que participa en el inicio y promoción de diversos tipos de cáncer humano, entre ellos el cáncer de mama (Gallagher, Chen and Kovach, 2010; IARC, 2012; Jouybari *et al.*, 2018).

Los principales mecanismos carcinogénicos en respuesta a Cd se relacionan con la inducción de estrés oxidativo, inhibición de los sistemas de reparación del DNA, evasión de la apoptosis y con su actividad como metaloestrógeno (Joseph, 2009; Hartwig, 2010; Filipič, 2012). Este metal puede activar algunos receptores como el ER α (receptor de estrógenos alfa) (Brama *et al.*, 2007), GPR30 (Receptor acoplado a Proteínas G) (Yu, Filardo and Shaikh, 2010), y el EGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal) (Darbre, 2006; Wei, Song and Shaikh, 2015). La unión del Cd a estos receptores tiene como consecuencia el incremento en la transcripción de genes que regulan el crecimiento y la proliferación celular (Yu, Filardo and Shaikh, 2010; Byrne *et al.*, 2013; Lappano *et al.*, 2017).

La actividad del Cd como metaloestrógeno es uno de los aspectos que más se ha estudiado y relacionado con el CaMa (Silva *et al.*, 2012; Aquino *et al.*, 2013). Siewit y colaboradores, empleando las líneas celulares tumorales MCF7-7, T-47D y ZR-76-1, demostraron que Cd promueve la proliferación celular de manera dependiente de la transcripción de genes blanco del $E\alpha$ (Siewit *et al.*, 2010). Mientras que promueve el crecimiento a través del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) (Wei, Song and Shaikh, 2015). No obstante, actualmente se estudian mecanismos alternativos involucrados con la carcinogénesis mamaria, inducidos por la exposición a este metal.

La transición epitelio-mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés) es un programa de transdiferenciación celular que participa en diferentes etapas de la progresión tumoral (Brabletz *et al.*, 2018). Durante este proceso, las células epiteliales experimentan alteraciones en la expresión y/o actividad de algunos factores de transcripción (FT) que modulan el proceso, tales como Snail, Slug, Twist, ZEB y β -catenina (Goossens *et al.*, 2017; Olea-Flores, M. Zuñiga-Eulogio, *et al.*, 2019). La EMT también se caracteriza por cambios en la distribución, función y/o niveles de expresión de proteínas de adhesión celular como E-cadherina, claudina, ocludina, ZO-1 y N-cadherina; y componentes del citoesqueleto como vimentina (Zeisberg and Neilson, 2009; Pastushenko and Blanpain, 2019). Otros eventos observados durante este proceso son la hiperactivación de cinasas, como ERK1/2, FAK y Src; y la secreción y/o activación de hidrolasas de matriz extracelular (Frame *et al.*, 2010; Luo and Guan, 2010; Alfredo *et al.*, 2017; Olea-Flores, M. D. Zuñiga-Eulogio, *et al.*, 2019; Olea-Flores, M. Zuñiga-Eulogio, *et al.*, 2019). Estos cambios, dan lugar a disolución de las uniones epiteliales, migración celular, resistencia a anoikis, la invasión de células tumorales, quimioresistencia y evasión de la respuesta inmune (Talbot, Bhattacharya and Kuo, 2012; Wang *et al.*, 2016; Alfredo *et al.*, 2017; Baulida, 2017; Olea-Flores, M. Zuñiga-Eulogio, *et al.*, 2019).

En este contexto, se ha estudiado el efecto de la exposición a Cd como inductor de EMT mediante la medición de marcadores canónicos en diferentes líneas celulares derivadas de glándula mamaria. En la línea celular MCF7, se observó la degradación de E-Cadherina e incremento en la activación y localización

nuclear de β -Catenina en respuesta a la exposición crónica a Cd (Ponce, Louie and Sevigny, 2015). En células HCC1937, HCC38 y MDA-MB-231 expuestas durante 4 semanas a 3 μ M de Cd se describió que Snail regula la adquisición de características mesenquimales (Wei, Shan and Shaikh, 2018). Estas líneas celulares son modelos *in vitro* de los diferentes subtipos moleculares del CaMa y tienen un trasfondo genético relacionado con el tipo de tumor del cual derivan, por lo que algunos procesos celulares como proliferación, migración e invasión se encuentran desregulados (Dai *et al.*, 2017).

Para la evaluación de la transdiferenciación de un fenotipo epitelial a mesenquimal es adecuado el uso de un modelo de células epiteliales. La línea celular MCF10A es derivada de epitelio de glándula mamaria no tumoral, su crecimiento es dependiente de anclaje y tiene un perfil de expresión ER (-), PR (-) y HER2 (-) (Subik *et al.*, 2010). Previamente, en nuestro grupo de trabajo se evaluó el efecto de la exposición aguda a 5 y 10 μ M de Cd en la línea celular MCF10A, se observó una disminución en la expresión de E-cadherina y un aumento en los niveles de vimentina, y adquisición de morfología fibroblastoide e incremento en la capacidad migratoria e invasiva (Herrera-Vargas and Grande-Vicario, 2016; Orozco-Cristóbal, 2018; Roque-Luna and García-Astudillo, 2018). Estos eventos son regulados por la interacción del Cd con receptores extracelulares o pueden estar asociados con su internalización e interacción directa con proteínas y otras biomoléculas.

Los modelos *in vitro* de exposición aguda se realizan con dosis únicas por tiempos no superiores a 72 h, lo cual es poco representativo de la exposición ambiental no ocupacional. Además, los efectos asociados a carcinogénesis por exposición a Cd, se observan después de periodos de exposición prolongados, por lo que un protocolo de tratamiento crónico es una mejor representación de la exposición humana. En ese sentido, fue de nuestro interés evaluar el efecto de la exposición crónica a diferentes concentraciones de Cd sobre el establecimiento de EMT en células epiteliales mamarias no tumorales, como parte del entendimiento de la carcinogénesis mamaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Reactivos

La línea celular MCF10A (CRL-10317™) fue obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection). El medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Los anticuerpos anti E-cadherina H-100 (sc-7870), anti-vimentina V9 (sc-6260), anti-FAK C20 (sc-558) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos anti-ZIP8 (A10395) y anti-ZIP14 (A10413) de Abclonal Science Inc. (Woburn, MA). El anticuerpo específico anti-phospho FAK (Tyr397) (44-624G) y los anticeros secundarios anti-rabbit HRP (31-460) y anti-goat HRP (31-402) de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). La faloidina acoplada a TRITC de Cytoskeleton (Denver, CO). El anticuerpo secundario anti-mouse HRP (A9044) de Sigma-Aldrich (St Louis, MO). El anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a Alexa Fluor 488 se obtuvo de Invitrogen (Carlsbad, CA). El Fluoroshield/DAPI (F6057) y cloruro de cadmio (CdCl₂) a través de Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

Cultivo de células MCF10A

La línea celular MCF10A se cultivó en medio DMEM/F12 (1:1) suplementado con 20 ng/ml del factor de crecimiento epidérmico recombinante (EGF), 0.5 µg/ml de hidrocortisona, 10 µg/ml de insulina, 5 % de suero fetal bovino (FBS) y 1 % de antibióticos. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ y 95 % de oxígeno.

Protocolo de exposición a Cd (CdCl₂)

Exposición a tiempos cortos para evaluar la activación de FAK

Las células MCF10A se mantuvieron en cultivo en cajas Petri de 60 mm en medio DMEM/F12 suplementado. Para fines experimentales, al llegar los cultivos a una confluencia del 80–90 %, se removió el medio de cultivo y se realizaron lavados con PBS estéril. Las células fueron puestas en ausencia de EGF, hidrocortisona, insulina y FBS (DMEM/F12 basal) durante 4 h previo al tratamiento con Cd. La

evaluación se realizó mediante ensayos curso temporal, a intervalos de 5, 10, 15, 30 y 60 min, empleando diferentes concentraciones de CdCl₂ (0.5, 1.5, 2.5, 5 y 10 µM) en medio DMEM/F12 basal. El tratamiento se finalizó por remoción del medio.

Exposición crónica para evaluar marcadores de EMT

Las células MCF10A fueron cultivados durante 4 semanas (28 días) en cajas Petri de 60 mm en medio DMEM/F12 suplementado con EGF (20 ng/ml), hidrocortisona (0.5 µg/ml), insulina (10 µg/ml), FBS (5 %) y las diferentes concentraciones (0.5, 1.5, 2.5, 5 y 10 µM) de CdCl₂. Se emplearon cultivos sin Cd como control. El protocolo inició con cultivos en número de pase 2-3, el cambio de medio y tratamiento con Cd se realizó cada tercer día. Los cultivos con 80 % de confluencia celular se despegaron para realizar cultivos subsecuentes. Al finalizar las 4 semanas, los cultivos fueron cosechados y re-sembrados para las diferentes determinaciones.

Determinación de la concentración intracelular de Cd por medio de espectroscopia de absorción atómica

Después de 4 semanas de tratamiento con Cd, el análisis de la concentración intracelular de Cd se realizó mediante espectroscopia de absorción atómica (AAS) con un horno de grafito (GF-AAS) (Perkin Elmer, Aanalyst 800) y una lámpara de cátodo hueco para Cd como fuente. El método es similar al análisis de trazas de elementos descrito previamente (Gordon *et al.*, 2019; Vilchis-Nestor *et al.*, 2019), una masa conocida de muestra fue digerida usando HNO₃ concentrado (Cheng *et al.*, 2007; Paskavitz *et al.*, 2018). Para calcular las concentraciones de las absorbancias medidas, se realizó una calibración usando soluciones estándar con Cd grado analítico (1000 mg/L) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado usando agua ultra-pura (18 mΩ).

Análisis de la viabilidad celular

La viabilidad de los cultivos tratados durante 4 semanas con Cd fue determinada mediante el ensayo de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) (Meerloo, Kaspers and Cloos, 2011; Tolosa, Donato and Gómez-Lechón,

2015). Las células fueron sembradas en cajas de 96 pozos y tratadas durante 48 h con diferentes concentraciones de CdCl₂ en medio DMEM/F12 basal. Posteriormente se incubaron con MTT disuelto en medio libre de rojo de fenol durante 4 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Al finalizar se disolvieron los cristales de formazán con DMSO grado reactivo. Las lecturas se realizaron por triplicado a 590 nm en un lector de microplacas EPOCH 2 (BioTek ®). El porcentaje de viabilidad se obtuvo empleando la siguiente ecuación: $\left(\frac{x \text{ de las D.O. problema}}{x \text{ de las D.O. control}}\right) * (100)$, en donde x es la media aritmética.

Detección de la activación y los niveles de expresión de proteínas por western blot

Al finalizar el tratamiento con Cd, los cultivos se lavaron 3 veces con PBS 1X. Se realizó extracción de proteínas totales empleando una solución amortiguadora de radioinmunoprecipitación (RIPA) (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, glicerol 10%, Tritón X-100 1%, C₂₄H₃₉NaO₄ 1%, MgCl₂ 1.5 mM, SDS 0.1% y PMSF 1 mM). Las muestras fueron cuantificadas por el método de Bradford, se usaron 30 µg/ml para las determinaciones. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles al 10 %, y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA). Se bloqueó durante 2 h con 5% de leche libre de grasa. Los anticuerpos primarios se incubaron durante la noche a 4 °C en las siguientes diluciones: anti-phospho-FAK (1:1000), anti-FAK (1:1000), anti-E-cadherina (1:1000), anti-Vimentina (1:1000), anti-ZIP8/14 (1:1000) y anti-GAPDH (1:5000) o anti-actina (1:1000) como controles de carga. Los anticuerpos secundarios anti-mouse/rabbit acoplados a HRP (1:5000) se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia (Clarity Western ECL substrate de Bio-Rad, Berkeley, CA) en placas autoradiográficas (KODAK ®).

Morfología celular y distribución citoplasmática de vimentina por microscopía de epifluorescencia

Los cultivos de células MCF10A tratados con Cd durante 4 semanas fueron sembrados sobre cubreobjetos y tratadas con diferentes concentraciones de CdCl₂

disuelto en medio DMEM/F12 basal. Después de 48 h, las células se fijaron y permeabilizaron con una solución de PBS 1X/formaldehído 3.7 % /Tritón X-100 0.5 % y bloqueadas con albúmina de suero bovino (BSA) al 3 %. Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con anti-vimentina (1:200) y durante 30 minutos a 37 °C con el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a AlexaFluor 488. Para evaluar la morfología celular se usó faloidina rodaminada (1:500). Se añadió fluoroshield/DAPI para teñir los núcleos celulares. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX43 usando un lente de 40X para los polímeros de actina y 100X para vimentina.

Evaluación de la migración celular por ensayo de cierre de herida

Las células MCF10A previamente tratadas durante 28 días con Cd, se cosecharon, re-sembraron y cultivaron en medio DMEM suplementado con EGF, hidrocortisona, insulina, FBS y con diferentes concentraciones de Cd hasta alcanzar una confluencia de 100%. Los cultivos fueron puestos en medio DMEM/F12 basal durante 4 h. Se añadió 10 μ M de Ara C (Citosina β -D-Arabinofuranosido) durante 2 h para inhibir el crecimiento celular. Se realizó la ralladura en el centro del cultivo con una punta estéril de 0.5 - 10 μ l, las células desprendidas se lavaron con PBS 1X estéril. Las células fueron cultivadas en DMEM/F12 con 3 % de FBS sin tratamiento como grupo control y con CdCl₂ (0.5, 1.5, 2.5, 5 y 10 μ M) como grupo experimental. Se monitoreó el progreso de la migración celular de las diferentes condiciones, al tiempo inicial 0 y después de 48 h, usando el objetivo 4X de un microscopio invertido de campo claro NIKON Ts2FL.

Análisis de datos

Las imágenes obtenidas por autorradiografía del western blot, por microscopía de epifluorescencia y microscopía de campo claro, fueron procesadas con el software ImageJ versión 1.44p. Para el análisis estadístico se empleó el sistema de análisis de varianza de una vía (ANOVA), aplicando las pruebas *post hoc* de Dunnett's y Bonferroni. Los resultados fueron expresados con medias \pm SD, tomando

como referencia un valor estadísticamente significativo de $p < 0.05$ (software GraphPad Prism 5.03).

RESULTADOS

Cadmio induce la activación de la cinasa FAK en la línea celular MCF10A

El efecto del Cd sobre los niveles de activación de FAK se evaluó mediante ensayos curso temporal acoplados a dosis respuesta, empleando diferentes concentraciones de Cd a intervalos de 0, 5, 10, 15, 30 y 60 min. Los niveles de activación fueron determinados por western blot mediante la detección de la fosforilación del residuo de tirosina 397 (pY397). Los niveles de FAK total y α -tubulina o GAPDH, se utilizaron como control de carga.

Los resultados obtenidos muestran que a una concentración de 0.5 μ M, la activación de FAK ocurre entre 10 a 30 min de exposición con un nivel máximo de activación a los 30 min y niveles basales a 5 y 60 min (Figura 1 A y B). Empleando una concentración de 1.5 μ M, hay activación de FAK a los 5, 15 y 60 min de exposición y un nivel máximo a los 60 min. Además se observan niveles basales a los 10 y 30 min (Figura 1 A y C), mientras que a una concentración de 2.5 μ M se observa un pico máximo de activación a los 5 min y niveles basales desde los 10 a 60 min (Figura 1 A y D). El tratamiento con 5 μ M de Cd induce la activación de FAK a los 5, 15 y 30 min de exposición, con un pico máximo a los 5 min y niveles basales a los 10 y 60 min (Figura 1 A y E), con 10 μ M la activación ocurre entre los 5 y 15 min de exposición (Figura 1 A y F). Los resultados se grafican comparando cada condición respecto a la condición control de 0 min.

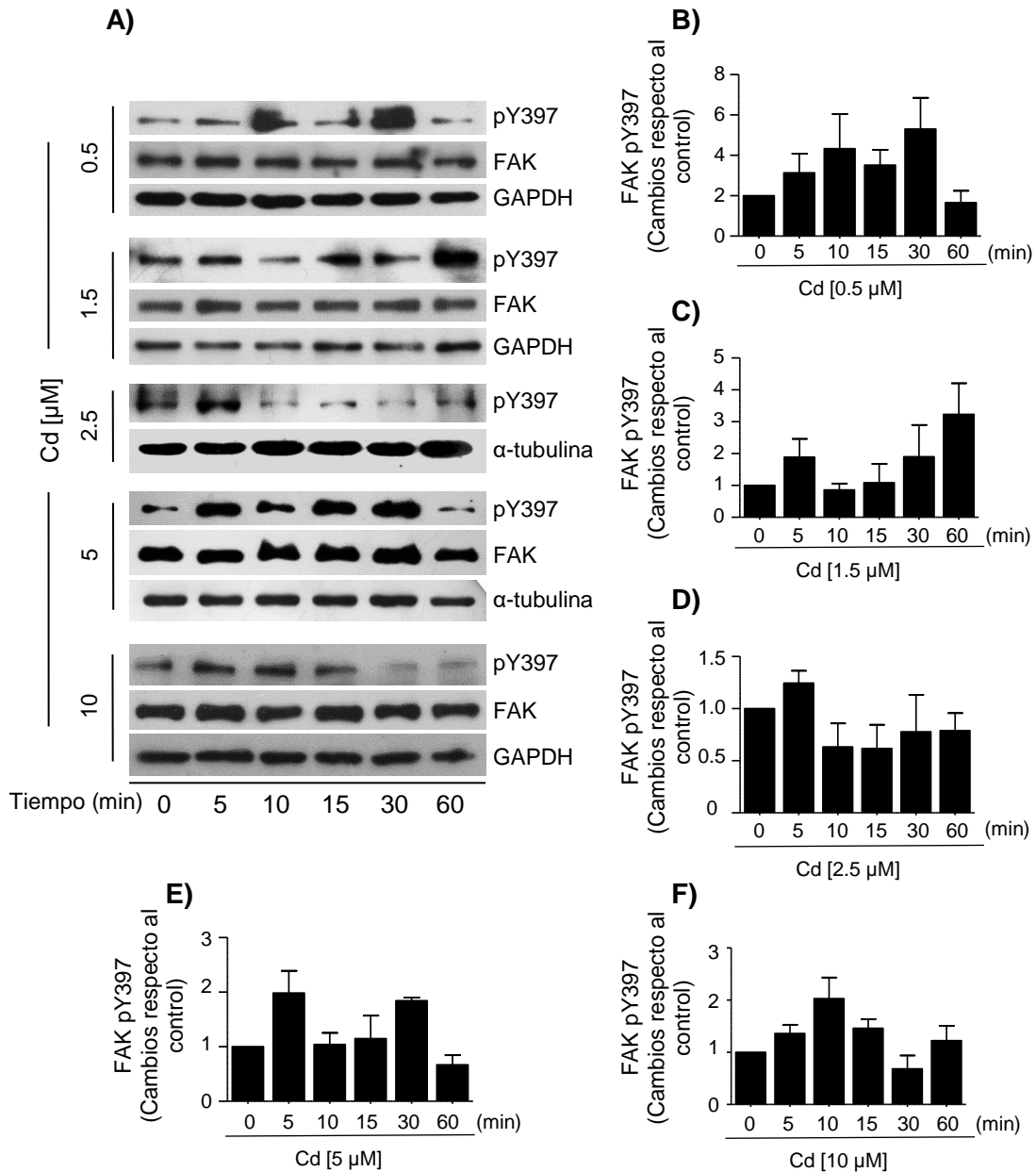


Figura 1. Activación de FAK en células MCF10A tratadas con diferentes concentraciones de cadmio. Los cultivos fueron tratados con 0, 0.5, 1.5, 2.5, 5 y 10 μM de Cd a diferentes tiempos. Las proteínas totales fueron analizadas mediante western blot. **A)** En la parte superior de cada panel se observan las bandas correspondientes a la forma activa de la cinasa FAK (pY397), posteriormente FAK total y α-tubulina o GAPDH como control de carga. Las gráficas (B – F) corresponden al análisis densitométrico, normalización y comparación hecha respecto al control por ANOVA de una vía (*Dunnett's post hoc test*). **B)** 0.5 μM Cd **C)** 1.5 μM Cd **D)** 2.5 μM Cd **E)** 5 μM y **F)** 10 μM Cd. Las imágenes son representativas de experimentos realizados de manera independiente.

Cadmio se internaliza en células MCF10A expuestas durante 4 semanas

Para evaluar la internalización de Cd después de un periodo crónico de exposición, los cultivos de células MCF10A fueron expuestos durante 4 semanas a diferentes concentraciones de Cd. Al terminar el tiempo de exposición, la concentración intracelular del metal se determinó por medio de espectroscopia de absorción atómica. La concentración intracelular de Cd se midió en relación al contenido total de proteínas. Los resultados muestran una mayor concentración intracelular del metal en función de la concentración usada en el tratamiento (Figura 2).

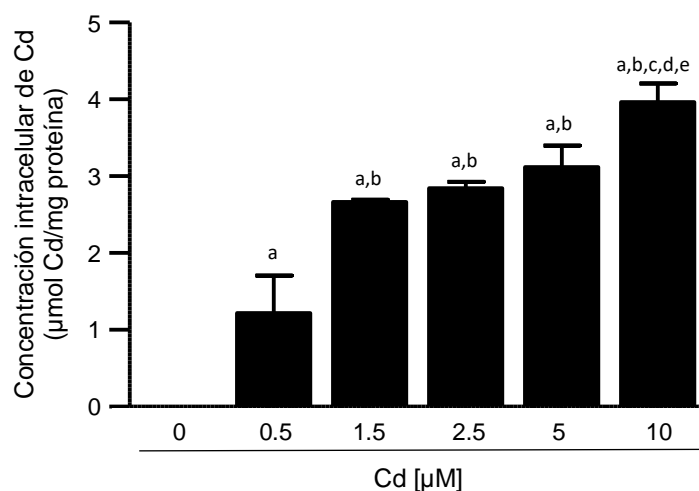


Figura 2. Concentración intracelular de cadmio en células MCF10A expuestas durante 4 semanas. Los cultivos de la línea celular MCF10A fueron tratados con diferentes concentraciones de Cd (μM) durante 4 semanas en medio DMEM/F12 suplementado. Se realizó espectroscopia de absorción atómica. La gráfica muestra las concentraciones de cadmio en μmol por cada mg de proteína y el análisis estadístico hecho mediante ANOVA de una vía empleando la prueba de comparación múltiple Bonferroni. **a:** $***p < 0.001$ vs 0, **b:** $***p < 0.001$ vs 0.5, **c:** $***p < 0.001$ vs 1.5, **d:** $**p < 0.01$ vs 2.5, **e:** $*p < 0.05$ vs 5. Los experimentos se realizaron por triplicado de manera independiente.

Efecto del tratamiento crónico con cadmio sobre la viabilidad celular

La viabilidad celular de los cultivos expuestos de manera crónica a Cd se midió por el ensayo de MTT. Los resultados indican que el tratamiento con las diferentes concentraciones de Cd no afecta la viabilidad celular. No obstante, en la comparación hecha respecto al control, se observa un incremento de la actividad metabólica celular a concentraciones de 5 y 10 μM (Figura 3).

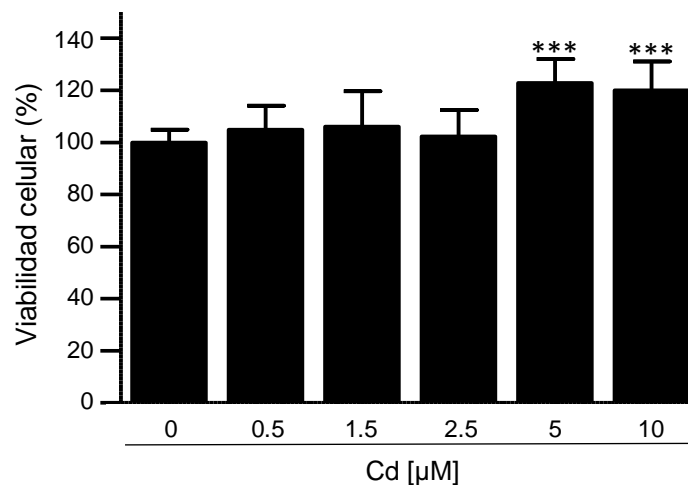


Figura 3. Viabilidad celular de células MCF10A expuestas a cadmio durante 4 semanas. Los cultivos de la línea celular MCF10A fueron tratados con diferentes concentraciones de Cd (μM) durante 4 semanas en medio DMEM/F12 suplementado. Se realizó el ensayo MTT. La gráfica muestra el porcentaje de viabilidad celular en comparación al grupo control no tratado con cadmio. La comparación y análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía (*Dunnnett's post hoc test*) *** $p < 0.001$. Las determinaciones se realizaron por triplicado de manera independiente.

La exposición crónica a cadmio promueve el cambio a una morfología mesenquimal y la formación de fibras de estrés en células MCF10A

Después de un periodo de exposición prolongada a Cd, se evaluaron cambios en la morfología celular con una tinción de faloidina rodaminada. Las células se cosecharon y sembraron sobre cubreobjetos, se fijaron y permeabilizaron. Se usó fluoroshield/DAPI para teñir los núcleos y faloidina rodaminada para observar los polímeros de actina del citoesqueleto.

En este estudio se observó pérdida de la morfología epitelial de las células MCF10A, disminución de la superficie de contacto entre células adyacentes y la formación de fibras de estrés en respuesta a la exposición a Cd, de manera dependiente de la concentración. A mayor concentración de este metal las células adquieren morfología fibroblastoide y aumenta el número de fibras de estrés, formadas por polímeros de actina de mayor densidad (Figura 4).

El tratamiento crónico con cadmio promueve la disminución de los niveles de E-cadherina en células MCF10A

Para determinar el efecto del tratamiento crónico con Cd sobre los niveles de E-cadherina, se realizó western blot. Al finalizar el tratamiento, las proteínas totales se separaron por SDS-PAGE y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos anti-E-cadherina y anti GAPDH como control de carga.

Los resultados muestran la disminución en la expresión de E-cadherina de manera dependiente de la concentración de Cd en las condiciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 μM . No obstante, se observaron niveles indicativos del restablecimiento de la expresión de E-cadherina a 2.5 μM Cd (Figura 5 A y B).

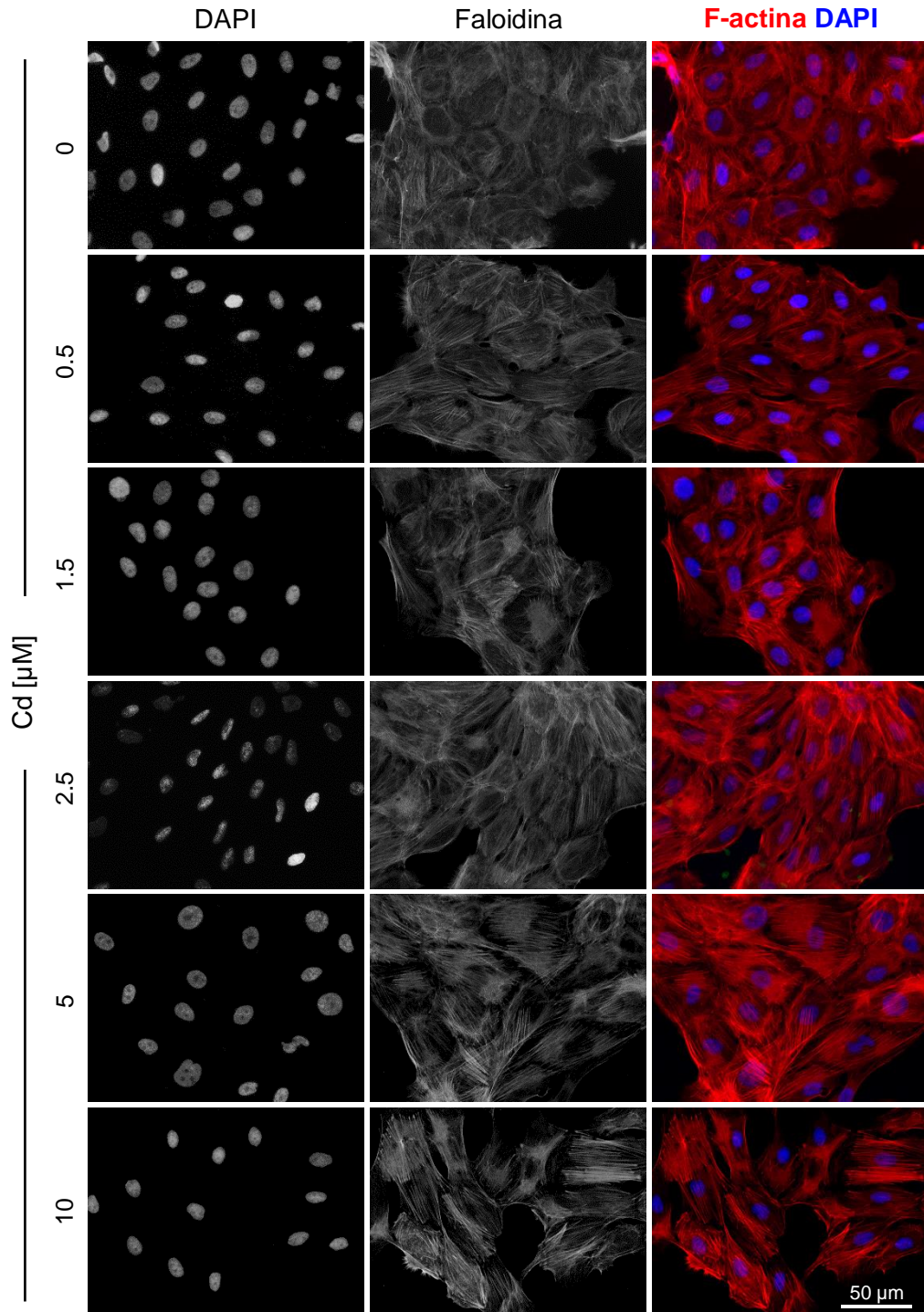


Figura 4. La exposición crónica a cadmio promueve la adquisición de morfología mesenquimal y la formación de fibras de estrés en células MCF10A. Tinción realizada a cultivos tratados con diferentes concentraciones de Cd (μM) durante 4 semanas. Las células fueron sembradas en cubreobjetos, fijadas y permeabilizadas. Se empleó faloidina rodaminada para teñir los filamentos de actina y fluoroshield/DAPI para teñir los núcleos. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 40X de un microscopio Olympus BX43 y procesadas con ImageJ 1.44p. Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente.

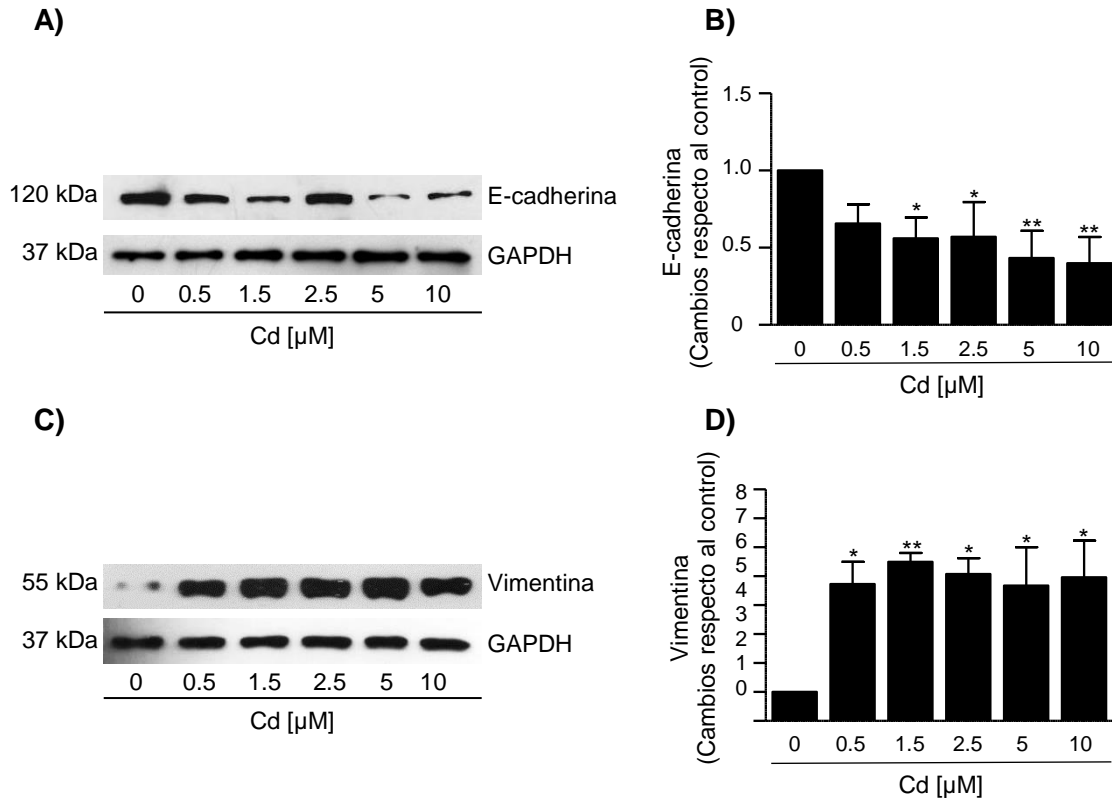


Figura 5. La exposición crónica a cadmio induce disminución en la expresión de E-cadherina y aumento en la expresión de vimentina en células MCF10A. Se realizó western blot a cultivos tratados con diferentes concentraciones de Cd (μM) durante 4 semanas. Las proteínas totales fueron separadas por SDS-PAGE y trasferidas a una membrana. Se incubó con los anticuerpos anti-E-cadherina y anti-vimentina, para los marcadores de EMT y anti-GAPDH como control de carga. En los paneles izquierdos se muestran las bandas correspondientes a E-cadherina (120 kDa) (**A**) y vimentina (55 kDa) (**C**), en la parte inferior GAPDH como control de carga (37 kDa). En el panel lateral derecho se muestran las gráficas correspondientes al análisis densitométrico, normalización y comparación hecha respecto al control mediante ANOVA de una vía para E-cadherina (**B**) y vimentina (**D**). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. Las imágenes son representativas de experimentos realizados de manera independiente.

El tratamiento crónico con cadmio promueve el incremento en los niveles de expresión de vimentina en células MCF10A

Se evaluó el efecto del tratamiento crónico con Cd sobre los niveles de expresión y localización subcelular de vimentina. Los extractos de proteínas totales se usaron para el análisis por western blot y se sembraron las células sobre cubreobjetos para la evaluación por inmunofluorescencia.

En los ensayos de western blot (Figura 5 A y C) e inmunofluorescencia (Figura 6) se observó incremento en la expresión de vimentina de manera dependiente de la concentración de Cd. A mayor concentración se observó una distribución longitudinal y filamentosa de vimentina en el citoplasma, y una morfología celular alargada, a diferencia del grupo control, en el cual la expresión es menor (Figura 6).

La exposición crónica a cadmio promueve la migración en la línea celular MCF10A

Para determinar el efecto del tratamiento crónico con Cd sobre la migración celular se realizaron ensayos de cierre de herida. Los cultivos confluentes fueron deprivados de suero y suplementos, después fueron tratados con un inhibidor de proliferación. Los ensayos de migración se realizaron en medio DMEM/F12 on 3% de FBS y con las diferentes concentraciones de Cd. Se realizó una ralladura en el centro del cultivo y se registró el porcentaje de cierre después de 48 h.

Los resultados muestran que el tratamiento crónico con Cd incrementa la migración celular de manera dependiente de la dosis. Adicionalmente, se observó que las células se mueven colectivamente en el frente de migración (Figura 7).

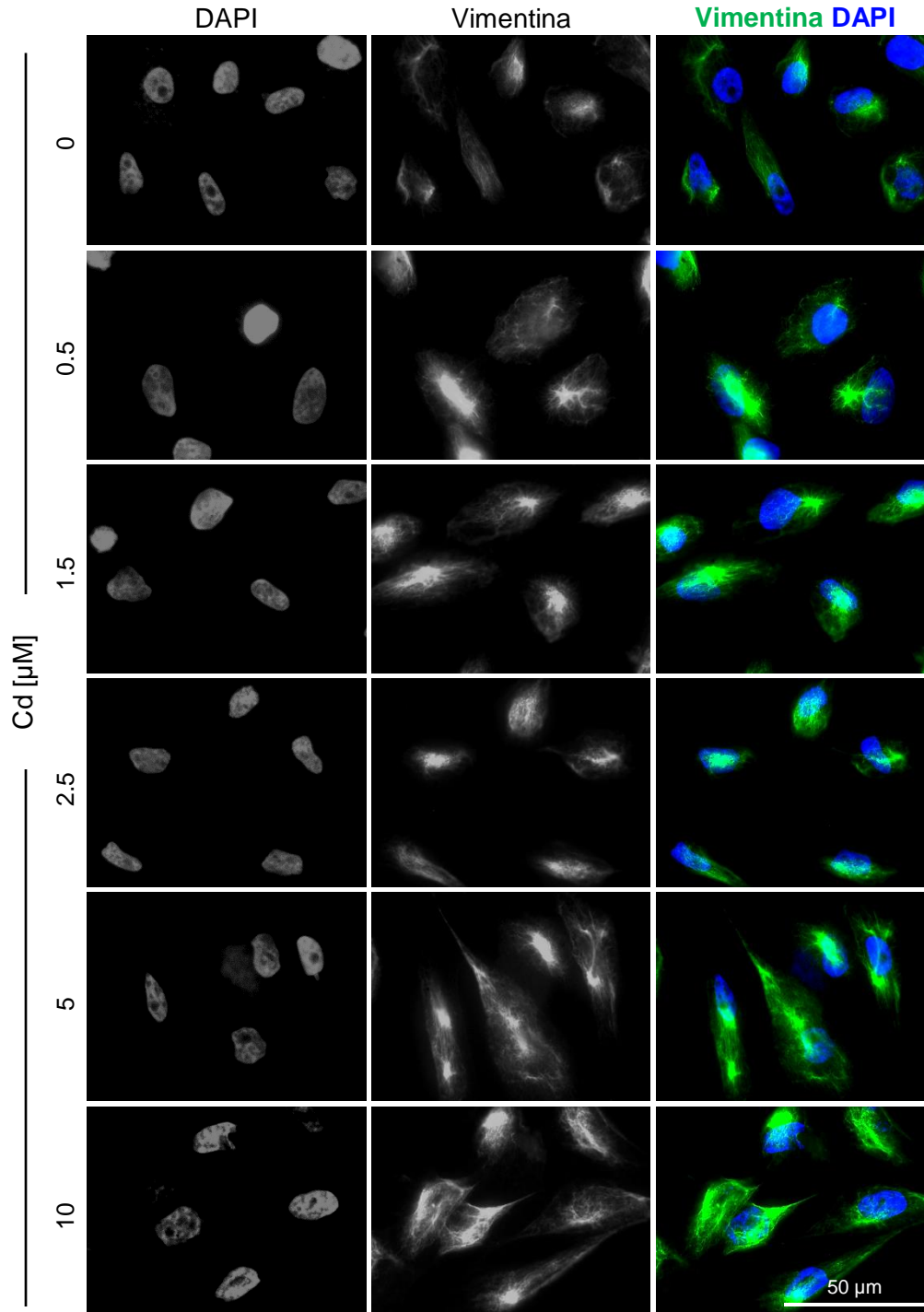


Figura 6. La exposición crónica a cadmio induce incremento en la expresión de vimentina en células MCF10A. Inmunofluorescencia realizada a cultivos tratados con diferentes concentraciones de Cd (μM) durante 4 semanas. Las células fueron sembradas en cubreobjetos, fijadas y permeabilizadas. Se emplearon los anticuerpos anti-vimentina y anti-mouse Alexa 488 para vimentina, y fluoroshield/DAPI para teñir los núcleos. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 100X de un microscopio Olympus BX43 y procesadas con ImageJ 1.44p. Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente.

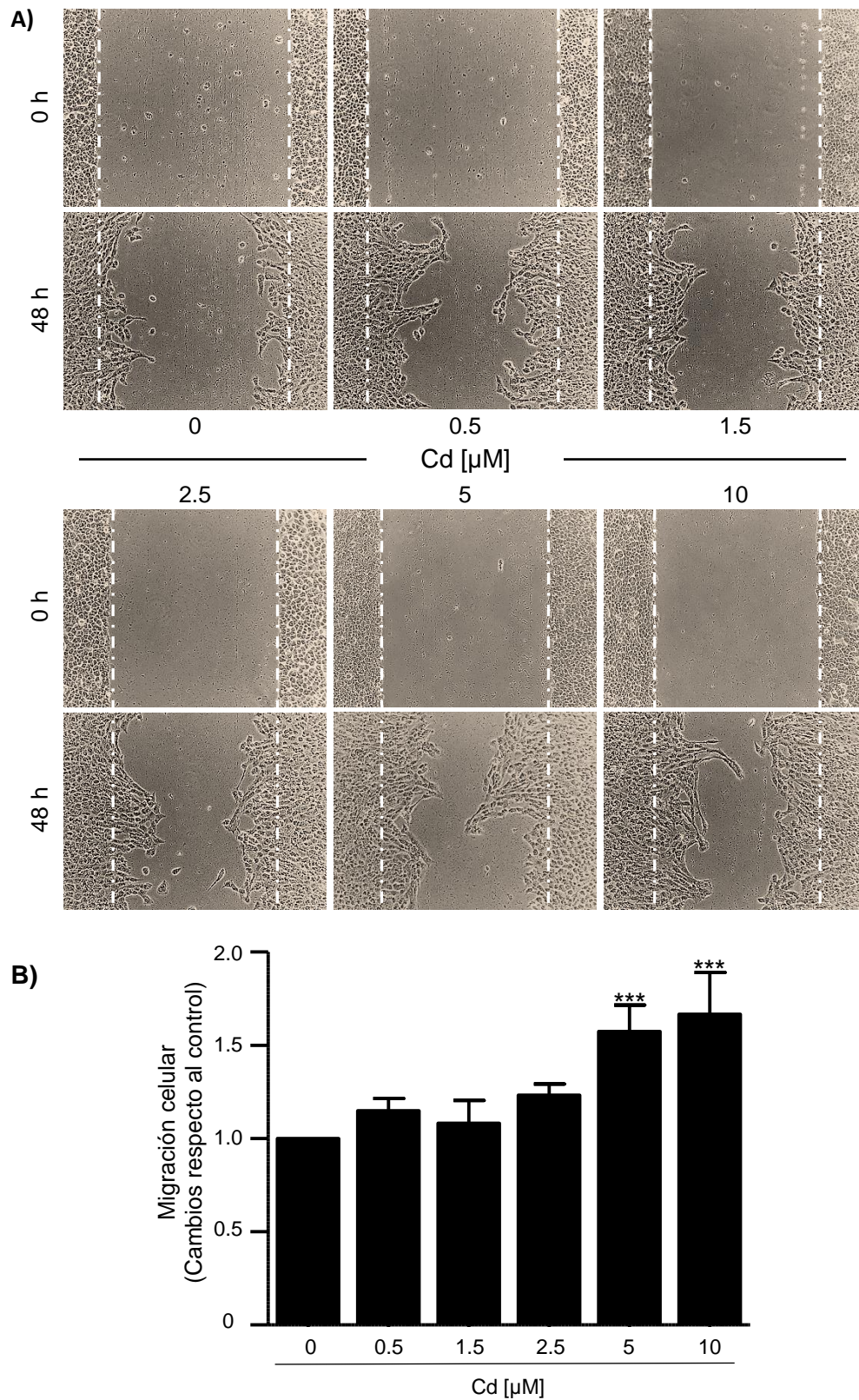


Figura 7. Efecto del tratamiento crónico con cadmio en la migración celular. Después de 4 semanas de tratamiento con Cd, las células se cultivaron hasta una confluencia de 100%. Se realizó una ralladura en el centro del cultivo y se monitoreó su progreso después de 48 h. Las imágenes son representativas de 3 experimentos realizados de manera independiente.

DISCUSIÓN

El CaMa es una enfermedad de origen multifactorial asociada con factores de riesgo genéticos, de estilo de vida y con la exposición a contaminantes ambientales, como el Cd (Forman *et al.*, 2015; Siddique, Kubwabo and Harris, 2016; Sun *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2018). Diversos estudios han demostrado que la exposición a Cd está relacionada con la incidencia, progresión y mal pronóstico del CaMa (Gallagher, Chen and Kovach, 2010). A nivel de glándula mamaria, el Cd puede actuar como metaloestrógeno y desregular la transcripción de genes involucrados en el crecimiento, proliferación y apoptosis (Darbre, 2006; Silva *et al.*, 2012; Byrne *et al.*, 2013). Este metal también puede inducir estrés oxidativo, favorecer la inhibición de los sistemas de reparación del DNA y promover la EMT (Hartwig, 2010; Filipič, 2012; Herrera-Vargas and Grande-Vicario, 2016; Wei, Shan and Shaikh, 2018).

La EMT es un proceso secuencial y reversible en el cual los cambios que experimentan las células son regulados por múltiples vías de señalización dependientes de la activación de cinasas específicas y modificación de la expresión génica (Benbrahim-Tallaa *et al.*, 2009; Brabletz *et al.*, 2018; Wei, Shan and Shaikh, 2018; Olea-Flores, M. Zuñiga-Eulogio, *et al.*, 2019). Estos cambios pueden ocurrir de manera simultánea o por etapas y su duración depende de la finalidad del evento. La activación de FAK es uno de los acontecimientos iniciales de la EMT debido a que esta cinasa participa en la formación de adhesiones focales y la regulación de la dinámica del citoesqueleto que tienen como consecuencia la migración celular (Schlaepfer and Mitra, 2004; Luo and Guan, 2010; Olea-Flores, M. Zuñiga-Eulogio, *et al.*, 2019)

En ese contexto, nuestra evaluación inicial fue determinar el efecto de Cd sobre la activación de FAK, empleando diferentes concentraciones a intervalos entre 5 hasta 60 min, se observó que Cd induce la activación de FAK de manera dependiente del tiempo y dosis de exposición. Estudios previos demuestran que el Cd puede activar diferentes cinasas, como CaMK-II en células mesenquiales (Choong, 2013; Choong, Liu and Templeton, 2013); y de manera más específica, Src, FAK, Akt y ERK1/2 en líneas celulares de cáncer

de mama (Brama *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2015; Song, Wei and Shaikh, 2015; Wei, Song and Shaikh, 2015; Wei and Shaikh, 2017).

La activación clásica de FAK involucra la señalización mediada por integrinas, receptores de factores de crecimiento y citocinas (Frame *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015). Se ha descrito que FAK puede activarse por medio de la integrina $\beta 1$ en respuesta a Cd en células de cáncer de mama triple negativo (Wei and Shaikh, 2017). En nuestro modelo de estudio, las células MCF10A tampoco expresan ER, PR o HER2 (Subik *et al.*, 2010) lo cual sugiere que el mecanismo de activación podría ser similar.

De manera interesante, nuestros resultados mostraron que el tiempo en que se obtienen los niveles máximos de activación de FAK varía en relación a la concentración de Cd. Con una concentración de 0.5 μM ocurren niveles máximos de activación a 10 y 30 min, usando 1.5 μM el pico máximo ocurre a 60 min, mientras que con 2.5 μM , 5 μM y 10 μM a 5 min. Esto podría estar relacionado con el umbral de concentración de Cd requerido para unirse al sitio de adhesión dependiente de iones metálicos, presente en las integrinas (Xiong *et al.*, 2003; Zhang and Chen, 2012). La unión de un ion a este sitio propicia cambios conformacionales que dan lugar a la activación de la integrina y posterior señalización intracelular que conduce a la activación de proteínas como paxilina, talina, Src y FAK (Zhang and Chen, 2012; Moreno-Layseca and Streuli, 2014). El resultado obtenido en nuestro estudio indica que la exposición a Cd induce la activación FAK, como un evento temprano durante la EMT inducida en células MCF10A, que será importante para consecuencias funcionales como la remodelación del citoesqueleto y la migración celular.

Previamente nuestro grupo de trabajo, usando el mismo modelo de células epiteliales mamarias, describió el efecto de la exposición aguda a Cd durante 24 a 48 h, los cambios observados indican la inducción de EMT (Herrera-Vargas and Grande-Vicario, 2016; Roque-Luna and García-Astudillo, 2018), efecto relacionado con la activación de proteínas como FAK y Src (Orozco-Cristóbal, 2018).

El resultado de la exposición a Cd y la duración de los efectos dependen de factores como el tipo celular, la dosis y el tiempo de exposición. Las consecuencias

de la exposición aguda se relacionan principalmente con la interacción del metal con proteínas membranales, como receptores y moléculas de adhesión. No obstante, la exposición por periodos prolongados a Cd, aún en respuesta a concentraciones bajas, puede tener efectos exacerbados de la exposición aguda, debido a la frecuencia del estímulo, la unión directa con biomoléculas y acumulación intracelular de este metal. Dada nuestra observación inicial sobre la activación de FAK en respuesta a Cd, y bajo la premisa de que la carcinogénesis por este metal ocurre después de periodos prolongados de exposición, en el presente trabajo, evaluamos el efecto del tratamiento crónico con Cd sobre marcadores de EMT.

Además del tiempo de exposición, los efectos crónicos del Cd se relacionan con la bioacumulación. Para que ocurra la acumulación intracelular, el primer paso es el ingreso de Cd a través de la membrana plasmática; por lo que decidimos verificar si en nuestro modelo celular ocurría la internalización del metal. Por medio de espectroscopia de absorción atómica determinamos las concentraciones intracelulares del metal después de 4 semanas de exposición a diferentes concentraciones de Cd. Se observó una relación directa entre la concentración del tratamiento y los niveles intracelulares del metal, este resultado se atribuye a las propiedades químicas del Cd, el cual es un catión divalente que puede movilizarse a través de canales de calcio, transportadores de metales divalentes (DMT1, ZIP8 y ZIP14) y también por medio de acuaporinas unido a proteínas solubles como el GSH (Fujishiro *et al.*, 2012; Sarkar, Ravindran and Krishnamurthy, 2013; Nogawa, 2015). Estos transportadores se expresan en la mayoría de linajes celulares, no obstante, se verificó la expresión de ZIP8 y ZIP14 en nuestro modelo celular (Figura C1), este resultado sugiere que la internalización de Cd puede ocurrir a través de estos transportadores.

Sin embargo, debido al tipo de determinación realizada, en la cual los niveles de Cd se midieron únicamente al finalizar las 4 semanas de tratamiento, no podemos afirmar que el metal se acumule en las células MCF10A, no obstante, podemos sugerir que esto ocurre considerando que el Cd es un elemento químico no metabolizable, que se une con gran afinidad a lípidos y proteínas ricas en grupos tiol, como metalotioneínas y metaloenzimas, por lo cual su excreción es mínima y en

consecuencia se acumula en las células (Martínez Flores *et al.*, 2013; Sigel, Sigel and Sigel, 2013; Nogawa, 2015).

Una vez confirmada la internalización del Cd en nuestro modelo celular y en el supuesto de su acumulación intracelular, evaluamos el porcentaje de viabilidad celular para descartar un posible efecto citotóxico como consecuencia de la exposición prolongada y bioacumulación del metal. Los resultados indican que el tratamiento crónico con Cd no tiene efecto negativo sobre la viabilidad celular. También se observó que los porcentajes de viabilidad obtenidos a concentraciones de 5 μM y 10 μM son mayores en comparación con el grupo control, esto puede ser consecuencia de un mecanismo adaptativo o de un incremento en el número de células. Se ha descrito en diferentes modelos celulares que la exposición aguda a Cd incrementa el daño oxidativo y la citotoxicidad, no obstante, estos efectos se revierten después periodos de exposición crónica (Liu, Qu and Kadiiska, 2009); este efecto se atribuye al mejoramiento de los mecanismos antioxidantes. También, se ha descrito que la exposición prolongada a Cd induce cambios en la señalización y expresión génica que tienen como consecuencia la proliferación descontrolada de las células (Joseph, 2009; Filipič, 2012; Sarkar, Ravindran and Krishnamurthy, 2013). Como se ha observado previamente en modelos de células transformadas resistentes al estrés oxidativo, con resistencia a la apoptosis y con una tasa elevada de proliferación (Achanzar, Webber and Waalkes, 2002; Qu *et al.*, 2006; Somji *et al.*, 2006).

Los cambios en la señalización celular y la expresión génica inducidos por la exposición a Cd también tienen como consecuencia la activación de programas como la EMT. Durante la EMT, ocurre un cambio de una morfología epitelial a una de tipo fibroblastoide, en este sentido realizamos nuestra siguiente evaluación. Por medio de la tinción del citoesqueleto de actina, observamos cambios en la morfología celular, y la formación de fibras de estrés en respuesta al tratamiento crónico con Cd. Los cultivos no expuestos a Cd y los expuestos a concentraciones bajas, presentaron una morfología cuboide, favorecida por una superficie mayor de contacto célula-célula, esto contribuye a la organización epitelial. Mientras que, conforme incrementó la concentración de Cd, las células se observaron con

morfología más alargada, lo cual ocasionó la disminución del contacto entre células adyacentes y por consecuencia pérdida de la polaridad apico-basolateral. Las fibras de estrés observadas por la exposición a Cd, están conformadas por polímeros densos de F-actina y dispuestas a lo largo de los extremos polares de la célula; son indicativas de la remodelación del citoesqueleto y necesarias para la fuerza de tracción mecánica y direccionamiento de las células durante la migración (Zeisberg and Neilson, 2009).

De manera conjunta a los cambios en el citoesqueleto, durante la migración celular, es necesaria la modificación en la distribución, función y/o niveles de expresión de proteínas como E-cadherina y vimentina, que son consideradas marcadores canónicos de EMT (Zeisberg and Neilson, 2009; Chernouvanenko, Minin and Minin, 2013). Se realizó la determinación por western blot para ambas proteínas y por inmunofluorescencia para vimentina.

Además, se observó disminución en los niveles de expresión de la proteína epitelial E-cadherina, la cual a las concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 μM tiene el nivel más bajo de expresión, en comparación con las células no expuestas a cadmio. Se ha descrito previamente que el tratamiento con Cd en células MCF7 promueve la degradación de E-cadherina (Ponce, Louie and Sevigny, 2015). En nuestro modelo experimental la disminución inicial a concentraciones de 0.5 y 1.5 μM podría estar asociada con disolución de las uniones adherentes dependientes de Ca^{2+} , provocada por la interacción de Cd con el dominio extracelular de E-cadherina, la cual se desensambla del complejo adherente que forma en la membrana con β -catenina y en consecuencia puede degradarse (Pearson and Prozialeck, 2001; Ponce, Louie and Sevigny, 2015). Mientras que a 2.5 μM la célula posiblemente experimenta el restablecimiento en los niveles de E-cadherina como un mecanismo compensatorio. No obstante, es posible que a 5 y 10 μM de Cd la disolución de las uniones adherentes ocurra de manera simultánea a cambios a nivel transcripcional por reguladores negativos de E-cadherina, como β -catenina que incrementa su localización nuclear y actividad transcripcional, o Snail y Slug, que aumentan su expresión en respuesta a Cd (Pearson and Prozialeck, 2001; Ponce, Louie and Sevigny, 2015; Fujiki *et al.*, 2017; Wei and Shaikh, 2017; Wei, Shan and Shaikh,

2018). Sin embargo, se requieren de estudios adicionales para comprobar esta hipótesis.

En relación a la expresión de vimentina, hubo un aumento evidente por la exposición prolongada a Cd. A nivel subcelular, se observó en forma de filamentos dispuestos longitudinalmente de un extremo polar a otro de las células, esta distribución es indicativa de células en migración (Chernoivanenko, Minin and Minin, 2013). Estos eventos podrían ser promovidos por los FT β -catenina, Snail, Slug y otros como Notch1 y Twist que se ha observado, juegan un papel importante en los cambios de fenotipo mesenquimal inducidos por Cd en otros modelos celulares (Chakraborty *et al.*, 2010; Luevano and Damodaran, 2014; Ponce, Louie and Sevigny, 2015; Fujiki *et al.*, 2017; Wei, Shan and Shaikh, 2018).

La activación de FAK como determinación inicial fue una directriz del tipo de cambios que puede promover este metal, esta cinasa regula eventos de supervivencia celular, proliferación y migración, por lo que una vez establecido que Cd puede internalizarse en células MCF10A y descartar los efectos citotóxicos del mismo, se procedió a evaluar otras características importantes para la migración. Se observaron cambios morfológicos hacia un fenotipo fibroblastoide, además de la formación de fibras de estrés y mayor expresión de vimentina. También se observó disminución en la expresión de E-cadherina y menor contacto célula-célula, y en consecuencia pérdida de la organización epitelial. Con base en los resultados de las diferentes determinaciones que llevamos a cabo, decidimos evaluar la capacidad de migración celular. La migración celular se observó incrementada como consecuencia funcional de la exposición crónica a Cd. De manera interesante, se observó en el frente migratorio que las células avanzan de manera colectiva, este efecto probablemente está relacionada con la co-expresión de vimentina y E-cadherina, que no pierde del todo su expresión, y favorecida por la activación de vías de señalización dependientes de FAK.

CONCLUSIONES

La exposición a cadmio induce la activación de FAK en células epiteliales mamarias no tumorales, como un evento temprano de la EMT. Se observó que la activación de FAK ocurre a intervalos entre 5 a 30 minutos de manera dependiente de la dosis. Consecuentemente, como modelo de exposición crónica, tratamos los cultivos durante 4 semanas con diferentes concentraciones de Cd. Nuestros resultados muestran que Cd se internaliza en las células y la concentración intracelular es mayor en función del incremento en la dosis. Se demostró que no existe efecto citotóxico del tratamiento prolongado y que a concentraciones de 5 y 10 μM hay incremento de la actividad metabólica celular. Se observaron cambios morfológicos hacia un fenotipo mesenquimal y formación de fibras de estrés de manera conjunta a la disminución en los niveles de expresión de E-cadherina e incremento en la expresión de vimentina. Estos cambios están relacionados con el incremento observado en la migración celular. En resumen, la exposición prolongada a Cd favorece el establecimiento de EMT, como característica favorable para la progresión de CaMa.

REFERENCIAS

- Achanzar, W. E., Webber, M. M. and Waalkes, M. P. (2002) 'Altered apoptotic gene expression and acquired apoptotic resistance in cadmium-transformed human prostate epithelial cells.', *The Prostate*, 52(3), pp. 236–44. doi: 10.1002/pros.10106.
- Alfredo, V. D. *et al.* (2017) 'Leptin induces partial epithelial-mesenchymal transition in a FAK-ERK dependent pathway in MCF10A mammary non-tumorigenic cells', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(10), pp. 10334–10342.
- Ali, I. *et al.* (2015) 'Cadmium at nanomolar concentrations activates Raf-MEK-ERK1/2 MAPKs signaling via EGFR in human cancer cell lines', *Chemico-Biological Interactions*. Elsevier Ireland Ltd, 231, pp. 44–52. doi: 10.1016/j.cbi.2015.02.014.
- Aquino, N. B. *et al.* (2013) 'Breast Cancer : Metalloestrogens or Not ?', *Journal Environ Sci Health*, 30(3), pp. 189–224. doi: 10.1080/10590501.2012.705159.Role.
- Baulida, J. (2017) 'Epithelial-to-mesenchymal transition transcription factors in cancer-associated fibroblasts', *Molecular Oncology*, 11(7), pp. 847–859. doi: 10.1002/1878-0261.12080.
- Benbrahim-Tallaa, L. *et al.* (2009) 'Cadmium malignantly transforms normal human breast epithelial cells into a basal-like phenotype', *Environmental Health Perspectives*, 117(12), pp. 1847–1852. doi: 10.1289/ehp.0900999.
- Brabletz, T. *et al.* (2018) 'EMT in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 18(2), pp. 128–134. doi: 10.1038/nrc.2017.118.
- Brama, M. *et al.* (2007) 'Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ER α -dependent mechanism', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 264(1–2), pp. 102–108. doi: 10.1016/j.mce.2006.10.013.
- Byrne, C. *et al.* (2013) 'Metals and Breast Cancer NIH Public Access', *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 18(1), pp. 63–73. doi: 10.1007/s10911-013-9273-9.
- Chakraborty, P. K. *et al.* (2010) 'Chronic cadmium exposure induces transcriptional activation of the Wnt pathway and upregulation of epithelial-to-mesenchymal transition markers in mouse kidney', *Toxicology Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 198(1), pp. 69–76. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.05.007.
- Cheng, L. *et al.* (2007) 'Mutation in nicotianamine aminotransferase stimulated the Fe(II) acquisition system and led to iron accumulation in rice', *Plant Physiology*, 145(4), pp. 1647–1657. doi: 10.1104/pp.107.107912.
- Chernoivanenko, I. S., Minin, A. A. and Minin, A. A. (2013) '[Role of vimentin in cell migration].', *Ontogenez*, 44(3), pp. 186–202. doi: 10.7868/S0475145013030026.
- Choong, G., Liu, Y. and Templeton, D. M. (2013) 'Cadmium affects focal adhesion kinase (FAK) in mesangial cells: Involvement of CaMK-II and the actin cytoskeleton', *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(8), pp. 1832–1842. doi: 10.1002/jcb.24529.
- Choong, G. M. Y. (2013) 'Effects of Cadmium on Actin Glutathionylation and Focal adhesions', pp. 1–145.
- Dai, X. *et al.* (2017) 'Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping', *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher, pp. 3131–3141. doi: 10.7150/jca.18457.
- Darbre, P. D. (2006) 'Metalloestrogens: An emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast', *Journal of Applied Toxicology*, 26(3), pp. 191–197. doi: 10.1002/jat.1135.

- Feng, Y. *et al.* (2018) 'Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis', *Genes and Diseases*. Elsevier Ltd, 5(2), pp. 77–106. doi: 10.1016/j.gendis.2018.05.001.
- Filipič, M. (2012) 'Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Mechanisms of cadmium induced genomic instability', *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, pp. 69–77. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.09.002.
- Forman, M. R. *et al.* (2015) 'Environmental exposures, breast development and cancer risk: Through the looking glass of breast cancer prevention', *Reproductive Toxicology*. Elsevier Inc., 54, pp. 6–10. doi: 10.1016/j.reprotox.2014.10.019.
- Frame, M. C. *et al.* (2010) 'The FERM domain: Organizing the structure and function of FAK', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 11(11), pp. 802–814. doi: 10.1038/nrm2996.
- Fujiki, K. *et al.* (2017) 'Involvement of Notch1 signaling in malignant progression of A549 cells subjected to prolonged cadmium exposure', *Journal of Biological Chemistry*, 292(19), pp. 7942–7953. doi: 10.1074/jbc.M116.759134.
- Fujishiro, H. *et al.* (2012) 'Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1 in transport of cadmium and manganese in mouse kidney proximal tubule cells', *Metallomics*, 4(7), pp. 700–708. doi: 10.1039/c2mt20024d.
- Gallagher, C. M., Chen, J. J. and Kovach, J. S. (2010) 'Environmental cadmium and breast cancer risk', *Aging*, 2(11), pp. 804–814. doi: 10.18632/aging.100226.
- Goossens, S. *et al.* (2017) 'EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET', *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier, 1868(2), pp. 584–591. doi: 10.1016/j.bbcan.2017.06.006.
- Gordon, S. J. V. *et al.* (2019) 'Atomic Absorbance Spectroscopy to Measure Intracellular Zinc Pools in Mammalian Cells', *Journal of visualized experiments: JoVE*, (147), pp. 1–11. doi: 10.3791/59519.
- Hartwig, A. (2010) 'Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: Recent insights', *BioMetals*, 23(5), pp. 951–960. doi: 10.1007/s10534-010-9330-4.
- Herrera-Vargas, A. K. and Grande-Vicario, L. G. (2016) *Efecto del Cadmio sobre marcadores de Transición Epitelio-Mesenquimal en Células Epiteliales Mamarias MCF10A*. Universidad Autónoma de Guerrero.
- IARC (2012) 'IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 100c: Cadmium and cadmium compounds', *IARC Monographs*, 1993, pp. 121–145. Available at: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-8.pdf>.
- Joseph, P. (2009) 'Mechanisms of cadmium carcinogenesis', *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier B.V., 238(3), pp. 272–279. doi: 10.1016/j.taap.2009.01.011.
- Jouybari, L. *et al.* (2018) 'Toxic elements as biomarkers for breast cancer: A meta-analysis study', *Cancer Management and Research*, 10, pp. 69–79. doi: 10.2147/CMAR.S151324.
- Kamińska, M. *et al.* (2015) 'Breast cancer risk factors', *Prz Menopauzalny*, 14(3), pp. 196–202. doi: 10.5114/pm.2015.54346.
- Lappano, R. *et al.* (2017) 'Recent advances on the stimulatory effects of metals in breast cancer', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 457, pp. 49–56. doi: 10.1016/j.mce.2016.10.017.
- Lee, B. Y. *et al.* (2015) 'FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics', *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc., 146, pp. 132–149. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.10.001 Associateeditor: B. Teicher.

Liu, J., Qu, W. and Kadiiska, M. B. (2009) 'Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis', *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier B.V., 238(3), pp. 209–214. doi: 10.1016/j.taap.2009.01.029.

Luevano, J. and Damodaran, C. (2014) 'A review of molecular events of cadmium-induced carcinogenesis', *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 33(3), pp. 183–194. doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2014011075.

Luo, M. and Guan, J. L. (2010) 'Focal adhesion kinase: A prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 289(2), pp. 127–139. doi: 10.1016/j.canlet.2009.07.005.

Martínez Flores, K. *et al.* (2013) 'Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular', *Acta toxicológica argentina*, 21(1), pp. 33–49.

Meerlo, J. Van, Kaspers, G. J. L. and Cloos, J. (2011) 'Cancer Cell Culture: Cell sensitivity assays: The MTT assay', 731, pp. 237–245. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5.

Mexico Source: Globocan 2018 (no date).

Mezynska, M. and Brzóska, M. M. (2018) 'Environmental exposure to cadmium—a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies', *Environmental Science and Pollution Research*. Environmental Science and Pollution Research, 25(4), pp. 3211–3232. doi: 10.1007/s11356-017-0827-z.

Moreno-Layseca, P. and Streuli, C. H. (2014) 'Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression', *Matrix Biology*. The Authors, 34, pp. 144–153. doi: 10.1016/j.matbio.2013.10.011.

Nogawa, K. (2015) *Chapter 32 – Cadmium*. Fourth Edi, *Handbook on the Toxicology of Metals*. Fourth Edi. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-444-59453-2.00032-9.

Olea-Flores, M., Zuñiga-Eulogio, M. D., *et al.* (2019) 'Extracellular-Signal Regulated Kinase: A Central Molecule Driving Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer', *International journal of molecular sciences*. NLM (Medline). doi: 10.3390/ijms20122885.

Olea-Flores, M., Zuñiga-Eulogio, M., *et al.* (2019) 'Leptin Promotes Expression of EMT-Related Transcription Factors and Invasion in a Src and FAK-Dependent Pathway in MCF10A Mammary Epithelial Cells', *Cells*. MDPI AG, 8(10), p. 1133. doi: 10.3390/cells8101133.

Orozco-Cristóbal, J. (2018) *Papel de la cinasa Src sobre los niveles de E-cadherina y vimentina en células epiteliales mamarias estimuladas con Cadmio*. Universidad Autónoma de Guerrero.

Paskavitz, A. L. *et al.* (2018) 'HHS Public Access', pp. 27–34. doi: 10.1016/j.jtemb.2018.04.024.Differential.

Pastushenko, I. and Blanpain, C. (2019) 'EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 29(3), pp. 212–226. doi: 10.1016/j.tcb.2018.12.001.

Pearson, C. A. and Prozialeck, W. C. (2001) 'E-cadherin, β -catenin and cadmium carcinogenesis', *Medical Hypotheses*, 56(5), pp. 573–581. doi: 10.1054/mehy.2000.1243.

Ponce, E., Louie, M. C. and Sevigny, M. B. (2015) 'Acute and chronic cadmium exposure promotes E-cadherin degradation in MCF7 breast cancer cells', *Molecular Carcinogenesis*, 54(10), pp. 1014–1025. doi: 10.1002/mc.22170.

Qu, W. *et al.* (2006) 'Acquisition of apoptotic resistance in cadmium-induced malignant transformation: specific perturbation of JNK signal transduction pathway and associated metallothionein overexpression.', *Molecular carcinogenesis*, 45(8), pp. 561–71. doi: 10.1002/mc.20185.

Roque-Luna, M. and García-Astudillo, A. (2018) *Papel de FAK-Src en la secreción de MMP-2 y*

MMP-9 en células MCF10A estimuladas con Cadmio. Universidad Autónoma de Guerrero.

Sarkar, A., Ravindran, G. and Krishnamurthy, V. (2013) 'a Brief Review on the Effect of Cadmium Toxicity: From Cellular To Organ Level', *International Journal of Bio-Technology and Research*, 3(1), pp. 2249–6858.

Schlaepfer, D. D. and Mitra, S. K. (2004) 'Multiple connections link FAK to cell motility and invasion', *Current Opinion in Genetics and Development*, 14(1), pp. 92–101. doi: 10.1016/j.gde.2003.12.002.

Siddique, S., Kubwabo, C. and Harris, S. A. (2016) 'A review of the role of emerging environmental contaminants in the development of breast cancer in women', *Emerging Contaminants*. Elsevier Ltd, 2(4), pp. 204–219. doi: 10.1016/j.emcon.2016.12.003.

Siewit, C. L. *et al.* (2010) 'Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between ER α and c-Jun', *Molecular Endocrinology*, 24(5), pp. 981–992. doi: 10.1210/me.2009-0410.

Sigel, A., Sigel, H. and Sigel, R. K. O. (2013) *Cadmium: From toxicity to essentiality, Metal Ions in Life Sciences*.

Silva, N. *et al.* (2012) 'Cadmium a metalloestrogen: Are we convinced?', *Journal of Applied Toxicology*, 32(5), pp. 318–332. doi: 10.1002/jat.1771.

Somji, S. *et al.* (2006) 'Urothelial cells malignantly transformed by exposure to cadmium (Cd(+2)) and arsenite (As(+3)) have increased resistance to Cd(+2) and As(+3)-induced cell death.', *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 94(2), pp. 293–301. doi: 10.1093/toxsci/kfl108.

Song, X., Wei, Z. and Shaikh, Z. A. (2015) 'Requirement of ER α and basal activities of EGFR and Src kinase in Cd-induced activation of MAPK/ERK pathway in human breast cancer MCF-7 cells', *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier Inc., 287(1), pp. 26–34. doi: 10.1016/j.taap.2015.05.010.

Subik, K. *et al.* (2010) 'The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, KI-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines', *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 4(1), pp. 35–41. doi: 10.1177/117822341000400004.

Sun, Y. S. *et al.* (2017) 'Risk factors and preventions of breast cancer', *International Journal of Biological Sciences*. Ivyspring International Publisher, pp. 1387–1397. doi: 10.7150/ijbs.21635.

Talbot, L. J., Bhattacharya, S. D. and Kuo, P. C. (2012) 'Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies', *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(2), pp. 117–136.

Tolosa, L., Donato, M. T. and Gómez-Lechón, M. J. (2015) 'General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay', in *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, pp. 1–390. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7.

Torre, L. A. *et al.* (2017) 'Global cancer in women: Burden and trends', *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. American Association for Cancer Research Inc., pp. 444–457. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0858.

Vilchis-Nestor, C. A. *et al.* (2019) 'Ouabain Enhances Cell-Cell Adhesion Mediated by β 1 Subunits of the Na⁺,K⁺-ATPase in CHO Fibroblasts', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), pp. 1–20. doi: 10.3390/ijms20092111.

Wang, J. *et al.* (2016) 'Transition to resistance: An unexpected role of the EMT in cancer chemoresistance', *Genes and Diseases*, 3(1), pp. 3–6. doi: 10.1016/j.gendis.2016.01.002.

Wei, Z. and Shaikh, Z. A. (2017) 'Cadmium stimulates metastasis-associated phenotype in triple-

negative breast cancer cells through integrin and β -catenin signaling', *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier Inc, 328, pp. 70–80. doi: 10.1016/j.taap.2017.05.017.

Wei, Z., Shan, Z. and Shaikh, Z. A. (2018) 'Epithelial-mesenchymal transition in breast epithelial cells treated with cadmium and the role of Snail', *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier, 344(March), pp. 46–55. doi: 10.1016/j.taap.2018.02.022.

Wei, Z., Song, X. and Shaikh, Z. A. (2015) 'Cadmium promotes the proliferation of triple-negative breast cancer cells through EGFR-mediated cell cycle regulation', *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier Inc., 289(1), pp. 98–108. doi: 10.1016/j.taap.2015.09.006.

Xiong, J. P. *et al.* (2003) 'Integrins, cations and ligands: Making the connection', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(7), pp. 1642–1654. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00277.x.

Yu, X., Filardo, E. J. and Shaikh, Z. A. (2010) 'The membrane estrogen receptor GPR30 mediates cadmium-induced proliferation of breast cancer cells', *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier Inc., 245(1), pp. 83–90. doi: 10.1016/j.taap.2010.02.005.

Zeisberg, M. and Neilson, E. G. (2009) 'Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions', *J.Clin.Invest*, 119(1558-8238 (Electronic)), pp. 1429–1437. doi: 10.1172/JCI36183.protected.

Zhang, K. and Chen, J. F. (2012) 'The regulation of integrin function by divalent cations', *Cell Adhesion and Migration*, 6(1), pp. 20–29. doi: 10.4161/cam.18702.

ANEXOS

Figura complementaria 1.

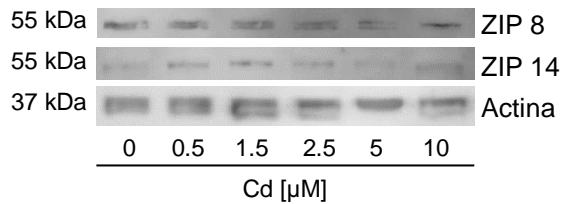


Figura C1. Expresión de ZIP8 y ZIP14 en células MCF10A. Se realizó western blot a cultivos tratados con diferentes concentraciones de Cd (μ M) durante 4 semanas. Las proteínas totales fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a una membrana. Se incubó con los anticuerpos anti-ZIP8/14 y anti-actina como control de carga. Las imágenes son representativas de experimentos realizados de manera independiente.