



Título del artículo.

**El efecto del Cadmio sobre la expresión del ARNm de la DNMT3B en células HepG2**

Título del artículo en idioma inglés.

**Effect of Cadmium on ARNm expression of DNMT3B in HepG2 cells**

Autores.

**José Jonathan Camacho Espinoza  
Daniel Hernández Sotelo  
Oscar Del Moral Hernández  
Ana Margarita Dircio Gutiérrez  
Luz Del Carmen Alarcón Romero  
Yaneth Castro Coronel**

Referencia bibliográfica:

MLA

Camacho Espinoza, José Jonathan. Daniel Hernández Sotelo, Oscar Del Moral Hernández, Ana Margarita Dircio Gutiérrez, Luz Del Carmen Alarcón Romero, Yaneth Castro Coronel. "El efecto del Cadmio sobre la expresión del ARNm de la DNMT3B en células HepG2." *Tlamati* 11.2 (2020): 19-23. Print.

APA

Camacho Espinoza, J. J., Hernández Sotelo, D., Del Moral Hernández, O., Dircio Gutiérrez, A. M., Alarcón Romero, L. del C. y Castro Coronel, Y. (2020). El efecto del Cadmio sobre la expresión del ARNm de la DNMT3B en células HepG2. *Tlamati*, 11(2), 19-23.

---

ISSN Revista impresa: 2007-2066.

ISSN Revista digital: En trámite

Publicado el 31 de diciembre del 2020

© 2020 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

*TLAMATI*, es una publicación semestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



## El efecto del Cadmio sobre la expresión del ARNm de la DNMT3B en células HepG2

José Jonathan Camacho Espinoza<sup>1</sup>  
 Daniel Hernández Sotelo<sup>2</sup>  
 Oscar Del Moral Hernández<sup>3</sup>  
 Ana Margarita Dircio Gutiérrez<sup>1</sup>  
 Luz Del Carmen Alarcón Romero<sup>1</sup>  
 Yaneth Castro Coronel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Guerrero, Laboratorio de Investigación en Citopatología e Histoquímica, Av. Lázaro Cárdenas s/n. C.P.39090 Ciudad Universitaria, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Guerrero, Laboratorio de Epigenética del Cáncer, Av. Lázaro Cárdenas s/n C.P.39090 Ciudad Universitaria, Chilpancingo de los Bravo Guerrero.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Guerrero, Laboratorio de Virología, Av. Lázaro Cárdenas s/n C.P.39090 Ciudad Universitaria, Chilpancingo de los Bravo Guerrero.

\*Autor de correspondencia  
[yanethcc@yahoo.com.mx](mailto:yanethcc@yahoo.com.mx)

### Resumen

El cadmio [Cd] es un metal pesado altamente tóxico, clasificado como carcinogénico y mutagénico que se encuentra de manera natural en el ambiente, sin embargo, las actividades antropogénicas han aumentado su concentración. La población en general está principalmente expuesta al Cd a través de la ingesta de alimentos y agua contaminada con este elemento. Uno de los mecanismos propuesto en los últimos años para explicar su toxicidad es la metilación anormal del ADN, probablemente modulando la expresión de genes responsables de la metilación, tales como las DNA metiltransferasas [DNMTs]. El presente trabajo se enfocó en determinar el efecto de la exposición a Cd sobre la expresión del ARNm de la DNMT3B en la línea celular HepG2. Las células HepG2 fueron expuestas a concentraciones subtóxicas de 0.8, 1 y 3  $\mu\text{M}$  de Cd por 24 y 48 h. Se determinó la citotoxicidad mediante el método de MTT, analizándose enseguida la expresión del ARNm de la DNMT3B mediante RT-qPCR. Los resultados obtenidos muestran que concentraciones de 0.8  $\mu\text{M}$  de Cd no comprometen la viabilidad celular; sin embargo se observó una disminución de la viabilidad en las concentraciones de 1 y 3  $\mu\text{M}$ . Así mismo la expresión del ARNm de la DNMT3B aumenta conforme a la concentración y tiempo de exposición a Cd. Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de Cd pueden alterar genes involucrados en la maquinaria de metilación, tal es el caso de la DNMT3B, pero se requieren más estudios que puedan sustentar tal hipótesis.

**Palabras clave:** Cadmio, DNMT3B, HepG2.

### Como citar el artículo:

Camacho Espinoza, J. J., Hernández Sotelo, D., Del Moral Hernández, O., Dircio Gutiérrez, A. M., Alarcón Romero, L. del C. y Castro Coronel, Y. (2020). El efecto del Cadmio sobre la expresión del ARNm de la DNMT3B en células HepG2. *Tlamati*, 11(2), 19-23.

## Abstract

Cadmium [Cd] is a highly toxic heavy metal, classified as carcinogenic and mutagenic. It is found naturally in the environment, however anthropogenic activities have increased its concentration. General population is mainly exposed through the intake of food and water contaminated with Cd. In recent years, one of the mechanisms proposed to explain its toxicity is abnormal DNA methylation, probably by modulating the expression of genes responsible for methylation, such as DNA methyltransferases. This study is focused on determining effects of Cd exposure on the expression of DNMT3B mRNA in HepG2 cell line. HepG2 cells were exposed to subtoxic concentrations of 0.8, 1 and 3  $\mu\text{M}$  Cd for 24 and 48 h; cytotoxicity was determined by the MTT method. As next step, expression of the DNMT3B mRNA was analyzed by RT-qPCR. Results obtained show that concentrations of 0.8  $\mu\text{M}$  of Cd do not compromise cell viability; however, a decrease in viability was observed at concentrations of 1 and 3  $\mu\text{M}$ . Likewise, expression of the mRNA of the DNMT3B increases with concentration and exposure time to Cd. Results obtained in this study suggest that exposure to environmentally relevant concentrations of Cd can alter genes involved in methylation machinery, such is the case of DNMT3B. More studies are required to support such a hypothesis.

**Keywords:** Cadmium, DNMT3B, HepG2.

## Introducción

El cadmio [Cd] es un metal pesado altamente tóxico, clasificado como carcinogénico y mutagénico (Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR], 2011; Vilahur, Vahter y Broberg, 2015). Se encuentra de manera natural en el ambiente, sin embargo las actividades antropogénicas han aumentado su concentración.

La población general está expuesta principalmente a través de la ingesta de alimentos y agua contaminada con Cd (Nemliche, 2017). El Cd tiene una vida media de hasta 20 años por lo que tiende a bioacumularse, llegando a alcanzar concentraciones micromolares en órganos como el hígado (Faroon, Ashizawa, Wright, Tucker, Jenkins, Ingerman y Rudisill, 2012; Nair, DeGheselle, Smeets, Van Kerkhove y Cuypers, 2013; Darwish et al., 2019).

En los últimos años se ha estudiado que las alteraciones epigenéticas y la modulación de la expresión de genes a través de la metilación como un mecanismo de toxicidad del Cd. Algunos autores han reportado que el Cd modula la expresión del ARNm de genes supresores de tumor (GST) como el CREB3 y genes implicados en el transporte y almacenamiento de metales como las metalotioneínas (MTs) (Cartularo, Laulicht, Sun, Kluz, Freedman y Costa, 2015; Takashi S., 2015).

El presente trabajo se enfocó en determinar el efecto de la exposición a Cd sobre el nivel de expresión del ARNm de la DNMT3B, enzima encargada de la metilación *de novo* del ADN.

## Materiales y Métodos

### *Cultivo de células y tratamientos*

Las células HepG2 (ATCC<sup>®</sup> HB-8065) se cultivaron en botellas flask 75 cm<sup>2</sup> (Corning) con 9 ml de medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen Life Technologies Oregon, USA) y 1% de antibiótico penicilina /estreptomina (Sigma-Aldrich), a una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37°C.

Para fines experimentales, las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos (310 000 células/pocillo), en 300  $\mu\text{L}$  de medio DMEM (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA)

suplementado con SFB (Invitrogen Life Technologies Oregon, USA), posteriormente las células fueron tratadas con concentraciones sub tóxicas de 0.8, 1 y 3  $\mu\text{M}$  de CdCl<sub>2</sub> por 24 y 48h, como grupo control las células HepG2 se mantuvieron solo con medio DMEM sin CdCl<sub>2</sub>.

### *Ensayo de viabilidad celular*

El cultivo en placa de 24 pocillos tratado de acuerdo a las condiciones anteriormente mencionadas, se procedió a evaluar la viabilidad celular por el método MTT (Mosmann, 1983), agregando 30  $\mu\text{L}$  de la solución de MTT (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA) e incubando por 4 horas a 37 °C, posteriormente se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol (Invitrogen Life Technologies. Oregon, USA) para solubilizar los cristales de formazan; se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de cada condición y se transfirieron a una placa de 96 pocillos para realizar la lectura en el lector de ELISA Stat Fax 2100 (Awareness Technology), en una longitud de onda de 570-630 nm.

### *Extracción de ARN*

El ARN total de las células fue extraído usando el reactivo de TRIzol (Life technology, USA); se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de cloroformo por cada 100  $\mu\text{L}$  de TRIzol (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA), se procedió a agitar durante 15 segundos y se centrifugó a 12,500 rpm durante 15 minutos a 4°C.

El ARN obtenido en la fase superior se precipitó agregando 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA), posteriormente se realizaron 2 lavados con 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y se dejó secar el ARN durante 1 hora.

El ARN obtenido se disolvió en 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasas; finalmente se realizó la cuantificación del ARN por espectrofotometría en el Nanodrop 2000c. La pureza del ARN total se determinó midiendo la absorbancia a 260/280 nm.

### *RT-qPCR*

La expresión del gen DNMT3B fue cuantificado por PCR en tiempo real, se utilizaron 100 ng de ARN total. La PCR se realizó con el kit KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR (Kapa Biosystem, Massachusetts, USA) de

### Efecto citotóxico de concentraciones subtoxicas de CdCl<sub>2</sub> en la líneas celular HepG2.

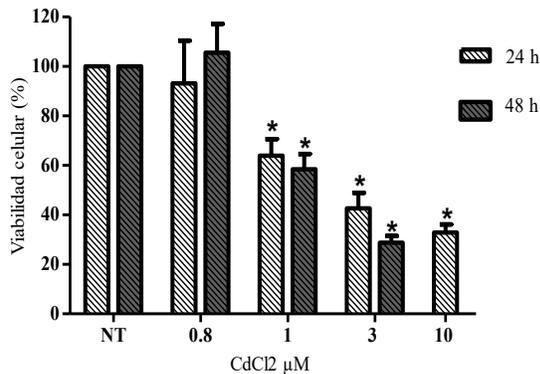


Figura 1. Efecto citotóxico del CdCl<sub>2</sub> en las células HepG2. Se determinó la viabilidad empleando el ensayo MTT. Cada barra representa la media  $\pm$  e.e. (error estándar), de tres experimentos independientes por triplicado. \*Indica una diferencia estadísticamente significativa respecto al control (NT) \* $p \leq 0.05$  (prueba *t*-Student), NT: no tratadas. La línea punteada representa la IC50: Concentración inhibitoria 50.

acuerdo a las condiciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio fueron DNMT3B y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). El gen GAPDH fue usado como un control interno.

A continuación se muestra la secuencias de los oligonucleótidos:

**DNMT3B:** Sentido 5'ctagaagtgggtccacgtctc3', Antisentido 5'agtccccacttgagggtcac-3'

**GAPDH:** Sentido 5'-gacccttcattgacctcaac-3, Antisentido 5'gtggcagtgatggcatggac-3' bajo las siguientes condiciones de amplificación: 37°C por 30 s, 42°C por 5 min, 95°C por 5 min, 95°C por 20 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s.

Las reacciones se realizaron en el equipo CFX<sup>TM</sup>96 Real- Time PCR Detection system Biorad. La expresión relativa del ARNm fue calculada utilizando el método comparativo 2<sup>-ΔΔCt</sup> (Livak y Schmittgen, 2001).

### Resultados

#### Efecto del CdCl<sub>2</sub> sobre la viabilidad celular

Los resultados obtenidos del ensayo MTT (véase Figura 1) mostraron un efecto citotóxico a las concentraciones de 1 y 3 μM de CdCl<sub>2</sub> dada la disminución de la viabilidad celular en más del 30% a las 24 h y 40% a las 48 h del tratamiento. La concentración de 3 μM mostró una disminución de más del 50% de la viabilidad celular tanto a las 24 como a las 48 h. Como control interno se utilizó la concentración de 10 μM de CdCl<sub>2</sub> a 24 h, la cual ya ha sido reportada anteriormente por Lawal y Ellis en el 2010.

#### La expresión del ARNm de la DNMT3B

El CdCl<sub>2</sub> indujo un aumento en la expresión del ARNm de la DNMT3B (véase Figura 2), tanto a las 24 h como a las 48 h de exposición en todas las concentraciones empleadas (0.8, 1 y 3 μM), dicho aumento es estadísticamente

significativo con respecto al grupo control.

### Discusión y conclusiones

El Cd es uno de los contaminantes más comunes en el ambiente, su toxicidad y alta peligrosidad está dada por su clasificación carcinogénica y mutagénica (ATSDR, 2011; Faroon et al, 2012).

Diversos reportes han indicado que la exposición a concentraciones micromolares de Cd está asociado con el riesgo de desarrollar cáncer (Wang, Yang, Tan, Miao, Liu, Shao, Yang, Turdi, Ma, Ren, y Cai, 2012; Wang, Li, Shao, Tan y Lu, 2012; Wang y Du, 2013).

En los últimos años una de las vías moleculares exploradas es la capacidad del Cd para modular la maquinaria epigenética y alterar los patrones de metilación del ADN (Wang et al, 2012), se ha sugerido que un factor causal primario de esta condición es la alteración y desregulación de la familia de los genes encargados de la metilación de *novo* del ADN, las DNMTs (Skipper Sims, Yedjou, y Tchounwou, 2016; Zhang y Xu, 2017; Gào, Zhang, Burwinkel, Xuan, Holleczeck, Brenner y Schöttker, 2019).

En este trabajo se analizó el efecto de la exposición de Cd sobre la expresión de la DNMT3B a concentraciones biológicamente relevantes, dado que son comparables en un rango de concentraciones encontradas en tejido post-mortem de hígado de personas ambientalmente expuestas. Los resultados obtenidos de la exposición de las células HepG2 a concentraciones micromolares del CdCl<sub>2</sub> muestran que la exposición a 0.8 μM de CdCl<sub>2</sub> no compromete la viabilidad celular, sin embargo, las concentraciones de 1 y 3 μM mostraron una disminución significativa de la viabilidad celular en comparación con el grupo control.

Estos resultados indican que el CdCl<sub>2</sub> es capaz de inducir citotoxicidad de una manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, resultados similares a los publicados por Lawal y Ellis en el 2010 quienes utilizaron el mismo modelo celular, demostrando también que la concentración de 10 μM de CdCl<sub>2</sub> disminuyó un 50% la viabilidad celular, datos que fueron reproducibles en este trabajo.

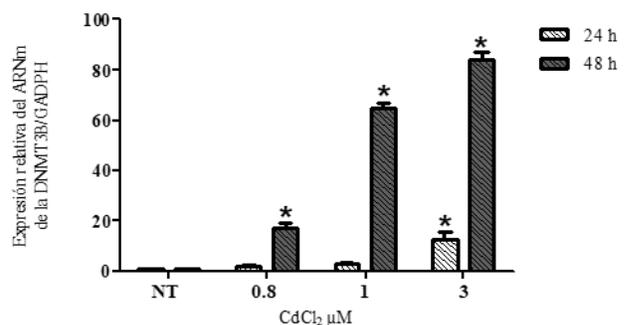


Figura 2. Efecto del CdCl<sub>2</sub> sobre la expresión del gen de DNMT3B en células HepG2. Las células fueron tratadas con CdCl<sub>2</sub>. El nivel del ARNm de la DNMT3B fue determinado por RT- qPCR y normalizado respecto a GAPDH. Cada barra representa la media  $\pm$  e.e. (error estándar), de tres experimentos independientes por triplicado. \* Indica una diferencia estadísticamente significativa respecto al control (NT) \* $p \leq 0.05$  (prueba *t*-Student) NT: no tratadas.

Uno de los mecanismos principales de toxicidad de Cd es la modulación de la expresión de diversos genes (Madejczyk, Baer, Dennis, Minarchick, Leonard, Jackson, Stallings, y Lewis, 2015). Se ha reportado que la exposición a concentraciones micromolares de CdCl<sub>2</sub> por 24 h y 3 semanas modula la expresión de genes como las MTs, CYP3A7, NT5E, y el gen de respuesta temprana al crecimiento (EGR1), glutatión S-transferasa (GSTT1), genes involucrados en la desintoxicación de metales y xenobióticos, proliferación, migración e invasión celular (Cartularu, et al., 2015; Madejczyk, et al., 2015).

De acuerdo a la anterior evidencia científica, se procedió a analizar si las concentraciones micromolares de CdCl<sub>2</sub> modulan la expresión de DNMT3B ante una exposición subcrónica de 24 y 48 h. Nuestros resultados mostraron una sobreexpresión inmediata y gradual del ARNm de las DNMT3B después de la exposición a 0.8 µM de CdCl<sub>2</sub> en ambos tiempos de exposición, con respecto al control.

Este comportamiento en el aumento de la expresión del ARNm de la DNMT3B son similares a los reportados por Jiang, Xu, Song, Zhu, Wu, Zhang y Wu en el 2008, utilizando como modelo la línea celular HLF (fibroblasto humano) tratadas con concentraciones de 0-1.5 µM/L de CdCl<sub>2</sub> durante dos meses, Jiang et al (2008) reportaron que la concentración más alta (1.5 µM/L) indujo la sobreexpresión de la DNMT3B.

En otro estudio realizado por Takiguchi, Achanzar, Qu, Li, y Waalkes en el 2003, analizaron el efecto que tiene el Cd sobre la actividad de las DNMTs y la metilación del ADN, utilizando como modelo de estudio las células de hígado de rata (TRL1215) tratadas por una semana a concentraciones de 0, 2 y 5 µM de Cd y observaron una disminución en la actividad de las DNMTs en un 40% de manera dependiente de la concentración.

En conclusión, las alteraciones epigenéticas inducidas por Cd pueden involucrar la inducción de enzimas de la maquinaria de metilación a través de la modulación del ARNm de DNMT3B, esta inducción puede darse a exposiciones subtóxicas de CdCl<sub>2</sub>, sin embargo se requiere analizar todas las enzimas de la familia de las DNMTs y evaluar otros aspectos de la regulación transcripcional en respuesta a Cd. Así mismo, la exposición a concentraciones biológicamente relevantes de Cd en las células HepG2 ejercen un efecto citotóxico y modulan la expresión del ARNm de DNMT3B.

### Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

### Referencias

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2011). *Toxicological Profile for Polychlorinated Biphenyls (PCBs)*. ATSDR. Obtenido de: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp17.pdf>.

Cartularu, L., Laulicht, F., Sun, H., Kluz, T. Freedman, J. H. y Costa, M. (2015). Gene expression and pathway analysis of human hepatocellular carcinoma cells treated with cadmium. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier Inc., 288(3), 399–408. doi: 10.1016/j.taap.2015.08.011.

Darwish, W. S., Chiba, H., Elhelaly, A. E. Hui, S. (2019). Estimation of cadmium content in Egyptian foodstuffs: health risk assessment, biological responses of human HepG2 cells to food-relevant concentrations of cadmium, and protection trials using rosmarinic and ascorbic acids. *Environmental Science and Pollution Research*. 26(15), 15443-15457

Faroon, O., Ashizawa, A., Wright, S., Tucker, P., Jenkins, K., Ingerman, L. y Rudisill, C. (2012). Toxicological Profile for Cadmium Atlant'. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*. (US), GA.

Gào, X., Zhang, Y., Burwinkel, B., Xuan, Y., Holleczeck, B. Brenner, H. y Schöttker, B. (2019). The associations of DNA methylation alterations in oxidative stress-related genes with cancer incidence and mortality outcomes: a population-based cohort study. *Clinical Epigenetics*, 11 (1), 1–9. doi: 10.1186/s13148-018-0604-y.

Jiang, G., Xu, L., Song, S., Zhu, C., Wu, Q., Zhang, L. y Wu, L. (2008). Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells. *Toxicology*, 244(1), 49–55. doi: 10.1016/j.tox.2007.10.028.

Lawal, A. O. y Ellis, E. (2010). Differential sensitivity and responsiveness of three human cell lines HepG2, 1321N1 and HEK 293 to cadmium. *Journal of Toxicological Sciences*, 35(4), 465–478. doi: 10.2131/jts.35.465.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Madejczyk, M., Baer, C. E., Dennis, W. E., Minarchick, V. C., Leonard, S. S., Jackson, D. A., Stallings, J. D. y Lewis, J. A. (2015). Temporal Changes in Rat Liver Gene Expression after Acute Cadmium and Chromium Exposure. *PLoS ONE*, 10(5) 101-27. 10.1371/journal.pone.0127327.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Nair, A. A., DeGheselle, O., Smeets, K., Van Kerkhove, E. y Cuypers, A. (2013). Cadmium-induced pathologies: Where is the oxidative balance lost (or not)? *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 6116–6143. doi: 10.3390/ijms14036116.

Nemmiche, S. (2017). Oxidative signaling response to cadmium exposure. *Toxicological Sciences*, 156(1), 4–10. doi: 10.1093/toxsci/kfw222.

Skipper, A., Sims, J. N., Yedjou, C. G. y Tchounwou, P. B. (2016). Cadmium chloride induces DNA damage and apoptosis of human liver carcinoma cells via oxidative stress. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(1), 1–10. doi: 10.3390/ijerph13010088.

Takahashi, S. (2015). Positive and negative regulators of the metallothionein gene (Review). *Molecular Medicine Reports*, 12(1), 795–799. doi: 10.3892/mmr.2015.3459.

Takiguchi, M., Achanzar, W. E., Qu, W., Li, G. y Waalkes, M. P. (2003). Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Experimental Cell Research*, 286(2), 355–365. doi: 10.1016/S0014-4827(03)00062-4.

- Vilahur, N., Vahter, M., Broberg, K. (2015). The epigenetic effects of prenatal cadmium exposure. *Current Environmental Health Reports*, 2, 195–203.
- Wang, B. y Du, Y. (2013) Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2013/898034.
- Wang, B., Yang, L., Tan, Y., Miao, X., Liu, X., Shao, C., Yang, X., Turdi, S., Ma, L., Ren, J. y Cai, L. (2012). Low-dose Cd induces hepatic gene hypermethylation, along with the persistent reduction of cell death and increase of cell proliferation in rats and mice, *PLoS ONE*. 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0033853
- Wang, B., Li, Y., Shao, C., Tan, Y. y Lu, C. (2012). Cadmium and Its Epigenetic Effects. *Current medicinal chemistry*. 19(16). 2611-20. 10.2174/092986712800492913..
- Zhang, W. y Xu, J. (2017). DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis', *Biomarker Research*. Biomarker Research, 5(1), 1–8. doi: 10.1186/s40364-017-0081-z.