

**ESTUDIO DEL EFECTO PRODUCIDO POR  
4-NITROSO FENOL, SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE  
CÉLULAS EPITELIALES RENALES DE RATA (NRK-52) Y  
SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE  
ADHESIÓN CX-43, CX-32 Y CD44.  
ANÁLISIS DEL PAPEL BENEFICIOSO DE LA VITAMINA C**

Lourdes Jiménez, Mónica Fernández,  
M<sup>a</sup> Luisa de la Puerta, Samuel González-Mancebo, Ana Martín  
*Universidad SEK*  
ammartin@sekmail.com

**Resumen**

*En este trabajo mostramos el efecto producido por el 4-nitrosfenol sobre las células NRK-52, células epiteliales tubulares renales de rata. Este nitrosocompuesto afecta el porcentaje de proliferación celular, cayendo drásticamente a medida que aumenta la concentración del compuesto. Del mismo modo, hemos observado que el patrón de expresión de las moléculas de adhesión conexina 43 (Cx-43), conexina 32 (Cx-32) y CD44, cambia notablemente tras la exposición de estas células con Nitrosfenol (4-NOPHE), lo que también ha sido confirmado por técnicas de western blot.*

*Por otro lado, se ha demostrado un efecto beneficioso de la vitamina C (ácido ascórbico, AA) sobre el carácter citotóxico del 4-NOPHE. Para ello, se han realizado diferentes ensayos con AA, permitiéndole actuar antes, simultáneamente o después del tratamiento con 4-NOPHE. Nuestros resultados muestran que al actuar simultáneamente o después, el AA produce una gran recuperación de los valores normales de proliferación, e incluso, los eleva. Además, la combinación de 4-NOPHE y AA, indujo una cierta recuperación de los patrones de expresión de las moléculas de adhesión estudiadas.*

**Palabras clave:** Nitrosocompuesto, Citotoxicidad, Moléculas de adhesión, Vitamina C.

## Summary

*In this report we show the effect produced for 4-nitrosophenol on the rat renal tubular epithelial cell line NRK52. This nitroso compound affects the percentage of cellular proliferation, falling down drastically as it increases the concentration of the compound. In the same way, we have observed that the pattern of expression of the connexin 43 (Cx-43), connexin 32 (Cx-32) and CD44 molecules of adhesion, changes notably after the treatment of these cells with nitrosophenol (4-NOPHE), which also has been confirmed for western blot technique.*

*On the other hand, it has been shown a beneficial effect of the vitamin C (ascorbic acid, AA) on the cytotoxic character of 4-NOPHE. For it, different assays have been realized by AA, allowing it to act before, simultaneously or after the treatment with 4-NOPHE. Our results show that on having acted simultaneously or later, the AA produces a great recovery of the normal values of proliferation, and even, it raises them. Besides, the combination of 4-NOPHE and AA, induced a certain recovery of the expression patterns of the studied adhesion molecules.*

**Key Words:** Nitroso compound, Cytotoxicity, Adhesion Molecules, Vitamin C.

\* \* \* \* \*

## Introducción<sup>1</sup>

La formación, en el medio ambiente de nitrosocompuestos en general y de nitrosaminas en particular ha llegado a ser objeto de preocupación social, desde que se ha conocido la capacidad cancerígena de numerosos de estos compuestos (Sugimura, T. *et al.*, 2000). Estas sustancias, de demostrado poder cancerígeno, se pueden originar *in vivo*, en el estómago, a partir de sus precursores: agentes nitrosantes y substratos nitrosables (Gaspar, J. *et al.*, 1996).

Existen numerosos estudios de la actividad biológica de los nitrosocompuestos, en los que se analiza su papel inductor de tumores (Takashima, T., 2001), pudiéndose establecer en muchos de los casos un cierto paralelismo entre los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro*.

Diferentes trabajos han demostrado las alteraciones que puede provocar en células epiteliales la exposición a diferentes sustancias induciendo cambios en la expresión de distintas moléculas de adhesión como E-cadherinas y algunas conexinas (Cx43 y Cx32). Estos cambios impiden la adhesión y comunicación celular, originando un proceso tumoral (Khare *et al.*, 1999; Haberman *et al.*, 2001).

Por ello, conocida la actividad biológica de las nitrosaminas, se han desarrollado diferentes estrategias dirigidas a evitar la acción de estos nitrosocompuestos, entre las que se destacan: la quimiopreención sobre nitrosaminas ya formadas y la búsqueda de agentes bloqueantes o protectores. Así, se han utilizando principalmente, componentes de alimentos naturales como el té verde y otros extractos de vegetales (Vermeer, *et al.*, 1999). Entre los posibles inhibidores del mecanismo de nitrosación, destacan el ácido ascórbico (AA) o vitamina C,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y ácido p-aminobenzóico (PABA) (Ferguson, 1994). La función más interesante que puede tener el ácido ascórbico es su capacidad de inhibir la reacción de nitrosación de diferentes nitrosaminas (Bartsch *et al.*, 1988), y del 4-NOPHE (Cuellar *et al.*, 2005), por lo que ha sido asociada con la disminución del riesgo de desarrollo de cáncer (Ferraroni *et al.*, 1994; Decosse *et al.*, 1977).

En este trabajo hemos estudiado el efecto del 4-NOPHE sobre la proliferación de la línea celular NRK52. Así como, la variación en la expresión de

---

<sup>1</sup> Agradecimientos. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos SEK99002 y USEK, n°-6-2004-05 de la Universidad SEK y por SEK 00/3F de la *Consejería de Educación y Cultura de la Junta de Castilla y León*.

moléculas de adhesión Cx 43, Cx32 y CD44, tanto por técnicas inmunohistoquímicas como por *western blot*. Por otro lado, hemos evaluado la capacidad del AA, como inhibidor de los efectos inducidos por el 4-NOPHE sobre la proliferación celular y la expresión de algunas moléculas de adhesión.

## **Materiales y Métodos**

### *1. Cultivos celulares*

Las células NRK52, una línea de células epiteliales tubulares proximales de riñón de rata (ATCC no. CRL-1571), clonada a partir de una mezcla de células de riñón normal y que posee características de células epiteliales tubulares proximales y distales (Larco y Todaro, 1978), fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma), 2mM de L-glutamina (Sigma) y 100 U/ml de penicilina + 100 mg/ml de estreptomicina (Sigma) a 37° C y con una atmósfera saturada de CO<sub>2</sub> 5% en un incubador (NUAIRE, modelo DH autoflow).

### *2. Preparación del 4-NOPHE*

Para obtener el 4-nitrosfenol, se siguió el protocolo descrito por González-Mancebo *et al.*, 1999. Se mezcló una solución de nitrito sódico 20 mM (NaNO<sub>2</sub>) (Merck) con una de fenol 20 mM (Sigma), ambas diluidas en tampón fosfato 0,1 mM pH 5.0 a una concentración 1:1, y la mezcla se incubó con agitación a 37° C durante toda la noche.

La concentración de 4-NOPHE se determinó mediante la ecuación de Lambert-Bear ( $A=e.L.C$ ), siendo el coeficiente de extinción molar ( $e$ ) para el 4-NOPHE de 5850 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, leyendo la absorbancia a 345 nm en un espectrofotómetro (GBC, modelo Cintra 10e).

Una vez calculada la concentración del 4-NOPHE, se realizaron las diluciones adecuadas para los diferentes estudios a realizar.

### 3. Proliferación celular

Los ensayos de proliferación celular se realizaron utilizando el método del MTT (Tetrazolium blue chloride), siguiendo el protocolo comercial de CellTiter 96 (ensayo de proliferación/citotoxicidad celular no radiactivo) (Promega, USA). Se incubaron  $35 \times 10^3$  células/pocillo en placas de 96 pocillos con concentraciones crecientes de 4-NOPHE durante 2 y 24 horas. Después de la incubación se añadieron 20  $\mu$ l del producto CellTiter 96 en 100  $\mu$ l de salino previamente filtrado y se incubó durante 3 horas a 37° C y a 5 % CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia a 492 nm con un lector de ELISA (ASYS HITECH, modelo DigiScan).

Para evaluar el efecto del ácido ascórbico (AA), las células se incubaron con 0.1 mM del mismo diluido en medio RPMI completo de tres maneras diferentes, antes de tratarlas con 4-NOPHE, simultáneamente o posteriormente al tratamiento con el 4-NOPHE. A cada uno de estos experimentos los hemos denominado como “*AA antes, simultáneamente y después*”.

Los resultados de la medición de la absorbancia, han sido relativizados, transformándolos en porcentaje de proliferación, es decir, se consideró el 100 % de proliferación en cada ensayo al control negativo de cualquier sustancia estudiada, de manera que las células contenían sólo medio completo. Así mismo, se ha tenido en cuenta la IC50: concentración del compuesto para la cuál se obtiene el 50% de proliferación celular.

Los datos que se presentan de los ensayos de proliferación corresponden a la media de tres ensayos (para 4-NOPHE y vitamina C), o más de tres ensayos (para 4-NOPHE sólo).

### 4. Inmunohistoquímica

$5 \cdot 10^4$  células se cultivaron en cámaras de cultivo sobre portaobjetos (IWAKI, Japón), y se trataron simultáneamente con diferentes concentraciones de 4-NOPHE en presencia y ausencia de 0.1 mM de AA durante 2 horas.

Las células se fijaron con alcohol:eter (1:1) durante 10 minutos y se lavaron varias veces con PBS. A continuación, se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos primarios anti-Cx 43 (diluido 1:20 en PBS) (Zymed Laboratories, San Francisco, California) y anti-CD44 (diluido 1:10 en PBS)

(Biosource Internacional, USA). Después de varios lavados, las células se incubaron durante 30 min con el anticuerpo secundario Sheep Ig anti mouse Ig conjugado a peroxidasa (diluído 1:40) (Pierce). Después de lavar la detección se determinó añadiendo diaminobenzidina (DAB) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3 %.

Por último, tras retirar las cámaras de los portaobjetos, las células fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina, deshidratadas y procesadas para su montaje con DPx.

## 5. Western blot

Las células tratadas a diferentes tiempos con concentraciones crecientes de NPHE se lavaron con PBS y se lisaron en buffer de lisis (1% Nonidet P-40 (Fluka Chemie), 150 mM NaCl (SIGMA), 20 mM Tris-HCl pH 7,6 (SIGMA), 1mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 1mg/ml aprotinina, 1mg/ml pepstatina y 1mg/ml leupeptina (SIGMA)) durante 30 minutos a 4°C. Después de medir la concentración de proteínas, siguiendo el protocolo de la casa comercial (Pierce), el lisado se sometió a electroforesis (SDS-PAGE) en un gel al 10% y a transferencia a papel de nitrocelulosa (Bio Rad), mediante transferencia semiseca. La nitrocelulosa se saturó con solución de saturación (3% BSA (seroalbúmina bovina), 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,9% NaCl, 0,05% Tween-20 (SIGMA)) durante 1 hora y se incubó con los distintos anticuerpos anti-CX43 y anti-Cx32 diluidos en solución de dilución de anticuerpos (0,1% BSA (seroalbúmina bovina), 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,9% NaCl, 0,05% Tween-20) durante toda la noche. Después de lavar con TBS-Tween 20 (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,9% NaCl, 0,05% Tween-20), se añadió el anticuerpo secundario (Rabbit anti-mouse Ig acoplado a fosfatasa alcalina) (Pierce) y las bandas se revelaron con BCIP/NBT (Pierce).

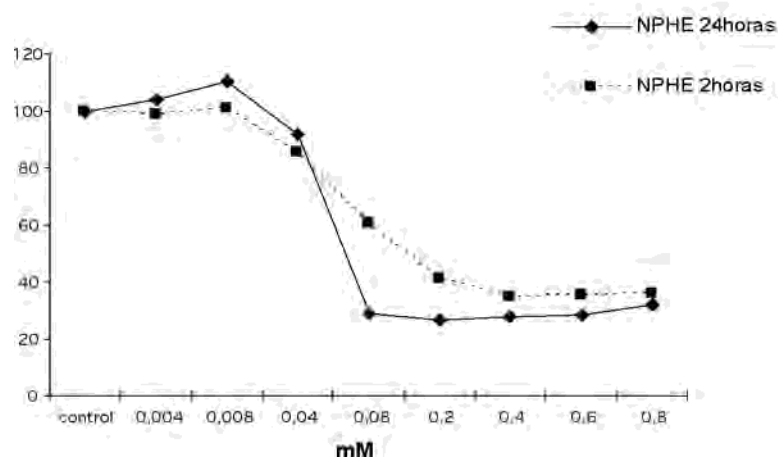
## 6. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD. Las diferencias estadísticas se han establecido por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

## Resultados

### 1. Efecto del 4-NOPHE sobre cultivos celulares

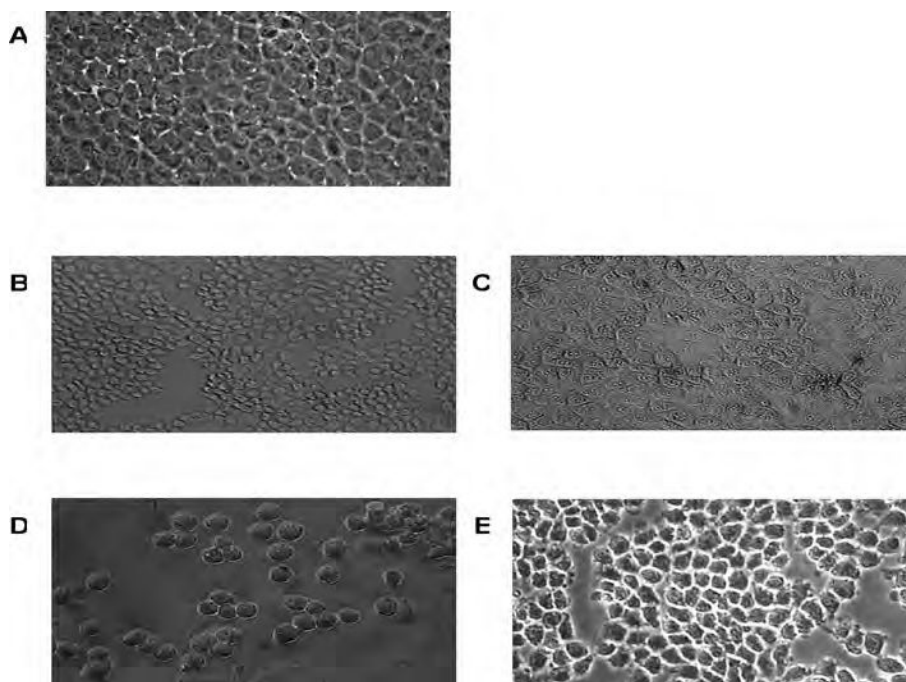
El tratamiento de las células NRK52 con 4-NOPHE induce un efecto citotóxico, como se refleja en el porcentaje de proliferación, (Fig. 1). Así, tras la incubación de las células durante 2 horas con diferentes concentraciones del nitrosocompuesto, se observa un descenso de la proliferación a partir de 0.08 mM, siendo este descenso más pronunciado a medida que la concentración a la que se exponen las células es mayor. Cuando el tratamiento se realiza durante 24 horas, se observa un efecto similar, aunque el descenso de la actividad celular, es más drástico que cuando se incubaba sólo 2 horas. Así, la IC<sub>50</sub> para 2 horas de 4-NOPHE, fue aproximadamente de 0.1 mM, mientras que, IC<sub>50</sub> para 24 horas de 4-NOPHE fue aproximadamente de 0.06 mM.



**Figura 1.** Porcentajes de proliferación tras el tratamiento con diferentes concentraciones de 4-NOPHE, a 2 y 24 horas.

Además, la morfología celular fue un importante indicador del efecto citotóxico. En este sentido, las células incubadas con medio completo sólo, consideradas como células control, muestran un cuerpo celular poligonal con gran cantidad de contactos celulares con las células vecinas, formando una monocapa continua en toda la superficie de la frasca de cultivo. Su núcleo presenta uno o más nucleolos prominentes (Fig. 2A).

Cuando las células fueron incubadas con concentraciones bajas de 4-NOPHE (como 0.004-0.008 mM), mostraron una morfología igual que las células control. Por el contrario, a partir de 0.04 mM, las células mostraron cambios morfológicos importantes (Fig. 2B), destacando su redondez, pérdida de contactos entre ellas y, por tanto, rotura de la monocapa continua. Dichas alteraciones se fueron acentuando a medida que las concentraciones de 4-NOPHE iban aumentando, como ocurre con 0.08 o con 0.2 mM (Fig. 2C y 2D). Sin embargo, hay que notar que, curiosamente, con las concentraciones más elevadas como 0.4 mM, en las que la proliferación está fuertemente disminuida, los cambios morfológicos no son tan notables como con las concentraciones menores que ellas, aunque no llegaron a mostrar el aspecto de las células control (Fig. 2E).



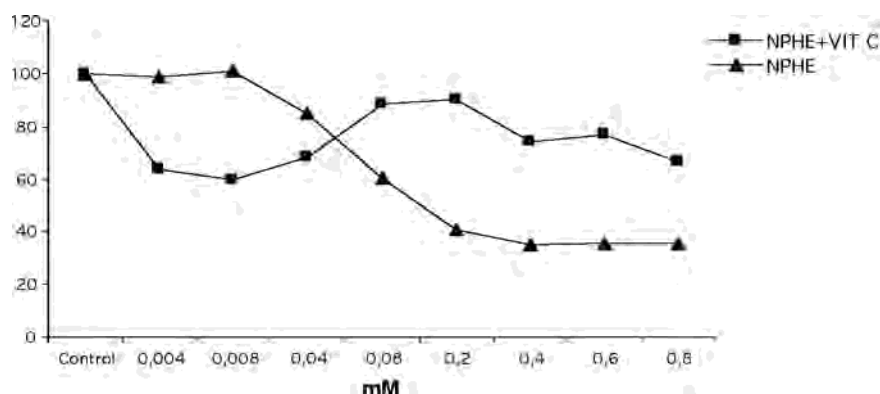
**Figura 2:** Células NRK52 incubadas con medio de cultivo sólo o con 4-NOPHE durante 2 horas. A, Células control. B, Células incubadas con 0.04 mM. C, Células incubadas con 0.08 mM. D, Células incubadas con 0.2 mM. E, Células incubadas con 0.4 mM.



## 2. Efecto del AA sobre los cultivos celulares

### 2.1. AA 2 y 24 h “antes” de 4-NOPHE 2 y 24 horas

El porcentaje de proliferación descendió cuando las células se incubaron durante 24 horas con 0.1 mM de AA antes del tratamiento con concentraciones bajas de 4-NOPHE, desde 0.004 hasta 0.04 mM (Fig.3). Por el contrario desde 0.08 mM de 4-NOPHE, la incubación con AA mostró un incremento notable del porcentaje de proliferación (hasta el 90 %), con respecto a las células incubadas sólo con 4-NOPHE, aunque estas diferencias no eran estadísticamente significativas.



**Figura 3.** Porcentajes de proliferación tras el tratamiento con 0.1 mM de AA durante 24 horas “antes” de diferentes concentraciones de 4-NOPHE durante 2 horas.

La morfología celular, no mostró diferencias al comparar las células tratadas con AA “antes” con aquella tratadas sólo con 4-NOPHE.

Estos resultados nos demuestran que el AA tiene un cierto efecto inhibitorio sobre la capacidad citotóxica de concentraciones altas de 4-NOPHE. Pero, a la vez, se observa un cierto efecto potenciador de la citotoxicidad a bajas concentraciones del nitrosocompuesto, cuando se trata previamente a las células con AA, citotoxicidad que no se observa cuando se incuba el 4-NOPHE sólo. El efecto potenciador de toxicidad producido por el AA “antes”, se repitió cuando las células se incubaron con durante periodos de tiempo mas largos (24 horas antes con AA y 24 horas con 4-NOPHE) (Fig. 4).

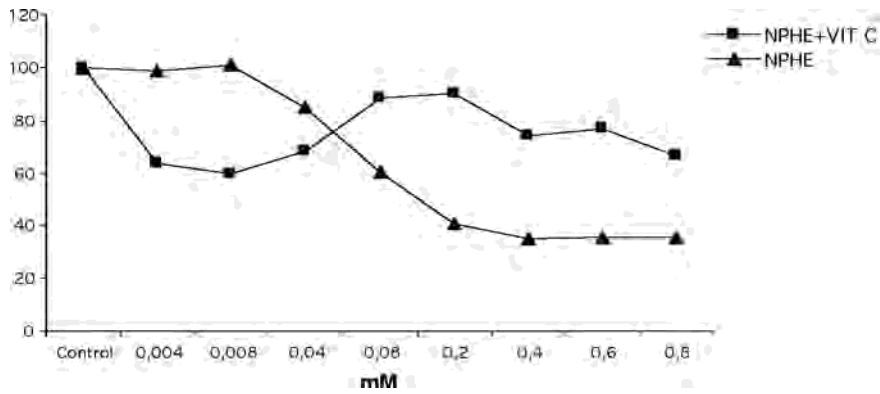


Figura 4. Porcentajes de proliferación tras el tratamiento con 0.1 mM de AA durante 24 horas “antes” de diferentes concentraciones de 4-NOPHE durante 24 horas.

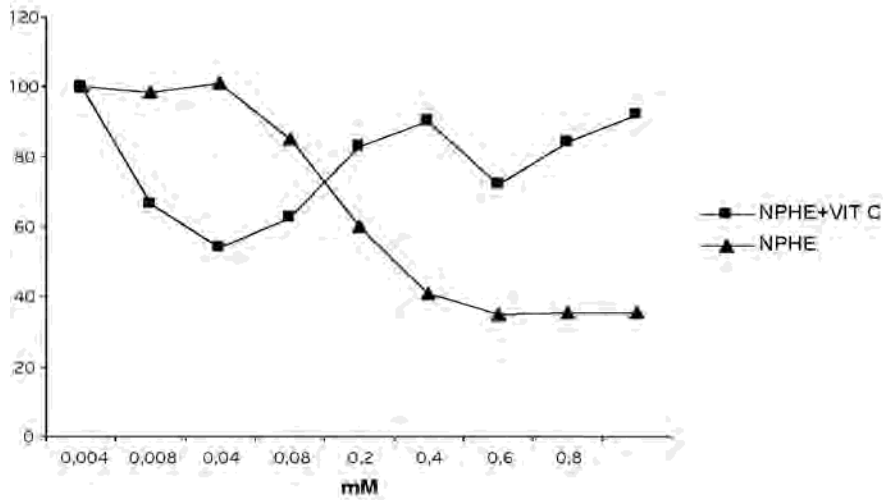
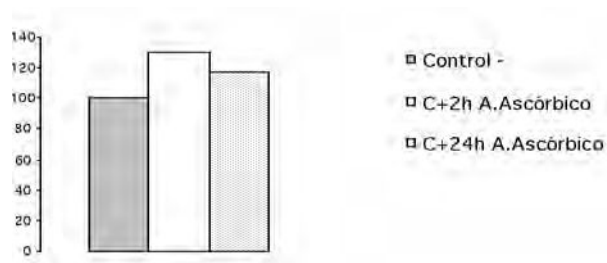


Figura 5. Porcentajes de proliferación tras el tratamiento con 0.1 mM de AA durante 2 horas “antes” de diferentes concentraciones de 4-NOPHE durante 2 horas.

Dado que, se observó un efecto citotóxico al incubarse con AA durante 24 horas “antes” que con 4-NOPHE 2 o 24 horas, se repitió el experimento en este caso, pero manteniendo la incubación con AA sólo 2 horas. Como se puede ver en la figura 5, el efecto citotóxico del AA “antes” se producía independientemente del tiempo, indicando que el AA produce un efecto potenciador del 4-NOPHE, si el AA se incubaba previamente.



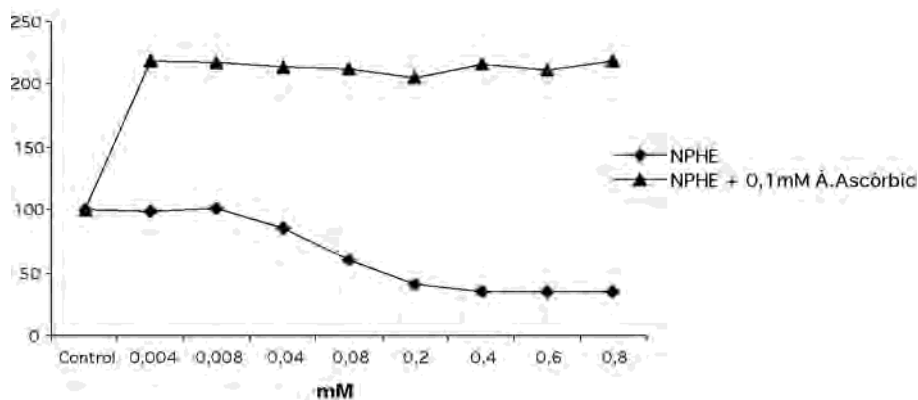
**Figura 6.** Porcentajes de proliferación tras la incubación de las células con 0.1 mM de AA durante 0, 2 y 24 horas.

Sin embargo, la incubación con AA sólo durante 2 o 24 horas no produjo descenso del porcentaje de proliferación, inclusive se ponía en evidencia un ligero incremento (Fig. 6).

## 2.2. AA 2 y 24 h “simultáneamente” con 4-NOPHE

En la figura 7 se muestra el efecto del AA cuando se incubaba simultáneamente con 4-NOPHE durante 2 horas. De este modo, se puede ver como la incubación del AA con 4-NOPHE induce un notable incremento del porcentaje de proliferación (estadísticamente significativo,  $p < 0.001$ ), respecto a la incubación con 4-NOPHE sólo, y que se mantiene en todas las concentraciones de 4-NOPHE analizadas.

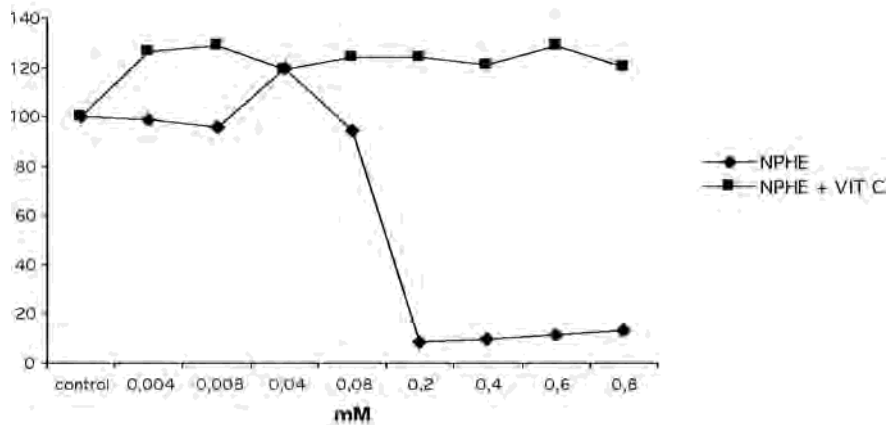
Tras 24 horas de incubación AA “durante” el tratamiento con 4-



**Figura 7.** Porcentajes de proliferación tras el tratamiento con 0.1 mM de AA durante 2 horas “simultáneamente” con diferentes concentraciones de 4-NOPHE durante 2 horas.

NOPHE, el incremento del porcentaje de proliferación, fue de nuevo constatado, si bien, no se eleva a los valores obtenidos para 2 horas (Fig.8).

Además, tanto a 2 como a 24 horas, los cambios morfológicos inducidos por 4-NOPHE, son revertidos cuando se incuban simultáneamente AA y 4-NOPHE.



**Figura 8.** Porcentajes de proliferación tras el tratamiento con 0.1 mM de AA durante 24 horas “simultáneamente” con diferentes concentraciones de 4-NOPHE durante 24 horas.

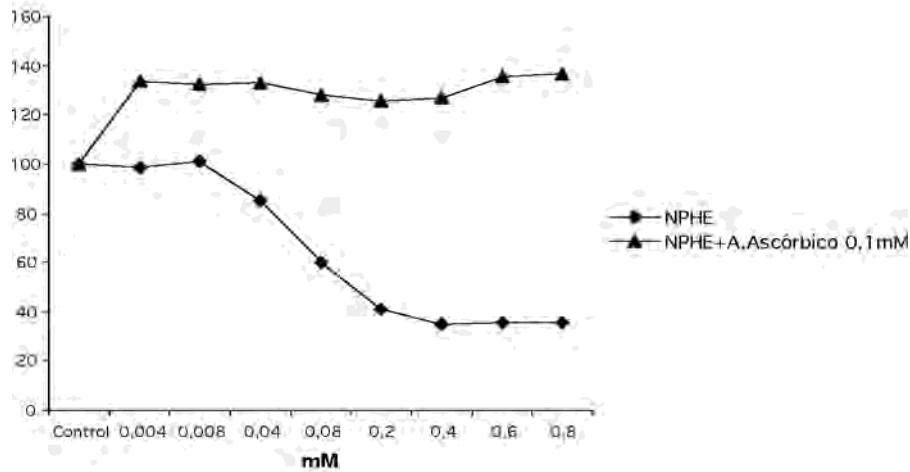
Estos datos demuestran que el AA induce un efecto bloqueante sobre las alteraciones producidas por 4-NOPHE.

### 2.3. AA 24 h “después” con 4-NOPHE 2 y 24 horas

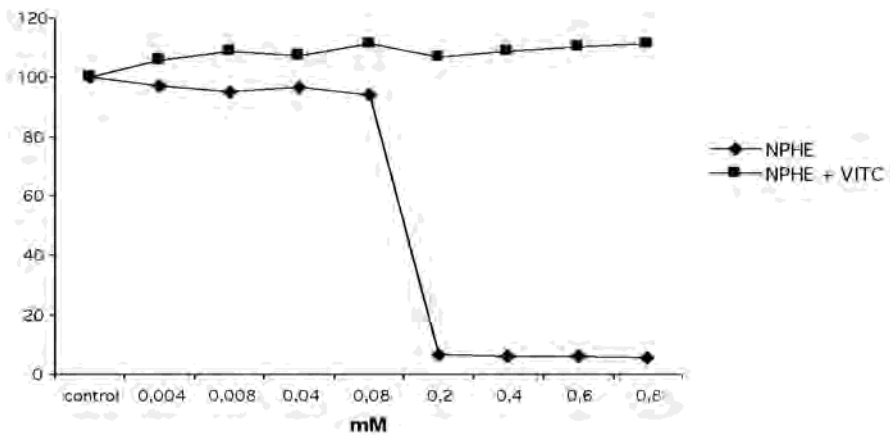
El porcentaje de proliferación se incrementó significativamente cuando se realizó la incubación 24 horas con AA y posteriormente 2 y 24 horas con 4-NOPHE, en comparación con el tratamiento de 4-NOPHE sólo (Fig. 9 y 10). Dicho incremento se observó para todas las concentraciones de 4-NOPHE analizadas, mostrando valores del porcentaje de proliferación por encima del 100 %.

Hay que notar, que además del efecto beneficioso del AA sobre la proliferación celular, éste produce una recuperación (o no alteración) de la morfología normal de las células, que el 4-NOPHE induce sobre ellas.

Estos datos indican que el AA produce un efecto inhibitorio sobre el efecto citotóxico del 4-NOPHE, independientemente del tiempo de exposición al tóxico.



**Figura 9.** Porcentajes de proliferación tras el tratamiento con 0.1 mM de AA durante 2 horas “después” de la incubación con diferentes concentraciones de 4-NOPHE durante 2 horas



**Figura 10.** Porcentajes de proliferación tras el tratamiento con 0.1 mM de AA durante 24 horas “después” de la incubación con diferentes concentraciones de 4-NOPHE durante 24 horas.

### 3. Efecto del 4-NOPHE sobre la expresión de Cx43 y CD44. Papel del AA.

#### 3.1. Estudio inmunohistoquímico:

El tratamiento con 4-NOPHE tanto a cortos como a largos tiempos de incubación, produce un efecto citotóxico que se refleja en la disminución

del porcentaje de proliferación como en las alteraciones de la morfología típica de las células NRK52. Por ello, pensamos que podría verse alterado el patrón de expresión de diferentes moléculas.

De manera que, hemos realizado un estudio inmunohistoquímico con anticuerpos que reconocen diferentes moléculas. Así, para el estudio hemos elegido las moléculas de adhesión Cx43 y CD44, que han sido analizadas en condiciones normales (células control) y tras 2 horas de tratamiento con 4-NOPHE (células tratadas). Hemos analizado 3 concentraciones del compuesto: aquella más baja en los que los cambios morfológicos se empiezan a evidenciar (0.08 mM); otra que corresponde a la concentración más elevada (0.8 mM); y por último, una intermedia (0.2 mM).

Igualmente, hemos valorado la capacidad del AA (0.1 mM) como bloqueante de los cambios inducidos por el 4-NOPHE sobre la expresión de estas moléculas, incubándolas simultáneamente con ambos reactivos durante 2 horas.

### 3.1.1. Células control y células tratadas con 4-NOPHE

Las células NRK52 control y las células tratadas con 4-NOPHE, incubadas con el anticuerpo irrelevante, control negativo, no muestran ningún marcaje positivo (Fig. 11A).

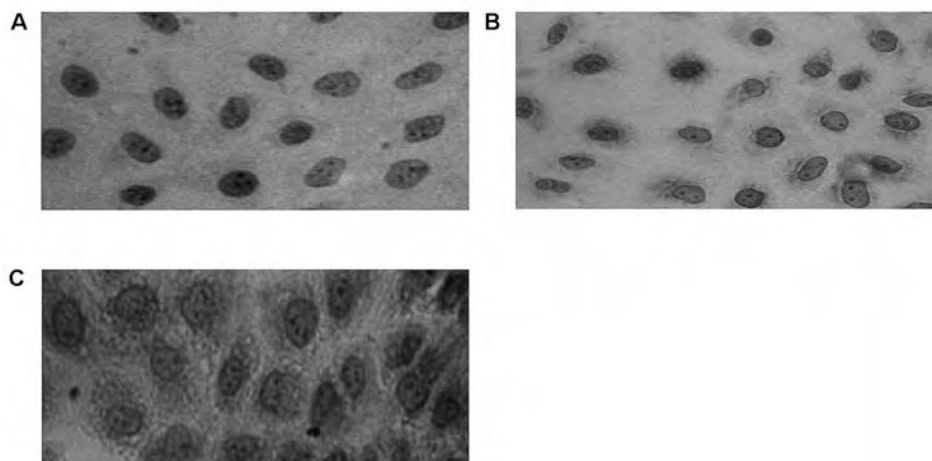
#### 3.1.1.1 Conexina 43 (Cx43)

Las células control fueron positivas para el anticuerpo anti-Cx43. El marcaje presenta un aspecto granular, a modo de manchas en zonas cercanas al núcleo, con una disposición perinuclear (Fig. 11B).

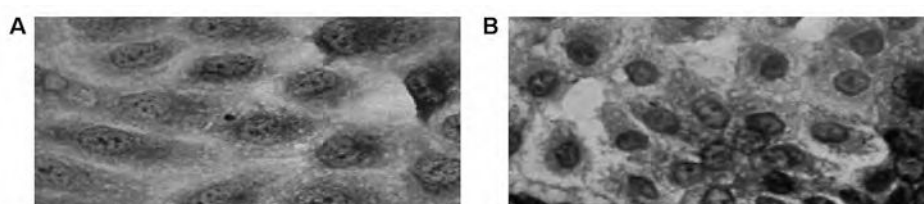
Las células tratadas con 4-NOPHE, muestran una mayor intensidad del marcaje y con un patrón de marcaje que muestra una disposición más extendida por el citoplasma (Fig. 11C), efecto que incrementa a medida que aumenta la concentración de 4-NOPHE.

#### 3.1.1.2. CD44

Las células control muestran un patrón de marcaje reticular y dispuesto por toda la superficie celular (Fig. 12A).



**Figura 11.** Estudio de la expresión de Cx43 en células NRK-52 en células control y en células tratadas con 4-NOPHE. A. Control negativo. B. Expresión de Cx43 en células sin tratar. C. Expresión de Cx43 en células tratadas con 0,8 mM de 4-NOPHE



**Figura 12.** Estudio de la expresión de CD44 en células NRK-52 en células control y en células tratadas con 4-NOPHE. A. Control negativo. B. Expresión de CD44 en células tratadas con 0,8 mM de 4-NOPHE.

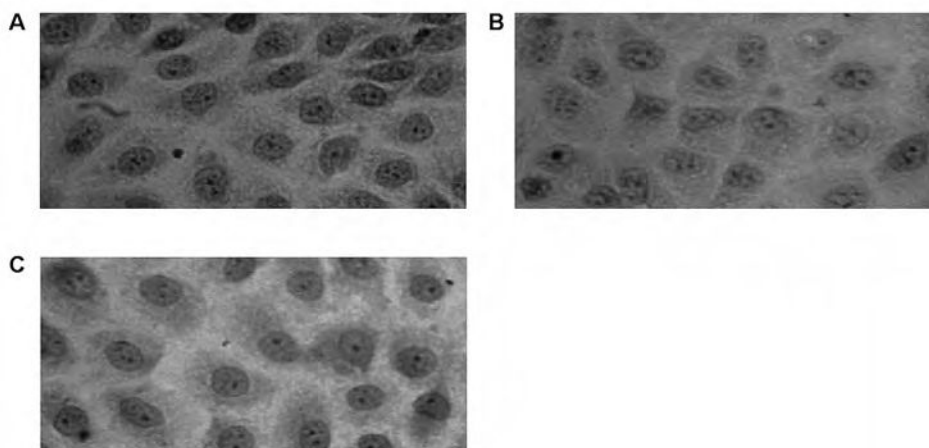
Las células tratadas con 4-NOPHE muestran un notable incremento en la intensidad del marcaje, así como de la superficie citoplásmica positiva para el anticuerpo, mostrando el patrón de marcaje una aspecto más reticular que en las células control (Fig. 12B). Las observaciones apuntadas son similares para las tres concentraciones analizadas.

Los resultados expuestos anteriormente, muestran que el 4-NOPHE induce modificaciones sobre los patrones de expresión del marcaje de las moléculas estudiadas.

### 3.1.2. Papel del AA sobre el marcaje de las células tratadas con 4-NOPHE

#### 3.1.2.1. Conexina 43

El incremento observado sobre la intensidad de marcaje de Cx43 tras la incubación con 4-NOPHE, disminuyó cuando las células fueron tratadas simultáneamente con 4-NOPHE y AA, sin embargo no cambió esa mayor extensión del marcaje en el cuerpo celular (Fig. 13).



**Figura 13.** Estudio de la acción del AA sobre los cambios inducidos por el 4-NOPHE en la expresión de Cx43. A. Células NRK-52 incubadas con 0,08 mM de 4-NOPHE + AA. B. Células NRK-52 incubadas con 0,2 mM de 4-NOPHE + AA. C. Células NRK-52 incubadas con 0,8 mM de 4-NOPHE + AA.

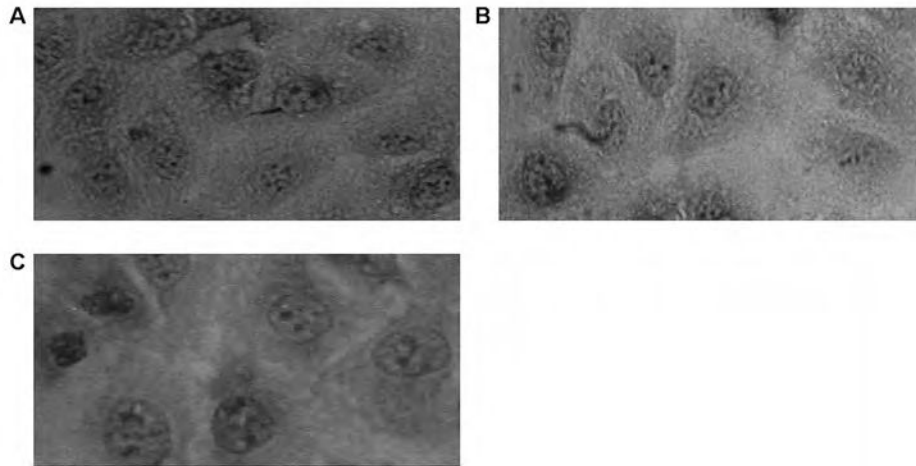
#### 3.1.2.2. CD44

El tratamiento con 4-NOPHE y AA no modificó el incremento detectado para el patrón de marcaje del anticuerpo anti-CD44 en células tratadas con 4-NOPHE sólo. Sin embargo, se observó una menor extensión del marcaje por el citoplasma, presentando un aspecto más parecido a las células control (Fig. 14).

### 3.2. Western blot:

En la figura se muestra la expresión de Cx43 en el lisado de células con-

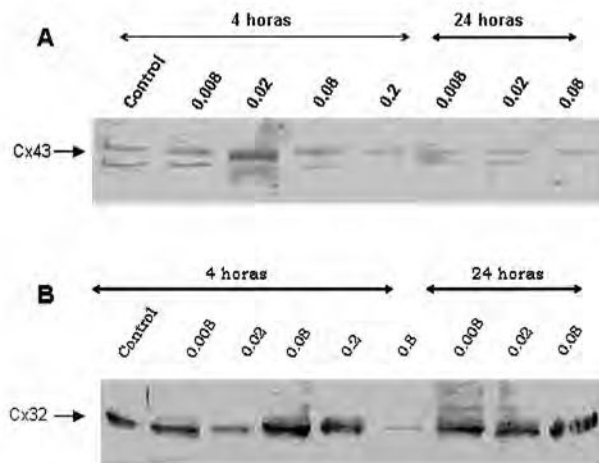




**Figura 14.** Estudio de la acción del AA sobre los cambios inducidos por el 4-NOPHE en la expresión de CD44. A. Células NRK-52 incubadas con 0,08 mM de 4-NOPHE + AA. B. Células NRK-52 incubadas con 0,2 mM de 4-NOPHE + AA. C. Células NRK-52 incubadas con 0,8 mM de 4-NOPHE + AA.

control y tratadas con las distintas concentraciones crecientes de NPHE durante 4 horas y durante 24 horas (Fig. 15A).

Cuando las células son incubadas con el NPHE durante 4 horas se observa que la expresión de Cx43 aumenta hasta llegar a una concentración de



**Figura 15.** Expresión de Cx43 y Cx32 por *western blot* en lisado de células NRK52 tratadas con distintas concentraciones de NPHE. A. Expresión de Cx43. B. Expresión de Cx32.

0,02mM y luego disminuye, sin embargo la expresión de Cx43 en células sometidas al NPHE durante 24hs la intensidad de las bandas es aún menor, observándose una mayor expresión a una concentración de 0,008mM que luego disminuye hasta 0.08mM.

En la figura 15B se muestra la expresión de Cx32 en el lisado de células control y tratadas con las distintas concentraciones crecientes de NPHE durante 4 horas y durante 24 horas. Cuando la incubación con NPHE es de 4 horas, se observa un leve aumento de la expresión de Cx32 hasta alcanzar una concentración intermedia de 0.08mM de NPHE, que vuelve a disminuir hasta la concentración de 0.8mM, siendo casi inapreciable. No obstante, la expresión de Cx32 se mantiene constante cuando la incubación de las células con el NPHE es durante 24 hs.

## Discusión

Como demuestran los resultados obtenidos, el tratamiento de células epiteliales NRK52 con diferentes concentraciones de 4-NOPHE produjo un efecto citotóxico. Este efecto induce alteraciones en las células, que consisten en un descenso del porcentaje de proliferación celular y cambios en su morfología. Estos cambios dependen de la concentración de 4-NOPHE analizada, comenzando a hacerse evidentes a 0.08 mM, se van haciendo más notables a concentraciones mayores, como 0.4 mM, y se mantiene el nivel de citotoxicidad a 0.8 mM, la mayor concentración utilizada en este estudio.

Además, los efectos producidos por el 4-NOPHE se observan a partir de las 2 horas de incubación. En estudios previos se pudo analizar este hecho (datos no mostrados). Sin embargo, el efecto es más intenso cuando el tratamiento se realiza a un tiempo más largo, 24 horas.

Los efectos del 4-NOPHE podrían ser producidos por el grupo NO-. Dicho grupo tiende a intercalarse en el DNA, produciendo oxidaciones que pueden conducir a la inducción de algún tipo de daño en él (Daiber, *et al.*, 1998, Carr *et al.*, 2002, Cuellar *et al.*, 2005). El daño oxidativo inducido por 4-NOPHE podría no ser sólo debido a el grupo NO-, dado que, otras especies reactivas de oxígeno derivadas de él, podrían interaccionar con las bases nitrogenadas, dando lugar a mutaciones en el DNA y en diferentes proteínas. Si existen bajo número de mutaciones, éstas se podrían reparar no produciéndose toxicidad, pero el proble-

ma surge al acumularse gran cantidad de mutaciones que podría afectar también a la enzima de reparación del DNA, lo que llevaría al desarrollo tumoral (Aia *et al.*, 1986; Sato *et al.*, 1998). Por ello, cuando el 4-NOPHE está presente en concentraciones bajas no produce alteraciones en las células (Fig. 1), posiblemente las oxidasas detoxificantes (como el citocromo p450) podrían actuar degradando el compuesto, y por tanto eliminando el daño sobre la célula (Mathews *et al.*, 2002). Sin embargo, para concentraciones elevadas quizás no sea posible la degradación de tales cantidades del compuesto. También, podemos especular que a partir del nitrosocompuesto se podrían producir radicales libres de oxígeno (ROS), que a su vez inducirían un mayor daño celular. En este sentido, reacciones similares han sido descritas anteriormente (Uppu, *et al.*, 1998).

Recientemente, se ha descrito que 2,6-diisopropyl-4-nitrosophenol (una molécula similar al 4-NOPHE, utilizada en este estudio), es una molécula altamente lipofílica y es un agente perturbante de la membrana, en el interior de la región interfase de la bicapa de liposomas donde éste se acumula (Momo *et al.*, 2002). Los autores relacionan estos hechos con el daño producido por esa sustancia en la función mitocondrial. De esta manera, podríamos especular que el 4-NOPHE podría producir el mismo efecto sobre la membrana plasmática de las células NRK52, alterando su permeabilidad, así como también, su función mitocondrial, induciendo un descenso de la síntesis de ATP, y en general, afectando al metabolismo normal de la célula. Esto último, explicaría el hecho de que descienda la tasa de proliferación en las células tratadas con 4-NOPHE. Además, pensamos que durante el desarrollo del protocolo de los ensayos, se pierden células, ya que, hay un menor número de ellas, como lo demuestran los ensayos con el método del MTT. Esto, estaría relacionado con las alteraciones en su morfología, volviéndose más redondeada, lo que impediría el contacto entre las mismas y por lo tanto, desapareciendo la monocapa en la que crecen. Estos cambios morfológicos se empiezan a detectar a partir de 0.04 mM, las células muestran cambios importantes (Fig. 2B) que se van acentuando a medida que las concentraciones de 4-NOPHE van aumentando, como ocurre con 0.08 o con 0.2 mM (Fig. 2C y 2D).

Por otro lado, hay que destacar que, curiosamente, con las concentraciones más elevadas como 0.4 o 0.8 mM, en las que el porcentaje de proliferación está fuertemente disminuido, los cambios morfológicos no son tan drásticos como con las concentraciones menores, aunque no muestran el aspecto de las células control. Esto de nuevo nos lleva a especular que los efectos cito-

tóxicos del 4-NOPHE, podrían estar relacionados con un daño en el metabolismo celular, que afectaría tanto a la maquinaria de la división celular como a la responsable de la síntesis o expresión de moléculas de adhesión intercelular.

Por ello, en este trabajo, hemos analizado que efectos podría tener el tratamiento del 4-NOPHE sobre los patrones de expresión de diferentes moléculas, como Cx43, Cx32 y CD44, mediante un estudio inmunohistoquímico y de *western blot* con anticuerpos monoclonales.

Por un lado, hemos estudiado las conexinas Cx43 y Cx32. Las conexinas son proteínas que forman parte de las uniones tipo nexo o hendidura, las cuales acoplan eléctrica y químicamente los citoplasmas de células contiguas (Alberts, *et al.*, 2002). La Cx43 detectada mediante inmunonarcaje, muestra en células control un patrón de marcaje granular con disposición perinuclear, mientras que, tras tratar con 4-NOPHE se observó un incremento de la intensidad de marcaje, que además cambia su patrón de distribución normal, apareciendo más extendido por todo el citoplasma. Realmente, parece que las Cx43 en células control estuviesen incluidas en vacuolas perinucleares, siendo detectadas así, y suponemos que, por tanto, estas moléculas no estarían expresadas en la membrana celular. Mientras que después de la incubación con 4-NOPHE, podría inducir su expresión en la superficie celular, lo que explicaría ese incremento y la extensión del marcaje por todo el contorno celular.

Este aumento de expresión de la Cx43 también se ha observado por *western blot*, puesto que hay un pico máximo a una concentración de 0,02 mM y después va disminuyendo a partir de 0.08 mM hasta su práctica desaparición a la concentración de 0.8 mM. Teniendo en cuenta estos resultados pensamos que existe una relación inversa entre el aumento de la proliferación celular y la disminución de la expresión de Cx43, a altas concentraciones de 4-NPHE.

Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos por Yaoita *et al.* (2002) en células epiteliales glomerulares renales tratadas con puromicina (un tóxico renal que inhibe la síntesis de proteínas), en los que se ve un aumento en la expresión de Cx43 tras el daño causado por dicho tóxico. Además, otros estudios con células HeLa negativas para Cx43, demostraron que cuando las células no expresan Cx43 hay una mayor proliferación celular y cuando esa expresión está aumentada hay un menor crecimiento celular (King *et al.*, 2000).

Sin embargo, en nuestros resultados, no observamos cambios en la expresión de Cx32 en todas las muestras analizadas tras 24 horas de incubación

con el nitrosocompuesto. Pero, después de la incubación de 4 horas con 4-NPHE hay un leve aumento de la expresión de la Cx32 hasta una concentración intermedia de 0.08mM.

Existen muchos trabajos que están en contra o a favor de estos resultados dependiendo del tipo de células, tejidos o diversas patologías. Así, se han descrito cambios en la expresión de conexinas relacionados con procesos que tienen lugar durante el desarrollo del cáncer. Mientras que, algunos trabajos informan de un descenso de la expresión de Cx32 o de Cx43 (Govindarajan *et al.*, 2002; King *et al.*, 2002; Provost *et al.*, 2002), otros trabajos describen una alta expresión de Cx43 en el desarrollo de diferentes tumores (Arishima *et al.* 2002; Livny *et al.*, 2002; Xiang *et al.*, 2002). Algo muy interesante es el cambio de la expresión de Cx32 por Cx43 durante el desarrollo tumoral, observado por ciertos autores (Govindarajan *et al.*, 2002; King *et al.*, 2002; Provost *et al.*, 2002). En nuestro caso, podríamos pensar que las moléculas Cx43 podrían estar acumuladas en vacuolas perinucleares en condiciones normales para estas células NRK52, y que el 4-NOPHE podría inducir la secreción de esas vesículas y cambiar su localización, provocando la expresión de Cx43 en toda la superficie celular.

La molécula de adhesión CD44 como receptor del ácido hialurónico, participa en los contactos célula-sustrato (Daar y Fabre, 1983). En células las epiteliales NRK52 controles, esta molécula mostró un patrón de marcaje reticular y dispuesto por toda la superficie celular. Sin embargo, cuando las células son tratadas con 4-NOPHE, muestran un notable incremento en la intensidad del marcaje. El incremento de la expresión de CD44 ha sido anteriormente relacionado con procesos inflamatorios (Aruffo 1996; Roy-Chaudhury *et al.*, 1996; Nikolic-Paterson *et al.*, 1996) y cancerígenos (Maaser *et al.*, 1999; Gryczynski *et al.*, 2000). Así mismo, una elevada expresión de esta molécula se ha descrito en relación con procesos de adhesión, migración e invasión tumoral (Knuston *et al.*, 1996), mientras que, otros investigadores demuestran una menor expresión de esta molécula en relación con dichos procesos (Carr *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2002).

Otros estudios relacionan la expresión de CD44 con la molécula supresora de tumores p53, sugiriendo que ambas moléculas podrían ser marcadores de la progresión tumoral en células de cáncer renal, existiendo un incremento de CD44 y una disminución de p53 (Zolota *et al.*, 2002). Así mismo, en estudios con ratones negativos para p53, se observó que las células eran positivas

para CD44 (Yoshida *et al.*, 2002). En general, se ha demostrado una disminución de la expresión de p53 durante el desarrollo del cáncer y que la disminución de CD44 previene la metástasis. También, se ha visto que CD44 no es importante para carcinogénesis, pero sí para la metástasis (Weber *et al.*, 2002).

Si tenemos en cuenta el incremento de la expresión de CD44 detectada después del tratamiento con el nitrosfenol y los antecedentes bibliográficos antes mencionados, podemos pensar que las células parecen adquirir un cierto fenotipo metastásico.

Además, hay que tener en cuenta que numerosos trabajos han mostrado como otros nitrosocompuestos pueden inducir procesos tumorales, o están relacionados con la inducción de mecanismos de invasión y metástasis (Bartsch *et al.*, 1987; Martínez *et al.*, 1988; García-Santos *et al.*, 2002; Sugimura *et al.*, 2002). De manera que, se puede establecer una correlación con nuestras observaciones que nos lleva a asumir la idea de que el 4-NOPHE, podría contribuir a activar procesos cancerosos o metastásicos, induciendo cambios y pérdida de moléculas de adhesión, induciendo la pérdida de uniones celulares y produciendo cambios en su morfología. De este modo podríamos explicar la aparición de una forma celular más redondeada, la menor confluencia entre ellas o el menor número de células presentes en los pocillos, que posiblemente sean despegadas de la placa de cultivo.

Por último, es importante destacar el papel que ha tenido el AA en nuestros experimentos. Así, el AA produjo recuperación del porcentaje de proliferación en los tratamientos denominados “simultáneamente” y “después”. Entonces, podemos decir que el AA (vitamina C) tiene un efecto *bloqueante e inhibitorio* de la acción del 4-NOPHE, independientemente del tiempo de exposición con el nitrosocompuesto.

Es ya sobradamente sabido que el AA es un agente antioxidante, y que su forma de actuar es producir una reducción del grupo NO a NH<sub>2</sub>, el cual, no es pernicioso (Tannenbaum *et al.*, 1991). Así, si se exponen las células a AA y a 4-NOPHE “simultáneamente” o “después”, el antioxidante bloquea o inhibe al nitrosocompuesto eliminando sus efectos citotóxicos. Así, podemos ver la recuperación, e incluso una potenciación del porcentaje de proliferación, la inhibición de los cambios morfológicos de las células y el mantenimiento, en buena medida, de los patrones de expresión de las moléculas de adhesión Cx43, Cx32 y CD44. Lo cuál nos lleva a pensar que el AA induce un efecto beneficioso que mantiene el buen funcionamiento de las células.

Sin embargo, el AA en los tratamientos “antes” (tanto durante 2 horas, como durante 24 horas), sólo mostró un aspecto beneficioso en el caso de utilizar concentraciones altas de 4-NOPHE e incubándolo durante 2 horas. En este sentido, no podemos decir que el AA muestre un efecto *preventivo* (al utilizarlo “antes”), ya que éste, depende de las concentraciones y del tiempo de exposición al nitrosocompuesto. De manera que, podemos decir que cuando el AA se incubaba “antes” produce un efecto potenciador de la toxicidad del 4-NOPHE en las células. Esto podría deberse a que el AA (durante ese periodo de incubación “antes”), podría interaccionar y activar a otras moléculas que sensibilicen a las células. De nuevo podemos pensar en la actividad detoxificante de ciertas moléculas (como citocromo p450), que podrían ser activadas por el AA, y que por su función cuando reaccionan con el nitrosocompuesto, dan lugar a moléculas o formas intermedias más tóxicas que el propio 4-NOPHE.



## BIBLIOGRAFÍA

- AIA, L., *et al.*, (1986): Characteristics of the carcinogenic action of methyl acetoxymethylnitrosamine and DNA repair in rats of different ages. *Exp Onkol*, 8: 18-21.
- ALBERTS, B., *et al.* (2002): Molecular biology of the cell. Fourth edition. Garland Science.
- ARISHIMA, H., SATO, K., KUBOTA, T. (2002): Immunohistochemical and ultrastructural study of gap junction proteins connexin 26 and 43 in human arachnoid villa and meningeal tumors. *J neuropathol Exp Neurol*, 61: 1048-1055.
- BARTSCH, H., OHSHIMA, H., PIGNATELLI, B. (1988): Inhibitors of endogenous nitrosation. Mechanisms and implications in human cancer prevention. *Mutat Res*, 202: 521-528.
- BARTSCH H., O'NEILL I., SCHULTE-HERMANN R. (1987): Eds. *The relevance of N-nitroso compounds to human cancer. Exposure and mechanisms*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 396-399 (IARC Scientific publication 84).
- CARR, N.J., *et al.*, (2002): Epithelial neoplasms of the appendix and colorectum : an analysis of cell proliferation, apoptosis and expression of p523, CD44, bc1-2. *Arch Pathol Lab Med*, 126: 837-841.
- CUELLAR J., MANCEBO S., GARCÍA-CECA J., MARTÍN A., LACADENA J. (2005): Genotoxicity of nitrosophenols in the SOS chromotest: inhibitory effect of ascorbic acid. *Oppidum*. 1: 357-371..
- DAAR, J., FABRE, A. (1983): *Eur J Cancer Clin Oncol* 1: 209-220.
- DAIBER, A., MEHL, M., ULLRICH, V (1998): New aspects in the reaction mechanism if phenol with peroxy nitrite: the role of phenoxy radicals. *Nitric Oxide* 2: 259-269.
- DECOSSE, J. J., *et al.*, (1977): Surgical and medical measures in prevention of large bowel cancer. *Cancer letters* 40: 2549-2552.
- FERGUSON, L.R. (1994): Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat Res* 307: 395-410.
- FERRARONI, M., *et al.*, (1994): Selected micronutrient intake and the risk of colorectal cancer. *Br J Cancer*, 70: 1150-1155.
- GARCÍA-SANTOS M. P., GONZALEZ-MANCEBO S., HERNANDEZ J., CALLE E., CASADO J. (2002): Reactivity of amino acids in nitrosation reactions and its relation to the alkylating potential of their products. *J Am. Chem. Soc.* 13:2177-82.
- GASPAR, I., *et al.*, (1996): Mutagenic activity of glicina upon nitrosation in the presence of chloride and human gastric juice: a possible role in gastric carcinogenesis. *Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis* 16: 275-286.
- GONZÁLEZ-MANCEBO, S., *et al.*, (1999): Nitrosation of phenolic compounds: Inhibition and enhancement. *J Agricultural and food chemistry* 47: 2235-2240.
- GOVINDARAJAN, R., *et al.*, (2002): Impaired trafficking of connexins in androgen-independent human prostate cancer cell lines and its mitigation by alpha catenin. *J Biol Chem* 20: 50087 -50097.
- GRYCZYNSKI, M., *et al.*, (2000): Expression of selected markers for apoptosis, proliferation and metastasis in evaluation of laryngeal cancer invasiveness dynamics. *Otolaryngol Pol*. 54: 675-679.



- HABERMANN, H., *et al.*, (2001): Developmental exposure to estrogens alters epithelial cell adhesion and gap junction proteins in the adult rat prostate. *Endocrinology* 142: 359-369.
- KING, T.J., *et al.*, (2000): Correlation between growth control, neoplastic potential and endogenous connexin43 expression in HeLa cell lines: implications for tumor progression. *Carcinogenesis* 21:311-315.
- KING, T.J., *et al.*, (2002): Inducible expression of the gap junction protein connexin 43 decreases the neoplastic potential of HT -1080 human fibrosarcoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell* 35: 29-41.
- KHARE, L., *et al.*, (1999): Altered localization of E-cadherin and alpha catenin in rat esophageal tumors. *Int J Oncol* 14: 33-40.
- KNUTSON, J.R., *et al.*, (1996): CD44/chondroitin sulfate proteoglycan and alpha 2 beta 1 integrin mediate human melanoma cell migration on type IV collagen and invasion of basement membranes. *Mol Biol Cell* 7:383-396.
- LARCO, J.E., TODAZO, G.L. (1978): Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *Cell Physiol* 94: 335-342.
- LIVNY, O., *et al.*, (2002): Lycopene inhibits proliferation and enhances gap-junction communication of KB-1 human oral tumor cells. *J Nutr* 132: 3754-3759.
- MARTÍNEZ A., CAMBERO I., IKKEN Y., MARTÍN M. L., HAZA A. I., MORALES P. (1988): Protective effect of broccoli, onion, carrot and licorice extracts against cytotoxicity of Nitrosamines evaluated by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide Assay, *J. Agric. Food Chem.* 46:585-589.
- MATHEWS, C.K., VAN HOLDE, K.E. AND AHERN, K.G. (2002): Bioquímica. 3ª edición. Addison Wesley.
- MOMO, F., *et al.*, (2002): Different effects of propofol and nitrosopropofol on DMPC multilamellar liposomes. *Biophys Chem* 95:145-155.
- NIKOLIC-PATERSON, D.J., Z. JUN, G.H. TESCH, H.Y.LAN, R. FOTI, R.C.ATKINS. (1996): De novo CD44 expression by proliferating mesangial cells in rat anti-Thy 1.1 nephritis. *J. Am. Soc Nephrol.*, 7:1006
- PROVOST, N., *et al.*, (2002): Ultraviolet A radiation transiently disrupts gap junctional communication in human keratinocytes *Am J Physiol Cell Physiol* 284: 51-59.
- RAY-CHANDHURY, P., T.F. KHONG, J.H. WILLIAMS, N.E. HAITES, B. WU, J.G. SIMPSON, D.A. POWER. (1996): CD44 in glomerulonephritis: expression in human renal biopsies, the thy 1.1 model, and by cultured mesangial cells. *Kidney Int.*, 50:272
- SATO, M., *et al.*, (1998): Formation of o-ORG in rat kidney DNA after administration of N-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine. *Cancer Lett* 124: 111-118.
- SUGIMURA T., NAGAS M., WAKABAYASHI K. (2002): How we should deal with unavoidable exposure of man to environmental mutagens: cooked food mutagen discovery, facts and lessons for cancer prevention. *Mutation Res.* 447:15-25.
- TAKASHIMA, K. *et al.* (2001): Strain variation in renal carcinogenesis by N-ethyl-N-hydroxyethyl-nitrosamine in F1 (Wistar-Fischer) rats. *Cancer Lett.* 170:125-130.
- TANNENBAUM, S.R., WISHNOK, J.S., LEAF, C.D. (1991): Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 53: 2475-2505.

- UPPU, R.M., *et al.*, (1998): Nitrosation by peroxyntirite: use of phenol as a probe. *Arch Biochem Biophys* 358: 1-16.
- VERMEER, I.T. *et al.* (1999): Effect of ascorbic acid and green tea on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopiperidine in humans. *Mutat Res.* 428:353-361.
- WEBER, G., *et al.*, (2002): Absence of the CD44 gene prevents sarcoma metastasis. *Cancer Res* 15: 2281-2286.
- XIANG, Q., *et al.*, (2002): Expression of connexin 43 and connexin 45 in nasopharyngeal carcinoma. *Ai Zheng* 21: 593-596.
- YAOITA, E. *et al.* (2002): Up-regulation of connexin43 in glomerular podocytes in response to injury. *Am J Pathol* 161: 1597-1606.
- YOSHIDA, K., *et al.*, (2002): Stem-cell leukemia: p53 deficiency mediated suppression of leukemic differentiation in C3H/He myeloid leukemia. *Leuk Res* 26: 1085-1092.
- ZOLOTA, V., *et al.*, (2002): Expression of CD44 protein in renal cell carcinomas: association with p53 expression. *Urol Oncol* 7: 13-17.