



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT EN LA
ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT-3 EN CULTIVO
PRIMARIO DE HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A:

Biol. Karina Martínez Flores

Directora de Tesis: Dra. Verónica Souza Arroyo

Asesora: Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz

Asesor: Dr. Emilio Rojas del Castillo

México, D.F., Enero del 2009

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA DE TESIS:

Doctora Verónica Souza Arroyo
Profesor Titular C, Tiempo Completo
Laboratorio de Fisiología Celular
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
veso@xanum.uam.mx

ASESORA:

Doctora María Concepción Gutiérrez Ruíz
Profesor Titular C, Tiempo Completo
Laboratorio de Fisiología Celular
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mcgr@xanum.uam.mx

ASESOR:

Doctor Emilio Rojas Del Castillo
Investigador Titular C, Tiempo Completo
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
emilior@servidor.unam.mx

AGRADECIMIENTOS
A CONACYT

El programa de la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I 309-1) pertenece al Programa Nacional de Posgrado de Calidad de CONACYT PIFOP-CONACYT-SEP y cuenta con el apoyo del mismo Consejo a través del convenio 309-0, con la clave C/PFPN-2002-35-32.

Agradezco el apoyo de la beca otorgada por CONACYT con el número de registro 203473, para realizar mi Maestría en Biología Experimental en la UAM-Iztapalapa.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Celular, en el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Verónica Souza Arroyo. El trabajo de investigación fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 39618-M).

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTA:

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mcgr@xanum.uam.mx

VOCAL:

Dra. Leticia Bucio Ortíz
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
lebo@xanum.uam.mx

VOCAL:

Dr. Edmundo Bonilla González
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mundo@xanum.uam.mx

SECRETARIO:

Dr. Emilio Rojas Del Castillo
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Universidad Nacional Autónoma de México
emilior@servidor.unam.mx

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **“PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT EN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT-3 EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO”**, con fecha 14 de ENERO del 2009.

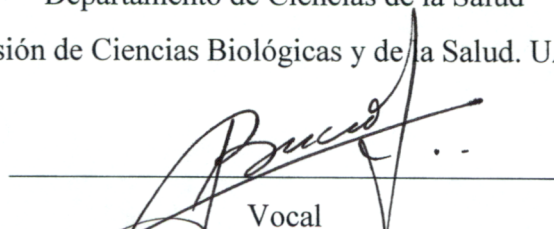
JURADO DE EXÁMEN



Presidenta

DRA. MA. CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUÍZ

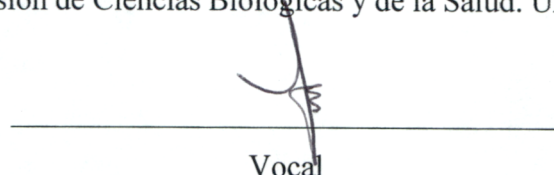
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.



Vocal

DRA. LETICIA BUCIO ORTÍZ

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.



Vocal

DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.



Secretario

DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Verónica Souza Arroyo con mi más profundo y sincero agradecimiento y admiración por su valioso apoyo, paciencia y consejos, no sólo en lo académico sino en lo personal, que me han servido inmensamente como parte de mi formación profesional y personal.

A la Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz con todo mi agradecimiento y estimación por su enorme apoyo y comprensión durante estos dos años de maestría, porque me enseñó muchos valores, no solo profesionales sino personales.

Al Dr. Emilio Rojas Del Castillo un agradecimiento sincero por todas sus observaciones y sugerencias importantes en el desarrollo de la tesis.

A mis queridos amigos y compañeros del laboratorio, con afecto, Lety, Vero, Ely, Luis, Naty, Denisse, Cristina, Mayra, pero en especial a Jorge, Argelia y Berna por tener siempre un tiempo para ayudarme y escucharme, ya que sus consejos fueron claves para la realización de mi proyecto.

Un especial y querido agradecimiento a mí amado y admirado esposo César, porque sin su ejemplo, fortaleza ante las adversidades, apoyo, confianza, consejos y su infinita paciencia no hubiera logrado consolidar esta etapa de mi vida profesional, por eso eres y seguirás siendo mi ejemplo a seguir adelante y no rendirme para alcanzar mis metas, con todo mi amor.

A mi querida Madre María del Rosario, por haberme enseñado con su ejemplo de sacar adelante a dos pequeñas sola, el valor de seguir de pie y no dejarme caer ante las adversidades de la vida, con todo mi amor y respeto.

A la memoria de mi querido Padre Evencio, por haber sido un padre maravilloso, hombre brillante, fuerte y con un corazón de oro, que admiraré y querré por siempre.

A mi querida hermana Adriana por haber participado en mi educación con sus palabras de aliento y confianza en mí, con todo mi amor.

A la memoria de mi querida abuelita María del Rosario, por haberme dado todo su amor incondicional y haber sido parte fundamental de mi educación, con mucho amor.

A la memoria de mi querida suegra Virginia por haberme querido y cuidado como una hija y siempre brindarme palabras de aliento para seguir adelante y valorarme, con sincero y mucho amor.

A mi querido suegro Guillermo por brindarme su valioso y enorme apoyo que ha sido fundamental para impulsarme a seguir adelante, con sincero cariño.

A mis queridos cuñados Claudia, Juan Carlos y Guillermo que me brindaron su apoyo, confianza y cariño como una hermana más, con mucho cariño.

INDICE

Glosario de Abreviaturas.	1
Resumen.	3
1 Introducción.	5
1.1 Aspectos generales del cadmio.	5
1.2 Efecto tóxico del cadmio sobre la salud.	6
1.3 Generalidades del hígado.	7
1.4 Cultivo primario de hepatocitos.	9
1.5 Vía de señalización PI3K/AKT.	9
1.6 Factores de transcripción.	13
1.7 Proteína de choque térmico.	15
2 Justificación.	17
3 Hipótesis.	17
4 Objetivos.	18
5 Material y Métodos.	19
5.1 Cultivo primario de hepatocitos.	19
5.2 Extracción de proteína total.	20
5.3 Análisis por Western blot.	20
5.4 Activación del factor de transcripción Stat-3 en hepatocitos primarios tratados con cadmio.	21
5.5 Participación de la vía de señalización PI3K/Akt en la activación del factor Stat-3.	21
5.6 Activación de la proteína Akt en hepatocitos tratados con CdCl ₂ . .	22
5.7 Activación de ERK1/2 y la participación de la vía PI3K/Akt en la activación de ERK1/2.	22
5.8 Participación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en la activación de Akt, ERK1/2 y el factor Stat-3.	23
5.9 Producción de la proteína Hsp70.	23
5.10 Determinación del contenido de proteína.	23
5.11 Análisis Estadístico.	24

6 Resultados.	25
6.1 Cinética de activación del factor de transcripción Stat-3 en hepatocitos tratados con cadmio.	25
6.2 Participación de la vía de señalización PI3K/Akt en la activación del factor de transcripción Stat-3.	27
6.3 Cinética de activación de Akt (Ser 473) en cultivo primario de hepatocitos tratados con cadmio.	29
6.4 Cinética de activación de Akt (Thr 308) en cultivo primario de hepatocitos tratados con cadmio.	31
6.5 Activación de ERK1/2 en cultivo de hepatocitos tratados con cadmio. .	33
6.6 Relación de la vía PI3K/Akt en la activación de ERK1/2.	35
6.7 Participación de ERO en la activación de Akt (Ser473).	37
6.8 Participación de ERO en la activación de Akt (Thr308).	39
6.9 Participación de ERO en la activación de ERK1/2.	41
6.10 Participación de ERO en la activación de Stat-3.	43
6.11 Expresión de la proteína Hsp70 en cultivo primario de hepatocitos expuestos a cadmio.	45
7 Discusión.	47
7.1 Activación del factor de transcripción Stat-3 en hepatocitos tratados con cadmio.	47
7.2 Participación de la vía de señalización PI3K/Akt en la activación del factor de transcripción Stat-3.	48
7.3 Activación de Akt en cultivo primario de hepatocitos tratados con cadmio.	49
7.4 La vía de señalización PI3K/Akt y su relación en la activación de ERK1/2 en cultivo de hepatocitos tratados con cadmio.	50
7.5 Participación de ERO en la activación de Akt, ERK1/2 y Stat-3.	51
7.6 Expresión de la proteína Hsp70 en cultivo primario de hepatocitos expuestos a cadmio.	52
8 Conclusión.	54
9 Bibliografía.	56

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AKT	Cinasa serina/treonina
AP-1	Proteína activadora-1
BCA	Ácido bicinconínico
CATPEG	Catalasa pegilada
CdCl ₂	Cloruro de cadmio
CO ₂	Dióxido de carbono
CTMP	Proteína moduladora del carboxilo terminal
DTT	Ditiotreitol
ERK1/2	Cinasa reguladora de señal extracelular 1 y 2
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FasL	Ligando Fas
GSH	Glutación
HSC	Células estelares hepáticas
HSE	Elementos de estrés
HSF-I	Factor de transcripción de choque térmico
Hsp70	Proteína de choque térmico 70
IP3	Fosfatidilinositol 3 fosfato
JNK	c-Jun cinasa amino terminal
KC	Células de Kupffer
MAPK's	Proteínas cinasas activadas por mitogeno
MEC	Matriz extracelular
MT	Metalotioneína
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NF-kB	Factor nuclear kappaB
PDK1	Cinasa dependiente de 3-fosfoinositol-1
PDK2	Cinasa dependiente de 3-fosfoinositol-2
PH	Dominio Homologo a plecstrina
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinasa
PKB	Proteína cinasa B
PKC	Proteína cinasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo

PTEN	Fosfatasa y homóloga a tensina
SEC	Células endoteliales sinusoidales
SFB	Suero fetal bovino
SHIP	SH2-fosfatasa inositol
Stat	Transductor de señal y activador de transcripción
TAD	Dominio transcripcional de transactivación

RESUMEN

El cadmio es un metal pesado, ampliamente usado en la manufactura de baterías, estabilizadores, pigmentos, etc. Una vez absorbido, en el humano tiene una vida media de eliminación entre 15 y 20 años. La principal fuente de exposición al cadmio para la población en general, es mediante la ingesta de alimentos contaminados, inhalación de humo de cigarrillo y la contaminación industrial. En humanos y otros mamíferos, afecta varios órganos y tejidos, incluyendo al hígado, el riñón, el pulmón, el páncreas y los huesos. Sin embargo inicialmente se acumula en el hígado en donde los efectos del cadmio se expresan. El cadmio induce la producción de especies reactivas de oxígeno, que se consideran importantes en la activación de factores de transcripción, en particular de Stat-3 cuyo mecanismo de señalización se ha relacionado con las MAPK's y PI3K/Akt. Es por ello, el interés de estudiar al factor de transcripción Stat-3 como mecanismo de respuesta celular en cultivo primario de hepatocitos, tratados con CdCl₂. Se trataron a las células con 5μM de CdCl₂ por diferentes tiempos de incubación y se determinó por Western blot la activación del factor Stat-3, Akt, ERK1/2 y Hsp70. Además, se evaluó la participación de la vía PI3K/Akt en la activación del factor Stat-3 y ERK1/2 utilizando inhibidores específicos de la vía PI3K/Akt: wortmanina para PI3K e inhibidor de Akt II para Akt. Para determinar la participación de las ERO en la activación de Akt, ERK1/2 y Stat-3 se pre-trataron los hepatocitos con un antioxidante catalasa pegilada (CATPEG) por 30 min. Se observó un incremento en la activación del factor a partir de la media hora, incrementándose hasta las 2 horas y comenzando a declinar a partir de las 3 horas. Con los inhibidores se observó que la activación del factor Stat-3 se ve disminuida significativamente con ambos inhibidores comparando con las células que fueron tratadas solo con cadmio. Además, la activación de Akt fosforilada en serina 473 y treonina 308 se inicia a los 5 minutos y esta va incrementando hasta los 30 minutos, disminuyendo a partir de las 2 horas. Por otra parte la cinética de ERK se observa que a los 15 minutos inicia su activación, incrementándose hasta las 2 horas y declinando a las 3 horas. Con los inhibidores se observó que la activación ERK1/2 se ve disminuida significativamente con ambos inhibidores comparado con las células que fueron tratadas sólo con cadmio. También se encontró que cuando se pre-tratan a los hepatocitos con un antioxidante, la activación de Akt, ERK1/2 y Stat-3 se ve disminuida de una manera significativa con respecto a los hepatocitos tratados con solamente cadmio. Estos resultados indican que el cadmio activa al factor de transcripción Stat-3 en cultivo primario de hepatocitos y que esta

actividad es mediada por PI3K/Akt y ERK1/2 inducidos por las ERO generadas por el cadmio, dando como respuesta celular la expresión de la Hsp70.

PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT EN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT-3 EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ASPECTOS GENERALES DEL CADMIO

El cadmio es un metal ampliamente usado en la manufactura de baterías, estabilizadores, pigmentos, etc. Coexiste con fierro, zinc y cobre en varios productos y la liberación de cadmio al medio ambiente ocurre paralelamente a la liberación de otros metales (OECD, 1994). La vida media de eliminación del metal es entre 15 y 20 años en el humano (Goyer, 1997; Valko y col., 2005). La principal fuente de exposición al cadmio para la población en general, es la ingesta de alimentos contaminados, donde aproximadamente el 70% del cadmio es absorbido por el organismo, porcentaje que se modifica en personas fumadoras debido a que cada cigarro puede contener de 1-2 μ moles de cadmio y del 40-60% del cadmio que se inhala pasa a través del epitelio pulmonar a la circulación sistémica (ATSDR, 1999). En humanos y otros mamíferos, afecta varios órganos y tejidos, incluyendo al hígado, el riñón, el pulmón, el páncreas y los huesos (Diamond y Zalpus, 1998). Sin embargo, inicialmente se acumula en el hígado (Rikans y Yamano, 2000; Urani y col., 2007) y es donde muchos de los efectos tóxicos del cadmio se expresan. En el hombre, se estima que la absorción del cadmio por el tracto gastrointestinal es de alrededor del 8% del total ingerido. Sin embargo, este valor puede variar por algunos factores nutricionales y fisiopatológicos. Así, en personas con bajas reservas de hierro, la proporción de cadmio absorbido es mayor. Por otra parte, se ha observado que en animales con una dieta baja en calcio y proteínas aumenta la absorción de cadmio. En general, la absorción de cadmio en el intestino se produce en dos etapas. En la primera, las células de la mucosa internalizan el cadmio presente en el lumen intestinal y en la segunda, una parte del cadmio atraviesa la membrana basolateral de los enterocitos para pasar a la circulación sanguínea (Andersen y col., 1994). Una vez absorbido, el cadmio pasa a la circulación sanguínea y es transportado por la albúmina a los tejidos. La albúmina se encuentra en concentraciones altas en el plasma (3-5 g/dl) y contiene un grupo sulfhidrilo reducido donde se une el metal (Del Raso y col., 2003). De esta forma llega al hígado y a los riñones donde se almacena. Sólo entre estos dos órganos se acumula del 40 al 80% del cadmio presente

en el organismo. Otras moléculas que sirven como transportadores del cadmio en la sangre son de bajo peso molecular y contienen grupos sulfhidrilo como la cisteína, el glutatión (GSH), las metalotioneínas (MTs), la ferritina y la transferrina. Bajo condiciones fisiológicas el cadmio se une a los grupos sulfhidrilo con mayor afinidad que a los grupos fosfato, cloruro, carboxilo o amino (Goering y Klaassen, 1997). La importancia de la interacción del cadmio con los grupos sulfhidrilo es demostrada por la MTs y el GSH que contienen residuos de cisteína en su estructura. Las MTs son una familia de proteínas de bajo peso molecular (6-7 kDa) constituida por cuatro isoformas que son la: MT-I, la MT-II, la MT-III y la MT-IV. La MT-I y la MT-II son expresadas en el hígado mientras que la MT-III es expresada en cerebro y la MT-IV es expresada en epitelio estratificado (Quaife y col., 1994). Las MTs tienen un papel muy importante en la homeostasis de los metales esenciales como el Zn, el Cu y en la protección contra las especies reactivas de oxígeno (ERO) y la toxicidad producida por el cadmio (Klaassen y Liu, 1998; Klaassen y col., 1999). El cadmio en el hígado se une a la metalotioneína y este complejo MT-Cd formado es transportado al riñón donde se considera que induce daño a la nefrona (Diamond y Zalpus, 1998). El cadmio es eliminado del organismo muy lentamente con la orina, las heces y sólo pequeñas cantidades del metal se llegan a eliminar con el sudor, la exfoliación epitelial y el pelo.

1.2 EFECTO TÓXICO DEL CADMIO SOBRE LA SALUD

El efecto del cadmio en los seres humanos depende de diferentes factores incluyendo la dosis, forma química, ruta de exposición y duración de la exposición. Cuando se ingieren alimentos o bebidas con altas concentraciones de cadmio se puede presentar irritación estomacal, náusea, vómito y diarrea, dolor abdominal y muscular (ATSDR, 1999). Los efectos de la intoxicación por inhalación crónica (exposición prolongada a humos o polvos del metal) son más graves. En este caso, el cadmio puede provocar enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva, fibrosis, neumonitis y edema pulmonar. Está comprobado que el daño que provoca el cadmio en los fumadores es mayor y que la concentración de cadmio en los pulmones es más elevada en estos individuos. Las principales alteraciones sistémicas debidas a la absorción de cadmio consisten en daño renal con proteinuria y anemia. De estos daños la proteinuria es el más típico, caracterizada por la α , β , γ -globulinuria, albuminuria e inmunoglobulinuria y en etapas avanzadas puede haber aumento en la excreción de aminoácidos, glucosa,

calcio y fosfatos en orina, lo cual puede causar la formación de cálculos renales (Diamond y Zalpus, 1998).

1.3 GENERALIDADES DEL HÍGADO

El hígado es el órgano más grande del cuerpo humano, pesa alrededor de 1.5 – 1.8 kg, lo que representa el 2% del peso total del cuerpo. La función del hígado es comparable a la del estómago, intestino, páncreas y riñón juntos, debido a que es el responsable de la síntesis de proteínas del suero, almacena nutrientes y energía derivada de la oxidación de nutrientes, transforma la glucosa, lípidos, proteínas, purifica la sangre de sustancias dañinas, produce la bilis que favorece la digestión de grasas y juega un papel muy importante en la degradación y síntesis del colesterol (Dufour y Clavien, 2005).

Este órgano se encuentra compuesto por varios tipos celulares, de los cuales el más abundante son los hepatocitos que ocupan alrededor del 80% del volumen total del hígado y que es el encargado de llevar acabo la mayoría de las funciones hepáticas. Por otra parte, las células no parenquimatosas contribuyen con sólo el 6.5% del volumen del hígado pero constituyen el 40% del número total de células hepáticas, se encuentran localizadas en el compartimiento sinusoidal del tejido. El sinusoides hepático es una línea constituida de tres tipos celulares: células endoteliales sinusoidales (SEC), células de Kupffer (KC) y células estelares hepáticas (HSC). Aunque también se encuentran linfocitos intrahepáticos como las células Pit (Fig. 1).

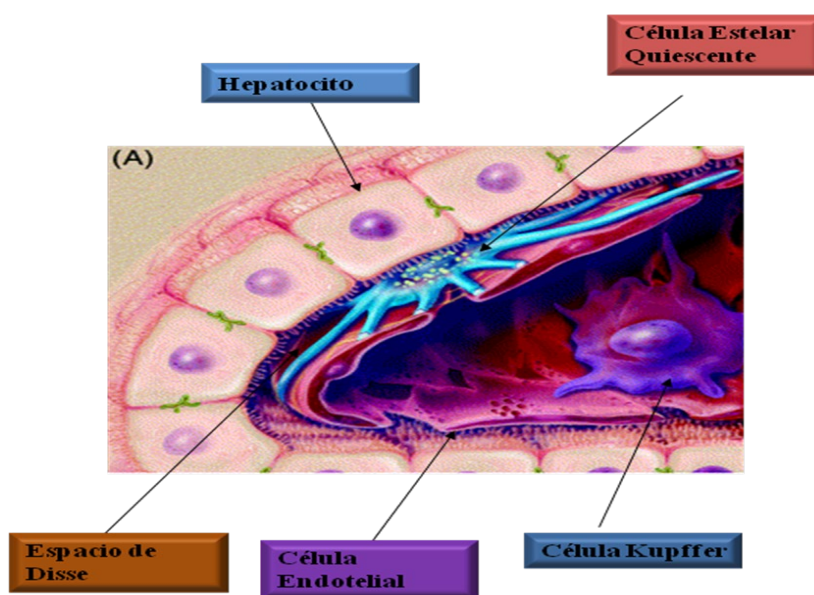


Figura 1. Tipos celulares hepáticos.

Las células endoteliales sinusoidales constituyen el sinusoides hepático, además llevan a cabo la importante función del filtrado, gracias a la presencia de pequeñas fenestraciones que les permiten una libre difusión de muchas sustancias, pero no de partículas del tamaño de quilomicrones, entre la sangre y la superficie del hepatocito.

Las células de Kupffer son macrófagos residentes y se encuentran localizadas intrasinusoidalmente, con una alta capacidad endocítica y fagocítica. Se encuentran en constante contacto con las partículas derivadas del intestino y productos bacterianos. Secretan potentes mediadores de respuesta inflamatoria por lo cual estas células juegan un papel muy importante en la respuesta inmune. Además, durante el daño hepático las células Kupffer secretan enzimas que pueden proteger a los hepatocitos y estar activos en la remodelación de la matriz extracelular (MEC).

Las células estelares se encuentran ubicadas en el espacio de Disse (Fig. 1). Se caracterizan porque almacenan más del 85% de vitamina A de todo el cuerpo, controlan el flujo sanguíneo a través de la contracción y dilatación del lumen sinusoidal, sintetizan la mayor cantidad de MEC y las enzimas que degradan a la MEC. En un daño agudo a los hepatocitos, las células estelares sufren una transformación de células quiescentes a células activas que juegan un papel muy importante en la respuesta fibrótica.

Las células Pit son linfocitos hepáticos, que presentan gran actividad endocítica y exocítica. Participan en la respuesta antitumoral. En modelos de rata se determinó que estas células inducen apoptosis en carcinoma de colon (Kmiec, 2001).

La entrada del cadmio a la célula no es uniforme, esto puede ser mediado por transporte pasivo o activo (Wispiyano y col., 1998) o vía canales de calcio (Shafer, 1998; Urani y col., 2007). Estudios en nuestro grupo y en grupos que han trabajado con cultivo primario de hepatocitos señalan que una tercera parte del cadmio entra a los hepatocitos por canales de calcio operados por receptores y sensibles a voltaje (Souza y col., 1997; Zalpus y Ahmad, 2003; Deckert, 2005; Wang y col., 2007). También se ha reportado que los grupos sulfhidrilo localizados en las membranas participan en la entrada de cadmio en células Caco-2 (Pigman y col., 1997) y en células WRL-68 (Souza y col., 1997). A nivel celular, el cadmio disminuye los grupos sulfhidrilo de las proteínas y del glutatión (GSH), debido a que tiene gran afinidad por estos grupos, por lo que este metal está asociado a estrés oxidativo (Rikans y Yamano, 2000; Hsiao y Stapleton, 2004; Deckert, 2005) y a la formación de ERO debido que disminuye el glutatión, que es muy importante para mantener la homeostasis del estado redox celular (Valko y col., 2005). Estas ERO, incrementan la lipoperoxidación (Souza y col., 2004),

alteran el estado redox intracelular, producen daño en el ADN (López-Ortal y col., 1999) y en las membranas biológicas; además, alteran la expresión de genes (Escobar y col., 2002).

1.4 CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS

La saga del aislamiento de hepatocitos comenzó hace 40 años con el objetivo de mejorar el método para estudio de parásitos de la malaria. El método de preparación de hepatocitos intactos fue el primero en describirse en 1969 y desde entonces ha sufrido muchas modificaciones. Las técnicas más comúnmente usadas fueron introducidas en 1976 y se desarrollan en dos pasos, incluyendo perfusión *in situ* y con purificación basada en la densidad celular. La perfusión usa medio libre de Ca^{2+} , crucial para la separación celular y subsecuentemente un medio rico en Ca^{2+} conteniendo una enzima dependiente de Ca^{2+} , la colagenasa para la digestión. El uso apropiado de la colagenasa es absolutamente crucial para la preparación de los hepatocitos. Frecuentemente, las dificultades para obtener una buena disociación celular son atribuidas a la contaminación de la colagenasa con otras proteasas, lo cual varía dependiendo del procesamiento de lotes. Otro paso crítico es la obtención misma de los hepatocitos. Aunque en todos los protocolos de purificación para hepatocitos primarios de ratón confían en la centrifugación a través de un gradiente de Percoll. Este polímero remueve células no parenquimáticas, células muertas y restos celulares, pero el grado de purificación de los hepatocitos ha sido difícil de obtener, sin embargo se ha introducido para evaluar esta purificación por medio de citometría de flujo (Goncalves y col., 2007).

1.5 VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT

La vía de señalización fosfatidilinositol-3 cinasa/ cinasa serina/treonina (PI3K/Akt) es crucial para una amplia cantidad de procesos fisiológicos que incluyen la progresión del ciclo celular, diferenciación celular, apoptosis y sobrevivencia. La vía PI3K/Akt se sabe que es sensible a EROS, porque estas tiene un papel de mediadoras en cascadas de señalización (Fig.2) (Osaki y col., 2004; Sauer y col., 2004; Chuan-Ming y col., 2007).

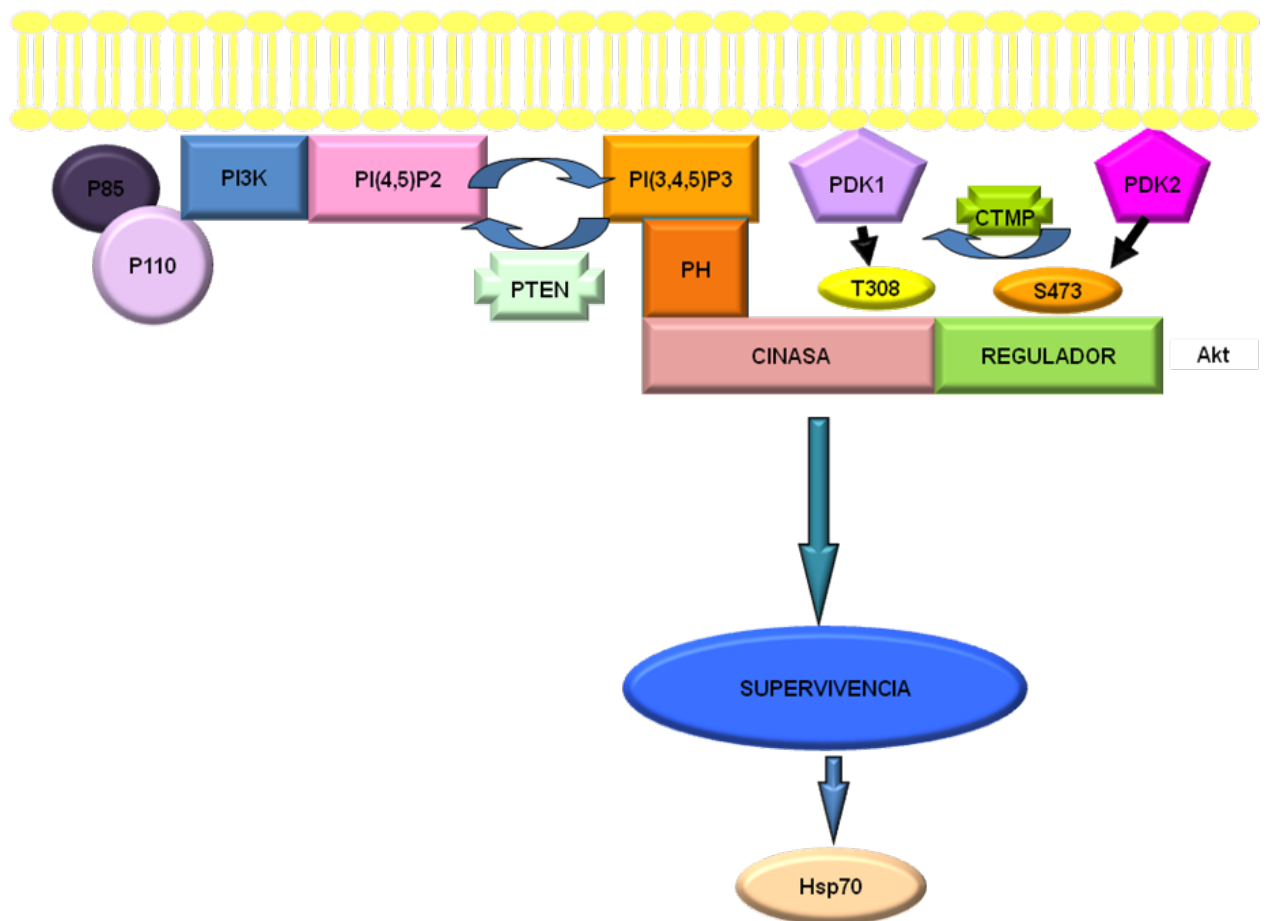


Figura 2. Vía de Señalización de PI3K/Akt.

Una de las proteínas que forma parte de la vía PI3K/Akt, es la cinasa serina treonina (Akt), también llamada proteína cinasa B (PKB) (Osaki y col., 2004). El genoma de mamíferos tiene tres genes *Akt*, que codifican para tres isoformas de Akt: Akt1/ α , Akt2/ β y Akt3/ γ . Akt2 y Akt3 tienen un 81 y 83% de similitud en la secuencia de aminoácidos con Akt1, respectivamente. Cada gen codifica para una proteína que contiene un dominio homólogo de plekstrina (PH) en la región N-terminal, un dominio central cinasa y un dominio regulatorio en la región C-terminal (Fig.3). Los tres genes *Akt* son ampliamente expresados en varios tejidos, pero la isoforma Akt1 es la más abundante en cerebro, corazón y pulmón, mientras que Akt2 es expresada en tejidos sensibles a insulina incluyendo el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, y Akt3 se expresa poco en órganos intestinales y tejido muscular, pero es predominantemente expresado en cerebro, riñón y testículo (Osaki y col., 2004; Thomas y col., 2005). La localización cromosómica de cada gen *Akt* ha sido identificado como 14q32 (Akt1), 19q13.1-13.2 (Akt2) y 1q44 (Akt3). El primer paso en la activación de Akt, involucra

su translocación del citosol a la membrana plasmática dependiente de PI3K (Andjelkovic y col. 1997).

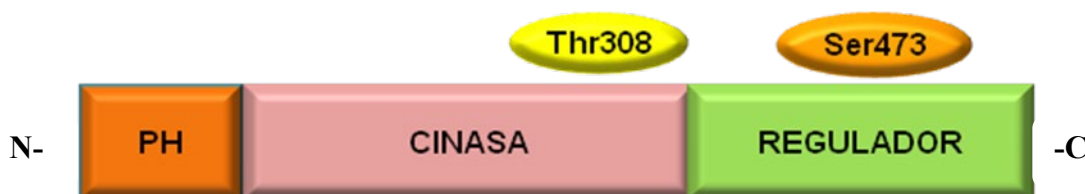


Figura 3. Estructura de los dominios de Akt.

PI3K está compuesta de dos subunidades, una catalítica (p110) y una adaptadora/reguladora (p85), esta subunidad se caracteriza por estar constituida de dos dominios SH2 separados por un dominio iSH2, dos fragmentos ricos en prolina, separados por un dominio BCR (punto de ruptura) y varios dominios SH3 (Krasilnikov, 2000). Además ésta proteína (PI3K) es la responsable de la fosforilación en la posición tres del anillo del inositol de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PI(4,5)P₂), para generar fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PI(3,4,5)P₃), un potente segundo mensajero requerido para la señalización de sobrevivencia. La acción de PI3K de fosforilar a PI(4,5)P₂ está regulada por la fosfatasa y homóloga a tensina (PTEN) que realiza la reacción inversa. La cinasa Akt sufre un cambio conformacional por la fosforilación de PI(4,5)P₂ a PI(3,4,5)P₃, lo que da como resultado su translocación a la membrana plasmática, seguido a esto interactúa con PI(3,4,5)P₃ vía su dominio PH, sufriendo otro cambio conformacional para ser fosforilada en dos sitios regulatorios Thr308 y Ser473. La fosforilación en el sitio Thr308 está dada por la cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositol (PDK1) y la del sitio Ser473 es dada por cinasa 2 dependiente de 3-fosfoinositol (PDK2), por otra parte, la proteína moduladora del carboxilo terminal (CTMP) realiza la reacción inversa de éstas (Osaki y col., 2004). La fosforilación de Thr308 y de Ser473, pueden ocurrir independientemente una de la otra, diversos estudios han demostrado que la inhibición de la activación de Akt vía PDK1 lleva a una elevada fosforilación en el sitio Ser473 (Kawakami y col., 2004).

Akt regula la sobrevivencia celular a través de la fosforilación de substratos que controlan directa o indirectamente los mecanismos de la maquinaria apoptótica. Una de las proteínas apoptóticas sobre la que actúa Akt para inactivarla es la proteína Bad, que controla la liberación de citocromo C de la mitocondria. También ejerce de manera

indirecta el control de la apoptosis a través de la regulación de la transcripción, mediante la fosforilación de los factores de transcripción tales como AFX, FKHR y FKHRL1, con lo que se inhibe la transcripción de genes pro-apoptóticos, tales como *FasL*, *IGFBP-1* y *Bim* (Osaki y col., 2004).

Akt también fosforila y activa a proteínas relacionadas a elementos de respuesta al AMP cíclico, con lo que incrementa la transcripción de genes anti-apoptóticos, tales como *Bcl-2*, *Mcl-1* (Osaki y col., 2004).

En cuanto a la regulación negativa de la vía PI3K/Akt como ya se había mencionado ésta va acompañada por PTEN, que fue originalmente identificada como tumor-supresor y es frecuentemente afectada por mutaciones en células germinales y somáticas en cáncer humano.

El principal sustrato lipídico de PTEN es PI(3,4,5)P₃, el cual es uno de los productos de PI3K. PTEN reduce la cantidad de PI(3,4,5)P₃ y lo cambia a PI(4,5)P₂ a través de la desfosforilación en la posición 3 del inositol (Martelli y col., 2006).

La actividad de Akt también está regulada negativamente por SH2-fosfatasa inositol (SHIP) y CTMP. SHIP es una fosfatasa, la cual desfosforila a PI(3,4,5)P₃ a nivel de la posición 5 y regula los niveles intracelulares de los fosfoinosítoles que activan Akt, sin embargo la importancia regulatoria en la vía de SHIP es poco clara. Por otra parte la CTMP ha sido una proteína de nuevo descubrimiento en la regulación de la vía, pero se ha reportado que ésta proteína está relacionada específicamente a nivel del dominio regulatorio del extremo carboxilo terminal de Akt en la membrana plasmática y reduce la actividad de Akt por inhibir la fosforilación a nivel de la serina 473 (Osaki y col., 2004).

Es importante enfatizar que PI3K puede controlar a la vía de MAPK's y lo realiza uniéndose con proteínas fosforiladas en tirosina y/o pequeñas proteínas G (ras, rac, Cdc42), lo que lleva a la síntesis de fosfoinosítoles que pueden activar a proteínas cinasas (Akt, PKC, PDK) y participar en la activación de las MAPK's. Por otra parte, se ha encontrado que la activación de la vía de las MAPK's no tiene un efecto anti-apoptótico significativo, sino que dicha característica fue detectada en Akt, que es activada por PI3K, considerándose uno de los principales factores intracelulares responsables para la transmisión de señal anti-apoptótica y controlar la sobrevivencia celular. La sobreexpresión de PI3K en las células es acompañado por un marcado efecto anti-apoptótico y causa un significativo incremento en la sobrevivencia celular. Por el

contrario, inhibidores específicos de PI3K causan un incremento de apoptosis y un decremento de la sobrevivencia celular (Krasilnikov, 2000).

1.6 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

El cadmio lleva a la activación o silenciamiento de genes de factores que regulan la transcripción, proteínas de fase aguda, enzimas antioxidantes y proteínas estructurales. El cadmio es un inductor efectivo de un gran número de proteínas de estrés entre las que se encuentran la hemoxigenasa-1, la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) (Souza y col., 2004), Hsp90 y la metalotioneína (Liu y col., 2002).

El primer paso en la transcripción depende de la actividad de factores proteicos específicos conocidos como factores de transcripción, tales como la proteína activadora-1 (AP-1), el factor nuclear kappaB (NF-kB) y el transductor de señal y activador de transcripción (Stat). Aunque un factor de transcripción puede jugar un papel dominante en la determinación de la expresión de ciertos genes, la activación transcripcional generalmente involucra la acción sinérgica de más de un factor de transcripción específico, además de aquellos de la maquinaria de transcripción básica.

La exposición al cadmio induce la producción de especies reactivas de oxígeno, que se consideran importantes en la activación de factores de transcripción, en particular de Stat-3 (Gao, 2005).

La familia de Stat's son factores de transcripción citoplasmáticos que está conformada por seis isorformas: Stat-1, Stat-2, Stat-3, Stat-4, Stat-5 y Stat-6 (Rawlings y col., 2004). Estos factores de transcripción están latentes en el citosol y son activados por fosforilación en Tyr 705 por la familia de las JAKs (Jak1, Jak2, Jak3) que son tirosina cinasas (Ortmann y col., 2000), lo cual permite que las Stat's se dimericen y se transloquen al núcleo y de esta manera regulen la expresión genética. También el factor Stat es fosforilado por la familia de la MAPK's (ERK1/2, JNK y P38) pero en el residuo Ser 727 (Lim y Cao, 1999). Su dominio C-terminal contiene el dominio transcripcional de transactivación (TAD), sitio de fosforilación por las MAPK's, por lo que es esencial para la función máxima de las Stat's (Fig. 4).

La estructura de la Stat-3 está muy conservada en sus dominios de doble enrollado de 114-317 residuos, dominio relacionado a DNA con 320-490 residuos, dominio de unión con 490-580 residuos y el dominio SH2 con 580-680 residuos. El dominio TAD con 680-750 residuos está también altamente conservado (Fig.5). En contraste, el dominio amino terminal está poco conservado lo que sugiere que está

involucrado en mediar respuesta específica. Y tanto el dominio doble enrollado y SH2 están involucrados en la interacción proteína proteína (Stephanou, 2004).

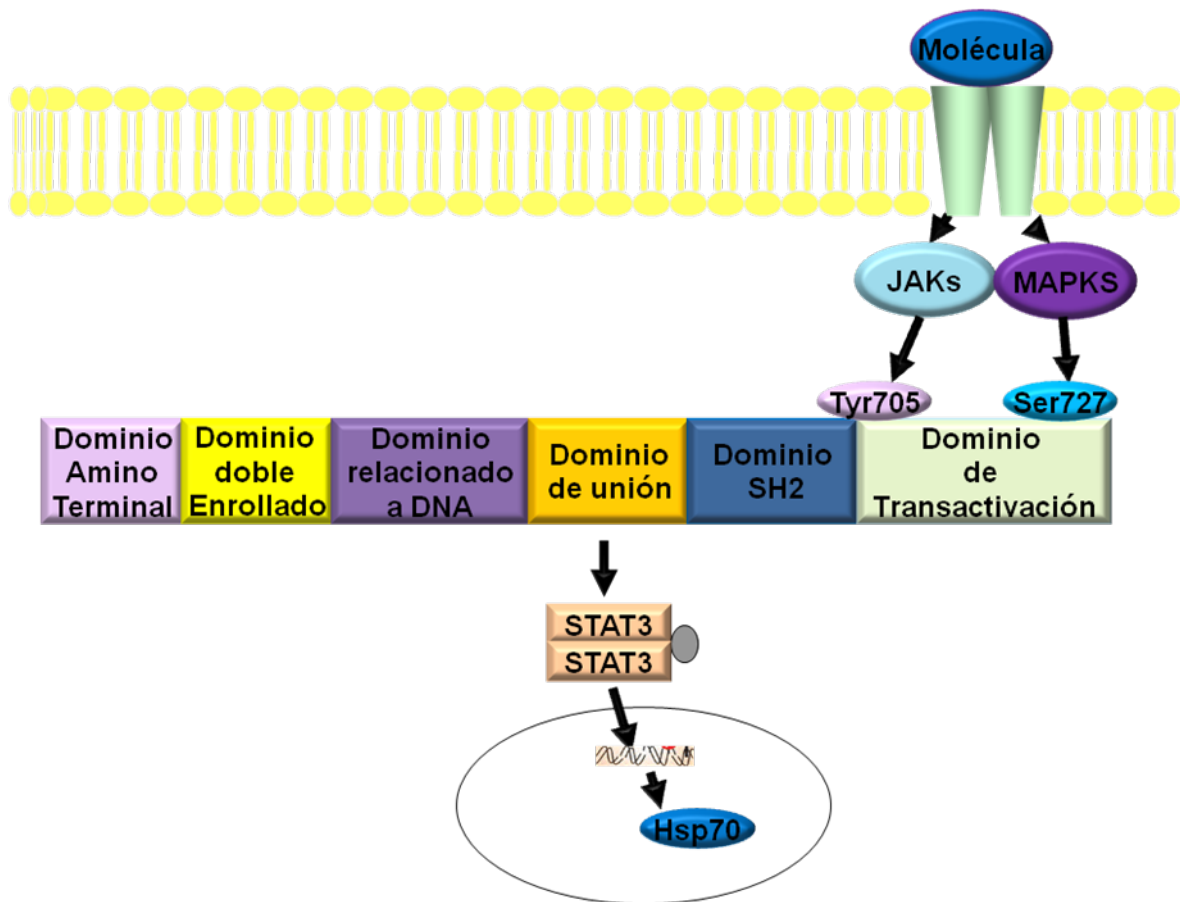


Figura 4. Activación del factor de transcripción Stat-3.



Figura 5. Estructura de Stat-3, incluyendo los dos sitios de fosforilación por MAPK's (Ser 727) y JAK (Tyr 705).

Aunque el mecanismo de señalización de MAPK/STAT es relativamente simple en teoría, las consecuencias biológicas de la vía activa son complicadas por la interacción con otras vías de señalización (Heinrich y col., 2003) como la PI3K/Akt que es activada (Ferrand y col., 2004), por lo que la relación entre estas cascadas es muy compleja.

En el hígado el factor Stat-3 tiene un papel importante en la respuesta de fase aguda, protección contra el daño, regeneración hepática, homeostasis de glucosa y en el metabolismo hepático (Gao, 2005). Existe evidencia que la activación de Stat-3, ERK y PI3K/Akt están implicadas en la hepatoprotección (Bustos y col., 2003).

También se ha encontrado que la fosforilación en serina en Stat-3 no es suficiente para la unión directa al DNA, esto indica que existe una vía alternativa por el cual Stat-3 pueda activar genes blancos. Por ejemplo Stat-3 fosforilado en serina puede actuar con el factor de transcripción de choque térmico (HSF-I) como un co-activador transcripcional, de genes blanco como el de la proteína Hsp70, que se sabe está una región específica que reconoce Stat-3 para inducir su expresión (Dudley y col., 2004).

1.7 PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO

El término de proteína de estrés o de choque térmico (Hsps), designa a una clase de proteínas que son inducidas por calor y agentes estresores como el cadmio (Goering y col., 1993) y las ERO (Vayssier y Polla, 1998). Estas proteínas son clasificadas de acuerdo a su función y tamaño molecular (15-110 kDa) (Kregel, 2002). Las Hsps están presentes en el citosol, la mitocondria, el retículo endoplásmico y en el núcleo (Feder y Hofmann, 1999). Estas proteínas funcionan como chaperonas, porque participan en la localización, regulación, secreción y degradación de proteínas. Así mismo, se les han atribuido efectos citoprotectores. Entre las Hsps más estudiadas está la familia Hsp70 (Hsp72, Hsp73, Hsp75 y Hsp78) ya que son las más sensibles al cambio de temperatura y las más conservadas. Entre las funciones de las Hsp70 están el mantener la estructura de las proteínas, la translocación de las proteínas a través de las membranas de varios compartimientos celulares, el prevenir la agregación de las proteínas y la degradación de proteínas inestables. El gen de la Hsp70 contiene dos elementos regulatorios que interactúan con un factor de transcripción de choque térmico (HSF). Este HSF-I se une a elementos de estrés (HSE) en la región promotora del gen Hsp70 en condiciones de estrés e induce la transcripción de la Hsp70 (Peterson y Lindquist, 1989; Stephanou, 1999). Se conoce que la inducción de la Hsp70 por las ERO es por un mecanismo que

involucra al factor HSF-I (Jacquier-Sarlin y Polla, 1996). Existen evidencias de que la función principal de la Hsp70 es la tolerancia a una gran variedad de agentes estresores (Jaattela, 1993). Aunque el mecanismo de citoprotección no se conoce exactamente, se le ha atribuido a la Hsp70, un papel muy importante en el estado redox de la célula por protegerla de los efectos de las ERO (Jacquier-Sarlin y Polla, 1996).

Por otra parte se sabe que el cadmio es capaz de inducir la expresión de esta proteína Hsp70 como una respuesta celular (Bertin y Auerbeck, 2006).

2 JUSTIFICACIÓN

Se ha encontrado que el cadmio activa la vía de señalización PI3K/Akt y que ésta es sensible a ERO. Así mismo, el cadmio activa al factor de transcripción Stat-3, sin embargo no se conoce con exactitud la vía de transducción de señales para una respuesta celular por el cadmio, por lo que se pretende evaluar el papel de la vía PI3K/Akt en la activación del factor de transcripción Stat-3 en hepatocitos.

3 HIPÓTESIS

El cadmio es un metal hepatotóxico, que genera ERO. La vía PI3K/Akt y el factor de transcripción Stat-3 son sensibles a ERO, por lo que se espera que la vía PI3K/Akt participe en la activación de Stat3, el cual activa genes de sobrevivencia como respuesta celular.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de la vía de señalización PI3K/Akt en la activación del factor de transcripción Stat-3 en hepatocitos primarios expuestos a cadmio.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar la cinética de activación del factor de transcripción Stat-3 en hepatocitos primarios tratados con cadmio por diferentes tiempos (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 h).
- 2) Evaluar la participación de la vía de señalización PI3K/Akt en la activación del factor de transcripción Stat-3 en hepatocitos primarios tratados con cadmio.
- 3) Determinar la cinética de activación para Akt en cultivo primario de hepatocitos tratados con cadmio.
- 4) Determinar la relación de la vía de señalización PI3K/Akt en la activación de ERK1/2 en cultivo de hepatocitos tratados con cadmio.
- 5) Determinar la participación de ERO en la activación de AKT, ERK1/2 y Stat3.
- 6) Evaluar la expresión de la proteína Hsp70 en cultivo primario de hepatocitos expuestos a cadmio.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1, de 8 a 12 semanas de edad. Se anestesiaron intraperitonealmente utilizando 0.7 ml de Avertina. La superficie abdominal se lavó con etanol 70%, y se procedió a hacer una incisión en el atrio derecho del corazón, en el que se introdujo un catéter (Abbocath 22G) acoplado a un equipo de perfusión. La vena cava inferior se anudó con hilo de sutura para evitar el paso de las soluciones utilizadas hacia los riñones, posteriormente se seccionó la vena porta para abrir la circulación. Se perfundió con aproximadamente 30 ml de amortiguador HBSS sin Calcio ni Magnesio que contenía HEPES 10 mM y EGTA 75 mM a pH 7.4 (Gibco). La velocidad de la perfusión se controló con una bomba peristáltica a 3.8 ml/min. En el segundo paso de la perfusión se utilizaron 50 ml de colagenasa tipo I (Sigma) a una concentración de 0.1% en Medio Williams (Sigma) con NaHCO_3 25 mM (J.T.Baker) y amortiguado con HEPES 10 mM (Gibco) a pH 7.4. Posterior a la colagenasa se extrajo el hígado y se colocó en una caja de Petri de 10 cm de diámetro con 50 ml de medio Williams frío suplementado con Suero Fetal de Bovino (SFB) (Hyclone) al 10%, 1% Antibiótico-Antimicótico (Gibco) (referido en adelante como medio de adhesión). La cápsula de Glisson, membrana de tejido conectivo que rodea al hígado, se rompió utilizando 2 pipetas estériles de 1 ml, con lo que se dispersaron las células hepáticas y se obtuvo una suspensión celular que se pasó por un filtro con un tamaño de poro de 100 μm . El filtrado se centrifugó a 500 rpm durante 5 minutos a 4 °C, para después succionar el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 25 ml de medio de adhesión frío. Esta suspensión celular se depositó sobre una solución de Percoll (Sigma) que contenía amortiguador HBSS 1X (Gibco) y ambas fases se homogenizaron suavemente invirtiendo 3 veces y posteriormente se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, obteniéndose un botón compuesto por hepatocitos viables. El sobrenadante se succionó y las células se resuspendieron en 20 ml de medio de adhesión frío. Una alícuota de 100 μl se utilizó para contar las células en un hematocitómetro usando tinción con azul tripano. El porcentaje de células viables obtenidas fue de al menos 90% y se obtuvieron típicamente 45 millones de hepatocitos. Las células se sembraron en una densidad de 1×10^6 células en cajas de Petri de 6 cm de diámetro y se incubaron a 37 °C en una atmósfera que contenía 5% de CO_2 . Después de que los hepatocitos se adhirieron (3 horas aproximadamente), se les cambió el medio de

adhesión por Medio Williams con antibiótico y antimicótico, sin SFB. Antes de poner los tratamientos, las células se dejaron en el medio sin SFB 12 h.

5.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

La extracción de la proteína total utilizada en la técnica de Western blot, de los hepatocitos tratados con y sin CdCl₂, se les agregaron 200 µl de un amortiguador de lisis, formado por 10 ml de Reactivo de Extracción de Proteína M-PER (Pierce), 100 µl DTT 1M, 100 µl PMSF 1M, una pastilla de inhibidor de proteasas (Complete, Roche) y una pastilla de inhibidor de fosfatasas (Roche). Los hepatocitos con el amortiguador se dejaron 15 min a 4 °C moviendo continuamente, pasado los 15 min los hepatocitos fueron raspados con un gendarme. Después se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min a 4° C. El sobrenadante conteniendo la proteína celular se almaceno en pequeños volúmenes y se guardó a -20° C. De una de las alícuotas se cuantificó la concentración de proteína con el kit BCA (Pierce).

5.3 ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

El ensayo de Western blot se realizó de acuerdo con el método descrito por Simon y col. (1998). Se tomaron 100 µg de la proteína total y se le agregó amortiguador de muestra 2X formado por Tris-HCl 0.1 M pH 6.8, glicerol, SDS al 20%, 2-β-mercapto etanol y azul de bromofenol al 0.1%. Las muestras se dejaron 5 min a 95° C y se corrieron en geles de acrilamida-bisacrilamida (BioRad) al 10% en un amortiguador formado por Tris HCl 1.5M pH 8.8, SDS al 10%. Después, las muestras se dejaron correr en una cámara de electroforesis (mini-Protean II, Bio-Rad) con un amortiguador de corrida formado por Tris-Base 0.125M, glicina 0.96M y SDS al 0.5% a 120 Volts por 90 min. La proteína se transfirió a una membrana de difloruro de polivinilideno (PVDF, Amersham Biotech) usando un amortiguador de transferencia formado por Tris-Base 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, SDS al 0.05% y metanol al 20% por 14 h a 30 Volts a 25° C. Después la membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada al 5% en amortiguador TBS-Tween formado por NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM y Tween 20 al 0.1 % pH 7.5 por 30 min dos veces. Posteriormente, se lavó con TBS-Tween 20 varias veces y se le agregó un anticuerpo primario específico para cada proteína como: p-Stat-3 (Ser727) a una dilución 1:3000 (Biosource), Stat-3 a una dilución 1:500 (Santa Cruz Biotechnology); p-Akt (Ser473), p-Akt (Thr308) y Akt a una dilución 1:1000 (Cell Signaling, Technology); p-ERK1/2 y

ERK1/2 a una concentración 1:500 (Santa Cruz, Biotechnology); Hsp70 y Actina en una dilución 1:1000 (Cell Signaling, Technology) por 1h. Se lavó con TBS-Tween suplementado con leche durante 10 min dos veces. Posteriormente se realizaron otros dos lavados con TBS-Tween durante 5 min. Después se les agregó el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa a una dilución 1:1000 (Santa Cruz, Biotechnology) por 1h. La membrana se lavó con TBS-Tween 10 min por triplicado y uno con sólo TBS. Finalmente la membrana se trató con el kit SuperSignal West Pico Substrate (Pierce) durante 5 min y se determinó su densitometría en un Imging System Gel Logic 1500 además y se reveló en una placa radiográfica (Kodak).

5.4 ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT-3 EN HEPATOCITOS PRIMARIOS TRATADOS CON CADMIO

Para poder evaluar la activación del factor de transcripción Stat-3, los hepatocitos primarios se sembraron en cajas de Petri de 6 cm a una densidad de 1×10^6 células/caja y se dejaron por 12 h en medio con antibiótico y antimicótico sin SFB. Pasado ese tiempo se les cambió el medio por uno sin suero y sin antibiótico y antimicótico conteniendo $5 \mu\text{M}$ de CdCl_2 y se dejaron incubar por diferentes tiempos (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 h) a 37°C . Las células control estuvieron en ausencia de CdCl_2 . La activación de este factor se determinó por la técnica de Western blot, con un anticuerpo específico para p-Stat3 (Ser727) (Biosource), Stat-3 (Santa Cruz, Biotechnology) y actina (Cell Signaling, Technology).

5.5 PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT EN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR STAT-3

Se sabe que la vía de señalización PI3K/Akt puede participar en la activación del factor de transcripción Stat-3, además de ser sensible a ERO. Para evaluar esta relación, los hepatocitos primarios se sembraron en cajas de Petri de 6 cm a una densidad de 1×10^6 células/caja y se dejaron por 12 h con medio con antibiótico y antimicótico sin SFB. Pasado ese tiempo se les cambió el medio por uno sin suero, sin antibiótico y antimicótico, conteniendo los inhibidores de la vía: $100 \mu\text{M}$ de Wortmanina (Calbiochem) para PI3K y $10 \mu\text{M}$ del Inhibidor Akt II (Calbiochem) para Akt, dejándolos pre-incubar por 30 min a 37°C . Después se les agregó a los hepatocitos, $5 \mu\text{M}$ de CdCl_2 durante 2h, este tiempo se determinó con el resultado de la cinética de activación previamente realizada para el factor Stat-3. Los hepatocitos control

estuvieron en ausencia de CdCl₂ y de inhibidores. La proteína se determinó por la técnica de Western blot (Simon y col., 1998) antes descrita utilizando los anticuerpos específicos policlonales específico para p-Stat3 (Ser727) (Biosource), Stat-3 (Santa Cruz, Biotechnology) y actina (Cell Signaling, Technology).

5.6 ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA AKT EN HEPATOCITOS TRATADOS CON CdCl₂

La activación de la proteína Akt se evaluó para ver si el CdCl₂ es capaz de activar esta cinasa, realizando una cinética de tiempo. Los hepatocitos se sembraron en cajas de Petri de 6 cm a una densidad de 1X10⁶ células/caja y se dejaron por 12 h con medio con antibiótico y antimicótico sin SFB. Pasado ese tiempo se les cambió el medio por uno sin suero ni antibiótico y antimicótico conteniendo 5 µM de CdCl₂ y se dejaron incubar por diferentes tiempos (0, 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 y 4 h) a 37° C. Los hepatocitos control se mantuvieron en ausencia de CdCl₂. La determinación de la activación de estas proteínas se realizó por la técnica de Western blot, utilizando anticuerpos específicos policlonales para Akt, p-Akt (Ser473) y el anticuerpo específico monoclonal p-Akt (Thr308) (Cell Signaling, Technology).

5.7 ACTIVACIÓN DE ERK1/2 Y LA PARTICIPACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT EN LA ACTIVACIÓN DE LA ERK 1/2

Se determinó la activación de ERK1/2 porque se conoce que el cadmio activa a esta MAPK, así que los hepatocitos primarios se trataron con CdCl₂ a una concentración de 5 µM por diferentes tiempos (0, 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 1, 2 y 3 h) a 37° C. Los hepatocitos control estuvieron en ausencia de CdCl₂. La activación de esta MAPK se determinó por la técnica de Western blot.

El factor de transcripción Stat-3 se sabe que es fosforilado por la familia de las MAPK's en el residuo Serina y para poder evaluar si la vía PI3K/Akt puede activar a la ERK1/2, los hepatocitos se pre-trataron con inhibidores de la vía PI3K/Akt, 100 µM de Wortmanina (Calbiochem) para PI3K y 10 µM del Inhibidor de Akt II (Calbiochem) para Akt y se dejaron pre-incubar por 30 min a 37° C. Después se les agregó a los hepatocitos 5 µM de CdCl₂ durante 2h, este tiempo se estableció por la cinética de activación de la proteína. Los hepatocitos control estuvieron en ausencia de CdCl₂ y de los inhibidores. La proteína ERK1/2 se determinó por la técnica de Western blot

(Simon y col., 1998) antes descrita utilizando el anticuerpo policlonal específico para p-ERK1/2, ERK1/2 (Santa Cruz, Biotechnology) y actina (Cell Signaling, Technology).

5.8 PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) EN LA ACTIVACIÓN DE AKT, ERK1/2 Y EL FACTOR STAT-3

Para determinar la participación las especies reactivas de oxígeno en la activación del de factor de transcripción Stat-3, la proteína Akt y ERK1/2 los hepatocitos fueron pre-tratadas con 0.5mg/ml del antioxidante catalasa pegilada (CATPEG) (Sigma) por 30 min a 37° C, para inhibir la formación de ERO. Después a los hepatocitos se les agregó 5 μ M de CdCl₂, durante 2h para determinar a Stat-3 y ERK1/2 y 30 minutos para Akt (Ser473; Thr308), estos tiempos se eligieron en base a las cinéticas de activación de cada proteína. Los hepatocitos control estuvieron en ausencia de CdCl₂ y del antioxidante. Las proteínas se determinaron por la técnica de Western blot (Simon y col., 1998) antes descrita utilizando anticuerpos específicos para p-Stat3 (Ser727) (Biosource), Stat-3, ERK1/2 (Santa Cruz, Biotechnology) p-Akt (Ser473), p-Akt (Thr308), Akt y actina (Cell Signaling, Technology).

5.9 PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA HSP70

Se sabe que el cadmio genera ERO y que la proteína Hsp70 se expresa ante este estímulo. Para evaluar la activación la Hsp70 ante el cadmio, a los hepatocitos se les agregó 5 μ M de CdCl₂ y se dejarán incubar por diferentes tiempos (0, 0,5, 1, 2, 3, 4 y 5 h) a 37° C. La producción de la Hsp70, se determinó utilizando la técnica de Western blot (Simon y col., 1998) antes descrita utilizando el anticuerpo específico para Hsp70 y actina (Cell Signaling, Technology).

5.10 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA

La determinación de la cantidad de proteína en las muestras se realizó con el Kit BCA (Pierce). Se tomó una alícuota de 5 μ l de las muestras y se le agregó 200 μ l de reactivo BCA diluido 1:50 y se incubó por 30 min a 25° C. Se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina de 0.1-0.5 mg/ml. Posteriormente se leyó la absorbancia y se determinó la concentración de la proteína utilizando la curva estándar.

5.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada experimento se realizó en eventos independientes por triplicado. El análisis estadístico de los resultados que se obtuvieron, se realizó por análisis de varianza (ANOVA) seguida por la prueba de Tukey con el programa SPSS versión 10. El nivel de significancia considerado fue de $P < 0.05$.

6 RESULTADOS

6.1 CINÉTICA DE ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT-3 EN HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

El efecto del cadmio en la activación del factor de transcripción Stat-3 en los hepatocitos primarios expuestos a 5 μM de CdCl_2 por diferentes tiempos de incubación (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 h) se determinó por la técnica de Western blot utilizando el anticuerpo específico para p-Stat-3 (Ser727), Stat-3 y actina como proteína de normalización. En la figura 1 se muestra el resultado y se expresa como el incremento de la activación del factor de transcripción con respecto al control. Se observa que a partir de la hora comienza a ser significativa su activación, con un valor de 1.89 veces más que el control, sin embargo su pico máximo de activación es a las 2 horas, presentando 2.93 veces más que el control y a partir de las 3 h la activación del factor comienza a descender hasta las 5 h donde obtenemos un valor de 1.19 veces llegando casi al valor del control. Como un control positivo se utilizó a IL-6, porque se sabe que esta citocina es capaz de activar al factor Stat-3, reflejándose de una manera positiva en la figura 1 con un incremento de 2.13 veces más que el control.

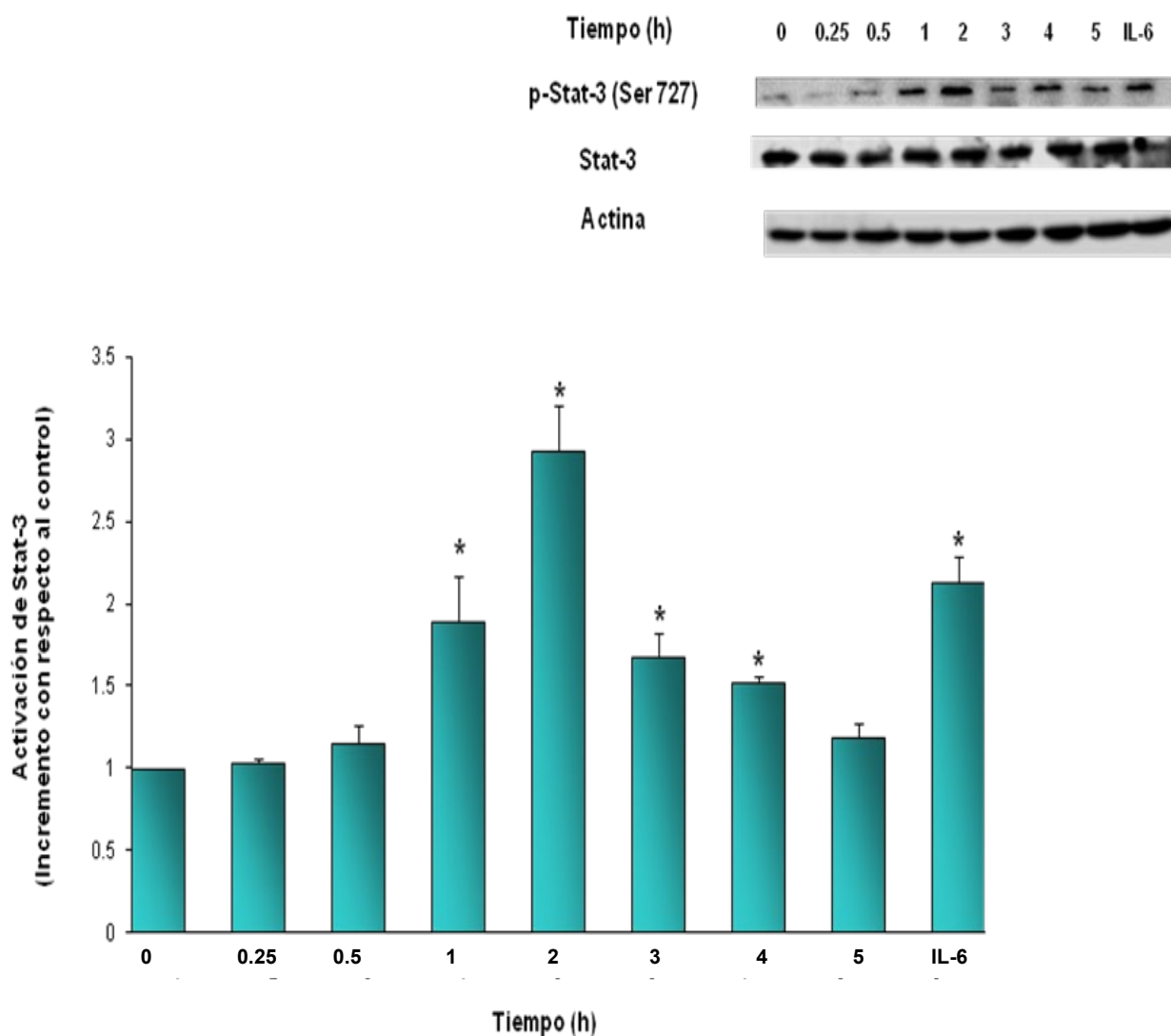


Figura 1. Activación del factor de transcripción Stat-3 en los hepatocitos primarios expuestos a 5 μ M de CdCl₂ por diferentes tiempos de incubación, determinados por Western blot. Cada punto expresa el promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control (*).

6.2 PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT EN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT-3

Para demostrar que el cadmio era capaz de activar al factor Stat-3 vía la cascada de señalización PI3K/Akt los hepatocitos se pre-trataron por 30 minutos con los inhibidores específicos de la vía, inhibidor de Akt II para Akt a 10 μ M y wortmanina para PI3K a 100 μ M, posteriormente se les agregó 5 μ M de CdCl₂ durante 2 h, tiempo de máxima activación del factor Stat-3 obtenido con la cinética de activación de Stat-3. Este resultado se determinó por la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para p-Stat-3(Ser727), Stat-3 y actina como proteína normalizadora. El resultado se muestra en la figura 2, observándose un incremento significativo en la activación de Stat-3 de 2.81 veces más con cadmio, respecto al control. El pre-tratamiento con wortmanina disminuyó significativamente un 65.5% la activación del factor con respecto a los hepatocitos tratados con cadmio. En los hepatocitos pre-tratados con el inhibidor de Akt II se encontró una disminución significativa del 24.2% con respecto a los tratados con cadmio. Para descartar que los inhibidores por sí solos no me activan a Stat-3 se trataron a los hepatocitos con los inhibidores puros sin cadmio, encontrándose valores semejantes al control, 1.1 veces con el inhibidor de Akt II y 1.03 veces con wortmanina. Este resultado muestra que la vía PI3K/Akt participa en la cascada de señalización para la activación del factor de transcripción Stat-3 en los hepatocitos tratados con cadmio.

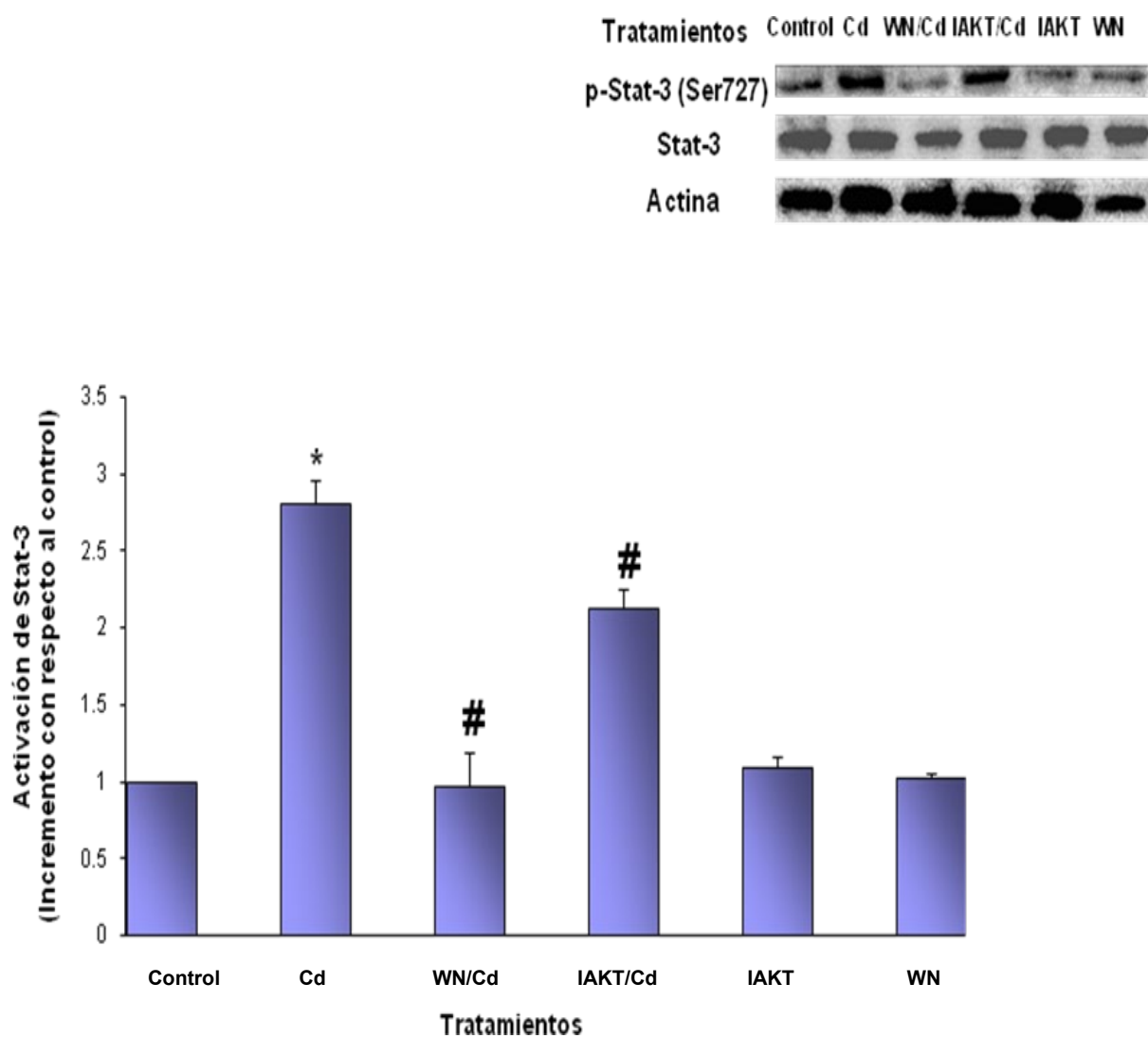


Figura 2. Participación de la vía PI3K/Akt en hepatocitos pre-tratados con el inhibidor de Akt II, wortmanina y tratados con 5 μ M de CdCl₂ por 2 h. Cada punto expresa el promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control (*) o al cadmio (#).

6.3 CINÉTICA DE ACTIVACIÓN DE AKT (Ser 473) EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

Se evaluó si el cadmio estaba activando a Akt (Ser 473) como parte de la cascada de señalización en la activación de Stat-3, los hepatocitos fueron expuestos a una concentración de 5 μ M por diferentes tiempos (0, 0.08, 0.16, 0.25, 0.5 1, 2, 3 y 5 h). La proteína total fue extraída y utilizada para determinar por Western blot esta cinética, utilizando anticuerpos específicos para p-Akt (Ser 473), Akt y actina como proteína de normalización. En la figura 3, se observa que el cadmio induce la activación de Akt (Ser 473) desde tiempos cortos, comenzando a ser significativa a partir de los 15 min con un valor de 3.58 veces más que el control y alcanzando un pico máximo de activación a los 30 min presentando 4.79 veces más que el control. A la 1 h y 2 h se observó una disminución paulatina entre 4.65-4.24 cayendo de manera definitiva a las 4 h con un valor de 0.91. Con esto se demuestra que la fosforilación a nivel de la serina 473 de Akt, se encuentra dentro de la cascada de señalización que activa al factor de transcripción Stat-3, para los tiempos pequeños en los que se comienza activar.

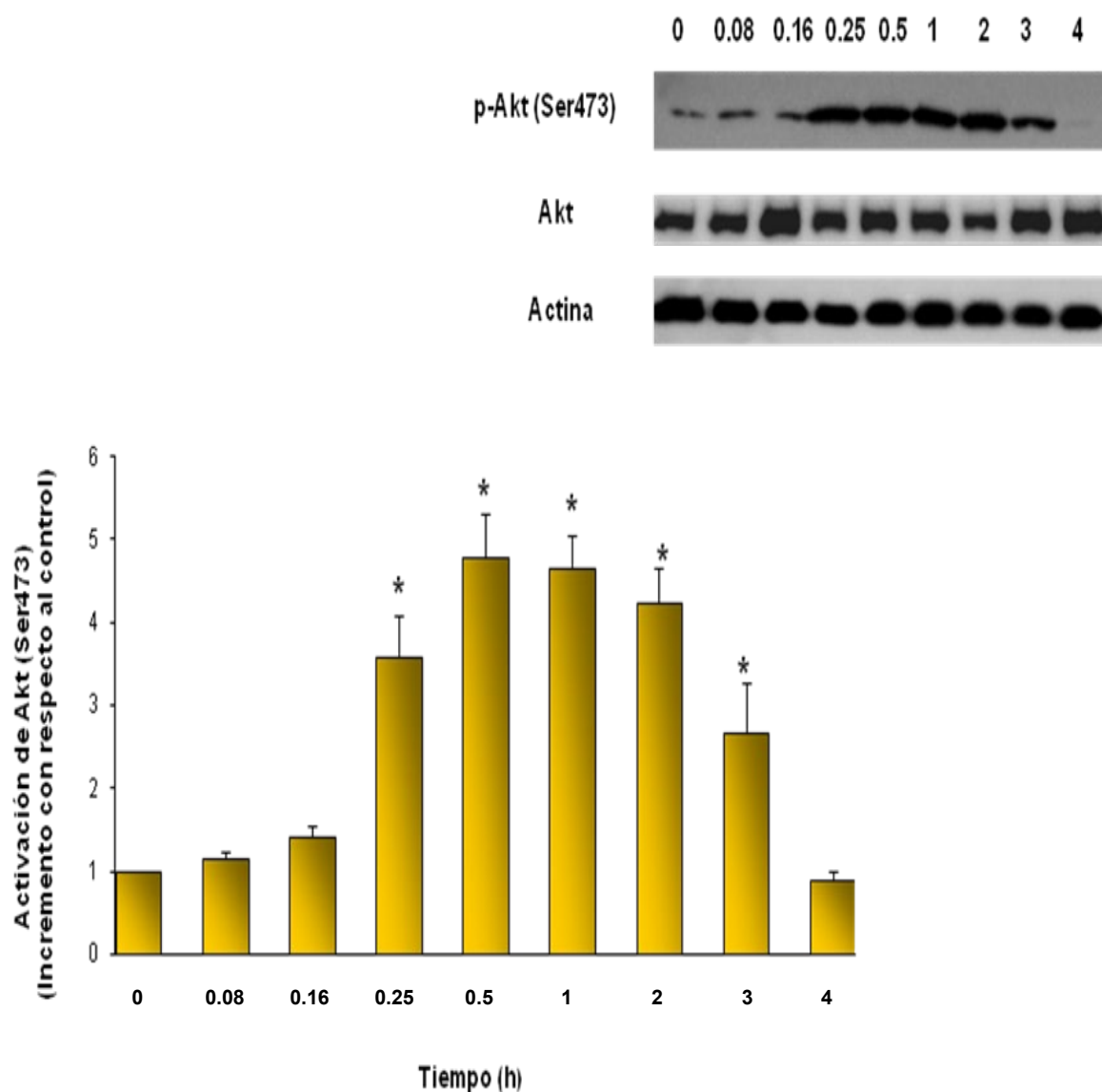


Figura 3. Activación de Akt (Ser473) en hepatocitos primarios expuestos a 5 μ M de CdCl₂ por diferentes tiempos de incubación determinándose por Western blot. Cada punto expresa el promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control (*).

6.4 CINÉTICA DE ACTIVACIÓN DE AKT (Thr 308) EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

Para determinar si el cadmio también estaba activando Akt a nivel de treonina 308 como parte de la cascada de señalización en la activación de Stat-3, los hepatocitos fueron expuestos a una concentración de 5 μM de CdCl_2 por diferentes tiempos (0, 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 y 5 h). La proteína total fue extraída y utilizada para la determinación por Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para p-Akt (Thr 308), Akt y actina se utilizó como proteína de normalización. El resultado se muestra en la figura 4, donde se observa que el cadmio induce la activación de Akt (Thr 308) desde tiempos cortos comenzando a ser significativa a partir de los 15 min con un valor de 3.11 veces más que el control y alcanzando un pico máximo de activación a los 30 min con un valor de 4.89 veces más que el control y a la 1 h y 2 h comienza haber una disminución paulatina de entre 4.67-4.31 cayendo de manera definitiva a las 4 h con un valor de 0.93. Esto demuestra que la fosforilación a nivel de treonina 308 de Akt se está llevando a cabo para la máxima activación de Akt y así formar parte de la cascada de señalización que activa al factor de transcripción Stat-3, para los tiempos pequeños en los que se comienza activar.

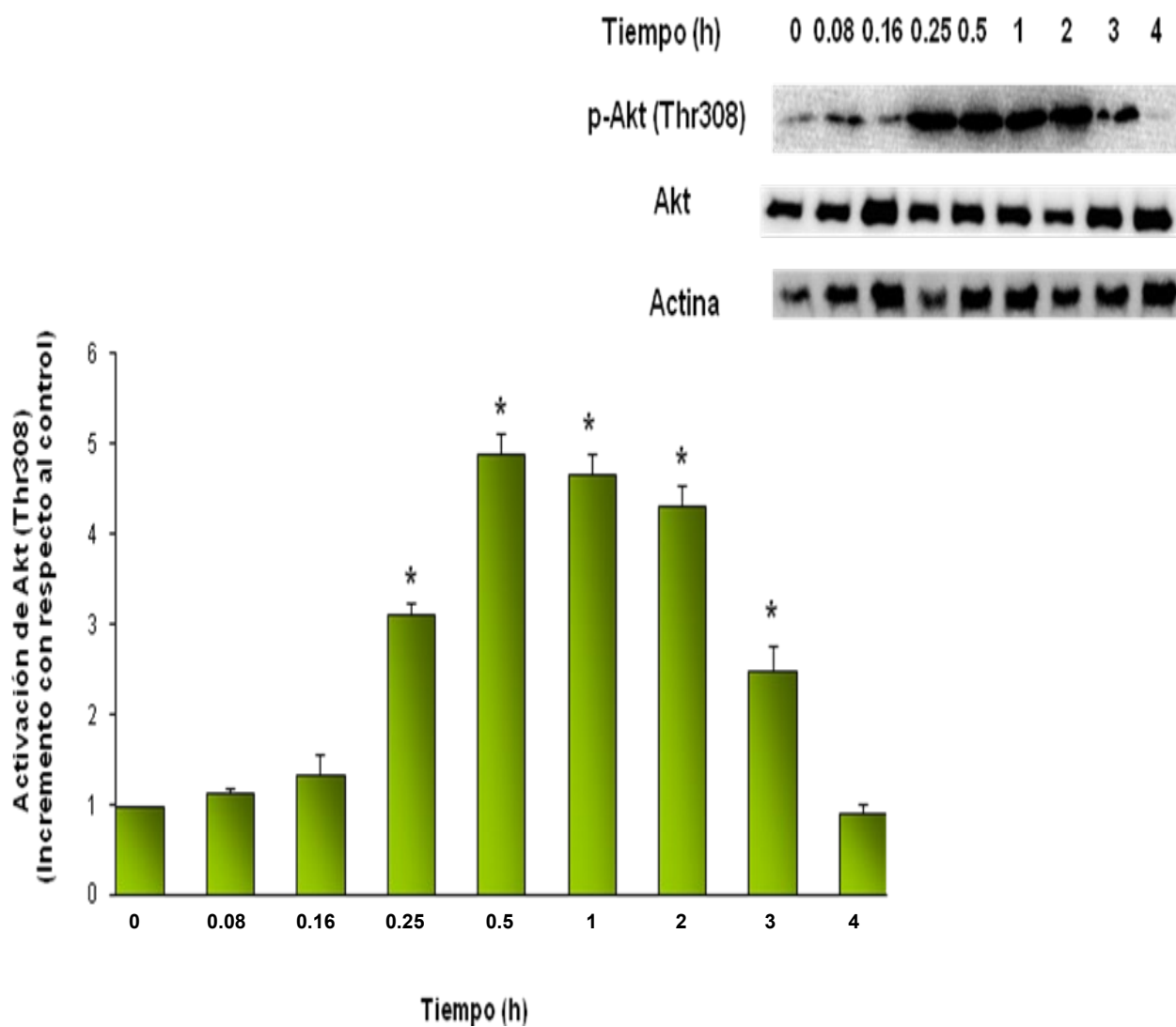


Figura 4. Activación de Akt (Thr308) en hepatocitos primarios expuestos a cadmio por diferentes tiempos, determinado por Western blot. Cada punto expresa $\pm$ desviación estándar (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control.

6.5 ACTIVACIÓN DE ERK1/2 EN CULTIVO DE HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

Existen evidencias que el cadmio es capaz de activar a ERK1/2, así que para evaluarlo los hepatocitos fueron tratados con CdCl_2 a una concentración de 5 μM por tiempos que comprendieron desde 0, 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 1, 2 hasta 3 horas, el resultado se determinó con la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para p-ERK1/2, ERK1/2 y actina como proteína de normalización. En la figura 5 se observa que a partir de los 5 min comienza a ser activada, sin embargo esta es significativa a partir de los 30 min con un valor de 2.33 veces más que el control, aumentando gradualmente hasta encontrar un pico máximo de activación a las 2 h, de 3.03 veces más que el control y a las 3 h desciende al valor del control de 1. Este resultado confirma la hipótesis de que el cadmio es capaz de activar a ERK1/2 porque sus tiempos de activación coinciden con la cascada de activación del factor Stat-3.

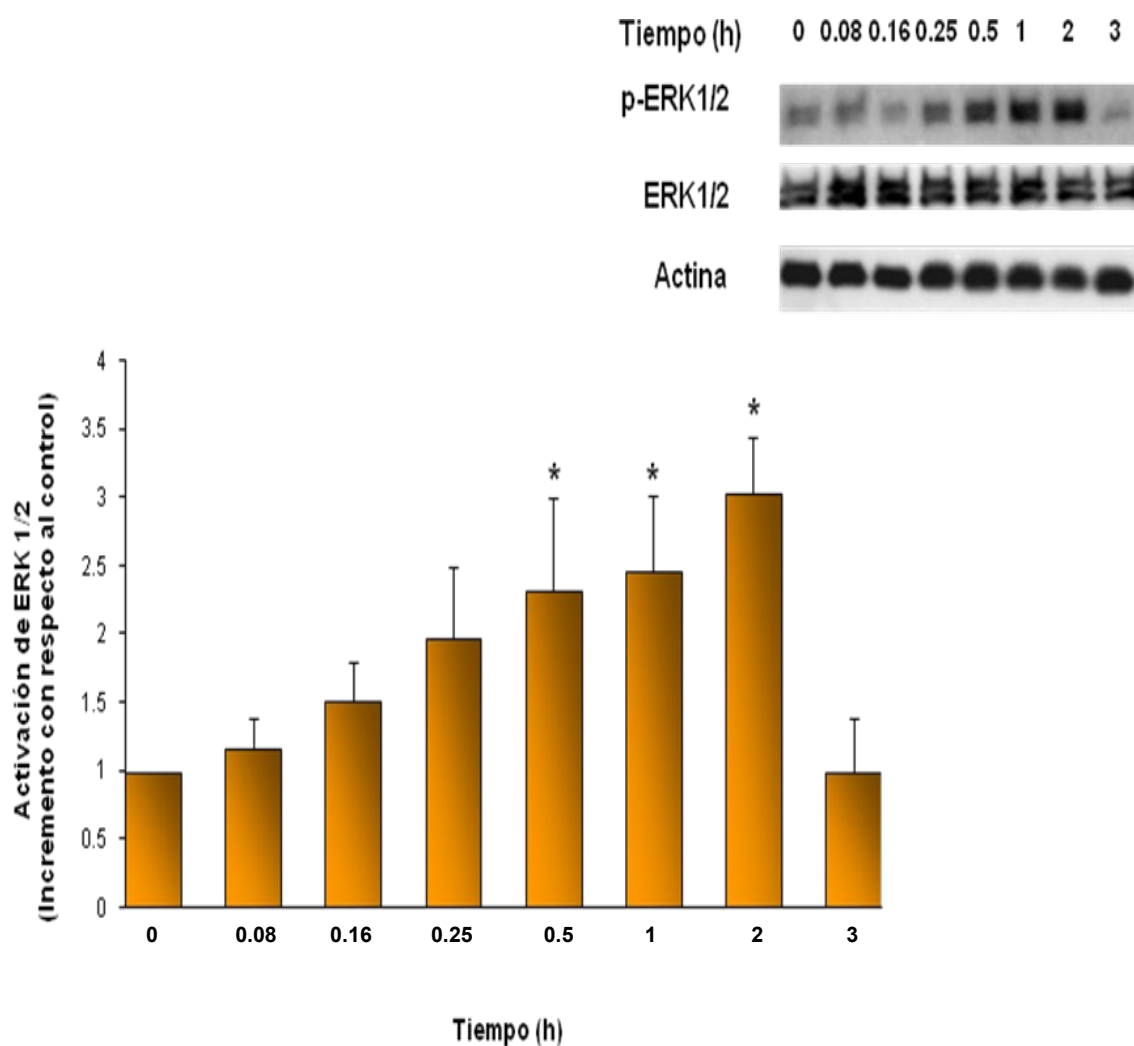


Figura 5. Activación de p-ERK1/2 en cultivo primario de hepatocitos tratados con CdCl₂ a una concentración 5 μ M por diferentes tiempos de exposición. Esto se determinó por la técnica de Western blot. Cada punto expresa $\pm$ desviación estándar (n=3). Diferencia significativa p<0.05 con respecto al control.

6.6 RELACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT EN LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2

Se determinó la participación de la vía PI3K/Akt en la activación de ERK1/2 como parte de la cascada de activación del factor Stat-3, los hepatocitos fueron pre-tratados por 30 minutos con el inhibidor de Akt II para Akt y wortmanina para PI3K, posteriormente se les agregó cadmio por 2 horas, tiempo que se determinó con la cinética de activación de ERK1/2, Para evaluar esto se utilizó la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para p-ERK1/2, ERK1/2 y actina como proteína normalizadora. El resultado se muestra en la figura 6, observándose un incremento significativo en la activación de ERK1/2 de 3.03 veces más con cadmio respecto al control. El pre-tratamiento con el inhibidor de Akt II disminuyó significativamente un 31.69 % la activación de ERK1/2 con respecto a los hepatocitos tratados con cadmio. En los hepatocitos pre-tratados con wortmanina se encontró una disminución significativa del 70.9 % con respecto a los tratados con cadmio. Para descartar que los inhibidores por sí solos no activan a ERK1/2, se trataron a los hepatocitos con solos inhibidores sin cadmio, encontrándose valores semejantes al control, 0.98 veces con el inhibidor de Akt II y 0.96 veces con wortmanina. Este resultado muestra que la vía PI3K/Akt participa en la activación de ERK1/2 como parte de la cascada de señalización para la activación del factor de transcripción Stat-3 en los hepatocitos tratados con cadmio.

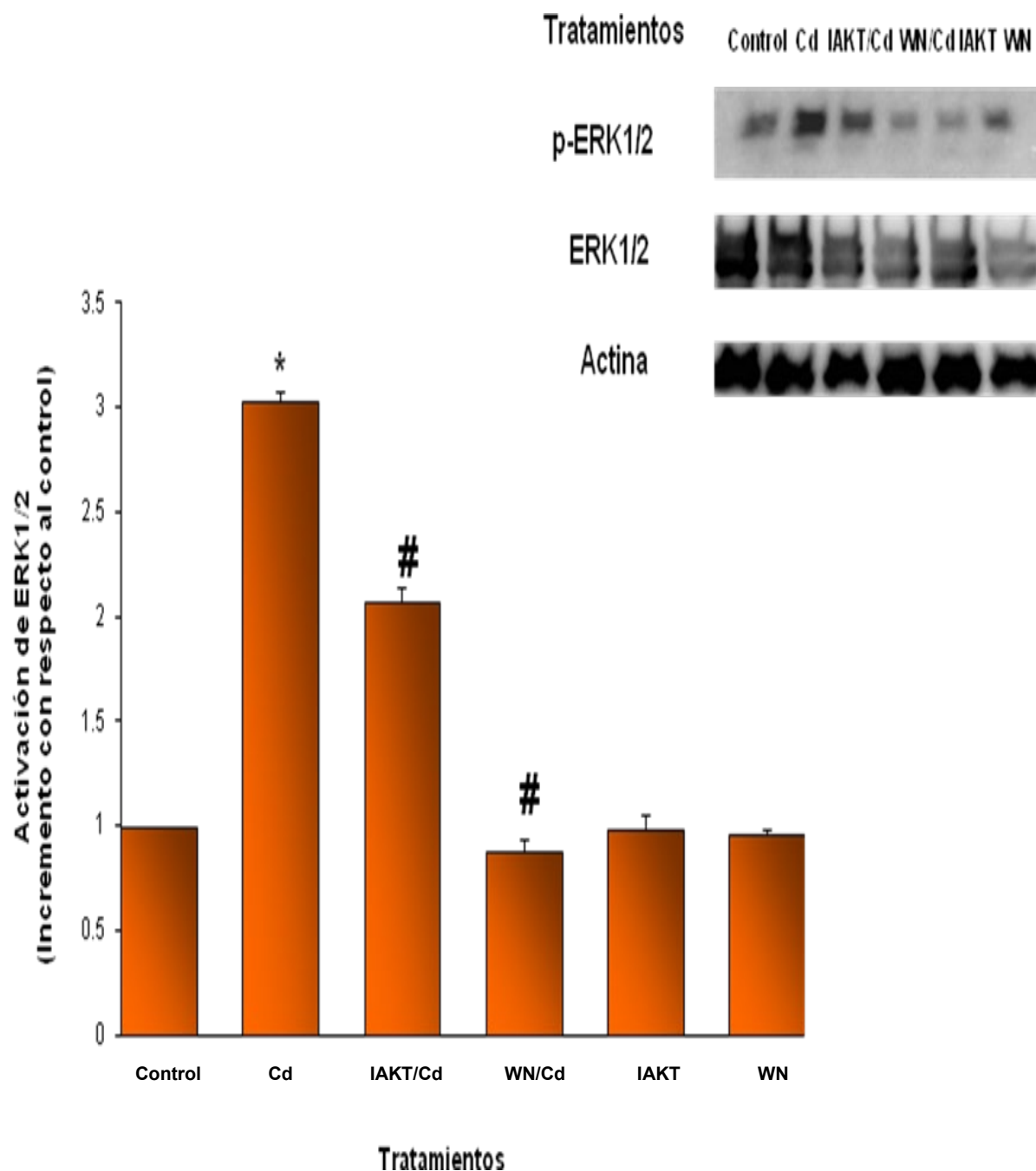


Figura 6. Participación de la vía PI3K/Akt en la activación de ERK1/2, en hepatocitos pre-tratados con los inhibidores específicos de la vía, inhibidor de Akt II para Akt y wortmanina para PI3K por 30 minutos, posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 2 h. Cada punto expresa el promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control (*) o al cadmio (#).

6.7 PARTICIPACIÓN DE ERO EN LA ACTIVACIÓN DE AKT (Ser 473)

Para estudiar la participación de las ERO generadas por el cadmio en la activación de Akt a nivel de serina 473, los hepatocitos se pre-trataron por 30 minutos con 0.5 mg/ml de catalasa pegilada (CATPEG) (Sigma), posteriormente se les agregó 5 μ M de CdCl₂ por 30 min, tiempo que se obtuvo con su cinética de activación. Este resultado se determinó con la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para p-Akt (Ser 473), Akt y actina como proteína de normalización. El resultado se muestra en la figura 7, observándose una disminución significativa de un 63.7% en los hepatocitos que fueron pre-tratados con la CATPEG, con respecto a los que sólo se trataron con cadmio y para descartar que el antioxidante por sí sólo no activa a Akt se trataron a los hepatocitos con solo el antioxidante, encontrándose un valor similar al control de 1.1. Con este resultado se demuestra que las ERO están activando a Akt a nivel de serina 473.

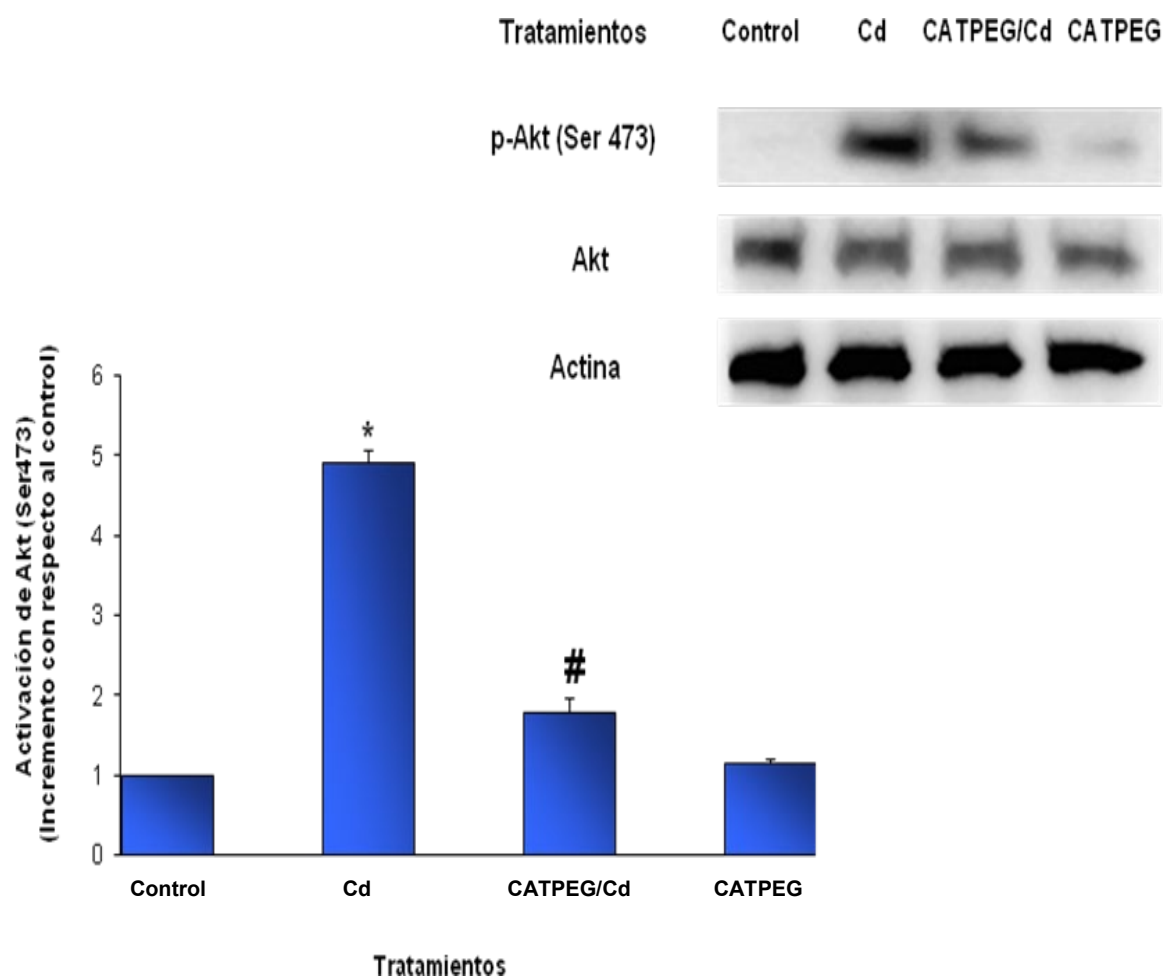


Figura 7. Participación de las ERO en la activación de Akt (Ser 473), en hepatocitos pre-tratados con un antioxidante (CATPEG) por 30 minutos, posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 30 minutos. Cada punto expresa el promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control (*) o al cadmio (#).

6.8 PARTICIPACIÓN DE ERO EN LA ACTIVACIÓN DE AKT (Thr 308)

La participación de las ERO generadas por el cadmio en la activación de Akt (Thr 308), se evaluó pre-tratando a los hepatocitos por 30 minutos con 0.5 mg/ml de catalasa pegilada (CATPEG) (Sigma), posteriormente se les agregó 5 μ M de CdCl₂ por 30 min, tiempo que se determinó con su cinética de activación. Este resultado se obtuvo con la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para p-Akt (Thr 308), Akt y actina como proteína de normalización. En la figura 8 se muestra el resultado, observándose una disminución significativa de un 66.18% en los hepatocitos que fueron pre-tratados con la CATPEG con respecto a los que sólo se trataron con cadmio y para descartar que el antioxidante por sí sólo no activa a Akt se trataron a los hepatocitos con solo el antioxidante, encontrándose un valor similar al control de 1.1. Con este resultado se demuestra que las ERO están activando a Akt (Thr 308).

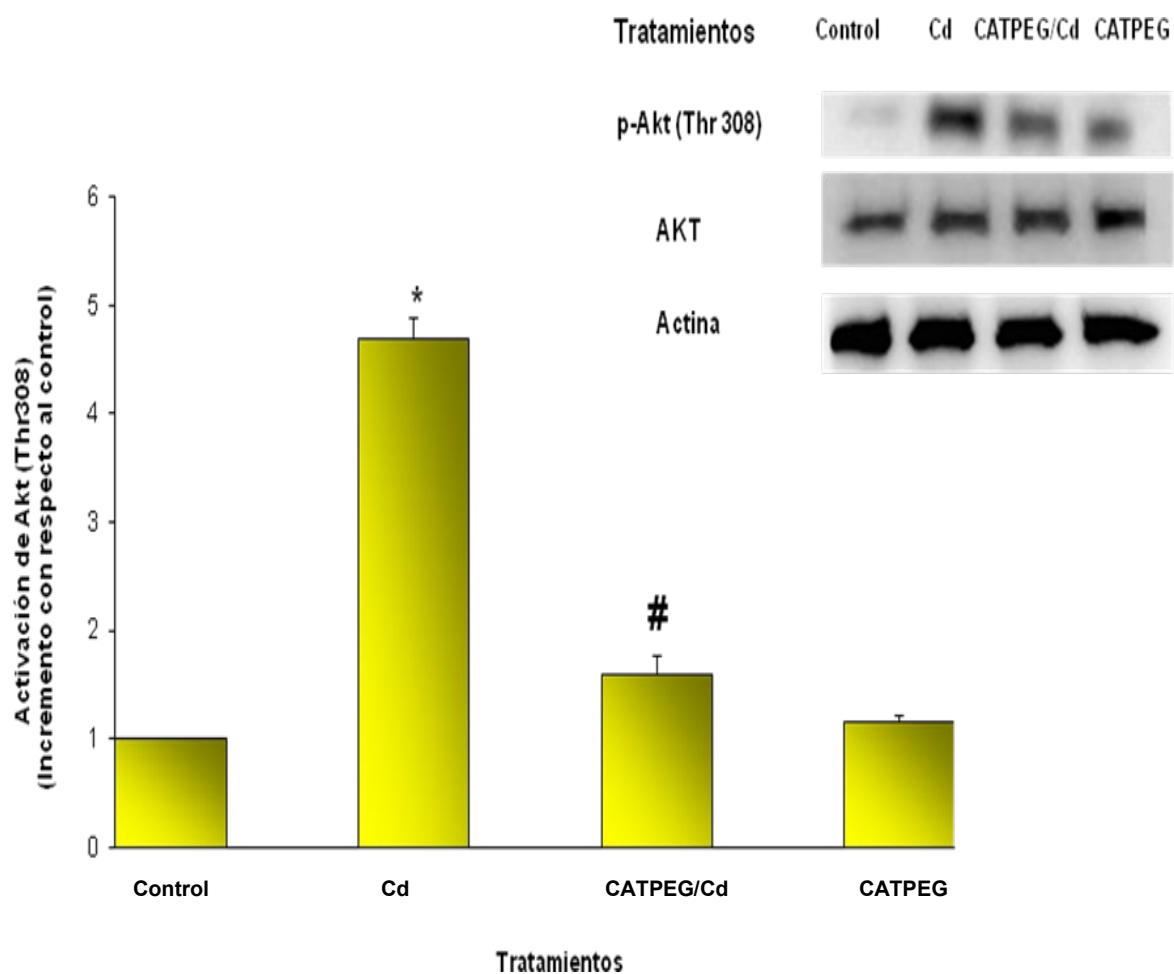


Figura 8. Relación de las ERO en la activación de Akt (Thr 308), en hepatocitos pre-tratados con un antioxidante (CATPEG) por 30 minutos, posteriormente se trataron con 5 μ M CdCl₂ por 30 minutos. Cada punto expresa el promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control (*) o al cadmio (#).

6.9 PARTICIPACIÓN DE ERO EN LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2

Se determinó la participación de las ERO generadas por el cadmio en la activación de ERK1/2, pre-tratando por 30 minutos a los hepatocitos con 0.5 mg/ml de catalasa pegilada (CATPEG) (Sigma), posteriormente se les agregó 5 μ M de CdCl₂ por 2 h, tiempo obtenido con su cinética de activación. El resultado se determinó con la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para p-ERK1/2, ERK1/2 y actina como proteína normalizadora. El resultado se muestra en la figura 9, observándose una disminución significativa de un 61.89 % en los hepatocitos que fueron pre-tratados con la CATPEG con respecto a los que sólo se trataron con cadmio y para descartar que el antioxidante por sí sólo activa a ERK1/2 se trataron a los hepatocitos con solo el antioxidante, encontrándose un valor similar al control de 1.1. Con este resultado se demuestra que las ERO están participando en la activación de ERK1/2.

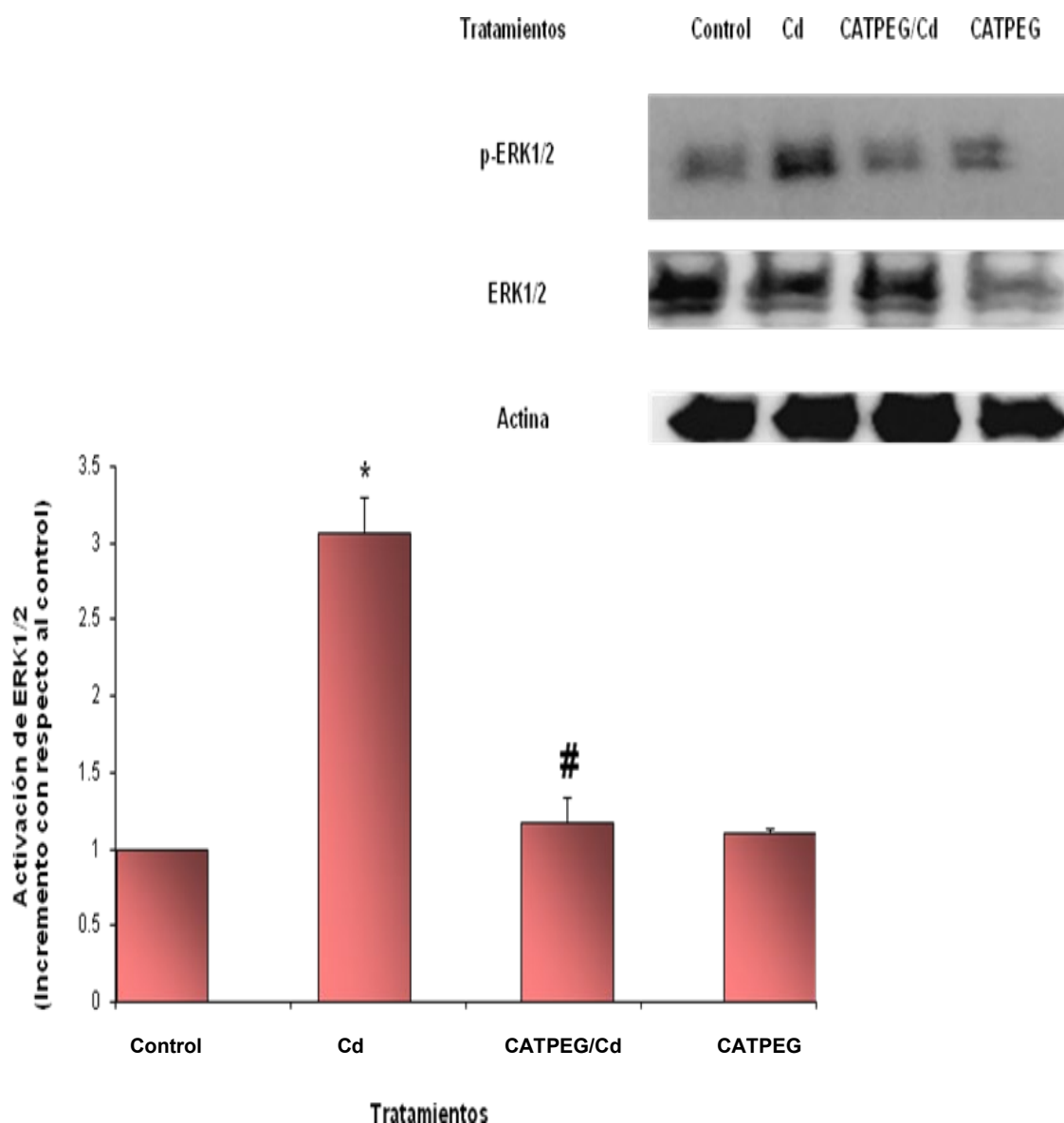


Figura 9. Participación de las ERO en la activación de ERK1/2 en hepatocitos pre-tratados con CATPEG 30 minutos, posteriormente se les trató con 5 μ M de CdCl₂ por 2 h. Cada punto expresa el promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control (*) o al cadmio (#).

6.10 PARTICIPACIÓN DE ERO EN LA ACTIVACIÓN DE STAT-3

Para estudiar la participación de las ERO generadas por el cadmio en la activación de Stat-3, los hepatocitos fueron pre-tratados por 30 minutos con 0.5 mg/ml de catalasa pegilada (CATPEG) (Sigma), posteriormente se les agregó 5 μ M de CdCl₂ por 2 h, tiempo que se determinó con su cinética de activación. Este resultado se obtuvo con la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para p-Stat-3 (Ser727), Stat-3 y actina como proteína de normalización. El resultado se muestra en la figura 10, observándose una disminución significativa de un 62.71 % en los hepatocitos que fueron pre-tratados con la CATPEG con respecto a los que sólo se trataron con cadmio y para descartar que el antioxidante por sí sólo activa al factor Stat-3 se trataron a los hepatocitos con solo el antioxidante, encontrándose un valor similar al control de 1.2. Con este resultado se demuestra que las ERO forman parte en la cascada de activación del factor Stat-3.

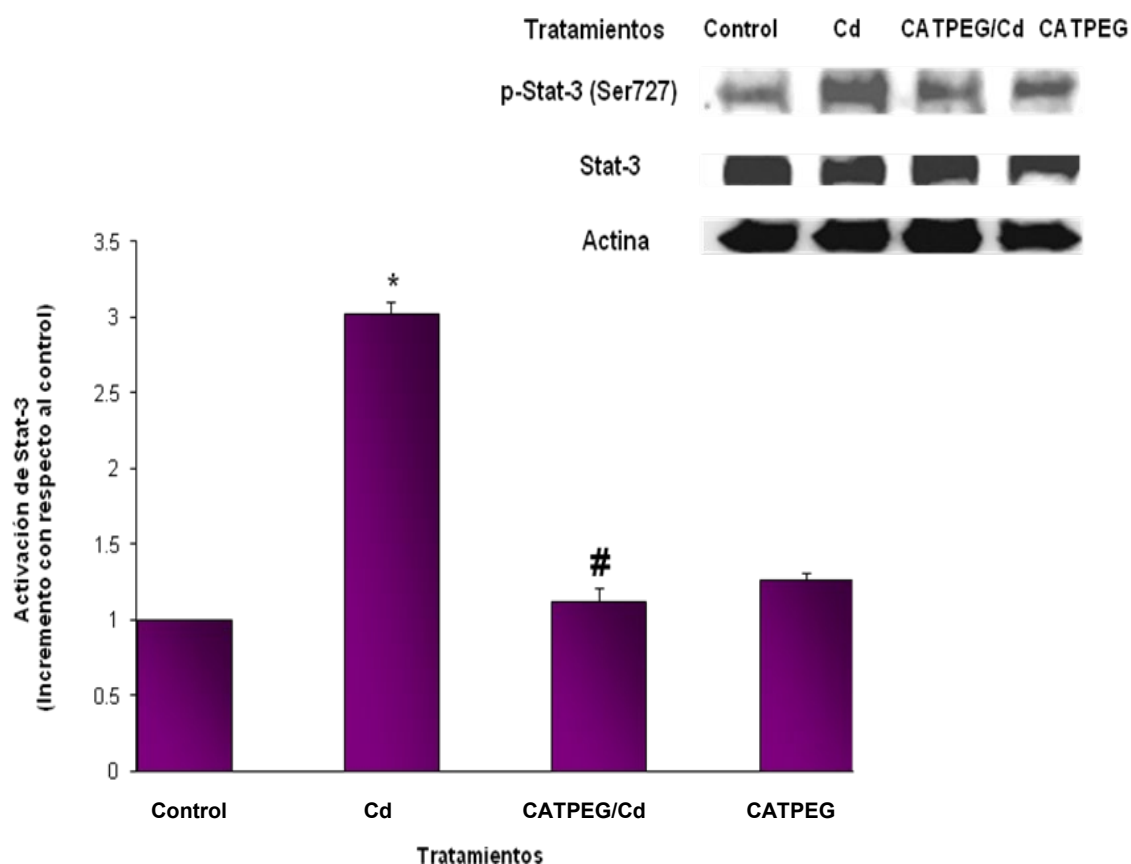


Figura 10. Relación de las ERO en la activación del factor de transcripción p-Stat-3 (Ser 727) en cultivo primario de hepatocitos pre-tratados con un antioxidante (CATPEG) por 30 minutos y posteriormente con 5 μ M de CdCl₂ por 2 h. Cada punto expresa el promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control (*) o al cadmio (#).

6.11 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HSP70 EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS EXPUESTOS A CADMIO

El efecto de el cadmio en la expresión de la proteína Hsp70 como proteína de respuesta final regulada por la activación del factor Stat-3, se evaluó tratando hepatocitos con CdCl₂ a una concentración de 5 µM por diferentes tiempos (0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, y 6 h) y se determinó por Western blot con el anticuerpo específico para Hsp70 y actina como proteína de normalización. En la figura 11 se muestra el resultado, observándose que a partir de los 30 min comienza a ser activada, sin embargo esta comienza a ser significativa a partir de las 2 h con un valor de 2.87 veces más que el control, aumentando gradualmente, hasta las 6 h con un valor de 8.75 veces más que el control. Confirmando con este resultado que se ve expresada Hsp70 como proteína final de la cascada de señalización.

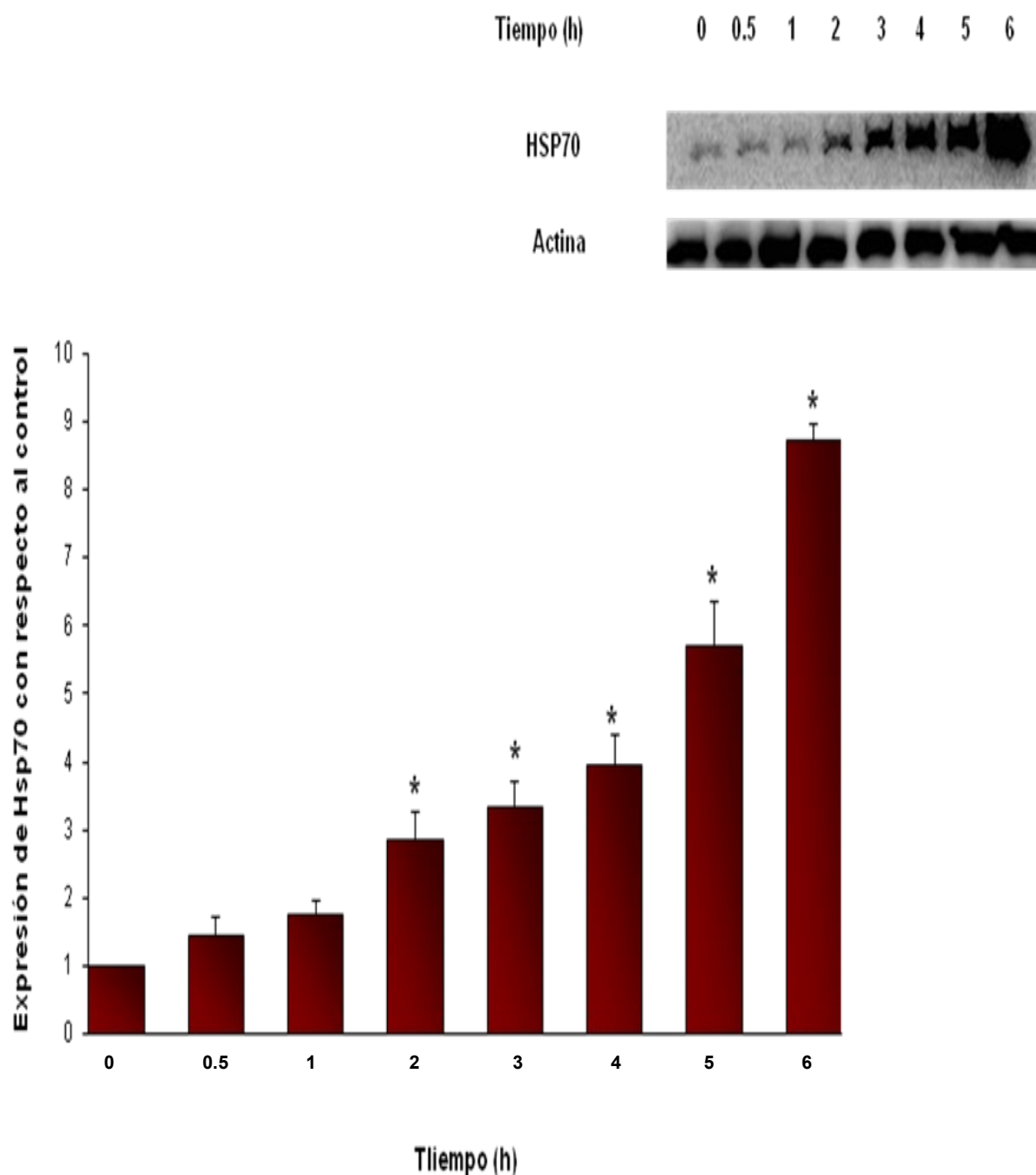


Figura 11. Inducción de la proteína Hsp70 en hepatocitos expuestos a 5 μ M de CdCl₂ por diferentes tiempos de exposición, determinado por Western blot. Cada punto expresa el promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). * Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control.

7 DISCUSIÓN

7.1 ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT-3 EN HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

Se ha reportado en diversos tipos celulares que una concentración micromolar de cadmio es capaz de iniciar rápidamente una serie de eventos de señalización, incluyendo la generación de segundos mensajeros como IP3 (Liu y col., 2008). Por otra parte, resultados *In vitro* demuestran que el cadmio influye en la activación de varios factores de transcripción (Valko y col., 2005), entre los que se encuentra el factor Stat-3. Además, se ha encontrado que las STAT's tienen múltiples funciones biológicas como: proliferación, apoptosis y sobrevivencia en diferentes tipos celulares como células de riñón y células hepáticas (Decker y Kovarik, 2000; Levy y Lee, 2002). Se conoce que el factor Stat-3 es fosforilado a nivel de la serina 727 por vía de las MAPK's a causa de agentes externos como metales, radiación UV o por hiperosmolaridad, y esta fosforilación es muy importante en respuestas biológicas como la de sobrevivencia, además de que se ha relacionado con una mayor actividad transcripcional, como se ha reportado en el caso de p38, que es indispensable para la fosforilación en la serina 727 del factor de transcripción Stat-1 y su actividad transcripcional (Ortmann y col., 2000), también en la línea celular de riñón (U3A) donde se mutó este sitio de fosforilación y se obtuvo una inactividad biológica del factor Stat-1. Otra MAPK como ERK1/2 puede fosforilar residuos de serina en los factores de transcripción Stat y activarlos, sin embargo también se ha reportado que esta fosforilación inactiva a estos factores, por lo que se han planteado muchas hipótesis hasta el momento, sobre el efecto de la fosforilación en serina de las STAT's, el cual depende del tipo celular y de la clase de MAPK activada en respuesta al estímulo (Ortmann y col., 2000). Estudios en células neuronales se ha encontrado que la activación de las STAT's es inhibida por el CdCl₂, mientras que en células de tipo no neuronal no se ven afectada como en la línea celular HepG2 (Monroe y Halvorsen, 2006). Células COS-1 y NIH3T3 tratadas con diferentes agentes como: arsenito de sodio, cloruro de sodio y luz UV la fosforilación de Stat-3 en serina 727 fue inducida, y con este resultado los autores infieren que la fosforilación en serina puede darse por tratamientos que generan ERO (Lim y Cao, 1999). Es por ello que se determinó si el cadmio era capaz de activar factor Stat-3 a nivel serina 727 como parte de la respuesta celular de sobrevivencia, encontrándose su máxima activación dos horas después de la exposición al metal de 2.93 veces más que el control, estudios

realizados en nuestro grupo de investigación en la línea HepG2 tratada con cadmio reportan que el pico máximo de activación es a la hora (Souza y col, artículo enviado). En células epiteliales de pulmón tratadas con cromo observaron un incremento en la fosforilación de Stat-3, no muy pronunciado a la hora (Ohara y col., 2007). Esto hace suponer que los hepatocitos son más sensibles al cadmio que las células de pulmón.

7.2 PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT EN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT-3

Se sabe en estudios hechos en hepatocitos y en cardiomiocitos que la activación del factor Stat-3, ERK1/2 y de la vía PI3K/Akt están implicadas en una función de hepatoprotección (Gao, 2005). En estudios realizados en línea celular de melanoma humano, se confirmó del papel de Stat-3 como un blanco para PI3K en la regulación de sobrevivencia (Ivanov y col., 2002). Es por ello que se determinó la participación de la vía PI3K/Akt en la cascada de activación del factor Stat-3, utilizando inhibidores específicos de la vía como son: wortmanina como inhibidor irreversible por unirse a la subunidad catalítica de PI3K, inhibidor que ha sido ampliamente aceptado; inhibidor de Akt II, isoforma que es la más abundante en tejidos y órganos como el hígado sensibles a glucosa, este además se utiliza como un agente terapéutico contra el cáncer por inducir apoptosis. Sin embargo, en líneas celulares de cáncer y ratones que han sido tratados con LY294002 como un inhibidor de Akt, han observado una menor fosforilación de Akt, pero en realidad este inhibidor es específico de PI3K siendo de acción reversible a diferencia de wortmanina, ya que se une al sitio de unión al ATP de PI3K y de esta manera esta cinasa no puede fosforilar a IP2 para que Akt pueda ser activado, tal vez por esta razón se utilice este como un inhibidor de Akt (Osaki y col., 2004; Martelli y col., 2006). Estudios en queratinocitos cuando se les trataba con wortmanina se veía disminuida la migración dependiente de Stat-3 (Sano y col., 2000). Sin embargo en hepatocitos tratados con LY294002 de acuerdo con Shoba y col., (2001) la fosforilación de Stat-5 en tirosina no se afecta. En nuestro estudio, los hepatocitos pre-tratados con los inhibidores de la vía PI3K/Akt se apreció una disminución significativa de Stat-3, aunque de manera más marcada con wortmanina que con el Inhibidor de Akt II, esto se puede deber a que wortmanina es un inhibidor más específico de su proteína que el inhibidor de Akt II, es tal vez por esta razón que se vea en la literatura el uso de LY294002 para inhibir Akt, o es posible que parte de la activación de Stat-3 sea por la acción directa de PI3K, probablemente porque ambos tiene dominios SH-2.

7.3 ACTIVACIÓN DE AKT EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

Akt es el mayor efector en la regulación de sobrevivencia celular (Persad y col., 2001). La fosforilación de esta cinasa en dos sitios, uno en Serina 473 y otro en Treonina 308 es necesaria para su total activación y así proteger a la célula de la apoptosis e inducir la sobrevivencia y proliferación celular. Es por esta razón que se determinó la activación de esta cinasa en ambos sitios, porque si solo Akt estuviera fosforilada en Thr308 estaría parcialmente activa, mientras que la fosforilación en ambos sitios es requerida para su total activación (Song y col., 2005). Por otra parte la vía dependiente de Akt se considera ser crucial en la apoptosis de hepatocitos, porque en hepatocitos con el gen deletado para una proteína de membrana se presentó una actividad disminuida de Akt y un incremento en la apoptosis (Murata y col., 2005). Es por ello, la finalidad de estudiar si el cadmio era capaz de activar Akt como parte de la cascada de activación del factor Stat-3, encontrándose un patrón de activación en ambos sitios muy parecido, ya que a los 15 minutos comenzó a ser significativa en ambas activaciones y su pico máximo se obtuvo a los 30 minutos con un incremento de 4.89 veces más que el control. En la línea celular de cáncer de mama MCF-7 tratada con 10 μ M de Cd por 60 minutos se reportó un incremento significativo de 3.3 veces más de Akt fosforilada que a los 2.5 minutos y continuó así hasta los 60 minutos que duró el experimento (Liu y col., 2008). Por otra parte en las células HepG2, la activación de Akt fue evidente después de 5 minutos y así se mantuvo hasta las 18 horas (Granado-Serrano y col., 2008). Así que estos reportes en la activación de Akt en tiempos de más de 3 horas, a diferencia de los resultados obtenidos aquí se puede deber a que sus experimentos los realizaron en líneas celulares, las cuales son células transformadas en las que se encuentran activadas de manera indistinta vías de señalización o debido a la concentración de cadmio. Así, con este resultado se determina que Akt se encuentra en la cascada de activación del factor Stat-3, porque su actividad comienza en tiempos cortos.

7.4 LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT Y SU RELACIÓN EN LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2 EN CULTIVO DE HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

ERK1/2 pertenece a la familia de las MAPK's, que juegan un papel muy importante en cascadas de señalización que regulan procesos celulares como sobrevivencia, proliferación y diferenciación (Liu y col., 2008). La activación tanto de ERK1/2 como de Akt pueden prevenir la apoptosis de la célula inducida por ciertos agentes químicos o físicos (Liu y col., 2008). Numerosos metales han sido reportados como agentes que afectan la señalización de las MAPK's. El cadmio en la línea de linfocitos T y otros tipos celulares activa a ERK1/2 (Stephen y col., 2004; Lag y col., 2005). En adición, la contaminación ambiental por metales como el cadmio y el mercurio pueden activar de manera simultánea a la familia de las MAPK's (Sugisawa y col., 2004). Por otra parte, recientemente se demostró el papel importante de la vía PI3K/Akt en el control celular de las MAPK's (Krasilnikov, 2000). Así que para evaluar esta relación entre la vía PI3K/Akt y ERK1/2 primero se determinó la cinética de activación de ERK1/2, que comenzó a ser significativa a partir de los 30 minutos y teniendo un pico máximo de activación a las 2 h, tiempo que se utilizó para determinar la participación de la vía PI3K/Akt en la activación de ERK1/2. En células de pulmón después de 1 a 2 h de exposición a 10 μ M de CdCl₂, se apreció la fosforilación de ERK1/2, sin embargo, cuando se expusieron por 12 h al cadmio, esta fosforilación fue mucho más marcada que a 1 o 2 h (Lag y col., 2005). En células de carcinoma de pulmón el tratamiento con cadmio induce la activación de ERK1/2 como una señal de sobrevivencia (Lag y col., 2005). En cultivo primario de hepatocitos se incremento la fosforilación de ERK1/2 aproximadamente cuatro veces más que el control a los 5 minutos y un incremento similar a los 10 minutos cuando se les sometió a cambio del mismo medio, sin embargo, a los 30 minutos y a la hora decremento la fosforilación de ERK1/2 por debajo de los niveles basales (Kim y col., 2005) En la línea celular HepG2 tratada con una flavona se incremento la fosforilación de ERK1/2 después de 5 minutos de incubación y los niveles de proteína activa continuaron incrementandose después de 15 a 60 minutos y decrementando a tiempos largos de 2 h (Granado-Serrano y col., 2008). En la línea celular NIH3T3 tratada con 10 μ M de CdCl₂ se incrementó claramente los niveles de fosforilación de ERK1/2 después de 1, 3 y 6 h. En contraste cuando fueron incubadas con 1 a 20 μ M de CdCl₂ por 6 h, la fosforilación de ERK1/2 se incremento de una manera dosis-dependiente (Sugisawa y col., 2004). En células

MCF-7 expuestas a 0.5 μM de Cd mostraron un incremento significativo de 2.2 veces de activación de ERK1/2 a los 2.5 minutos, pero cuando se trataron con concentraciones de 5 a 10 μM de Cd se observó una máxima activación de 6.3 veces (Liu y col., 2008). De acuerdo al resultado obtenido en la activación de ERK1/2 y lo que se ha encontrado en la literatura, se puede observar que la activación y duración de la activación de ERK1/2 depende del tipo celular y la concentración de cadmio. Así que los tiempos de activación significativos, encontrados de ERK1/2 en este modelo de cultivo primario van de acuerdo a la cascada de activación del factor Stat-3. Por otra parte, como ya se ha mencionado la conexión de ERK1/2 con la vía PI3K/Akt es requerida para la sobrevivencia (Granado-Serrano y col., 2008), ya que en células HepG2 la activación de ERK1/2 y de la vía PI3K/Akt contribuyen a la sobrevivencia celular. En nuestro estudio encontramos que al pre-tratar a los hepatocitos con los inhibidores específico de la vía PI3K/Akt se disminuye significativamente la activación de ERK1/2, este resultado confirma que la vía PI3K/Akt está participando en la activación de ERK1/2. Estudios en hepatocitos primarios con el inhibidor LY294002 a una concentración de 50 μM , como inhibidor de la vía PI3K/Akt bloqueó la fosforilación de ERK1/2 confirmado de esta manera que la vía PI3K/Akt es una importante vía de señalización requerida para la activación de ERK1/2 (Mounho y Thrall, 1999). En células de riñón embrionario se mostro que la activación de la MAPK's fue sensible a wortmanina otro inhibidor de PI3K (Lo y col., 2003).

7.5 PARTICIPACIÓN DE ERO EN LA ACTIVACIÓN DE AKT, ERK1/2 Y STAT-3

El papel de las ERO como segundos mensajeros o mediadores de vías de señalización ha sido investigado mediante el pre-tratamiento a la células con compuestos antioxidantes como: catalasa pegilada (CATPEG) y N-acetilcisteína (NAC) antes de la administración de cadmio, esto se ha confirmado en células renales (Hsiao y Stapleton, 2004; Koyu y col., 2006). Debido a que el cadmio es capaz de generar ERO, es por ello, que se plantea ver su participación como mediadores de la activación de Akt, ERK1/2 y Stat-3 utilizando como antioxidante a la CATPEG, ya que su conjugado de polietilenglicol le da mayor tiempo de vida media para actuar a diferencia de la catalasa no modificada, su efecto se ha observado al reducir el número de células tumorales de pulmón (Hyoudou y col., 2006). Por otra parte, en un modelo murino de células de pulmón sometidas a radiación y pre-tratadas con CATPEG se

demostró su acción antioxidante (Machtay y col., 2006). En el presente estudio encontramos que la activación de la Akt (Ser 473), la Akt (Thr 308), la ERK1/2 y la Stat-3 (Ser 727) se ve disminuida de manera significativa su actividad con respecto a las células que sólo fueron tratadas con cadmio, con este resultado se confirma que las ERO generadas por el cadmio se encuentran como mediadores de la cascada de señalización que se propone para el cadmio en cultivo primario de hepatocitos. Stephen y col. (2004), reportan que metales pesados como el cadmio, cobalto, arsénico, vanadato y cobre han mostrado interactuar con la vía PI3K/Akt mediante las ERO y no mediada por las ERO. Por otra parte, Granado-Serrano y col. (2008), señalan que la generación de ERO actúan como activadores río arriba de las MAPK's, ya que cuando las células son tratadas con NAC se ve suprimida su activación. En un modelo de hepatocitos tratados con NAC se observó un decremento de la fosforilación basal de ERK1/2, este resultado sugiere que las ERO juegan un papel crucial en la regulación de ERK1/2 en hepatocitos cultivados en ausencia de hormonas, factores de crecimiento así como en hepatocitos en respuesta a cambio de medio completo nuevo (Kim y col., 2005).

7.6 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HSP70 EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS EXPUESTOS A CADMIO

La exposición a metales pesados resulta en una alta expresión de la proteína Hsp70 en tejidos de peces, incluyendo hepatocitos (Boone y Vijayan, 2002). Esta proteína se sabe que actúa como chaperona molecular y es crucial para la funcionalidad de las proteínas incluyendo, plegamiento, localización intracelular, secreción y degradación (Boone y Vijayan, 2002). En estudios realizados en la línea celular U3A, determinaron que existe una región corta del promotor del gen codifica para Hsp70 que contiene un sitio de reconocimiento para Stat-3 (Stephanou y Latchman, 1999; Nageswara y col., 2001). Además, la interacción de esta chaperona está involucrada con la transducción de señal, regulación del ciclo celular y muerte celular programada (Mayer y Bukau, 2005). Es por ello el interés de ver su expresión como respuesta final de la cascada de señalización en la activación del factor Stat-3. En nuestro estudio, los hepatocitos tratados con CdCl₂ 5 µM incrementaron la expresión de la proteína Hsp70 de manera dependiente del tiempo de exposición, a partir de las 2h que comenzó a ser significativa. Estudios en células HepG2 con 5 µg/ml de CdCl₂ se encontró un incremento de cuatro veces en la inducción de la Hsp70 (Tchounwou y col., 2001), en el grupo de Urani y col. (2007), trataron a las células HepG2 a diferentes concentraciones

de CdCl₂, reportando que a una exposición prolongada a CdCl₂ sobre-regula la expresión de la Hsp70. Estudios realizados en cultivo primario de hepatocitos tratados con 10 µM de CdCl₂ por 24 h mostraron una elevada acumulación de 3 a 6 veces (Boone y Vijayan, 2002).

8 CONCLUSIÓN

Se ha reportado que el cadmio es capaz de activar a factores de transcripción (Valko y col., 2005), sin embargo, el mecanismo exacto por el que se activa al factor Stat-3 no se conoce. Nuestros resultados se resumen en la figura 12, en la que se observa que el cadmio induce una clara producción de ERO involucradas como mediadoras de vías de señalización como se ha reportado en trabajos con cultivo primario de hepatocitos y ha no ser consideradas como una respuesta citotóxica. Las ERO generadas por el cadmio llevan a la activación de Akt, ERK1/2 y Stat-3 que son sensibles a las ERO. Así mismo, se sabe que existe una relación entre la vía PI3K/Akt y la MAPK ERK1/2 en mecanismos de respuesta celular, como sobrevivencia, y al encontrar en los resultados una disminución significativa de la activación de p-ERK1/2 por los inhibidores específicos de la vía PI3K/Akt se confirmó la relación entre estas proteínas dentro de la cascada de señalización para la activación del factor Stat-3 a nivel de serina 727, sitio que se sabe es fosforilado por vía de las MAPK's. Y una vez fosforilado el factor por ERK1/2 se une a la secuencia específica que reconoce el promotor del gen de la Hsp70 para inducir la expresión de esta proteína como una respuesta final en la vía de señalización (Fig 12).

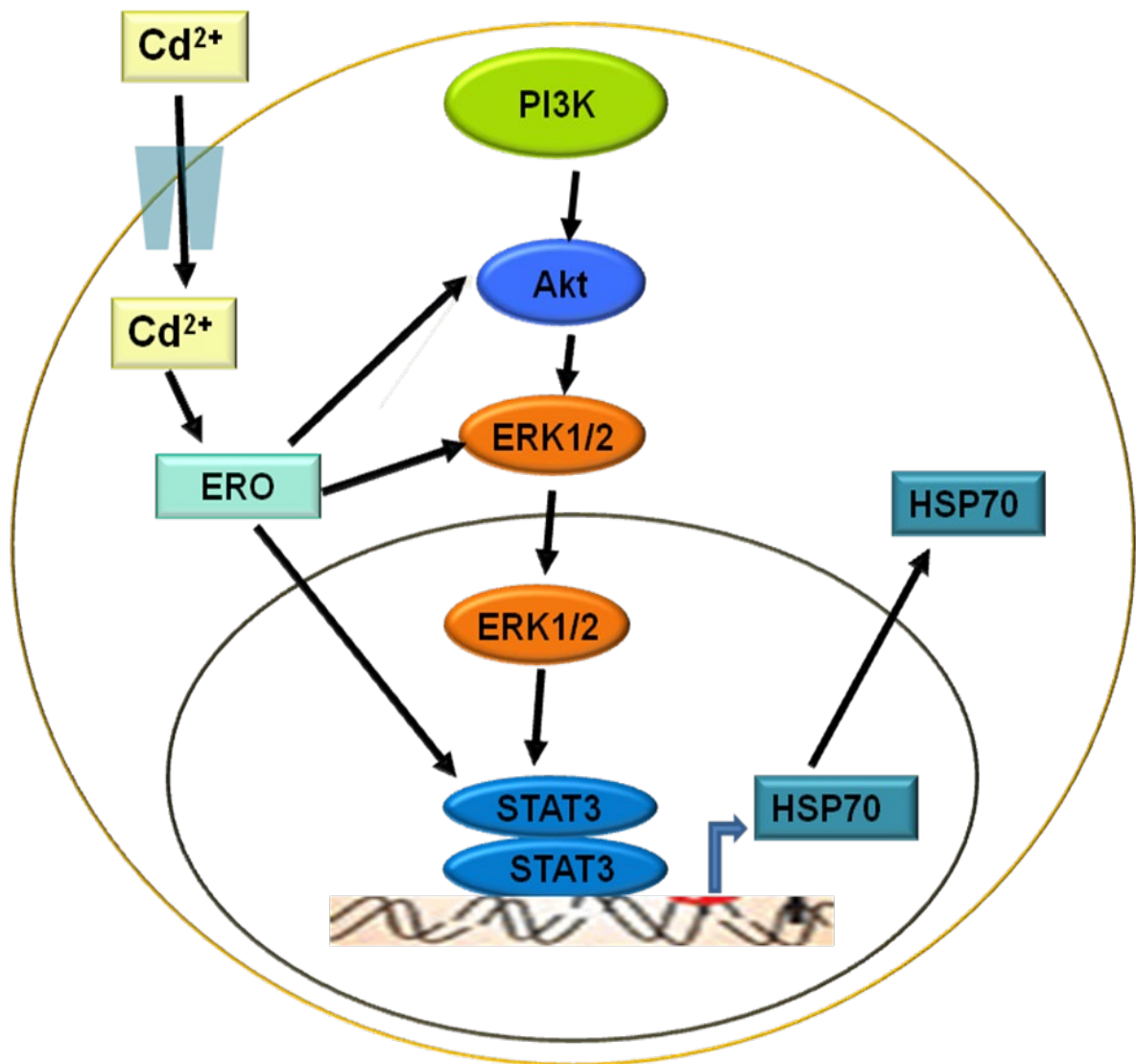


Figura 12. Mecanismo de acción encontrado para el cadmio en hepatocitos.

9 BIBLIOGRAFÍA

Andersen O., Nielsen J.B., Sorensen J.A. y Scherrebek L. 1994. Experimental localization of intestinal uptake site for metals (Cd, Hg, Zn, Se) in vivo in mice. Environ Health Perspect. 102: 199-206.

Andjelkovic M., Alessi D. R., Meier R., Fernández A., Lambo N. J., Frech M., Cron P., Cohen P., Lucocq J.M. y Hrmings B.A. 1997. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. B J Biol Chem. 272:31515-31524.

ATSDR. 1999. Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, GA.

Bertin G. y Averbeck D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications in biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). Biochimie. 88(11): 1549-1559.

Boone N. A. y Vijayan M. M. 2002. Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes: effect of heat shock and heavy metal exposure. Comp Biochem and Physiol Toxicol Pharmacol Part C. 132 (2): 223-233.

Bustos M., Beraza N. y Lasarte J.J. 2003. Protection against liver damage by cardiotrophin-1: a hepatocyte survival factor up-regulated in the regenerating liver in rats. Gastroenterology. 125(1):192-201.

Chuan-Ming Y., Pei-Shan Ch. y Hao-Jen H. 2007. Distinct signaling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. J Exp Bot. 58:659-671.

Deckert J. 2005. Cadmium toxicity in plants: Is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells?. Biometals. 18(5):475-481.

Decker T. y Kovarik P. 2000. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogen*. 19: 2628-2637.

DelRaso N. J., Foy B.D., Gearhart J.M. y Frazier J.M. 2003. Cadmium uptake kinetics in hepatocytes: Correction for albumin binding. *Toxicol Sci*. 72: 19-30.

Diamond G. L. y Zalupus R.K. 1998. Understanding renal toxicity of heavy metals. *Toxicol Pathol*. 26: 92-103.

Dudley C. A., Thomas D., Best J. y Jenkins A. 2004. The STATs in cell stress-type responses. *Cell Commun Signal*. 2:1-5.

Dufour J. F. y Clavien P. A. 2005. Signaling pathways in liver diseases. Ed. Springer. Germany. Págs. 3-5.

Escobar M. C., Souza V., Bucio L., Hernández E., Damián-Matsumura P., Zaga V. y Gutiérrez-Ruiz M. 2002. Cadmium induces $\alpha 1$ collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells. *Toxicology*. 170:63-73.

Feder M.E. y Hofmann G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*. 61:243-282.

Ferrand A., Kowalski-Chauvel A., Bertrand C., Pradayrol L., Fourmy D., Dufresne M. y Seva C. 2004. Involvement of Jak2 upstream of the PI 3-Kinase in cell-cell adhesion regulation by gastrin. *Exp Cell Res*. 301: 128-138.

Gao B. 2005. Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol*. 2: 92-100.

Goering P.L., Fisher B.R. y Kish C.L. 1993. Stress protein synthesis induced in rat liver by cadmium precedes hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 122:139-148.

Goering P.L. y Klaassen C.D. 1997. Hepatotoxicology of copper, iron, and cadmium. Hepatic and Gastrointestinal Toxicology Chapter 9. Sipes IG, McQueen CA, Gandolphi AJ, editors. New York. Elsevier Science. Pág. 389-406.

Goncalves A. L., Vigário A M. y Penha-Goncalves C. 2007. Improved isolation of murine hepatocytes for in vitro malaria liver stage studies. Malar J. 6: 169.

Goyer R. A. 1997. Toxic and essential metal interactions. Annu Rev Nutr. 17:37–50.

Granado-Serrano A. B., Martín A. A., Goya L., Bravo L. y Ramos S. 2008. Time-course regulation of survival pathways by epicatechin on HepG2 cells. J Nutr Biochem. 10: 1-10.

Heinrich P. C., Behrmann I., Haan S., Hermanns H. M., Muller-Newen G. y Schaper F. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. Biochem J. 374: 1-20.

Hsiao Ch. J. y Stapleton S. R. 2004. Characterization of Cd-induced molecular events prior to cellular damage in primary rat hepatocytes in culture: Activation of the stress activated signal protein JNK and transcription factor AP-1. J Biochem Mol Toxicol. 18(3):133-142.

Hyoudou K., Nishikawa M. Kobayashi Y., Kuramoto Y., Yamashita F. y Hashida M. 2006. Inhibition of adhesión and proliferation of peritoneally disseminated tumor cells by pegylated catalase. Clin Exp Metastasis. 23(5-6): 269-278.

Ivanov V. N., Krasilnikov M. y Ronai Z. 2002. Regulation of Fas expression by Stat3 and c-Jun is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling. J Biol Chem. 277(7): 4932-4944.

Jaattela M. 1993. Overexpression of major heat shock protein Hsp 70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. J Immunol. 151(8):4286-4294.

Jacquier-Sarlin M.R. y Polla B.S. 1996. Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H₂O₂: role of thioredoxin. *Biochem J.* 318:187-193.

Kawakami Y., Nishimoto H., Kitaura J., Maeda-Yamamoto M., Kato R. M., Littman D. R., Leitges M., Rawlings D. J. y Kawakami T. 2004. Protein kinase C β 1 regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type and stimulus specific fashion. *J Biol Chem.* 279(46): 47720-47725.

Kim K. S., Woodcroft J. K., Oh J. S., Abdelmegeed A. M. y Novak F. R. 2005. Role of mechanical and redox stress in activation of mitogen-activated protein kinases in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 70(12): 1785-1795.

Klaassen C.D. y Liu J. 1998. Induction of metallothionein as an adaptive mechanism affecting the magnitude and progression of toxicological injury. *Environ Health Perspect.* 1:297-300.

Klaassen C.D., Liu J. y Supratim C. 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:267-294.

Kmiec Z. 2001. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 161: 1-151.

Koyu A., Gokcimen A., Ozguner F., Bayram D. S. y Kocak A. 2006. Evaluation of effects of cadmium on rat liver. *Mol Cell Biochem.* 284: 81-85.

Krasilnikov M. A. 2000. Phosphatidylinositol-3-kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry.* 65(1): 59-67.

Kregel K.C. 2002. Molecular biology of thermoregulation. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92:2177-2186.

Lag M., Refsnes M., Lilleaas E. M., Holme J. A., Becher R. y Schwarze P. E. 2005. Role of mitogen activated protein kinases and protein kinase C in cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells. Toxicology. 211(3): 253-264.

Levy D. E. y Lee Ch. 2002. What does Stat3 do?. J Clin Invest. 109: 1143-1148.

Lim C. P. y Cao X. 1999. Serine phosphorylation and negative regulation of STAT3 by JNK. J Biol Chem. 274 (43): 31055-31061.

Liu J., Kadiska M. B., Corton C., Qu W., Waalkes M.P., Mason R. P., Liu Y. y Klaassen C. D. 2002. Acute cadmium exposure induce stress-related gene expression in wild-type and metallothionein-I/II-null mice. Free Radic Biol Med. 32: 525-535.

Liu Z., Yu X. y Shaikh A. Z. 2008. Rapid activation of ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells by cadmium. Toxicol Appl Pharmacol. 228(3): 286-294.

Lo R. K. H., Cheung H. y Wong Y. H. 2003. Constitutively active Gα16 stimulates Stat3 via a c-Src/Jak and Erk-dependent mechanism. J Biol Chem. 278 (52): 52154-52165.

López-Ortal P., Souza V., Bucio L., González E. y Gutiérrez-Ruiz M. 1999. DNA damage produced by cadmium in a human fetal hepatic cell line. Mutat Res. 439: 301-306.

Machtay M., Scherpereel A., Santiago J., Lee D., McDonough J., Kinniry P., Arguiri E., Shuvaev V.V., Sun J., Cengel K., Solomides C.C. y Christofidou-Solomidou M. 2006. Systemic polyethylene glycol-modified (PEGYLATED)-superoxide dismutase and –catalase mixture attenuates radiation pulmonary fibrosis in the C57BL/6 mouse”. Radiother Oncol. 81(2): 196-205.

Martelli A. M., Nyakern M., Tabellini G., Bortul R., Tazzari P. L., Evangelisti C. y Cocco L. 2006. Phosphoinositide 3- kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 20(6):911-928.

Mayer P.M. y Bukau B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 62(6): 670-684.

Monroe R. K. y Halvorsen S. W. 2006. Cadmium blocks receptor-mediated Jak/STAT signaling in neurons by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 41(3): 493-502.

Mounho J. B. y Thrall D. B. 1999. The extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to mitogenic and antiapoptotic effects of peroxisome proliferators in vitro". *Toxicol Appl Pharmacol*. 159(2): 125-133.

Murata M., Kojima T., Yamamoto T., Go M., Takano K., Osanai M., Chiba H. y Sawada N. 2005. Down-regulation of survival signaling through MAPK and Akt in occludin-deficient mouse hepatocytes in vitro. *Exp Cell Res*. 310(1): 140- 151.

Nageswara R. M., Suzhen L., Cam P. y Marschall S. R. 2001. Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21(3): 321-326.

OECD Enviroment monograph series No. 104. 1994. Risk reduction monograph No. 5 Cadmium. OECD. Francia, París. Pp. 23-32.

Ohara K. A., Vaghjiani R. J., Nemec A. A., Klei L. R. y Barchosky A. 2007. Cr(VI)-stimated Stat3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human airway epithelial cells requires Lck. *Biochem J*. 402: 261-269.

Ortmann R. A., Cheng T., Visconti R., Frucht D. M. y O'Shea J. J. 2000. Janus kinases and signal transducers and activators of transcription: their roles in cytokine signaling, development and immunoregulation. Arthritis Res. 2(1): 16-32.

Osaki M., Oshimura M. e Ito H. 2004. PI3K/Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. Apoptosis. 9(6):667-676.

Persad S., Attwell S., Gray V., Mawji N., Deng J.T., Leung D., Yan J., Sanghera J., Walsh M. P. y Dedhar S. 2001. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase. J Biol Chem. 276 (29): 27462-27469.

Peterson R.B. y Lindquist S. 1989. Regulation of Hsp70 synthesis by messenger RNA degradation. Cell Regul. 1(1):135-149.

Pigman A. E., Blanchard J. y Laird E. H. 1997. A study of cadmium transport pathways using the Caco-2 cell model. Toxicol Appl Pharmacol. 142(2): 243-247.

Quaife C., Findley S.D., Erickson J.C., Kelly E.J., Zambrowicz B.P. y Palmiter R.D. 1994. "Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia". Biochemistry. 33(23):7250-7259.

Rawlings J. S., Rosler K. M. y Harrison D. A. 2004. The JAK/STAT signaling pathway. J Cell Sci. 117: 1281-1283.

Rikans L. E. y Yamano T. 2000. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity". J Biochem Mol Toxicol. 14(2):110-117.

Sano S., Kira M., Takagi S., Yoshikawa K., Takeda J. y Itami S. 2000. Two distinct signaling pathways in hair cycle induction: Stat3-dependent and -independent pathways. Proc Natl Acad Sci. U. S. A. 97(25): 13824 – 13829.

Sauer H., Neukirchen W., Rahimi G., Grünheck F., Hescheler J. y Wartenberg M. 2004. Involvement of reactive oxygen species in cardiotrophin-1-induced proliferation of cardiomyocytes differentiated from murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res.* 294: 313-324.

Shafer J. T. 1998. Effects of Cd^2 , Pb^2 and CH_3Hg on high voltage activated calcium current in pheochromocytoma (PC12) cells: potency, reversibility, interactions with extracellular Ca^2 and mechanisms of block. *Toxicol Lett.* 99(3): 207-221.

Shoba L. N. N., Newman M., Liu W. y Lowe W. L. 2001. LY294002, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits GH-mediated expression of the IGF-I gene in rat hepatocytes". *Endocrinology.* 142(9): 3980-3986.

Simon A. R., Usha R., Barry L., Fanburg y Brent H. C. 1998. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol.* 275:C1640-C1652.

Song G., Ouyang G. y Bao S. 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cells survival. *J Cell Med.* 9: 59-71.

Souza V., Bucio L. y Gutiérrez-Ruiz M. C. 1997. Cadmium uptake by and human hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology.* 120: 215-220.

Souza V., Escobar M. C., Bucio L., Hernández E. y Gutiérrez-Ruiz M.C. 2004. Zinc pretreatment prevents hepatic stellate cells from cadmium-produced oxidative damage. *Cell Biol Toxicol.* 20(4):241-251.

Souza V., Escobar M. C., Bucio L., Hernández E., Gómez-Quiroz L. y Gutiérrez-Ruiz M.C. Cadmium induces Stat3 activation by NADPHoxidase and ERK1/2 in HepG2 cells. *Toxicol Letters.* (Enviado para su publicación).

Souza V., Escobar M. C., Gómez-Quiroz L., Bucio L., Hernández E., Chávez Cossio E. y Gutiérrez-Ruiz M.C. 2004. Acute cadmium exposure enlases AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology.* 197:213-228.

Stephanou A. 2004. Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury. J Cell Mol Med. 8(4):519-525.

Stephen S. L., Harris K. G. y Shi X. 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. Free Radic Biol Med. 37 (12): 1921-1942.

Stephanou A., Isenberg D. A., Nakajima K. y Latchman D. S. 1999. Stat-1 and HSF-1 interact and activate the transcription of the Hsp-70 and Hsp-90 gene promoter. J Biol Chem. 274(3): 1723-1728.

Stephanou A. y Latchman D. S. 1999. Transcriptional regulation of the heat shock protein genes by STAT family transcription factors. Gene Expr. 7(4-6): 311-319.

Sugisawa N., Matsuoka M., Okuno T. y Igisu H. 2004. Suppression of cadmium-induced JNK/p38 activation and Hsp70 family gene expression by LL-Z1640-2 in NIH3T3 cells. Toxicol Appl Pharmacol. 196 (2). 206-214.

Tchounwou P. B., Ishaque A. B. y Schneider J. 2001. Cytotoxicity and transcriptional activation of stress in human liver carcinoma cells (HepG2) exposed to cadmium chloride. Mol Cel Biochem. 222: 21-28.

Thomas F. Franke, Daniel C. Berwick. 2005. PI3K, PTEN and Akt en Signaling Pathways in liver diseases. Dufour Jean-Francois and Clavien. Pierre-Alain. Ed. Springer. Germany. p.p. 441.

Urani C., Melchiorretto P., Canevali C., Morazzoni F. y Gribaldo L. 2007. Metallothionein and hsp70 expression in HepG2 cells after prolonged cadmium exposure. Toxicol In Vitro. 21(2): 314-319.

Valko M., Morris H. y Cronin M.T.D. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. Curr Medic Chem. 12(10): 1161-1208.

Vayssier M. y Polla B.S. 1998. Heat shock proteins chaperoning life and death. Cell Stress Chaperones. 3(4):221-227.

Wang S. S., Chen L. y Xia S. K. 2007. Cadmium is acutely toxic for murine hepatocytes: effects on intracellular free Ca^{2+} homeostasis. Physiol Res. 56: 193-201.

Wispriyono B., Matsuoka M., Igisu H. y Matsuno K. 1998. Protection from cadmium citotoxicity by N-acetylcysteine in LLC-PK1 cells. J Pharmacol Exp Ther. 287: 344-351.

Zalpus R. K. y Ahmad S. 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. Toxicol Appl Pharmacol. 186(3): 163-188.