



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

Laboratorio de Fisiología Celular UAM-I

**“PARTICIPACIÓN DEL EGFR EN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN STAT-3 EN HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

PRESENTA

Biol. Exp. Uribe Marín Berna del Carmen

Directora de Tesis: Dra. Souza Arroyo Verónica

Asesor interno: Dr. Gómez Quiroz Luís Enrique

Asesor externo: Dr. Emilio Rojas del Castillo

México, D. F. 2010

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. Verónica Souza Arroyo
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.
veso@xanum.uam.mx

ASESOR

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.
legq@xamun.uam.mx

ASESOR

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

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT

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).

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.

Fondo Sectorial de Investigación SEP-CONACYT CB-2006-1-60181 y CONACYT con número de becario/CVU 229382/212789.

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE

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

VOCAL

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

VOCAL

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.
legq@xamun.uam.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 DEL EGFR EN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT-3 EN HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO”**, con fecha 9 de febrero del 2010.

JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTA

DRA. MA. CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ

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

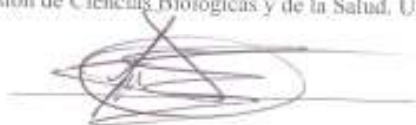


VOCAL

DR. LUIS ENRIQUE GÓMEZ QUIROZ

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.



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Verónica Souza Arroyo mi más sincero agradecimiento por darme su valioso apoyo y tiempo (PDI, Servicio Social, Maestría) así como sus consejos tanto académicos como personales, ya que me han servido como parte de mi formación.

A la Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz todo mi agradecimiento y estimación por su enorme apoyo y comprensión durante mi estancia en el laboratorio, y porque me enseñó valores, tanto en lo profesional como en lo personal.

Al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz con cariño por sus observaciones y sugerencias para el desarrollo de la tesis y de mi formación académica.

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

A mis amigas y compañeros del laboratorio, con cariño; Lety, Ely, Vero Lopez, Naty, al equipo C-met (Denisse, Cristina, Mayra), Alberto, Sandra, Jorge, Ileana, pero en especial a; Argelia, Cynthia y Karina por tener siempre tiempo para ayudarme y escucharme, ya que sus consejos fueron claves para la realización de mi proyecto.

Esta tesis esta dedicada a mi madre, a quien agradezco de todo corazón por brindarme su apoyo incondicional, tener la sabiduría para guiarme y enseñarme con su ejemplo que no hay nada que no pueda hacer.

Gracias a mis hermanos, por su compañía, su paciencia y por darme el cariño y apoyo necesario para no darme por vencida.

A mis tíos; gracias por ser parte importante en mi formación.

Agradezco haber encontrado el amor y compartir con el esta etapa de mi vida.

Mis amigos; gracias por brindarme su tiempo, sus conocimientos y su amistad.

Agradezco a la vida por darme la oportunidad de llegar a esta fase de la vida y poderla compartir con mis seres querido.

ÍNDICE

Abreviaturas	3
Resumen	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Generalidades del cadmio	5
1.2 Efectos del Cadmio	7
1.3 Generalidades del Hígado	7
1.4 El Factor Transductor de señal y Activador de Transcripción (Stat-3)	8
1.5 Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR)	10
1.6 Proteína de choque térmico	16
1.7 Cultivos celulares	16
2. JUSTIFICACIÓN	18
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos particulares	20
5. MATERIAL Y METODOS	21
5.1 Aislamiento de hepatocitos por perfusión con colagenasa	21
5.2 Tratamientos de los hepatocitos primarios con CdCl ₂	22
5.3 Tratamientos de los hepatocitos primarios con inhibidores	22
5.4 Extracción de la proteína total	22
5.5 Western Blot	23
5.6 Determinación del contenido de proteína	23
5.7 Análisis estadístico	24
6. RESULTADOS	25
6.1 Activación del factor de transcripción Stat-3 en hepatocitos tratados con Cadmio	25
6.2 Participación del EGFR y de la cinasa Src en la fosforilación de Stat-3 (Tyr705)	25
6.3 Activación de EGFR en hepatocitos tratados con Cadmio	28
6.4 Participación de la cinasa Src, y de PKC en la fosforilación del EGFR	28
6.5 Participación de PKC en la fosforilación de Stat-3 (Tyr705)	28
6.6 Activación de ERK 1/2 en hepatocitos tratados con Cadmio	31

6.7 Participación de la cinasa Src, y PKC en la fosforilación de ERK 1/2	31
6.8 Producción de la proteína Hsp70 en cultivo primario de hepatocitos expuestos a Cadmio	36
7. DISCUSIÓN	39
8. CONCLUSIÓN	43
9. REFERENCIAS	45

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
Alb	Albúmina
AP-1	Proteína activadora 1
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca	Calcio
Cd	Cadmio
CdCl ₂	Cloruro de cadmio
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiamintetracético
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal
EGTA	Ácido tetracético etilén glicol
ERK 1/2	Cinasa reguladora de señal extracelular 1 y 2
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
GSH	Glutación
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks
HSC	Células estelares hepáticas
HSF-1	Factor de choque térmico 1
Hsp70	Proteína de choque térmico 70
IP3	Fosfatidilinositol 3 fosfato
JAK	Cinasa Janus
JNK	Cinasa de Jun
KC	Células de Kupffer
Mg	Magnesio
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MT	Metalotioneína
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH oxidasa	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidasa
NaF	Fluoruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaO ₃ V	Ortovanadato de sodio
NiCd	Níquel-Cadmio
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PH	Dominio Homólogo a plestrina
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEC	Células endoteliales sinusoidales
SFB	Suero fetal bovino
SHIP	SH2-fosfatasa inositol
siRNA	ARN de interferencia
Src	Cinasa del sarcoma de Rous
Stat	Transductor de señal y activador de transcripción
TAD	Dominio transcripcional de transactivación
TBS	Amortiguador salino de TRIS
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

- ❖ El cadmio (Cd) es un metal pesado no esencial que debido a la actividad industrial, está ampliamente distribuido en el ambiente. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden ser mediadoras de señales y se ha sugerido que el Cd puede producirlas a través de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), la cual es activada por medio de PKC. El factor de transcripción como el Transductor de Señal y Activador de Transcripción-3 (Stat-3), es sensible a la generación de ERO y es activado por el Cd. Sin embargo, no se conoce con exactitud la vía de transducción de señales responsable de la activación de Stat-3 por el Cd. Se sabe que la proteína Stat-3, es fosforilada por JAK2 en los residuos conservados de tirosina (Tyr705) y por ERK 1/2 en serina (Ser727). Stat-3 activado se transloca al núcleo para activar los genes correspondientes. Por otro lado, se conoce que el factor de crecimiento epidermal (EGFR) puede ser transactivado por la cinasa Src para fosforilar a Stat-3 en tirosina (Tyr705) de manera directa. Es por ello, que el objetivo de este proyecto fue caracterizar el mecanismo de activación de Stat-3 mediado por el CdCl₂ en hepatocitos de ratón. Los hepatocitos fueron tratados con 5 μM de CdCl₂ por diferentes tiempos de incubación (0, 0.15, 0.5, 1, 2, 3-12 h) y se determinó la activación del factor Stat-3, del EGFR, de ERK 1/2, así como de la Hsp70 por Western blot. Para poder evaluar la participación del EGFR, de PKC y de la cinasa Src en la activación de Stat-3, las células fueron pre-tratadas con los inhibidores para el EGFR (AG1478), para PKC (queleritrina) y para la cinasa Src (Su6656), seguidos de 5 μM de CdCl₂. Los resultados mostraron que la activación del factor Stat-3 tanto en tirosina como en serina es dependiente del tiempo de exposición al CdCl₂. Los inhibidores para EGFR, PKC y la cinasa Src, mostraron una disminución significativa en la activación de Stat-3 en los hepatocitos tratados con CdCl₂. Para determinar la transactivación del EGFR mediado por la cinasa Src, los hepatocitos fueron pre-tratados con el inhibidor de la cinasa Src (Su6656), seguido de 5 μM de CdCl₂. Se encontró que la activación del EGFR por el Cd es dependiente del tiempo de exposición y que al inhibir a la cinasa Src, la activación del EGFR disminuyó en un 59.19%. Para determinar la participación del EGFR, de la cinasa Src y de PKC en la activación de ERK 1/2 los hepatocitos fueron pre-tratados con los inhibidores para el EGFR (AG1478), para PKC (queleritrina) y para la cinasa Src (Su6656), seguido de 5 μM de CdCl₂. Se encontró que la activación de ERK 1/2 por el Cd es dependiente del tiempo de exposición y que al inhibir al EGFR, la activación de ERK 1/2 disminuyó en un 76.51%. La activación de ERK 1/2, también se encontró disminuida en un 50.81% con el inhibidor de la cinasa Src y en un 63.71% con el inhibidor de PKC. También se evaluó la producción de la proteína Hsp70 en los hepatocitos tratados con 5 μM de CdCl₂ y se encontró un incremento con respecto al tiempo de exposición. Con estos resultados podemos concluir que el Cd puede activar al factor de transcripción Stat-3, por medio de la transactivación del EGFR dependiente de la cinasa Src. Además, la activación del EGFR involucra la vía de transducción de señales para la activación de ERK 1/2 que tiene un papel muy importante en la regulación de Stat-3. La producción de la Hsp70 por el Cd, es una respuesta que presentan los hepatocitos como mecanismo de sobrevivencia y su expresión puede ser mediada por la proteína Stat-3 por contener en su región promotora un sitio de reconocimiento para Stat-3.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DEL CADMIO (Cd)

El cadmio (Cd) es un metal pesado no esencial que está ampliamente distribuido en el ambiente, por la contaminación industrial. Se estima que cerca de 25,000 a 30,000 toneladas de Cd son liberadas al ambiente por año, debido a las amplias aplicaciones industriales que se le ha dado como la fabricación de baterías, pinturas, plásticos, fertilizantes, etc. Por lo tanto se incrementa el riesgo tanto de humanos como en otros mamíferos al exponerse a este metal. En el siglo XXI, el uso global del Cd es del 77 % por baterías NiCd, 11 % por pigmentos, 8 % por revestimientos (Gunnar y col., 2005). La principal fuente de exposición al Cd para la población en general es la ingesta de alimentos contaminados, donde aproximadamente el 70% del metal es absorbido por el organismo, porcentaje que se ve incrementado en personas fumadoras ya que un cigarrillo contiene entre 1-2 μg de Cd. Se ha demostrado que una baja concentración de hierro, zinc, y cobre en suero incrementa el grado de absorción considerablemente del Cd por vía gastrointestinal en humanos (Gunnar y col., 2005). La exposición por vía respiratoria ocurre en forma de partículas en el aire. Estudios obtenidos de exposiciones crónicas, indican que existe una alta absorción del Cd a través de la vía inhalatoria aproximadamente del 7-40 % (Gunnar y col., 2005). Después de la absorción, el Cd se une a la albúmina (Alb), y a otras proteínas en el plasma sanguíneo. El Cd unido a la albúmina (Cd-Alb) es captado principalmente por el hígado en donde causa toxicidad. En los hepatocitos el Cd se une al glutatión (GSH) y es eliminado en la bilis. El GSH es un tripéptido constituido por tres aminoácidos: glicina, cisteína, y ácido glutámico; es un antioxidante intracelular para lo cual usa el grupo tiol de la cisteína como agente reductor (Schnelldorfer y col., 2000). Igualmente el Cd puede unirse a la metalotioneína (MT) y trasladarse al riñón para su excreción (Fig. 1). Las MT constituyen un grupo de proteínas ampliamente distribuidas en los organismos. Se caracterizan por tener un alto contenido de grupos sulfhidrilo capaces de unir metales esenciales. La MT es una proteína citosólica la cual es inducida por una variedad de xenobióticos, hormonas, citocinas y metales como el Zn y el Cd (Coyle y col., 2000). Se le ha dado un papel muy importante en la acumulación del metal en los tejidos, con la cual forma un complejo (García y col., 1999). La entrada del Cd a la célula no es uniforme en todos los sistemas. Esto puede ser mediado por transporte pasivo o activo (Wispryono y col., 1998) o vía canales de calcio (Shafer., 1998). En nuestro laboratorio se determinó que el transporte de Cd en células hepáticas puede ser por canales iónicos o por acarreadores que involucran interacción con los grupos sulfhidrilo (Souza y col., 1997; Zalpus y Ahmad., 2003). El grupo de Trinder y col., (2000) determinó que en el hígado se expresa la proteína DMT1 (transportador 1 de metales divalentes), que esta involucrada en la entrada de Cd. El Cd que es

absorbido es eliminado muy lentamente por la orina, las heces fecales y solo pequeñas cantidades del metal se llegan a eliminar por el sudor, la exfoliación epitelial y el pelo (Timbrell., 2000). En humanos y otros mamíferos, el Cd afecta a varios órganos y tejidos, incluyendo el riñón, el hígado, el pulmón, el páncreas, la placenta y los huesos. Se conoce que el Cd tiene una vida media entre 20-30 años en el humano (Gunnar y col., 2005; Wlostowsk y col., 2007). El Cd tiene efectos carcinogénicos en órganos tales como, pulmón, páncreas y próstata (Gunnar y col., 2005). Basado en estudios epidemiológicos y toxicológicos en humanos y animales experimentales, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer en USA (IARC), ha clasificado al Cd como un carcinógeno de categoría de tipo I (Urani y col., 2007).

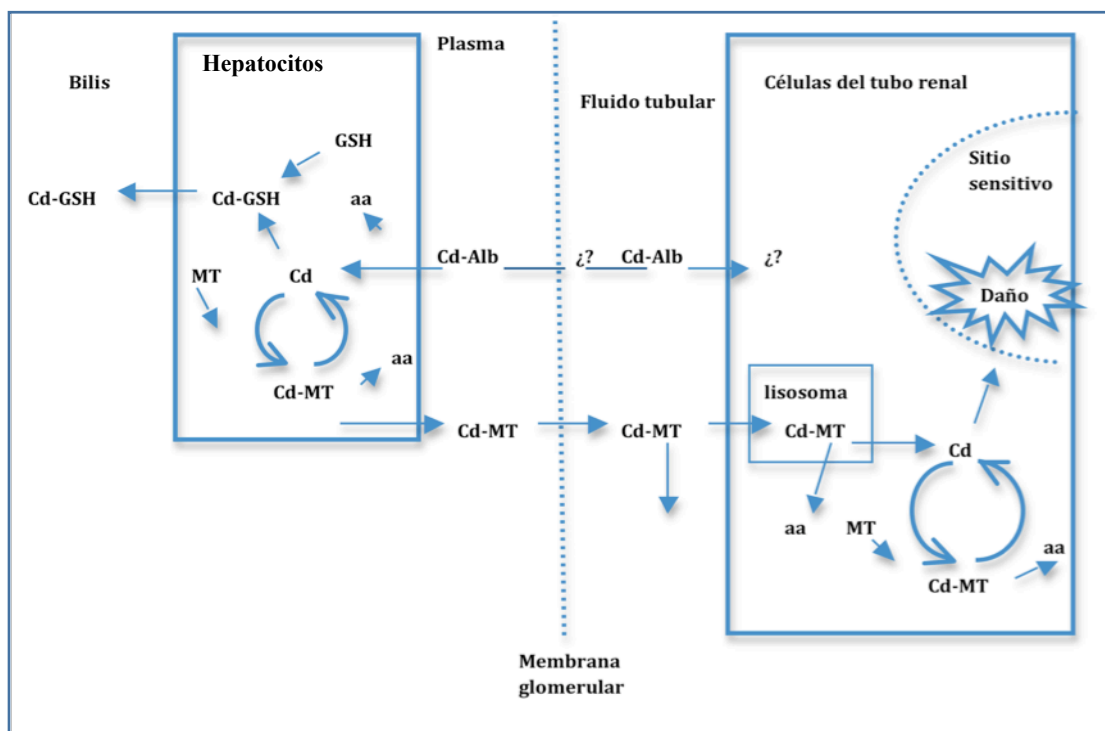


Figura 1.- Absorción del cadmio (Cd) a nivel sistémico y su transporte a los órganos blancos; GSH: glutatión; MT: metalotioneína; aa: amino ácidos; Alb: albúmina. Imagen tomada de Gunnar, y col., 2005.

1.2 EFECTOS DEL CADMIO

Los efectos del Cd sobre el organismo dependen de varios factores, incluyendo la dosis, la forma química, las propiedades fisicoquímicas, la ruta de exposición y la duración de la exposición. Cuando se ingieren alimentos o bebidas con altas concentraciones de Cd se puede presentar gastritis, náusea, vómito, diarrea, dolor abdominal y mialgias, así como salivación. Los efectos por inhalación crónica de humos, polvos de óxido o sulfuros son más graves. En este caso, el Cd puede provocar enfisema, neumonitis química aguda y edema pulmonar. Respecto al daño pulmonar, está se incrementa con el tiempo y el grado de exposición, y consiste en obstrucción pulmonar, bronquitis crónica y la fibrosis progresiva. Está comprobado que el daño que el Cd provoca en los fumadores es mayor y la concentración de Cd en los pulmones es más elevada en estos individuos. Las principales alteraciones sistémicas debidas a la toxicidad del Cd consisten en daño renal con proteinuria, anemia y aumento en la velocidad de sedimentación en los eritrocitos. De estos daños la proteinuria es el más típico, caracterizado por la α, β, γ -globulinuria, albuminuria e inmunoglobulinemia y en etapas avanzadas puede haber un aumento en la excreción de aminoácidos, glucosa, calcio y fosfatos en la orina, lo cual puede causar la formación de cálculos renales (Diamond y Zalupus., 1998). A nivel celular se conoce que el Cd produce lipoperoxidación en donde los ácidos grasos polinsaturados son peroxidados por un mecanismo mediado por radicales libres, lesionando la membrana celular con un aumento en la permeabilidad. Hay evidencias de que el Cd inactiva actividades enzimáticas importantes para la función celular, ya sea por unirse a los grupos tioles presentes en los sitios activos de las enzimas o por desplazamiento de metales esenciales por competir por los sitios de unión (Rikans y Yamano., 2000). También el Cd disminuye los grupos sulfhidrilo de las proteínas y del GSH, debido a que tiene gran afinidad por estos grupos, por lo que éste metal está asociado a estrés oxidativo (Rikans y Yamano., 2000; Hsiao y Stapleton., 2009) y a la formación de ERO. 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 alteran la expresión de genes (Escobar y col., 2002). Así mismo, el Cd incrementa el contenido de calcio intracelular (Rikans y Yamano., 2000), y la síntesis de la proteína MT (García y col., 1999).

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 de 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 a cabo la mayoría de las funciones hepáticas. Por otra parte las células no parenquimáticas 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 un elemento constituido 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. 2). Las células endoteliales sinusoidales, llevan a cabo la importante función del filtrado, gracias a la presencia de pequeñas fenestraciones que les permiten una libre difusión de muchas sustancias.

Las células Kupffer 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 citocinas, prostanoídes, óxido nítrico que pueden proteger a los hepatocitos y estar activos en la remodelación de la matriz extracelular (MEC) (Dufour y Clavien., 2005).

Las células estelares se encuentran ubicadas en el espacio de Disse (Fig. 2). 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 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).

1.4 EL FACTOR TRANSDUCTOR DE SEÑAL Y ACTIVADOR DE TRANSCRIPCIÓN (STAT-3)

La exposición al Cd lleva a la activación de genes de factores que regulan la transcripción de proteínas de fase aguda, enzimas antioxidantes y proteínas estructurales. El Cd 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 MT (Liu y col, 2002).

Las proeínas Stat fueron identificadas por primera vez a partir de la purificación de factores que se unen a genes inducidos por el interferón- γ (Stephanou., 2004). Hasta el momento son siete las Stat identificadas (Stat-1, Stat-2, Stat-3, Stat-4, Stat-5a, Stat-5b y Stat-6). Las Stat comparten en su estructura una serie de dominios conservados, importantes para ejercer correctamente su función, estos dominios desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal son; dominio de interacción dímero-dímero, dominio enrollado-enrollado, dominio de unión a ADN, dominio SH2 (Src-homologo 2) y dominio de transactivación.

La vía de la cinasa Janus /STAT (Jak/STAT) es uno de los mecanismos de señalación para citocinas y factores de crecimiento. La señalización de Jak/Stat ocurre cuando el ligando se une a su receptor, induciendo la multimerización de las subunidades (Warren., 2001). Para algunos ligandos como la eritropoyetina y las hormonas del crecimiento, las subunidades del receptor están unidas como homodímeros, y para otros como los interferones y las interleucinas, como heterodímeros (Jason y col., 2004). La vía Jak/Stat utiliza un mecanismo en el cual los factores de transcripción Stat que se hallan en estado latente en el citoplasma son fosforilados por las cinasas de la familia Janus, dando lugar a la dimerización y su translocación al núcleo (Madamanchi y col., 2001) (Fig. 3). En el núcleo el dímero, Stat, es fosforilado por otras cinasas, como las de la familia de las cinasa activadas por mitógenos (MAPK) pero en residuos de serina. Las Stat modulan la expresión de genes relacionados con la diferenciación, el desarrollo, el crecimiento, la inflamación y proliferación (Jason y col., 2004). En mamíferos la familia de Jak comprende de cuatro miembros: Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2. Las MAPK están involucradas en la regulación del crecimiento celular, diferenciación y varias respuestas al estrés oxidativo incluyendo la apoptosis. La familia de las MAPK está formada por ERK 1/2 (cinasa regulada por señales extracelulares), p38 y la cinasa de Jun (JNK). En general se considera que las ERO activan a las MAPK, sin embargo la respuesta de los diferentes miembros de la familia es un proceso que depende del tipo celular. La cascada de señalización de ERK 1/2 es activada por factores de crecimiento y está asociada con la proliferación celular. p38 y JNK son activadas principalmente por estrés celular y están asociadas con procesos de inflamación y apoptosis. La fosforilación de Stat en serina 727 por las MAPK en adición a la fosforilación en tirosina 705 por las Jak es requerida para una máxima activación transcripcional. Eso indica por consiguiente que la fosforilación de Stat en serina 727 permite la integración de señales provenientes de múltiples vías (Zhang y col., 2004). Cambios en el estado redox intracelular pueden modificar la conformación de los Stat habilitando su activación (Dudley y col., 2004). Barry y col., (2009) demuestran que Stat-3, juega un papel citoprotector en células cardíacas expuestas a estrés

oxidativo. El Cd induce la producción de ERO, que se consideran importantes en la activación de factores de transcripción, en particular de Stat-3 (Gao., 2005).

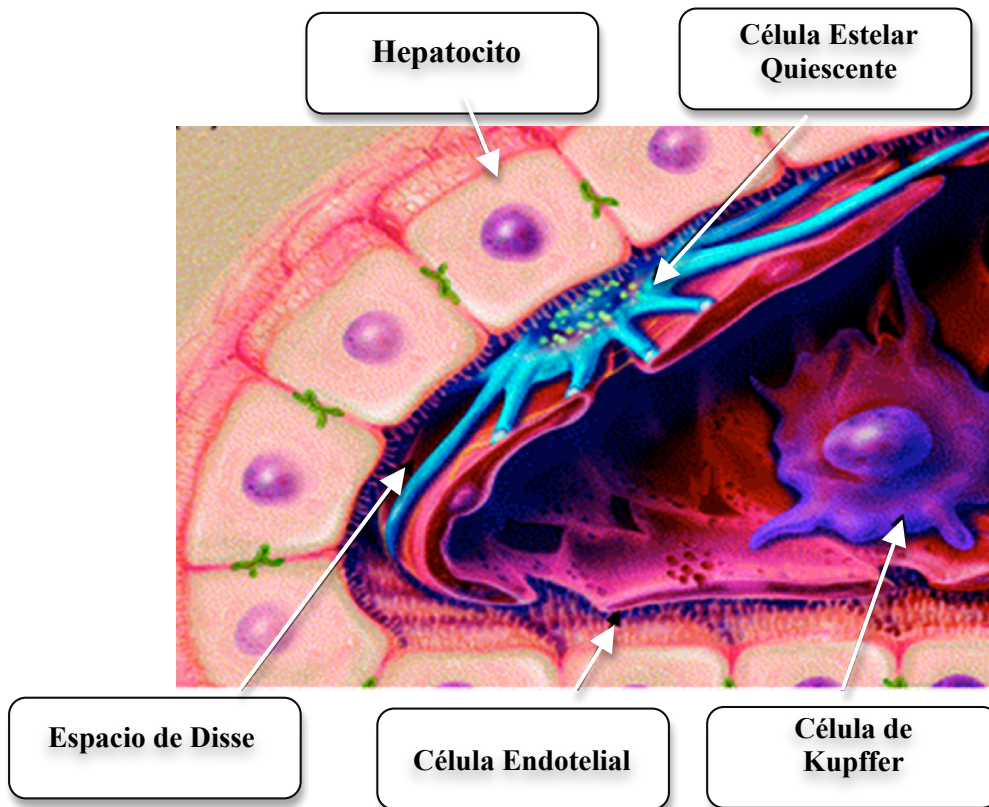


Figura 2. Tipos celulares de hígado normal. Las células estelares quiescentes (azul) se representa en el espacio de Disse entre los hepatocitos (rosa claro, las células cuadradas) y las células endoteliales sinusoidales (color rosado oscuro, las células alargadas), a un costado de las células de Kupffer (color morado) Imagen modificada de Friedman., 2004.

1.5 RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDEMAL (EGFR)

Se conoce que el Stat-3 puede ser activado por el receptor del factor de crecimiento epidemal (EGFR). Este receptor es una cinasa de tirosina transmembranal de 170 kDa que pertenece a la familia de las proteínas HER/ErbB (Ortiz y col., 2008). Su región amino terminal se encuentra localizada hacia el lado extracelular y posee dos dominios ricos en cisteínas, así como de presentar sitios de glicosilación que pueden regular la unión del ligando al receptor. El extremo C-terminal se orienta hacia el interior de la célula y estructuralmente posee dos componentes importantes que definen la cascada de señalización intracelular: 1) un dominio con actividad de

cinasa de tirosina, y 2) un número importante de residuos de tirosina, susceptibles de ser fosforilados (Lemus y Montaña., 2004). La unión a su ligando resulta en la dimerización de un receptor que da lugar a la activación de su tirosina cinasa y a la transfosforilación de los residuos de tirosina de su extremo C-terminal, así como de la activación de señales intracelulares y a su degradación lisosomal (Biscardi y col., 1999).

La fosforilación del receptor en la tirosina 845 (Tyr485) en su dominio catalítico está implicado en el sostenimiento de la activación, para facilitar la unión con los sustratos de la superficie celular, también de ser un sitio de unión para la cinasa Src.

El entrecruzamiento de señales que involucran la transactivación del EGFR está implicado en la regulación de una amplia variedad de funciones celulares importantes. Una de las proteínas que participan en la transactivación del EGFR es la cinasa Src (Slomiany y Slomiany., 2009). La activación del EGFR genera señales que inducen la proliferación, la diferenciación y la sobrevivencia celular a través de las MAPK (en específico con ERK 1/2) (Fig. 5). El intermediario que conecta a la cascada de señalización generada por EGFR con ERK 1/2 es la proteína Ras, que une nucleótidos de guanina y que posee también actividad de GTPasa. En el estado activo, Ras se une y activa a Raf, una cinasa de serina/treonina que a su vez fosforila y activa a la cinasa de ERK/MAPK (denominada MEK), enzima que fosforila residuos de serina/treonina y de tirosina. La activación de ERK 1/2 requiere de su fosforilación en un residuo de treonina y en uno de tirosina, separados únicamente por un aminoácido. Finalmente ERK 1/2 activada, pasa del citoplasma al núcleo y fosforila a proteínas reguladoras de la transcripción como a Stat-3 en serina 727 (Lemus y Montaña., 2004; Skarpen y col., 2005).

La cinasa Src es un miembro de la familia de proteína tirosina cinasa y tiene un papel muy importante en la transactivación del EGFR. La cinasa Src, fue identificada originalmente como el homólogo celular del v-Src por el virus del sarcoma de Rous (Moasser y col., 1999). Y tienen un papel importante en la diferenciación, la proliferación y la sobrevivencia celular (Roskoski., 2005). La cinasa Src puede ser activada por integrinas, una variedad de receptores de proteínas G, por estimulación de factores de crecimiento y por ERO (Schelessinger., 2000; Liu y col., 2009).

Sadd., (2008) concluye que la cinasa Src es un importante punto de convergencia para la señal de transducción y regulación de muchas vías de señalización. Gupte y col., (2009) mencionan que a través de la formación de ERO por medio de la NADPH oxidasa activada por la proteína cinasa C (PKC), la cinasa Src puede tener una participación en la vasoconstricción (Gupte y col., 2009). Se ha reportado que el Cd activa a PKC en varios tipos celulares, pero poco se conoce sobre sus efectos en las diferentes isoformas (Lag y col., 2005). En células de mejillones expuestas a

concentraciones bajas de Cd se propone que la generación de ERO es vía la NADPH oxidasa mediada por PKC (Dailianis., 2009).

PKC es miembro de la familia de fosforansferasas serina/treonina, las cuales tienen un papel regulatorio en varios procesos celulares, incluyendo la proliferación y la progresión del ciclo celular, así como en la diferenciación, la apoptosis, el remodelamiento del citoesqueleto, la modulación de canales iónicos, y la secreción. Se han identificado tres clases de PKC en mamíferos, y estas se pueden subdividir ampliamente en tres grupos las cuales tienen un requerimiento común de fosfolípidos para su actividad, pero difieren en su estructura y en la dependencia a otros activadores (Martelli y col., 2006).

La clásica PKC (cPKCs), $-\alpha$, $-\beta$ I, $-\beta$ II, $-\gamma$, son proteínas cinasas dependientes de fosfolípidos y de Ca^{2+} , requieren de fosfatidilserina (PS), Ca^{2+} y diacilglicerol (DAG).

Las PKC nuevas (nPKCs), $-\delta$, $-\epsilon$, $-\eta$, $-\theta$, μ /PKD (proteína cinasa D), son independientes de Ca^{2+} y requieren DAG y PS. La atípica PKC (aPKCs), $-\tau$, $-\iota$ / $-\lambda$, son dependientes de PS, o lípidos de inositol (Bey y col., 2004). Todos los miembros de la familia de PKC contienen un dominio catalítico altamente conservado en el carboxilo terminal el cual contiene un dominio de unión a ATP (C_3), y un dominio catalítico (C_4). La dependencia al Ca^{2+} es conferida sobre las cPKC a través de la región C_2 . La función biológica de PKC se liga con eventos que ocurren a nivel de membrana plasmática o en el citoplasma, porque la mayoría de las isoformas de PKC están asociadas con el citoesqueleto en un estado inactivo y después de la activación parcial (fosforilación, unión de Ca), estas son reclutadas en la membrana plasmática para activarse completamente en presencia de su cofactor específico, DAG y fosfolípidos (Bey y col., 2004). Sin embargo, hay evidencia donde implican el papel de PKC en funciones nucleares, sugiriendo que puede ser una vía de comunicación entre señales generadas en la periferia celular a hacia el núcleo (Martelli y col., 2006). Xuan y col., (2005), mencionan que en daño por isquemia en células cardíacas, la fosforilación de Stat-1 y Stat-3 en serina, se da a través de PKC vía PCK-Raf1-MEK 1/2-p 44/42 MAPK (Xuan et al., 2005). De igual forma, se ha reportado que en la línea celular de osteoblastos de ratón bajo estímulos de estrés, PKC activa a ERK 1/2 (Miyahara y col., 2004). En células epiteliales de pulmón, tratadas con acetato de cadmio ($CdAc_2$) se observa que la activación de las MAPK es promovida por PKC (Lag y col., 2005).

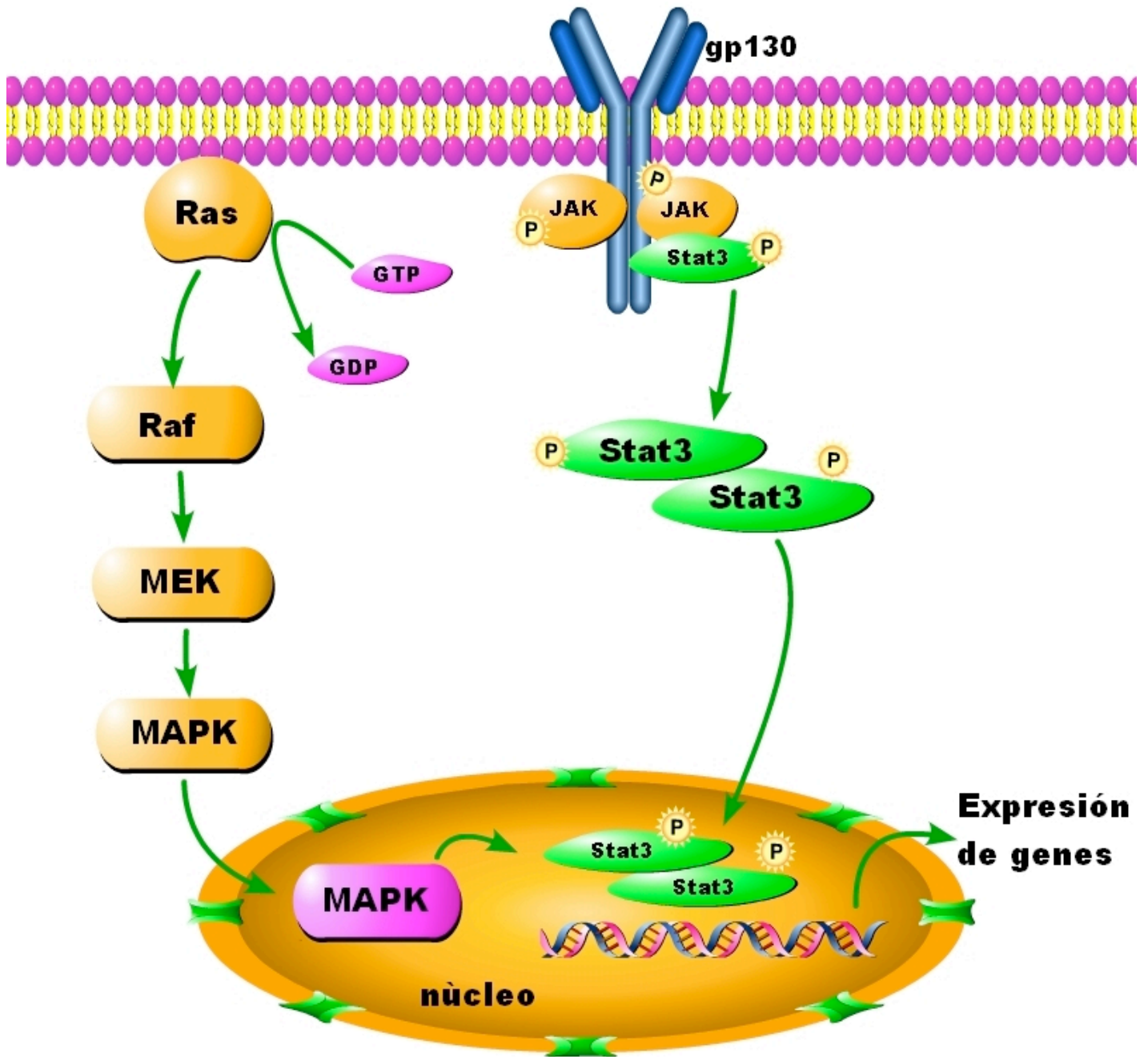


Figura 3. Vía de activación de Stat 3. Fosforilación de la cinasa Janus (JAK) para la subsecuente fosforilación y dimerización del Transductor de señal y activador de transcripción (Stat-3). Así como la activación de la vía de las Proteínas cinasas activadas por mitogeno (MAPK) para la activación de la proteína Stat-3.

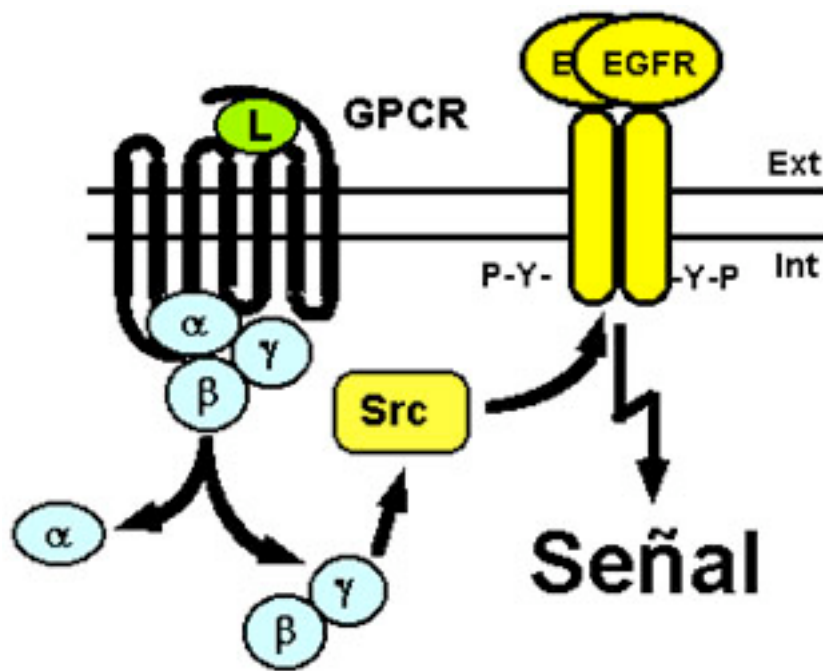


Figura 4. Transactivación del EGFR por la cinasa Src acoplada a proteínas G. La activación del GPCR por su ligando (*L*) induce la transactivación del EGFR en ausencia de EGF por un mecanismo en el que está implicada la cinasa Src que es activada por el dímero βγ de la proteína G. Imagen tomada de Lemus y Montaña., 2004.

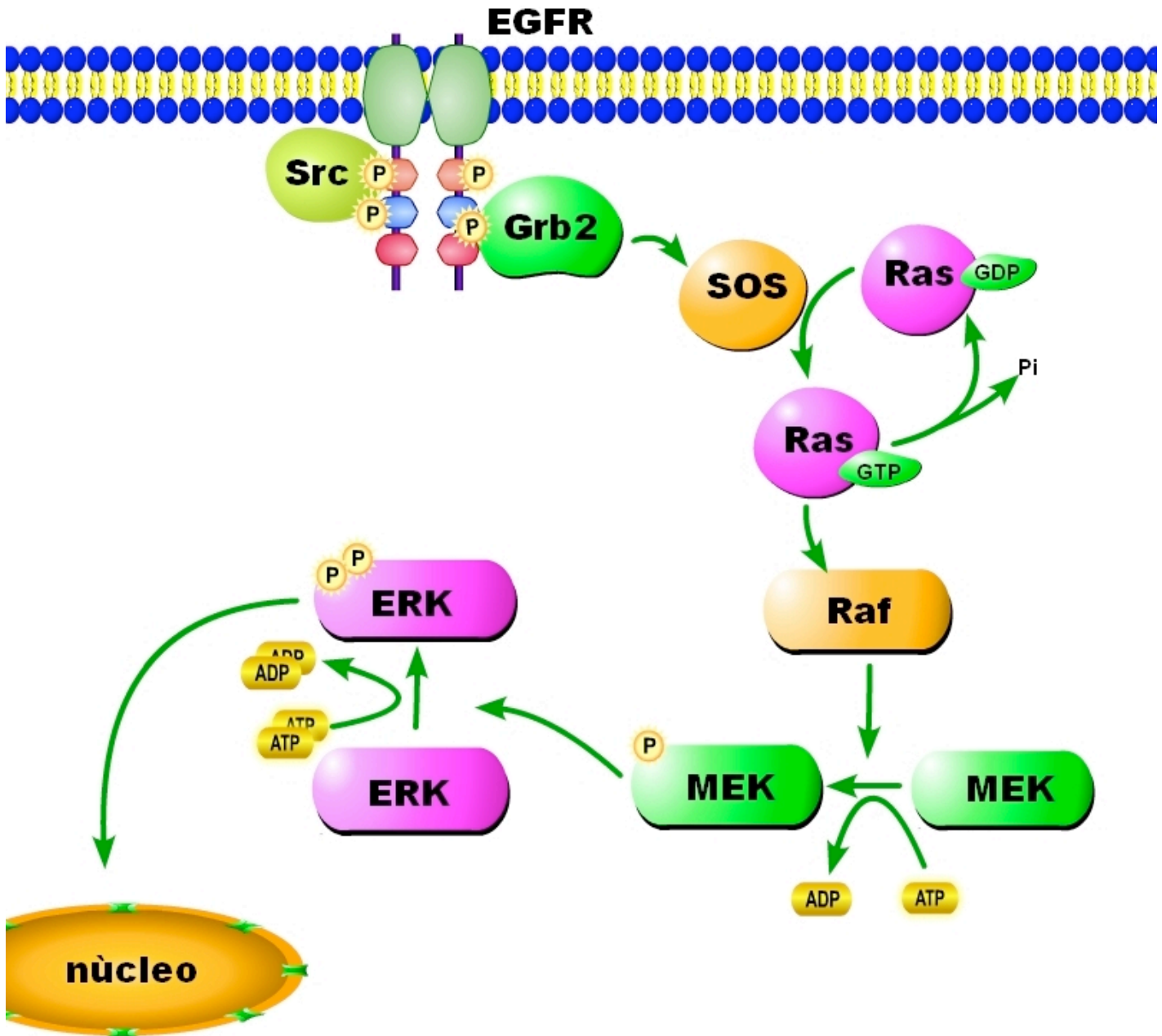


Figura 5. Vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR). Activación de la vía de las Proteínas cinasas activadas por mitogeno (MAPK), por medio de la transactivación EGFR por medio de la cinasa Src. Imagen tomada de Lemus y Montaña., 2003.

1.6 PROTEÍNA DE CHOQUE TERMICO

El término de proteínas de estrés o de choque térmico (HSP), designa a una clase de proteínas que son inducidas por condiciones de estrés celular como el calor, cambios en el estado osmótico, las ERO o metales como el Cd, entre otros (Valbonesi y col., 2008; Nishitai y Matsuoka., 2008; Souza y col., 2009; Escobar y col., 2009). Estas proteínas son clasificadas de acuerdo a su función y tamaño molecular (15-110k Da) (Kregel., 2002). Las HSP están presentes en el citosol, la mitocondria, el retículo endoplásmico, y en el núcleo (Feder y Hofmann., 1999). Estas proteínas funcionan como chaperonas; ellas se unen a otras proteínas sensibles y estabilizan su estructura. También participan en la localización, regulación, secreción y degradación de las proteínas. Así mismo, se les han atribuido efectos citoprotectores y están involucradas en la regulación de muchas vías celulares.

Entre las HSP más estudiadas está la familia de HSP70 (HSP72, HSP73, HSP75 y HSP78) ya que son las más sensibles al cambio de temperatura y las más conservadas. El gen de la HSP70 contiene dos elementos regulatorios que interactúan con el factor de transcripción de choque térmico (HSF). Este HSF se une a la región promotora en condiciones de estrés e induce la transcripción de la HSP70. Se conoce que la inducción de la HSP70 por las ERO es por un mecanismo que involucra el factor HSF y la estabilidad del ARNm (Jacquier-Sarlin y Polla., 1996). Hay evidencias de que la función principal de la HSP70 es la tolerancia a una gran variedad de agentes estresores. 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 (Jacquier-Sarlin y col., 1994), así como de estabilizar la estructura de las proteínas (Rodríguez y López., 2003). La HSP70 protege a la célula de la lipoperoxidación, la cual daña a la membrana celular con la subsecuente alteración en la homeostasis de calcio. Los niveles de calcio intracelular tienen un papel muy importante en la toxicidad y muerte celular mediada por las ERO (Stojadinovic y col., 1997). Se ha demostrado en células vasculares de músculo liso (VSMCs) que el H₂O₂, causa activación del Stat-1 y Stat-3 induciendo la expresión de HSP70 (Nageswara y col., 2001).

1.7 CULTIVOS CELULARES

El cultivo de células generado a partir de material tomado directamente de un organismo se denomina cultivo primario. Las células obtenidas de esta forma son células normales adaptadas al crecimiento *in vitro*. La ventaja de utilizar de células normales radica en la similitud de estas a las células presentes en el organismo, a diferencia de las líneas celulares establecidas o continuas que por sus características de inmortalidad tienen comportamientos anómalos (Gerstein., 2001). Además,

las células, en cultivo primario, mantienen su viabilidad durante un periodo de tiempo limitado y no se reproducen en cultivo. La obtención de un cultivo primario de hepatocitos nos entrega un atractivo e importante acercamiento al estudio de las funciones específicas del hígado, y las interacciones entre las células hepáticas y los fármacos. Es un modelo muy importante para estudios de señalización y mantienen su diferenciación hasta un máximo de dos semanas (Cabané, y col., 2007). Resultados obtenidos en hepatocitos primarios de rata, demuestran que el Cd induce algunos genes como respuesta a cambios en el estrés oxidante (Hsiao y Stapleton., 2009). Buscalpi y col., (2009), concluyen que varias proteínas son afectados por el Cd en hepatocitos primarios de rata. Para presente trabajo, se han utilizado hepatocitos de ratón en cultivo primario ya que representan un buen modelo los estudios de señalización que reporto en la presente tesis.

2 JUSTIFICACIÓN

El Cd es un metal no esencial que se acumula principalmente en el hígado, del cual se han publicado múltiples artículos acerca de su efecto tanto a nivel sistémico como a nivel celular. Sin embargo, a la fecha no se conoce con exactitud el mecanismo de activación del factor de transcripción Stat-3 mediado por el Cd. Se ha sugerido que el factor de crecimiento epidermal (EGFR) por su actividad de cinasa, puede fosforilar al Stat-3 de manera directa en tirosina 705. Además, el EGFR es activado por la tirosina cinasa c-Src que promueve la cascada de señalización para la cinasa ERK 1/2 que puede fosforilar al Stat-3 en serina 727. Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende caracterizar el mecanismo de activación de Stat-3 mediado por el Cd en hepatocitos de ratón, así como relacionar la cascada de señalización inducida por el Cd con la expresión de HSP70. Los datos obtenidos permitirán una mejor comprensión del mecanismo de señalización intracelular que el Cd induce en células hepáticas.

3 HIPÓTESIS

El Cd es un metal no esencial que se acumula principalmente en el hígado y puede activar al factor de transcripción Stat-3 mediante la activación del factor de crecimiento epidermal (EGFR). En los hepatocitos de ratón tratados con los inhibidores tanto para el EGFR y para la cinasa Src, se espera encontrar una disminución en la activación de Stat-3 y de ERK 1/2 inducida por el Cd. Así mismo, se pretende relacionar la activación de esta vía de señalización con la expresión de la proteína HSP70 como respuesta a la presencia de Cd en los hepatocitos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- ❖ Caracterizar el mecanismo de activación de Stat-3 mediado por el CdCl₂ en hepatocitos de ratón.

4.2 Objetivos particulares

- ❖ Determinar la participación del EGFR en la activación de Stat-3 en hepatocitos tratados con CdCl₂.
- ❖ Determinar la función de la cinasa Src y de PKC en la activación del EGFR inducida por el CdCl₂.
- ❖ Caracterizar la activación de ERK 1/2 como consecuencia de la transactivación de EGFR inducida por el CdCl₂.
- ❖ Relacionar el mecanismo de señalización inducido por el CdCl₂ con la expresión de HSP70.

5 MATERIAL Y METODOS

5.1 AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS POR PERFUSIÓN CON COLAGENASA

El aislamiento de hepatocitos se realizó por la técnica de doble perfusión con colagenasa. Se usaron ratones machos de la cepa CD-1 de entre 8 y 10 semanas de edad y 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 el hígado usando aproximadamente 30 ml de una solución de HBSS sin Ca^{2+} / Mg^{2+} /Rojo de fenol que contenía HEPES 10 mM y EGTA 75 mM a pH 7.4 (Gibco) y después con una solución de colagenasa. 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 disectó 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 (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 hizo pasar por un filtro con un tamaño de poro de 100 μm . El filtrado se centrifugó a 28 g 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 113 g 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%. Las células se plaquearon en una densidad de 36000 células/ cm^2 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 (4 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 TRATAMIENTOS DE LOS HEPATOCITOS PRIMARIOS CON CdCl₂

Los hepatocitos primarios se sembraron en cajas de cultivo (Costar) a una densidad de 36000 células/cm² en medio de adhesión suplementado con SBF al 10 %, 1 % de ANTIBAC por 4 h, posteriormente el medio se retiró y se adicionó medio William's suplementado solo con los antibióticos y se dejó estabilizar el cultivo por 12 h. Posteriormente, se les cambió el medio por otro sin suero y conteniendo 5 µM de CdCl₂ y se dejaron incubar por diferentes tiempos (0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 12 h) a 37°C. Las células control estuvieron en ausencia de CdCl₂. Como controles positivos se trataron a los hepatocitos con 10 ng/ml de IL-6, o un lisado de células HepG2 tratadas con EGF (BIOMOL). Posteriormente se lavaron las células con PBS y se aisló la proteína total para determinar la activación de las proteínas por Western blot, utilizando anticuerpos para: p-Stat3 (Ser727), p-Stat3 (Tyr705) (Cell Signaling), Stat-3 (Santa Cruz Biotechnology), p-EGFR, EGFR (BIOMOL), p-Erk 1/2, Erk 1/2 (Santa Cruz, Biotechnology, INC), Hsp70 (D69) (Cell Signaling) y actina (Santa Cruz Biotechnology).

5.3 TRATAMIENTOS DE LOS HEPATOCITOS PRIMARIOS CON INHIBIDORES

Los hepatocitos fueron pre-tratados con los siguientes inhibidores: 3 nM de AG1478 (Laboratory research) para el EGFR, 10 µM de Su6656 (Sigma Aldrich) para la cinasa Src y 5 µM de queleritrina (Sigma Aldrich) para PKC y se dejaron incubar durante 30 min. Posteriormente se les agregó 5 µM de CdCl₂ y se dejaron incubar por 1 ó 2 h a 37°C. Las células control estarán en ausencia de CdCl₂. Posteriormente se lavaron las células con PBS y se aisló la proteína total para determinar la activación de las proteínas por Western blot, utilizando anticuerpos para: p-Stat3 (Tyr705) (Cell Signaling), Stat-3 (Santa Cruz Biotechnology), p-EGFR, EGFR (BIOMOL), p-Erk 1/2, Erk 1/2 (Santa Cruz, Biotechnology, INC) y actina (Santa Cruz Biotechnology).

5.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Para la extracción de proteína total, a las células tratadas con y sin CdCl₂ 5 µM se les agregó 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 fosfatasa (ROCHE) y una pastilla de inhibidor de proteasas (Complete, Roche). El homogenizado celular fue resuspendido varias veces y se dejó reposar 5 min a 25°C. Después fue centrifugado a 17530 g a 4°C. El sobrenadante conteniendo la proteína celular fue almacenado en pequeños volúmenes y guardado a -

80°C. De una de las alícuotas se cuantificó la concentración de proteína utilizando el Kit BCA (Pierce).

5.5 WESTERN BLOT

El ensayo de Western blot se realizó de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). Se tomó 50 µg de la proteína total y se le agregó un amortiguador de muestra 4X formado por Tris-HCl 0.1 M pH 6.8, glicerol, SDS al 20%, 2-β-mercapto etanol al 10 % y azul de bromofenol al 0.1%. Las muestras se dejaron por 5 min a 95 °C y se cargaron en geles de acrilamida-bisacrilamida (BioRad) al 10% en un amortiguador formado por Tris HCl 1.5 M 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 1X formado por Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.5 % a 200 Volts por 45 min. La proteína fue transferida 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 90 min 110 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 20 min. Posteriormente se lavó con TBS-Tween 20 varias veces y se le agregó el anticuerpo correspondiente a la proteína por estudiar: p-Stat3 (Tyr705), p-Stat-3 (Ser727), Stat-3, p-EGFR, EGFR, p-ERK 1/2, ERK 1/2, Hsp70 y actina por 1 h. Se lavó con TBS-Tween suplementado con leche 0.5 % durante 10 min. Posteriormente se realizaron dos lavados más con TBS-Tween durante 5 min. Después se le agregó el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Biosource) 1h. La membrana se lavó con TBS-Tween 10 min dos veces y uno con sólo TBS. Finalmente la membrana reveló con un reactivo quimioluminiscente SuperSignal[®] West Pico Substrate (Pierce) durante 5 min y fue expuesta en una placa radiográfica (Kodak) y revelada. Los resultados se visualizaron en un densitómetro Imging System Gel Logic 1500 además se expuso en una placa radiográfica (Kodak). Los resultados se analizaron en el Imaging System Gel Logic 1500.

5.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA

Para determinar el contenido de proteína en las muestras se utilizó la técnica del ácido bicínico usando el estuche comercial BCA (Pierce). Se tomó una alícuota de 5 µl de las muestras y se les agregó 200 µl reactivo BCA diluido 1:50. Se dejaron incubar 30 min a 25° C y se realizó una

curva patrón de albúmina sérica bovina de 0.1-0.5 mg/ml. Posteriormente se determinó la absorbancia y se cuantificó la concentración de la proteína utilizando la curva estándar.

5.7 ANALISIS ESTADÍSTICO

Cada experimento se realizó por triplicado en al menos tres eventos independientes. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido por una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se utilizó para el análisis el programa SPSS 11.

6 RESULTADOS

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

El efecto del Cd en la activación del factor de transcripción Stat-3. Entendiéndose como activación la fosforilación de la proteína en la tirosina 705 y en serina 727. Se evaluó en hepatocitos tratados con CdCl₂ 5 µM y se determinó por Western blot con anticuerpos específicos para p-Stat-3 (Tyr705), p-Stat-3 (Ser727), Stat-3 y actina como proteína de normalización. En el grafico 1 se muestra el resultado y se expresa como el incremento de la activación del factor de transcripción con respecto al control (sin tratamiento). En donde podemos observar que a partir de los 5 min comienza a ser significativa la fosforilación del Stat-3 (Tyr705), manteniéndose hasta las 2 h. A las 3 h, se presenta un incremento máximo de 2.89 veces y a las 6 h de 3.33 veces más con respecto al control (sin tratamiento). A partir de las 7 h, la fosforilación del factor comienza a descender hasta las 12 h. Por otro lado, la fosforilación del factor de transcripción Stat-3 (Ser727), como se observa en el grafico 2, inicia a la hora con un pico máximo de fosforilación a las 2 h con un valor de 2.93 veces y a partir de las 3 h comienza a descender. Como control positivo se utilizó a la IL-6, ya que se conoce que esta citocina activa al factor Stat-3.

6.2 PARTICIPACIÓN DEL EGFR Y DE LA CINASA SRC EN LA FOSFORILACIÓN DE STAT-3 (TYR705)

Para determinar la participación del EGFR y Src, en la fosforilación de Stat-3 (Tyr705), los hepatocitos fueron pre-tratados por 30 min con los inhibidores; 3nM de Ag1478 para EGFR y 10 µM SU6656 para la cinasa Src. Posteriormente se les agregó 5 µM de CdCl₂ y se dejaron incubar 1 h. Este tiempo se determinó de acuerdo a la fosforilación de Stat-3 en tirosina 705 (Graf. 1). La fosforilación de Stat-3 (Tyr705) se determinó con la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para p-Stat-3, Stat-3 y actina como proteína de normalización. En el grafico 3 se muestra el resultado y se expresa como el incremento de la fosforilación de p-Stat-3 (Tyr705) con respecto al control (sin tratamiento). El pre-tratamiento con el inhibidor de EGFR (Ag1478), disminuye la fosforilación de p-Stat-3 (Tyr705) en un 33.15 % con respecto a los hepatocitos tratados con Cd y con el inhibidor para la cinasa Src (Su6656), disminuye significativamente en un 38.29 % con respecto a los hepatocitos tratados con Cd. Los inhibidores por sí solos no tienen ningun efecto sobre la proteína Stat-3.

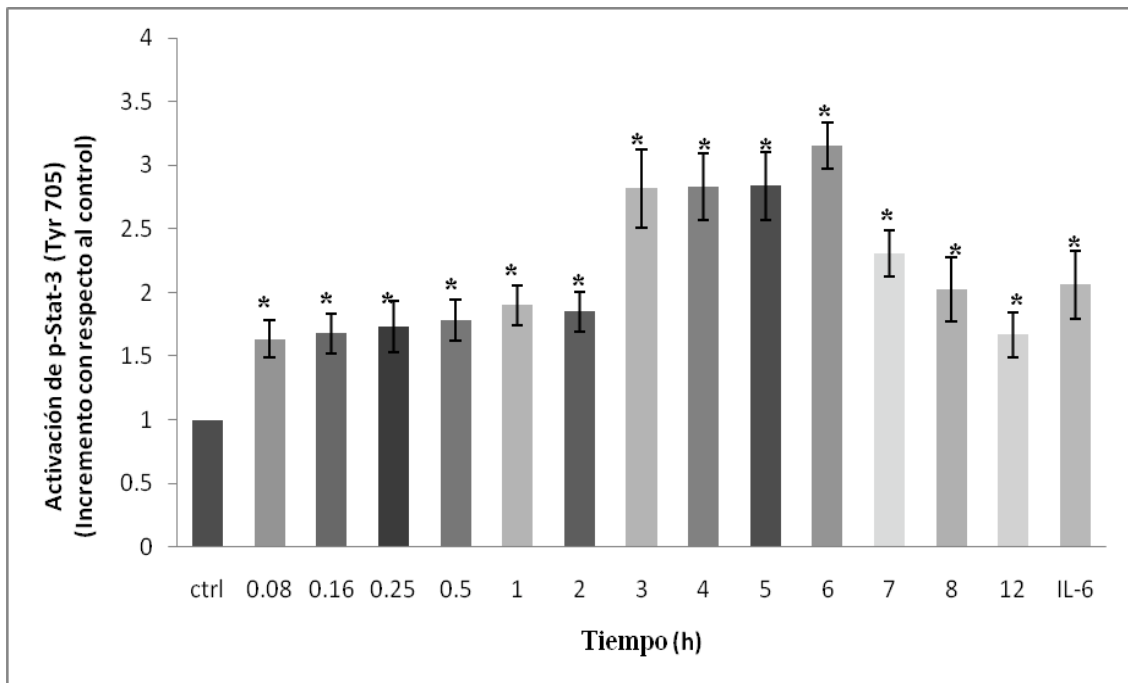
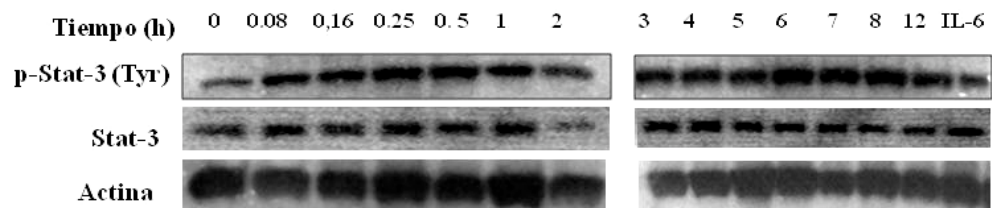


Grafico 1. Fosforilación del factor de transcripción Stat-3 (Tyr705). Los hepatocitos fueron tratados con 5 μM de CdCl_2 por diferentes tiempos de incubación y se determinó la fosforilación de Stat-3 por Western blot. Cada punto expresa el valor promedio \pm desviación estándar (n=5). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control (*).

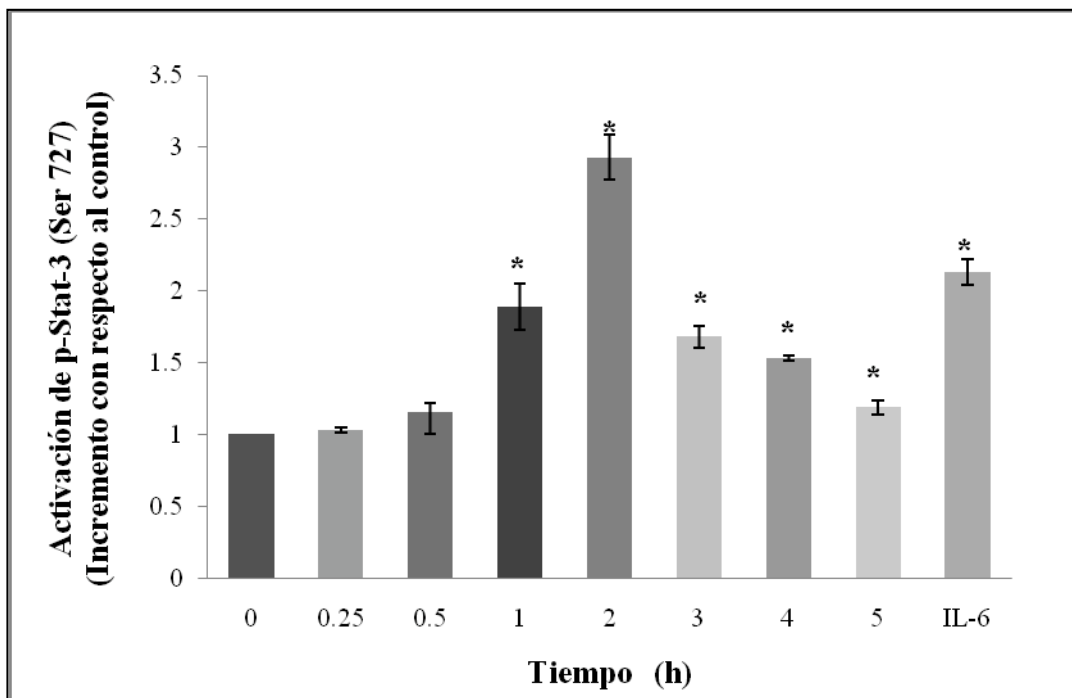
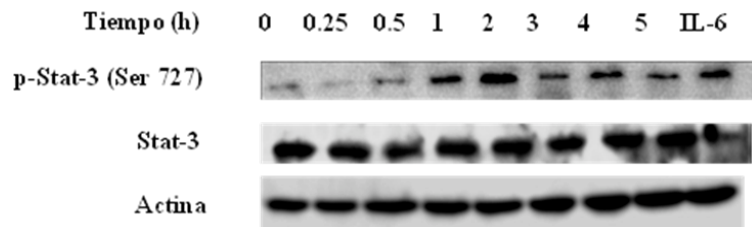


Grafico 2. Fosforilación del factor de transcripción Stat-3 (Ser727). Los hepatocitos fueron tratados con 5 μM de CdCl_2 por diferentes tiempos de incubación y se determinó la fosforilación de Stat-3 (Ser727) por Western blot. Cada punto expresa el valor promedio \pm desviación estándar (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control (*).

6.3 ACTIVACIÓN DEL EGFR EN HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

El efecto de el Cd en la activación del EGFR, se evaluó tratando a los hepatocitos con CdCl₂ 5 µM y se determinó por Western blot con anticuerpos específicos para p-EGFR, EGFR y actina como proteína de normalización. En el grafico 5 se muestra el resultado y se expresa como el incremento de la fosforilación del receptor con respecto al control (sin tratamiento), en donde podemos observar que a partir de la hora comienza a ser significativa. La máxima activación del p-EGFR, la podemos notar a las 6 h con un valor significativo de 6.18 veces más con respecto al control (sin tratamiento), manteniéndose prácticamente hasta las 8 h. Se utilizo como control positivo, células HepG2 tratadas con EGF (BIOMOL).

6.4. PARTICIPACIÓN DE LA CINASA SRC, Y DE PKC EN LA FOSFORILACIÓN DEL EGFR

Para determinar la participación de la cinasa Src, y PKC en la activación de EGFR como parte de la cascada de activación del factor Stat-3, los hepatocitos fueron pre-tratados por 30 min con los inhibidores; 10 µM de Su6656 para la cinasa Src y 5 µM de queleritina para PKC. Posteriormente se les agregó Cd por 3 h, tiempo que se determinó con la activación presentada del p-EGFR (Graf. 5). Para determinar esto se utilizó la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para p-EGFR, EGFR y actina como proteína normalización. En el grafico 6 se muestra el resultado y se expresa como el incremento en la fosforilación del EGFR en los hepatocitos tratados con Cd con respecto al control (sin tratamiento). El pre-tratamiento con el inhibidor de Src (Su6656), disminuyó la fosforilación del p-EGFR en un 59.19 % y con el inhibidor de PKC (queleritina), en un 29.59 % con respecto a los hepatocitos tratados con Cd. Los inhibidores por sí solos no tienen ningun efecto sobre el EGFR.

6.5 PARTICIPACIÓN DE PKC EN LA FOSFORILACIÓN DE STAT-3 (TYR705)

Para determinar la participación de PKC en la fosforilación de Stat-3 (Tyr705), los hepatocitos fueron pre-tratados por 30 min con el inhibidor para PKC; 5 µM de queleritina. Posteriormente se les agregó Cd por 1 h. Para determinar esto se utilizó la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para p-Stat-3 (Tyr705), Stat-3 y actina como proteína normalización. En el grafico 7 se muestra el resultado y se expresa como el incremento de la fosforilación del p-Stat-3 (Tyr705) con respecto al control (sin tratamiento).

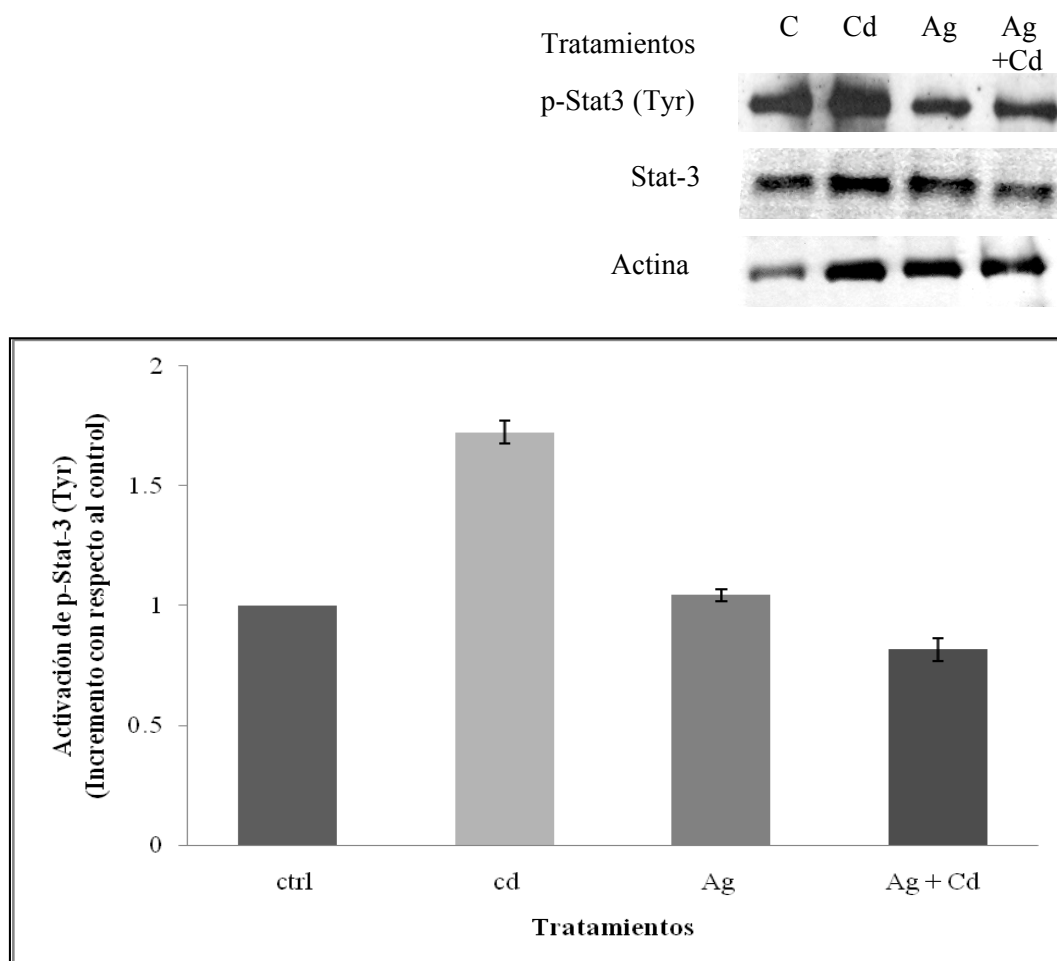


Figura 3. Participación de EGFR en la activación de Stat-3 (Tyr705). Los hepatocitos fueron pre-tratado con el inhibidor Ag1478 para EGFR por 30 min y posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 1 h. La fosforilación de p-Stat-3 (Tyr705) se determinó por Western blot.

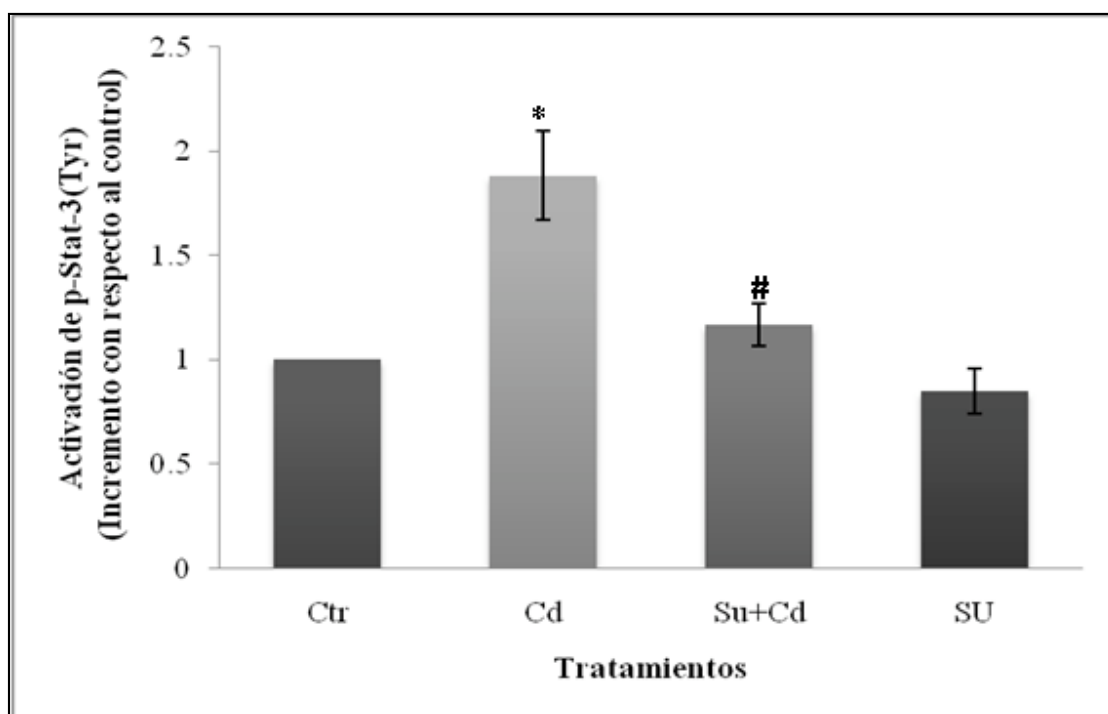
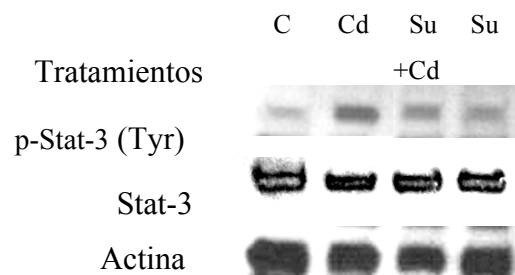


Grafico 4. Participación de la cinasa Src, en la activación de p-Stat-3 (Tyr705). Los hepatocitos fueron pret-ratados con el inhibidor Su6656 para Src por 30 min y posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 1 h. Cada punto expresa el valor promedio \pm desviación estándar (n=4). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control (*) o al cadmio (#).

El pre-tratamiento con el inhibidor de PKC disminuyó la fosforilación de Stat-3 (Tyr705) en un 25.77 % con respecto a los hepatocitos tratados con Cd. El inhibidor por sí solo no tiene ningun efecto en la fosforilación de Stat-3.

6.6 ACTIVACIÓN DE ERK 1/2 EN HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

El efecto del Cd en la activación de ERK 1/2, se evaluó tratando a los hepatocitos con CdCl₂ 5 µM y se determinó por Western blot con anticuerpos específicos para p-ERK 1/2, ERK 1/2 y actina como proteína de normalización. En el grafico 8 se muestra el resultado y se expresa como el incremento de la activación con respecto al control (sin tratamiento). Se observa que la activación de ERK 1/2 comienza a partir de los 30 min. A las 2 h se preseneta su máxima activación con un valor significativo de 3.03 veces más con respecto al control y a las 3 h disminuye.

6.7 PARTICIPACIÓN DE LA CINASA SRC, PKC Y EGFR EN LA FOSFORILACIÓN DE ERK 1/2

Para determinar la participación de la cinasa Src, PKC y EGFR en la activación de ERK 1/2, los hepatocitos fueron pre-tratados por 30 min los inhibidores; 10 µM de Su6656 para la cinasa Src, 5 µM de queleritrina para PKC y 10 µM de Ag1478 para EGFR. Posteriormente a los hepatocitos se les agregó Cd por 2 h. Este tiempo fue determinado con la activación de p-ERK 1/2 (Graf. 8). Para determinar esto se utilizó la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para p-ERK 1/2, ERK 1/2 y actina como proteína de normalización. En el grafico 9 se muestra el resultado y se expresa como el incremento significativo en la fosforilación de ERK 1/2 con respecto al control (sin tratamiento). El pre-tratamiento con el inhibidor de Src disminuyó significativamente la fosforilación de ERK 1/2 en un 50.81 % y con queleritrina en un 63.71 % con respecto a los hepatocitos tratados con Cd. Sin embargo, con Ag1478 se encontró una disminución mas marcada en la fosforilación de ERK 1/2 siendo de un 76.51% con respecto a los hepatocitos tratados con Cd. Los inhibidores por sí solos no tienen nungun efecto en ERK 1/2.

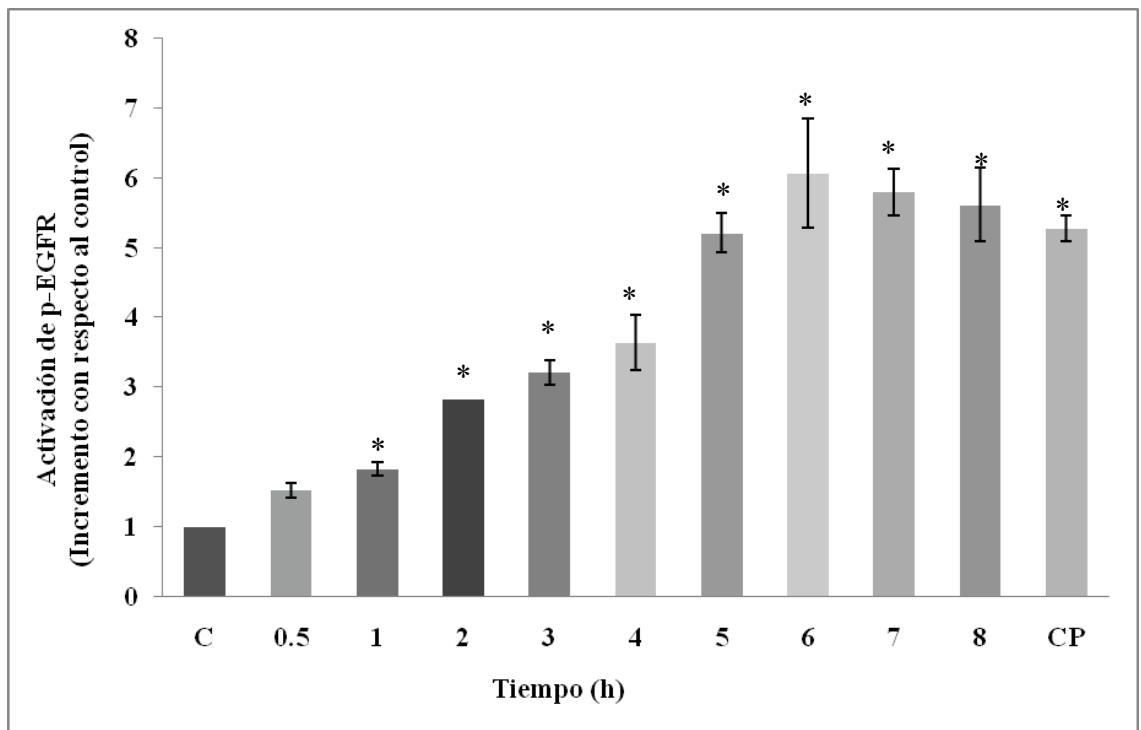
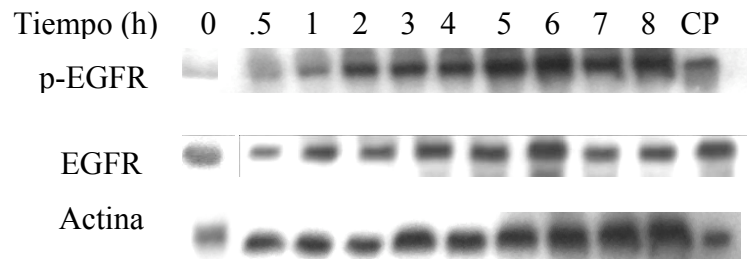


Grafico 5. Activación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) en los hepatocitos tratados con 5 μ M de CdCl₂ por diferentes tiempos de incubación. La fosforilación del EGFR, se determinó por Western blot. Cada punto expresa el valor promedio \pm desviación estándar (n=4). Diferencia significativa p<0.05 con respecto al control (*).

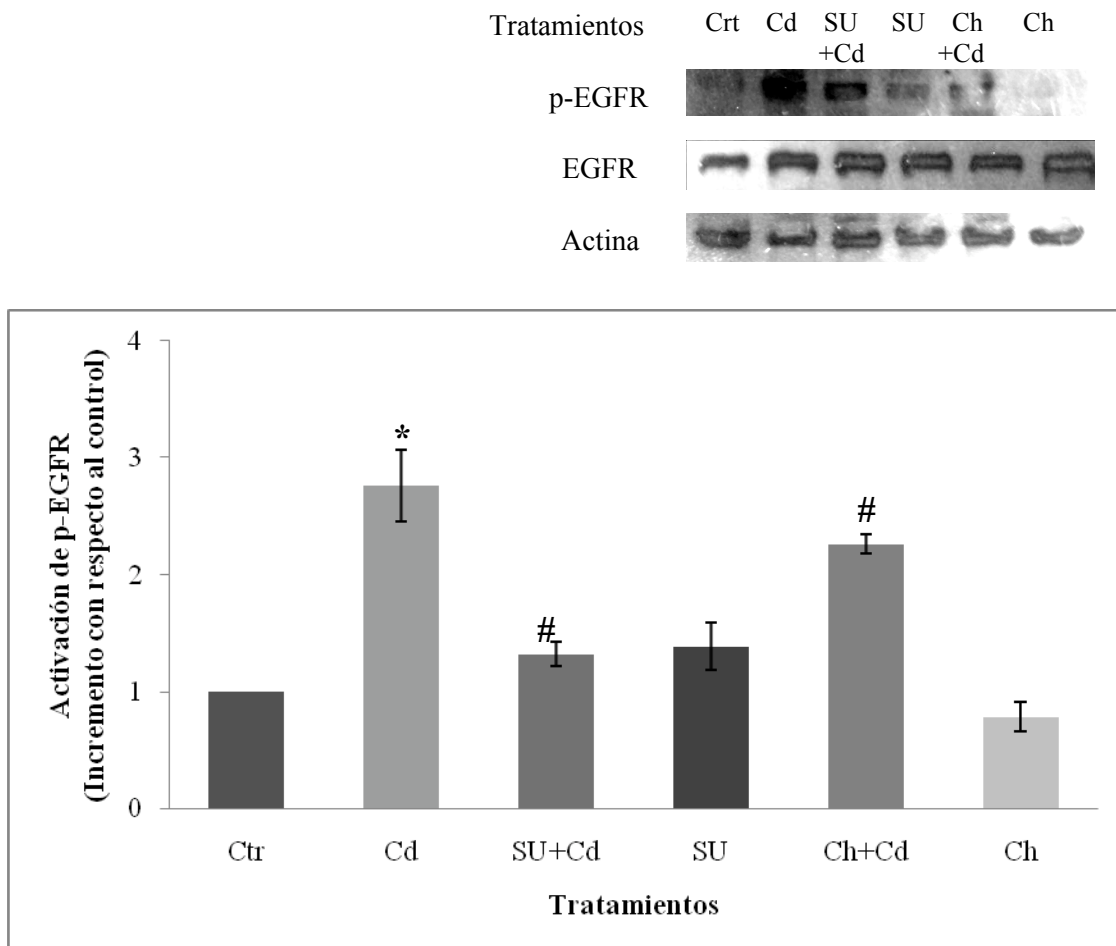


Grafico 6. Participación de la cinasa Src y PKC en la activación del EGFR. Los hepatocitos fueron pre-tratados con el inhibidor Su6656 para Src y queleritrina para PKC por 30 min. Posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 3 h. La fosforilación del EGFR se determino por Western blot. Cada punto expresa el valor promedio \pm desviación estándar (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control (*) o al cadmio (#).

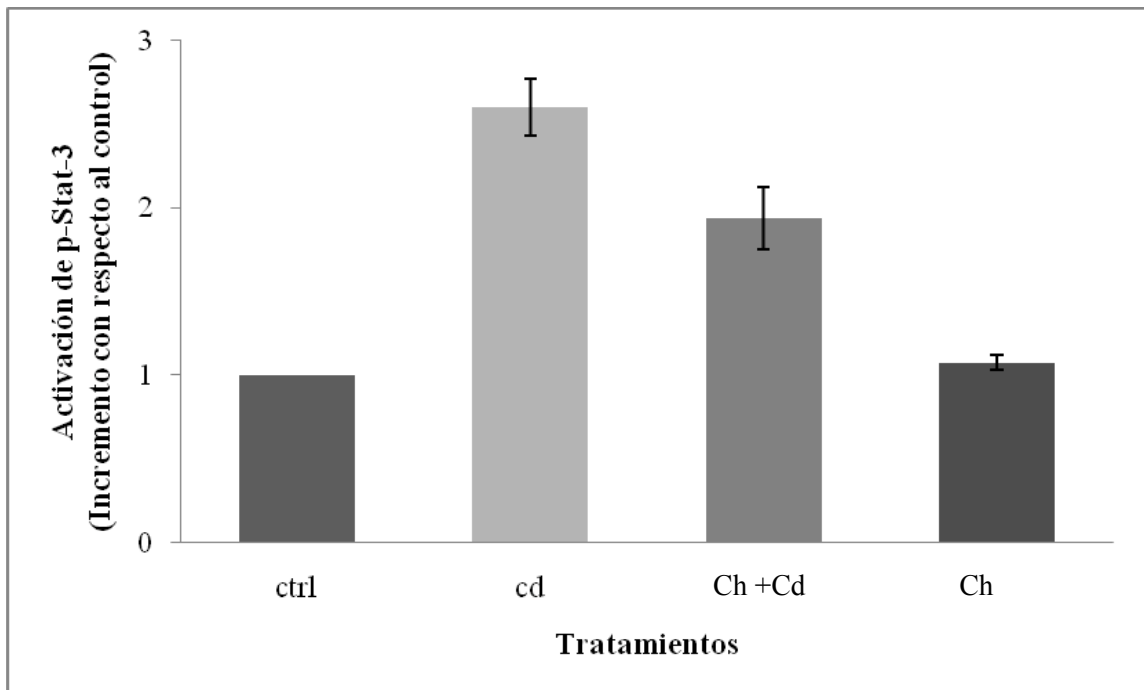
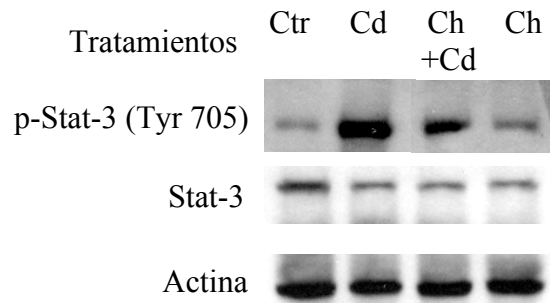


Grafico 7. Participación de PKC en la fosforilación de Stat-3 (Tyr705). Los hepatocitos fueron pre-tratados con el inhibidor queleritrina por 30 min y posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 1 h. La fosforilación de Stat-3 fue determinado por Western blot.

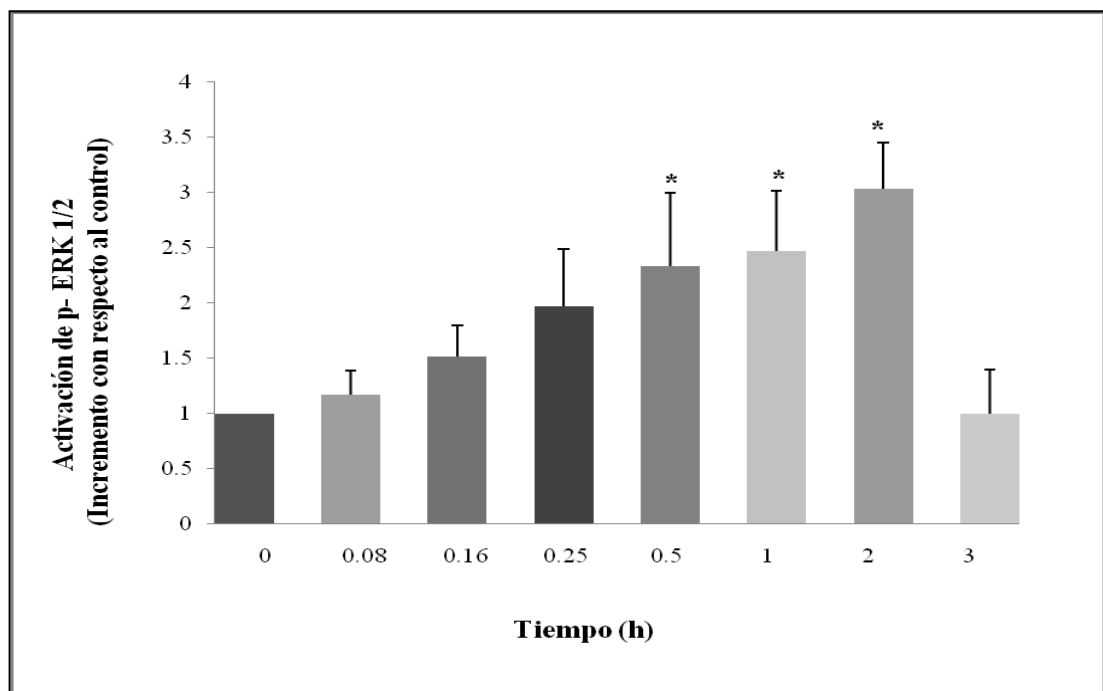
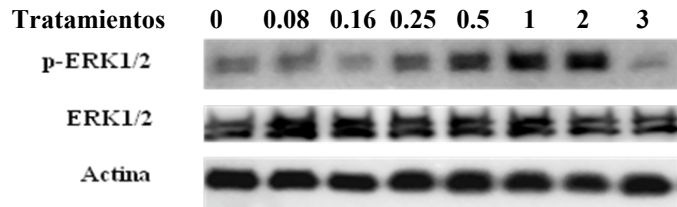


Grafico 8. Activación de p-ERK 1/2 en cultivo de hepatocitos tratados con CdCl₂ a 5 μM por diferentes tiempos de incubación. La activación se determinó por la técnica de Western blot. Cada punto expresa el valor promedio ± desviación estándar (n=3). Diferencia significativa p<0.05 con respecto al control.

6.8 PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA HSP70 EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS EXPUESTOS A CADMIO

El efecto de el Cd en la producción de la proteína HSP70, se evaluó tratando a los hepatocitos con CdCl₂ 5 μM y se determinó por Western blot con anticuerpos específicos para HSP70 y actina como proteína de normalización. En el grafico 10 se muestra el resultado y se expresa como el incremento de la activación con respecto al control (sin tratamiento) comenzando a partir de los 30 min. A las 6 h se preseneta su máxima activación con un valor significativo de 6.75 veces más con respecto al control manteniendose practicamente hasta las 12 h.

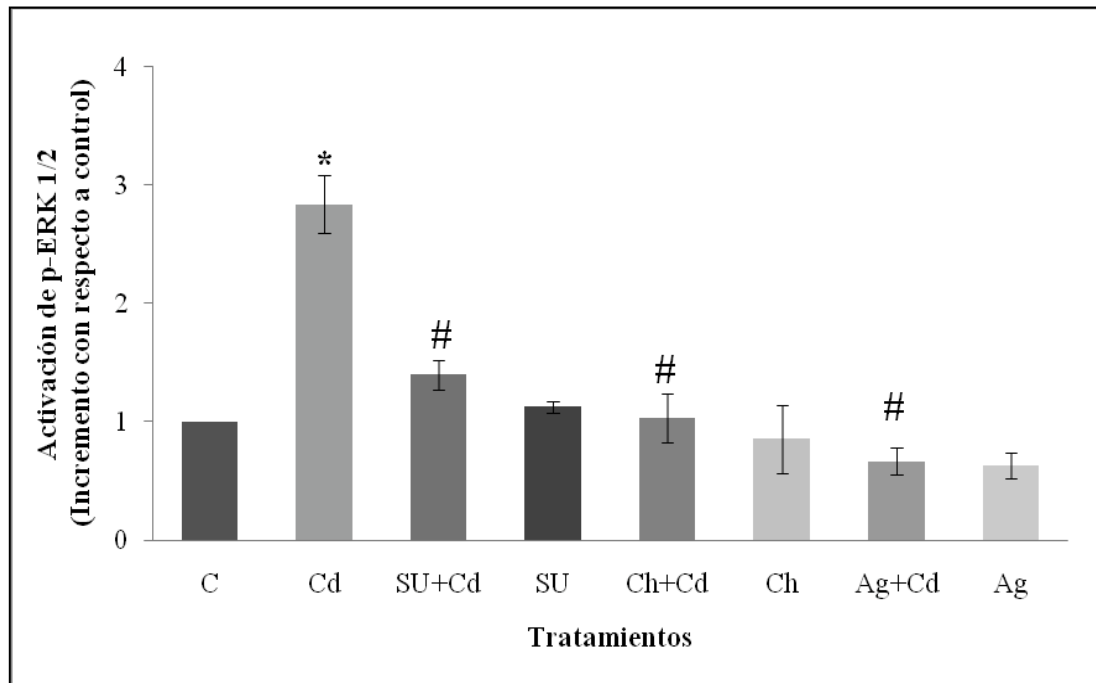
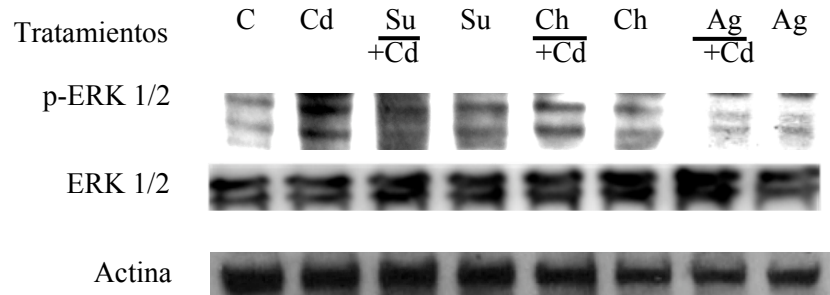


Grafico 9. Participación de la cinasa Src, PKC y el EGFR en la activación de ERK 1/2. Los hepatocitos fueron pre-tratados con los inhibidores; Su6656 para la cinasa Src, queleritrina para PKC y Ag1478 para el EGFR por 30 min. Posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 2 h. La activación de ERK 1/2 se dermino por Western blot. Cada punto expresa el valor promedio \pm desviación estándar (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control (*) o al cadmio (#).

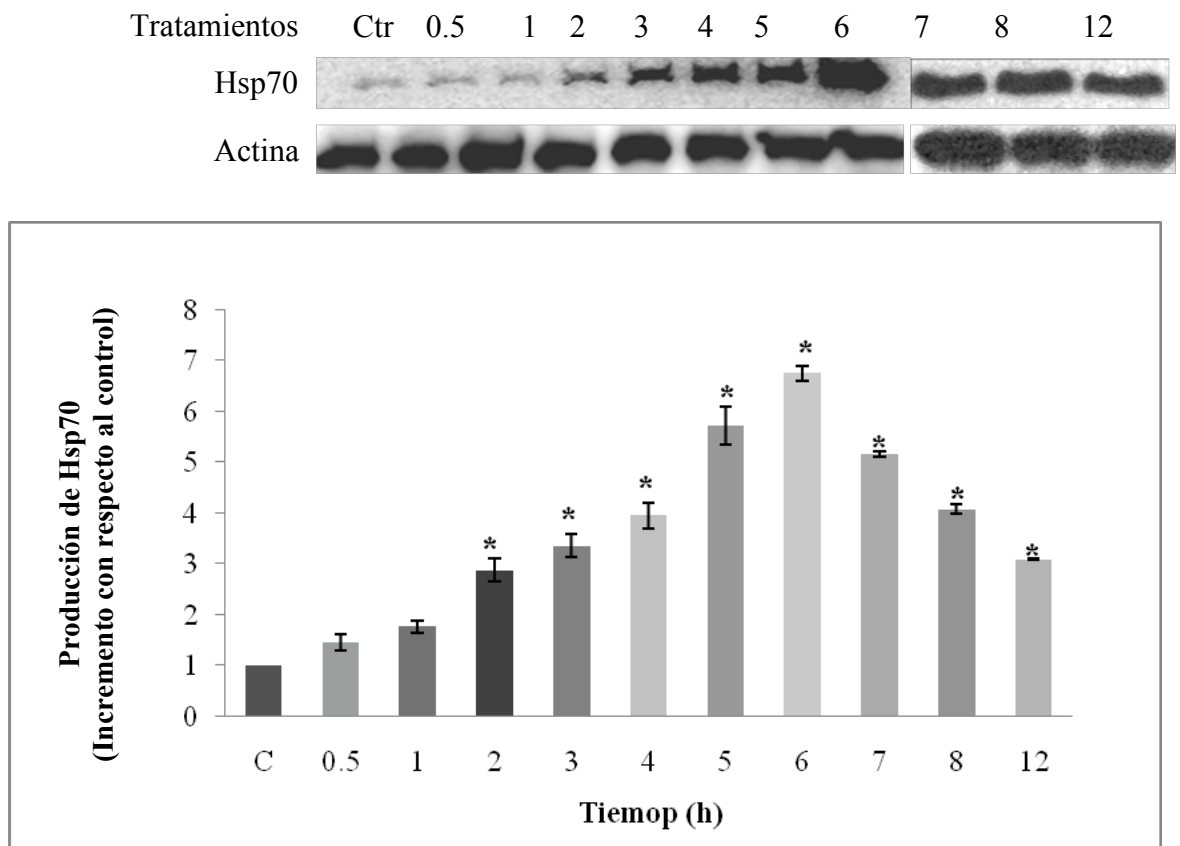


Grafico 10. Producción de la proteína HSP70 en hepatocitos tratados con 5µM de CdCl₂ a diferentes tiempos de exposición, determinado por Western blot. Cada punto expresa el valor promedio ± desviación estándar (n=3). Diferencia significativa p < 0.05 con respecto al control (*).

7 DISCUSIÓN

Se ha reportado en diversos estudios que el Cd contribuye a la activación de diversos factores de transcripción, entre ellos el factor Stat-3 (Valko y col., 2005; Chen y col., 2008). Este factor está implicado en la regulación de varios procesos fundamentales para la célula como son la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la sobrevivencia (Gong y col., 2007). El factor Stat-3 es fosforilado en la tirosina 705 por medio de Jak2, dando como resultado la homo ó heterodimerización para translocarse al núcleo, en donde es fosforilado en la serina 727 por medio de las MAPK y así activar la transcripción de genes por medio de la interacción con su secuencia específica en el ADN (Weng y col., 2008; Brow y Sacks., 2009). También se reporta que el EGFR puede fosforilar a las Stat en tirosina a través de su actividad intrínseca de tirosina cinasa (Gong y col., 2007). Es por ello que en este trabajo, se estudiaron los mecanismos, por los cuales el Cd a través de la transactivación del EGFR puede regular al factor de transcripción Stat-3 en hepatocitos tratados con CdCl₂. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el CdCl₂ induce la activación de Stat-3 por medio de la fosforilación en tirosina y posteriormente el sostenimiento de la activación por la fosforilación en serina. Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que en la línea celular HepG2 tratada con CdCl₂, reportan un incremento en la fosforilación de Stat-3 pero solo en el residuo de serina (Souza y col., 2009). Staveren y col., (2009), señalan que las líneas celulares derivadas de tumor tienden a alterar tanto la expresión de sus genes como la estabilidad genética comparada con las células de cáncer in vivo.

Los receptores con actividad de tirosina cinasa, como EGFR pueden ser transactivados por cinasas como Src y su estimulación inicia cascadas de señalización que llevan a la regulación de Stat-3 (Lemus y Montaña., 2004). Los resultados obtenidos en este proyecto, demuestran que el Cd activa al EGFR de manera significativa en los hepatocitos. Además al inhibir a la cinasa Src con SU5666 o al EGFR con AG1478, tanto la activación de Stat-3 como la del EGFR inducida por el Cd se ven disminuidos. Esto sugiere que Src transactiva al EGFR en hepatocitos tratados con Cd. Biscardi y col., (1999), demuestran que en células de cáncer de mama (MDA468) estimuladas con EGF se señala que la cinasa Src puede interactuar directamente con EGFR, fosforilandolo en la tirosina (Tyr845), sitio necesario para incrementar la actividad catalítica del EGFR. Estudios realizados en la línea celular hepática (Hep3B), tratados con agonistas de receptores adrenérgicos, muestran la formación de un complejo formado entre la cinasa Src y Stat-3 con la fosforilación del EGFR (Han y col., 2008). En cardiomiocitos de rata neonatal se encontró que el adrenoreceptor beta1 (α 1-AR) puede transactivar al EGFR regulando la vía de ERK 1/2, así como la fosforilación de Stat-3, induciendo la proliferación de fibroblastos cardiacos a través de la vía PI3K/ERK 1/2 (Gong y col., 2007).

Norkina y col., (2007) demuestran que en monocitos tratados con etanol, la cinasa Src puede activar al Stat-3 de manera directa por inducir la fosforilación en tirosina (Tyr705) y de manera indirecta por inducir la vía de señalización de las MAPK para fosforilar al Stat-3 en serina (Ser727). Resultados obtenidos en células acinares de la glándula salival expuestas a etanol sugieren que la transactivación del EGFR es dependiente de Src y que esto resulta en la activación de ERK 1/2; sin su translocación al núcleo y poder fosforilar a proteínas citosólicas con un papel fisiológico de sobrevivencia celular como la cPLA₂ (fosfolipasa 2 citosólica) (Slomiany y Slomiany., 2009). Se sabe que Stat son sensibles a las ERO. Esto es apoyado en estudios realizados en células vasculares de músculo liso (VSMCs) tratadas con H₂O₂, donde se encontró incrementada la fosforilación tanto en tirosina como en serina para Stat-1 y Stat-3 (Madamanchi y col., 2001). Con estos resultados implican a las ERO en la activación de Stat. Por otro lado se sabe que el Cd puede generar ERO de manera indirecta (Liu y col., 2009). Souza y col., (2009), determinaron el origen de las ERO que pueden participar en la activación del Stat-3 inducido por el Cd, en células HepG2 pretratadas con cianuro de potasio (KCN) para inhibir a la mitocondria, allopurinol para inhibir a la xantina oxidasa y cloruro de difenileno iodonio (DPI) para inhibir a la NADPH oxidasa. Ellos encontraron una mayor disminución en la activación de Stat-3 con DPI. Esto sugiere que el sistema de la NADPH oxidasa es la principal fuente de ERO involucrada en la activación de Stat-3. Seshiat y col., (2002), relacionan a la NADPH oxidasa con la activación de la cinasa Src.

La transactivación del EGFR por Src genera señales que inducen cascadas de señalización que llevan a regulación del Stat-3 a través de las MAPK (Lemus y Montaña., 2004). Souza y col., (2009), reportan que en células HepG2, pretratada con los inhibidores para las MAPK (SP600125 para JNK, PD98059 para ERK 1/2, SB203580 para P38), la fosforilación de Stat-3 en serina es principalmente por ERK 1/2. De igual manera, estudios en hepatocitos de rata, se determinó que la p42/44 MAPK participa en la fosforilación de Stat-3 en serina (Weng y col., 2008) y que p38 es indispensable para la fosforilación del Stat-1 en serina 727 (Dudley y col., 2004).

Los resultados obtenidos en este proyecto, demuestran que el Cd activa a ERK 1/2 de manera significativa en los hepatocitos. Además al inhibir a la cinasa Src con SU5666 y al EGFR con AG1478, la activación de ERK 1/2 inducida por el Cd se ve disminuida. Esto sugiere que tanto Src como EGFR participan como mediadores en la regulación de ERK 1/2 en hepatocitos tratados con Cd. La activación de la cinasa Src, lleva a la formación de complejo adaptador, Shc-Grb2-Sos, resultando en la activación secuencial de la cascada Ras/Raf-1/MEK 1/2 /ERK 1/2, activando la translocación de ERK 1/2 al núcleo para inducir la activación las Stat (Liu, y col., 2009). Min y col., (2009), mencionan que la proteína Ras es susceptible a las ERO provenientes de la NADPH oxidasa. Saad y Fred., (2008), sugieren que la cinasa Src juega un papel muy importante en la activación de

ERK 1/2 en osteoblastos. En células de hepatoma de rata (FaO), la inhibición del EGFR atenúa constitutivamente la activación de ERK 1/2 y de Akt inhibiendo la síntesis de ADN (Ortiz y col., 2008). Gupte y col., (2009), mencionan que la NADPH oxidasa puede ser activada por PKC. Además, se ha reportado que el Cd activa a PKC en varios tipos celulares (Lag y col., 2005), con la activación de la vía de las MAPK. Xuan y col., (2005), mencionan que en células cardíacas dañadas por isquemia, la fosforilación tanto de Stat-1 como de Stat-3 en serina, se da a través de PKC vía PCK-Raf1-MEK 1/2-p44/42 MAPK. De igual manera, se ha reportado que en la línea celular de osteoblastos de ratón, PKC activa a ERK 1/2 (Miyahara y col., 2004). En nuestros resultados, se reporta que tanto la activación de Stat-3 (Tyr705) como la activación de ERK 1/2 y del EGFR inducida por el Cd, se ven disminuidas cuando los hepatocitos fueron tratados con el inhibidor queleritrina para PKC. Esto sugiere que la proteína PKC participa en la cascada de señalización inducida por el Cd para la activación de Stat-3 mediado por Src/EGFR/ERK 1/2. Estudios previos, indican que el Cd sustituye al zinc en los dominios regulatorios de PKC, resultando en su activación. Además, el Cd al ser muy similar al Ca, puede sustituirlo de los sitios de unión y así activar las isoformas de PKC (Martin y col., 2009). En hemocitos de mejillones expuestos a concentraciones bajas de Cd se propone que la generación de ERO es probablemente vía PKC mediada la NADPH oxidasa (Dailianis., 2009). Seshiah y col., (2002), demuestran que en células vasculares de músculo liso (VSMCs), la activación del EGFR, es por medio de las ERO generadas por la NADPH oxidasa activada por PKC.

Existen varios estudios relacionados con la producción de la proteína HSP70 inducida por el Cd en diversos tipos celulares (Valbonesi y col., 2008; Nishitai y Matsuoka., 2008; Souza y col., 2009; Escobar y col., 2009). Estudios en células embrionarias de ratón (ES) (Nishitai y Matsuoka., 2008) y en células HepG2 (Urani y col., 2007), tratadas con varias concentraciones de CdCl₂ encontraron un incremento en la producción de HSP70. Nuestros resultados, demostraron que en los hepatocitos tratados con CdCl₂, se incrementó la producción de la HSP70 de manera dependiente del tiempo de exposición. Estudios en la línea celular humana U3A, determinaron que existe una región corta del promotor del gen que codifica para HSP70, la cual, contiene un sitio de reconocimiento para Stat-3 (Nageswara y col., 2001). Souza y col., (2009), demostraron que en células HepG2 pre-tratadas con el péptido inhibidor para Stat-3, hay una disminución en la producción de la proteína HSP70 y inducidas con CdCl₂. Esto sugiere que la producción de la HSP70 puede ser mediada por la activación del factor Stat-3. Sin embargo, se conoce que para la producción de la HSP70, también se requiere de la activación de otros factores de transcripción como el de choque térmico (HSF), el cual se une a los elementos localizados en los genes promotores de las HSPs (Sugisawa y col., 2004). El grupo de Nishitai y Matsuoka., (2008), demostró que en células embrionarias de ratón (ES)

transfectadas con siRNA para las proteínas JNK, P38 y ERK 1/2, la producción de la HSP70 inducida por el Cd se encontró disminuida. Estos resultados sugieren que la HSP70 es regulada por las isoformas de las MAPK.

8 CONCLUSIÓN

El mecanismo mediante el cual el Cd puede activar al factor Stat-3 en los hepatocitos, no se conoce con exactitud. De acuerdo con nuestros resultados, se propone que la activación de Stat-3 es por vía Src/EGFR/ERK 1/2 y se resume en la figura 11. Se sabe que el Cd puede generar ERO a través de la NADPH oxidasa (Souza y col., 2009) por medio de PKC. Estas ERO activan a proteínas sensibles como la cinasa Src que tienen un papel muy importante en la transactivación del EGFR, determinado con el inhibidor SU6656. Este EGFR está involucrado en la fosforilación de Stat-3 en tirosina, determinado con el inhibidor Ag1478. Por otro lado, el EGFR activa la cascada de señalización de ERK 1/2 a través de la vía Ras-Raf-Mek- ERK 1/2 para la fosforilación de Stat-3 en serina, determinado con el inhibidor Ag1478. Se sabe que PKC puede activar la vía de las MAPK que son las responsables de regular a Stat-3 en serina y como se muestra en la figura 11 con el inhibidor de PKC (queleritina), se inhibe la fosforilación de Stat-3 y de ERK 1/2. El factor Stat-3 fosforilado se transloca al núcleo para inducir la expresión de genes. De esta manera, el factor Stat-3 se une al promotor del gen que codifica para HSP70, incrementando su producción.

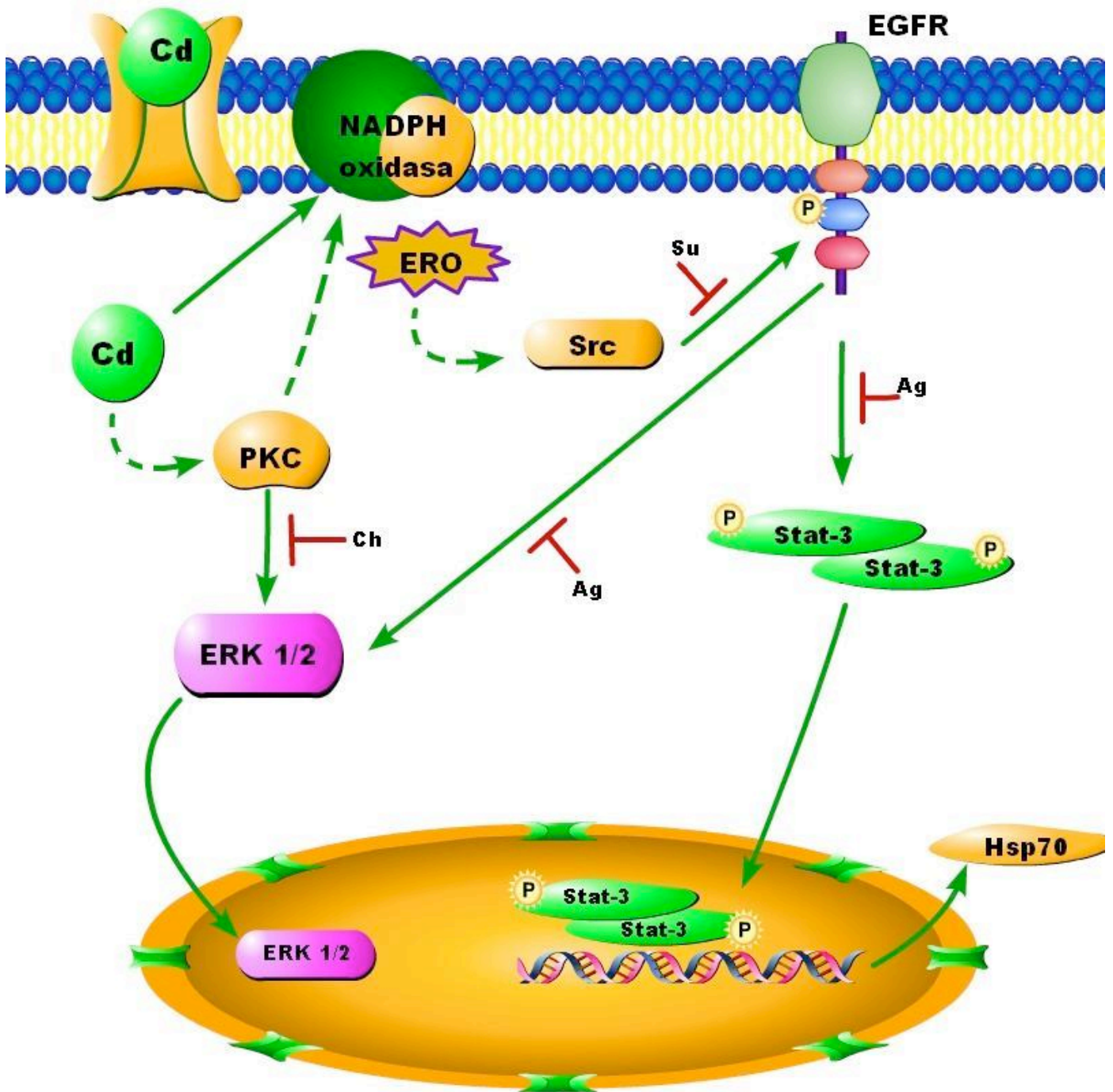


Figura 11. Modelo propuesto para la activación de Stat-3, a través de la transactivación del EGFR, por medio de la cinasa Src. Y las vías de señalización involucradas en la cascada de señalización inducida por el Cd. Así como la producción de la proteína HSP70.

9 REFERENCIAS

- Barry S. P., Townsend P. A., McCormick J., Knight R. A., Scarabelli T. M., Latchman D. S., Stephanou A. (2009). "STAT3 deletion sensitizes cells to oxidative stress". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385:324-329.
- Biscardi J.S., Maa M-C., Tice D. A., Cox M E., Leu T-H., Parson S. (1999). "c-Src-mediated Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor on Tyr⁸⁴⁵ and Tyr¹¹⁰¹ Is associated with Modulation of Receptor Function". *J Biol Chem.* 274:8335-8343.
- Bey E., Xu B., Bhattacharjee A., Oldfield C., Zhao X., Li Q., Subbulakshmi V., Feldman G., Wientjes F., Cathcart M. (2004). "Protein Kinase C δ is Required for p47^{phox} phosphorylation and Translocation in Activated Human Monocytes" *J Immunol.* 173:5730-5738.
- Brown M. D. y Sacks D. B. (2009) "Protein scaffolds in MAP kinase signalling". *Cell Signal.* 21:462-469.
- Buscalpi G., Massimi M., Divergillis C. G., Lesuni S., (2009). "Multiples parameters are involved in the effect of cadmium on prenatal hepatocytes". *Toxicol. in vitro: 23:* 1311-1318.
- Cabané P., Díaz J., Rojas J., Maluenda F., Rencoret G., Saud K., Loreto M. G., Ibacache D., Ledezma S., Caviedes R., (2007). "Optimización de cultivos primarios de hepatocitos humanos para el estudio de citotoxicidad". *Rev. Chilena de Cirugía.* No 2., pp. 116-12.
- Chen L., Liu L., Huang S. (2008). "Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5". *Free radical biology & Medicine* 45., pp; 1035-1044.
- Coyle P., Niezing G., Shelton T. L., Philcox J. C., Rofe A. M. (2000). "Tolerance to cadmium hepatotoxicity by metallothionein and zinc: in vivo and in vitro Studies with MT-null mice". *Toxicology* 150: 53-67.
- Dailianis S., (2009). "Production of superoxides and nitric oxide generation in haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.) after exposure to cadmium: A possible involvement of Na⁺/H⁺ exchanger in the induction of cadmium toxic effects". *Fish Shellfish Immunol.* 27:446-453.
- Diamond G.L. y Zalupus R.K. (1998). "Understanding renal toxicity of heavy metals". *Toxicol. Pathol.* 26: 92-103.
- Dudley A., Thomas D., Best J., Jenkins A. (2004). "The STATs in cell stress-type responses". *Cell. Commun. Signal.* 2: 2-8.

- Dufour J.F., y Clavien P. A. (2005). "Signaling pathways in liver diseases". Ed. Springer., Germany., pp; 3-5.
- Escobar M. C., Souza V., Bucio L., Hernández E., Gómez Q. L. E., Gutierrez R. Ma. C. (2009). "MAPK activation is involved in cadmium-induced Hsp70 expression in HepG2 cells". *Toxicol. Mech. Methods.* 19:503-509.
- 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.
- Friedman SL. (2004). "Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications". *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol Hepatol.* 1(2):98-105.
- Gao B. (2005). "Cytokines, STATs and liver disease". *Cell. Mol. Immunol.* 2: 92-100.
- García R. L., Robles B. R. y Valenzuela S. E, (1999). "Las metalotioneínas y su relación con la toxicidad del cadmio en los mamíferos". *Rev. Int. Contam. Ambient.* 15 (2):113-120.
- Gerstein S. A., (2001). "Molecular Biology; Problem Solver". Wiley-Liss. pp.117.
- Gong K-Z., Zhang H., Du J-H., Zhang Y-Y. (2007) "Crosstalk between signaling pathways of adrenoceptors and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT 3) in heart". *Acta Pharmacol Sin.* Pp: 153-165.
- Gunnar F., Nordberg., Bruce A., Fowler Monica Nordberg. y Lars Friberg (2005), "Handbook on the toxicology of metals". 3ª Edición., pp; 445-486.
- Gupte S. A., Kaminski P. M., George S., Kouznestova L., Olson S. C., Mathew R., Hintze T. H., Wolin M. S. (2009). "Peroxide generation by p47^{phox} -Src activation of Nox2 has a key role in protein kinase C-induced arterial smooth muscle contraction". *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 296: 1048-1057.
- Han C., Bowen W. C., Michalopoulos G. K., Wu T. (2008) "Alpha-1 Adrenergic Receptor Transactivates Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (Stat3) Through Growth Activation of Src and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in Hepatocytes". *J. Cell. Physiol.* 216: 486-497.
- Hsiao Ch. J. y Stapleton S. R. (2009). "Early sensing and gene expression profiling under a low dose of cadmium exposure". *Biochimie* 91:329-393.
- 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.

- Jacquier-Sarlin M.R., Fuller K., Dinh-Xuan A.T., Richard M.J. y Polla B.S. (1994). "Protective effects of hsp70 in inflammation". *Experientia* 50: 1031-1038.
- Jason S., Rawling., Kristin M., Rosler. y Douglas A. H., (2004) "The JAK/STAT signaling pathway". *J. Cell. Science* 117, 128-1283.
- Kregel K.C. (2002). "Molecular biology of thermoregulation. Heat shock preoteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance". *J. Appl. Physiol.* 92: 2177-2186.
- Kmiec Z. (2001). "Cooperation of liver cells in health and disease". *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 161: 1-151.
- Laemmli, U.K., (1970). "cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄". *Nature* 227: 680-685.
- Lag M., Refsnes M., Lilleaas E. M., Holme J. A., Becher R., Schwarze P. E. (2005) "Role of mitogen activated protein kinases and protein kinase C in cadmium-induces apoptosis of primary epithelial lung cells". *Toxicology.* 211; 253-264.
- 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 induces strees-related gene expression in wild-type and metallothionein-I/II-null mice". *Free. Radic. Biol. Med.* 32: 525-535.
- Liu J., Qu W., Kadiska M. B. (2009) "Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis" *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, doi:10.1016/j.taap.2009.01.029., pp, 6-4C
- Lemus S. E. y Montaña J. A. (2004). "transactivación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK's) por receptores acoplados a proteínas G". *Rev. Biomed;* 15:33-48.
- 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.
- Madamanchi N. R., Li S., Patterson C. y Runge M. S., (2001), "Reactive Oxygen Species Regulate Heat-Shock protein 70 via JAK/STAT Pathway". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:321-326.
- Martelli A., Evangelisti C., Nyakern M., Manzoli F. (2006). "Nuclar protein kinase C" *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 542-552.
- Martin P., Boulukos K. E., Poggi M. C., Pognonec P. (2009). "Long- term extracellular signal-related kinase activation following cadmium intoxication is negatively regulated by a protein kinaseC-dependent pathway affecting cadmium transport". *FEBS journal* 276: 1667-1679.

- Min L-J., Masaki M., Iwai M., Horiuchi M. (2009) "Signaling mechanisms of angiotensin II in regulating vascular senescence". *Ageing. Res. Rev.* 8: 113-121.
- Miyahara T., Katoh T., Watanabe M., Mikami Y., Uchida S., Hosoe M., Sakuma T., Nemoto N., Takayama K., Komurasaki T. (2004). "Involvement of mitogen-activated protein kinases and protein kinase C in cadmium-induced prostaglandin E2 production in primary mouse osteoblastic cells". *Toxicology* 200: 159-167.
- Moasser M. M., Srethapakdi M., Sachar K. S., Kraker A. J., Rosen N. (1999). "Inhibition of Src kinases by Selective Tyrosine Kinase Inhibitor Causes Mitotic Arrest". *Cancer Research* 59: 6145-6152.
- 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: 321-326.
- Nishitai G. y Matsuoka M. (2008). "Differential Regulation of HSP70 Expression by the JNK kinases SEK1 and MKK7 in Mouse Embryonic Stem Cells Treated With Cadmium". *J. Cell. Biochem.* 104:1771-1780.
- Norkina O., Dolganuic A., Shapiro T., Kodys K., Mandrekar P., y Szabo G. (2007) "Acute alcohol activates STAT3, AP-1, and Sp-1 transcription factors via the family of Src kinase to promote IL-10 production in human monocytes" *J. Leukoc. Biol.* 82: 752-762.
- Ortiz C., Caja L., Sancho P., Bertran E., Fabregat I. (2008). "Inhibition of the EGF receptor blocks autocrine growth and increases the cytotoxic effects of doxorubicin in rat hepatoma cells. Role of reactive oxygen species production and glutathione depletion". *Biochem. Pharmacol.* 75:1935-1945.
- Rikans L. E. y Yamano T. (2000). "Mechanisms of Cadmium-Mediated Acute Hepatotoxicity". *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14(2):110-117.
- Rodriguez E. y López R. (2003). "Proteínas de Estrés y nutrición". *Higiene y Sanidad Ambiental* 3: 36-44.
- Roskoski R. (2005) "Src Kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331:1-14.
- Saad Fred. (2008). "Src as a therapeutic target in men with prostate cancer and bone metastases". *BJUI international.* 103:434-440.
- Schiessinger J. (2000). "New Roles for Src Kinases in Control of Cell Survival and Angiogenesis". *Cell.* 100: 293-296.

- Schnelldorfer T., Gansauge S., Gansauge F., Schlosser S., Beger H G., Nussler A. (2000). "Glutathione depletion causes cell growth inhibition and enhanced apoptosis in pancreatic cancer cells". *Cancer*. 89:1440-1447.
- Seshiah P. N., Weber D. S., Rocic P., Valppu L., Taniyama Y., Griendling K. K. (2002). "Angiotensin II Stimulation of NAD(P)H Oxidase Activity:Upstream Mediators" *Circ. Res.* 91;406-413.
- Shafer J. T. (1998). "Effects of Cd²⁺, Pb²⁺ and CH₃Hg on high voltage activated calcium current in pheochromocytoma (PC12) cells: potency, reversibility, interactions with extracellular Ca²⁺ and mechanisms of block". *Toxicol. Lett.* 99: 207-221.
- Skarpen E., Oksvold M. P., Grosvik H., Widnes C., Huitfeldt H. S. (2005). "Altered Regulation of EGF Receptor Signaling Following a Partial hepatectomy". *J. Cell. Physiol.* 202:707-716.
- Slomiany B. L. y Slomiany A. (2009). "Role of Epidermal growth Factor receptor in the Activation of Cytosolic Phospholipase A₂ in leptin Protection of Salivary Gland acinar cell Against ethanol cytotoxicity". *J. Physio. Pharmacol.* 60: 49-55.
- Souza V., Bucio L. y Gutiérrez-Ruiz M.C. (1997). "Cadmium uptake by a human hepatic cell line (WRL-68)". *Toxicology* 120: 215-220.
- Souza V., Escobar M. C., Gómez-Quiroz L., Bucio L., Hernández E., Chávez Cossio E., Gutiérrez-Ruiz M.C. (2004). "Acute cadmium exposure enlances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells". *Toxicology.* 197:213-228.
- Souza V., Escobar M. C., Bucio L., Hernández E., Gómez-Quiroz L., Gutiérrez-Ruiz M.C. (2009). "NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced-STAT3 activation in HepG2 cells" *Toxicol. Lett.* 187:180-186.
- Staveren W. C. G., Solís D. Y. W., Hébrant A., Detours V., Dumont J. E., Manenhaut C. (2009). "Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells?" *Biochim. Biophys. Acta.* 1795: 92-103.
- Stephanou A. (2004). "Role of STAT-1 and STAT-3 in ischemia/reperfusion injury." *J. Cell. Moll. Med.* 8: 519-525.
- Stojadinovic A., Kiang J., Goldhill J., Matin D., Smallridge R., Galloway R. y Shea-Donohue T. (1997). "Induction of the heat shock response prevents tissue injury during acute inflammation of the rat ileum". *Crit. Care. Med.* 25: 309-317.

- Sugisawa N., Matsuoka M., Okuno T., 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: 206-214.
- Timbrell J., (2000), "Principles of Biochemical Toxicology", 3ª edición, Ed. Taylor & Francis, pag. 334, 335.
- Trinder D., Oates P. S., Thomas C., Sadleir J., Morgan E. H. (2000). "Localisation of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat duodenal enterocytes in iron deficiency, but to hepatocytes in iron overload". *Gut.* 46:270-276.
- Urani C., Melchiorretto P., Canevali C., Morazzoni F. y Gribaldo L. (2007). "Metallothionein and hsp70 expression in HepG2 cells after prolonged cadmium exposure". *Toxicology in vitro.* 21:314-319.
- Valbonesi P., Ricci L., Franzellitti S., Biondi C., Fabri E. (2008). "Effects cadmium on MAPK Signalling Pathways and HSP70 Expression in a human Trophoblast Cell Line" *Placenta* 29: 725-733.
- Valko M., Morris H. y Cronin M.T.D. (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress". *Curr. Medic. Chem.* 12(10): 1161-1208.
- Warren J. L., (2001). "Role of Jak Kinases and STATs in Cytokine Signal Transduction". *Inter. J. Hematol.* 73: 271-277.
- Weng Y-I., Aroor A. R., Shukla S. (2008). "Ethanol inhibition of Angiotensin II-stimulated Tyr 705 and Ser 727 STAT3 phosphorylation in cultured rat hepatocytes: Relevance to activation of p42/44 mitogen-activated protein kinase". *Alcohol.* 42: 397-406.
- Wispriyono B., Matsuoka M., Igisu H. y Matsuno K. (1998). "Protection from cadmium cytotoxicity by N-acetylcysteine in LLC-PK1 cells". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287: 344-351.
- Wlostowski T., Krasowska E. y Bonda E., (2007) "Joint effects of dietary cadmium and polychlorinated diphenyls on metallothionein induction, lipid peroxidation and histopathology in the kidneys and liver of bank voles". *Ecotoxicol. Environm. Saf.* 69: 403-410.
- Xuan Y. T., Guo y., Zhu Y., Wang O-L., Rokosh G., Messing R. O., Bolli R. (2005). "Role of the Kinase C-Raf-1-MEK-1/2-p44/42 MAPKs Signaling Cascade in the Activation of signal Transducers and Activators of transcription 1 and 3 and Induction of Cyclooxygenase-2 After Ischemic Preconditioning". *Circulation.* 112: 1971-1978.
- Zalpus R. K. y Ahmad S. (2003). "Molecular handling of cadmium in transporting epithelia". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186: 163-188.

- Zhang Y., Cho Y. Y., Petersen B. L., Zhu F. y Dong Z., (2004) “Evidence of STAT1 phosphorylation modulated by MAPKs, MEK1 and MSK1”. *Carcinogenesis*. 25: 1165-1175.