



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PARTICIPACIÓN DE LA NADPH OXIDASA EN LA ACTIVACIÓN DEL
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT3 VIA SRC-EGFR EN CULTIVO
PRIMARIO DE HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
P R E S E N T A:
M. en Biól. Exp. 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., Febrero del 2013

AGRADECIMIENTOS A CONACYT

El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I:0904-0) pertenece al Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado y cuenta con el apoyo del mismo Consejo con la clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Agradezco el apoyo de la beca otorgada por CONACYT con el número de registro 203473, para realizar mi Doctorado 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 División de Ciencias Biológicas y 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 (SEP-CONACYT.CB-2008-106194).

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTA:

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

VOCAL:

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
legq@xanum.uam.mx

VOCAL:

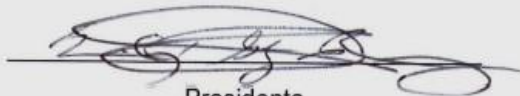
Dr. Edmundo Bonilla González
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mundo@xanum.uam.mx

SECRETARIO:

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

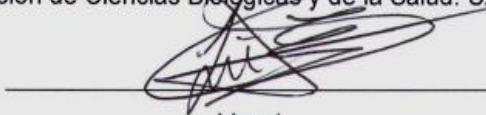
Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "**PARTICIPACIÓN DE LA NADPH OXIDASA EN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT3 VIA SRC-EGFR EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO.**", con fecha 22 de FEBRERO del 2013.

JURADO DE EXÁMEN



Presidenta

Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.



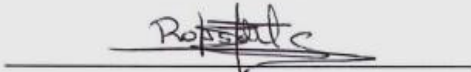
Vocal

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.



Secretario

Dr. Emilio Rojas del Castillo
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

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

DEDICATORIAS

A la Dra. Verónica Souza Arroyo con enorme agradecimiento y admiración por su valioso apoyo, infinita paciencia y acertados consejos, no sólo académicamente sino en lo personal que me han ayudado a tratar de ser mejor científica y sobre todo persona.

A la Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz con todo mi agradecimiento y estimación por su enorme apoyo incondicional y valiosas palabras que me guiaron tanto en lo científico como en lo personal.

Al Dr. Emilio Rojas Del Castillo un sincero agradecimiento por todas sus observaciones, sugerencias y el tiempo que se tomo siempre para atenderme y que fueron claves importantes en el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz un gran agradecimiento por sus acertadas observaciones y por ser un ejemplo a seguir como investigador ya que sus enseñanzas me han ayudado a culminar esta etapa profesional.

A mis queridos amigos y compañeros del laboratorio, con afecto y agradecimiento, Lety, Nelly, Tonatiuh, Marce, Mayrel, Natalia, Soraya, Benjamín, Arturo, Paty y Roxana.

A mis herman@s Denise, Mayra y Alberto que me han demostrado día con día que se puede luchar contra cualquier adversidad por muy mala que parezca y que además siempre me brindaron su tiempo para ayudarme y escucharme tanto en lo académico como en lo personal y por esas valiosas enseñanzas les brindo mi eterno agradecimiento con mucho cariño y recordando nuestra gran frase “ÁNIMO EQUIPO, SI SE PUEDE”.

A mi adorado tesoro Ximena que llego a darme una gran felicidad, fuerza y lecciones de vida al reencontrarme con lo que realmente tiene valor y que se llama FAMILIA.

A mi amado César mi agradecimiento por siempre alentarme con amor a seguir mis metas y sobre todo por ayudarme a conseguirlas, porque sin él yo no podría culminar esta gran etapa de mi vida profesional.

A mi adorada Madre María del Rosario, por apoyarme siempre, alentándome a no caer ante las adversidades de la vida y a seguir luchando por mis metas, con inmenso amor, gran respeto y admiración.

A la memoria de mi amado Padre Evencio, por acompañarme, cuidarme siempre en cada etapa de mi vida y por haberme dejado la enseñanza tan valiosa de la fortaleza y la humildad, con todo mi amor y gran admiración por siempre.

A mi amada hermana Adriana por demostrarme que nunca es tarde para cambiar de actitud y por brindarme siempre todo su amor, apoyo con palabras de confianza en mí, con todo mi amor y agradecimiento.

A la memoria de mi querida abuelita María del Rosario, por haberme brindado el privilegio de gozar de su amor incondicional y por enseñarme a dar el apoyo incondicional que una madre puede darle a su hijo ante cualquier circunstancia de la vida, con inmenso amor.

A mí querido tío Miguel por compartir con su amor y apoyo de padre momentos tan hermosos como fue el nacimiento de Ximena, así como ser incondicional en las circunstancias más difíciles de nuestra vida. También por seguir siendo parte fundamental de mi formación como persona, con todo mi amor, respeto y agradecimiento.

A mi queridas tías Rosa y Lupita por brindarme palabras de aliento y apoyo con todo su amor en etapas significativas de mi vida, mi eterno agradecimiento con amor.

A mis queridos compadres Rosario y Miguel por demostrarme siempre con hechos su amor y apoyo en todo momento y sobre todo por enseñarme a no olvidar lo importante en la vida... EL AMOR Y RESPETO. Con mucho amor y afecto.

A mi consentido y querido primo Fernando por haber sido mi compañero incondicional de juegos y por darme su amor de hermano, con mucho, mucho amor.

A todos mis queridos primos, principalmente Mariano, Raúl, Humberto, Elizabeth, Alejandra, Lorena, y Gaby por darme siempre su cariño y apoyo, mil gracias.

A mi querido suegro Guillermo y cuñados Claudia, Juan Carlos y Guillermo por brindarme su confianza y amor infinito, mi agradecimiento sincero.

RESÚMEN

El cadmio (Cd) es un metal no esencial que se encuentra usualmente en la naturaleza como mineral en combinación con otros elementos en forma de óxido de cadmio (CdO), sulfato de cadmio (CdSO₄) y cloruro de cadmio (CdCl₂). Además se ha catalogado dentro de las 20 sustancias más tóxicas de las cuales se ha incrementado su distribución en el medio ambiente por ser ampliamente utilizado en la manufactura de pilas, fertilizantes, cerámicas y plásticos, es de esta manera que el ser humano está expuesto a este metal y como consecuencia afecta varios órganos y tejidos, incluyendo el riñón, el pulmón, el páncreas y la próstata, sin embargo su órgano blanco es el hígado, donde básicamente se acumula y se sintetiza una proteína de bajo peso molecular (6 kDa) metalotioneína (MT) que contiene grupos sulfhídricos a los que el Cd se une como un mecanismo de defensa. A nivel celular existen evidencias que el Cd induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en parte vía NADPH oxidasa. Se ha reportado a las ERO como mediadoras en vías de señalización en respuesta al Cd, llevando a la activación del factor de transcripción Stat-3, cuyo mecanismo de señalización se ha relacionado con MAPK y la transactivación mediada por la cinasa Src y el receptor de crecimiento epidermal (EGFR), al ser sensibles a ERO. Sin embargo a pesar de que el organismo trata de inducir una respuesta de defensa, se ha reportado que el Cd es capaz de llevar a las células a apoptosis. Es por ello el interés de estudiar el mecanismo de respuesta del hepatocito ante el Cd implicando la activación del factor de transcripción Stat-3 abordando la participación de la NADPH oxidasa y Src-EGFR así como su relación con la producción de MT-II y la apoptosis. Los hepatocitos fueron tratados con diferentes tiempos y concentraciones de Cd para evaluar la viabilidad celular mediante el ensayo de violeta cristal así como activación de Src, STAT3, ERK1/2, MT-II, p53 y Bax por Western blot. La participación de las ERO en la activación del factor de transcripción Stat-3 y de la cinasa Src se evaluó pretratando los hepatocitos con un antioxidante Catalasa pegilada (pCAT) por 30 min. Para evaluar la generación de ERO se utilizó el método fluorométrico con DCFH-DA y se realizó un barrido de tiempo (0, 2, 2.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 90 min), además para determinar la fuente de ERO los hepatocitos se pretrataron

con el inhibidor de NADPH oxidasa (AEBSF) seguidos de 5 μ M de CdCl₂ utilizando los tiempos del barrido. La actividad de la NADPH oxidasa se obtuvo midiendo el consumo de la NADPH inhibido por DPI empleando los mismos tiempos de incubación de la generación de ERO. El papel de NADPH oxidasa, Src y el EGFR en la fosforilación de Stat3, transactivación del EGFR, activación de ERK1/2 y producción de MT-II se evaluó pre tratando con los inhibidores: AEBSF, SU6656 para Src y AG1478 para el EGFR. La apoptosis se midió con la tinción del kit de Annexin-V-fluos por citometría de flujo. Los resultados demuestran un incremento significativo en la activación del factor a nivel de tirosina a partir de los 5 min e incrementándose con respecto al tiempo de incubación con el Cd. Por otra parte la fosforilación a nivel de serina presentó un incremento a partir de la hora. Con el antioxidante (pCAT) se encontró disminuida la activación en ambos sitios de fosforilación de Stat-3 así como la activación de Src. En la generación de ERO por Cd se observó una máxima producción de ERO a los 2.5 min declinando a los 5 min sin dejar ser significativa y por lo tanto sin llegar a niveles del control. La NADPH oxidasa participó en la formación de ERO, porque al pre tratar con su inhibidor (AEBSF) las ERO se abatieron de manera significativa con respecto a los hepatocitos tratados con sólo Cd. La actividad de la NADPH oxidasa mostró un comportamiento semejante al de la formación de ERO porque a los 2.5 min se encontró la máxima actividad de esta oxidasa. Al realizar las inmunoprecipitaciones de Src-EGFR, Stat3-Src y EGFR-Stat3 encontramos una interacción directa entre las proteínas estudiadas. En cuanto a la expresión de MT-II como proteína de respuesta final, esta comenzó a ser significativa a partir de las 2 h encontrando una máxima expresión de 60 veces más que el control a las 4 h. También se encontró que al pre-tratar con los inhibidores de NADPH oxidasa, Src y EGFR la expresión de la MT se disminuyen de manera significativa con respecto a los hepatocitos tratados con Cd. Finalmente a pesar de que el hepatocito trata de responder ante el Cd, lo lleva a apoptosis activando a p53 y Bax a las 12 h de tratamiento. Estos resultados sugieren que el Cd activa al factor de transcripción Stat3 a través de la participación de las ERO generadas por la NADPH oxidasa llevando a la fosforilación de Src, transactivación del EGFR y fosforilación de ERK1/2, dando como respuesta celular la expresión de la MT-II,

pero finalmente los hepatocitos mueren por apoptosis implicando a p53 y Bax en el proceso.

ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a metal which is non-essential in nature and usually in combination with other mineral elements in the form of cadmium oxide (CdO), cadmium sulphate (CdSO₄) and cadmium chloride (CdCl₂). It has further been listed in the most toxic substances 20 which has an increased distribution in the environment to be widely used in the manufacture of batteries, fertilizers, ceramics and plastics, is in this manner that the human being is exposed to This metal and consequently affects various organs and tissues, including the kidney, lung, pancreas and prostate, but its target organ is the liver, where it is accumulates and synthesize a low molecular weight protein (6 kDa) metallothionein (MT) containing the sulfhydryl groups that Cd binds as a defense mechanism. At the cellular level there is evidence that induces the production of reactive oxygen species (ROS) in part via NADPH oxidase. It has been reported as a ROS signaling pathways mediating defense response to Cd, leading to activation of the transcription factor Stat-3, the signaling mechanism is related MAPK mediated transactivation and Src kinase receptor epidermal growth (EGFR), to be sensitive to ROS. But even though the body tries to induce a defense response, it has been reported that Cd can cause cells to apoptosis. It is therefore of interest to study the mechanism of response of hepatocyte against Cd involving the activation of the transcription factor Stat3 addressing involving NADPH oxidase and Src-EGFR and its relationship with the production of MT-II and apoptosis . Hepatocytes were treated with different concentrations of Cd times and assessing cell viability using the crystal violet assay as activation of Src, Stat3, ERK1/2, MT-II, p53 and Bax by Western blot. The involvement of ROS in the activation of the transcription factor Stat-3 and the Src kinase was assessed pre treating hepatocytes with an antioxidant catalase pegylated (pCAT) for 30 min. To evaluate the generation of ROS fluorometric method was used with DCFH-DA and performed a sweep time (0, 2, 2.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60 and 90 min), and to determine the source ROS pre hepatocytes are treated with the inhibitor of NADPH oxidase (AEBSF) followed by 5 M CdCl₂ μ using scanning times. The NADPH oxidase activity was obtained by measuring the NADPH consumption DPI inhibited by using the same incubation times of the generation of ROS. The role of NADPH oxidase in Src and EGFR

phosphorylation of Stat-3, EGFR transactivation, activation of ERK1/2 and MT-II production was assessed pre treated with inhibitors: AEBSF, SU6656 for Src and AG1478 for EGFR. Apoptosis was measured by staining kit Annexin-V-Fluos by flow cytometry. The results demonstrate a significant increase in activation of the tyrosine level factor from the 5 min and increasing with respect to time of incubation with the Cd. Moreover phosphorylation at serine showed an increase from the time. With the antioxidant (pCAT) activation was decreased in both sites of phosphorylation of Stat-3 activation and Src. In the generation of ROS by Cd was observed maximum ROS production declining by 2.5 min at 5 min while being significant and therefore did not reach levels of control. The NADPH oxidase involved in the formation of ROS, because the pre treat with its inhibitor (AEBSF) ROS were brought down significantly compared to hepatocytes treated with Cd only behavior of NADPH oxidase activity showed a similar behavior the formation of ROS for the 2.5 min peak was found for this oxidase. When performing immunoprecipitations of Src-EGFR, Stat-3-Src and EGFR-Stat-3 found a direct interaction between each pair of proteins studied. As for the expression of MT-II protein as final response, it began to be significantly after 2 h finding the maximum expression 60 times more than the control at 4 h. We also found that by pre-treating with NADPH oxidase inhibitors, Src EGFR expression and the MT are reduced significantly with respect to hepatocytes treated with Cd. Finally Cd that the hepatocyte is accountable to the Cd, leads to apoptosis activating p53 and Bax at 12 h of treatment. These results suggest that the active Cd transcription factor Stat-3 through the involvement of ROS generated by NADPH oxidase leading to the phosphorylation of Src EGFR transactivation and phosphorylation of ERK1/2, leading to the expression cell response MT-II, but eventually die due to apoptosis of hepatocytes involving p53 and Bax in the process.

ABREVIATURAS

BCA	Ácido bicinconínico
pCAT	Catalasa pegilada
CdCl ₂	Cloruro de cadmio
CO ₂	Dióxido de carbono
DMT-1	Proteína transportadora de iones metálicos divalentes 1
DTT	Ditiotreitol
ERK1/2	Cinasa reguladora de señal extracelular 1 y 2
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
FasL	Ligando Fas
GSH	Glutatión
HSC	Células estelares hepáticas
JNK	c-Jun cinasa amino terminal
KC	Células de Kupffer
MAPK's	Proteínas cinasas activadas por mitogeno
MEC	Matríz extracelular
MRE	Elementos de respuesta a metales
MT	Metalotioneína
MTF-1	Factor de transcripción de metales -1
NADPH	Nicotinamida de adenina dinucleotido fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
SEC	Células endoteliales sinusoidales
SFB	Suero fetal bovino
Src	Cinasa del elemento transformante del retrovirus de sarcoma de rous
Stat	Transductor de señal y activador de transcripción
TAD	Dominio transcripcional de transactivación

INDICE

1	Introducción.	01
1.1	Generalidades del cadmio.	01
1.2	El cadmio y su efecto en la salud.	03
1.3	El hígado.	04
1.4	El cultivo primario de hepatocitos.	07
1.5	El cadmio y las cascadas de señalización	08
1.6	La NADPH oxidasa.	09
1.7	El factor transductor de señal y activador de transcripción (Stat3)	12
1.8	El receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR).	15
1.9	La metalotioneína.	18
1.10	El cadmio como inductor de apoptosis	20
2	Justificación.	22
3	Hipótesis.	23
4	Objetivos.	24
5	Material y Métodos.	25
5.1	Cultivo primario de hepatocitos.	25
5.2	Diseño experimental.	26
5.3	Extracción de proteína total.	26
5.4	Análisis del contenido de proteína por Western blot.	27
5.5	Determinación del contenido de proteína.	28
5.6	Ensayo de viabilidad celular por cristal violeta.	28
5.7	Determinación de generación de ERO con DCFH.	29
5.8	Análisis de la actividad de la NADPH oxidasa.	29
5.9	Inmunoprecipitación.	30
5.10	Determinación de la apoptosis por citometría de flujo.	30
5.11	Análisis Estadístico.	31
6	Resultados.	32
6.1	Curva de viabilidad celular de hepatocitos tratados con cadmio.	32
6.2	Determinación de la NADPH oxidasa como fuente de las ERO.	36
6.3	Actividad de la NADPH oxidasa en presencia de cadmio	38
6.4	Fosforilación a nivel de tirosina del factor Stat3 en hepatocitos tratados	

con cadmio.	40
6.5 Participación de la NADPH oxidasa en la activación a nivel de tirosina del factor Stat3.	42
6.6 Participación de las ERO en la activación de Stat3.	44
6.7 Fosforilación en serina del factor de transcripción Stat3 en hepatocitos tratados con cadmio.	46
6.8 Fosforilación a nivel de serina de Stat3 mediada por NADPH oxidasa.	48
6.9 Las ERO como mediadoras en la fosforilación a nivel de serina del factor Stat3.	50
6.10 Cinética de activación de la cinasa Src.	52
6.11 Participación de la NADPH oxidasa y de las ERO en la activación de Src.	54
6.12 Activación del EGFR en hepatocitos tratados con cadmio	57
6.13 Participación de la NADPH oxidasa en la fosforilación del EGFR	59
6.14 Participación de la cinasa Src en la transactivación del EGFR	61
6.15 Interacción de la cinasa Src con el EGFR	63
6.16 Participación de la cinasa Src y del EGFR en la activación del factor Stat3	65
6.17 Interacción del factor Stat3 con la cinasa Src	68
6.18 Interacción del EGFR con el factor Stat3	70
6.19 Activación de ERK1/2 en cultivo de hepatocitos tratados con cadmio	72
6.20 El papel de la NADPH oxidasa en la activación de ERK1/2	74
6.21 Participación de la cinasa Src y el EGFR en la fosforilación de ERK1/2	76
6.22 Participación de la cinasa ERK1/2 en la fosforilación a nivel de serina del factor Stat3	78
6.23 La expresión de metalotioneína en hepatocitos expuestos a cadmio	80

6.24 Participación de la NADPH oxidasa en la expresión de metalotioneína	82
6.25 El papel de la cinasa Src y el EGFR en la expresión de MT-II	84
6.26 Inducción de apoptosis en hepatocitos primarios por el cadmio	86
6.27 Activación de p53 y Bax	88
7 Discusión	91
7.1 Viabilidad celular	91
7.2 Generación de ERO vía NADPH oxidasa	92
7.3 Señalización de activación del factor Stat3	94
7.4 Producción de MT-II y apoptosis	96
8 Conclusión	99
9 Referencias	101

PARTICIPACIÓN DE LA NADPH OXIDASA EN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT3 VIA SRC-EGFR EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

1 INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DEL CADMIO

El cadmio (Cd) es un metal pesado no esencial que está presente en los alimentos o el agua debido a procesos graduales de erosión y abrasión de rocas y suelos, causado por eventos como incendios forestales y erupciones volcánicas (Nakamura y col., 2012, Marcano, kiy col., 2009; Pan, y col., 2009). Este metal se encuentra como mineral en combinación con otros elementos en forma de óxido de cadmio (CdO), cloruro de cadmio (CdCl₂), sulfato de cadmio (CdSO₄), carbonato de cadmio (CdCO₃), hidróxido de cadmio (Cd(OH)₂) y sulfuro de cadmio (CdS). Más del 90% del Cd en el ambiente es producido en forma antropogénica ya que es utilizado en la manufactura de fertilizantes, pigmentos, estabilizadores, compuestos electrónicos y especialmente en baterías recargables de níquel-cadmio, así su presencia en la atmósfera se ha ido incrementando con el desarrollo industrial (Luparello y col., 2011; Cuypers y col., 2010; Giuseppe y col., 2009; Jihen y col., 2009). En la agricultura, el uso de fertilizantes de fosfatos representa un contacto directo de Cd con los suelos y subsecuentemente con el medio ambiente. Las concentraciones de Cd pueden ser tan altas como 500 ppm por el uso de fertilizantes con fosfatos (Pan y col., 2009).

Los alimentos y el agua contaminada son la fuente diaria de exposición del ser humano a este metal, existe también la que proviene del humo del cigarrillo, debido a su alto contenido de este metal en ellos. La entrada de Cd a las células no es uniforme en todos los sistemas. Éste puede ser mediado por transporte pasivo o activo o vía canales de calcio (Ca) y magnesio (Mg) sensibles a voltaje a través de la membrana plasmática (Vesey, 2010; Lévesque y col., 2008; Fotakis y Timbrell, 2006). Estudios realizados por Souza, y col (1997) y otros grupos señalan que una tercera parte del Cd entra a los hepatocitos por canales de Ca operados por receptores y sensibles a voltaje (Deckert, 2005; Zalpus y Ahmad,

2003). Además, se ha reportado que los grupos sulfhidrilo localizados en las proteínas de las membranas participan en la entrada de Cd en células epiteliales de cáncer de colon (Caco-2) (Pigman, y col., 1997) y en la línea celular de hepatocitos fetales (WRL-68) (Souza, y col., 1997). Tanto en células de hepatoblastoma (HepG2) como en células de hepatocarcinoma (HTC), también se encontró que el Cd utiliza para su entrada a la proteína transportadora de iones metálicos divalentes 1 (DMT1) o por endocitosis mediada por receptor de proteínas unidas a Cd como la proteína transportadora 8 relacionada a zinc (Zn) y hierro (Fe) (ZIP8) (Moullis y Thévenod, 2010; Vesey, 2010; Klaassen, y col., 2009; Lévesque y col., 2008).

En el hígado se encuentran compuestos con grupos tioles o compuestos orgánicos con grupos sulfhidrilo que están involucrados en la movilización y detoxificación del Cd a través de la formación de complejos Cd-tiol dentro de la célula. Este metal es capaz de formar uniones covalentes con varias moléculas con grupos tioles tal como el glutatión (GSH), que es un pequeño péptido que está constituido por tres aminoácidos: glicina, cisteína, y ácido glutámico. El GSH es un antioxidante intracelular para lo cual usa el grupo tiol de la cisteína como agente reductor (Cuypers y col., 2010; Schnelldorfer y col., 2000). El Cd también se une con proteínas como la metalotioneína (MT) que también tienen grupos tioles y juega un papel muy importante en la homeostasis de metales esenciales como el Zn, el cobre (Cu), en la protección contra las especies reactivas de oxígeno (ERO) y la toxicidad producida por el cadmio (Kothinti y col., 2010; Klaassen y Liu, 1998; Klaassen y col., 1999). El Cd es secretado en la bilis o bien es liberado a la circulación como complejos Cd-GSH o Cd-MT. Estos son una importante forma de transporte dentro del organismo así como una manera de acumulación, explicando así su larga vida biológica que se estima es de entre 20-40 años, característica que lo hace particularmente tóxico (Xu y col., 2011; Klaassen y col., 2009).

Se ha encontrado que el Cd puede inducir daño mitocondrial, procesos de inflamación, fibrosis e interferir con la homeostasis del Ca, llevando a muerte celular vía apoptosis o necrosis en varios tipos celulares como células hepáticas, epidermales, linfoblastoides y renales (Xu y col., 2011; Cuypers, y col., 2010;

Thévenod, 2009; Giuseppe, y col., 2009; Thijssen, y col., 2007). Sin embargo, el principal órgano blanco del Cd es el hígado, donde este metal puede disparar mecanismos adaptativos al generar ERO como mediadoras de señalización celular y respuesta anti-apóptica (Honda y col, 2010). También la exposición al Cd se ha asociado con varios tipos de cánceres, por ello la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado al Cd como carcinogénico clase I así como la Ley de Respuesta Ambiental, Compensación y Responsabilidad (CERCLA) que lo ha enumerado como el número 7 de una lista de 275 de materiales peligrosos (Urani y col., 2007; ATSDR, 2007; IARC, 1993).

1.2 EL CADMIO Y SU EFECTO EN LA SALUD

El efecto del Cd en los seres humanos depende del tipo de compuesto y duración del tiempo de la exposición, la dosis y forma química. Cuando se ingieren alimentos o bebidas con altas concentraciones de Cd de forma aguda se puede presentar irritación estomacal, náusea, vómito y diarrea, dolor abdominal y muscular (Moulis y Thévenod, 2010; ATSDR, 2005). 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). Evidencias recientes sugieren que el Cd causa osteoporosis por afectar de manera directa al tejido óseo. Así mismo en personas diabéticas se ha visto que son más sensibles a la toxicidad inducida por el Cd (Moulis y Thévenod, 2010). 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. Existen evidencias 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 se une a 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 oxidante (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 (Xu y col., 2011; Rikans y Yamano., 2000), y la síntesis de la proteína MT (García y col., 1999). También se ha demostrado que a nivel celular el Cd induce respuestas que involucran no sólo señales de muerte sino también de protección contra su toxicidad. Por otra parte, existen evidencias que sugieren fuertemente que el Cd es capaz de regular la expresión de genes, afectando drásticamente el patrón de la actividad transcripcional en varios tipos celulares (Luparello y col., 2011).

1.3 EL HÍGADO

El hígado es uno de los órganos más grande del cuerpo humano, pesa entre 1.5 – 1.8 kg, lo que representa el 2% del peso total del cuerpo en el adulto. El hígado tiene varias funciones vitales, como el ser centro de defensa, ya que está involucrado en la biotransformación de xenobióticos, lleva a cabo la captura y degradación de bacterias, virus, parásitos, partículas entre otras, además está involucrado en el metabolismo de carbohidratos, participa en el metabolismo de lípidos teniendo como funciones principales la captación, oxidación y transformación de los ácidos grasos, la síntesis de lipoproteínas del plasma, la transformación de lipoproteínas. (Karim y col., 2012; 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 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).

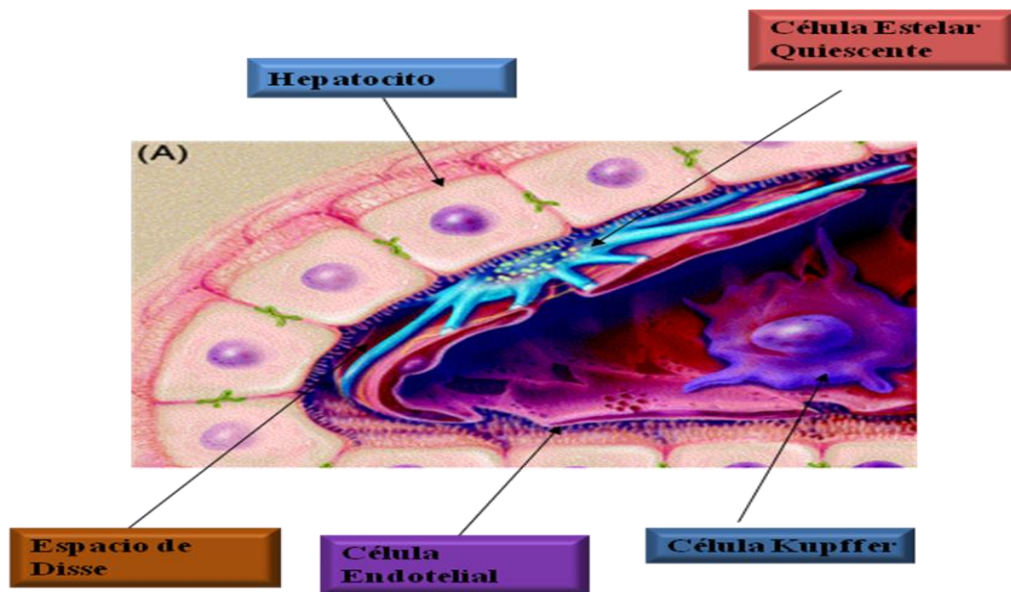


Figura 1. Tipos celulares de hígado normal. Las células estelares quiescentes (azul) se representa en el espacio de Disse entre los hepatocitos (rosa claro, las células cuadradas) y las células endoteliales sinusoidales (color rosado oscuro, las células alargadas), a un costado de las células de Kupffer (color morado) Imagen tomada y modificada de Friedman SL., 2004.

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 (Wang y col., 2011; Friedman, 2004).

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 (Wispriyono y col., 1998) o vía canales de calcio (Shafer, 1998; Urani y col., 2007). Estudios en nuestro grupo y en otras investigaciones 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 GSH, debido a que tiene gran afinidad por estos grupos, por lo que éste metal está asociado a estrés oxidante (Hsiao y Stapleton, 2009, Deckert,

2005; Rikans y Yamano, 2000) y a la formación de ERO debido a 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 alteran la expresión de genes (Escobar y col., 2002).

1.4 EL CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS

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 a las condiciones *in vitro*. La ventaja de utilizar de células normales radica en la similitud de éstas 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 es un sistema valioso para el estudio de la biología y patofisiología del hígado, porque nos permite 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; Gardmo y col., 2005).

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, crucial para la separación celular y subsecuentemente un medio rico en Ca conteniendo una enzima dependiente de Ca, 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 parenquimatosas, 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 EL CADMIO Y LAS CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN

Se ha reportado que ante la presencia del Cd se activan distintas cascadas de señalización que regulan varios factores de transcripción y la expresión de genes, como una respuesta de adaptación, que si no puede compensar lleva a la célula a la muerte (Souza, y col, 2009; Leonard, y col, 2004).

Por su parte los metales pueden afectar la transcripción de genes, expresión y activación de diversas proteínas de señalización como receptores de factores de crecimiento, proteínas G tales como ras, proteínas tirosina cinasa como Src, cinasas activadas por mitógeno (MAPK), factores de transcripción como el factor nuclear kappa-B (NF-kB), la proteína activadora-1 (AP-1), y el factor transductor de señal y activador de transcripción (Stat3) y esto lo pueden hacer de manera directa al activar diferentes vías de señalización, porque pueden interactuar con las proteínas y por otra parte generar de manera indirecta la formación de ERO, así como mimetizar los efectos de ligandos extracelulares como la insulina (Leonard y col., 2004).

El Cd, tiene además la capacidad de interrumpir los procesos de señalización fisiológicos, resultando en una señalización disfuncional. Además estos efectos sobre la señalización también amplifican la respuesta celular a los efectos tóxicos del Cd, como el daño directo a enzimas, oxidación de grupos thiol e incremento en los niveles de ERO. La entrada de Cd genera cambios más o menos permanentes en los receptores de la superficie celular y por consiguiente en los niveles de segundos mensajeros los cuales puede estar fisiológicamente

elevados o reducidos, afectando de esta manera la función celular, transcripción y regulación de adaptación y sobrevivencia (Thévenod, 2009; Leonard y col., 2004). Finalmente se ha encontrado que el Cd es capaz de interferir con el Ca, ERO, MAPK, la cinasa serina/treonina/ proteína cinasa “B” (Akt/PKB), NF-κB, factor nuclear eritroide relacionado a factor 2 (Nrf2), proteína cinasa “C” PKC y en los mecanismos de muerte celular, sobrevivencia, proliferación e inflamación (Kundu y col., 2009; Thévenod, 2009). Estudios realizados por Souza y col., (2009), en hepatocitos demuestran que el Cd genera ERO vía la NADPH oxidasa.

1.6 LA NADPH OXIDASA

La NADPH oxidasa fue originalmente identificada como un componente clave de defensa. Su función como un complejo enzimático es catalizar la reducción de un electrón del oxígeno que, acoplado con la oxidación de NADPH, resulta en la producción de $O_2^{\cdot-}$. La producción de $O_2^{\cdot-}$ es seguida por su dismutación a H_2O_2 espontáneamente o a través de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) (Babelova y col., 2012; Cuypers y col., 2010; Iaccio y col., 2007). Esta oxidasa está constituida por dos subunidades de membrana gp91phox y p22phox, que juntas forman a la flavocitocromo b558 y tres subunidades citosólicas p47^{phox}, p67^{phox}, p40phox y RAC (Fig.2). En células en estado basal, la oxidasa está inactiva y sus componentes están separados. Cuando la célula es expuesta a estímulos apropiados, estos componentes se asocian para formar un complejo activo. Por su parte el flavocitocromo b558 sirve como un transportador de electrones que genera al $O_2^{\cdot-}$ del oxígeno y el NADPH, por su parte p47^{phox} es postulada como una proteína adaptadora que ensambla los componentes de la enzima (Cui y col., 2011; Yamamori y col., 2004).

Las NADPH oxidasa es clasificada de acuerdo a su tipo de producción de ERO y su composición de subunidades (Babelova y col., 2012). Existen tres principales grupos de la NADPH oxidasa, de acuerdo a la presencia de dominios en adición al dominio gp91^{phox}. NOX1, NOX3 y NOX4 tienen una estructura y tamaño similar a gp91^{phox}, ellas contienen un sitio de unión al sustrato NADPH y otro a FAD en la región C-terminal, además de dos grupos hemo presentes en la región N-terminal, lo que constituye un sistema eficiente para el transporte de

electrones. Los electrones fluyen del NADPH unido a NOX hacia el FAD y mediante los dos grupos hemo que están orientados perpendicularmente a la superficie de la membrana constituyendo un conducto para que los electrones pasen a través de la membrana para reducir el oxígeno molecular y formar al $O_2^{\cdot-}$. De acuerdo a su topología este subgrupo de oxidasas se encuentra en la membrana y reducen oxígeno a través de la membrana para generar $O_2^{\cdot-}$ y en una segunda reacción, dos moléculas de $O_2^{\cdot-}$ que pueden reaccionar para generar H_2O_2 , el cual entre otras cosas, puede funcionar como un sustrato para peroxidasas. Por su parte NOX5 está constituida por la estructura básica de gp91phox, pero con dominio extra en la parte del amino denominado de calmodulina que contiene 4 sitios de unión para Ca. Cuando el Ca se une al dominio de calmodulina provoca un cambio conformacional, exponiendo los residuos hidrofóbicos que unen y regulan a las enzimas blanco. Cuando NOX5 es expresada en células ésta es activada por calcio. El tercer grupo de oxidasas es el de DUOX, con una estructura similar a la NOX5, conteniendo en la parte amino terminal un dominio homólogo a peroxidasa y dominio extra denominado alfa hélice que se encuentra entre el dominio homólogo a peroxidasa y el dominio de unión a Ca, el dominio peroxidasa se encuentra en parte extracelular de la membrana. La importancia de este dominio en DUOX es que se encarga de generar ERO (Lambeth, 2004).

La regulación de la NADPH oxidasa involucra las subunidades regulatorias, incluyendo las asociadas a membrana como p22^{phox} y las citosólicas como p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox} así como la pequeña GTPasa RAC. La subunidad p22^{phox} forma un complejo estable con gp91^{phox} y su carboxilo terminal contiene secuencias ricas en prolina, que sirven como sitio de unión para el dominio homólogo a SRC-3 (SH3) de p47^{phox}. Además p47^{phox} tiene una región autoinhibitoria, que combinada con el dominio SH3 previene la unión con p22^{phox}. Por otra parte el dominio SH3 también interactúa con el dominio homólogo a Phox (PX), probablemente a través de su secuencia rica en prolina, esta interacción inhibe la unión del dominio PX a los lípidos de membrana. Además p47^{phox} se encuentra en el citosol en forma de complejo con p40^{phox} y p67^{phox}, mientras que

RAC se encuentra unida a la proteína inhibitoria RhoGDP-inhibidor de disociación (RhoGDI) (Lambeth, 2004; Fontayne y col., 2002).

La activación de la NADPH oxidasa dispara tres eventos moleculares: fosforilación de proteína, metabolismo de lípidos e intercambio del nucleótido de guanina en RAC y estos eventos dan como resultado la translocación de las subunidades citosólicas al flavocitocromo b_{558} (Fig.2). El papel fundamental del ensamblaje de las subunidades es yuxtaponer el dominio de activación de $p67^{phox}$ para unirla a la flavocitocromo b_{558} . El dominio de activación de $p67^{phox}$ activa la transferencia de electrones de NADPH a flavina adenina dinucleótido (FAD), este paso es determinante en la generación de $O_2^{\cdot-}$.

Se ha considerado que la NADPH oxidasa participa en varios procesos de señalización a través de las ERO generadas, las cuales se han considerado como segundos mensajeros para la activación de factores de transcripción (Cuypers y col., 2010; Lambeth, 2004).

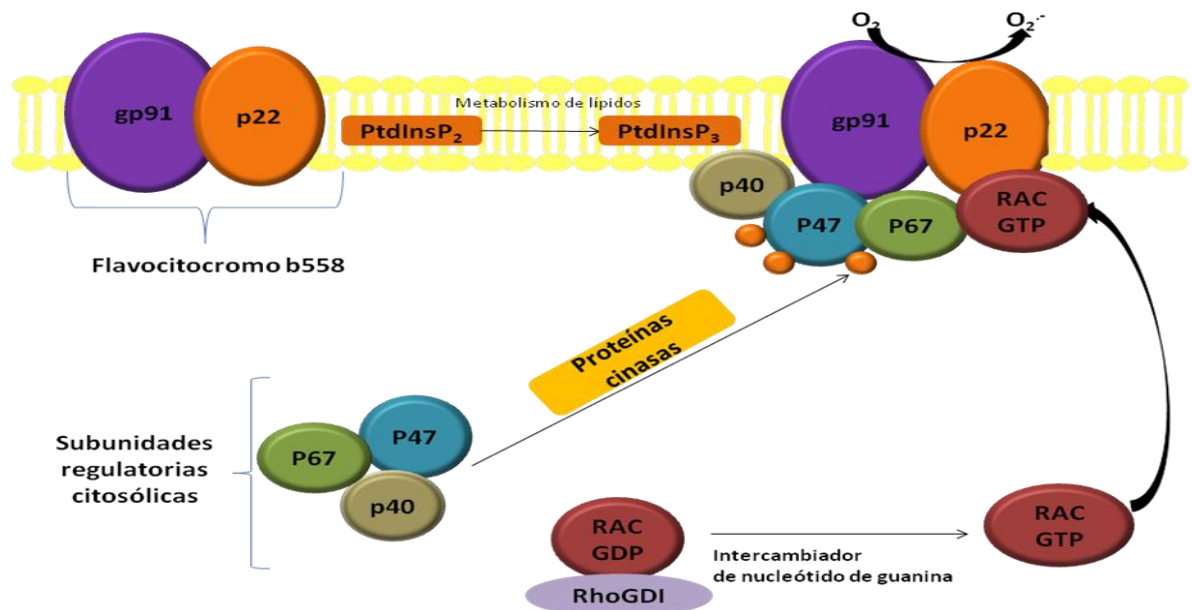


Figura 2. Mecanismo de activación de la NADPH oxidasa implica la translocación de las tres subunidades citosólicas (p67, p47 y p40) junto con RAC que ayuda al ensamblaje al flavocitocromo b_{558} para generar la producción de $O_2^{\cdot-}$

1.7 EL FACTOR TRANSDUCTOR DE LA SEÑAL Y ACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN (STAT3)

Las ERO generadas en respuesta al cadmio contribuyen a la defensa vía la activación del factor de transcripción Stat3 (Cuypers y col., 2010; Gao, 2005).

La familia de Stat son factores de transcripción citoplasmáticos que está conformada por siete isoformas: Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5A, Stat5B y Stat6 (Timofeeva y col., 2012; Rawlings y col., 2004). Su estructura funcional y de dominios está muy conservada y cuenta con un dominio 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.3). 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 (Timofeeva y col., 2012; Stephanou, 2004). Estos factores son requeridos para diversos procesos biológicos incluyendo desarrollo embrionario y homeostasis en el adulto, así como diferenciación, proliferación, sobrevivencia y apoptosis (Zhang y col., 2012; Timofeeva y col., 2012; Jason y col., 2004).

Estos factores de transcripción están inactivos en el citosol y citocinas o factores de crecimiento se unen a sus respectivos receptores resultando en el reclutamiento de Stat a los receptores para que sea fosforilado por miembros de la familia de la cinasa Janus (Jak) o la cinasa Src o por el receptor mismo como el del factor de crecimiento epidermal (EGFR) a nivel de Tyr 705 en Stat3. Este proceso de activación para el factor Stat3 dispara la dimerización y la translocación al núcleo. En el núcleo el dímero de Stat3, es fosforilado por las MAPK en el residuo de serina 727 para que pueda unirse al ADN a nivel de elementos de respuesta llamados secuencia activada por interferón gama (GAS) que son los promotores de genes blanco (Timofeeva y col., 2012; Hou y col., 2007) (Fig. 4). Las MAPK están involucradas en la regulación del crecimiento celular, sobrevivencia, diferenciación y varias respuestas al estrés oxidante 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 a nivel de serina 727 por las MAPK en adición a la fosforilación en tirosina 705 es requerida para una máxima activación transcripcional. La fosforilación de Stat3 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 Stat3, juega un papel citoprotector en células cardiacas expuestas a estrés oxidante El Cd induce la producción de ERO, que se consideran importantes en la activación de factores de transcripción, en particular de Stat3 (Gao., 2005).



Figura 3. Estructura del factor de transcripción Stat3 en él que se muestran sus dos sitios de fosforilación serina 727 (Ser727) y tirosina 705 (Tyr705).

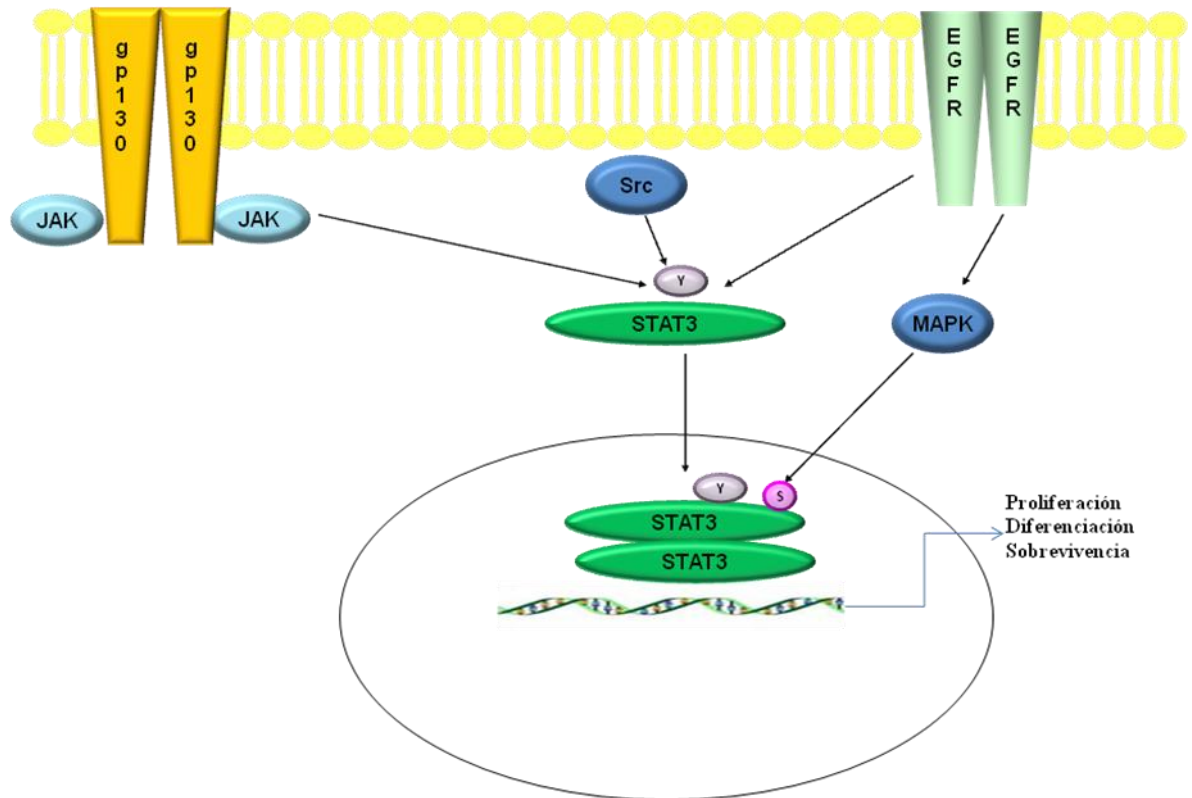


Figura 4. Vía de activación de Stat3. La fosforilación a nivel de tirosina puede ser mediada por la cinasa Jak, Src o por EGFR para llevar a la subsecuente dimerización del Transductor de señal y activador de transcripción (Stat3). Así como la activación a nivel de serina por la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) para la unión del factor Stat3 al ADN.

1.8 EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGFR)

Se conoce que el factor Stat3 puede ser activado por el EGFR. Este receptor es una cinasa de tirosina transmembranal de 170 kDa que pertenece a la familia de las proteínas HER/ErbB (Abdullah y col, 2012; Berasain y col., 2011; Ortiz y col., 2008). Su región amino terminal se encuentra localizada hacia el lado extracelular y posee dos dominios ricos en cisteínas, también presenta 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 a ser fosforilados (Berasain y col., 2011; Lemus y Montaña., 2004). La unión de su ligando resulta en la dimerización del receptor que da lugar a la activación de su actividad de 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 en su dominio catalítico está implicada en el mantenimiento 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 col., 2009). La activación del EGFR genera señales que inducen la proliferación, la diferenciación y la sobrevivencia celular a través de las MAPK (específicamente ERK 1/2) (Fig. 5). El intermediario que conecta a la cascada de señalización generada por el 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 fosforilan y activan a la cinasa de ERK/MAPK (denominada MEK), enzima que fosforilan 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 Stat3 en serina 727 (Lemus y Montaño., 2004; Skarpen y col., 2005).

La cinasa Src es un miembro de la familia de proteínas tirosina cinasa que tienen papeles muy importantes en respuestas de viabilidad, proliferación y sobrevivencia y especialmente tiene un papel muy importante en la transactivación del EGFR (Giannoni y col., 2010; Ingley, 2008; Sánchez-Lemus y Arias-Montaño, 2004). Src, fue identificada originalmente como el homólogo celular del v-Src por el virus del sarcoma de Rous (Moasser y col., 1999). Todos los miembros de la familia de Src comparten una estructura de dominios similar, que comprende: una región única N-terminal de la alta variabilidad entre los miembros de la familia que proporciona funciones únicas para cada miembro de la familia Src y puede ser desde una miristoilación y a veces un sitio de palmitoilación que influyen en la localización subcelular; el dominio de homología a Src 3 (SH3) que dirige la asociación específica con motivos ricos en prolina para que de tal manera medie las interacciones intra- e intermoleculares; el dominio de homología a Src 2 (SH2) proporciona una interacción con motivos fosfotirosina en Src misma o de otras proteínas; el dominio involucrado en la unión intramolecular con el dominio SH3; el dominio de homología a Src 1 (SH1) es el responsable de la actividad enzimática, que alberga un sitio de activación que controla el acceso a los sustratos y contiene un sitio de autofosforilación positiva-reguladora a nivel Tyr 416 en Src importante para lograr la máxima actividad cinasa y finalmente el C-terminal que contiene sitio regulador negativo en Src cuando está fosforilado en Tyr527 porque se puede acoplar al dominio SH2 (Giannoni y col., 2010). La cinasa Src puede ser activada por integrinas, una variedad de receptores de proteínas G, por estimulación de factores de crecimiento y por ERO (Liu y col., 2009; Schelessinger., 2000).

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, Src puede tener una participación en la vasoconstricción.

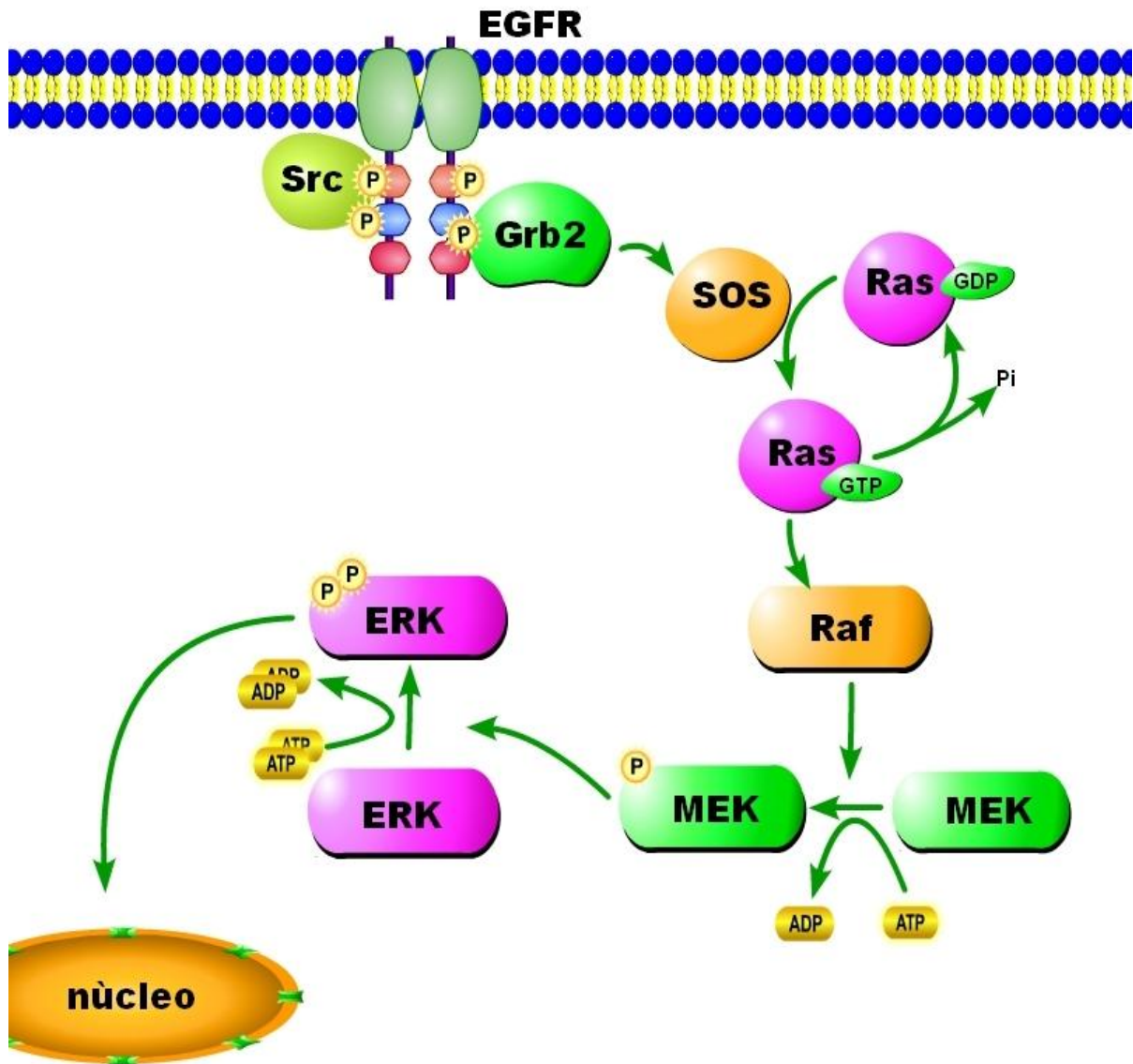


Figura 5. Vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Activación de la vía de las Proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), por medio de la transactivación EGFR por medio de la cinasa Src. Imagen tomada de Lemus y Montaño., 2004.

1.9 LA METALOTIONEÍNA

El Cd induce la formación de ERO que pueden interactuar con vías de señalización de defensa como MAPK, receptores como EGFR y factores de transcripción. Como consecuencia los genes codifican para moléculas involucradas en la defensa biológica y reparación celular, incluyendo proteínas atrapadoras de radicales como la metalotioneína (MT) (Cuypers y col., 2010; Leonard y col., 2004). Nakamura y col. (2012) reportan que la MT fue aislada por primera vez en 1957 de riñón de caballo como proteína de unión a Cd. El efecto del Cd en la expresión del gen de MT fue la primera actividad transcripcional controlada por este metal según Koizumi y col. (1985), quien al exponer células derivadas de cáncer cérvico uterino (HeLa) a Cd éste estimuló la inducción de dos isoformas de MT no clasificadas en ese momento.

La MT cumple diversas funciones como es el proveer una homeostasis de metales fisiológicamente importantes como el Cu y el Zn, detoxificación de metales como el Cd, y de defensa antioxidante.

La MT puede unirse al Zn a nivel de sus cisteínas para transportarlo de una parte de la célula a otra, de esta manera la MT es un sistema clave de señales de Zn en la célula. El Zn, a su vez, es un elemento clave para la activación y unión de factores de transcripción a través de su participación en la región de dedo de Zn (Kang, 2006).

Las MT's inicialmente fueron reportadas como proteínas de unión al Cd que comprende una familia de proteínas de bajo peso molecular (6-7 kDa) compuesta de más de diez isoformas en humanos como: MTIA, MTIF, MTIG, MTIH, MTIX y MTIIA entre otras (Luparello y col., 2011). Se encuentran subdivididas en 4 grupos: MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV pero son las isoformas MT-I y MT-II las que están ampliamente distribuidas (Inoue y col, 2009).

De acuerdo a su diferente localización y función fisiológica las MT's se pueden dividir como apo-MT cuando se encuentran libres, es decir sin estar unidas a un metal o como complejo MT-metal se denomina como holo-MT, esto en varios órganos y organelos, impactando el estado redox celular (Moulis y Thévenod, 2010). Se caracterizan por tener en su estructura regiones ricas en cisteína, esto les confiere una alta capacidad de unión a iones de metales

pesados en los sistemas biológicos y consecuentemente actúan como atrapadores de radicales libres y protegen contra daño oxidante o de la toxicidad de metales pesados como el Cd (Swindell, 2011; Giuseppe y col, 2009). Estas MT's secuestran al Cd en el citosol para reducir la cantidad de Cd libre y no pueda afectar a otros organelos. Este papel fue confirmado en experimentos con inductores de la MT y con animales transgénicos, en ambos modelos se encontró sobre-expresada la MT y los ratones fueron protegidos contra la letalidad aguda y hepatotoxicidad por el Cd (Klaassen y col, 2009). Sirchia y col (2008), trató a células de derivadas de cáncer de mama (MDA-MB231) con Cd y encontró una sobre-regulación selectiva para la isoforma de la MT-I. Este resultado sugiere que cada isoforma sufre una regulación diferencial con el fin tener diferentes papeles biológicos.

En cuanto a la regulación de su gen se ha encontrado que frente a una respuesta a estrés se incrementan las citocinas que estimulan al eje hipotálamo-pituitaria-adrenal y se unen al complejo citoplásmico receptor de glucocorticoides (GRF) y activa a los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) en el gen de MT. Sin embargo cuando los glucocorticoides inducen la síntesis de MT inicia el secuestro de Zn desde el plasma y origina un reservorio intracelular de Zn, que es crucial para el intercambio de Zn entre la MT y el dominio de dedos de Zn de los factores de transcripción que sirve como mecanismo de regulación de la expresión génica, al facilitar la unión de los factores de transcripción al ADN que activará los elementos de respuesta a metales (MRE) mediante el factor de transcripción de metales 1 (MTF-1) produciendo una regulación positiva, porque este factor de transcripción reconoce a las secuencias MRE que consisten de 753 aminoácidos (Luparello y col., 2011). Por otra parte la IL-6 también regula la expresión de MT y de varias proteínas de respuesta de fase aguda al inducir la fosforilación de tirosina en el factor Stat3, que interactúa con los sitios de la región promotora del gen MT (Scott, 2007).

1.10 EL CADMIO COMO INDUCTOR DE APOPTOSIS

Aunque la célula trata de dar una respuesta adaptativa ante el Cd que si no logra que contrarrestar el daño producido por este metal, entonces se va a apoptosis, como mecanismo fundamental de defensa contra daño al ADN o a una proliferación incontrolada. En próstata y pulmón la apoptosis es frecuentemente observado en células expuestas al Cd como una función anti carcinogénica. Estudios realizados en células del túbulo proximal de riñón han demostrado que el Cd induce toxicidad causada por la generación de ERO llevando a una respuesta de apoptosis (Aimola y col., 2012; Tokumoto y col., 2011; Lau y Chiu, 2007). Otros estudios han mostrado que el Cd interfiere con la homeostasis de Ca intracelular libre llevando a la apoptosis en una variedad de células, tal como células hepáticas, renales, epidermales, linfoblásticas, mesangiales y de tiroides (Xu y col., 2011).

En los años 70's la apoptosis fue descrita como un mecanismo de muerte celular programada en células de tejido sanos. Este mecanismo se caracteriza por que la integridad de la membrana persiste hasta el final del proceso. Una característica clave es el rompimiento de las proteínas del citoesqueleto por proteasas específicas de aspartato, llevando al colapsamiento de los componentes celulares. Otras características es la condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y la formación de vesículas de membrana. (Aimola y col., 2012; Hotchkiss y col., 2009).

La apoptosis se divide en dos vías: extrínseca e intrínseca. La extrínseca es mediada a nivel de la superficie celular por varios receptores de muerte como Fas, Receptor del factor de necrosis tumoral-1 (TNFR-1), Receptor de muerte-3,6 (DR-3,DR-6), Receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF-1,2 (TRAIL-1, TRAIL-2), Receptor del nervio de crecimiento p75 y el Receptor de displasia ectodérmica. Los receptores de muerte son activados por ligandos específicos tales como el ligando Fas, TNF α y TRAIL. La unión del ligando al receptor de muerte transmite una señal que resulta en el reclutamiento intracelular de dominios asociados de muerte tal como Fas asociado a dominio de muerte, y el receptor TNF asociado a dominio de muerte. Fas unido a su receptor a nivel del dominio de muerte forma un complejo que lleva al reclutamiento de una proteína

adaptadora para formar un complejo más grande y así inducir la señal de muerte que activa a la procaspasa 8 y 10. Activada caspasa 8 y 10 activan caspasas río abajo como es caspasa 3, 6 y 7. Activadas estas caspasas llevan a la formación de cuerpos apoptóticos, condensación de la cromatina y a la fragmentación del ADN (Natarajan y col., 2012; Hotchkiss y col., 2009).

La vía intrínseca o mitocondrial es primero iniciada ante una respuesta de estrés oxidante o daño al ADN. La radiación ultravioleta así como drogas, fármacos o moléculas que dañan el ADN inducen la vía intrínseca a través de p53 mediando la sobre regulación transcripcional de los miembros proapoptóticos de la familia de BCL-2 como Bax, APAF-1, PUMA y NOXA. Los miembros proapoptóticos inhiben la acción de los mediadores antiapoptóticos de la familia de BCL-2 como BCL-xL, BCL-w y el factor de células mieloides 1. La sobre regulación de p53 como modulador de la apoptosis y otros factores como la proteína relacionada a dinamina 1 (una GTPasa) y BCL-2 interactuando como mediador de muerte celular promueven la oligomerización de Bax-Bak, lo cual lleva a la formación de poros en la membrana externa de la mitocondria. Esto altera el potencial de membrana mitocondrial que lleva a la liberación del citocromo c, del factor inductor de apoptosis (AIF) y de endonucleasa G (Natarajan y col., 2012; Hotchkiss y col., 2009).

El citocromo c liberado se une a la proteasa apoptótica activando al factor 1 en el citosol, para formar un complejo llamado apoptosoma. El apoptosoma brinda la plataforma para la activación de caspasa 9, la cual subsecuentemente activa caspasas río abajo como 3, 6 y 7. El AIF y la endonucleasa G contribuyen a la apoptosis independientemente de la actividad de caspasas sino por translocación al núcleo, donde asisten en la condensación de la cromatina y fragmentación del ADN. Tanto la vía apoptótica extrínseca como la intrínseca se encuentran involucradas, con lo que en ciertos tipos celulares amplifican el efecto de las señales de inducción de apoptosis. La vía apoptótica mitocondrial puede ser inducida por la acción del complejo inductor de muerte, el cual se une con el dominio citosólico de interacción con BCL-2 (BID) en BID truncado. BID truncado se transloca dentro de la mitocondria para facilitar la dimerización de Bax-Bak y la formación de poros mitocondriales (Natarajan y col., 2012).

2 JUSTIFICACION

El Cd es un metal no esencial que se acumula principalmente en el hígado, teniendo efecto tanto a nivel sistémico como a nivel celular, así como la generación de ERO en parte vía NADPH oxidasa, como mediadoras en vías de señalización para la activación del factor de transcripción Stat3. Sin embargo, a la fecha no se conoce con exactitud el mecanismo de activación del factor de transcripción Stat3 mediado por el Cd. Se ha sugerido que el factor de crecimiento epidermal (EGFR) o la cinasa Src, pueden fosforilar a Stat3 de manera directa en tirosina 705. Además, el EGFR es activado por la tirosina cinasa Src que es sensible a ERO provenientes de la NADPH oxidasa. Es por ello el interés de estudiar el mecanismo de activación del factor de transcripción Stat3 como respuesta de sobrevivencia compensatoria involucrando a la NADPH oxidasa y Src-EGFR en cultivo primario de hepatocitos tratados con Cd, así como relacionar la cascada de señalización inducida por el Cd con la expresión de MT-II. Los datos obtenidos permitirán una mejor comprensión del mecanismo de señalización intracelular que el Cd induce en células hepáticas con la finalidad de conocer el mecanismo adaptativo que permitirá la sobrevivencia celular, o bien si este proceso se ve rebasado y el hepatocito muere.

3 HIPÓTESIS

El cadmio en el hepatocito es capaz de inducir la producción de MT-II como un mecanismo de adaptación/sobrevivencia ante la agresión por el metal. En esta respuesta el cadmio será capaz de activar a la NADPH oxidasa que generará ERO que activarán la cascada de señalización Src-EGFR, así como a ERK1/2 y al factor de transcripción Stat3. Sin embargo esta respuesta a una exposición mayor a 12 horas no será suficiente y el hepatocito finalmente será condicionado a morir por apoptosis.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la vía de señalización involucrada en la activación de Stat-3 en hepatocitos de ratón tratados con cadmio como una respuesta de adaptación/sobrevivencia y su relación con la producción de MT-II.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Evaluar la activación del factor de transcripción Stat3 en hepatocitos tratados con cadmio.**
- ❖ Determinar el papel de la NADPH oxidasa en la activación de Stat3 y de la cinasa Src inducidos por cadmio.**
- ❖ Estudiar la transactivación del EGFR por Src cinasa y su participación en la activación de Stat3.**
- ❖ Evaluar el papel de la vía de señalización de activación del EGFR en la fosforilación de ERK1/2.**
- ❖ Caracterizar la participación de la vía de señalización de activación del factor Stat3 en la expresión de la metalotioneína.**
- ❖ Evaluar la apoptosis generada por el Cd mediada por p53 y Bax.**

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%, se abrió la caja toraxica y el abdomen, se cortó el diafragma 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 Life Technologies). 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 Aldrich) a una concentración de 0.1% en Medio Williams (Sigma Aldrich) con NaHCO₃ 25 mM (J.T.Baker) y amortiguado con HEPES 10 mM (Gibco Life Technologies) 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 Laboratories Inc., Logan Utah, USA) al 10%, 1% Antibiótico-Antimicótico (Gibco Life Technologies) (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 Aldrich) como lo describe Kao y col. (1996) que contenía amortiguador HBSS 1X (Gibco Life Technologies) 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 μ l se utilizó para contar las células en un hematocitómetro usando tinción con azul tripano. El porcentaje de células viables obtenidas fue mayor al 90% y se obtuvieron en promedio 50 millones de hepatocitos por animal perfundido. Las células viables se sembraron a una densidad de 254,000 células/cm² y se mantuvieron en incubación por 4 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. 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 DISEÑO EXPERIMENTAL

El cultivo de hepatocitos fue tratado con 5 μ M de CdCl₂ durante diferentes tiempos (3,5, 10, 15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, o h 12). Después del tratamiento con Cd, las células se lavaron dos veces con PBS, y las células se lisaron. MT-II y la activación de Src, EGFR, ERK 1/2 y Stat3 se analizaron por Western blot. Las células control sin CdCl₂ se sembraron al mismo tiempo. Para los estudios con inhibidores, las células se pre trataron 30 min antes del Cd con 10 μ M SU6656 (Inhibidor de Src, SU) (Sigma Aldrich), 1,0 μ M 4-(2-aminoetil) bencenosulfonilo fluoro de hidrocloreuro(AEBSF) (inhibidor de la NADPH oxidasa, AE) (Sigma Aldrich), 3 nM tirfostina AG1478 (inhibidor de EGFR, AG) (Enzo Life Sciences) o 20 μ M PD98059 (inhibidor de ERK1/2, PD) (Calbiochem USA). En el caso de tratamiento antioxidante, los hepatocitos fueron tratadas previamente 30 min antes del tratamiento con Cd con 0,5 mg / ml de polietilenglicol conjugado a catalasa (pCAT) (Sigma Aldrich).

5.3 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 μ l de un amortiguador de lisis, formado por 10 ml de Reactivo de Extracción de Proteína M-PER (Pierce Biotechnology, USA), 100 μ l DTT 1M, 100 μ l PMSF 1M, una pastilla de inhibidor de proteasas (Complete, Roche Applied Science, Indianapolis, USA) y una pastilla de inhibidor de fosfatasa (PhosphoStop, Roche Applied

Science, Indianapolis, USA). 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 Biotechnology, USA).

5.4 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE PROTEINA POR WESTERN BLOT

El ensayo de Western blot se realizó de acuerdo con el método descrito por Valdés-Arzate y col. (2009). 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 gradiente 4-20% (Lonza,USA) 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, G.E. Healthcare Amersham Pharmacia Biotechnology, USA) 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 a las siguientes diluciones: pStat3(Ser727) 1:1000 (Biosource, International), pStat3(Tyr705) 1:000 (Cell Signaling, Technology), Stat3 1:200 (Santa Cruz, Biotechnology), pSrc (Tyr418), Src 1:1000 (Invitrogen, Life Technologies), pEGFR(Tyr845) 1:1000 (Biomol, Enzo Life Sciences); EGFR 1:1000 (Cell Signaling, Technology); pERK1/2(Tyr204) y ERK1/2 1:250 (Santa Cruz, Biotechnology); p53 y Bax 1:200 (Santa Cruz, Biotechnology), metalotioneína (Stressgen) 1:1000 y Actina 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 1:10000 (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 Biotechnology, USA) durante 5 min y se determinó su densitometría en un Imaging System Gel Logic 1500 (Kodak).

5.5 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

La determinación de la cantidad de proteína total en las muestras se realizó con el estuche comercial del ácido bicinconínico o BCA (Pierce Biotechnology, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomó una alícuota de 5 µl de las muestras y se le agregó 200 µl 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 en un Multimode Detector (DTX880, Beckman Coulter) y se determinó la concentración de la proteína utilizando la curva estándar de albúmina sérica de bovino.

5.6 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR CRISTAL VIOLETA

Para justificar la concentración de CdCl₂ que se estaba utilizando, se decidió determinar la viabilidad celular. Para determinarla se realizó el ensayo de Cristal Violeta descrito por Nakagawa y col. (1996), los hepatocitos se sembraron a una densidad de 1 x 10⁶ células/cm² en placas de 12 pozos (Nalge Nunc, New York, USA) con medio Williams-completo suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% y Antibiótico y antimicótico al 1% por 5 h, posteriormente se les cambió por medio Williams sin SFB dejándolo 12 h, una vez pasado este tiempo se les trató con diferentes concentraciones de CdCl₂ (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 y 50 µM) por 6 h, para la curva de concentración y para la de tiempo fueron: 0, 3, 6, 9, 12 y 24 h pasado los tiempos se lavaron los hepatocitos con PBS frío y se fijaron con alcohol metílico por 10 min a temperatura ambiente, después se les retiró este y les puso una solución de cristal violeta al 0.5% dejándolo actuar por 10 min, posteriormente se lavaron varias veces con agua destilada para retirar el

exceso de colorante y dejarlas secar a temperatura ambiente toda la noche. Posteriormente se extrajo el colorante con una solución al 2% de dodecilsulfato de sodio (SDS 2%) y se colocaron en una placa de 96 pozos para leerlos a una absorbancia de 620 nm de longitud de onda. Los hepatocitos viables fueron calculados en porcentaje relativo a las células sin tratamiento.

5.7 DETERMINACIÓN DE GENERACIÓN DE ERO CON DCFH

Para evaluar las variaciones del estado redox en la célula se utiliza el método fluorométrico con 2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma Aldrich). DCFH-DA es una de las sondas fluorescentes comúnmente usadas para la determinación de ERO. El DCFH-DA rápidamente difunde a través de las membranas celulares y comienza a ser desacetilado por esterasas intracelulares. Entonces la molécula queda como la forma no fluorescente DCFH que es atrapada en la célula y puede servir como un marcador citosólico sensible a estrés oxidante por su oxidación a DCF. Los hepatocitos se sembraron a una densidad de 2×10^5 células/cm² en placa oscura de 96 pozos (Nalge Nunc, New York, USA) y se les trató con 5 μ M de CdCl₂ por diferentes tiempos (0, 2,2.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 90 min) y a otra placa se le pre trató con el inhibidor de NADPH oxidasa (AEBSF) por 30 min y seguido de 5 μ M de CdCl₂ por diferentes tiempos (0, 2,2.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 90 min) y como control positivo para la técnica se utilizó H₂O₂ a 250 μ M. Una vez tratadas las células se les puso DCFH-DA por 30 min y posterior a este tiempo se leyó la intensidad de fluorescencia con una absorbancia de excitación de 503 nm y una de emisión de 529 nm en un Multimode Detector (DTX880, Beckman Coulter). La producción de ERO fué expresada como el incremento con respecto a los hepatocitos no tratados.

5.8 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LA NADPH OXIDASA

Para evaluar la actividad de la NADPH oxidasa (Herrera y col., 2004) los hepatocitos tratados con CdCl₂ y no tratados, se sembraron a una densidad de 3×10^6 células/cm², en cajas Petrí de 10 cm² posteriormente se rasparon con un gendarme y se suspendieron en PBS frío. La actividad se determino incubando con 250 μ M de NADPH y el consumo de NADPH fue monitoreado por el

decremento en la absorbancia de 340 nm por 5 min. Para el análisis de la actividad oxidasa específica, el rango del consumo de NADPH inhibido al agregar DPI 30 min antes del ensayo.

Finalmente se usó el coeficiente de extinción (6.22 mM^{-1}) para calcular la cantidad de NADPH consumido. Los resultados fueron expresados como pmoles de NADPH oxidado por minuto por miligramo de proteína.

5.9 INMUNOPRECIPITACIÓN

Se sembraron hepatocitos en cajas de Petri de 10 cm de diámetro a una densidad de 3×10^6 células/cm². Después de los tratamientos se extrajo y cuantificó la proteína total como se describe en la sección de análisis de proteínas por Western blot. 5 mg de proteína se incubaron con 20 µl de preclearing matrix A (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h a 4°C en rotación. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se recuperó y se incubó toda la noche con un anticuerpo dirigido contra el EGFR (Cell Signaling, Technology) en una dilución 1:100; Stat3 (Santa Cruz Biotechnology) en 1:200 y Src (Invitrogen, Life Technologies) en 1:100, y con 20 µl de Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) a 4°C, en una rotación constante. Posteriormente, el inmunocomplejo se colectó centrifugando a 3000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó con una pipeta y la proteína se lavó 2 veces con 300 µl de amortiguador de lisis, repitiendo la centrifugación en cada lavado. Después del último lavado, el sobrenadante se eliminó y el botón se resuspendió en 20 µl de amortiguador de muestras 2X y se realizó un Western blot para la determinación de Stat3, Src y EGFR.

5.10 DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para evaluar la apoptosis, se sembraron los hepatocitos 250,000 en placa de 12 pozos. Posteriormente se levantaron con tripsina Tryple Express (Invitrogen, Life Technologies) y se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó con una pipeta y posteriormente resuspendió con 100 µl de una solución de Anexina V y yoduro de

propidio y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Finalmente se analizaron en un citometro de flujo FACScalibur (Beckton Dickinson) a 488 nm con un laser azul de Argón. Y las células apoptóticas fueron identificadas como positivas para Anexina V y negativas para yoduro de propidio.

5.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada experimento se realizó en al menos tres eventos independientes. El análisis estadístico de los resultados que se obtuvieron se realizó por un análisis de varianza (ANOVA) seguida por la prueba post hoc de Tukey con el programa SPSS versión 10. El nivel de significancia considerado fue de $p < 0.05$.

6 RESULTADOS

6.1 CURVA DE VIABILIDAD CELULAR DE HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

Para elegir la concentración de CdCl_2 a ser utilizada en los experimentos, los hepatocitos se trataron con diferentes concentraciones que comprendieron desde 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 y 50 μM por 6 h, así como con diferentes tiempos, que fueron 3, 6, 9, 12 y 24 h utilizando el la técnica de cristal violeta. En la figura 6 se muestra el resultado que se graficó como el porcentaje de hepatocitos vivos con respecto a los hepatocitos sin CdCl_2 . Se observa que a la concentración de 5 μM hay más del 90% de hepatocitos vivos, porcentaje que se considera bueno con respecto al 100% de los hepatocitos control ya que a partir de la concentración de 6 μM disminuye la viabilidad a un 80% comenzando a tener una diferencia estadísticamente significativa y así hasta 50 μM en el que el porcentaje llega a un 20%. En la figura 7 se muestra a las 9 h una viabilidad del 75% y así disminuye hasta las 24 h con un 38.2%. La figura 8 se muestra los cambios morfológicos entre hepatocitos controles y los tratados con cadmio por 12 h, en estos últimos podemos observar células flotando y algunas otras con estructura celular contraída.

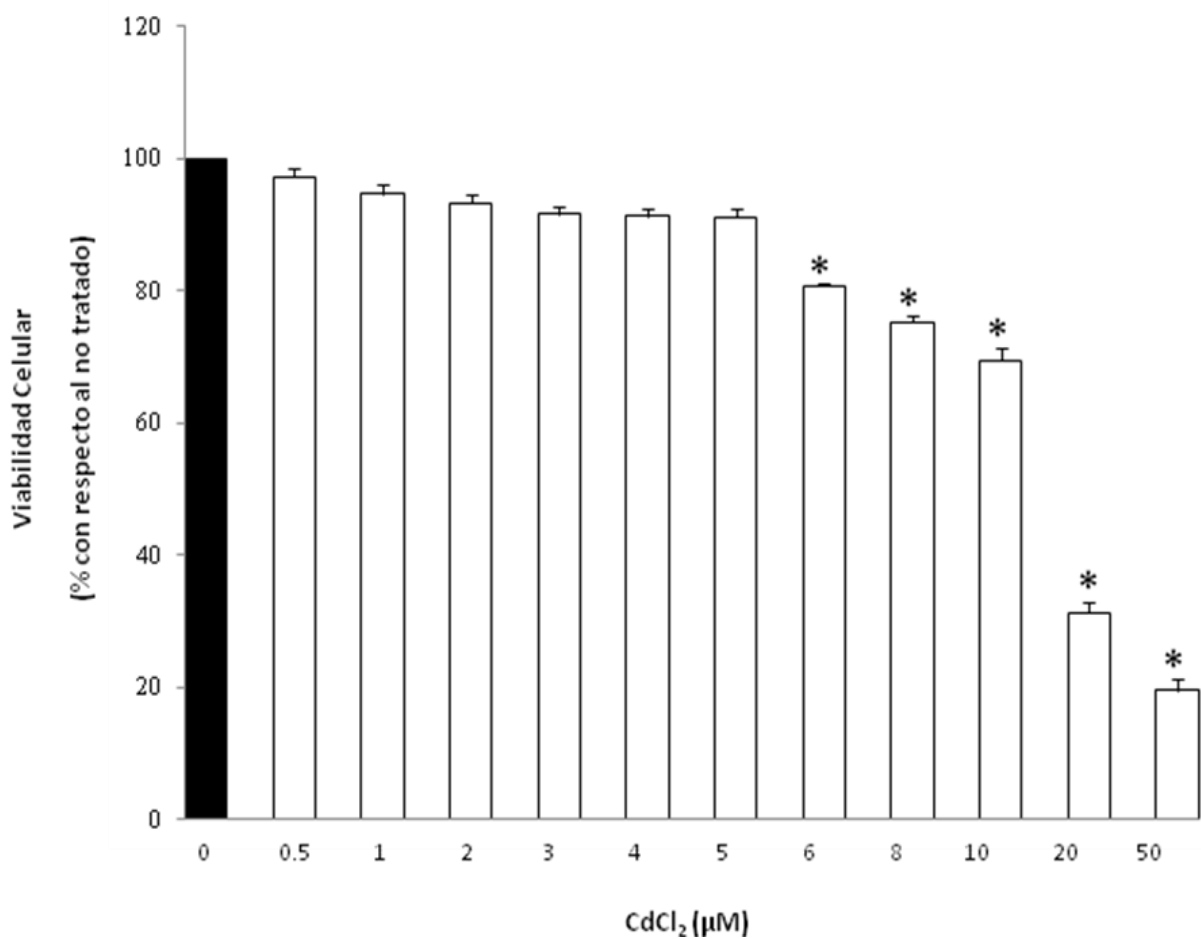


Figura 6. Viabilidad celular. Los hepatocitos fueron expuestos a 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 y 50 μM de CdCl₂ durante 6 h. La viabilidad celular se determinó para elegir la concentración de CdCl₂ idónea a utilizar en experimentos posteriores. Los hepatocitos incubaron con una solución de de cristal violeta al 0.5% por 10 min y la absorbancia se leyó a 620 nm en un Multimode Detector (DTX880, Beckman Coulter). El resultado se graficó como el porcentaje de hepatocitos vivos con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*).

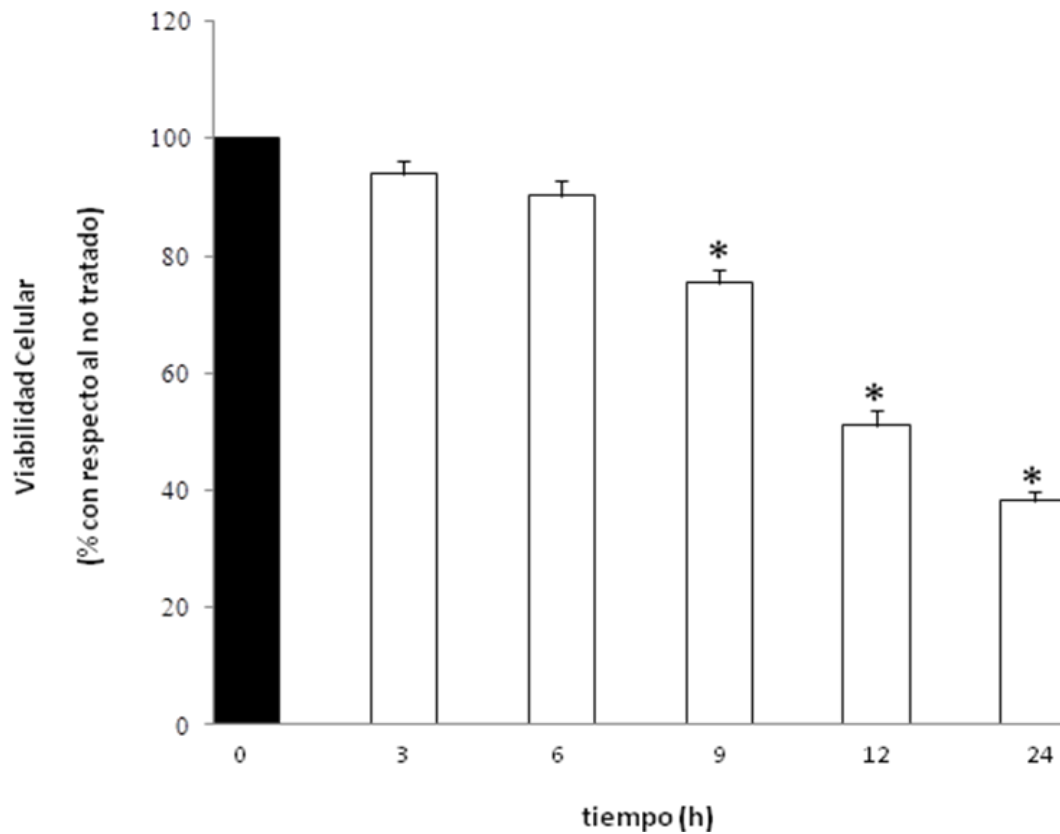


Figura 7. Viabilidad celular. Los hepatocitos fueron tratados por diferentes tiempos 0, 3, 6, 9, 12 y 24 h y con 5 μM de CdCl_2 . La viabilidad se determinó por la técnica de cristal violeta. Se tiñieron los hepatocitos con una solución de cristal violeta al 0.5% y la absorbancia se leyó a 620 nm en un Multimode Detector (DTX880, Beckman Coulter). El resultado se graficó como el porcentaje de hepatocitos vivos con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes ($n=3$). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p<0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*).

(A)



(B)

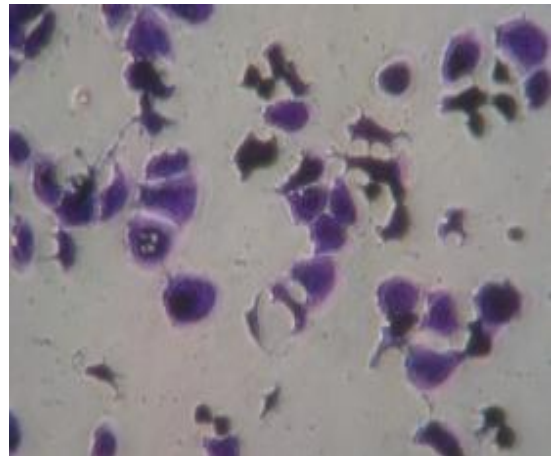


Figura 8. Aspecto microscópico de las células en el estudio de viabilidad celular. Para evidenciar los cambios microscópicos en los hepatocitos, fueron tratados con una concentración de 5 μM de CdCl_2 por 12 h en el panel (B). Los hepatocitos no tratados (NT) se muestran en el panel (A). Ambos tratamientos se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0.5% por 10 minutos y las imágenes representativas de cada experimento fueron tomadas con un microscopio de contraste de fase (Carl Zeiss) a un aumento de 100x.

6.2 DETERMINACIÓN DE LA NADPH OXIDASA COMO FUENTE DE LAS ERO

La formación de ERO en presencia de Cd involucra un descontrol en el estado redox y la inducción de la enzima NADPH oxidasa. Estas ERO han mostrado un papel muy importante en procesos biológicos, incluyendo cascadas de señalización regulando varios factores de transcripción, por lo tanto para evaluar que el cadmio es capaz de generar ERO como mediadoras en la cascada de activación del factor Stat3, los hepatocitos se trataron con 5 μM CdCl_2 por diferentes tiempos (0, 2, 2.5, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 min) y para evaluar la fuente de ERO los hepatocitos se pre trataron con el inhibidor de NADPH oxidasa (AEBSF) a una concentración 1 μM , seguido de 5 μM CdCl_2 con los tiempos utilizados en la curva de generación de ERO. El resultado se determinó con DCFH-DA y se muestra en la figura 9, encontrado que a los 2.5 min se presenta la máxima generación de ERO con un valor de 8.5 veces más que las células no tratadas (NT), posteriormente a los 5 min comenzó a disminuir hasta los 90 min sin dejar de ser significativos. Cuando se pre trato con el antioxidante se abatió esta generación de ERO, llegando a valores del control. Finalmente este resultado sugiere que el Cd genera ERO a través de la NADPH oxidasa.

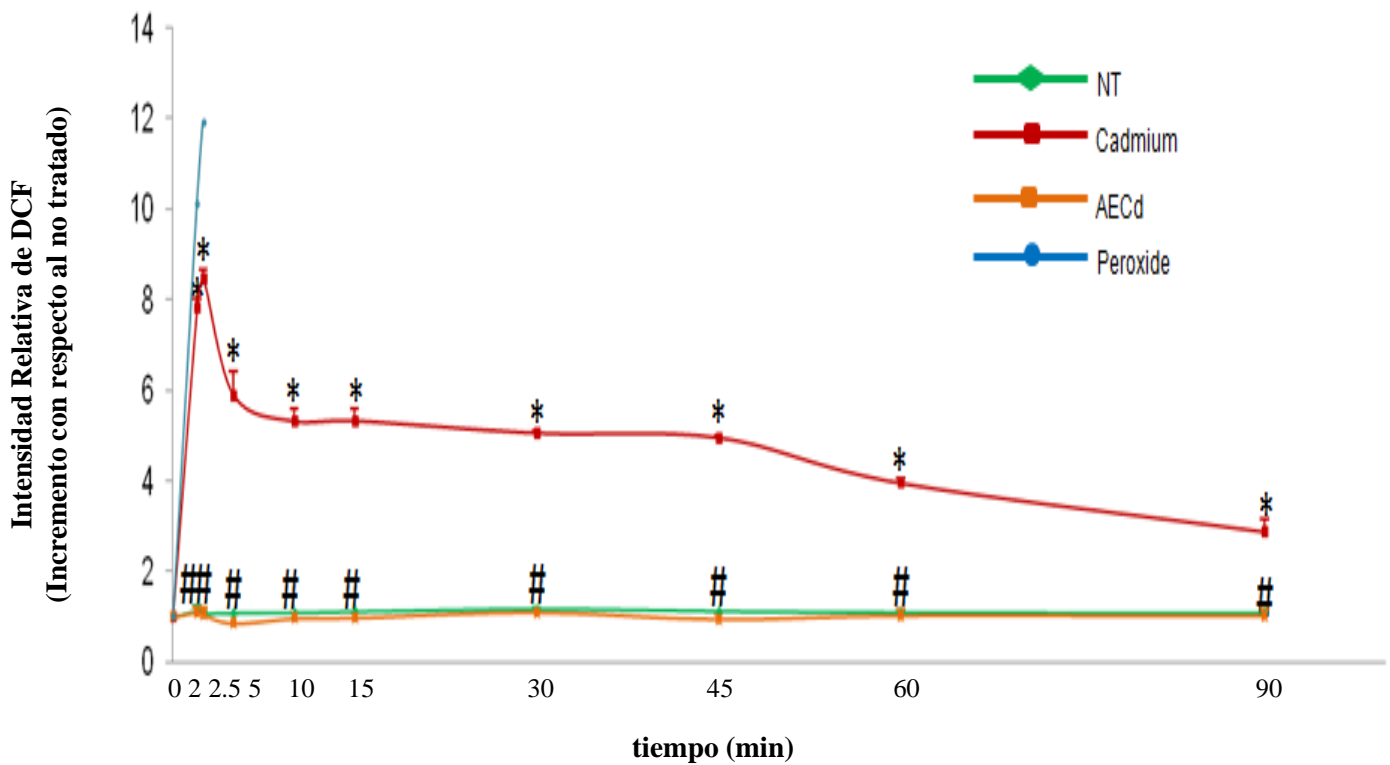


Figura 9. Generación de ERO y la participación de NADPH oxidasa como fuente de ERO. El ensayo se dividió en tres grupos: 1. Hepatocitos no tratados (NT), 2. Hepatocitos expuestos a 5 μM de CdCl_2 por diferentes tiempos (0, 2, 2.5, 5, 10, 15 30, 45, 60 y 90 min), 3. Hepatocitos pre tratados con 1 μM de AEBSF (Inhibidor de la NADPH oxidasa) por 30 min y seguido de 5 μM de CdCl_2 (AECd) y 4. Hepatocitos tratados con 250 μM de peróxido de hidrógeno como control positivo de la técnica. Para evaluar la formación intracelular de ERO y la fuente de estas en presencia de Cd, se determinó con la oxidación de la molécula fluorescente DCFH. La intensidad de fluorescencia fue detectada con 503 nm de excitación y 529 nm de emisión en un Multimode Detector (DTX880, Beckman Coulter). La producción de ERO fue expresada como el incremento de fluorescencia con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (*) o a los tratados con cadmio (Cd) (#).

6.3 ACTIVIDAD DE LA NADPH OXIDASA EN PRESENCIA DE CADMIO

En células expuestas a concentraciones bajas de Cd se propone que la generación de ERO es vía la NADPH oxidasa, así que para corroborar el papel de la esta enzima como fuente de ERO en nuestro modelo se evaluó la actividad de la NADPH oxidasa. Los hepatocitos fueron tratados por diferentes tiempos con CdCl₂. La actividad se determinó como el consumo de NADPH inhibido con DPI y usando el coeficiente de extinción (6.22 mM⁻¹) para calcular la cantidad de NADPH consumido. En la figura 10 se muestra que desde los 2 min la actividad de la oxidasa comienza a ser significativa y a los 2.5 min se encuentra su máxima actividad con un valor de 6.82 veces más con respecto a las células no tratadas (NT) Este resultado nos demuestra que el Cd es capaz de activar a la NADPH oxidasa como fuente de ERO.

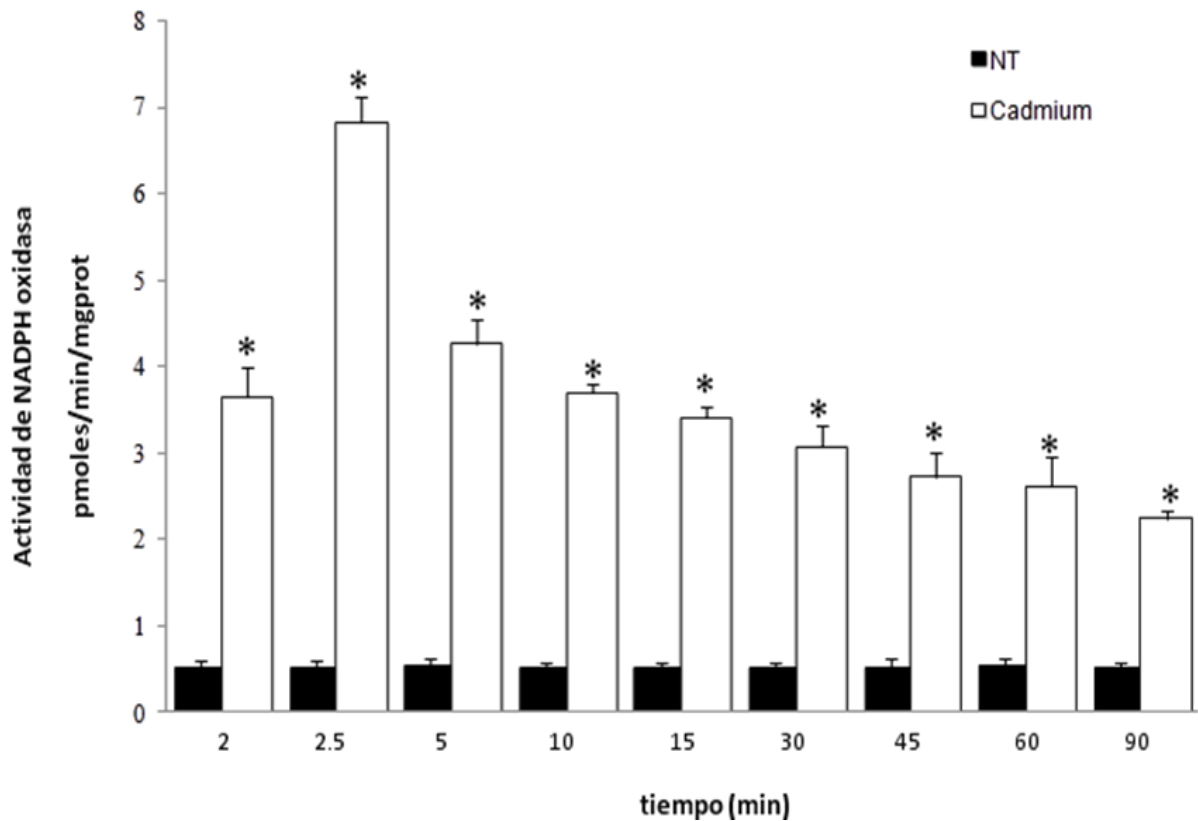


Figura 10. La actividad de la NADPH oxidasa en presencia de cadmio. Los hepatocitos se expusieron a 5 μM de CdCl_2 por diferentes tiempos que comprendieron 2, 2.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 90 min (Barras blancas) y como controles los hepatocitos no tratados (NT) (Barras negras). La actividad se determinó como el consumo de NADPH. Para conocer la participación de la NADPH oxidasa debida al tratamiento con Cd su actividad fue inhibida con DPI. Finalmente se usó el coeficiente de extinción (6.22 mM^{-1}) para calcular la cantidad de NADPH consumido. Los resultados fueron expresados como pmoles de NADPH oxidado por minuto por miligramo de proteína. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes ($n=3$). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p<0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*).

6.4 FOSFORILACIÓN A NIVEL DE TIROSINA DEL FACTOR STAT3 EN HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

El efecto del Cd en la fosforilación del factor de transcripción Stat3 en tirosina 705, se evaluó en hepatocitos expuestos a 5 μM de CdCl_2 por diferentes tiempos de incubación (0, 30, 120 y 180 min) y se determinó por la técnica de Western blot utilizando el anticuerpo específico para pStat3(Tyr705), Stat3 y actina como proteína de normalización. En la figura 11 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 los 5 min comienza a ser significativa la fosforilación del Stat3 en tirosina, manteniéndose hasta las 3 h, se presenta un incremento máximo de 2.45 veces más con respecto a las células no tratadas (NT).

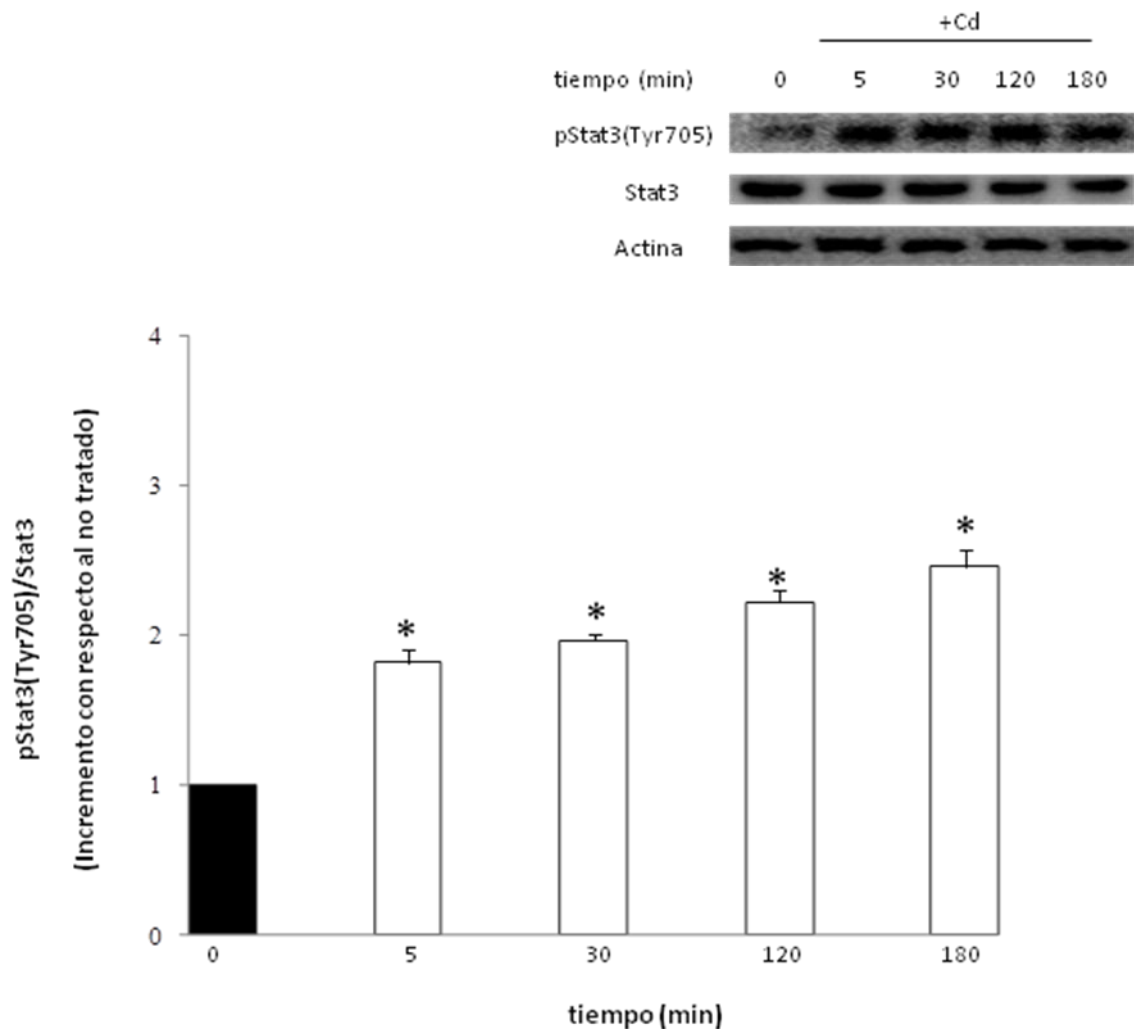


Figura 11. Fosforilación del factor de transcripción pStat3(Tyr705) inducida por él cadmio. Los hepatocitos fueron tratados con 5 μ M de CdCl₂ por diferentes tiempos (0, 5, 30, 120 y 180 minutos) para evaluar si el Cd es capaz de activar al factor Stat3 a nivel de tirosina. La activación de Stat3 fue analizada con la técnica de Western blot, usando el anticuerpo para pStat3(Tyr705) para la inmunodetección. El resultado se obtuvo del análisis densitométrico de pStat3(Tyr705) y se expresó como el incremento de la activación del factor de transcripción con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*).

6.5 PARTICIPACIÓN DE LA NADPH OXIDASA EN LA ACTIVACIÓN A NIVEL TIROSINA DEL FACTOR STAT3

La participación de la NADPH oxidasa como fuente de ERO en la activación del factor Stat3 se determinó en hepatocitos pre tratados por 30 min con el inhibidor de NADPH oxidasa (AEBSF). Posteriormente se les agregó Cd por 2 h para pStat3(Tyr705). Para determinar esto se utilizó la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para pStat3(Tyr705), Stat3 y actina como proteína normalización. En la figura 12 se muestra el resultado para pStat3(Tyr705) encontrado en una disminución significativa de 66.45% con respecto a los hepatocitos tratados con sólo Cd. Sugiriendo la participación de NADPH oxidasa en la activación de Stat3 ante el Cd.

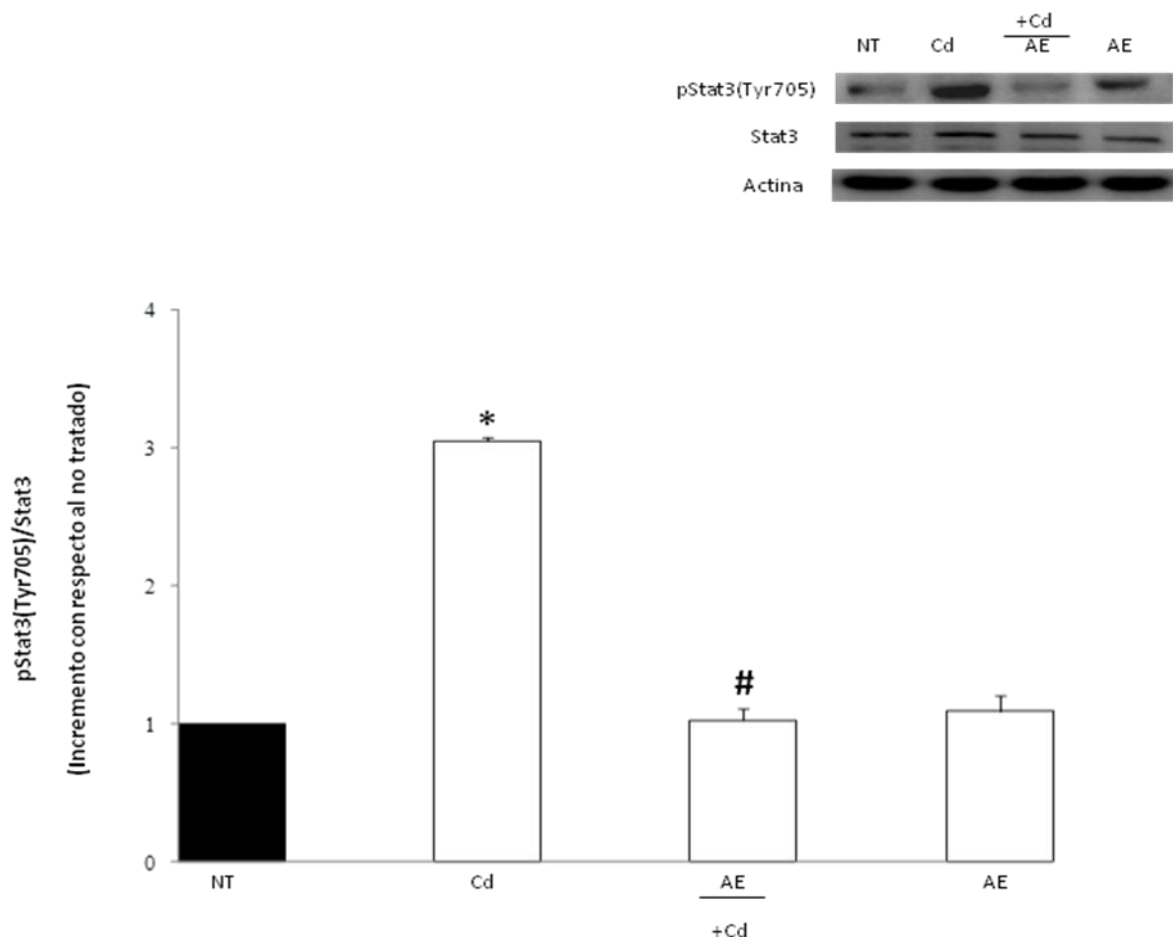


Figura 11. Participación de la NADPH oxidasa en la activación del factor Stat3 debida al tratamiento con cadmio. El cultivo primario de hepatocitos fueron pre tratados con el inhibidor de la NADPH oxidasa (AEBSF) por 30 min y posteriormente con 5 μ M de CdCl₂ por 2h para determinar el papel de NADPH oxidasa en la activación del factor Stat3 en presencia de Cd. Se determinó la activación de Stat3 en tirosina con Western blot usando el anticuerpo de pStat3(Tyr705) y se expresó como el incremento de la activación del factor de transcripción con respecto al no tratado. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de p<0.05 con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#). La imagen del Western blot es representativa.

6.6 PARTICIPACIÓN DE LAS ERO EN LA ACTIVACIÓN DE STAT3

Se sabe que el factor Stat3 es sensible a ERO, así que para estudiar la participación de estas ERO generadas por el cadmio en la fosforilación a nivel de tirosina de Stat3, los hepatocitos fueron pre tratados por 30 minutos con 0.5 mg/ml de catalasa pegilada (pCAT), posteriormente se les agregó 5 μ M de CdCl₂ por 2h para pStat3(Tyr705), el tiempo se determinó con respecto a su cinética de activación. Este resultado se obtuvo con la técnica de Western blot, utilizando el anticuerpo específico para pStat3(Tyr705), Stat3 y actina como proteína de normalización. El resultado se muestra en la figura 13, observándose una disminución significativa de 55.56% en los hepatocitos pre tratados con la pCAT con respecto a los que solo se trataron con cadmio y para descartar que el antioxidante por sí sólo activa al factor Stat3 se trataron a los hepatocitos con solo el antioxidante, encontrándose un valor similar a las células no tratadas (NT). Este resultado sugiere que las ERO participan en la cascada de activación del factor Stat3.

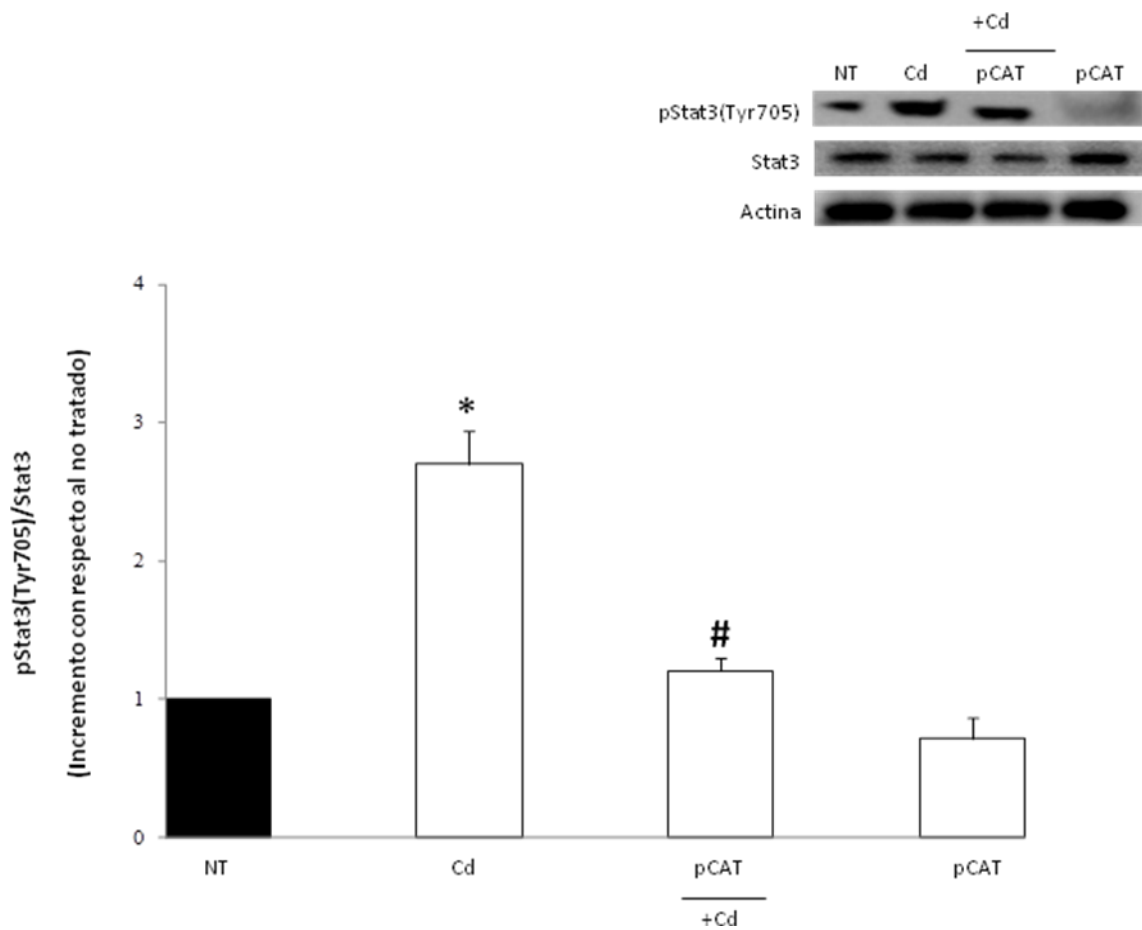


Figura 13. Efecto del tratamiento con un agente antioxidante sobre la fosforilación en tirosina del factor de transcripción Stat3 en presencia de cadmio. El cultivo primario de hepatocitos fue pre tratado con un antioxidante (pCAT) por 30 min y posteriormente con 5 μM de CdCl_2 por 2 h, para evaluar que la activación del factor Stat3 en presencia en Cd es sensible a ERO. La fosforilación de Stat3 se analizó con la técnica de Western blot. El resultado se graficó como el incremento de la activación del factor de transcripción con respecto al no tratado. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes ($n=3$). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p<0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#). La imagen del Western blot es representativa.

6.7 FOSFORILACIÓN EN SERINA DEL FACTOR STAT3 EN HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

Se evaluó la capacidad del Cd en inducir la fosforilación a nivel de serina del factor de transcripción Stat3, en hepatocitos expuestos a 5 μM de CdCl_2 por diferentes tiempos de incubación (0, 30, 60, 120 y 180 min) y se determinó por la técnica de Western blot utilizando el anticuerpo específico para pStat3(Ser727), Stat3 y actina como proteína de normalización. En la figura 14 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 los 60 min comienza a ser significativa la fosforilación del Stat3 en serina, con un valor de 1.66 veces más que las células no tratadas (NT), sin embargo su máxima de activación es a las 2 h con un valor de 2.96 veces más.

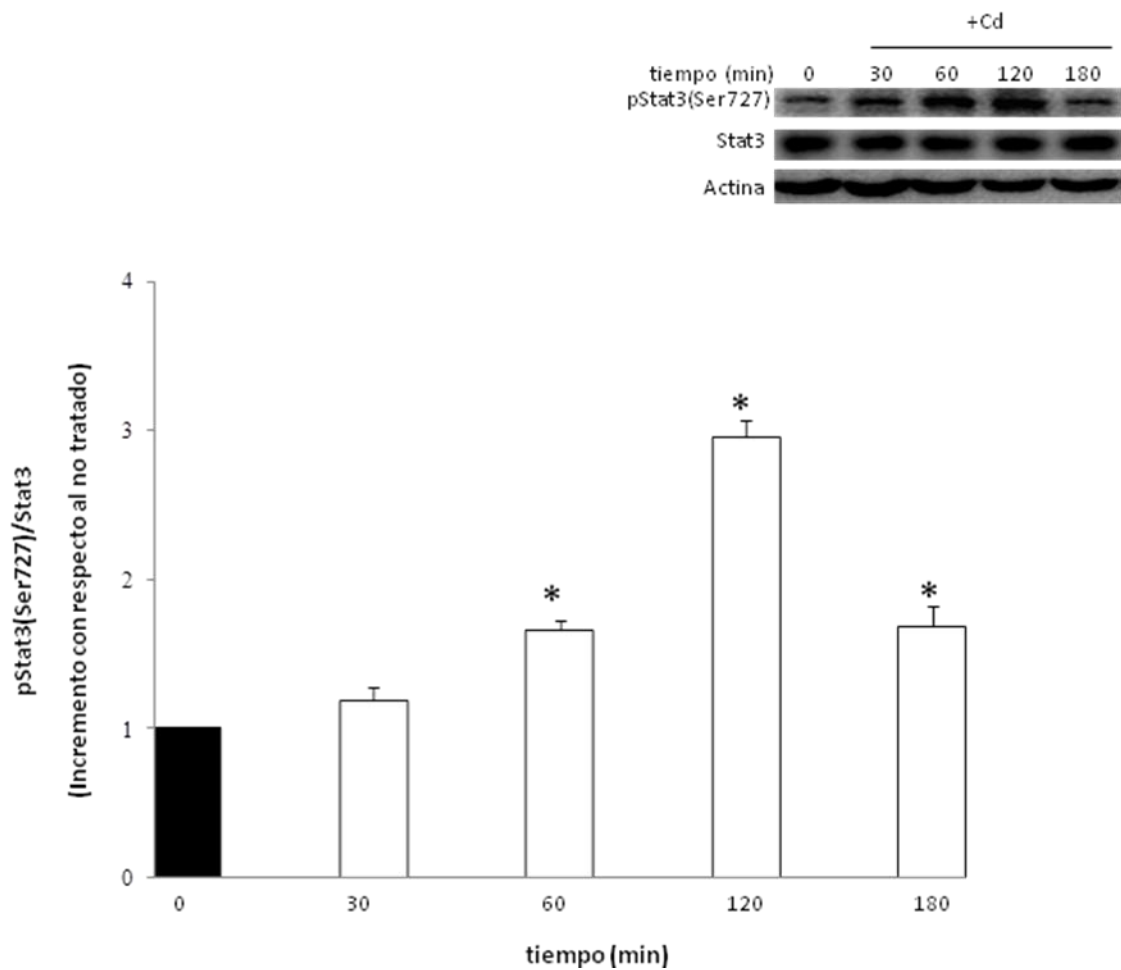


Figura 14. Efecto del cadmio en la fosforilación en serina del factor de transcripción Stat3. Se expuso el cultivo de hepatocitos a 5 μM de CdCl_2 por diferentes tiempos (0, 30, 60, 120 y 180 min) de exposición. Se determinó la fosforilación a nivel de serina del factor Stat3 en presencia de Cd utilizando la técnica de Western blot. El resultado se obtuvo del análisis densitométrico de pStat3(Ser727) y se expresó como el incremento de la activación del factor de transcripción con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*). La imagen del Western blot es representativa.

6.8 FOSFORILACIÓN A NIVEL DE SERINA DE STAT3 MEDIADA POR NADPH OXIDASA

Para determinar el papel de la NADPH oxidasa como fuente de ERO en la activación de Stat3 en serina, se pre trataron a los hepatocitos por 30 min con el inhibidor de NADPH oxidasa (AEBSF), posteriormente se les agregó Cd por 2 h. Para determinar esto se utilizó la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para pStat3(Ser727), Stat3 y actina como proteína normalización. En la figura 15 se muestra el resultado para pStat3(Ser727) encontrado una disminución significativa de un 64.17% con respecto a los hepatocitos sin él inhibidor. Sugiriendo la participación de NADPH oxidasa en la activación de Stat3 ante el Cd.

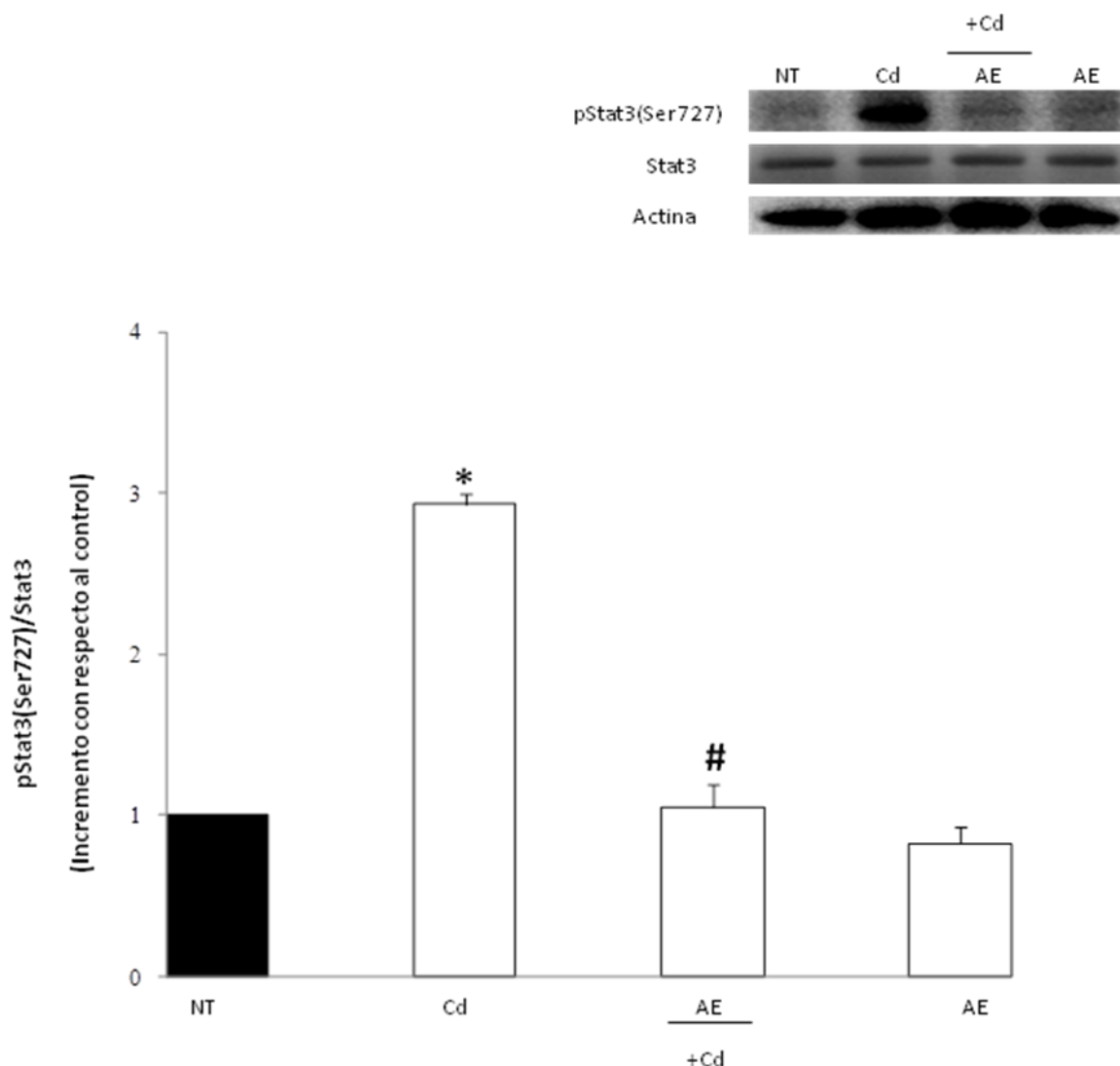


Figura 15. Participación de la NADPH oxidasa en la fosforilación en serina del factor Stat3 en hepatocitos tratados con cadmio. Los hepatocitos se pre trataron con el inhibidor de la NADPH oxidasa (AEBSF) por 30 min y posteriormente con 5 μ M de CdCl₂ por 2h, para evaluar a la NADPH oxidasa como parte de la cascada en la fosforilación a nivel de serina del factor de transcripción Stat3, utilizando la técnica de Western blot. La imagen del Western blot es representativa y cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de p<0.05 con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#).

6.9 LAS ERO COMO MEDIADORAS EN LA FOSFORILACIÓN A NIVEL DE SERINA DEL FACTOR STAT3

Las ERO han sido consideradas como mediadoras en rutas de señalización para activar factores de transcripción como Stat3 que es sensible a ellas, así que para estudiar la participación de estas ERO generadas por el cadmio en la fosforilación a nivel de serina de Stat3, los hepatocitos fueron pretratados por 30 min con 0.5 mg/ml de catalasa pegilada (pCAT), posteriormente se les agregó 5 μM de CdCl_2 por 2h, el tiempo se determinaron con respecto a su cinética de activación. Este resultado se obtuvo con la técnica de Western blot, utilizando el anticuerpo específico para pStat3(Ser727), Stat3 y actina como proteína de normalización. El resultado se muestra en la figura 16, observándose una disminución significativa de 74.04% con respecto a los hepatocitos que sólo se trataron con cadmio y para descartar que el antioxidante por sí sólo activa al factor Stat3 se trataron a los hepatocitos con solo el antioxidante, encontrándose un valor similar a los hepatocitos no tratados (NT). Este resultado sugiere que las ERO participan en la cascada de activación del factor Stat3.

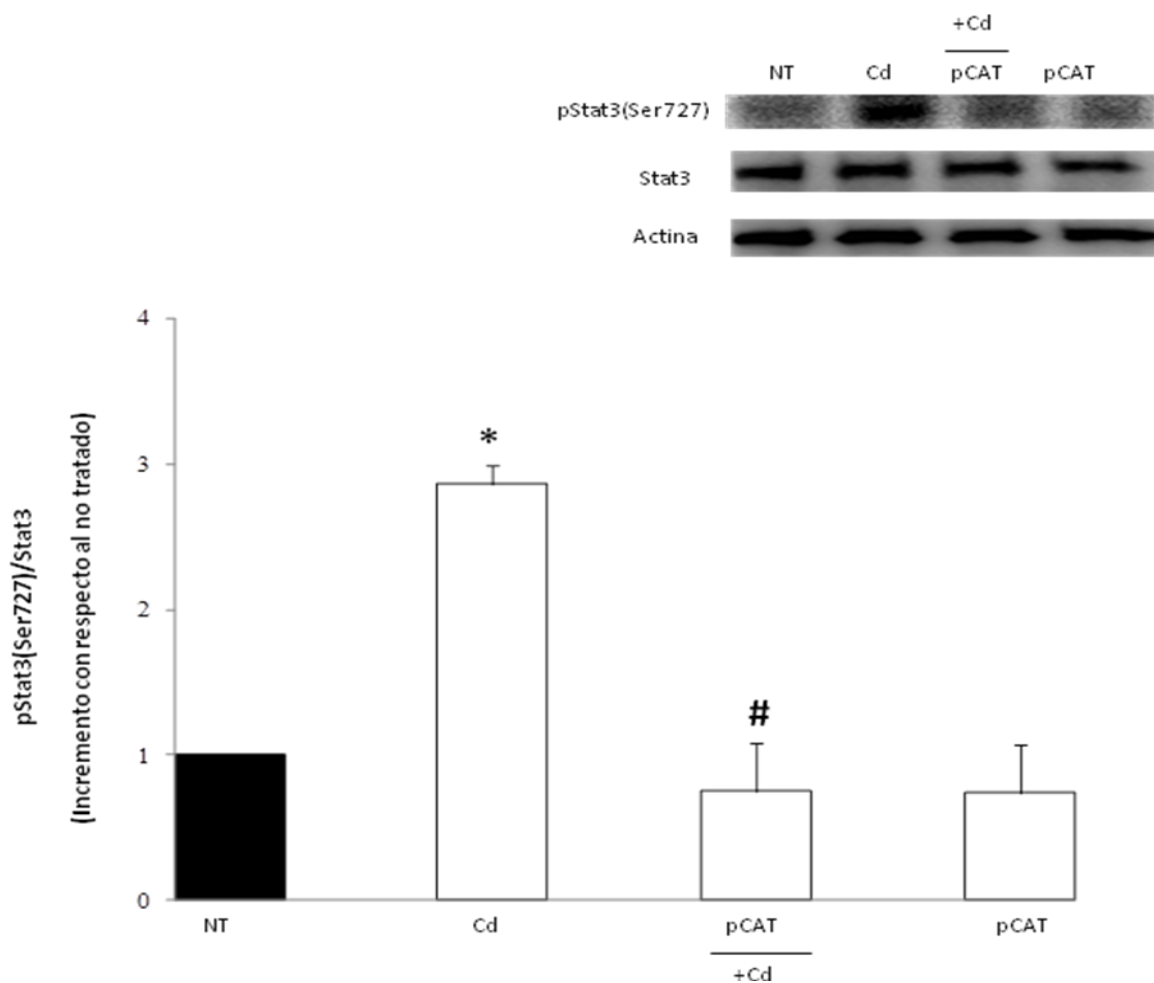


Figura 16. Participación de las ERO en la fosforilación en serina del factor de transcripción Stat3 en hepatocitos tratados con cadmio. Para evaluar la participación de las ERO como mediadoras en la activación del factor Stat3 a nivel de serina los hepatocitos primarios fueron pre tratados con 0.5 mg/ml de catalasa conjugada con polietilenglicol (pCAT) como antioxidante por 30 min, seguido de 5 μ M de CdCl₂ por 2 h, tiempo que se eligió de la cinética de activación del factor Stat3 mostrada en la figura 14. Se utilizó proteína total para la técnica de Western blot y se determinó por densitometría el incremento de la activación del factor Stat3 con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#). La imagen del Western blot es representativa.

6.10 CINÉTICA DE ACTIVACIÓN DE LA CINASA SRC

La activación de la Src se determinó ya que se ha descrito que esta cinasa es capaz de activar al factor Stat3 y por otra parte transactivar al EGFR, por ello se obtuvo su cinética de fosforilación al tratar a los hepatocitos con CdCl₂ por diferentes tiempos que comprendieron desde 0, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 120 y 180 min. Se determinó la activación de la cinasa Src por la técnica de Western blot utilizando el anticuerpo específico para pSrc(Tyr418), Src y actina como proteína de normalización. En la figura 17 se observa que a partir de los 3 min comienza a ser significativa la fosforilación de Src y se presenta a los 5 min un incremento máximo de 2.25 veces más con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) y a partir de los 10 min disminuye sin dejar significativa.

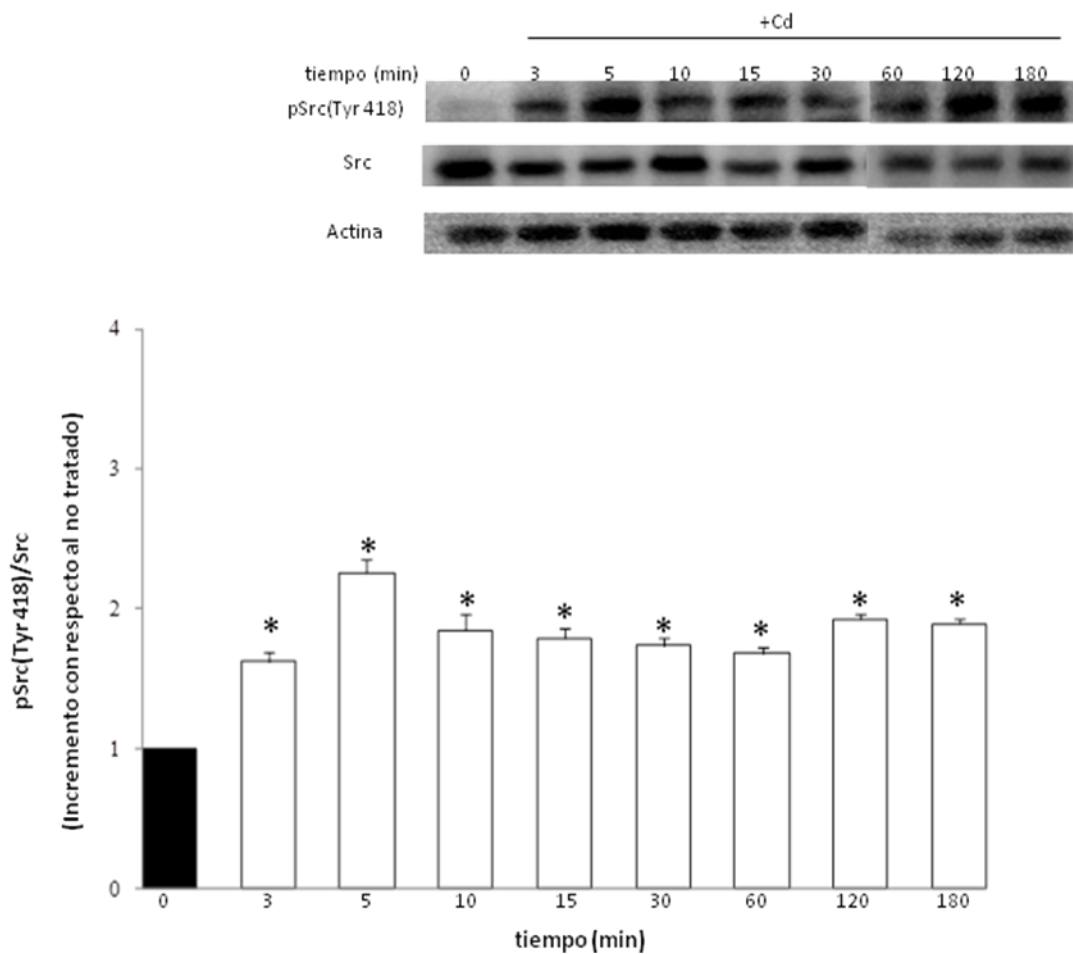


Figura 17. Activación de la cinasa Src en cultivo primario de hepatocitos expuestos a cadmio. Se trató el cultivo de hepatocitos con 5 μ M de CdCl₂ por diferentes tiempos (0, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 min). Y por la técnica de Western blot se evaluó la activación de la cinasa Src en presencia de cadmio, usando el anticuerpo específico para pSrc(Tyr418) y se realizó un análisis densitométrico para graficar el resultado como el incremento de la activación de Src con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*).

6.11 PARTICIPACIÓN DE LA NADPH OXIDASA Y DE LAS ERO EN LA ACTIVACIÓN DE SRC

Se conoce que la cinasa Src es sensible a las ERO provenientes de la NADPH oxidasa, así que para determinar la participación tanto de ERO como de la oxidasa en la activación de Src los hepatocitos fueron pre tratados por 30 min con el inhibidor de NADPH oxidasa AEBSF a 1 μ M y con 0.5 mg/ml de catalasa pegilada (pCAT) como antioxidante, posteriormente se le agregó al cultivo 5 μ M de CdCl₂ por 5 min. Estos resultados se obtuvieron con la técnica de Western blot usando el anticuerpo específico para pSrc(Tyr418), Src y actina como se muestra en la figura 18 hay una disminución significativa del 49.78% cuando se inhibe la NADPH oxidasa y en figura 19 cuando se utiliza el antioxidante encontramos una disminución del 39.74% con respecto a los hepatocitos sin inhibidor ni antioxidante. Estos resultados sugieren la participación de la NADPH oxidasa como fuente de ERO a las que Src es sensible para su activación.

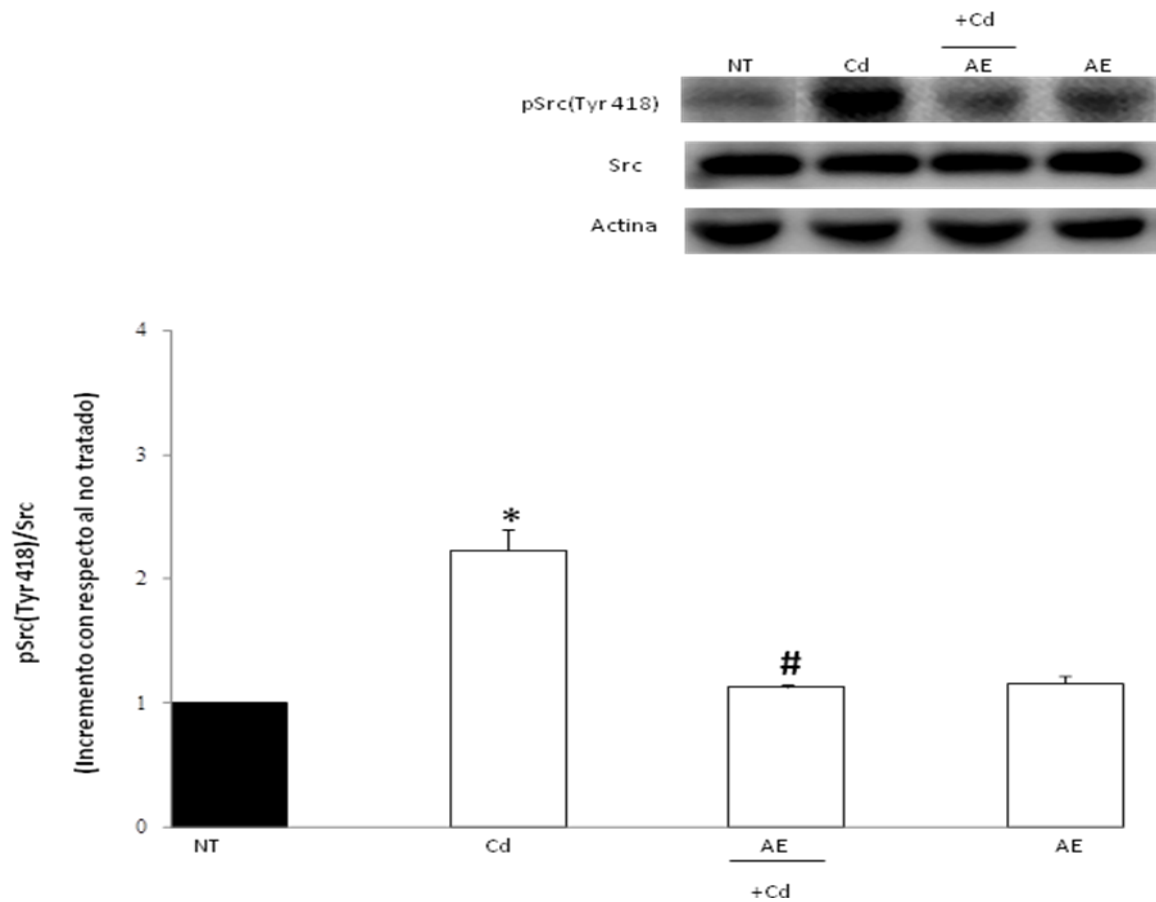


Figura 18. Participación de la NADPH oxidasa en la activación de Src en hepatocitos tratados con cadmio. Los hepatocitos fueron pre tratados con el inhibidor de la NADPH oxidasa (AEBSF) a 1 μ M por 30 min. Posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 5 min. Para evaluar a la NADPH oxidasa como parte de la cascada de fosforilación de Src en presencia de cadmio. El resultado se determinó utilizando proteína total para la técnica de Western blot, usando el anticuerpo de pSrc(Tyr418) y el resultado se gráfico como el incremento de la activación de Src con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#)

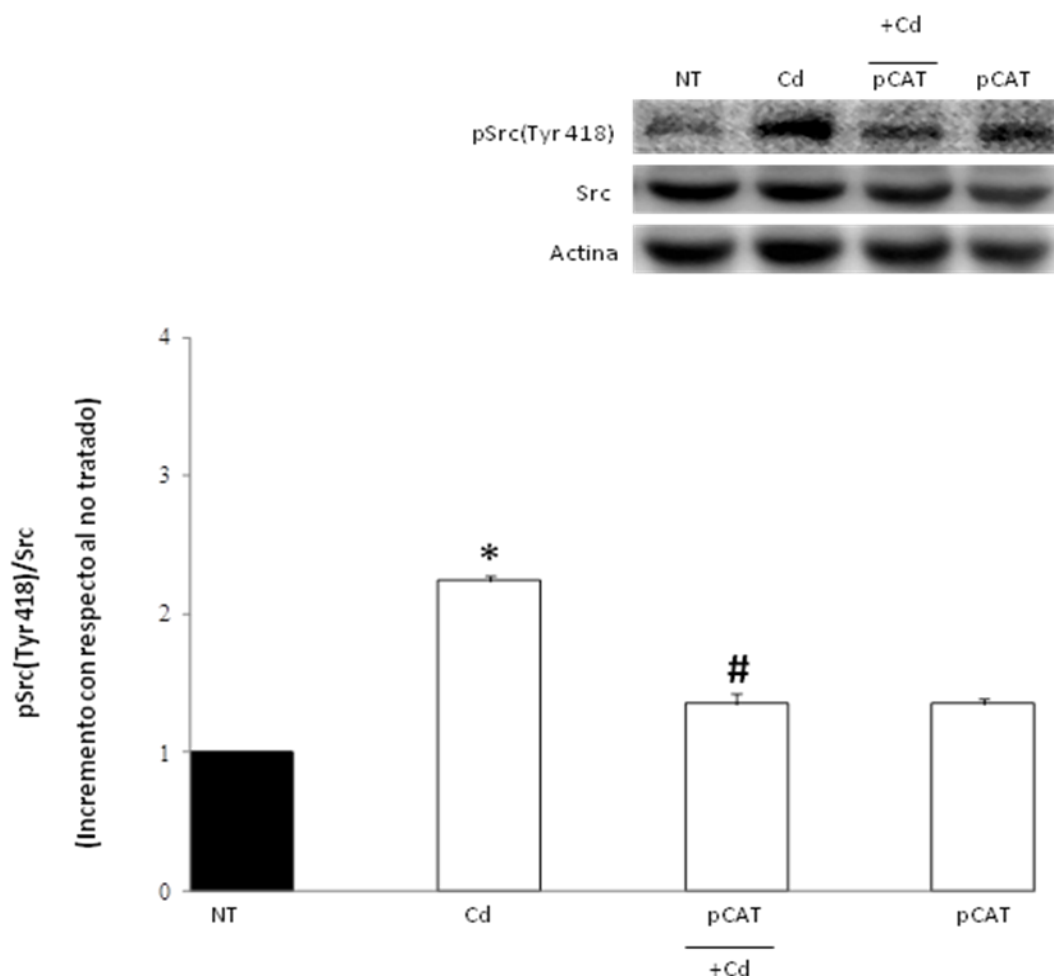


Figura 19. Papel de las ERO en la activación de Src en presencia de cadmio.

Para determinar la participación de las ERO como mediadoras en la activación de Src, el cultivo de hepatocitos fue pre tratado con 0.5 mg/ml de catalasa conjugada con polietilenglicol (pCAT) como antioxidante por 30 min, seguido de 5 μ M de CdCl₂ por 5 min. El resultado se determinó utilizando proteína total para la técnica de Western blot, usando el anticuerpo de pSrc(Tyr418) y el resultado se gráfico como el incremento de la activación de Src con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#).

6.12 ACTIVACIÓN DEL EGFR EN HEPATOCITOS TRATADOS CON CADMIO

El efecto del Cd en la activación del EGFR, se evaluó tratando a los hepatocitos con CdCl₂ a una concentración de 5 µM por diferentes tiempos (0,1, 2 y 3 h) y se determinó por Western blot con anticuerpos específicos para pEGFR(Tyr845), EGFR y actina como proteína de normalización. En la figura 20 se muestra el resultado y se expresa como el incremento de la fosforilación del receptor con respecto a los hepatocitos no tratados y se observa que a partir de la hora comienza a ser significativa con un valor de 1.83 veces y aumenta con respecto al tiempo de exposición. Este resultado demuestra que el Cd es capaz de activar al EGFR.

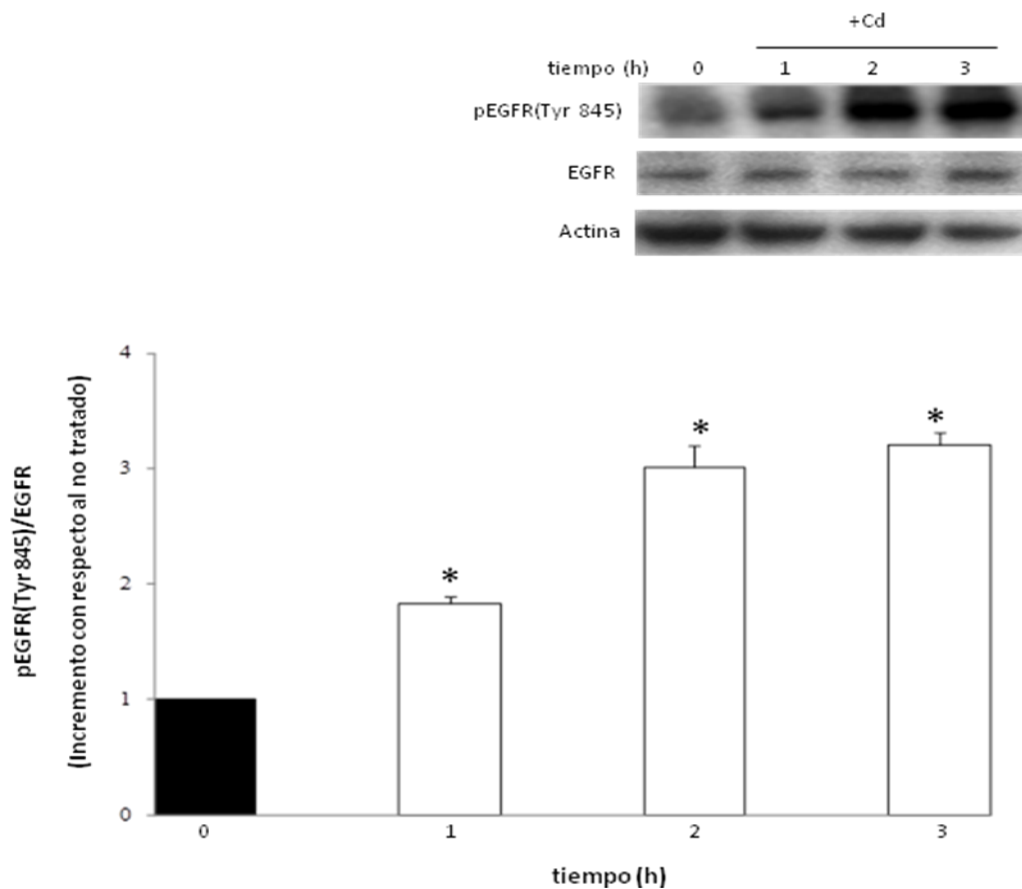


Figura 20. Activación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) en respuesta al tratamiento con cadmio. Los hepatocitos se trataron con 5 μM de CdCl_2 por diferentes tiempos (0, 1, 2 y 3 h). Se analizó por Western blot la activación del EGFR en presencia de cadmio, usando el anticuerpo específico para pEGFR(Tyr845) y se realizó un análisis densitométrico para graficar el resultado como el incremento de la activación del EGFR con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes ($n=3$). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p<0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*). La imagen del Western blot es representativa.

6.13 PARTICIPACIÓN DE LA NADPH OXIDASA EN LA FOSFORILACIÓN DEL EGFR

Se evaluó el papel de la NADPH oxidasa en la activación de EGFR como parte de la cascada de activación del factor Stat3, para ello los hepatocitos se pre trataron por 30 min con el inhibidor de NADPH oxidasa (AEBSF) y posteriormente se les agregó Cd por 2 h. Para determinarlo se utilizó la técnica de Western blot, En la figura 21 se muestra que el pre tratamiento de ABSF, disminuyó significativamente la fosforilación del EGFR un 61.88 % con respecto a los hepatocitos sin él inhibidor. El resultado sugiere que la oxidasa está participando en la transactivación del EGFR.

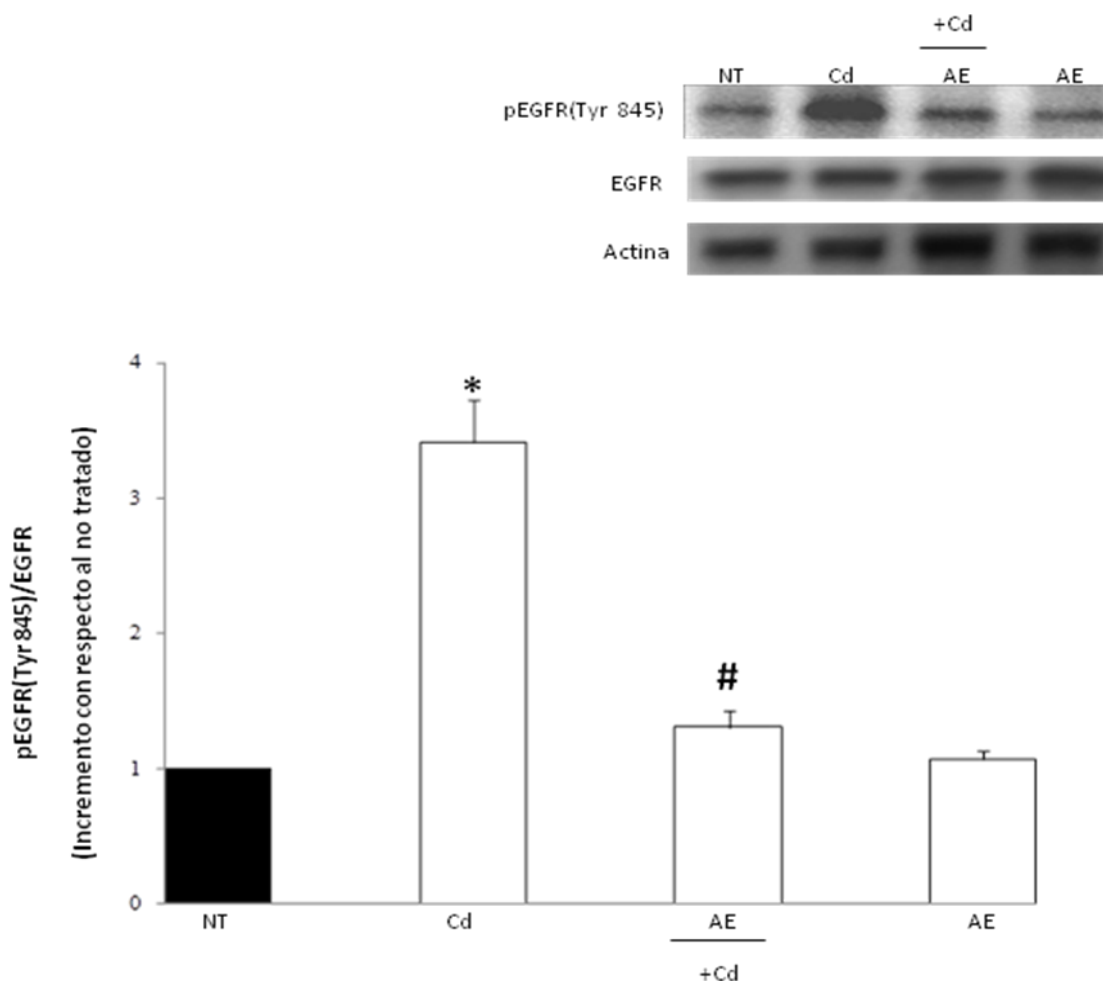


Figura 21. Papel de la NADPH oxidasa en la activación del EGFR en presencia de cadmio. Los hepatocitos fueron pre tratados con el inhibidor de la NADPH oxidasa (AEBSF) a 1 μ M por 30 min. Posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 2 h. Para evaluar la participación de la NADPH oxidasa en la cascada de fosforilación del EGFR en presencia de cadmio. El resultado se determinó utilizando proteína total para la técnica de Western blot, usando el anticuerpo de pEGFR(Tyr845) y el resultado se gráfico como el incremento de la activación del EGFR con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de p<0.05 con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#). La imagen del Western blot es representativa.

6.14 PARTICIPACIÓN DE LA CINASA SRC EN LA TRANSACTIVACIÓN DEL EGFR

Para determinar la participación de la cinasa Src, en la activación de EGFR como parte de la cascada de activación del factor Stat3, los hepatocitos fueron pre tratados por 30 min con el inhibidor a 10 μ M de SU6656 para Src. Posteriormente se les agregó Cd por 2 h, tiempo que se determinó con la activación presentada del EGFR . Se determinó con la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para pEGFR(Tyr845), EGFR y actina como proteína normalización. En la figura 22 se muestra el resultado y se expresa como el incremento en la fosforilación del EGFR en los hepatocitos tratados con Cd con respecto a las células no tratadas (NT). El pre tratamiento con el inhibidor de Src (SU6656), disminuyó la fosforilación del EGFR un 35.21 % con respecto a los hepatocitos tratados con Cd. El resultado propone que Src están participando en la transactivación del EGFR.

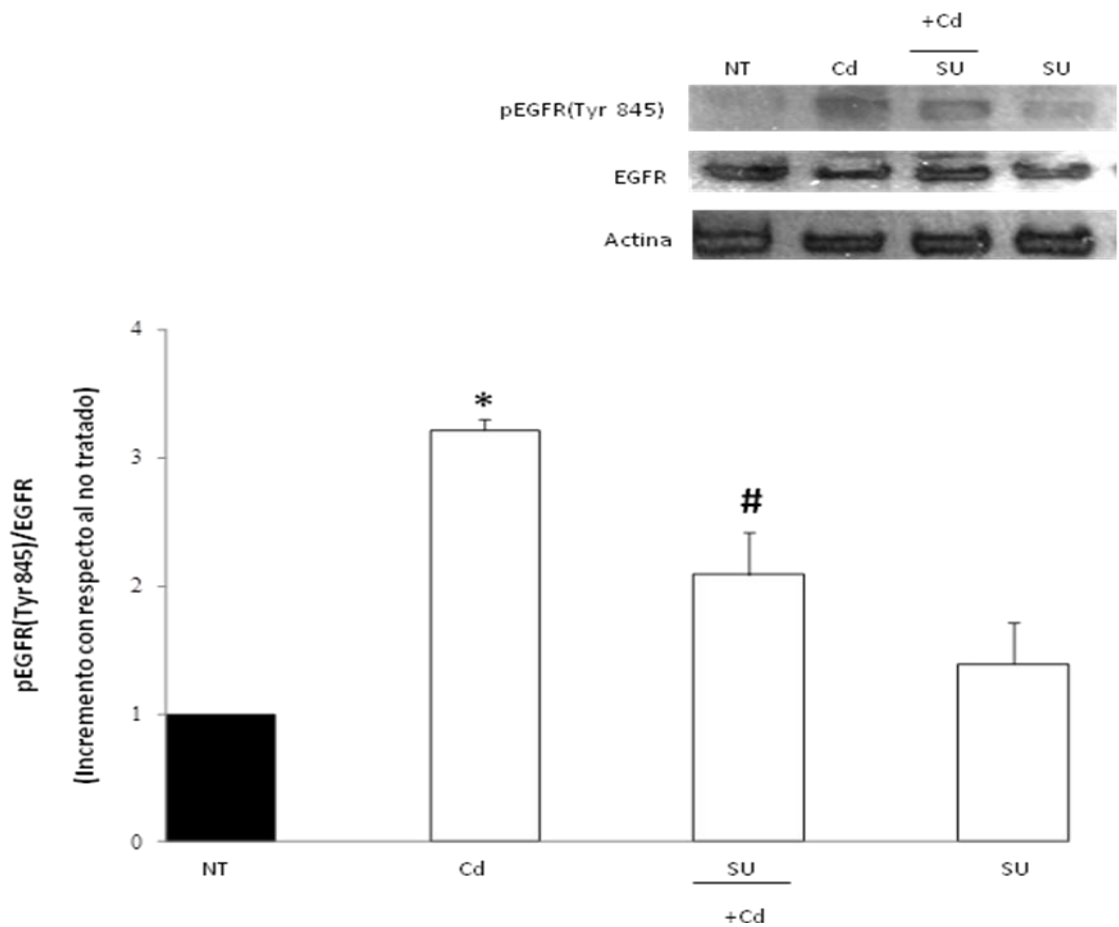


Figura 22. La cinasa Src y su participación en la transactivación del EGFR en presencia de cadmio. Los hepatocitos fueron pre tratados con el inhibidor de la cinasa Src (SU6656) a 10 μ M por 30 min. Posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 2 h. Para evaluar la participación de Src en la transactivación del EGFR en presencia de cadmio. El resultado se determinó utilizando proteína total para la técnica de Western blot, usando el anticuerpo de pEGFR(Tyr845) y el resultado se gráfico como el incremento de la activación del EGFR con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#). La imagen del Western blot es representativa.

6.15 INTERACCIÓN DE LA CINASA SRC CON EL EGFR

La participación directa de Src en la transactivación del EGFR, se determinó en hepatocitos de ratón se tratados con 5 μM CdCl_2 por 2 h. Con la técnica de inmunoprecipitación se precipitó Src usando su anticuerpo específico y se marcó el inmunoblot con el anticuerpo de EGFR. El resultado se muestra en la figura 23 se observa una clara relación Src con EGFR, sugiriendo participación directa de Src en la transactivación del receptor.

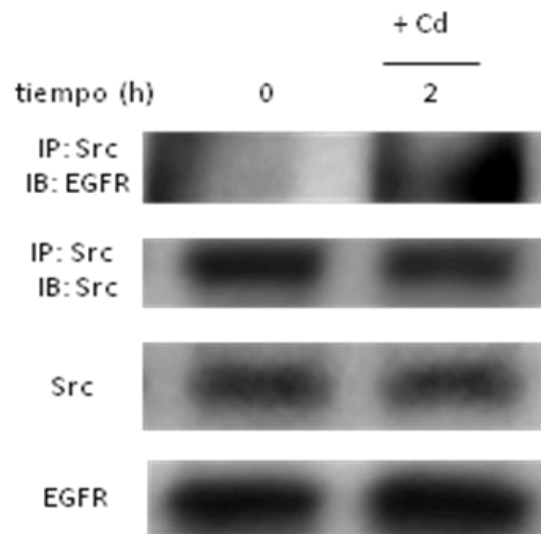


Figura 23. Interacción de la cinasa Src con el EGFR en presencia de cadmio.

Los hepatocitos se trataron con 5 μM de CdCl_2 por 2 h para determinar la participación directa de Src en la transactivación del EGFR, utilizando proteína total para la inmunoprecipitación con el anticuerpo específico de Src y el de EGFR para el inmunoblot. La imagen de la inmunoprecipitación es representativa de tres experimentos independientes.

6.16 PARTICIPACIÓN DE LA CINASA SRC Y DEL EGFR EN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR STAT3

Para determinar la participación del EGFR y Src, en la fosforilación de Stat3, los hepatocitos fueron pre tratados por 30 min con los inhibidores respectivos; 3nM de Ag1478 para EGFR y 10 μ M SU6656 para la cinasa Src. Posteriormente se les agregó 5 μ M de CdCl₂ y se dejaron incubar 2 h. Este tiempo se escogió de acuerdo a las cinéticas de activación tanto para tirosina como en serina de las figuras 6 y 9. La fosforilación de Stat3 se determinó con la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para pStat3(Tyr705), pStat3(Ser727), Stat3 y actina como proteína de normalización. En la figura 24 se muestra que el pre tratamiento con el inhibidor para la cinasa Src (Su6656) disminuye la fosforilación de pStat3(Tyr705) en un 63.15% y con el inhibidor de EGFR (AG1478) un 65.87% con respecto a los hepatocitos tratados con Cd. En la figura 25 la fosforilación de pStat3(Ser727) disminuye con el inhibidor para la cinasa Src (Su6656) un 69.58% y con el inhibidor de EGFR (AG1478) un 66.67 % con respecto a los hepatocitos tratados con Cd. Y como controles de que los inhibidores por sí solos no tienen ningún efecto sobre la activación de Stat3, se trataron los hepatocitos con solo los inhibidores. Estos resultados sugieren que la activación de Stat3 es mediada por Src, EGFR.

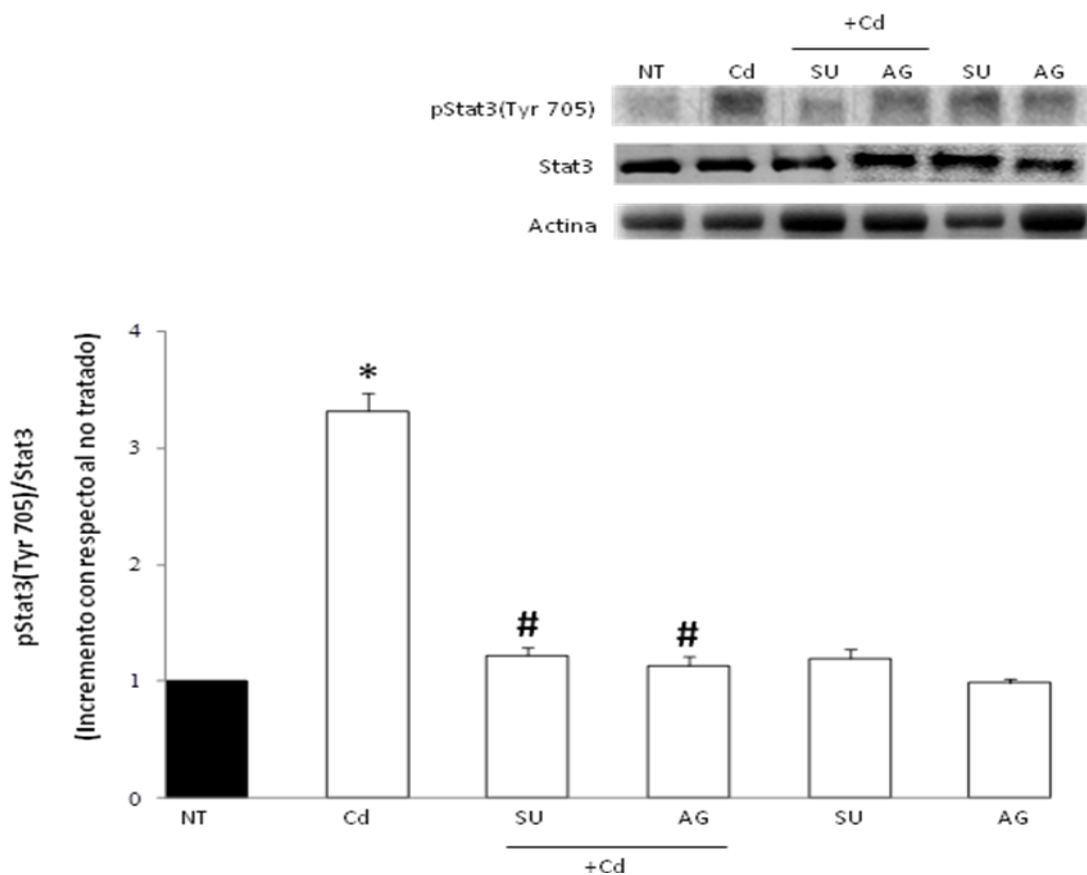


Figura 24. Participación de la cinasa Src y el EGFR en la activación de Stat3 en tirosina en presencia de cadmio. Los hepatocitos fueron pre tratados con 10 μ M del inhibidor SU6656 para Src y 3 nM del inhibidor Ag1478 para EGFR por 30 min y posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 2 h. Para determinar la participación de vía Src-EGFR en la activación de Stat3 en presencia de cadmio. El resultado se determinó utilizando proteína total para la técnica de Western blot, usando el anticuerpo de pStat3(Tyr705) y el resultado se gráfico como el incremento de la activación del factor Stat3 con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#). La imagen del Western blot es representativa.

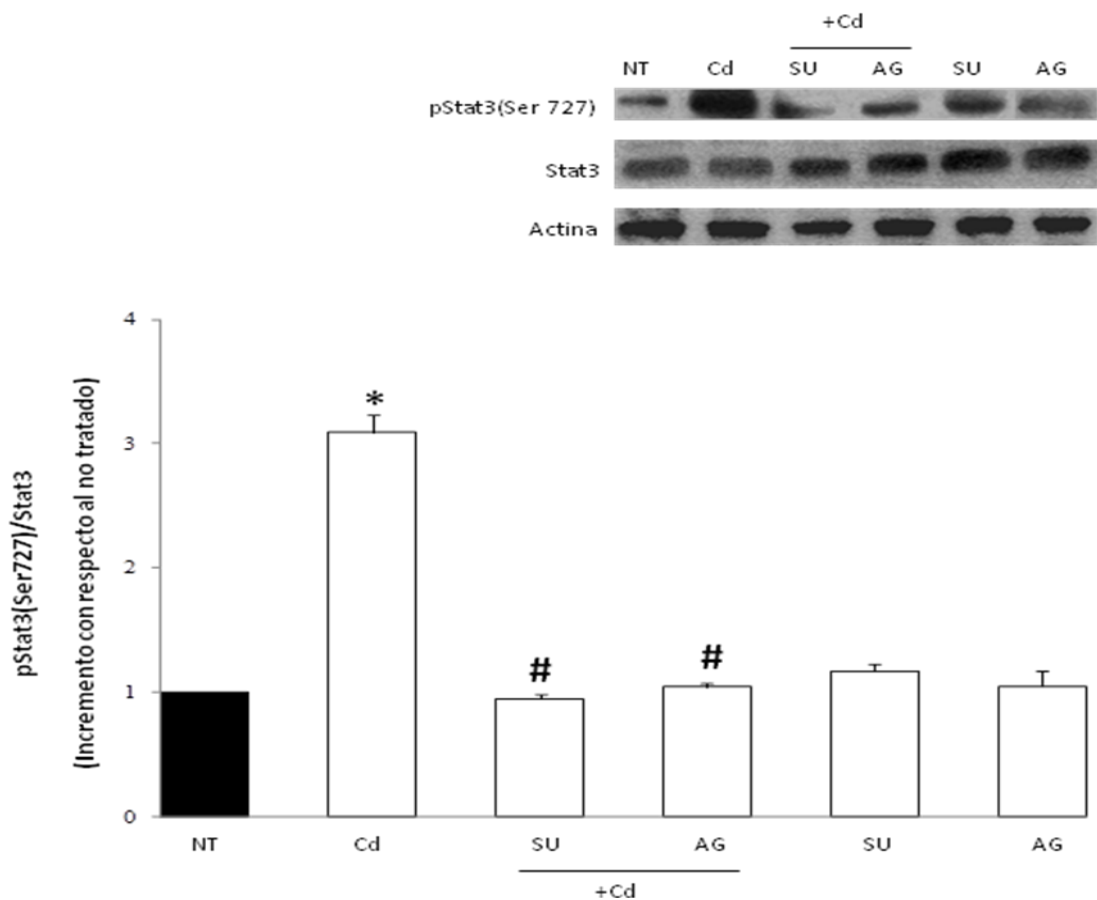


Figura 25. Papel de la cinasa Src y el EGFR en la fosforilación en serina de Stat3 en presencia de cadmio. Los hepatocitos fueron pre tratados con 10 μ M del inhibidor SU6656 para Src y 3 nM del inhibidor Ag1478 para EGFR por 30 min y posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 2 h. Para determinar la participación de vía Src-EGFR en la activación de Stat3 a nivel de serina en presencia de cadmio. El resultado se determinó utilizando proteína total para la técnica de Western blot, usando el anticuerpo de pStat3(Ser727) y el resultado se gráfico como el incremento de la activación del factor Stat3 con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#). La imagen del Western blot es representativa.

6.17 INTERACCIÓN DEL FACTOR STAT3 CON LA CINASA SRC

Para determinar la participación directa de la cinasa Src en la activación de Stat3, el cultivo primario de hepatocitos de ratón se trataron con 5 μM CdCl_2 durante 5 min, este tiempo se escogió de la cinética de activación del factor Stat3 a nivel de tirosina. Con el método de inmunoprecipitación se precipitó Stat3 usando su anticuerpo específico y se marcó el inmunoblot con el anticuerpo de Src. El resultado se muestra en la figura 26 y se observa una clara relación Stat3-Src, sugiriendo una fosforilación directa de Stat3 por Src.

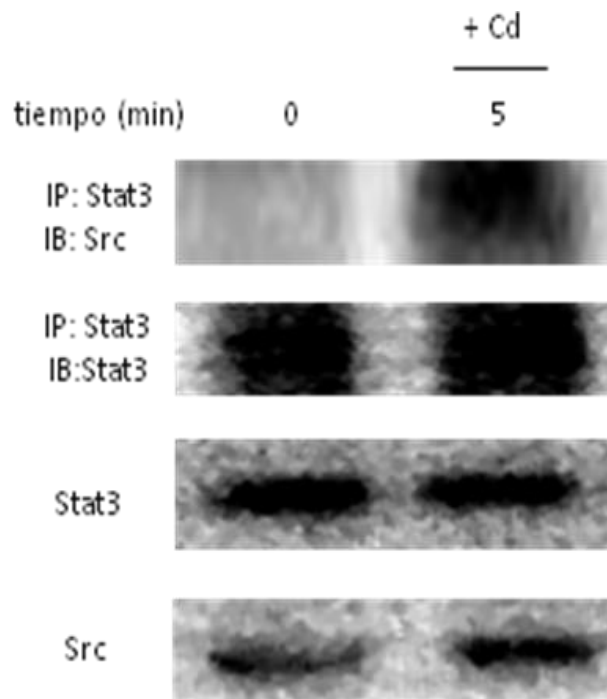


Figura 26. Relación directa de Src con el factor Stat3 para su activación en presencia de cadmio. Los hepatocitos se trataron con 5 μM de CdCl_2 durante 5 min para determinar la participación directa de Src con el factor Stat3 para la activación de este en un medio con cadmio, utilizando proteína total para la inmunoprecipitación con el anticuerpo específico de Stat3 y el de Src para el inmunoblot. La imagen de la inmunoprecipitación es representativa de tres experimentos independientes.

6.18 INTERACCIÓN DEL EGFR CON EL FACTOR STAT3

Se evaluó la interacción directa del receptor EGFR con Stat3 como otro mecanismo de fosforilación. Para determinarlo los hepatocitos fueron tratados con CdCl₂ por 2 h respectivamente y para evaluar esta interacción se utilizó el método de inmunoprecipitación en el que se precipitó Stat3 usando su anticuerpo específico y se marcó el inmunoblot con el anticuerpo de EGFR. En la figura 27, se observa que existe una interacción EGFR-STAT3. Esto sugiere que parte de la activación del factor Stat3 es directamente por EGFR.

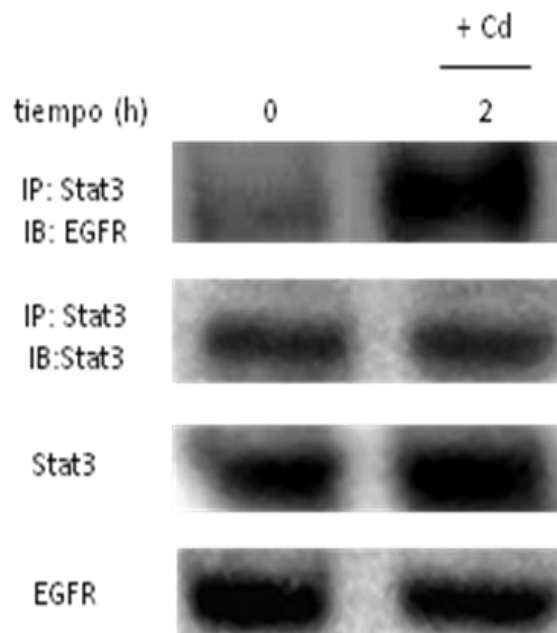


Figura 27. Participación directa del EGFR con EGFR y del factor Stat3 para su activación en presencia de cadmio. Los hepatocitos se trataron con 5 μM de CdCl_2 por 2 h para determinar la interacción de EGFR con el factor Stat3 para la activación de este en un medio con cadmio, utilizando proteína total para la inmunoprecipitación con el anticuerpo específico de Stat3 y el de EGFR para el inmunoblot. La imagen de la inmunoprecipitación es representativa de tres experimentos independientes.

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

Existen evidencias que el cadmio es capaz de activar a la cinasa ERK1/2, así que para evaluarlo, los hepatocitos fueron tratados con CdCl₂ a una concentración de 5 µM por tiempos que comprendieron desde 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120 y 180 min el resultado se determinó con la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para pERK1/2(Tyr204), ERK1/2 y actina como proteína de normalización. En la figura 28 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 máximo de activación a los 120 min, de 3.03 veces más que el control y a los 180 min desciende al valor de los hepatocitos no tratados de 1. Este resultado demuestra que el Cd es capaz de activar a ERK1/2.

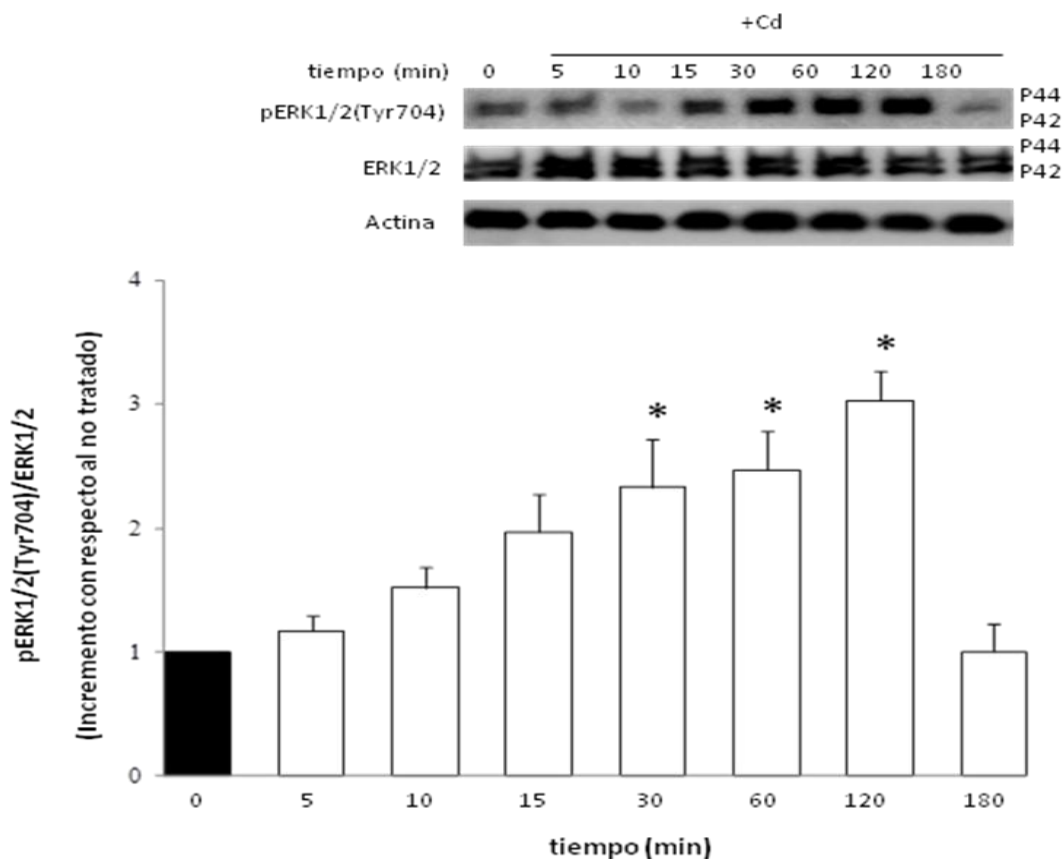


Figura 28. Activación de la cinasa ERK1/2 en respuesta a la presencia de cadmio. Los hepatocitos se trataron con 5 μM de CdCl_2 por diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30, 60, 120 y 180 min). Se analizó por Western blot la activación de ERK1/2 en presencia de cadmio, usando el anticuerpo específico para pERK1/2(Tyr704) y se realizó un análisis densitométrico para graficar el resultado como el incremento de la activación de ERK1/2 con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes ($n=3$). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p<0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*). La imagen del Western blot es representativa.

6.20 EL PAPEL DE LA NADPH OXIDASA EN LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2

La participación de la NADPH oxidasa se relacionó con la activación de ERK1/2, porque se sabe que esta cinasa es sensible a ERO que pueden provenir de NADPH oxidasa, para este experimento los hepatocitos fueron pre tratados por 30 min con AEBSF inhibidor de NADPH oxidasa, posteriormente se les agregó Cd por 1 h. El resultado se determinó con la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para pERK 1/2 (Tyr704), ERK 1/2 y actina como proteína de normalización. En la figura 29 la activación de ERK1/2 disminuyó un 69.39%, con respecto a los hepatocitos tratados con sólo Cd. Este resultado sugiere que NADPH oxidasa se encuentra participando en la activación de ERK1/2.

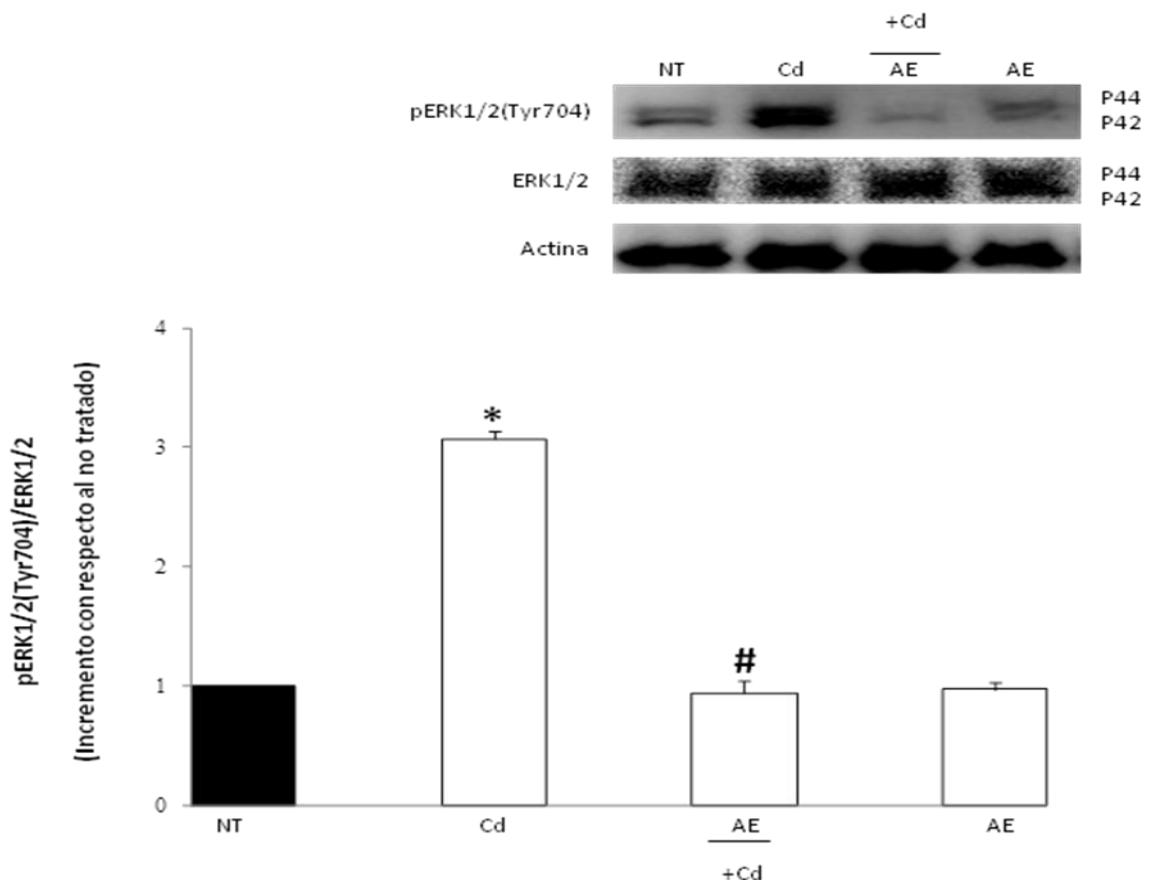


Figura 29. La NADPH oxidasa y su participación en la activación de ERK1/2 en respuesta al tratamiento con cadmio. Los hepatocitos fueron pre tratados con el inhibidor de la NADPH oxidasa (AEBSF) a 1 μ M por 30 min. Posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 1 h. Para evaluar la participación de la NADPH oxidasa en la cascada de fosforilación de ERK1/2 en presencia de cadmio. El resultado se determinó utilizando proteína total para la técnica de Western blot, usando el anticuerpo de pERK1/2(Tyr704) y el resultado se gráfico como el incremento de la activación del ERK1/2 con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de p<0.05 con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#). La imagen del Western blot es representativa.

6.21 PARTICIPACIÓN DE LA CINASA SRC Y EL EGFR EN LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2

Para determinar la participación de Src y EGFR en la activación de ERK 1/2, los hepatocitos fueron pre tratados por 30 min con los inhibidores: SU6656 para la cinasa Src, y AG1478 para EGFR. Posteriormente a los hepatocitos se les agregó Cd por 1 h. Este tiempo fue determinado con la cinética de activación de ERK 1/2 (Figura 28). Para determinar esto se realizó la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos específicos para pERK1/2 (Tyr704), ERK 1/2 y actina como proteína de normalización. En la figura 30, con el inhibidor de Src la fosforilación de ERK1/2 disminuyó un 63.24%, y con el de EGFR un 74.92% con respecto a los hepatocitos que fueron tratados con sólo Cd. El resultado sugiere que Src y EGFR se encuentran participando en la activación de ERK1/2 como parte de la cascada de activación del factor Stat3.

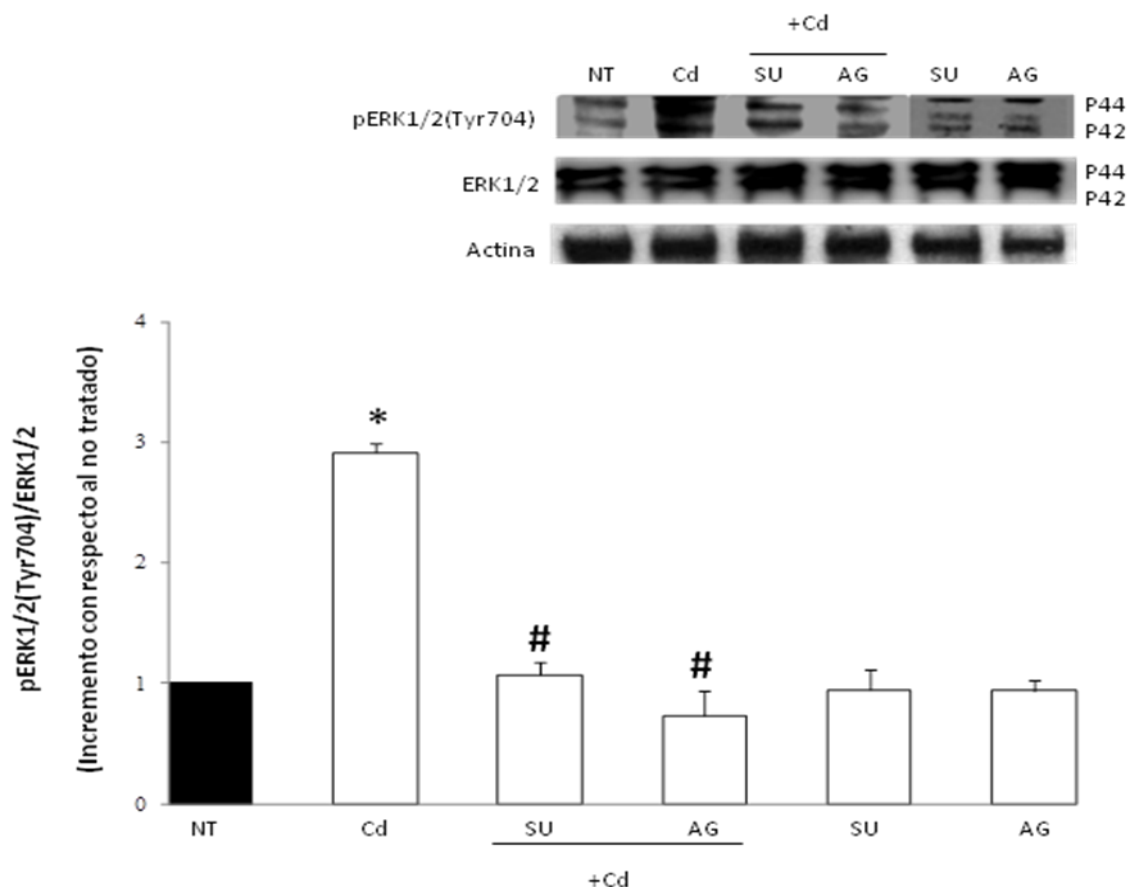


Figura 30. Participación de Src y EGFR en la activación de ERK1/2 en respuesta al tratamiento con cadmio. Los hepatocitos fueron pre tratados con 10 μ M del inhibidor de Src (SU6656) y 3 nM del inhibidor de EGFR (Ag1478) por 30 min y posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 1 h. Para determinar la participación de vía Src-EGFR en la activación de ERK1/2 en presencia de cadmio. El resultado se determinó utilizando proteína total para la técnica de Western blot, usando el anticuerpo de pERK1/2(Tyr704) y el resultado se gráfico como el incremento de la activación de ERK1/2 con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#). La imagen del Western blot es representativa.

6.22 PARTICIPACIÓN DE LA CINASA ERK1/2 EN LA FOSFORILACIÓN A NIVEL DE SERINA DEL FACTOR STAT3

Se conoce que ERK1/2 está involucrada en la fosforilación a nivel de serina del factor de transcripción Stat3, así que para determinarlo lo hepatocitos se pretrataron con el inhibidor de esta cinasa PD98059 a 20 μM durante 30 min y posteriormente con el CdCl_2 5 μM durante 2 h. Para lograr visualizar este efecto se realizó un Western blot utilizando el anticuerpo de pStat3(Ser727), Stat3 y actina como proteína de normalización. El resultado se muestra en la figura 31, en donde se observa que el inhibidor disminuye la fosforilación de Stat3 en serina un 55.75% con respecto a los hepatocitos que fueron tratados con Cd. Demostrando de esta manera la relación de ERK1/2 con la fosforilación de Stat3 a nivel de serina.

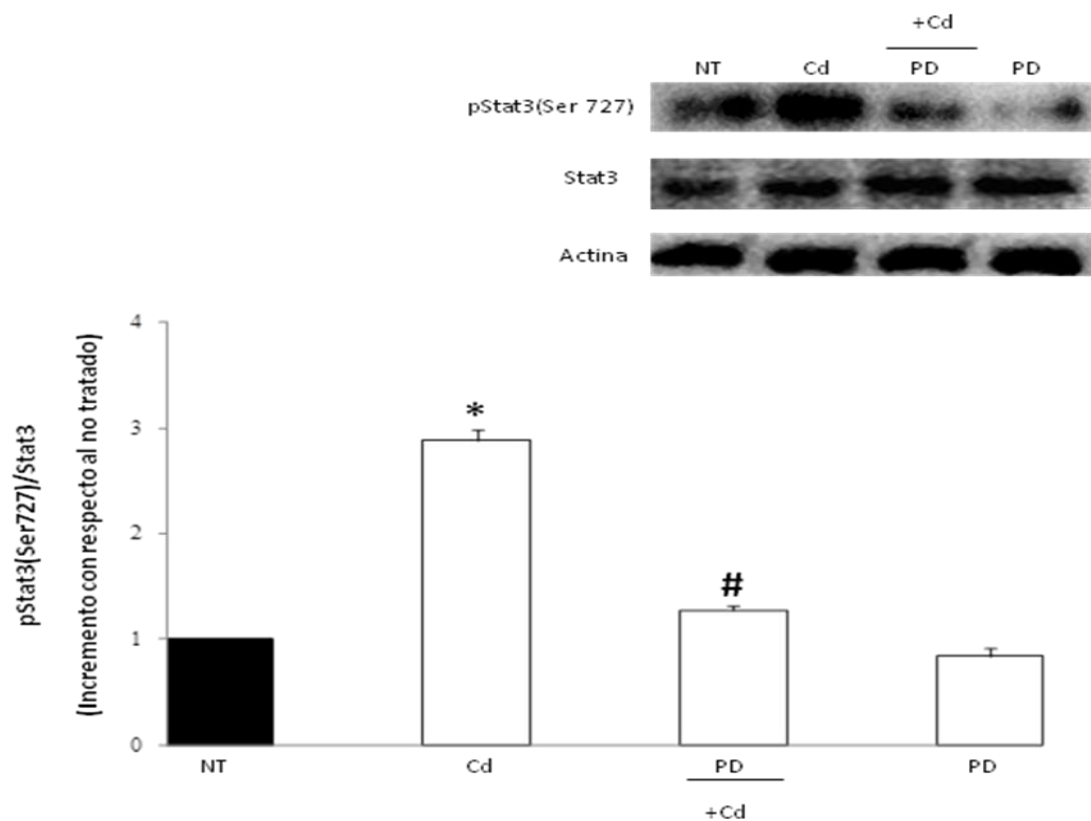


Figura 31. Participación de ERK1/2 como activador de Stat3 a nivel de serina en presencia de cadmio. El cultivo de hepatocitos fue pre tratado con el inhibidor de ERK1/2 PD98059 a 20 μ M por 30 min. Posteriormente se trató con 5 μ M de CdCl₂ por 2 h. Para evaluar la participación de ERK1/2 en la activación a nivel de serina del factor Stat3 en presencia de cadmio. El resultado se determinó utilizando proteína total para la técnica de Western blot, usando el anticuerpo de pStat3(Ser727) y el resultado se gráfico como el incremento de la activación de Stat3 en serina con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#). La imagen del Western blot es representativa.

6.23 LA EXPRESIÓN DE METALOTIONEÍNA EN HEPATOCITOS EXPUESTOS A CADMIO

El efecto del Cd en la expresión de la metalotioneína como proteína de respuesta regulada por la activación del factor Stat3, se evaluó tratando hepatocitos con CdCl₂ a una concentración de 5 µM por diferentes tiempos (0, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 12 h) y se determinó por Western blot con el anticuerpo específico para metalotioneína y actina como proteína de normalización. En la figura 32 se muestra el resultado, observándose que a las 2 h comienza a ser significativa su producción con un valor aproximado de 47 veces más que el control y a las 4 h se encuentra su máxima expresión con un valor de 65 veces manteniéndose así hasta las 8h, encontrando que a las 12h ya no se detecta. Este resultado nos permite confirmar que la MT-II se ve expresada como resultado de la activación de Stat3.

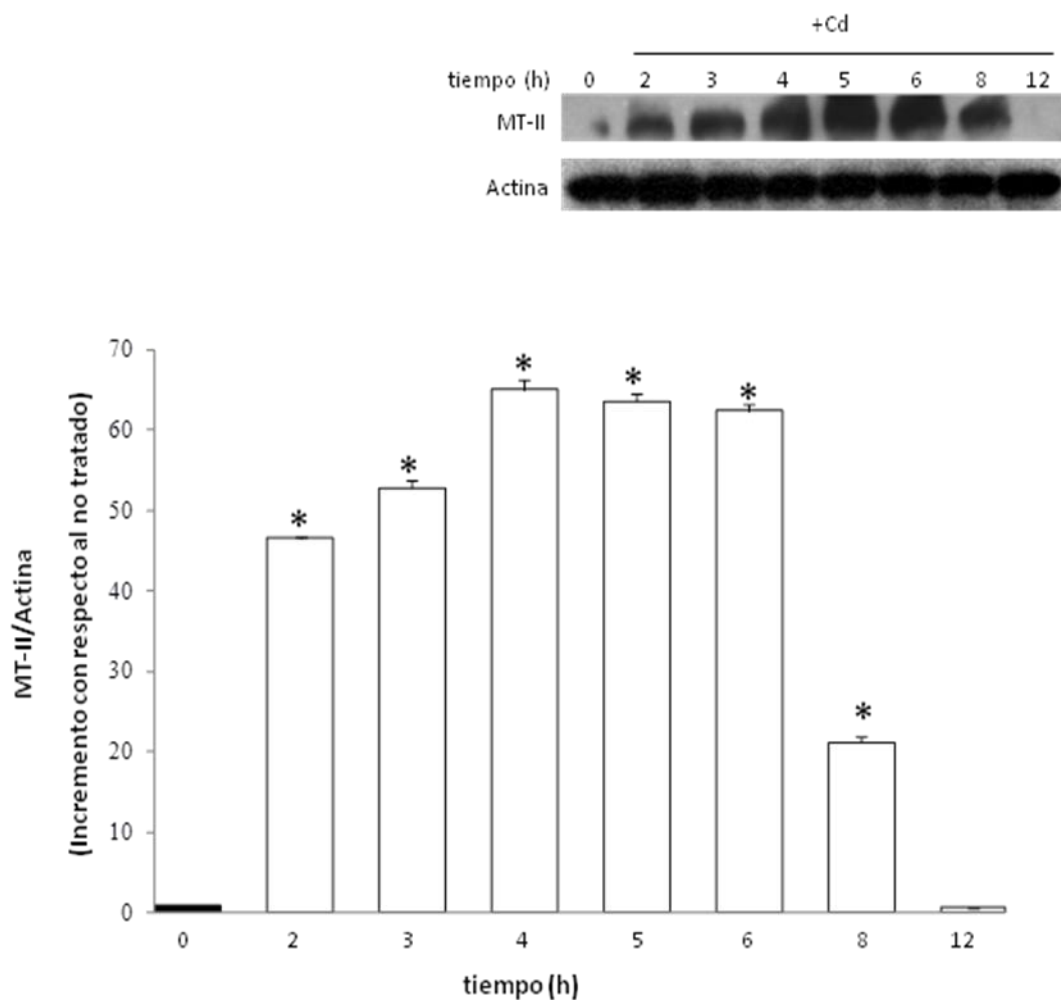


Figura 32. Expresión de la metalotioneína en respuesta al tratamiento con cadmio. En hepatocitos expuestos a 5 μM de CdCl_2 por diferentes tiempos (0, 2, 3, 4, 5, 6, 8, Y 12 h) de exposición, se analizó por Western blot la producción de MT-II como proteína regulada por Stat3 en presencia de cadmio, usando el anticuerpo específico para MT-II y se realizó un análisis densitométrico para graficar el resultado como el incremento de la expresión de MT-II con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*). La imagen del Western blot es representativa.

6.24 PARTICIPACIÓN DE LA NADPH OXIDASA EN LA EXPRESIÓN DE METALOTIONEÍNA

Para relacionar la participación de la NADPH oxidasa en la expresión de metalotioneína, los hepatocitos se pre trataron con AEBSF a 1 μM durante 30 min y posteriormente se les agregó 5 μM de CdCl_2 durante 4 h. Este resultado se determinó con la técnica de Western blot utilizando el anticuerpo para metalotioneína y actina como proteína de normalización. El resultado obtenido se muestra en la figura 33, observándose una disminución significativa de un 91.68% con AEBSF. sugiriendo que NADPH oxidasa participa en la expresión de metalotioneína como respuesta adaptación, regulada por la activación de Stat3.

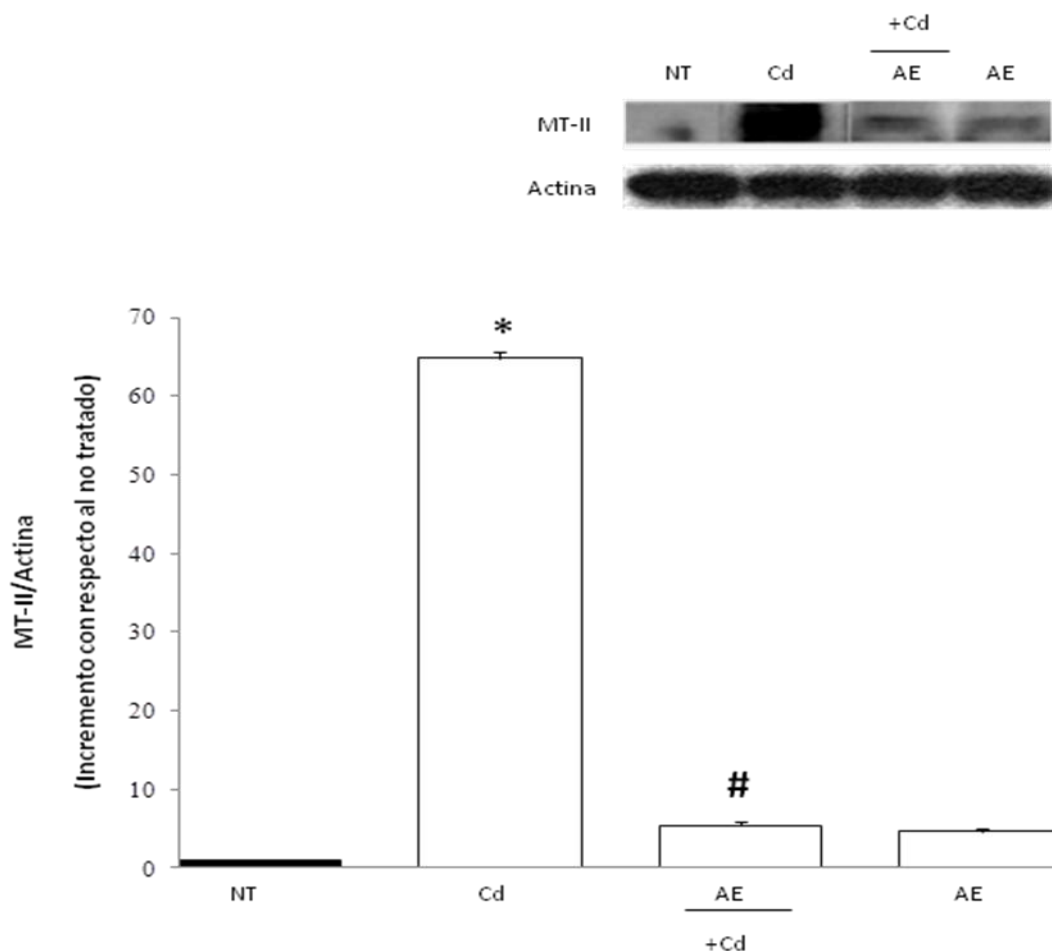


Figura 33. Papel de la NADPH oxidasa en la expresión de metalotioneína en respuesta al tratamiento con cadmio. Los hepatocitos fueron pre tratados con el inhibidor de la NADPH oxidasa (AEBSF) a 1 μ M por 30 min. Posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 4 h. Para evaluar la participación de la NADPH oxidasa como parte de cascada de expresión de la MT-II en presencia de cadmio. El resultado se determinó utilizando proteína total para la técnica de Western blot, usando el anticuerpo de MT-II y el resultado se gráfico como el incremento de la expresión de la MT-II con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#). La imagen del Western blot es representativa.

6.25 EL PAPEL DE LA CINASA SRC Y EL EGFR EN LA EXPRESIÓN DE MT-II

Para corroborar la participación de Src y EGFR en la expresión de metalotioneína, se evaluó pre tratando a los hepatocitos con SU6656 inhibidor de Src, y AG1478 para inhibir EGFR, durante 30 min y posteriormente se les agregó 5 μ M de CdCl₂ durante 4 h. La MT-II se determinó con la técnica de Western blot. El resultado obtenido se muestra en la figura 34 observándose una disminución significativa con ambos inhibidores, de un 88.29% con SU6656 y de un 87.52% con AG1478. Este resultado corrobora la participación de la vía Src-EGFR en la expresión de metalotioneína

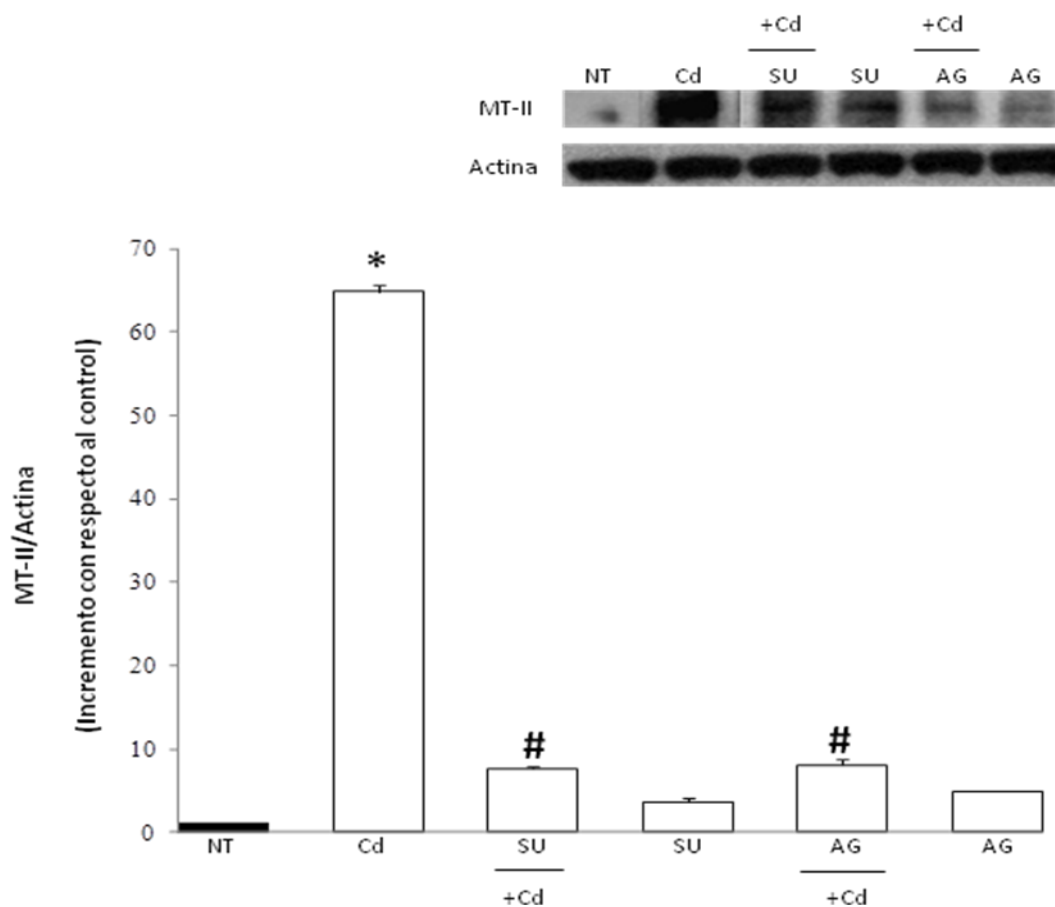


Figura 34. Participación de Src y EGFR en la expresión de metalotioneína ante la presencia de cadmio. Los hepatocitos fueron pre tratados con 10 μ M del inhibidor de Src (SU6656) y 3 nM del inhibidor de EGFR (Ag1478) por 30 min y posteriormente se trataron con 5 μ M de CdCl₂ por 4 h. Para corroborar la participación de vía Src-EGFR en la expresión de MT-II en presencia de cadmio. El resultado se determinó utilizando proteína total para la técnica de Western blot, usando el anticuerpo de MT-II y el resultado se gráfico como el incremento de la producción de MT-II con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*) o al cadmio (Cd) (#). La imagen del Western blot es representativa.

6.26 INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN HEPATOCITOS PRIMARIOS POR EL CADMIO

La apoptosis se ha observado en varios tipos celulares expuestos al Cd. En nuestro modelo de hepatocitos primarios, a pesar de que se da una respuesta de sobrevivencia, estos finalmente mueren, así que para ver si este mecanismo es por apoptosis, se expuso el cultivo de hepatocitos con diferentes tiempos (0, 0.5, 2, 6, y 12 h) y posteriormente usando el estuche comercial de anexina V (Roche) se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Beckton Dickinson) a 488 nm con un laser azul de Argón. Y las células apoptóticas fueron identificadas como positivas para Anexina V y negativas para yoduro de propidio. Y en la figura 35 A y B se muestra como a las 12 h existe un incremento de 52.7% de células apoptóticas. Demostrando este resultado que el cadmio a tiempos mayores a 12 h, la respuesta adaptativa no es suficiente y la célula termina por muriendo por apoptosis.

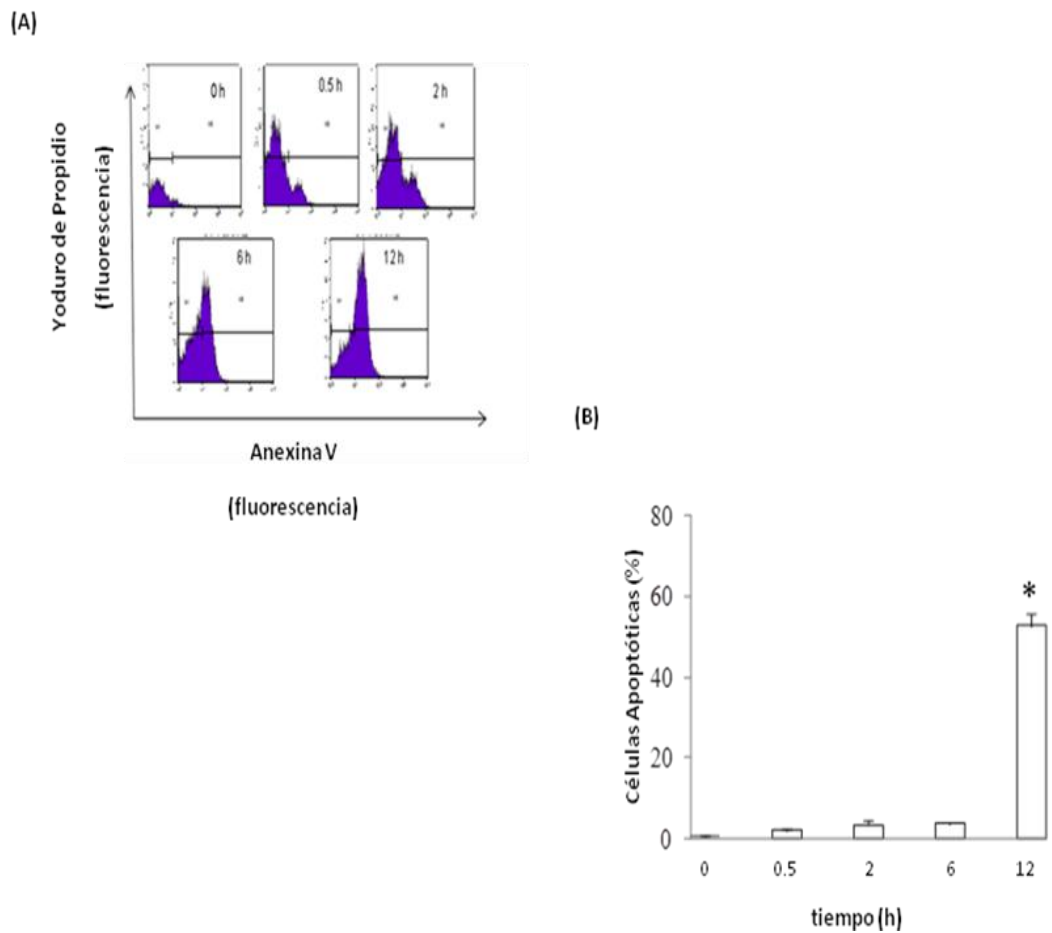


Figura 35 Inducción de apoptosis ante la presencia de cadmio. Los hepatocitos fueron tratados con diferentes tiempos (0, 0.5, 2, 6 y 12 h) de exposición a 5 μM de CdCl_2 . Para evaluar si la apoptosis era el mecanismo de muerte empleado por el hepatocito, se utilizó el estuche comercial de Anexina V y por citometría flujo las células apoptóticas fueron identificadas como positivas para Anexina V y negativas para yoduro de propidio. El resultado se gráfico como porcentaje de células apoptóticas con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes ($n=3$). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p<0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*).

6.27 ACTIVACIÓN DE p53 Y DE BAX

Se sabe que p53 y Bax son proteínas que están implicadas en el proceso de apoptosis y para determinar si el cadmio era capaz de activarlas los hepatocitos se trataron con diferentes tiempos de exposición (0, 3, 6, y 12 h). Para evaluarlas se utilizó la técnica de Western blot usando los anticuerpos específicos para p53, Bax y actina como proteína normalizadora. Se encontró que p53 comienza a activarse a las 3 h teniendo un máximo a las 12 h con un valor de 3,05 veces el valor el control. Con respecto a Bax también se encuentra con un máximo de activación a las 12 h con un valor de 2,0 veces incrementado con respecto al control. Este resultado demuestra que el cadmio puede activar a p53 y a Bax, muy probablemente como parte de la maquinaria de apoptosis. Estos resultados se muestran en las figuras 36 y 37.

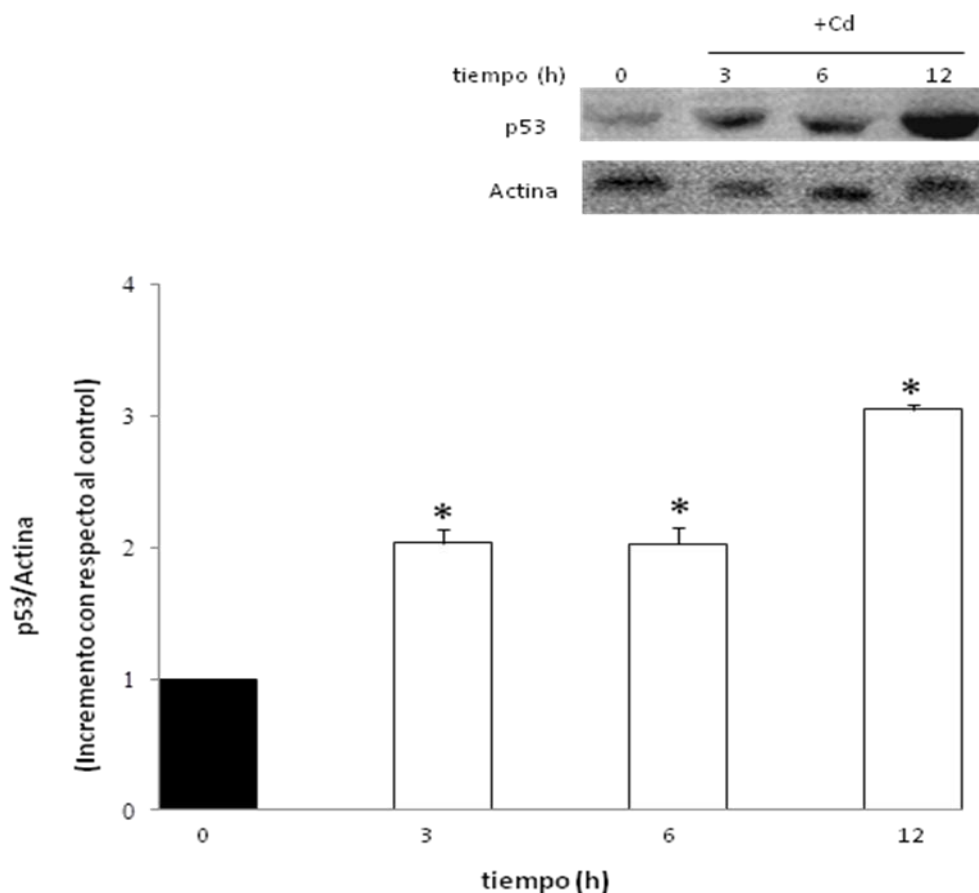


Figura 36. Activación de p53 en presencia de cadmio. Los hepatocitos se trataron con diferentes tiempos (0, 3, 6 y 12 h) de exposición a 5 μM de CdCl_2 y se analizó por Western blot la activación de p53 como proteína en la vía de la apoptosis en respuesta al tratamiento con cadmio, utilizando el anticuerpo específico para p53 y por medio de un análisis densitométrico para graficar el resultado como el incremento de la activación de p53 con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes ($n=3$). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p<0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*). La imagen del Western blot es representativa.

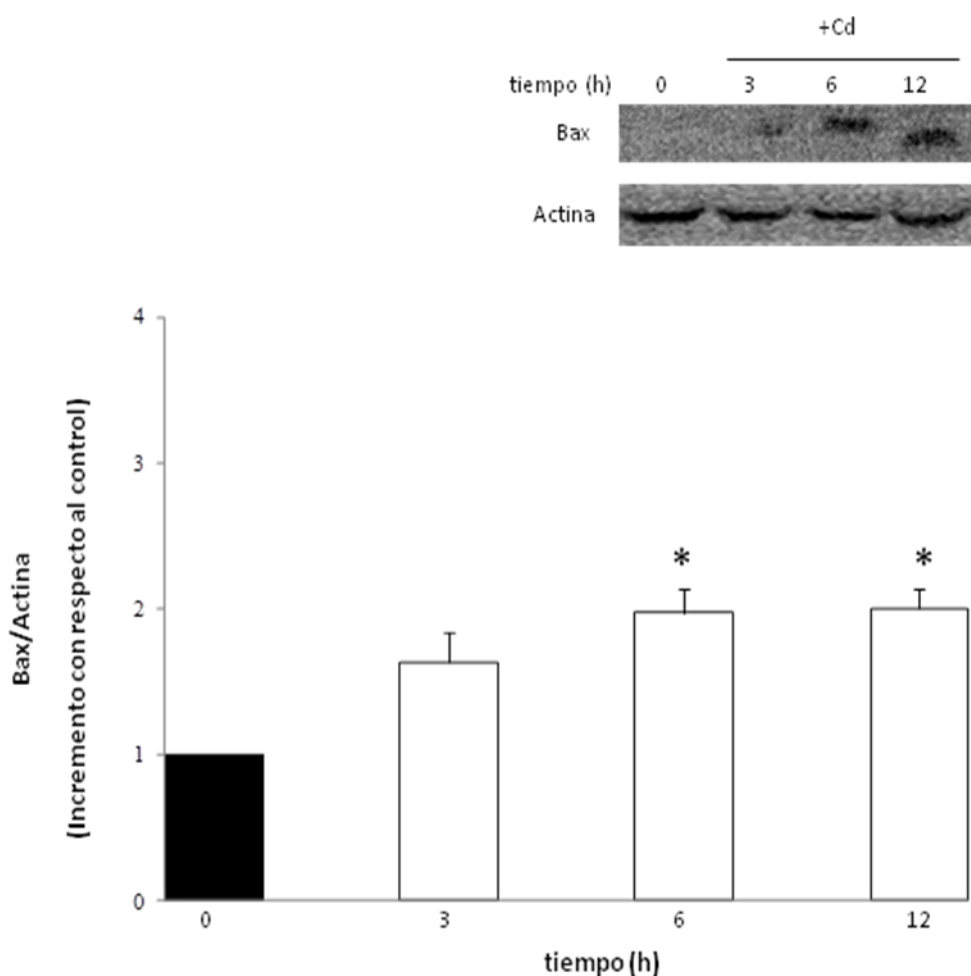


Figura 37. Activación de la proteína proapoptótica Bax en respuesta al tratamiento con cadmio. El cultivo primario de hepatocitos fueron tratados con diferentes tiempos (0, 3, 6 y 12 h) de exposición a 5 μ M de CdCl₂ y se analizó por Western blot la activación de Bax como proteína en la vía de la apoptosis en respuesta al tratamiento con cadmio, utilizando el anticuerpo específico para Bax y por medio de un análisis densitométrico para graficar el resultado como el incremento de la activación de p53 con respecto a los hepatocitos no tratados. Cada barra expresa el valor promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). La prueba estadística utilizada fue post hoc de Tuckey considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con respecto a los hepatocitos no tratados (NT) (*). La imagen del Western blot es representativa.

7 DISCUSIÓN

7.1 VIABILIDAD CELULAR

Cuando evaluamos el efecto del Cd sobre la viabilidad celular, encontramos que los hepatocitos tratados en un rango de concentración de entre 0.5-5 μM de CdCl_2 , presentaron un 100% de hepatocitos vivos y a concentraciones mayores de 6 μM , la viabilidad disminuye significativamente. Por otra parte cuando el Cd se administró por diferentes tiempos, la viabilidad celular disminuyó de manera significativa después de las 9 h, sin embargo, datos previos del grupo, han encontrado mayor resistencia ante el tratamiento con Cd, en diferentes líneas celulares hepáticas, como en la línea de células estelares de rata (CFSC-2G) que su viabilidad se ve disminuida un 40% a concentraciones mayores a 10 μM por 24 h (Souza y col., 2004), mientras que la línea proveniente de un hepatoblastoma HepG2 la viabilidad disminuyó un 27% cuando fue tratada a una concentración de 20 μM de CdCl_2 (Souza y col., 2004). Esta diferencia de sensibilidad se debe a que el cultivo primario, conserva la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto y en las líneas celulares estas características se han perdido, debido a que están alterados sus mecanismos de respuesta celular, lo que las hace ser más resistentes ante diversos agentes tóxicos como el Cd. Así, Lawal y Ellis (2010) lo demuestran en la línea HepG2, que hasta las 24 h a una concentración de 50 μM la viabilidad disminuye. Por otra parte Odewumi y col. (2011) en una línea de hepatoma de rata (CRL-1439) encontraron una disminución del 40% en la viabilidad cuando se trataron con 150 μM y Song y col. (2012) en la línea de células epiteliales de cristalino (CRL11241) encontraron una disminución de más del 50% cuando fueron expuestas a una concentración de 60 μM de CdCl_2 . De igual forma en la línea de feocromocitoma de rata (PC12) tratadas con CdCl_2 a 20 μM por 24 h presentaron un decremento significativo en la viabilidad (Xu y col., 2011). Por su parte Diep y col. (2005) al tratar hepatocitos primarios de ratón con 100 μM de CdCl_2 por 1 h, encuentran una pérdida significativa de la viabilidad celular y Wang y col. (2007) al tratar hepatocitos de ratón neonatal con diferentes concentraciones de CdCl_2 (5, 10 y 25 μM), encuentran, que la viabilidad disminuye significativamente conforme se

aumenta la concentración. Sin embargo Gulisano y col. (2009) en cultivo primario de células neuroepiteliales de ratón descubrieron que con 100 μM de CdCl_2 disminuía el crecimiento y la viabilidad, llevando a cambios morfológicos que finalmente conducen a muerte por apoptosis. Finalmente Angenard y col. (2010) encontraron en células germinales tratadas con concentraciones mayores a 1 μM de CdCl_2 la densidad disminuía de una manera dependiente a la dosis. Esta respuesta diferencial entre líneas celulares y cultivos primarios, se debe además de sus diferentes orígenes, a los diversos mecanismos de protección que cada tipo celular desarrolla. Por ello el interés de estudiar la respuesta ante el Cd en un modelo primario, porque es un sistema que se acerca más a lo que sucede en un organismo expuesto ante este tóxico y porque son poco entendidos los mecanismos moleculares resultado de la agresión del Cd en los hepatocitos para tratar de dar una respuesta de sobrevivencia.

7.2 GENERACION DE ERO VÍA NADPH OXIDASA

De acuerdo a Cuypers y col. (2010) el Cd altera el estado redox, por un aumento de la formación de ERO por la cadena respiratoria mitocondrial y por la inducción de la NADPH oxidasa. Estas ERO tienen un papel clave en la adaptación celular al Cd, porque estas pueden disparar una sobreexpresión de mecanismos de protección antioxidante que promueven reparación y sobrevivencia, pero también malignidad (Moulis y Thévenod, 2010). Además el Cd es capaz de disminuir GSH y unirse a proteínas que contienen grupos sulfhidrilo, dando como resultado la producción de ERO como $\text{O}^{\cdot -}_2$, H_2O_2 y el radical OH^{\cdot} . Sin embargo particularmente el H_2O_2 se reconoce como una molécula importante en los mecanismos de señalización que pueden influir en la proliferación, muerte celular o expresión de genes (Genestra. M., 2007). Sin embargo aunque la generación de ERO es frecuentemente atribuida a la cadena respiratoria mitocondrial, en algunos casos se puede definir la fuente de ERO usando inhibidores que indiquen de donde pueden provenir, porque puede ser de una flavoproteína como la NADPH oxidasa (Lambeth, 2004), así en nuestro modelo de hepatocitos primarios tratados con CdCl_2 encontramos que la generación ERO provenían de la NADPH. Antecedentes de nuestro grupo demuestran que en

diferentes líneas hepáticas (WRL-68 y HepG2) el Cd produce estrés oxidante y que estas responde por diferentes vías para compensar el daño (Souza y col., 2009; Souza y col., 2004). En otros tipos celulares como de túbulo proximal de riñón y en células epiteliales bronquiales también se ha reportado que el Cd induce ERO (Kitamura y Hiramatsu, 2010). Así mismo Xu y col. (2011), reportan que al tratar a células de línea de neuroblastoma (SH-SY5Y) y de cultivo primario de neuronas a 10 y 20 μM CdCl_2 por 24 h hay un incremento en los niveles de ERO. Por otra parte Chen y col. (2011), encontraron en las líneas de feocromocitoma de rata (PC12) y SH-SY5Y tratadas entre 0-20 μM de CdCl_2 , una generación de ERO y una sobreexpresión de la NOX2 de manera dependiente de la concentración. Además señalan que cuando tratan a las células PC12 con 10 μM de CdCl_2 se incrementan significativamente los niveles de ERO, pero que la expresión de NOX2 no se eleva. Ellos proponen que el Cd es capaz de generar ERO primero por vía cadena respiratoria y después a través de NOX2 y sus subunidades reguladoras. En modelo de células de riñón Thijsen y col. (2007) encontraron expresado NOX4 cuando fueron expuestas a Cd, sin embargo el papel exacto de NOX4 en la toxicidad del Cd no ha sido descrito, así mismo Fotakis y col. (2005) reportan que en hepatocitos expuestos a Cd hay una producción de ERO dependiente de la NADPH oxidasa. Por su parte Cuypers y col., (2010) señalan que las NOX son blanco del Cd y que influye en la actividad de la NADPH oxidasa, resultando en una señalización que lleva a mecanismos de protección o alternativamente de muerte celular, sin embargo el papel exacto de las ERO en la activación de vías de señalización involucradas en la defensa durante el estrés por Cd es poco conocido. Por nuestra parte recientemente en nuestro modelo presentamos la clara evidencia que el Cd induce una temprana generación de ERO, involucrando una señal que no es considerada como respuesta citotóxica por un mecanismo dependiente de la actividad de la NADPH oxidasa, que puede relacionarse para la transducción de señales y activar el sistema de defensa antioxidante o como mecanismo adaptativo en el que se ve involucrado la activación de factores de transcripción que induzcan la expresión de proteínas de protección como la MT.

7.3 SEÑALIZACIÓN DE ACTIVACIÓN DEL FACTOR STAT3

Se conoce que el factor Stat3 desarrolla una respuesta adaptativa ante una agresión al hígado amplificando genes que mantienen la homeostasis (Suh y col. 2008) y de acuerdo con Okamoto y col. (2011) puede ser activado en respuesta a factores de crecimiento, citosinas o cinasas. Una vez activado puede mediar procesos como: proliferación celular, migración y sobrevivencia en varios tipos celulares. Bromberg y Chen (2001) señalan que la activación del factor de transcripción Stat, es un proceso transitorio, que va de minutos a horas. Por otra parte, resultados *in vitro* demuestran que el Cd influye en la activación de varios factores de transcripción (Cui y col., 2007; Valko y col., 2005), entre los que se encuentra el factor Stat3. Así mismo Souza y col. (2009) en la línea de hepatoblastoma HepG2, señalan que las ERO se generan en respuesta a Cd contribuyendo a la defensa celular vía la activación de factor Stat3 solamente a nivel de serina 727 a través de la cinasa ERK1/2, probablemente porque la células son provenientes de un hepatoblastoma, en el cual los mecanismos moleculares se encuentran alterados, por ello decidimos trabajar en el modelo de cultivo primario, porque los mecanismos no se encuentran sobre-regulados o reprimidos como en sucedió en la línea HepG2. Ya que demostramos que el factor Stat3 es activado tanto a nivel de tirosina 705 por una vía independiente a su ruta canónica de Jak, en la cual está involucrada la cinasa Src y el EGFR que a su vez media la activación de las MAPK, particularmente ERK1/2 que activa a nivel de serina 727 a Stat3 para que pueda activarse totalmente e inducir la expresión de MT como una respuesta inicial de protección ante la agresión por él Cd. Por su parte Tseng y col. (2012) reportan en su modelo de queratinocitos tratados con trióxido de arsénico, se sobre activa la cinasa Src y da como resultado la fosforilación en tirosina 845 del EGFR y por consiguiente la activación de la cinasa ERK1/2, dando como respuesta final el arresto del ciclo celular y apoptosis. Kundu y col. (2011) en la línea A549 de adenocarcinoma de pulmón encontraron que el Cd induce una elevada expresión del EGFR. Y otros reportes (Sánchez-Lemus y Arias-Montaño, 2004; Jorissen y col. 2003; Frame, 2002) indican que la cinasa Src activada y el EGFR son capaces de activar a las MAPK. Puddicome y Davies, 2000 menciona que en general la cinasa ERK1/2 es

activada por factores de crecimiento asociado a una respuesta de sobrevivencia y proliferación celular. Simeonova y col. (2001), reportan que el arsénico induce la activación del EGFR y de la MAPK ERK1/2 de una manera dependiente de Src en ratón. Además numerosos metales como el arsénico, cromo, Cd, cobalto y níquel afectan la señalización de las MAPK. Por ejemplo se conoce que el Cd, es capaz de activar la ruta de las MAPK vía la generación de ERO, teniendo un papel muy importante en la inducción de apoptosis para eliminar el daño oxidante en la célula (Chen y col, 2008; Qu y col., 2007). Chen y col. (2011) indican que el Cd activa la ruta de las MAPK vía la generación de ERO provenientes de NOX2. Por su parte Lag y col. (2005) encontraron un incremento en la fosforilación de la cinasa ERK1/2 en células de pulmón expuestas a 10 μ M de acetato de cadmio (CdAc) por 1-2 h, interpretando esta respuesta como de sobrevivencia ante el Cd. De igual forma Alam y col. (2000) encontraron en células de cáncer de mama MCF-7 tratadas con 10 μ M de CdCl₂ un incremento de 4 a 5 veces más la activación de la cinasa ERK1/2. En células de la glándula adrenal tratadas con diferentes concentraciones de CdCl₂ (1-50 μ M), se encontró fosforilada a la cinasa ERK1/2 de una manera dependiente a la dosis, sin embargo la participación de esta cinasa probablemente pueda estar relacionada en otros mecanismos que no sean antioxidante, como en la exocitosis (Leal y col., 2007). En células humanas embrionarias de riñón tratadas con 2 μ M de CdCl₂ por 24 h, mostraron una activación sostenida de la cinasa ERK1/2 relacionándola con una respuesta de muerte celular (Martin y Pognonec 2010; Martin y col., 2009). Finalmente estos reportes demuestran la respuesta diferencial de las células ante el Cd, sin embargo estos mecanismos no han sido bien entendidos, por ello la importancia de nuestro trabajo, al demostrar con un ensayo de inmunoprecipitación la asociación directa de Stat3 con el EGFR para su activación a nivel de tirosina, corroborando esto cuando se inhibe al EGFR la activación del factor disminuye significativamente, esto no ha sido previamente descrito ante la respuesta del Cd. Por otra parte también encontramos que Src y el EGFR median la activación de ERK1/2 que es la responsable de la fosforilación a nivel de serina de Stat3. Así mismo también encontramos que al inhibir a la NADPH oxidasa, ERO, Src, EGFR, el factor así como la producción de MT-II disminuyen, indicándonos que el Cd es

capaz de activar distintas vías de señalización y sugiriendo que las ERO provenientes de la NADPH oxidasa juegan un papel muy importante de mediadoras en la activación de Stat3.

7.4 PRODUCCIÓN DE MT-II Y APOPTOSIS

Lee y col. (1999) señalan que en la región promotora del gen de MT contiene una secuencia reguladora que el factor Stat3 reconoce para iniciar la inducción de esta proteína. La MT tiene un papel muy importante en la detoxificación de metales pesados como el Cd (Nakamura y col. 2012; Inoue y col. 2009 Alam y col. 2000). Fabbri y col. (2012) así como Klaassen y col. (2009), reportan que aproximadamente entre un 80-90% del Cd en el cuerpo se une a MT y previene que el Cd quede libre como ion y no pueda ejercer sus efectos tóxicos por la interacción con proteínas o factores de transcripción. Sadhu y Gedamu (1988) fueron los primeros en reportar el patrón expresión de los genes que codifican las diferentes isoformas de MT, en base a su secuencia de aminoácidos, dividiéndolas la categoría MTI que comprende MTIA, MTIB, MTIE, MTIF y MTIG y la categoría MTIIA que has sido identificada como MTII. Señalando que todas son funcionales y que sus genes se localizan en el cromosoma 16 y se ubican en él siguiente orden: G, F, A, D, C y B. Estos investigadores encontraron que en células de hepatoblastoma tratadas con CdCl₂, la MTIIA fue la más inducida y que MTIF y MTIG solo se acumularon en baja cantidad dentro de la célula. MTIIA fue también específicamente inducida en células de hepatocarcinomas tratadas con CdCl₂, representado una respuesta que le permite a las células sobrevivir ante este tóxico. MTIA, MTIF, MTIG, MTIH y MTIX fueron encontradas principalmente en células de carcinoma de tiroides expuestas a Cd (Luparello y col. 2011; Liu y col., 2007). Además, Gurel y col. (2005) encontraron en células epiteliales de mama MCF10 expuestas a CdCl₂ un moderado incremento en los niveles transcripcionales de MTIE, MTIX y MTIIA, mientras que Sirchia y Luparello (2009) demostraron en la línea de células epiteliales de mama HB2, al exponerlas a 50 µM de CdCl₂ por 24 h se murieron, pero cuando bajaron la concentración a 5 µM por 96 h se activó la transcripción de MTIIA y se sobreguló tanto la de MTIF como la de la MTIG. Diep y col. (2005) al tratar cultivo primario de hepatocitos de

rata con 10 μM CdCl_2 por 2h, encontraron un incremento significativo en los niveles de RNAm de MTI y MTII. Otros reportes mencionan que MTI y MTII juegan un papel muy importante en la protección contra la toxicidad del Cd ya que en ratones deficientes de MTI/II presentan mayor sensibilidad a la toxicidad del Cd tanto a nivel hepático como renal (Honda y col., 2010) encontrando cambios morfológicos como muerte por necrosis en los hepatocitos. También en un modelo de ratas a las que se les administro diferentes dosis de Cd, presentaron a nivel de útero un incremento en la presencia del complejo MT-Cd (Nakamura y col. 2012). Thirumoorthy y col. (2011) demostraron en una línea de cáncer de tiroides (KAT5) una expresión de manera funcional tanto de MTI como de MTII inducidas por Cd. Además ellos sugieren que esta expresión se ve bloqueada cuando se tratan a las células con el inhibidor de ERK1/2 indicando que la expresión de estas isoformas es dependiente de la vía de ERK1/2. En nuestro modelo de cultivo primario logramos determinar a nivel de proteína la expresión de la MT-II con un incremento de 60 veces más, ya que algunos artículos reportan solo al mRNA y pocos reportan la producción por la dificultad de detectarla por su peso molecular tan bajo. Además también demostramos que esta se produce después de 2 h de tratamiento con el Cd, e incrementándose hasta las 6 h y a las 12 h es indetectable, porque a ese tiempo la viabilidad celular ya se ve disminuida a más del 50%, esto indica el papel tan importante de la MT-II como agente protector de la respuesta de sobrevivencia que la célula activa ante el daño por Cd en tiempos tempranos. También algunos estudios han mostrado que MT-II juega un papel protector contra la apoptosis, sin embargo en nuestros datos encontramos que cuando aumenta la apoptosis disminuye la MT-II, indicando que su disminución es la decisión final de la célula para llevarla a muerte, porque la progresión de daño ha sido mayor a la respuesta de adaptación. Por otra parte la apoptosis que observamos puede ser respuesta a la incapacidad del hepatocito a reparar el daño al DNA. Además que está siendo mediada por p53 y Bax. Miguel y col. (2005) refieren que el Cd puede inducir apoptosis o necrosis, esto depende de tipo celular, concentración y el diseño experimental. En modelos celulares como de feocromocitoma de rata (PC12) y de neuroblastoma (SH-SY5Y) que se expusieron al Cd, se encontró una disminución

en su viabilidad celular y un incremento en la apoptosis (Xu y col. 2011). En células de leucemia mieloide (U937) expuestas a 200 μ M de CdCl₂, presentaron un incremento significativo del 50% de apoptosis (Miguel y col. 2005). Lag y col. (2002) encuentran en células epiteliales de pulmón que a concentraciones bajas de Cd induce apoptosis. Los metales como el Cd dañan el ADN e induce la vía intrínseca de apoptosis a través de p53 mediando la sobre regulación transcripcional de los miembros proapoptóticos de la familia de BCL-2 como Bax, por esta razón nos enfocamos en determinar su activación en nuestro modelo para mediar la apoptosis. Por su parte Aimola y col. (2012) en células normales de próstata (RWPE), encuentran que el Cd induce un incremento dosis dependiente en la apoptosis y una elevada producción de p53. En células de sertoli tratadas con 20 μ M de CdCl₂ por 24 h se encontró un incremento significativo de p53 (Yu y col., 2008). Por lo tanto el Cd es capaz de generar muchos mecanismos de respuesta en diversos tipos celulares pero finalmente ninguno es capaz de sobrevivir ante este metal , lo que es de destacar en nuestro estudio es que logramos demostrar otra vía de activación en la que se encuentra implicada Src-EGFR y factor Stat3 para que se dé la expresión de MT-II en respuesta de adaptación al Cd, ya que además del factor Stat3 existe el factor de transcripción que se induce por metales (MFT-I) que también puede inducir la producción de esta proteína. Sin embargo la expresión de MT-II no es suficiente para contrarrestar el daño generado por el Cd y el hepatocito finalmente llega a un mecanismo de muerte.

8 CONCLUSIÓN

Hemos abordado los eventos moleculares implicados antes de la toxicidad inducida por Cd celular y la muerte celular en hepatocitos primarios de ratón. Por esta razón proponemos que los hepatocitos desarrollan una respuesta adaptativa para tratar de sobrevivir ante los efectos nocivos del Cd por un mecanismo accionado por el factor de transcripción Stat3, mediado a través de la NADPH oxidasa, Src, EGFR y ERK1/2, que, además conducen a la expresión de MT-II. Sin embargo, esta respuesta no resuelve el daño producido por Cd y célula muere por un mecanismo de apoptosis mediada por p53. Finalmente nuestros resultados establecen a la MT-II como un factor determinante para la célula en la decisión de sobrevivir o morir bajo la toxicidad del Cd. La conclusión se resume en la figura 38.

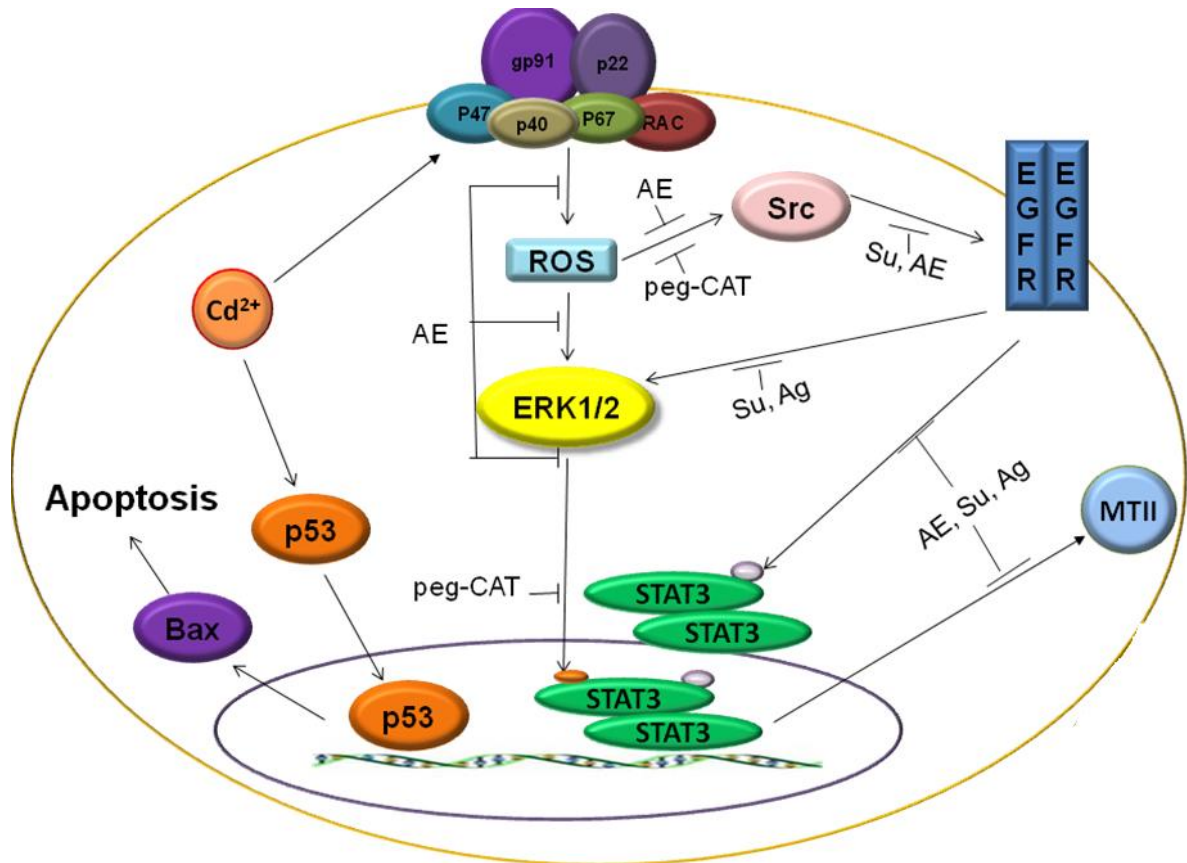


Figura 38. Modelo propuesto para la activación del factor Stat3, a través de la participación de la NADPH oxidasa como fuente de ERO que llevan a la activación Src y por consiguiente a la transactivación del EGFR, dando como respuesta celular la expresión de la MTII, pero finalmente esta respuesta se ve rebasada por la toxicidad del Cd y los hepatocitos mueren por apoptosis implicando a p53 y Bax en el proceso.

9 REFERENCIAS

Abdullah, S.E., Haigentz, M. Jr. Y Piperdi, B. Dermatologic toxicities from monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors against EGFR: Pathophysiology and management. *Chemother Res Pract.* 2012:351210. Epub 2012 Sep 11.

Aimola, P., Carmignani, M., Volpe, A.R., Di-Benedetto, A., Claudio, L., Waalkes, M.P., van-Bokhoven, A., Tokar, E.J., Claudio, P.P. Cadmium induces p53-dependent apoptosis in human prostate epithelial cells. *PLoS One.* 2012:7(3):33647.

Alam, J., Wicks, C., Stewart, D., Gong, P., Touchard, C., Otterbein, S., Choi, A.M.K., Burow, M.E. y Tou, J. Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 2000:(275):27694-27702.

Angenard, G., Muczynski, V., Coffingny, H., Pairault, C., Duquenne, C., Frydman, R., Habert, R., Roviller-Fabre, V. y Livera, G. Cadmium increases human fetal germ cell apoptosis. *Environ Health Perspect.* 2010: 118(3):331-337.

ATSDR, 2005. Agency for Toxic Substance and Disease Registry, U.S. Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA.

ATSDR, 2007. Agency for Toxic Substance and Disease Registry, U.S. Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA.

Babelova, A., Avaniadi, D., Jung, O., Fork, C., Beckmann, J., Kosowski, J., Weissmann, N., Anilkumar, N., Shah, A.M., Schaefer, L., Schröder, K. y Brandes,

R.P. Role of Nox4 in murine models of kidney disease. *Free Radic Biol Med.* 2012: 53(4):842-853.

Barry, S. P., Townsend P. A., McCormick J., Knight R. A., Scarabelli T. M., Latchman D. S., Stephanou A. STAT3 deletion sensitizes cells to oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009:(385):324-329.

Berasain, C., Ujue Latasa, M., Urtasun, R., Goñi, S., Elizalde, M., García-Irigoyen, O, Azcona, M., Prieto, J. y Ávila, M.A. 2011. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Crosstalks in liver cáncer. *Cancers.* 2011:(3):2444-2461.

Biscardi, J.S., Maa M-C., Tice D. A., Cox M E.,Leu T-H., Parson S. c-Src-mediated Phosphorilation of the Epidermal Growth Factor Receptor on Tyr⁸⁴⁵ and Tyr¹¹⁰¹ Is associated with Modulation of Receptor Fuction. *J Biol Chem.* 1999:(274):8335-8343.

Bromberg, J. y Chen, X. Stat proteins. Signal transducers and activators of transcription. *Methods Enzymol.* 2001:(333):138-151.

Cabané, P., Díaz J., Rojas J., Maluenda F., Rencoret G., Saud K., Loreto M. G., Ibacache D., Ledezma S., Caviedes R. Optimización de cultivos primarios de hepatocitos humanos para el estudio de citotoxicidad. *Rev. Chilena de Cirugía.* 2002: (2): 116-12.

Chen, L., Liu, L. y Huang, S. Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2 A and 5. *Free Radic Biol Med.* 2008:(45):1035-1044.

Chen, L., Xu, B., Liu, L., Luo, Y., Zhou, H., Chen, W., Shen, T., Han, X., Kontos, C.D. y Huang, S. 2011. Cadmium induction of reactive oxygen species activates mTOR pathway, leading to neuronal cell death. *Free Radic Biol Med.* 2011 50(5):624-632.

Cui, Y., McBride, S.J., Boyd, W.A., Alper, Scott y Freedman, J.H. Toxicogenomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals novel genes and pathways involved in the resistance to cadmium toxicity. *Genome Biol.* 2007: 8(6):R122.

Cui, W., Matsuno, K., Iwata, K., Ibi, M., Matsumoto, M., Zhang, J., Zhu, K., Katsuyama, M., Torok, N.J. y Yabe-Nishimura, C. Nox1/Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, reduced form (NADPH) oxidase promotes proliferation of stellate cells and aggravates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Hepatology.* 2011:54(3):949-958.

Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opendakker, K., Nair, A. R., Munters, E., Artois, T.J., Nawrot, T., Vangronsveld, J. & Smeets K. Cadmium stress: an oxidative challenge. *BioMetals.* 2010:23(5):927-940.

Corinne, M.S. Role of Stat's as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene.* 2004: 23(48):8017-8023.

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

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

Diep, P.T.N., Denizeau, F. y Jumarie, C. Kinetics of the early subcellular distribution of cadmium in rat hepatocytes. *Biometals.* 2005:18(3):255-267.

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

Dudley, A., Thomas D., Best J., Jenkins A. 2004. The STATs in cell stress-type responses. *Cell. Commun. Signal.* 2:2-8.

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

Fabbri, M., Urani, C. y Sacco, M.G. Whole genome analysis and microRNAs regulation in HepG2 cells exposed to cadmium. *ALTEX.* 2012:29(2):173-182.

Fontayne, A., Dang, P.M., Gougerot-Podiciao, M.A. y El-Bennan, J. Phosphorylation of p47phox sites by PKC α , BII, δ and ζ :Effect on Binding to P22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry.* 2002:(41):7743-7750.

Fotakis, G., Cemeli, E., Anderson, D. y Timbrell, J.A. Cadmium chloride induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line. *Toxicol In Vitro.* 2005:19(4):481-489.

Fotakis, G. y Timbrell, J.A. Role of trace elements in cadmium chloride uptake in hepatoma cell lines. *Toxicol Lett.* 2006:164 (2): 97-103.

Frame, M.C. Src in cancer: desregulation and consequences for cell behavior. *Biochim Biophys Acta.* 2002:(1602):114-130.

Friedman, SL. "Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications". *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol Hepatol.* 2004:1(2):98-105.

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

Garcia, R. L., Robles B. R. y Valenzuela S. E. "Las metalotioneínas y su relación con la toxicidad del cadmio en los mamíferos". *Rev. Int. Contam. Ambient.* 1999;15 (2):113-120.

Gardmo, C., Kotokorpi, P., Helander, H y Mode, A. Transfection of adult primary rat hepatocytes in culture. *Biochem Pharmacol.* 2005: 69;(12): 1805-1813.

Genestra, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signaling cascades and antioxidants. *Cell Signal.* 2007;19;(9):1807-1819.

Gerstein, S. A. "Molecular Biology; Problem Solver". Wiley-Liss.2001 pp.117.

Giannoni, E., Taddei, M.L. y Chiarugi, P. Src redox regulation: Again in the front line. *Free Radic Biol Med.* 2010: 49;(4):516-527.

Giuseppe, C., Ferruggia, E., Luparello, C. & Rinaldi, A. M. Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion.* 2009;9;(6):377-384.

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

Gupte, S. A., Kaminski P. M., George S., Kouznestova L., Olson S. C., Mathew R., Hintze T. H., Wolin M. S. 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.* 2009;(296):1048-1057.

Gurel, V., Sens, D.A., Somji, S., Garrett, S.H., Welland, T. y Sens, M.A. Post-transcriptional regulation of metallothionein isoform 1 and 2 expression in the human breast and the MCF-10A cell line. *Toxicol Sci.* 2005;(85):906-915.

Herrera, B., Murillo, M.M., Alvarez-Barrientos, A., Beltrán, J., Fernández, M., Fabregat, I. Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:16-26.

Hsiao, Ch. J. y Stapleton S. R. Early sensing and gene expression profiling under a low dose of cadmium exposure. *Biochimie.* 2009;(91):329-393.

Honda, A., Komuro, H., Hasegawa, T., Seko, Y., Shimada, A., Nagase, H., Hozumi, I., Inuzuka, T., Hara, H., Fujiwara, Y. y Satoh, M. Resistance of metallothionein-III null mice to cadmium-induced acute hepatotoxicity. *J Toxicol Sci.* 2010;35;(2):209-215.

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E. y Swanson, P.E. Cell Death. *N Engl J Med.* 2009: 361;(16):1570-1583.

Hou, T., Ray, S. y Brasier, A.R. The functional role of an interleukin 6 inducible CDK9 Stat3 complex in human gamma fibrinogen gene expression. *J Biol Chem.* 2007;282;(51):37091-37102.

Iaccio, A., Collinet, C., Gesualdi, N. M. & Ammendola, R. Protein kinase C- α and δ are required for NADPH oxidase activation in WKYMVm-stimulated IMR90 human fibroblast. *Archives of Biochem and biophysics.* 2007;(459):288-294.

IARC, Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. International Agency for Research on Cancer. 1993

Ingle, E. Src family kinases: Regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1784;(1):56-65.

Inoue, K., Takano, H., Shimada, A. y Satoh, M. Metallothionein as an Anti-Inflammatory mediator. *Mediators Inflamm.* 2009:1-7.

Jason, S., Rawling, Kristin M., Rosler. y Douglas A. H. The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell. Science* 2004:(117): 128-1283.

Jihen, E. H., Imed, M., Fatima, H. & Abdelhamid, K. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: Effects on the oxidative stress. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009:72;(5): 1559-1564.

Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P.J., Ward, C.W. y Burgess, A.W. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. *Exp Cell Res.* 2003:284;(1):31-53.

Kang, Y. J. Metallothionein redox cycle and function. *Exp Biol Med.* 2006:231(9):1459-1467.

Karim, S., Adams, D.H. y Lalor, P.F. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World J Gastroenterol.* 2012:18;(46):6771-6781.

Kao, C.Y., Factor, V.M. y Thorgeirsson, S.S. Reduced growth capacity of hepatocytes from c-myc and c-myc/TGF- α transgenic mice in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996:(222):64-70.

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

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

Klaassen, C. D., Liu, J. & Diwan, B. A. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009: 238; (3): 215-220.

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

Koizumi, S., Sone, T., Otaki, N. y Kimura, M. Cd²⁺ induced synthesis of metallothionein in HeLa cells. *Biochem J.* 1985:227;(3):879-886.

Kothinti, R.K., Blodgett, A.B., Petering, D.H. y Tabatabai, N.M. Cadmium down-regulation of kidney Sp1 binding to mouse SGLT1 and SGLT2 gene promoters: Possible reaction of cadmium with the zinc finger domain of Sp1. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010:(244):254-262.

Kundu, S., Sengupta, S., Chatterjee, S., Mitra., S. & Bhattacharyya, A. Cadmium induces lung inflammation independent of lung cell proliferation: a molecular approach. *J. Inflamm.* 2009:6;(19):1-15.

Kundu, S., Sengupta, S. y Bhattacharyya, A. EGFR upregulates inflammatory and proliferative responses in human lung adenocarcinoma cell line (A549), induced by lower dose of cadmium chloride. *Inhal Toxicol.* 2011:23;(6):339-348.

Lag, M., Westly, S., Lerstad, T., Bjornsrud, C., Refsnes, M. y Schwarze, P.E. Cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells: involvement of Bax and p53, but not of oxidative stress. *Cell Biol. Toxicol.* 2002:(18); 29-42.

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

Lambeth, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 2004:4;(3):181-168.

Leal, R.B., Posser, T., Rigon, A.P., Oliveira, C.S., Goncalves, C.A., Gelain, D.P. y Dunkley, P.R. Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology*. 2007:234;(1-2):34-43.

Lee, D.K., Carrasco, J., Hidalgo, J. y Andrews, G.K. Identification of a signaltransducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression. *Biochem J*. 1999:(337): 59–65.

Lemus, S. E. y Montaña J. A. Transactivación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK's) por receptores acoplados a proteínas G. *Rev. Biomed*. 2004:(15):33-48.

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

Lévesque, M., Martineau, C., Jumarie, C. y Moreau, R. Characterization of cadmium uptake and cytotoxicity in human osteoblast-like MG-63 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008:(231):308-317.

Liu, Z.M., Chen, G.G., Shum, C.K., Vlantis, A.C., Cherian, M.G., Koropatnick, J. y vanHasselt, C.A. Induction of functional MT1 and MT2 isoforms by calcium in anaplastic thyroid carcinoma cells. *FEBS Lett*. 2007:(581):2465-2472.

Liu, J., Qu, W. y Kadiska, M. B. 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009:238;(3):209-214.

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

Luparello, C., Sirchia, R., Longo, A. Cadmium as a transcriptional modulator in human cells. *Crit. Rev. Toxicol*. 2011:41;(1): 73-80.

Marcano, L.B.C., Carruyo, I. M., Montiel, X. M., Morales, C.B. & de Soto, P.M. Effect of cadmium on cellular viability in two species of microalgae (*Scenedesmus* sp. And *Dunaliella viridis*). *Biol. Trace Elem. Res.* 2009:130;(1):86-93.

Martin, P., Boulukos, K.E., Poggi, M.C. y Pognonec, P. Long-term extracellular signal-related kinase activation following cadmium intoxication is negatively regulated by a protein kinase C-dependent pathway affecting cadmium transport. *FEBS J.* 2009:276;(6):1667-1679.

Martin, P. y Pognonec, P. ERK and cell death: cadmium toxicity, sustained ERK activation and cell death. *FEBS J.* 2010:277;(1):39-46.

Miguel, B. G., Rodriguez, M. E., Aller, P., Martinez, A. M. y Mata, F. Regulation of cadmium induced apoptosis by PKC δ in U937 human promonocytic cells. *Biochim Biophys Acta.* 2005:1743;(3):215-222.

Moasser, M. M., Srethapakdi M., Sachar K. S-. Kraker A. J., Rosen N. Inhibition of Src kinases by Selective Tyrosine Kinase Inhibitor Causes Mitotic Arrest. *Cancer Research.* 1999:(59):6145-6152.

Moulis, J.M. y Thévenod, F. New perspectives in cadmium toxicity: an introduction. *Biometals.* 2010:23(5):763-768.

Nakagawa, T., Sawada, M., González, F. J., Yokoi, T. y Kamataki, T. Stable expression of human CYP2E1 in Chinese hamster cells: high sensitivity to N,N-dimethylnitrosamine in cytotoxicity testing. *Mutat Res.* 1996:360;(3): 181-186.

Nakamura, Y., Ohba, K., Suzuki, K. y Ohta, H. Health effects of low-level cadmium intake and the role of metallothionein on cadmium transport from mother rats to fetus. *J Toxicol Sci.* 2012:37;(1):149-156.

Natarajan, S.K. y Becker, D.F. Role of apoptosis-inducing factor, proline dehydrogenase, and NADPH oxidase in apoptosis and oxidative stress. *Cell Health Cytoskelet.* 2012;(4):11-27.

Okamoto, W., Okamoto, I., Arao, T., Yanagihara, K., Nishio, K. y Nakagawa, K. Differential roles of Stat3 depending on the mechanism of Stat3 activation in gastric cancer cells. *Br J Cancer.* 2011;105;(3):407-412.

Ortiz, C., Caja L., Sancho P., Bertran E., Fabregat I. 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.* 2008;(75):1935-1945.

Pan, J., Plant, J.A., Voulvoulis, N., Oates, C.J. & Ihlenfeld, C. Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environ. Geochem. Health.* 2009;32;(1): 1-12.

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

Puddicombe, S.M. y Davies, D.E. The role of MAP kinases in intracellular signal transduction in bronchial epithelium. *Clin Exp Allergy.* 2000;(30):7-11.

Qu, W., Ke, H., Broderick, P.J., French, J.E., Webber, M.M., Waalkes, M.P. Acquisition of apoptotic resistance in cadmium transformed human prostate epithelial cells: Bcl-2 overexpression blocks the activation of JNK signal transduction pathway. *Environ Health Perspect.* 2007;(115):1094-1100.

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

Rikans, L. E. y Yamano T. "Mechanisms of Cadmium-Mediated Acute Hepatotoxicity". J. Biochem. Mol. Toxicol. 2000;14;(2):110-117.

Roskoski, R. Src Kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005;(331):1-14.

Saad, Fred. Src as a therapeutic target in men with prostate cancer and bone metastases. BJUI international. 2008;(103):434-440.

Sadhu, C. y Gedamu, L. Regulation of human metallothionein (MT) genes. Differential expression of MTI-F, MTI-G and MTII-A genes in the hepatoblastoma cell line (HepG2). J Biol Chem. 1988;(263):2679-2684.

Sánchez-Lemus, E. y Arias-Montaña, J. Transactivación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK's) por receptores acoplados a proteínas G. Rev Biomed. 2004;15;(1):33-48.

Schiessinger, J. New Roles for Src Kinases in Control of Cell Survival and Angiogenesis. Cell. 2000;(100): 293-296.

Schnelldorfer, T., Gansauge S., Gansauge F., Schlosser S., Beger H G., Nussler A. Glutathione depletion causes cell growth inhibition and enhanced apoptosis in pancreatic cancer cells. Cancer. 2000;(89):1440-1447.

Scott, L. E. H. La Metalotioneínas y el estrés quirúrgico. REB. 2007;26;(2):67-72.

Shafer, J. T. 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. 1998;(99): 207-221.

Simeonova, P.P., Wang, S., Kashon, M.L., Kommineni, C., Crecelius, F. y Luster, M.I. Quantitative relationship between arsenic exposure and AP-1 activity in mouse urinary bladder epithelium. *Toxicol Sci.* 2001:(60):279-284.

Sirchia, R., Longo, A. & Luparello, C. Cadmium regulation of apoptotic and stress response genes in tumoral and immortalized epithelial cells of the human breast. *Biochimie.* 2008:(90): 1578-1590.

Sirchia, R. y Luparello, C. Short-term exposure to cadmium affects the expression of stress response and apoptosis-related genes in immortalized epithelial cells from the human breast. *Toxicol In Vitro.* 2009:(23):943-949.

Skarpen, E., Oksvold M. P., Grosvik H., Widnes C. y Huitfeldt H. S. Altered Regulation of EGF Receptor Signaling Following a Partial hepatectomy. *J. Cell. Physiol.* 2005:(202):707-716.

Slomiany, B. L. y Slomiany A. 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.* 2009:(60):49-55.

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

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

Souza, V., Escobar, M.C., Bucio, L., Hernández, E., Gómez-Quiroz, L. E. y Gutiérrez-Ruiz, M.C. NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced- Stat3 activation in HepG2 cells. *Toxicol Lett.* 2009:187;(3):180-186.

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

Suh, H.N., Lee, S.H., Lee, M.Y., Lee, Y.J., Lee, J.H. y Han, H.J. Role of interleukin-6 in control of DNA synthesis of hepatocytes: involvement of PKC, p44/42 MAPKs, and PPAR δ . *Cell Physiol Biochem* 2008;(22):673-684.

Swindell, W.R. Metallothionein and the biology of aging. *Ageing Res Rev.* 2011;10;(1): 132-145.

Thévenod, F. Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be?. *Toxicol. Appl. Pharm.* 2009;238;(3): 221-239.

Thijssen, S., Cuypers, A., Maringwa, J., Smeets, K., Horemans, N., Lambrichts, L. & Van Kerkhove, E. Low cadmium exposure triggers a biphasic oxidative stress response in mice kidneys. *Toxicology.* 2007;236;(1-2):29-41.

Thirumoorthy, N., Sunder, A.S., Kurmar, K.T.M., Kurmar, M.S., Ganesh, G.N.K. y Chatterjee, M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol.* 2011;(9):54.

Timofeeva, O.A., Chasovskikh, S., Lonskaya, I., Tarasova, N.I., Khavrutskii, L., Tarasov, S.G., Zhang, X., Korostyshevskiy, V.R., Cheema, A., Zhang, L., Dakshanamurthy, S. Brown, M.L. y Dritschilo, A. Mechanisms of unphosphorylated Stat3 transcription factor binding to DNA. *J Biol Chem.* 2012;287;(17):14192-14200.

Tokumoto, M., Fujiwara, Y., Shimada, A., Hasegawa, T., Seko, Y., Nagase, H., Satoh, M. Cadmium toxicity is caused by accumulation of p53 through the down-regulation of Ube2d family genes in vitro and in vivo. *J Toxicol Sci.* 2011;36;(2): 191-200.

Tseng, H.Y., Liu, Z.M. y Huang, H.S. NADPH oxidase-produced superoxide mediates EGFR transactivation by c-Src in arsenic trioxide-stimulated human keratinocytes. *Arch Toxicol.* 2012;36;(6):935-945.

Urani, C., Melchiorretto P., Canevali C., Morazzoni F. y Gribaldo L. Metallothionein and hsp70 expression in HepG2 cells after prolonged cadmium exposure. *Toxicology in vitro.* 2007;(21):314-319.

Valdés-Arzate, A., Luna, A., Bucio, L., Licona, C., Clemens, D.L., Souza, V., Hernandez, E., Kershenobich, D., Gutiérrez-Ruiz, M.C. y Gómez-Quiroz, L.E. Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med* 2009;47;(4): 424-30.

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

Vega-Avila, E. y Pugsley, M.K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc.* 2011;(54):10-14.

Vesey, D.A. Transport pathways for cadmium in the intestine and kidney proximal tubule: focus on the interaction with essential metals. *Toxicol Lett.* 2010;198;(1):9-13.

Wang, S. S., Chen L. y Xia S. K. Cadmium is acutely toxic for murine hepatocytes: effects on intracellular free Ca²⁺ homeostasis. *Physiol Res.* 2007;56;(2): 193-201.

Wang, H., Lafdil, F., Kong, X. y Gao, B. Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: A novel therapeutic target. *Int J Biol Sci.* 2011;7;(5):536-550.

Warren, J. L. "Role of Jak Kinases and STATs in Cytokine Signal Transduction". *Inter. J. Hematol.* 2001;(73): 271-277.

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

Xu, B., Chen, S., Luo, Yan., Chen, Zi., Liu, L., Zhou, H., Chen, W., Shen, T., Han, X., Chen, S. y Huang, Shile..Calcium signaling is involved in cadmium-induced neuronal apoptosis via induction of reactive oxygen species and activation of MAPK/mTOR network. *PLoS One.* 2011;6;(4):1-12.

Xuan, Y. T., Guo y., Zhu Y., Wang O-L., Rokosh G., Messing R. O., Bolli R. 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.* 2005;(112):1971-1978.

Yamamori, T., Inanami, Osamu., Naahata, H. & Kuwabara. Phosphoinositide 3-kinase regulates the phosphorylation of NADPH oxidase component p47phox by controlling cPKC/PKC δ but not Akt. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;316;(12):720-730.

Yu, X., Hong, S. y Faustman, E. M. Cadmium induced activation of stress signalling pathways, disruption of ubiquitin-dependent protein degradation and apoptosis in primary rat sertoli cell gonocyte cocultures. *Toxicol Sci.* 2008;104;(2):385-396.

Zalpus R. K. y Ahmad S. "Molecular handling of cadmium in transporting epithelia". *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2003;(186):163-188.

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

Zhang, Y., Zhang, J.W., Lv, G.Y., Xie, S.L. y Wang, G.Y. Effects of Stat3 gene silencing and rapamycin on apoptosis in hepatocarcinoma cells. *Int J Med Sci.* 2012;9;(3):216-224.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit

Hepatocytes display a compensatory survival response against cadmium toxicity by a mechanism mediated by EGFR and Src

K. Martínez Flores^{a,b}, B.C. Uribe Marín^a, V. Souza Arroyo^a, L. Bucio Ortiz^a, A. López Reyes^{a,c}, L.E. Gómez-Quiroz^a, E. Rojas del Castillo^d, M.C. Gutiérrez Ruiz^{a,*}

^aDepartamento Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico

^bExperimental Biology PhD program, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico

^cSubdirección de Investigación, Instituto Nacional de Rehabilitación, Mexico

^dMedicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 September 2012

Accepted 4 January 2013

Available online 29 January 2013

Keywords:

Cadmium
NADPH oxidase
ROS
Stat3
Src
EGFR
Erk
Metallothionein

ABSTRACT

Although the liver is a cadmium-target organ, hepatocyte response involved in its toxicity is not yet elucidated. A link between this heavy metal treatment and Stat3 signaling pathways was examined in primary mouse hepatocytes. We provided evidence of a novel link among NADPH oxidase and Stat3 signaling, mediated by Src, EGFR, and Erk1/2. Cadmium activates NADPH oxidase. ROS produced by this oxidase activates Src, enable that in turn, transactivates EGFR that activates Stat3 in tyrosine, allowing its dimerization. Also, ROS from NADPH oxidase favors ERK1/2 activation that phosphorylates Stat3 in serine, resulting in a compensatory or adaptive survival response such as production of metallothionein-II in short Cd exposure times. However, after 12 h CdCl₂ treatment, cell viability diminished in 50%, accompanied by a drastic decrease of metallothionein-II production, and an increase in p53 activation and the pro-apoptotic protein Bax.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cadmium (Cd), is a pollutant associated with several modern industrial processes, it is absorbed at significant quantities from cigarette smoke, water, food and air contamination. It is known that Cd have numerous undesirable effects on health in both, experimental animals and humans, targeting kidney, liver and vascular system (Cannino et al., 2009; Ellis et al., 2012). Cd induces cell damage by the impairment of key cellular functions, such as enzyme activities, DNA repair systems, changes in redox state and signal transduction (Souza et al., 2012). Although the liver is a Cd-target organ, the mechanisms involved in its toxicity are not yet clarified. Cells treatment to toxic metals is known to up-regulate the expression of a number of stress proteins, including metallothionein (MT) and members of the heat shock protein (HSP) family (Luparello et al., 2011). MT's are low molecular weight non-enzyme cytosolic proteins with high cysteine content, which play a physiological role in metal ion homeostasis. Induction of

MT protects against acute Cd-induced lethality, as well as acute liver and lungs toxicity, and plays important roles in the detoxification of heavy metals, scavenging oxygen radicals, and stabilizing biomembranes. In recent years, accumulating experiments have shown that MT, is a strong endogenous cytoprotective agent against hepatocyte injury. Cd markedly induces MT-I and MT-II, the abundance of MT-II was found to be higher in liver (Klaassen et al., 2009; Zhang et al., 2012). In the liver, signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) has been shown to play a key role in acute phase response, protection against organ injury, promotion of regeneration, glucose homeostasis, and hepatic lipid metabolism (Gao, 2005). It has been reported that promoter region of the MT gene contains functional Stat3-regulatory sequence, providing the causality between Stat3 activation and MT induction (Lee et al., 1999). Stat3 is activated by IL-6, IL-22, IL-10, EGF, HGF, and hepatitis B and C viral proteins (Schaper et al., 1997; Gong et al., 2001; Waris et al., 2001; Gao, 2005). Disruption of the Stat3 gene impairs liver regeneration (Li et al., 2002) and causes insulin resistance associated with increased hepatic expression of gluconeogenic genes (Inoue et al., 2004). Overexpression of constitutively activated Stat3 reduces blood glucose, plasma insulin concentrations and hepatic gluconeogenic gene expression in diabetic mice (Inoue et al., 2004) and protects against Fas-induced fulminant hepatitis via redox-dependent and independent

* Corresponding author. Address: Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Avenida San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, México D.F. 09340, Mexico. Tel.: +52 55 58046451; fax: +52 55 58044730.

E-mail address: mcgr@xanum.uam.mx (M.C. Gutiérrez Ruiz).

mechanisms (Haga et al., 2003). Src activates Stat3 as Src PTK inhibitor pretreatment decreased phosphorylation of Src PTKs, and Stat3 phosphorylation (Han et al., 2008; Oyaizu et al., 2012). Previous data from our group (Souza et al., 2009), indicate that Stat3 activation, in HepG2 cells, was stimulated after 1 h with 5 μM CdCl₂ treatment. Serine phosphorylation was involved in Stat3 activation. NADPH oxidase and redox-sensitive signaling molecules such as ERK are involved in this response. Pharmacological inhibition of NADPH oxidase and ERK abolished the delay phosphorylation of Stat3 and reduces Hsp70, a Cd stress-responsive protective protein known to be transactivated by Stat3 in hepatocytes.

In the present study we described a link between Cd cellular uptake and Stat3 signaling pathway examined in primary mouse hepatocytes and the hepatoprotective effects of Stat3 on the early Cd-induced hepatocyte damage, and the involvement of MT-II in this process, when cells presented a near 100% of viability and how this effect was lost after a longer exposure time. Our data suggest that Cd induces MT-II production at early times, however, despite the induction of protective proteins, hepatocytes die 12 h after Cd treatment. Thus, evidence is compelling that Stat3 importantly regulates various physiological functions in the hepatocyte. In this report, we described a novel link among NADPH oxidase and Stat3 signaling, mediated by Src, EGFR, and ERK1/2. Cadmium activates NADPH oxidase. ROS produced by NADPH oxidase activates Src. Src stimulation transactivates EGFR. EGFR-mediated activation of Stat3 in tyrosine permits its dimerization which allows binding to DNA. Also, ROS from NADPH oxidase favors ERK1/2 activation that phosphorylates Stat3 in serine, resulting in a protective response such as production of MT-II in short Cd exposure times. However, this response is not sufficient because after 12 h Cd treatment, 50% of the cells die by apoptosis in primary mouse hepatocytes.

2. Materials and methods

2.1. Primary mouse hepatocytes isolation and culture

CD1 mice were maintained in pathogen-free housing and cared for in accordance with the Universidad Autonoma Metropolitana and the International Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Hepatocytes were isolated from 8 to 10-week-old male mice by a two-step collagenase perfusion technique followed by isodensity purification in a Percoll gradient as described by Kao et al. (1996). Freshly isolated hepatocytes of >90% viability, as assessed by trypan blue exclusion, were seeded at 254,000 cells/cm² either in Petri dishes or flasks (Nalge Nunc, New York, USA) in Williams' E medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Hyclone Laboratories Inc., Logan Utah, USA). The cells were incubated at 37 °C (5% CO₂ and 95% air at saturation humidity) and checked for adherence of monolayer after 4 h. Once adhered, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and the medium was replaced for a serum-free basal hepatocyte growth medium. The following day, cells were treated with serum-free basal growth medium with 5 μM CdCl₂ or without it.

2.2. Experimental design

Hepatocytes were treated with CdCl₂ for different times (5, 10, 15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, or 12 h). After Cd treatment, cells were washed twice with PBS, and cells were lysed. MT-II and activation of Src, EGFR, ERK 1/2 and Stat3 were analyzed by Western blot. Control cells without CdCl₂ were seeded at the same time. For the studies using inhibitors, cells were pretreated 30 min before Cd with 10 μM SU6656 (SU, Src inhibitor), 1.0 μM 2-aminoethyl benzenesulfonyl fluoride hydrochloride AEBSF (AE, NADPH oxidase

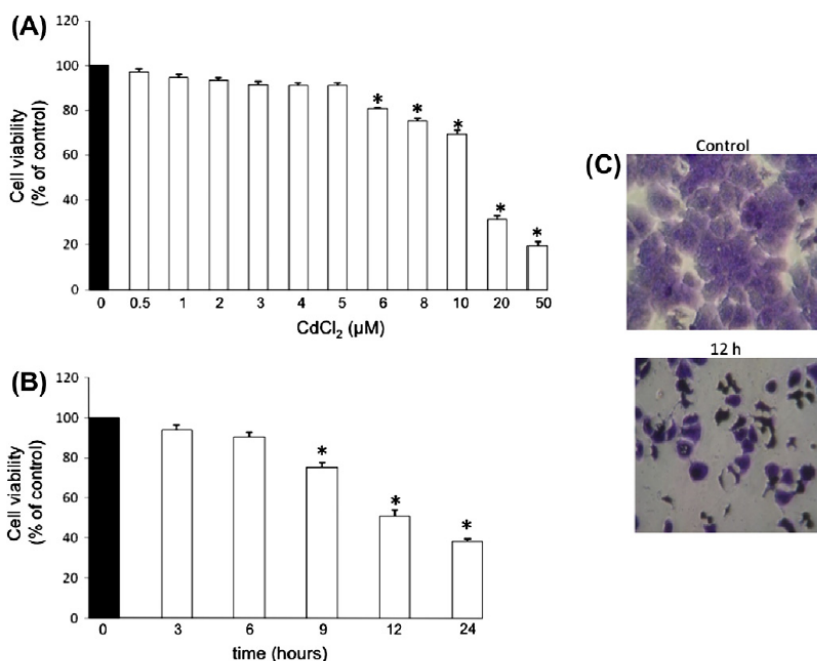


Fig. 1. Effect of CdCl₂ treatment on primary cultured mice hepatocytes viability. (A) Cells were exposed to 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 and 50 μM of CdCl₂ for 6 h and viability was determined by crystal violet-staining assay. (B) Cell viability at different times of 5 μM CdCl₂ treatment. Results are expressed as percent viability vs. control cells. Each bar represents the mean \pm S.E. of at least three independent experiments. *Significantly different from control ($p < 0.05$). (C) Representative phase contrast microscopy images with crystal violet staining control and 12 h CdCl₂ treatment (100 \times).

inhibitor) (Sigma Aldrich), 3 nM tyrphostin AG1478 (AG, EGFR inhibitor) (Enzo Life Sciences) or 20 μ M PD9805910 (PD, ERK1/2 inhibitor) (Calbiochem, USA). In the case of antioxidant treatment, hepatocytes were pre-treated 30 min before Cd treatment with 0.5 mg/ml of polyethylene glycol conjugated catalase (pCAT) (Sigma Aldrich). All experiments were conducted in primary mouse hepatocytes isolated from at least three mice and carried out by triplicate.

2.3. Cell viability

Cell viability was evaluated by crystal violet-staining assay as described by Nakagawa et al. (1996). Briefly, 1×10^6 hepatocytes were seeded into 12-well plates (Nalge Nunc, New York, USA) and exposed to different CdCl₂. At the end of treatments, cells were washed with PBS and stained with 0.2% crystal violet for 30 min at room temperature. Then, plates were rinsed with water three times and dried at room temperature. Afterwards, 100 μ L of 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) was added to release the dye and estimate cell viability. The absorbance of each well at 620 nm was measured using a microplate reader (Multimode detector DTX 880, Beckman Coulter). Results are expressed as percentage of cell viability referred to the absorbance measurement obtained from untreated cells.

2.4. Reactive oxygen species (ROS) detection

Intracellular ROS was monitored by 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma–Aldrich). Hepatocytes (2×10^5 cells) were pretreated with 1.0 μ M AEBSF for 30 min and then treated with 5 μ M CdCl₂ for the indicated time,

250 μ M H₂O₂ was used as a positive control. Cells were washed with ice-cold PBS and incubated with DCFH-DA for 30 min. Cells were, scraped and suspended in ice-cold PBS in the dark and fluorescence intensity was measured with excitation wavelength of 503 nm and emission wavelength of 529 nm using a Multimode Detector (DTX880, Beckman Coulter).

2.5. NADPH oxidase activity

Cells incubated in the absence or presence of CdCl₂ were scraped into ice-cold PBS, pH 7.4, and centrifuged at 2500xg for 5 min at 4 °C, and re-suspended in PBS. NADPH oxidase activity was analyzed as described previously (Herrera et al., 2004). Cells were incubated with 250 μ M NADPH and NADPH consumption was monitored by the decrease in absorbance at $\lambda = 340$ nm for 5 min. In the case of NADPH oxidase inhibition, 10 μ M diphenylene iodonium (DPI) were added 30 min before the assay. An aliquot of cells was lysed with SDS to determine protein content. Results were expressed as pmoles of oxidized NADPH per minute per milligram of protein.

2.6. Cell lysis and Western blot

Hepatocytes (1.5×10^6 cells) were collected and washed twice with ice-cold PBS. The cell pellet was resuspended in 150 μ L of lysis buffer M-PER (Pierce Chemical, Rockford, Illinois) supplemented with proteases inhibitor (Complete, Roche Applied Science, Indianapolis, USA) and phosphatases inhibitor (PhosphoStop, Roche Applied Science, Indianapolis, USA). Western blot procedure was conducted as reported previously (Valdés-Arzate et al., 2009). Immunodetection was performed using primary antibody listed

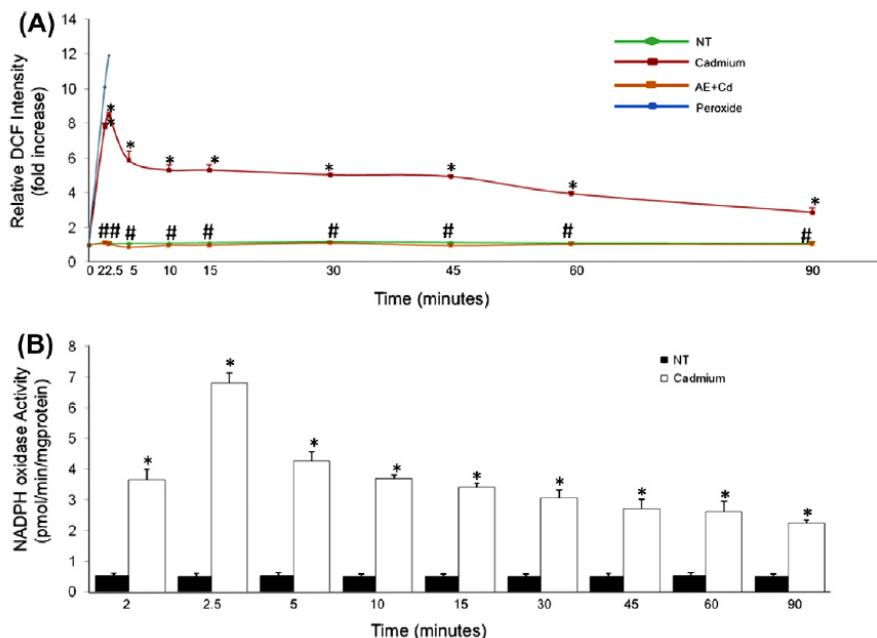


Fig. 2. Cadmium-induced ROS generation, NADPH oxidase contribution in ROS generation and NADPH oxidase activity in primary culture hepatocytes. (A) The cells were pretreated with 1.0 μ M AEBSF (AE) (NADPH oxidase inhibitor) for 30 min, and exposed to 5 μ M CdCl₂ for different times. Intracellular ROS formation was determined by DCFH fluorescence. The results are expressed as fold increased compared with not treated cells (NT). (B) For NADPH oxidase activity, cells were incubated with 250 μ M NADPH and NADPH consumption was monitored by the decrease in absorbance at $\lambda = 340$ nm for 5 min. Results are expressed as pmol of oxidized NADPH per minute per milligram of protein. Each bar represents the mean \pm S.E. of at least three independent experiments. *Significantly different from NT ($p < 0.05$) or #versus CdCl₂ alone ($p < 0.05$).

in Supplementary Table 1. Secondary antibody was horseradish peroxidase-conjugated and was used according primary antibodies. Blots were revealed using supersignal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce Biotechnology, USA). Protein bands were scanned and the band intensities quantified using a densitometer Imaging System (Gel Logic 1500).

2.7. Immunoprecipitation

Cell lysates (3.0 mg/ml) were pre-cleared with matrix A-rabbit (Santa Cruz Biotechnology, USA) for 1 h at 4 °C. Lysates were treated with anti-Src, anti-Stat3 antibody overnight at 4 °C with gentle rotation. Immune complexes were precipitated by incubation with protein-AG agarose beads (Santa Cruz Biotechnology, USA) at 4 °C for 1 h and collected by centrifugation. Immunoprecipitates were washed with lysis buffer and then electrophoresed on 4–20% gradient precast gels Lonza, USA). Protein was transferred to PVDF membranes (G.E. Healthcare life sciences, USA) and blotted as described above using anti-EGFR, anti-Src or antiStat3.

2.8. Apoptosis determination by flow cytometry

Apoptotic cell death was determined using an Annexin-V Fluos staining kit (Roche Applied Science, USA) according manufacturer's instructions. Samples were analyzed with FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Apoptotic cells were identified as Annexin V-positive/PI-negative cells.

2.9. Protein content determination

Protein content was determined using a bicinchoninic acid (BCA) kit (Pierce Chemical, USA) according manufacturer's instructions.

2.10. Data analysis

The data are presented as mean ± S.E. for at least three independent experiments carried out by triplicate (n = 9). Comparison between groups were made using ANOVA test with a Tukey Post Hoc analysis. Differences were considered significant at p < 0.05. The SPSS software version 10 was used to run the analysis.

3. Results

3.1. Cell viability

Cell viability in the presence of increasing cadmium concentrations was determined by the crystal violet-staining assay. Results obtained indicate that exposure of hepatocytes to different CdCl₂ concentrations for 6 h from 0.5 to 5 μM did not affect cell survival, while an increasing inhibitory effect was observed at higher Cd concentrations reaching 20% viability with 50 μM (Fig. 1A). In order to verify an early survival hepatocyte response to Cd, we chose 5 μM CdCl₂, a concentration that preserves 100% viability at 6 h, but kills about 60% cells at 24 h (Fig. 1B). Characteristic morphological changes associated with cell death, such as shrinkage,

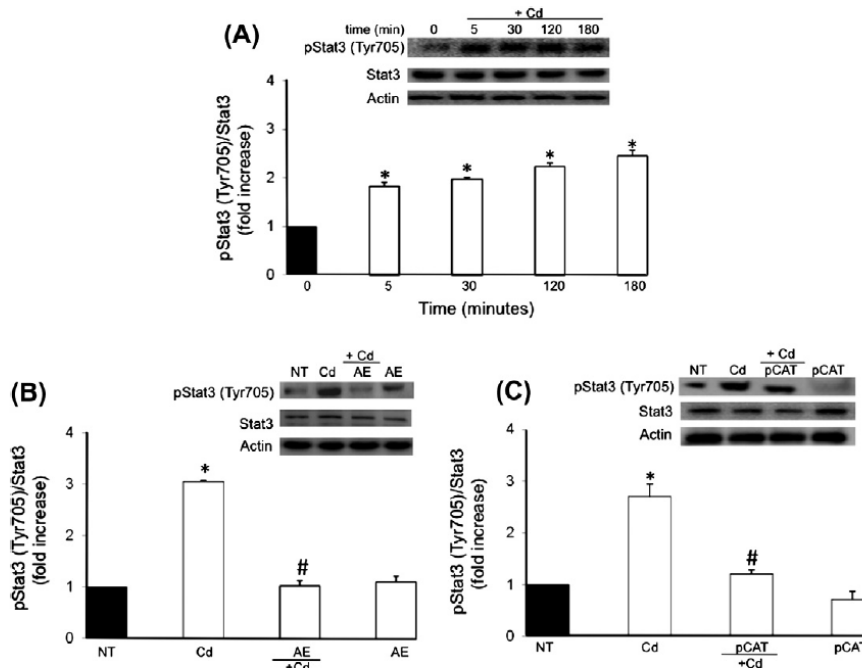


Fig. 3. Cadmium-induced Stat3 tyrosine activation was suppressed by specific NADPH oxidase inhibitor or antioxidant (pCAT) treatment in primary cultured mice hepatocytes. (A) Hepatocytes were treated for various times with 5 μM CdCl₂ or (B) pretreated with 1.0 μM AEBF (AE) (NADPH oxidase inhibitor) or (C) 0.5 mg/ml of polyethylene glycol conjugated catalase (pCAT) for 30 min and exposed to 5 μM CdCl₂ for 2 h. The total protein was extracted and prepared for Western blot. Representative Western blot and densitometric analysis of phosphor Tyrosine⁷⁰⁵ Stat3 activation. (A) Effect of NADPH oxidase inhibition (B) and antioxidant treatment with pCAT (C) on phospho Tyrosine⁷⁰⁵ Stat3. The results are expressed as fold increase compared with not treated cells (NT). Each bar represents the mean ± S.E. of at least three independent experiments. *Significantly different from NT (p < 0.05) or #versus CdCl₂ alone (p < 0.05).

rounding, and floating, were observed by phase contrast microscopy in hepatocytes treated for 12 h with CdCl₂ (Fig. 1C).

3.2. Cadmium induced ROS generation by NADPH oxidase activation

In the present study, we determined ROS generation in primary cultures of mouse hepatocytes in response to Cd, we found an increase in ROS at 2 min, which presented different control cell values even at 90 min. To corroborate that ROS derived from NADPH oxidase activation, it was inhibited with AE, which abrogates the generation of ROS (Fig. 2A). To confirm NADPH oxidase participation, the enzyme activity was determined (Fig. 2B), which is consistent with the finding of ROS production in panel A.

3.3. Stat3 activation

The next point to consider was whether Stat3 activation was involved in the initial protective response in Cd treated cells and how it was activated. Several studies have demonstrated that activation of Stat3 signaling pathway triggered liver protection. Stat3 activity is initiated when tyrosine 705 (Tyr-705) is phosphorylated, further phosphorylation are required to complete Stat3 activation, particularly in serine 727, which lead to DNA binding to induce the transcription of cell survival proteins. Therefore, we tried to determine whether Stat3 might be involved in the protection against Cd injury. Previous work from our group showed that Hsp70 induction was partially dependent from Stat3 activation (Souza et al., 2009). First, we assessed Stat3 activation at various time points after cells were treated with 5 μM CdCl₂. As shown in Fig. 3A, Stat3 phosphorylation in tyrosine 705 was dynamically

changed after Cd treatment, it quickly increased at 5 min and activation was maintained until 180 min. In order to evaluate the participation of NADPH oxidase in Stat3 (Tyr-705) activation, hepatocytes were pretreated with AE and then treated during 2 h with Cd. Stat3 (Tyr-705) activation presented control cell value (Fig. 3B). ROS participation on Stat3 Tyr activation was determined by treating hepatocytes with an antioxidant, pCAT. Fig. 3C shows antioxidant treatment decreased Stat3 Tyr activation. Then, phosphorylation at serine 727 was determined. Fig. 4A shows that Stat3 serine 727 phosphorylation increased after 60 min Cd treatment, peaked at 120 min. NADPH oxidase participation (Fig. 4B) and ROS contribution (Fig. 4C) in Stat3 (Ser-727) activation was determined in presence of AE and antioxidant treatment. In both cases, Stat3 (Ser 727) phosphorylation decreased to control cell values.

3.4. Cadmium induced Src activation

The mechanism accounting for Stat3 activation could relies on the Src pathway and is independent of the canonical Stat3 activator Janus-activated kinase (JAK2). Further experiments were carried out to identify the possible up-stream molecules that mediate Stat3 (Tyr 705) activation in our system. Since Src can bind and activate Stat3 in other cells, we performed Western blot analysis at various Cd time exposures (Fig. 5A) and the effect of NADPH oxidase inhibition (Fig. 5B) and an antioxidant treatment (Fig. 5C) were also evaluated on Src-Tyr 418 phosphorylation. Src activation was increased 3 min after Cd treatment and remained active until 180 min. NADPH oxidase inhibition and antioxidant treatment decreased Src activation.

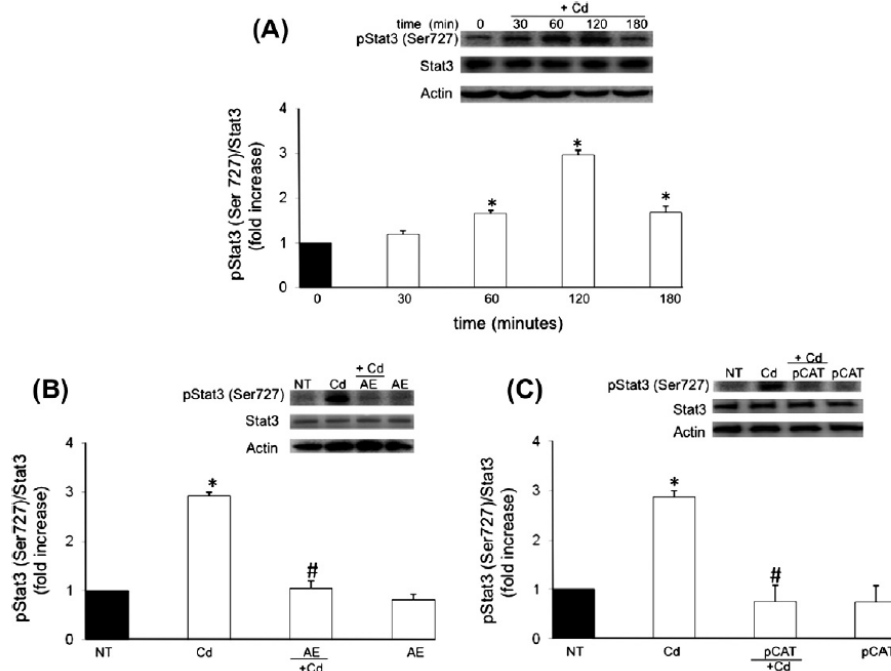


Fig. 4. Cadmium-induced Stat3 serine activation was suppressed by specific NADPH oxidase inhibitor or antioxidant (pCAT) treatment in primary cultured mice hepatocytes. (A) The cells were treated with 5 μM CdCl₂ for various times or (B) pretreated with 1.0 μM AEBSF (AE) (NADPH oxidase inhibitor) or (C) 0.5 mg/ml of polyethylene glycol conjugated catalase (pCAT) for 30 min and exposed to 5 μM CdCl₂ for 2 h. The total protein was extracted and prepared for Western blot. Representative Western blot and densitometric analysis of phospho Serine⁷²⁷ Stat3 activation (A). Effect of AEBSF (AE) (B) or antioxidant treatment with pCAT (C) on phospho Serine⁷²⁷ Stat3. The results are expressed as fold increase compared with not treated cells (NT). Each bar represents the mean ± S.E. of at least three independent experiments. *Significantly different from NT ($p < 0.05$). #Versus CdCl₂ alone ($p < 0.05$).

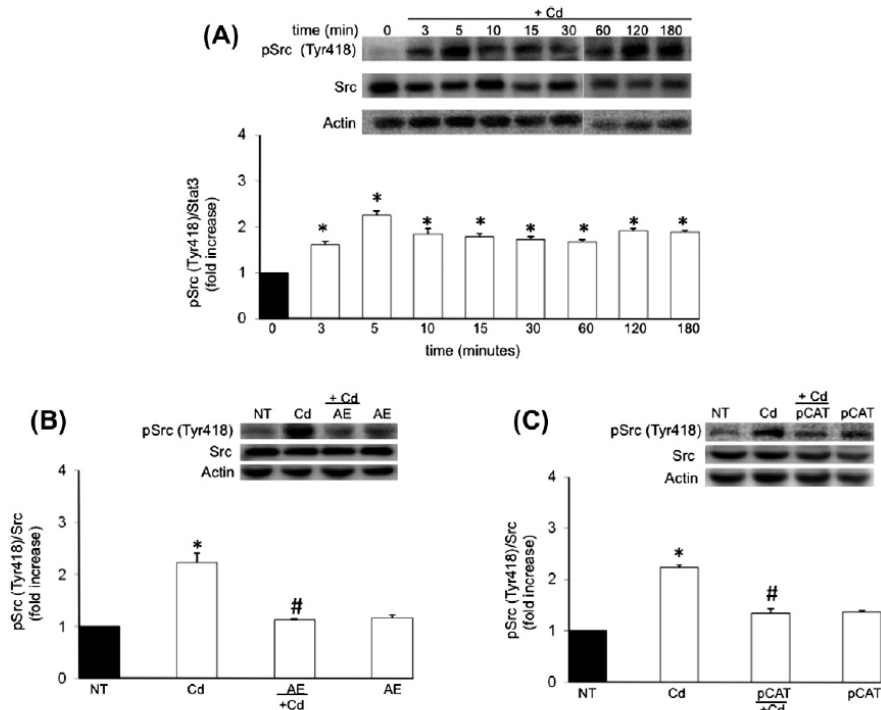


Fig. 5. Cadmium-induced protein c-Src activation and effect of NADPH oxidase inhibition or antioxidant (pCAT) treatment on Src activation in primary cultured mice hepatocytes. (A) Hepatocytes were treated with 5 μ M CdCl₂ for various times or (B) pretreated with 1.0 μ M AEBSF (AE) (NADPH oxidase inhibitor) or (C) 0.5 mg/ml of polyethylene glycol conjugated catalase (pCAT) for 30 min and exposed to 5 μ M CdCl₂ for 5 min. The total protein was extracted and prepared for Western blot. (A) Representative Western blot and densitometric analysis of phospho c-Src. (B) Effect of AEBSF(AE) or (C) pCAT on phospho c-Src. The results are expressed as fold increase compared with not treated cells (NT). Each bar represents the mean \pm S.E. of at least three independent experiments. *Significantly different from NT ($p < 0.05$). #Versus CdCl₂ alone ($p < 0.05$).

3.5. EGFR participation in response to cadmium

It is known that epidermal growth factor receptor (EGFR) could activate Stat3. Receptor phosphorylation at tyrosine 845 (Tyr845), in its catalytic domain, is involved in sustaining activation, to facilitate binding with cell surface substrates, and it is also the binding site for Src kinase. Signal crosslinking involving EGFR transactivation is involved in the regulation of a wide variety of important cellular functions. One of the proteins involved in the transactivation of the EGFR kinase is Src (Slomiany and Slomiany, 2004). EGFR activation generates signals that induce proliferation, differentiation and cell survival through ERK1/2. So, our next objective was to determine EGFR participation in Cd response. Fig. 6 shows EGFR activation as a result of Cd treatment (Fig. 6A), and activation decreased after 2 h Cd treatment when hepatocytes were pretreated with NADPH oxidase inhibitor (Fig. 6B) or Src inhibitor (Fig. 6C), in the latter case the decrease in EGFR activation diminished about 30%, which indicates that other pathways, are involved in EGFR activation. An immunoprecipitation was done to determine whether Cd response influence Src association with EGFR. Fig. 6D shows that an interaction of Src and EGFR receptor was established as a result of Cd treatment.

3.6. Src and EGFR participation in Stat3 activation in response to cadmium treatment

Hepatocytes were treated with Src inhibitor, SU, or EGFR inhibitor, AG, prior to Cd treatment (2 h) and Stat3 activation in tyrosine

(Fig. 7A) and serine (Fig. 7B) was determined by Western blot. Inhibition of Src and EGFR abrogated Stat3 phosphorylation, both in tyrosine and serine. Immunoprecipitation showed an interaction between Src and Stat3 (Fig. 7C) and EGFR and Stat3 (Fig. 7D) as a result of hepatocytes to Cd treatment.

3.7. ERK1/2 participation in Stat3 activation

EGFR activation generates signals that induce cell survival through ERK1/2 activation. Phospho-ERK1/2 increased significantly after 30 min Cd treatment, decreasing to baseline values at 180 min (Fig. 8A). NADPH oxidase inhibition decreased ERK1/2 activation to basal values (Fig. 8B) and the same behavior was observed by inhibiting Src or EGFR (Fig. 8C). Stat3 serine activation was abolished when ERK1/2 was inhibited (Fig. 8D).

3.8. Metallothionein

A specific protective mechanism is the induction of MT-II, a small protein that can bind Cd with high efficiency and is important for metal detoxification. Induction of MT-II protects against Cd cytotoxicity, as well as acute toxicity to the liver. We therefore determined the effect of Cd at different exposure times on MT-II levels in hepatocytes. As shown in the blot in Fig. 9A, MT-II level was very low in hepatocytes not treated with Cd. MT-II induction in hepatocytes increased with cadmium time exposure, reaching a peak at 4 h which was maintained until 6 h metal treatment, and being no detectable at 12 h. The decrease in the content of

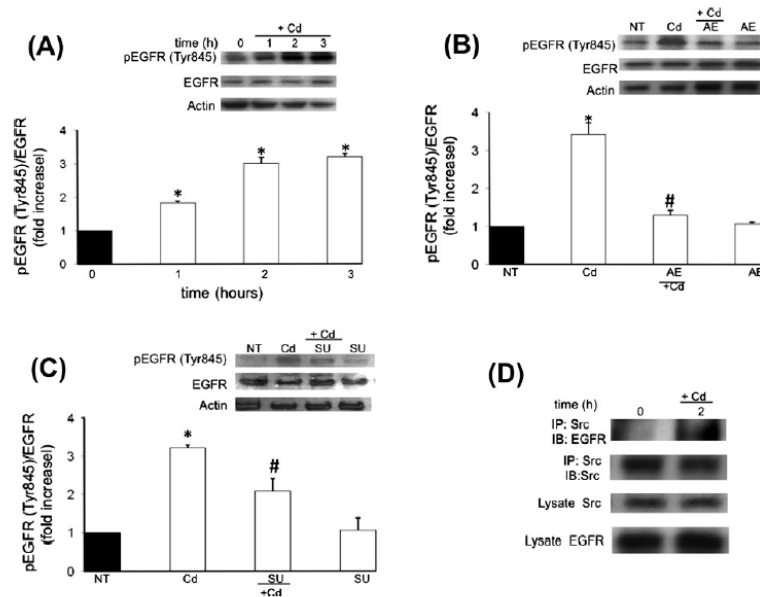


Fig. 6. Cadmium-induced protein EGFR phosphor Tyrosine⁸⁴⁵ activation and effect of NADPH oxidase inhibition (AEBSF) (AE) or Src inhibition (SU6656) (SU) on EGFR activation in primary cultured mice hepatocytes. The cells were treated with 5 μM CdCl₂ for various times or pretreated with 1.0 μM AEBSF (AE) (NADPH oxidase inhibitor) or 10 μM SU6656 (SU) (Src inhibitor) for 30 min and exposed to 5 μM CdCl₂ for 2 h. The total protein was extracted and prepared for Western blot or immunoprecipitation with anti-c-Src and the membranes were immunoblotted with the antibody against EGFR. (A) Representative Western blot and densitometric analysis of phosphor EGFR activation. (B) Effect of AEBSF (AE) or (C) SU6656 (SU) on phospho EGFR. (D) Representative Western blot of c-Src IP, immunoprecipitation, IB, immunoblot. The results are expressed as fold increase compared with not treated cells (NT). Each bar represents the mean ± S.E. of at least three independent experiments. *Significantly different from NT ($p < 0.05$). #Versus CdCl₂ alone ($p < 0.05$).

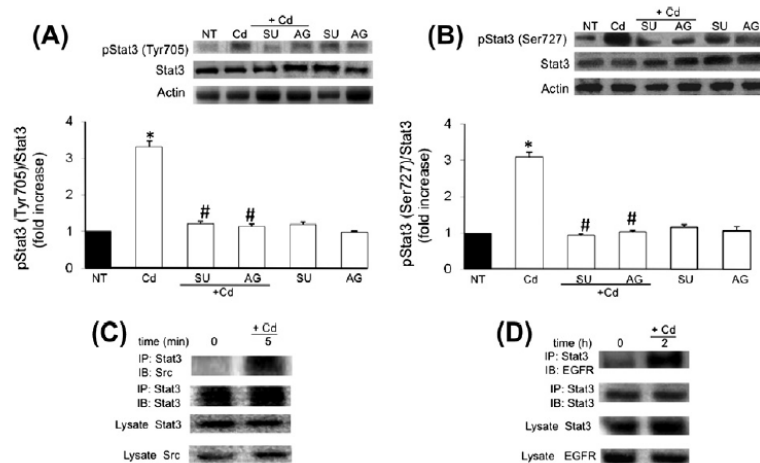


Fig. 7. Cadmium-induced Stat3 tyrosine and serine activation activation were suppressed by specific EGFR and Src inhibitors in primary cultured mice hepatocytes. The cells were pretreated with 10 μM SU6656 (SU) (Src inhibitor) or 3 nM tyrothostin Ag1478 (AG) (EGFR inhibitor) for 30 min and exposed to 5 μM CdCl₂. The total protein was extracted and prepared for Western blot or immunoprecipitation with anti-Stat3 and the membranes were immunoblotted with the antibody against c-Src or EGFR. (A) Representative Western blot and densitometric analysis of effect SU6656 (SU) or tyrothostin Ag1478 (AG) on phospho Tyrosine⁷⁰⁵ Stat3 or (B) phospho Serine⁷²⁷ Stat3 in 2 h hepatocytes treated with Cd. (C) Representative Western blot of Stat3 IP, immunoprecipitation, IB, immunoblot c-Src of hepatocytes treated for 5 min with CdCl₂ or (D) EGFR of hepatocytes treated for 2 h with CdCl₂. The results are expressed as fold increase compared with not treated cells (NT). Each bar represents the mean ± S.E. of at least three independent experiments. *Significantly different from NT ($p < 0.05$) and #versus CdCl₂ alone ($p < 0.05$).

MT-II matched up with cell viability. After 12 h Cd treatment, cells presented a viability of about 50% when it was no longer detectable MT-II. Following experiments were performed after 4 h Cd treat-

ment when a substantial increase in MT-II was observed. Fig. 9B shows that inhibition of NADPH oxidase reduced significantly MT-II content, indicating that NADPH oxidase was involved in

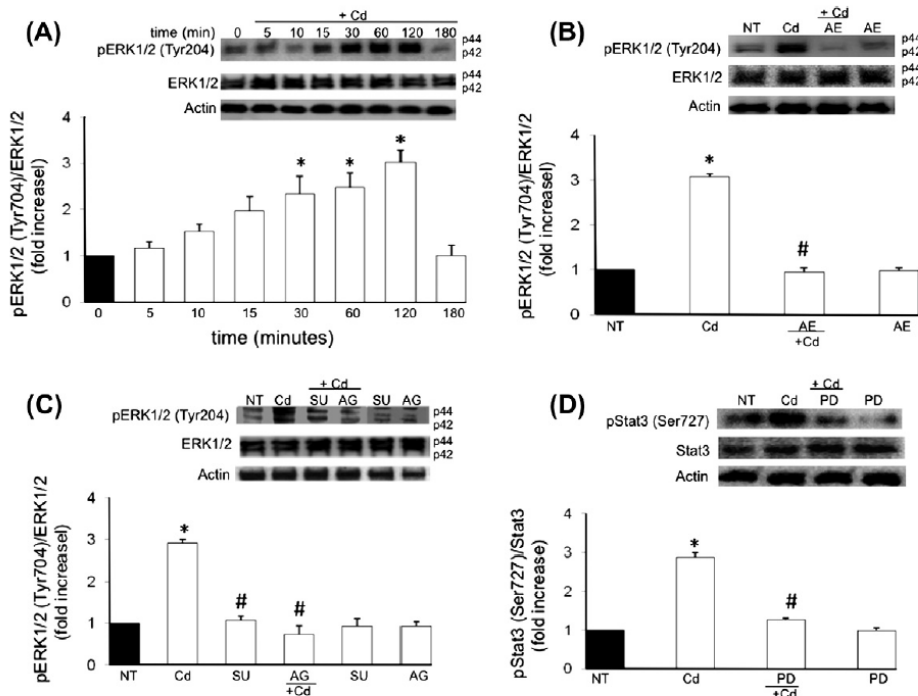


Fig. 8. Cadmium-induced Erk1/2 activation and effect of NADPH oxidase, Src and EGFR inhibition on Erk1/2 phosphorylation. Erk1/2 inhibition suppresses Stat3 serine activation on primary cultured mice hepatocytes. The cells were treated with 5 μ M CdCl₂ for various times or pretreated with 1.0 μ M AEBSF (AE) (NADPH oxidase inhibitor), 10 μ M SU6656 (SU) (Src inhibitor), 3 nM tyrphostin Ag1478 (AG) (EGFR inhibitor) or 20 μ M PD980591 (PD) (Erk1/2 inhibitor) for 30 min and then exposed to 5 μ M CdCl₂ for 1 h in the case of Erk1/2 (B and C) determination or 2 h in the case of Stat3 activation (D). The total protein was extracted and prepared for Western blot. (A) Representative Western blot and densitometric analysis of phospho Erk 1/2 activation or (B) effect of NADPH oxidase inhibition or (C) Src or EGFR inhibition on Erk1/2 activation. (D) Representative Western blot and densitometric analysis of Erk1/2 inhibition (PD9805910) (PD) on phospho Serine⁷²⁷ Stat3. The results are expressed as fold increase compared with not treated cells (NT). Each bar represents the mean \pm S.E. of at least three independent experiments. *Significantly different from NT ($p < 0.05$) and # versus CdCl₂ alone ($p < 0.05$).

the signaling pathway that results in production of this protective protein, as well as Src and EGFR (Fig. 9C), because Src or EGFR inhibition also decreased MT-II content.

3.9. Cadmium induces apoptosis

Cadmium induced a time-dependent cell death after 9 h of treatment (Fig. 1B). In order to evaluate hepatocyte death, apoptosis induced by Cd was quantified by flow cytometry. A significantly apoptotic index increase was observed after 12 h Cd exposure (Fig. 10A and B). p53 were time-dependent increased in Cd-exposed hepatocytes as early as 3 h after exposure (Fig. 10C) and this effect was related to the increment in one of its main target genes, Bax (Fig. 10D).

4. Discussion

The mechanism of Cd-induced hepatotoxicity is not completely understood because this metal exerts differential response, depending on concentration, time of exposure and cell type. Although Cd accumulates in the liver and this tissue has been the target of several studies related to Cd, most of the findings are from *in vivo* studies or hepatic cell lines (Park et al., 2001). Relatively few data are available on the direct effect in hepatocytes. Our aim was to study the signaling pathway involved in hepatocytes as a result of Cd aggression, MT-II protective response in early times and how

this defensive response was overtaken and eventually cells die. Previous data from our lab in WRL-68 and HepG2 cell lines showed that Cd produces oxidative stress and cells respond in different ways to compensate cell damage (Bucio et al., 1995; López-Ortal et al., 1999; Souza et al., 2004, 2009; Escobar et al., 2009). Recently we present clear evidence that Cd induces an early ROS production involved in signaling pathways that could not be considered as cytotoxic response to Cd, by a mechanism depending on NADPH oxidase activity. We showed that serine phosphorylation of Stat3 in the absence of tyrosine phosphorylation, play an important role in Cd-induced HepG2 cells protective response (Souza et al., 2009). In this study, we show a different Cd response in primary cultured hepatocytes because Stat3 must be activated in tyrosine and then in serine sites. Hepatocytes exposure to CdCl₂ induced cell death in dose- and time-dependent manner. Cells exposed to 5 μ M CdCl₂ initially respond by producing MT-II as a protective response to Cd aggression. This response is mediated by Stat3 activation. However, after 12 h CdCl₂ treatment, cell viability approximately decreased 50%, with a dramatic fall in MT-II content while p53 and its target gene, the pro-apoptotic protein Bax, increased. Stat3 activation depended on NADPH oxidase activation. ROS production activated Src, that transactivated EGFR, which allowed Stat3 tyrosine phosphorylation. ROS also activated ERK1/2, which in turn promoted serine Stat3 activation and MT-II was produced protecting hepatocytes against Cd injury.

Previous data show that the human fetal hepatic cell line, WRL-68, have a LC₅₀ value of 4.66 μ M after 24 h CdCl₂ treatment (Bucio

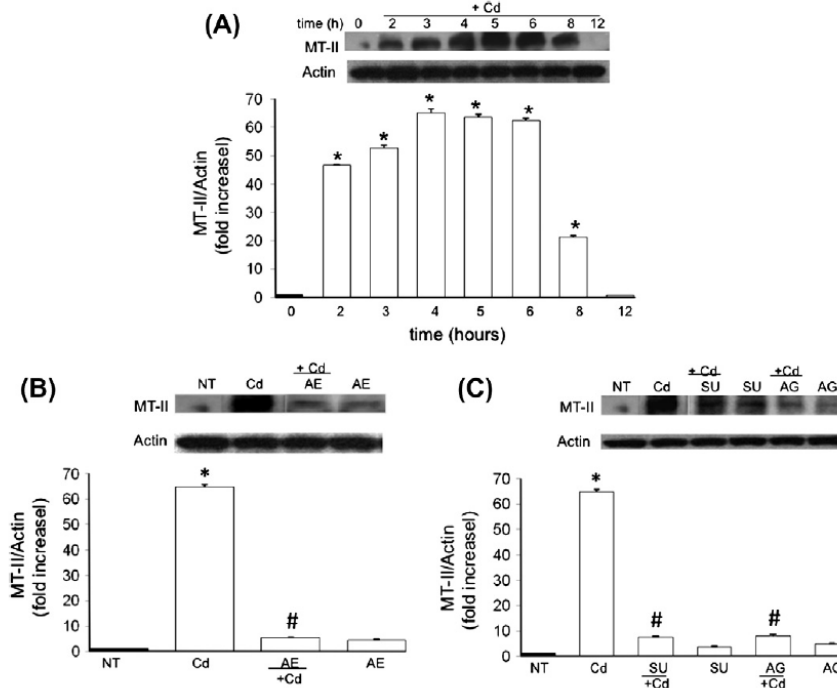


Fig. 9. Cadmium-induced metallothionein (MT) expression and NADPH oxidase or Src or EGFR inhibition abrogate MT production in primary cultured mice hepatocytes. The cells were treated with 5 μM CdCl₂ for various times or pretreated with 1.0 μM AEBSF (AE) (NADPH oxidase inhibitor), 10 μM SU6656 (SU) (Src inhibitor) or 3 nM tyrphostin Ag1478 (AG) (EGFR inhibitor) for 30 min and exposed to 5 μM CdCl₂ for 4 h. The total protein was extracted and prepared for Western blot. (A) Representative Western blot and densitometric analysis of MT-II. (B) Effect of NADPH oxidase inhibition (AEBSF) (AE). Effect of Src (SU6656) (SU) or EGFR receptor (tyrphostin Ag1478) (AG) MT-II expression (C). The results are expressed as fold increase compared with not treated cells (NT). Each bar represents the mean \pm S.E. of at least three independent experiments. *Significantly different from NT ($p < 0.05$) and #versus CdCl₂ alone ($p < 0.05$).

et al., 1995), while HepG2 cells, are more resistant to Cd damage because cells decrease viability 27% after 6 h with 20 μM CdCl₂ treatment (Souza et al., 2004), probably due that is an hepatoblastoma cell line. Lawal and Ellis (2010) have reported that HepG2 cells have a LC₅₀ = 13.96 μM after 24 h CdCl₂ treatment. Also, some reports indicate that Reuber H35 rat hepatoma were less sensitive (50% LDH release at 20–35 μM CdCl₂) than the corresponding primary cultures (Wiegant et al., 1997). Primary hepatocytes used in this study, present similar sensitive to CdCl₂ treatment than WRL-68 cells. A differential Cd sensitivity could be due to differences in the underlying protective mechanisms present in each cell type. MT-II is involved in protective mechanisms during acute liver Cd exposure. Some articles reported mRNA MT-II induction and there are very few articles that reported MT-II production, due to its difficulty to determine. We determine MT-II content by Western blot. Primary mouse hepatocytes decreased 50% cell viability after 12 h CdCl₂ treatment, so we quantified MT-II content at different time exposures. Our data show that MT-II production increased, peaked at 4 h and then decreased, not being detected at 12 h. MT-II high content was present in hepatocytes at early times when cells presented high viability. This fact confirms the role of this protein as a protective factor against Cd-induced damage and could explain cell survival at early Cd exposure times. MT-II content was detected after 2 h CdCl₂ treatment, with an increase production at 4 and 6 h treatment, decreasing at 8 h and not being detectable after 12 h CdCl₂ treatment. A high level of MT-II probably confers an acquired tolerance to the stress and protected against Cd cell injury as demonstrated by cell viability values. It is assumed that toxicity

in the cells starts when Cd loading exceeds the buffering capacity of intracellular MT.

MT-II response was mediated by Stat3 activation. The interaction of Stat3 with cis-acting promoter elements has been shown to participate in the activation of several acute phase proteins genes (Madamanchi et al., 2001). In addition to the expression of hepatic acute-phase proteins, also leads to increase expression of several predominantly intracellular proteins, including metallothioneins (Lee et al., 1999; Zhang et al., 2012). Moreover, Stat3 is considered an acute-phase response factor. The current study identified a signaling pathway that mediates effect of Cd in MT-II production in primary mouse hepatocyte culture.

Cd treatment induced Stat3 (Tyr 705) activation that is mediated by ROS as pCat treatment decreased Stat3 activation. Cd induces ROS in HepG2 cells and primary cultured hepatocytes, yet the underlying mechanism is poorly defined. Here, we show that Cd induction of ROS generation was closely related to NADPH oxidase activation, as ROS formation and NADPH oxidase activity correlates, and NADPH oxidase inhibition abrogates Cd-induced ROS formation. Chen et al. (2011) reported that Cd induced generation of ROS by upregulating expression of NADPH oxidase 2 (NOX2) and its regulatory proteins (p22phox, p67phox, p40phox, p47phox and Rac1) in neuronal cell lines. So Cd-induced Stat3 activation is mediated by ROS derived from NADPH oxidase in primary cultured hepatocytes.

We observed that Cd induced EGFR tyrosine phosphorylation, via Src activation. NADPH-oxidase-dependent ROS generation promotes Src kinase activity. As a result of EGFR transactivation,

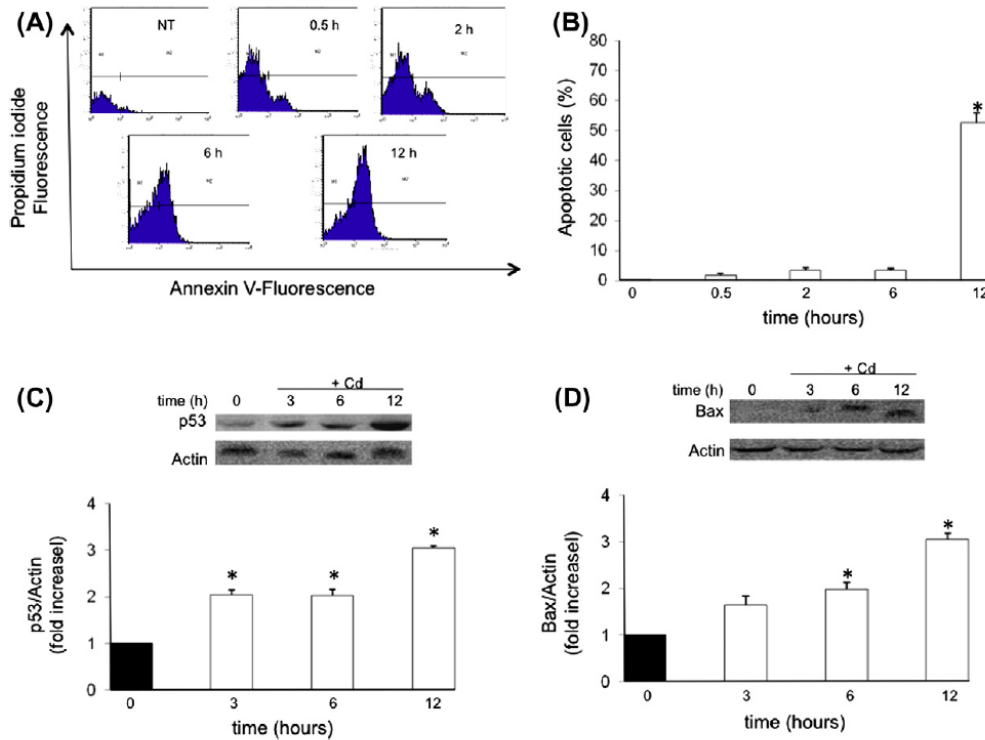


Fig. 10. Cadmium induces apoptosis, increases p53 and Bax expression after 12 h treatment in primary cultured mice hepatocytes. The cells were treated with 5 μM CdCl₂ for various times. Apoptosis was determined with Annexin-v Fluos in presence of Propidium iodide (PI) by flow cytometry. The total protein was extracted and prepared for Western blot. (A) FACS analysis of apoptotic cells after staining with Annexin-V-FLUOS and propidium iodide. (B) Apoptotic cells expressed as percent vs. control cells. (C) Representative Western blot and densitometric analysis of p53 or (D) Bax proteins. The results are expressed as fold increase compared with control cells. Each bar represents the mean \pm S.E. of at least three independent experiments. *Significantly different from control ($p < 0.05$).

phosphotyrosine residues provide docking sites for recruitment and triggering of the Stat3 pathway. Stat3 activation mediated by EGFR in hepatocyte Cd injury is an interesting result which had not been described previously. Immunoprecipitation assay demonstrate that Stat3 and EGFR can physically be associated with each other. Inhibition of EGFR decreased Stat3 activation, and also MT-II production. Cadmium response activates Stat3, concomitant with upregulation of a subset of Stat3 target genes, like MT-II. The kinases responsible for ERK1/2-mediated serine phosphorylation of Stat3 were identified to be Src and EGFR. Interestingly, inhibition of NADPH oxidase or ROS inhibits Src, EGFR and Stat3. These findings indicate that Cd activates multiple distinct signaling pathways and suggest that NADPH oxidase play an important role in Src, Stat3, and ERK1/2 activation, as NADPH oxidase inhibition abrogates Src, Stat3 and ERK1/2 activation. Src is a member of a family of cytoplasmic tyrosine kinases that have several domains including the catalytic, the regulatory, and SH2 and SH3, which allow it to interact with multiple substrates (Thomas and Brugge, 1997). Activated Src is capable to interact with several substrates including Stat3 (Yu et al., 1995; Turkson et al., 1997; Bromberg et al., 1999). Inhibition of Src family kinases activity inhibited Stat3 phosphorylation, and immunoprecipitation assay demonstrate that Stat3 and Src can be physically associated with each other, while phospho-Stat3 (Ser727) was a result of ERK1/2 downstream action. Phosphorylated Stat3 dimerize and translocate to nucleus where binds the promoter of MT-II at early time as a protective

response, during the first 6 h of treatment. Previous work from our group, in HepG2 cells, indicates that phospho-Stat3 (Ser727) was stimulated after 1 h Cd treatment, however tyr-Stat3 activation was not detected. NADPH oxidase and redox-sensitive signaling molecules such as ERK1/2 were involved in this response (Souza et al., 2009). Pharmacological inhibition of NADPH oxidase and ERK1/2 abolished the delay phosphorylation of Stat3 and significantly reduced Hsp70 (Souza et al., 2009). Differences in Stat3 activation in HepG2 cells are probably due to the cell origin. Critical roles of MT in Cd detoxification are well established (Klaassen et al., 2009; Zhang et al., 2012). As in the case of many noxious agents, such as heavy metals or free radicals, the primary cell protective mechanism against Cd toxic effect is sequestration by MT. Some studies show that MT-II plays a protective role with respect to apoptosis, and the anti-apoptotic effects of MT-II are highly dependent on cellular MT levels (Shimoda et al., 2003). Our data show that apoptosis increment coincided with the decrease in MT-II, strongly suggesting the protective effect elicited by MT-II, it could be possible that the final decision regarding the progression from cell damage to cell death be the down-regulation of MT-II, positioning MT-II as a critical checkpoint for cell death in Cd-induced toxicity. Evidence in the literature suggests that low Cd concentrations are able to inhibit excision and mismatch DNA repair (Giaginis et al., 2006). Shimoda et al. (2003) reported that MT expression plays a protective role with respect to apoptosis. Apoptosis that we observed could be a response to the inability

of hepatocytes to repair DNA damage. The tumor suppressor protein p53, which is involved in a number of cellular signaling pathways, is known to play an essential role in cellular defense. This transcription factor is phosphorylated at multiple sites, leading to reduce interactions with its negative regulator, the oncoprotein MDM2. This leads p53 accumulation by stabilization and functional activation in response to DNA damage. By Western blotting, we showed the accumulation of p53 in hepatocytes exposed to Cd. Increased level of p53 and Bax suggest that apoptosis was executed by this particular pathway as it has been reported previously (Tokumoto et al., 2011; Aimola et al., 2012). Our data propose that Cd, under the conditions assayed in here, induces apoptosis in hepatocytes. Lasfer et al. (2008) reported that Cd (100 μ M for 24 h) induces apoptosis in normal human hepatocytes in primary culture. We found that the sensitivity to Cd-induced apoptosis in primary mouse hepatocyte is higher (5 μ M for 24 h) than that of human hepatocytes in primary culture.

In conclusion, we addressed the molecular events involved prior to the Cd-induced cellular toxicity and cell death in primary mouse hepatocytes. We propose that hepatocytes display an adaptive response tending to survive from the noxious effect of cadmium by a mechanism driven by Stat3 via NADPH oxidase, Src, EGFR and Erk1/2 pathways, which, in addition lead to the expression of MT-II. However this response does not overcome the damage produced by Cd and cell dies by a p53-mediated apoptosis, our results set MT-II as a determinant factor for cell death/survival decisions under Cd toxicity.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was partially supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT) No. CB-2008-106194 and by Universidad Autónoma Metropolitana. Karina Martínez Flores was PhD scholarship holder from CONACYT (203473). We thank UAM-I Flow Cytometer Lab, Dr. E. Cortes for technical support and Dr. R. Ortiz for the FACS analysis.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.01.017>.

References

- Aimola, P., Carmignani, M., Volpe, A.R., Di-Benedetto, A., Claudio, L., Waalkes, M.P., van-Bokhoven, A., Tokar, E.J., Claudio, P.P., 2012. Cadmium induces p53-dependent apoptosis in human prostate epithelial cells. *PLoS One* 7, 33647.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., Darnell, J.E., 1999. Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295–303.
- Bucio, L., Souza, V., Albores, A., Sierra, A., Chávez, E., Cáraz, A., Gutiérrez-Ruiz, M.C., 1995. Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology* 102, 285–299.
- Cannino, G., Ferruggia, E., Luparello, C., Rinaldi, A.M., 2009. Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion* 9, 377–384.
- Chen, L., Xu, B., Liu, L., Luo, Y., Zhou, H., Chen, W., Shen, T., Han, X., Kontos, C.D., Huang, S., 2011. Cadmium induction of reactive oxygen species activates them TOR pathway, leading to neuronal cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 50 (5), 624–632.
- Ellis, J.K., Athersuch, T.J., Thomas, L.D., Teichert, F., Pérez-Trujillo, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., Singh, R., Järup, L., Bundy, J.G., Keun, H.C., 2012. Metabolic profiling detects early effects of environmental and lifestyle exposure to cadmium in a human population. *BMC Med.* 10, 61.
- Escobar, M.C., Souza, V., Bucio, L., Hernández, E., Gómez-Quiroz, L.E., Gutiérrez-Ruiz, M.C., 2009. MAPK activation is involved in cadmium-induced Hsp70 expression in HepG2 cells. *Toxicol. Mech. Meth.* 19, 503–509.
- Gao, B., 2005. Cytokines, STATs and liver disease. *Cell. Mol. Immunol.* 2, 92–100.
- Giagnis, C., Gatzidou, E., Theocharis, S., 2006. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 213, 282–290.
- Gong, G., Waris, G., Tanveer, R., Siddiqui, A., 2001. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9599–9604.
- Haga, S., Terui, K., Zhang, H.Q., Enosawa, S., Ogawa, W., Inoue, H., Okuyama, T., Takeda, K., Akira, S., Ogino, T., Irani, K., Ozaki, M., 2003. Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J. Clin. Invest.* 112, 989–998.
- 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 activation of Src and epidermal growth factor receptor (EGFR) in hepatocytes. *J. Cell. Physiol.* 216, 486–497.
- Herrera, B., Murrillo, M.M., Alvarez-Barrientos, A., Beltrán, J., Fernández, M., Fabregat, I., 2004. Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal rat hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 16–26.
- Inoue, H., Ogawa, W., Ozaki, M., Haga, S., Matsumoto, M., Furukawa, K., Hashimoto, N., Kido, Y., Mori, T., Sakaue, H., Teshigawara, K., Jin, S., Iguchi, H., Hiramatsu, R., LeRoith, D., Takeda, K., Akira, S., Kasuga, M., 2004. Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat. Med.* 10, 168–174.
- Kao, C.Y., Factor, V.M., Thorgeirsson, S.S., 1996. Reduced growth capacity of hepatocytes from c-myc and c-myc/TGF-alpha transgenic mice in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 64–70.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Diwan, B.A., 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 215–220.
- Lasfer, M., Vadrot, N., Aoudjehane, L., Conti, F., Bringuier, A.F., Feldmann, G., Reyl-Desmars, F., 2008. Cadmium induces mitochondria-dependent apoptosis of normal human hepatocytes. *Cell. Biol. Toxicol.* 24, 55–62.
- Lawal, A.O., Ellis, E., 2010. Differential sensitivity and responsiveness of three human cell lines HepG2, 1321N1 and HEK 293 to cadmium. *J. Toxicol. Sci.* 35, 465–478.
- Lee, D.K., Carrasco, J., Hidalgo, J., Andrews, G.K., 1999. Identification of a signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression. *Biochem. J.* 337, 59–65.
- Li, W., Liang, X., Kellendonk, C., Poli, V., Taub, R., 2002. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 277, 28411–28417.
- López-Ortal, P., Souza, V., Bucio, L., González, E., Gutiérrez-Ruiz, M.C., 1999. DNA damage produced by cadmium in a human fetal hepatic cell line. *Mutat. Res.* 439, 301–306.
- Luparello, C., Sirchia, R., Longo, A., 2011. Cadmium as a transcriptional modulator in human cells. *Crit. Rev. Toxicol.* 41, 75–82.
- Madamanchi, N.R., Li, S., Patterson, C.M., Runge, M.S., 2001. Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 321–326.
- Nakagawa, T., Sawada, M., González, F.J., Yokoi, T., Kamataki, T., 1996. Stable expression of human CYP2E1 in Chinese hamster cells: high sensitivity to NN-dimethylnitrosamine in cytotoxicity testing. *Mutat. Res.* 360, 181–186.
- Oyazü, T., Fung, S.Y., Shiozaki, A., Guan, Z., Zhang, Q., Santos, C.C., Han, B., Mura, M., Keshavjee, S., Liu, M., 2012. Src tyrosine kinase inhibition prevents pulmonary ischemia-reperfusion-induced acute lung injury. *Intensive Care Med.* 38, 894–905.
- Park, J.D., Liu, Y., Klaassen, C.D., 2001. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals(1). *Toxicology* 163, 93–100.
- Schaper, F., Siewert, E., Gomez-Lechon, M.J., Gatsios, P., Sachs, M., Birchmeier, W., Heinrich, P.C., Castell, J., 1997. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) signals via the STAT3/APRF transcription factor in human hepatoma cells and hepatocytes. *FEBS Lett.* 405, 99–103.
- Shimoda, R., Achanzar, W.E., Qu, W., Nagamine, T., Takagi, H., Mori, M., Waalkes, M.P., 2003. Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicol. Sci.* 73, 294–300.
- Slomiany, B.L., Slomiany, A., 2004. Src-kinase-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in salivary mucin secretion in response to beta-adrenergic G-protein-coupled receptor activation. *Inflammopharmacology* 12 (3), 233–245.
- Souza, V., Escobar, M.C., Gómez-Quiroz, L., Bucio, L., Hernández, E., Chávez, C., Gutiérrez-Ruiz, M.C., 2004. Acute cadmium exposure enhances 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.E., 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.
- Souza, V., Martínez, K., Bucio, L., Gómez-Quiroz, L.E., Gutiérrez-Ruiz, M.C., 2012. Liver and cadmium toxicity. *J. Drug Metab. Toxicol.*, doi:10.1177/2157-7609.55-001.
- Thomas, S.M., Brugge, J.S., 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13, 513–609.
- Tokumoto, M., Fujiwara, Y., Shimada, A., Hasegawa, T., Seko, Y., Nagase, H., Satoh, M., 2011. Cadmium toxicity is caused by accumulation of p53 through the down-regulation of Ube2d family genes in vitro and in vivo. *J. Toxicol. Sci.* 36, 191–200.
- Turkson, J., Bowman, T., Adnane, J., Zhang, Y., Djeu, J.Y., Sekharam, M., Frank, D.A., Holzman, L.B., Wu, J., Sebti, S., Jove, R., 1997. Requirement for Ras/Rac1-

- mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7519–7528.
- Valdés-Arzate, A., Luna, A., Bucio, L., Licona, C., Clemens, D.L., Souza, V., Hernandez, E., Kershenovich, D., Gutiérrez-Ruiz, M.C., Gómez-Quiroz, L.E., 2009. Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 424–430.
- Waris, G., Huh, K.W., Siddiqui, A., 2001. Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF-kappa B via oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7721–7730.
- Wiegant, F.A., van-Rijn, J., van-Wijk, R., 1997. Enhancement of the stress response by minute amounts of cadmium in sensitized Reuber H35 hepatoma cells. *Toxicology* 116, 27–37.
- Yu, C.L., Meyer, D.J., Campbell, G.S., Larner, A.C., Carter-Su, C., Schwartz, J., Jove, R., 1995. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 269, 81–83.
- Zhang, D., Gao, J., Zhang, K., Liu, X., Li, J., 2012. Effects of chronic cadmium poisoning on Zn, Cu, Fe, Ca, and metallothionein in liver and kidney of rats. *Biol. Trace Elem. Res.* <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-012-9394-9>.