

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

**PARTICIPACIÓN DE LAS MAPK EN LA REGULACIÓN DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN AP1 Y EN LA PRODUCCIÓN DE Hsp70 EN CÉLULAS HepG2
TRATADAS CON CADMIO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

M. en B.E. María del Carmen Escobar Villanueva

CO-DIRECTOR

Dra. Verónica Souza Arroyo
Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

ASESORES

Dr. Edmundo Chávez Cossio
Dra. Patricia Rojas Castañeda
Dr. Alejandro Zentella Dehesa

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2010

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud; División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, apoyada de la Co-Dirección de la Dra. Verónica Souza Arroyo y de la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz del mismo laboratorio. Asimismo se contó con la asesoría del Dr. Edmundo Chávez Cossío del Instituto Nacional de Cardiología, de la Dra. Patricia Rojas Castañeda del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y del Dr. Alejandro Zentella Dehesa del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

El Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio 0904-0.

Mi agradecimiento a CONACyT por la beca con número de registro 137896, otorgada durante mi formación profesional. Asimismo el proyecto contó con el apoyo del CONACyT con el número de convenio 39618-M

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa,
aprobó la tesis que presentó

M. en BE. María del Carmen Escobar Villanueva
El día 11 de Febrero del año 2010

Comité Tutorial:

Dr. Edmundo Bonilla González

PRESIDENTE

Dr. Edmundo Chávez Cossío

SECRETARIO

Dra. Norma Edith López Díaz-guerrero

VOCAL

Dra. Leticia Bucio Ortiz

VOCAL

Agradecimientos

Dra. Verónica Souza Arroyo

Mi mayor reconocimiento, agradezco todo el apoyo, comprensión y tiempo durante estos años de formación profesional, tanto a nivel académico, como personal.

Por siempre, mi admiración, aprecio, respeto y amistad.

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Gracias por darme la oportunidad de integrarme durante estos años a su grupo de trabajo y brindarme la confianza de convivir y aprender en un ambiente profesional, de compañerismo, respeto y lealtad.

A mis Asesores:

Dr. Edmundo Chávez Cossío, Dra. Patricia Rojas Castañeda, Dr. Alejandro Zentella Dehesa Por su valiosa colaboración, observaciones y sugerencias importantes en el desarrollo de esta tesis.

A los **miembros del jurado**; Dr. Edmundo Bonilla González, Dr. Edmundo Chávez Cossío, Dra. Norma Edith López Díaz-guerrero y Dra. Leticia Bucio Ortiz, cuyas observaciones y comentarios ayudaron a mejorar esta tesis

A la Dra. Mina Konigsberg, Coordinadora del Posgrado en Biología Experimental y Lic. Violeta Luna, por su paciencia, orientación y apoyo en los trámites de esta tesis

A mis compañeros y amigos

Laboratorio de Fisiología Celular:

Dra. Elizabeth Hernández, Dra. Leticia Bucio, Dr. Luis Enrique Gómez y Dra. Argelia Valdés. Gracias por brindarme su tiempo, consejo, apoyo y amistad, mi cariño siempre.

Laboratorio HIPAM:

Dr. Guillermo Robles, Dr. Max Schmulson. Gracias por fortalecer mi carácter, enseñarme a valorar mi profesión, respetar mi tiempo laboral y el familiar, para ser mejor profesional.

Laboratorio de Farmacología:

Dr. Rubén Román, Dr. Francisco Alarcón, Dr. José Luis Flores, Dr. Federico Vilchis Gracias por la confianza que me brindan y la oportunidad que me otorgan en esta nueva etapa profesional.

Braulio, Jaime, Mario, Ricardo, Blanca Blas, Ana Bertha, David, Esther, Carmina, Ata, Lulú, Magi, Juanita, Alicia, Mariana, Paty. Gracias por todo su apoyo y el cariño que me hacen sentir, totalmente correspondido.

DEDICATORIAS

A la memoria de mi Padre:
Siempre juntos

Victoriano Escobar

y de mi Amiga

Bertha Maqueda

A mi Madre y Hermanos:

Carmen Villanueva

Carlos, Naty, Victor, José de Jesús, Julio, Veró y Héctor
Sobrinos

Gracias por confiar en mi y saber que estamos más unidos en todos nuestros sueños
y proyectos

A mis Amigos:

Norma, Rocío, Bernardo, Anita, Paco, Tulio por todo ese cariño incondicional que me
han demostrado siempre.

Y por supuesto

Por que eres y siempre serás muy especial, mi regalo de Fantasía y de Poesía
MFJA.

INDICE

ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN EN ESPAÑOL.....	3
RESUMEN EN INGLÉS.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Cadmio.....	5
1.2 Efecto del cadmio sobre la salud.....	6
1.3 Generalidades de las especies reactivas de oxígeno.....	8
1.4 Factor activador de proteína (AP1).....	14
1.4.1. Activación transcripcional de AP1.....	16
1.5 Aspectos generales de las proteínas cinasas activadas por mitogénos (MAPK).....	17
1.5.1 Proteína cinasa activada por estímulos extracelulares (ERK).....	19
1.5.2 MAPK cinasa activada por estrés (p38).....	20
1.5.3 Proteína cinasa con c-Jun amino terminal (JNK/SAPKs).....	21
1.6 Proteínas de choque térmico (Hsp).....	23
1.7 Modelo celular.....	25
2. JUSTIFICACIÓN.....	27
3. HIPÓTESIS.....	27
4. OBJETIVOS.....	28
4.1 Objetivo General.....	28
4.2 Objetivos Particulares.....	28
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
5.1 Cultivo celular.....	29
5.2 Activación del factor de transcripción AP1.....	29
5.3 Extracción de la proteína nuclear.....	30
5.4 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA).....	31
5.5 Composición del factor AP1 (c-Jun y c-Fos).....	32
5.6 Las MAPK (ERK, p38 y JNK) como mediadores en la activación del factor de transcripción AP1.....	32
5.7 Activación de las MAPK.....	32
5.8 Extracción de la proteína total.....	33
5.9 Análisis por Western blot (WB).....	33

5.10 Participación de la depleción de GSH, función mitocondrial y sistema XO en la activación de las MAPK.....	35
5.11 Participación de las MAPK en la producción de la proteína Hsp70.....	36
5.12 Determinación del contenido de proteína.....	36
5.13 Análisis estadístico.....	37
6. RESULTADOS.....	38
6.1 Activación del factor de transcripción AP1.....	38
6.2 Composición del factor AP1 (c-Jun y c-Fos).....	41
6.3 Participación de las MAPK en la activación del factor de transcripción AP1.....	41
6.4 Activación de las MAPK en las células HepG2 expuestas a CdCl ₂	45
6.5 Participación de la depleción de GSH, función mitocondrial y sistema XO en la activación de las MAPK.....	49
6.6 Participación de las MAPK como mediadoras en la producción de la proteína Hsp70.....	52
7. DISCUSIÓN.....	58
8. CONCLUSIÓN.....	66
9. REFERENCIAS.....	67
10. ARTICULO	

Resumen

La población en general está expuesta a contaminantes como el cadmio (Cd). Se ha sugerido que el Cd puede producir especies reactivas de oxígeno (ERO) que tienen un papel como mediadores intracelulares. El factor de transcripción AP1 es sensible a ERO y es activado por el Cd. Sin embargo, no se conoce con exactitud la vía de transducción de señales responsable de esta la activación. Se conoce que AP1 es fosforilado por las MAPK (ERK, p38 y JNK) y que activa genes de sobrevivencia, además esta constituido por homodímeros Jun/Jun o heterodímeros Jun/Fos. Es por ello que el objetivo de este proyecto fue estudiar la vía de señalización MAPK/AP1 en respuesta al Cd en células HepG2 y su participación en la inducción de la proteína de choque térmico 70 (Hsp70). Las células HepG2 fueron tratadas con 5 μM de CdCl_2 por diferentes tiempos de incubación (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h) y se determinó la activación del factor AP1 por EMSA y la activación de ERK, p38 y JNK por Western blot. Para poder evaluar la composición de AP1 se realizó un super retardo y EMSA utilizando anticuerpos para c-Jun y c-Fos en las células tratadas con 5 μM de CdCl_2 . Para evaluar la participación de las MAPK en la activación de AP1 y en la producción de Hsp70, las células fueron pre-tratadas con los inhibidores para ERK (PD98059), p38 (SB203580) y JNK (SP600125), seguidas de 5 μM de CdCl_2 . Para determinar la procedencia de las ERO en la activación de las MAPK (ERK, p38 y JNK), las células fueron pre-tratadas con KCN para inhibir la función mitocondrial, alopurinol para inhibir a la xantina oxidasa, seguidas de 5 μM de CdCl_2 . Por otro lado, las células HepG2 fueron pre-tratadas con butinona-L-sulfoximina (BSO), para depletar el glutatión (GSH). Los resultados mostraron que la activación de AP1 y la fosforilación de las ERK, p38 y JNK fueron dependientes del tiempo de exposición al CdCl_2 . La composición de AP1 fue c-Jun/c-Jun. Además, encontramos que los inhibidores de las MAPK disminuyeron significativamente la activación de AP1 y la producción de la Hsp70 en las células tratadas con CdCl_2 . Por otro lado, observamos que la activación de las MAPK (ERK, p38 y JNK) disminuyó significativamente con los inhibidores. Con estos resultados podemos concluir que el Cd puede activar al factor AP1 y a las MAPK. Además, el AP1 esta constituido por las subunidades c-Jun/c-Jun y es regulado por las MAPK. Por otro lado, las ERO tienen un papel importante como segundos mensajero en la activación de las MAPK. ERK1/2 y JNK participan en la producción Hsp70 en células HepG2 tratadas con Cd y puede ser mediada por el AP1 por contener en su región promotora secuencias específicas para el reconocimiento de este factor.

ABSTRACT

Cadmium (Cd) is an environmental pollutant, and general population is exposed continuously to it. It has been suggested that Cd may produce reactive oxygen species (ROS), and they could play an important role in intracellular signaling for cellular response. The activator protein 1 (AP1) is a transcription factor that is sensitive to ROS. Actually, Cd-signal transduction pathway responsible for AP1 activation has not been described. It is known that AP1 can be phosphorylated by mitogen-activated protein kinases (MAPK) ERK, p38 and JNK that could activate survival genes. The AP1 quaternary structure could be constituted by Jun/Jun homodimers or Jun/Fos heterodimers. The aim was to provide a greater insight into the effect of Cd on mitogen-activated protein kinases (MAPK) involved in signal transduction, its relationship with AP1 activation, and heat shock protein (Hsp)70 production. HepG2 cells were incubated in the presence of CdCl₂ (5 μM) at different periods from 1 to 6 hours. AP1 activation was determined by an electrophoretic mobility shift assay (EMSA); and ERK, p38 and JNK activation by Western Blot. In order to evaluate AP1 dimer composition a supershift EMSA was performed, exposing the CdCl₂ treated cells to c-Jun and c-Fos specific antibodies. To evaluate MAPK participation in AP1 activation and Hsp70 induction, cells were pretreated with ERK, p38 and JNK inhibitors (PD98059, SB203580 and SP600125 respectively) followed by CdCl₂ exposure. In order to elucidate the origin of ROS involved in the MAPK (ERK, p38 and JNK) activation, cells were pre-treated with KCN to inhibit mitochondrial function and allopurinol to inhibit xanthine oxidase, followed by Cd treatment. On the other hand, HepG2 cells received a pre-treatment with buthionine-L-sulfoximine (BSO) to deplete glutathione (GSH). Results showed that Cd-induced AP1 activation depended on ERK, p38, JNK phosphorylation. AP1 composition was c-Jun/c-Jun. Also data showed that Cd-induced AP1 activation and Hsp70 production decreased significantly in presence of MAPK inhibitors. Moreover, we observed that MAPK (ERK, p38 and JNK) activation was reduced in presence of mitochondrial function and xanthine oxidase inhibitors and GSH depletor. With these results, we can conclude that cadmium could activate MAPK signaling pathway by an indirect ROS generation. MAPK are responsible for AP1 activation. Only ERK1/2 and JNK participated in Hsp70 production, conferring cell protection against cadmium damage. It is important to investigate the molecular events involved in high viability cadmium concentration exposure prior to the Cd-induced cellular toxicity and damage in HepG2 cells because the initial cadmium accumulation and toxicity is the liver.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CADMIO

El cadmio (Cd) es un metal de transición, biológicamente no esencial. Desde 1955 se tiene evidencia de su toxicidad, ocupando el 7º lugar en la lista de las 20 sustancias más peligrosas reportada por *The Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades y la Agencia de Protección Ambiental en USA, (Fay y Mumtaz, 1996). Ha sido identificado como un carcinógeno humano del grupo I por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, 1993). El Cd es ampliamente usado en la industria en la fabricación de baterías Ni-Cd, de cables, estabilizadores de plástico y pintura, pigmentos, acumuladores eléctricos, etc, donde la producción mundial en el 2005 fue de aproximadamente 30 000 ton/año (Thévenod, 2009).

El Cd afecta a individuos ocupacionalmente expuestos, principalmente daña a personas que viven cerca de lugares contaminados o bien consumiendo alimentos contaminados con altas concentraciones del metal como: los cereales, vegetales, patés, mariscos, algas secas, leche, huevo (Olsson et al., 2002). La ingesta media de alimentos contaminados generalmente varía entre 8 y 25 µg por día (Llobet et al., 2003; Amzal et al., 2009; Jarup y Akesson, 2009). Otra manera de exposición de la población al metal es a través del humo de cigarrillos, ya que contienen aproximadamente 1-2 µg (Mannino et al., 2004), el cual se absorbe por inhalación alrededor del 10-50% (Bernard, 2008, Joseph, 2009). Después de la absorción el Cd se une a la albúmina (Cd-Alb) siendo la vida media del complejo de 2 a 3 meses, la proteína transporta al metal a través del sistema circulatorio. Posteriormente Cd-

Alb se dirige a los órganos como el pulmón, glándula salival, corazón (Nishijo et al., 2006), hígado, riñón, vaso, páncreas, testículos, epidídimo, próstata (Sahmoun et al., 2005), sistema nervioso y sistema inmune. Debemos resaltar que el 50% del metal que se absorbe se almacena principalmente en el hígado (Koyuturk et al., 2007) y el riñón (Nishijo et al., 2006), debido a su capacidad de estos tejidos de sintetizar altas concentraciones de metalotioneína (MT), proteína de bajo peso molecular (6-7 kDa), rica en cisteína. Estos residuos de cisteína unen y almacenan iones metálicos. Una molécula de MT puede unir 7 átomos de cadmio. Es fácilmente inducida por metales pesados esenciales como el zinc (Zn^{2+}) y el cobre (Cu^{2+}), hormonas, estrés y una gran variedad de productos orgánicos e inorgánicos (Kagi, 1993). Se ha propuesto que la MT juega un papel importante en la detoxificación del cadmio (Waalkes y Klaassen, 1985), secuestrando al metal en el citosol (Figura 1) evitando la unión con moléculas blanco como el GSH (Bucio et al., 1995; Escobar et al., 2002). El problema con el Cd es su prolongada vida media en el organismo, una vez que ingresa se almacena durante 15-30 años (Goyer, 1997), eliminándose lentamente, a través de la orina, sin embargo la cantidad es muy baja siendo de 0.005 al 0.01% (Bernard, 2008).

1.2 EFECTO DEL CADMIO SOBRE LA SALUD

El efecto del Cd en los seres humanos depende de la ruta de entrada al organismo, de la dosis, de la forma química del metal y del tiempo de exposición. El

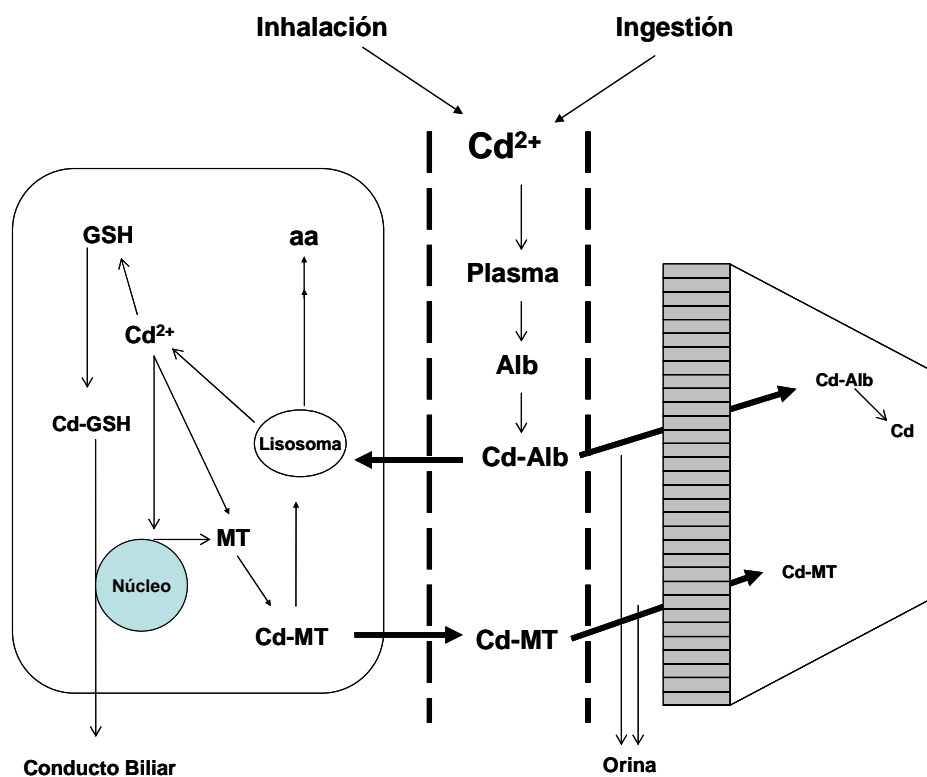


Figura 1. Mecanismo Responsable de la Acumulación Selectiva del cadmio. (Bernard, 2008). Albúmina (Alb), Metalotioneína (MT), glutatión (GSH)

Cd una vez que se libera de la MT puede causar daño dependiendo de la concentración, por ejemplo concentraciones agudas del metal pueden ocasionar edema pulmonar, irritación gastrointestinal, dolor de cabeza, etc., y a concentraciones crónicas puede ocasionar lesiones irreversibles del túbulo renal, anosmia, rinitis crónica y osteoporosis (Akesson et al., 2006), daño en endometrio (Akesson et al., 2008), anemia y se considera que el Cd es un potente carcinógeno (IARC, 1993; ATSDR, 1999). A nivel celular se conoce que en el daño provocado por el Cd participan la inactivación de grupos tioles y el aumento de la lipoperoxidación (LPO). Estudios en nuestro grupo señalan que una tercera parte del cadmio entra a los hepatocitos por canales de calcio (Souza et al., 1997). Las

alteraciones morfológicas tempranas observadas en hígado de rata después de una exposición con concentraciones hepatotóxicas del metal son dilatación del retículo endoplásmico con pérdida de ribosomas, condensación nucleolar y un incremento en el número de gránulos pericromáticos. Posteriormente hay hinchamiento mitocondrial, dilatación y vesiculación del retículo endoplásmico rugoso y la presencia de material fibrilar dentro del citoplasma. La necrosis hepatocelular se hace evidente en ratas después de 10 -12 h de exposición de dosis altas 3.9 mg Cd/kg y dosis bajas 0.5 mg Cd/kg durante 6 días a la semanas durante 6 meses (Dudley et al., 1984). Por otro lado se considera que ocurre un proceso de inflamación, en donde la activación de las células Kupffer, son las iniciadoras de la liberación de mediadores de daño como citocinas, moléculas de adhesión, quimiocinas y radicales libres. La respuesta temprana de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), la interleucina 1 (IL1), y la interleucina 6 (IL6), es activar a otras células del hígado (hepatocitos, estelares y endotelial) e inducir la expresión de quimiocinas como la interleucina 8 (IL8) que atraen y activan a los neutrófilos y monocitos (Rikans y Yamano, 2000). La presencia de agentes antioxidantes protege a las células de la citotoxicidad inducida por Cd, al ácido desoxirribonucleico (ADN) y los cromosomas, lo que indica la participación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la respuesta tóxica (Hartwig, 1994).

1.3 GENERALIDADES DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Debido a la naturaleza aeróbica del metabolismo celular, se generan ERO y/o especies reactivas de nitrógeno (ERN). Son moléculas que en su estructura

atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad, extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse con otras moléculas (carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos). Las ERO están parcialmente reducidas, como el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y radical lipídico (L^{\bullet}) (Liu et al., 2009). A nivel celular existen procesos que elaboran continuamente ERO como un producto del metabolismo normal.

La mitocondria es un organelo intracelular con una morfología dinámica, encargado de suministrar y mantener la homeostasis energética, a través de la fosforilación oxidativa (McFarland y Turnbull, 2009), responsable del consumo del 90% del oxígeno celular. Se calcula que entre el 2 y el 4% del oxígeno se convierte en ERO, esta cantidad es equivalente a 10^7 moléculas ERO/día/mitocondria (Desouki et al., 2005). En este proceso se requiere de 5 complejos acoplados para realizar la fosforilación de adenosina difosfato (ADP) a adenosina trifosfato (ATP), durante la translocación de electrones en la cadena de transporte mitocondrial el oxígeno es el aceptor final, generándose un gradiente de protones que aporta la energía necesaria. Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital antienlazante.

El citocromo a_3 del complejo IV de la cadena respiratoria es capaz de mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al O_2 y con ello la formación de agua (Benzi y Moretti, 1995), cuando todo

el ADP está en forma de ATP no llegan los electrones al complejo IV y producen reducciones parciales de oxígeno. La inhibición de la cadena respiratoria por el bloqueo de la transferencia de electrones de la NADH reductasa a la coenzima Q se da con rotenona (0.1mM), pero también se puede utilizar cianuro de potasio (KCN, 0.1 mM) durante 30 min para disminuir la producción de ERO bloqueando la transferencia electrónica del complejo IV al oxígeno (Yoon et al., 2005; Lee et al., 2006).

El sistema xantina oxidoreductasa (XOR), se encuentra en varios órganos como el riñón, pulmón, corazón, cerebro, hígado e intestino. Predomina en los endotelios (Pacher et al., 2006). La XOR es un dímero conformado por dos enzimas interconvertibles la xantina dishidrogenasa (XDH; EC.1.17.1.4) y la xantina oxidasa (XO; EC. 1.1.3.22), ambas son subunidades idénticas de 145 kDa, cada monómero contiene un dominio N-terminal de 20 kDa con dos centros Fe-S, un dominio intermedio de 20 kDa que contiene FAD y un dominio C-terminal de 85 kDa que contiene el cofactor de molibdeno pterina y el sitio de unión al sustrato. Las dos enzimas pueden oxidar a NADH formando ERO (Zhang et al., 1998), fisiológicamente participan en la hidroxilación de purinas, pirimidinas y aldehídos, pero el papel esencial de la enzima es regular la velocidad de conversión de hipoxantina a xantina y xantina a ácido úrico. La reducción completa de XO requiere la transferencia de 6 electrones y en su reoxidación se transfieren al O₂ el cual genera 2 moléculas de H₂O₂ y 2 moléculas de O₂^{•-} (George y Struthers, 2009). La XO puede ser bloqueada por cloruro de difenileneiodonio (DPI) y alopurinol (Allo; 1,5 hidro-4H pirazol 3,4-d] pirimidina- 4,1), un inhibidor que a bajas concentraciones

es competitivo y a altas concentraciones su inhibición es no-competitiva (0.2 – 50 μM), dependiendo el tipo celular, al oxidarse Allo produce un metabolito que también es capaz de inhibir competitivamente a la XO denominado oxipurinol.

Otro mecanismo en el hígado, relacionado con la producción de ERO es a través de distintas vías de señalización, que involucra la participación de un desequilibrio, dado en el aumento de especies prooxidantes y la disminución de antioxidantes. El Cd genera radicales libres porque interfiere con el sistema antioxidante no enzimático celular como el GSH, que ha sido considerado como defensa del organismo a la toxicidad aguda producida por el metal, formando un complejo Cd-GSH a través de la unión con el grupo tiol. Esta hipótesis fue demostrada por Singhal, et al., 1987, en ratones tratados con butinona-L-sulfoximina (BSO), un inhibidor de la gamma-glutamylcisteína sintetasa (γ -GCS), presentando un incremento en el daño por el metal.

El GSH es un tripéptido (L- γ -glutamyl-cisteinil-L-glicina) de bajo peso molecular, el cual está presente en todas las células. Su concentración puede oscilar entre 0.1 a 10mM, estando presente el 85% en su forma reducida GSH y un 15% en su forma oxidada (GSSG). En los humanos el GSH total está presente en el plasma en concentraciones bajas, aproximadamente de 1 a 3 μM (Arias et. al., 1994).

La estructura del GSH presenta dos características importantes que le dan su funcionalidad: el grupo γ -glutamyl y la presencia de un grupo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína juegan un papel importante en las funciones del GSH, se ha considerado que la presencia del grupo tiol en el GSH le permite participar de manera directa o

indirecta en muchos fenómenos biológicos, entre los que se incluyen la síntesis de proteínas y protección del ADN, participa en la transformación de diversas proteínas uniéndose al GSH por medio del grupo tiol permitiendo las reacciones de tipo tiol-disulfuro que están involucradas en el ensamblaje y degradación de proteínas y catálisis. El GSH proporciona capacidad reductora para varias reacciones, participa en reacciones de amortiguamiento de ERO y puede unirse a metales divalentes como el Cd. El GSH participa en el metabolismo de varios compuestos endógenos, juega un papel catalítico en algunos casos y como reactante en otros, además interviene en el transporte de aminoácidos (Chan y Cherian, 1992).

El GSH es sintetizado de novo por dos enzimas, la γ -GCS y la glutatión sintetasa. La γ -GCS es un heterodímero constituido por dos subunidades 31 y 73 kDa, esta enzima interacciona con el ácido glutámico y cisteína formando al dipéptido γ -glutamilcisteína un intermediario que se encuentra en bajas concentraciones en el hígado y en otros tejidos porque es utilizado como sustrato por la GSH sintetasa, para sintetizar GSH. La γ -glutamiltranseptidasa (GGT) y γ -glutamilciclotransferasa son enzimas importantes en el ciclo γ -glutamil. En condiciones normales, la actividad de la γ -GCS es baja, ya que es inhibida por la presencia del GSH. Si está bloqueada la actividad de la GSH sintetasa, la γ -glutamilcisteína es convertida a 5-oxoprolina y cisteína libre por la acción de la γ -glutamilciclotransferasa. La hidrólisis del GSH y la transferencia del grupo γ -glutamil a aceptores tales como los aminoácidos cisteína, metionina, y glutamina, es catalizado por la GGT enzima que actúa en la membrana externa. El GSH es transportado a través de la membrana celular, este interactúa con la GGT

produciendo la hidrólisis del GSH a γ -glutamil y cisteinil-L-glicina. Los aminoácidos libres se unen al grupo γ -glutamil y es transportado al interior celular. Convirtiéndose en sustrato de la γ -glutamilciclotransferasa cuya función es la liberación del aminoácido y formación de 5-oxoprolina. La conversión de la 5-oxoprolina a L-glutamato, es dependiente de ATP y es catalizada por la 5-oxo-prolinasa. La cisteinil-L-glicina, formada por la transpeptidasa, es digerida por la peptidasa ocasionando la ruptura del péptido. Estas reacciones constituyen el ciclo de la γ -glutamil, el cual toma parte en la síntesis y degradación del GSH (Meister, 1995).

Otro mecanismo para incrementar ERO es consecuencia de la inflamación inducida por Cd, como se describió en el segundo mecanismo de daño, la activación e inactivación de células Kupffer (macrófagos) pueden liberar citocinas, que participan en la activación de una ruta que brinda una respuesta en el desbalance de los sistemas de defensa antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSHpx) y generar con ello un incremento en ERO.

La formación de ERO y la subsiguiente restauración de la homeostasis celular después del estímulo por el metal llevan a la activación o silenciamiento de genes que regulan la transcripción de enzimas antioxidantes y proteínas estructurales. El Cd es un inductor efectivo de un gran número de proteínas de estrés entre las que se encuentran la hemoxigenasa-1, Hsp70, Hsp90 y MT (Liu et al., 2002). El Cd también activa factores de transcripción. Hay reportes que indican que el Cd induce la actividad del activador de proteínas 1 (AP1) en células

epidermales (Huang et al., 2001) e induce la expresión de genes que responden al daño al ADN (Dally y Hartwing, 1997).

1.4 FACTOR ACTIVADOR DE PROTEINA 1 (AP1)

Hace mas de 20 años fue identificado un nuevo factor transcripcional denominado AP1 (Angel et al., 1987; Curran y Franza, 1988), el cual participa en la expresión basal de genes, así como de genes inducibles, regulando procesos en la diferenciación, proliferación, apoptosis celular y transformación oncogénica (Karin et al., 1997; Wagner, 2002). AP1 se une tanto al promotor del virus (SV40), como al promotor del gen de la MT y también a regiones de control de genes virales y celulares que responden a sustancias inductoras de tumores, como los ésteres de forbol (Rauscher FJIII et al., 1988).

AP1 no es una proteína sencilla, está formada por un complejo dimérico integrado por familias y subfamilias; Fos (c-Fos, v-Fos, FosB, Fra1 y Fra2), Jun (c-Jun, JunB, JunD), Jun asociadas a un dímero (JDP1 y JDP2), o puede estar integrada con factores de activación transcripcional (ATF2, LRF1/ATF3 y B-ATF) y proteínas con cremallera de leucina (bZIP). Jun y Fos están relacionadas porque tienen una estructura muy similar. Estas proteínas se asocian entre sí a través de las bZIP siendo necesarias pero no suficientes para formar homodímeros estables (Jun/Jun) o heterodímeros (Jun/Fos). La composición de AP1 puede variar en relación con el estímulo aplicado y al patrón de transducción de señales utilizado por la célula. Es importante resaltar que Fos no puede formar homodímeros (Halazonetis et al., 1988). La unión con el ADN se realiza con una afinidad elevada,

específicamente a la secuencia denominada elementos de respuesta a tetradecanoil-forbol-mirestato-acetato ó TPA (TRE); integrado por la secuencia palindrómica 5'-TGACTCA-3' (Karin et al., 1997; Wisdom, 1999; Chinenov y Kerppola, 2001). Figura 2.

Durante más de una década se han publicado estudios revelando que la activación de algunos componentes de AP1 son dependientes del estímulo que indudablemente afectan la intensidad de la señal, por ejemplo: citocinas ($TNF\alpha$), factores de crecimiento, neurotransmisores, ERO, estrés oxidante, hormonas, mitogénos, radiación UV, infecciones bacterianas o virales etc. (Wisdom, 1999; Shaulian y Karin, 2001, 2002).

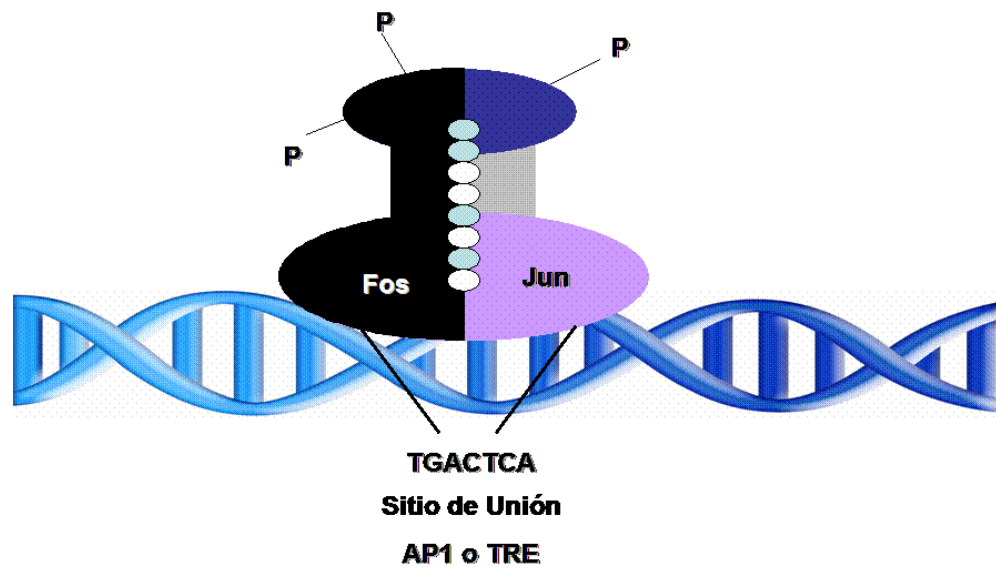


Figura 2. Esquema representativo de la secuencia AP1 o TRE para el factor de transcripción AP1. La secuencia está presente en el promotor de una gran diversidad de genes (Alcantará, 1998).

1.4.1 Activación Transcripcional de AP1

Los factores de transcripción han sido considerados como mensajeros nucleares de la señal extracelular. El mecanismo se inicia con el reconocimiento de un estímulo extracelular con el receptor específico (Karin, 1995), la actividad de los factores ya sea preexistentes o de *novo* son modulados por la fosforilación mediada por cinasas tales como la proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa A (PKA), las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), proteínas citoplásmicas pasan de un estado inactivo o de reposo a un estado activo, cuando son fosforiladas por las proteínas cinasas, que les transfieren grupos fosfato a residuos de serina o de treonina. La fosforilación parece ser una señal para que los factores de transcripción viajen al núcleo de la célula en donde reconocen secuencias específicas localizadas en el ADN (Karin et al., 1997). La interacción del factor con una secuencia consenso correspondiente tiene un efecto positivo o negativo sobre la frecuencia de transcripción del gen que regula e induce la expresión de los protooncogenes *c-fos* y *c-jun*, los cuales se modifican para formar las proteínas c-Fos y c-Jun (Shaulian y Karin, 2002). Todos los factores tienen un dominio de unión al ADN rico en residuos de lisina, arginina e histidina, razón por la cual se le llama dominio básico. Con base a la estructura, los factores de transcripción forman varios grupos. Por ejemplo, los factores bZip, AP1 y AP2 tienen además, una región de leucinas en serie que asemeja una cremallera o “zipper” y esto le confiere la capacidad de unirse entre si. La familia de los factores de transcripción AP1 ha sido una de las más estudiadas encontrándose que tiene una diversidad de efectos funcionales que se explica por el hecho de que la

secuencia reguladora AP1 se encuentra en la región promotora de genes muy diversos. Por ejemplo, la secuencia AP1 está presente en el promotor del gen de la integrina p150 (López-Rodríguez et al., 1996) un receptor para moléculas de adhesión. La misma secuencia se encuentra en el promotor de distintos genes de la colágena, la principal proteína fibrosa, angiotensina, o factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF). Se ha sugerido que en células epidermales, el cadmio puede inducir la activación de PKC y MAPK (Huang et al., 2001; Rodius et al., 2007).

1.5 ASPECTOS GENERALES DE LAS PROTEÍNAS CINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)

Con el nombre en inglés *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), son proteínas conservadas evolutivamente. Responden al estrés físico y químico, controlando la supervivencia, adaptación y su principal mecanismo de acción es la regulación de la expresión génica controlando procesos de proliferación, diferenciación, crecimiento, desarrollo, movimiento e incluso la apoptosis (Dong et al., 2002). Su actividad está regulada a través de proteínas cinasas dependiendo la subfamilia como: MAPK cinasa (MAPKK o MKK o MEK), éstas a su vez son activadas por la MAPKK cinasa (MAPKKK o MKKK), quienes tienen diferentes señales de activación, sin embargo las proteínas G son importantes en su activación (Figura 3). Los estímulos que activan a estos mediadores intracelulares son múltiples, incluyendo los ésteres de forbol, factores de crecimiento, situaciones de estrés ambiental como las producidas por las radiaciones ionizantes, el choque osmótico, el estrés oxidante causado por el Cd o citocinas pro-inflamatorias (Dong

et al., 2002). Tras la llegada del estímulo la señal puede seguir distintas vías MAPK independientes o con pequeñas conexiones entre ellas, de manera que mientras algunos estímulos son específicos para una sola vía otros son comunes para dos o más, por lo que la coordinación entre estas rutas paralelas es importante. En mamíferos se conocen tres grupos de MAPK: cinasas activadas por señales extracelular (ERK), la p38 MAP cinasa y la cinasa con c-Jun en el amino terminal o

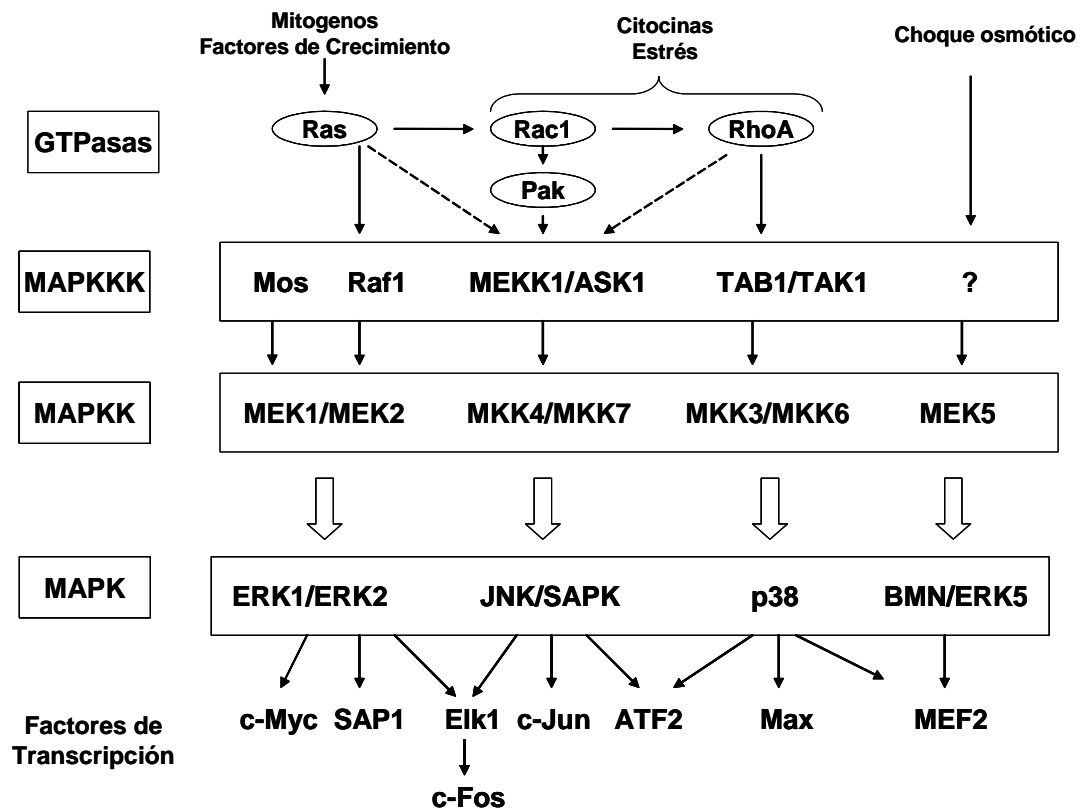


Figura 3. Activación de las MAPK. Los módulos de activación se componen de MAPKKK, MAPKK y MAPK. Las GTPasas de la familia de Ras y RhoA transducen las señales extracelulares a la cascada de señalización de las MAPK (Dong et al., 2002). Las MAPKKK activadas, pueden a su vez activar una o varias MAPKK; sin embargo las MAPKK son específicas para activar a las MAPK. Una vez activadas las MAPK fosforilan factores de transcripción, los cuales controlan procesos como crecimiento, diferenciación y apoptosis.

también conocida como proteína cinasa activada por estrés (JNK/SAPK). En todos los casos se activan por la fosforilación dual del motivo compuesto de un tripéptido Treonina- Xaa-Tirosina (**Thr-Xaa-Tyr**) que le da la identidad al grupo (Kyriakis y Avruch, 2001).

1.5.1 PROTEÍNA CINASA REGULADA POR ESTÍMULOS EXTRACELULARES (ERK)

Las ERK, fueron originalmente identificadas como proteínas fosforiladas que interaccionan con la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2) en respuesta a la activación de receptores con actividad tirosina cinasa (Adams y Sweatt, 2002), principalmente son reguladas por estímulos extracelulares como: factores de crecimiento, la ligación de receptores acoplados a proteínas GTPasa monomérica, Ras que activa a la proteína Raf (Raf1, B-Raf y A-Raf) que a su vez activa a dos proteínas: MEK1 y MEK2, las cuales fosforilan a las isoformas, ERK1 y ERK2 con un peso molecular de p44 y p42 respectivamente (Cobb, 1999). La activación se realiza al fosforilar los dos residuos de aminoácidos treonina-glutamina-tirosina (**Thr-Glu-Tyr**), que una vez activada lleva su acción en diversos blancos como proteínas de citoesqueleto (MAP-2 y Tau), proteínas nucleares, incluyen factores de transcripción (c-Myc, c-Fos, Elk1, CREB y ATF2) y proteínas de señalización Fosfolipasa 2A (PLA₂). Finalmente, la activación de ERK debe ser regulada por medio de la inactivación que realiza las proteínas fosfatasas de las MAP (MKP), estas enzimas desfosforilan selectivamente los dos residuos de Tyr y Thr. Para entender mejor el mecanismo de acción de las ERK se han utilizado bloqueadores de la señal o bien inhibidores como U0126, PD098059, este último es un inhibidor

no competitivo de MEK1 y MEK2, se une a un lugar diferente al sitio activo evitando que Raf la fosforile, dependiendo del tipo celular la concentración puede variar de 2 – 50 μ M (Alessi et al., 1995).

1.5.2 MAPK ACTIVADA POR ESTRÉS p38

La p38, tiene cuatro isoformas (α , β , γ , δ), fue aislada como una proteína de bajo peso molecular 38kDa, fue purificada y clonada como una molécula que unía a los derivados de pirimidinil imidazol, sustancias que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias. Las proteínas p38 α y p38 β , se localizan de manera general en la mayoría de las células. La p38 γ se expresa de manera diferencial en otros tejidos como músculo esquelético (Lechner et al., 1996) y la p38 δ en testículo, páncreas, intestino delgado (Kumar et al., 1997). Las isoformas conservan el 60% de identidad con su grupo y entre el 40 y 45% con la familia de las MAPK.

La activación de p38 se presenta por la fosforilación dual de dos residuos de aminoácidos treonina-glicina-tirosina (**Thr-Gly-Tyr**), activada por MKK3 y MKK6 (Imagen 3 (Dong et al., 2002)). Estas proteínas son activadas previamente por las MKKK y a su vez estas proteínas por estímulos extracelulares como LPS, TNF- α (Han et al., 1994; Hirasawa et al., 2009; Lu y Cederbaum, 2009), trombina (Chan et al., 2008), factores de crecimiento, choque térmico, y la respuesta depende del tipo celular, ya que un estímulo puede activar a p38 en una célula y puede inhibir la actividad en otro tipo celular. Numerosos factores de transcripción son fosforilados y consecuentemente activados corriente abajo como el factor de transcripción activador 1 (ATF1) (Chan et al., 2008) y ATF2 (Hirose et al., 2009), CHOP y p53, la

activación de ATF2 puede formar un heterodímero con c-Jun y asociarse directamente con el sitio de reconocimiento de AP1. p38 puede ocasionar la expresión de citocinas proinflamatorias IL1 α , IL6, IL12 o INF γ , TNF α (Karcher y Laufer, 2009). El uso de células mutantes para MKK3 y 6, permite entender las funciones de esta proteína en la regulación de genes, así como los inhibidores SB202190, SB202474 y SB203580 (4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)1 H-imidazol), este último se puede utilizar en un rango de (0.7- 25 μ M) dependiendo el tipo celular (Clerk y Sugden, 1998). Kalmes et al., (1999), proponen que el mecanismo de acción de este inhibidor está acoplado a MEK/ERK debido a la activación de Raf1 independiente de Ras ejerciendo un efecto antiapoptótico en células de músculo liso del corazón (SMCs) al activar ERK.

1.5.3 PROTEÍNA CINASA CON c-JUN AMINO TERMINAL (JNK/SAPKs)

JNK también conocida como proteína activada por estrés, fue identificada y purificada como la proteína asociada a microtúbulos p54 activada por cicloheximida (Dérillard et al., 1994). Posteriormente se describió que esta proteína se unía al dominio amino terminal de activación de c-Jun y que fosforilaba a ésta en las serinas (Ser) 63 y 73 implicadas en la regulación de AP1 (Pulverer et al., 1991). Las JNK están codificadas por tres genes, JNK1 (p54) y JNK2 (p46) que se expresan generalmente en todas las células mientras que JNK3 se expresan en neuronas (Resnick y Fennell, 2004), corazón y testículos. Estos genes sufren procesamientos alternativos que dan lugar a diez isoformas distintas cuatro para JNK1 y cuatro para JNK2 y sólo dos para JNK3 que interactúan selectivamente para

fosforilar a ATF2, Jun, o Elk1 (Gupta et al., 1996; Turjanski et al., 2007). La activación de JNK se da similar a los otros grupos, a través de la fosforilación dual de treonina-prolina-tirosina (**Thr-Pro-Tyr**) (Dong et al., 2002), dada por MKK4 (SEK1) y MKK7. Existen diferencias en cuanto a los estímulos que regulan estas dos proteínas, de manera que, MKK4 se activa preferentemente por estrés, mientras que MKK7 se activa principalmente por citocinas (Tournier et al., 2001). JNK fosforila el dominio de activación transcripcional de ATF2, y ATF1, c-Jun, c-JunD, Elk1, regulando la expresión génica por otros mecanismos como son regulación de la estabilidad proteica y transporte al núcleo. JNK aumenta la estabilidad proteica de c-Jun, por fosforilación de Ser63 y 73 impidiendo la ubiquitinación. Este proceso aumenta la vida media de c-Jun, causando su acumulación. Para explicar la participación de las JNK en la respuesta dada por un estímulo se han usado moléculas como PS600125 (antra[1-9 cd] pirazol-6(2H)-1), es un inhibidor reversible competitivo con ATP específico para las tres isoformas (Bennett et al., 2001), se utiliza en un rango de 5 – 50 μ M dependiendo del tipo celular (Joiakim et al., 2003; Yeh y Yen, 2005; Park et al., 2009; Kuo et al., 2009)

En general se considera que las ERO activan a las MAPK, sin embargo la respuesta de los diferentes miembros de la familia de las MAPK es un proceso que depende del tipo celular. Se sugiere que las JNKs y la cinasa de p38 participan cooperativamente en la inducción de la apoptosis inducida por Cd. Las MAPK pueden regular al factor de transcripción AP1 en la respuesta celular a estímulos extracelulares (Figura 4).

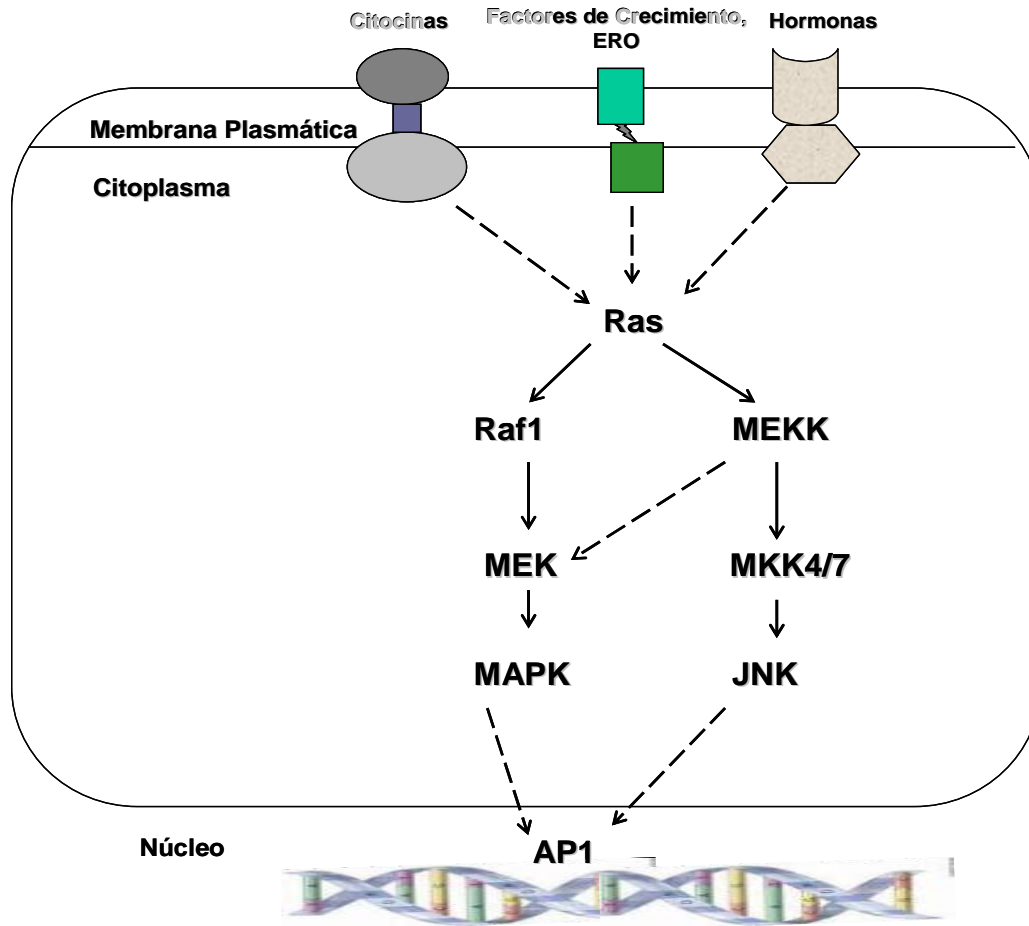


Figura 4. Resumen de las vías de transducción que emplean los diversos tipos de receptores de membranales para inducir la activación de AP1. Algunas proteínas que participan son proteínas G y cinasas, las flechas continuas son interacciones directas entre las proteínas y las discontinuas interacciones indirectas (Alcántara, 1988)

1.6 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (Hsp)

El término de proteína de estrés o choque térmico (Hsp), designa a una clase de proteínas que son inducidas en respuesta a un amplio rango de señales por ejemplo: el calor, radiación UV, metales pesados, como el Cd (Goering et al., 1993) y ERO (Vayssier y Polla, 1998). En una célula normal, el contenido total de Hsp es aproximadamente 1-2% del total de proteína celular, mientras que en células sometidas a estrés puede incrementar hasta un 20% (Donati et al., 1990). Estas

proteínas son clasificadas de acuerdo a su función y peso molecular (27-110 kDa) (Kregel, 2002). Las Hsp están presentes en el citosol, la mitocondria, retículo endoplásmico rugoso y el núcleo (Feder y Hofmann, 1999). Funcionan como chaperonas moleculares participando en el plegamiento asistido de otras proteínas. También participan en la localización, regulación, secreción y catabolismo intracelular de proteínas. Así mismo, se les han atribuido efectos citoprotectores y están involucradas en la regulación de muchas vías celulares afectando la expresión de genes a nivel transcripcional a través de factores de transcripción (Rutherford y Zuker, 1994). Entre las Hsp más estudiadas están la familia Hsp70, Hsp72, Hsp73, Hsp75 y Hsp78 ya que son más sensibles al cambio de temperatura y las más conservadas. Algunas funciones de las Hsp70 son mantener la estructura, la translocación de las proteínas a través de las membranas en varios compartimientos celulares y el prevenir la agregación de las proteínas inestables. Las Hsp70 han sido descritas en hepatocitos en cultivo primario y células HepG2 (Souza et al., 2004a). La rápida expresión de las Hsp70 en respuesta al cadmio está principalmente regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional. La regulación transcripcional de los genes Hsp está mediada por el factor de transcripción de choque térmico (HSF), el cual es inactivo en células no estimuladas y es activado durante el estímulo con el agente agresor. Finalmente la inducción de Hsp70 regula la actividad de JNK (Mizukami et al., 2001). Aunque el mecanismo de citoprotección no se conoce con exactitud, se le ha dado una participación relevante en mantener el equilibrio redox celular dado por los sistemas oxidantes y antioxidantes. Regulando la respuesta celular ocasionada por las citocinas que en

condiciones normales tienen una función biológica, sin embargo en procesos patológicos como la toxicidad por Cd, las concentraciones se alteran ocasionando un desbalance entre ellas aumentando las ERO.

1.7 MODELO CELULAR

Los efectos tóxicos de los metales pesados pueden ser diferentes dependiendo de una exposición aguda o crónica, ya que el daño crónico puede resultar de la acumulación del agente en el organismo en pequeñas concentraciones por dosis repetidas para producir daño biológico a largo plazo; en cambio, una exposición de tipo agudo se debe a que concentraciones mayores del agente tóxico, entra al organismo en una sola administración, produciendo un daño inmediato. Hay variaciones en los efectos toxicológicos entre las especies. Los criterios determinados para la selección del modelo animal están dados por una alta sensibilidad al metal y por una similitud en el metabolismo con respecto al humano. Una variedad de datos experimentales revelan que, en los humanos, el Cd ocasiona numerosas alteraciones fisiológicas, por ejemplo, hepatotoxicidad y problemas respiratorios. Sin embargo, es difícil contestar en el animal íntegro algunas preguntas a nivel celular, debido a los sistemas homeostáticos presentes, por ello es conveniente utilizar cultivos primarios o líneas celulares dependiendo de los objetivos del trabajo (Gutiérrez et al., 1994). Las líneas celulares son un modelo que se ha utilizado para estudiar los efectos tóxicos del Cd, debido a que las células conservan sus funciones hepatocelulares, no presentan alteraciones fenotípicas y, por lo tanto, es posible analizar en este sistema el efecto de un agente tóxico por períodos

prolongados o cortos. Ejemplos de líneas celulares son: de epitelio renal porcino LLC-PK, células fetales hepáticas humanas WRL-68.

Las ventajas que presentan los cultivos celulares son: a) Se trata de un solo tipo celular sin glándulas, sin vasos, ni terminales nerviosas, b) Todas las células tienen la misma edad y se les puede sincronizar para que estén en la misma fase del ciclo celular, c) La composición del medio es conocido, d) Se pueden obtener grandes cantidades de células, lo que posibilita su análisis bioquímico y e) Se puede conocer las respuestas a nivel celular, sin interferencia de procesos homeostáticos.

En el laboratorio se han realizado estudios previos con la línea celular HepG2 (hepatoblastoma humano), para evaluar el daño ocasionado por diferentes tóxicos (Hernández et al., 1998; Gutiérrez-Ruiz et al., 1999; Gutiérrez-Ruiz et al., 2001, Souza et al., 2004b), siendo un modelo bien estandarizado es utilizado por diversos grupos de investigación (Roman et al., 2000; Yoo et al., 2002; Merrill et al., 2002; Dehn et al., 2004; Oishi et al., 2007; Urani et al., 2007; Kawata et al., 2009). Es por ello que las células HepG2 fueron utilizadas para estudiar la toxicidad con Cd y así evaluar algunas alteraciones morfológicas y funcionales que el metal produce sobre ellas y de esta manera poder contribuir a describir uno de los posibles mecanismos de daño a nivel celular.

2. JUSTIFICACIÓN

El cadmio es un metal hepatotóxico del cual se han publicado múltiples artículos acerca de su efecto tanto a nivel sistémico como celular. Sin embargo, aún no se conoce con exactitud la vía de transducción de señales para la respuesta celular por el Cd, por lo que se pretende evaluar en el presente estudio el papel de la vía de señalización MAPK/AP1 involucrada en la respuesta celular causada por la exposición al metal. Asimismo, se pretende evaluar la fuente productora de ERO implicada en la activación de las MAPK inducidas por el cadmio. Finalmente, se evaluará la participación de las MAPK en la producción de Hsp70 en respuesta al Cd en células hepáticas.

3. HIPÓTESIS

Las células HepG2 expuestas al cadmio pueden responder activando factores de transcripción como AP1, esta activación puede depender de las vías que participan en la transducción de señales. Entre ellas las MAPK, son responsables de regular las subunidades de c-Jun y de c-Fos, que integran al factor AP1 en forma de homo o heterodímero.

Considerando que el cadmio es un metal pro-oxidante que puede inducir indirectamente la producción de ERO, éstos pueden ser los intermediarios en la activación de las MAPK.

La Hsp70 es sensible a ERO, es por ello que su incremento puede ser mediado por algunos factores de transcripción como AP1, el cual es regulado por las MAPK.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la vía de señalización MAPK/AP1 en respuesta al cadmio en células HepG2 y su participación en la inducción de Hsp70

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

4.2.1 Evaluar la activación del factor de transcripción AP1 y su composición (c-Jun y c-Fos) en células HepG2 tratadas con CdCl₂

4.2.2 Determinar la activación de las MAPK (ERK, p38 y JNK) y su participación en la activación del factor de transcripción AP1 en las células HepG2 expuestas a CdCl₂

4.2.3 Identificar la fuente de producción de ERO que participa en la activación de las MAPK por el CdCl₂

4.2.4 Determinar la producción de Hsp70 como respuesta celular al cadmio y su relación con las MAPK en las células HepG2 expuestas a CdCl₂

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 CULTIVO CELULAR

La línea celular HepG2 proveniente de un hepatoblastoma humano fue adquirida comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA), Las células HepG2 fueron mantenidas en medio de Williams (Sigma, St Louis, MO) suplementado con 8% de suero fetal de bovino (SFB, Hy-Clone, Logan, UT, EUA), 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina (Microlab). Este medio se llamó medio completo. Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Corning, Acton, MA, EUA) y el medio de cultivo se les cambió cada tercer día. Las células se levantaron con tripsina-EDTA al 0.25% (Sigma) y se resembraron a una dilución 1:3 en botellas de cultivo una vez a la semana. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera del 5% de CO₂ y 95% de humedad a una temperatura de 37°C. Todos los experimentos se realizaron cuando las células se encontraban en fase de crecimiento logarítmica.

5.2 ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP1

Para poder estudiar la activación de transcripción AP1, las células HepG2 se sembraron en cajas de Petri de 100 mm de diámetro (Costar) con medio completo a una densidad de 4×10^6 células/caja por 24 h bajo condiciones fisiológicas. Después de este tiempo, se lavaron las células con amortiguador de fosfatos (PBS) y se les cambió el medio por otro sin suero y conteniendo 5 µM de CdCl₂, las células se dejaron incubar por diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 5 y 6 h) a 37°C. Las células se lavaron con PBS y se aisló la proteína nuclear para determinar la activación del factor de transcripción AP1 por el ensayo de movilidad electroforética (EMSA). Las

células control fueron mantenidas durante 6h con medio Williams sin suero en ausencia del metal.

5.3 EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA NUCLEAR

La extracción de proteína nuclear, se realizó de acuerdo con el método descrito por Morales et al., (1997). A las células se les adicionó 800 μ l de un buffer de lisis A, pH 7.9 formado por HEPES 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM y PMSF 0.5 mM. El homogenado celular fue resuspendido varias veces y se dejó reposar 15 min a 4°C. Después se le agregó 50 μ l de IGEPAL 10% y fue agitado vigorosamente por 10 seg. Inmediatamente, las muestras fueron centrifugadas a 12235 x g por 30 seg y se desechó el sobrenadante. El precipitado obtenido (núcleos), fue incubado durante 15 min a 4°C en 30 μ l de buffer C pH 7.9, formado por HEPES 20 mM, NaCl 0.4 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM y PMSF 1 mM. El homogenado celular fue agitado vigorosamente cada 5 min. Terminado el tiempo de incubación fue centrifugado a 16654 x g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se tomó una alícuota de 5 μ l para la cuantificación de proteína nuclear con el reactivo de Bradford (Bio Rad, Hercules, C.A, USA), el resto fue conservado a -80°C para su empleo en los ensayos de movilidad electroforética (EMSA).

5.4 ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)

Para determinar la activación del factor de transcripción AP1, se utilizó la técnica de EMSA, la cual se basa en la unión específica de los factores de transcripción activos al DNA y se realizó de acuerdo con el método descrito por Morales et al., (1997).

Se tomaron 20 μg de la proteína nuclear y se hicieron reaccionar con 2 μl del oligonucleótido AP1 (5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3') (Promega, Madison, WI, EUA) que fue marcado por la cinasa polinucleótido T4 con [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (NEN, Life Science Products, Inc.) en 5 μl de buffer formado por Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, glicerol 20%, MgCl_2 5 mM y poly (dl.dC) 1 μg . La reacción se dejó incubar durante 15 min a 25°C. Para los ensayos de super-retardo, los extractos nucleares fueron preincubados por 15min a 25°C con el anticuerpo (anti c-Jun o anti c-Fos) (Santa Cruz Biotechnology INC, Santa Cruz, CA.). Después se incubaron con el oligonucleótido marcado con $\gamma^{32}\text{p}$ -ATP por 15 min a 25°C. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 6%, el cual fue preparado al mezclar 4 ml de acrilamida-bisacrilamida (29:1, Sigma) 1 ml de TBE 5X, 15 ml de agua desionizada, 200 μl persulfato de amonio al 10%, y 10 μl de TEMED. Después a cada muestra se le agregaron 2 μl de azul de bromofenol 0.1% y se dejaron correr en una cámara de electroforesis (Bio-Rad, Hércules, CA) a 150 Volts por 2 h. Los complejos ADN-proteína fueron expuestos en una placa radiográfica (Kodak) y revelados. Los resultados fueron visualizados en un densitómetro GS 670 (Bio Rad) y analizados en el Molecular Analyst (Bio Rad).

5.5 COMPOSICIÓN DEL FACTOR AP1 (c-Jun y c-Fos)

Para poder estudiar la composición del factor AP1 (c-Jun y c-Fos) activado en presencia del metal, las células fueron tratadas durante 4 h con 5 μM de CdCl_2 . Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y se realizó la extracción de proteína nuclear y un ensayo de retardo. Los extractos nucleares fueron preincubados por 15 min a 25°C con 4 μl de cada anticuerpo (anti c-Jun o anti c-Fos) y se realizó el ensayo por EMSA.

5.6 LAS MAPK (ERK, p38 y JNK) COMO MEDIADORES EN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP1

Para estudiar la participación de las proteínas MAPK (ERK, p38 y JNK) en la activación del factor AP1. Las células HepG2 fueron tratadas con 20 μM de cada uno de los diferentes de inhibidores de las MAPK: PD98059 (inhibidor de ERK) o SB203580 (Inhibidor de p38) o SP600125 (Inhibidor de JNK) y se dejaron incubar durante 1 h a 37°C. Después se les adicionó 5 μM de CdCl_2 y se dejaron incubar durante 4 h a 37°C. Las células control estuvieron en ausencia del CdCl_2 . Pasado este tiempo las células fueron lavadas con PBS y se realizó la extracción de proteína nuclear y el ensayo de EMSA.

5.7 ACTIVACIÓN DE LAS MAPK

Para evaluar la activación de las MAPK, las células HepG2 se sembraron en cajas de petri de 60 mm de diámetro (Costar) con medio completo a una densidad de 3×10^6 células/caja durante 24 h bajo condiciones fisiológicas. Pasado ese

tiempo, se les cambió el medio por otro sin suero, conteniendo 5 μM de CdCl_2 y se dejaron incubar a diferentes tiempos (0.5, 1, 2, 4, y 6 h) a 37°C. Las células se lavaron con PBS y se aisló la proteína total para determinar la máxima activación de las MAPK (ERK, p38 y JNK) por el método de Western blot (WT). Las células control fueron mantenidas durante 6h con medio Williams sin suero en ausencia del metal.

5.8 EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA TOTAL

La extracción de la proteína total se realizó utilizando 200 μl de un amortiguador de lisis pH 8.0, formado por Tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, IGEPAL 0.5%, NaF 100 mM, NaOV₃ 200 mM, todos los reactivos marca Sigma y 80 μl de un stock de inhibidor de proteasas Complete (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN). El homogenado celular fue resuspendido varias veces y se dejó reposar 15 min a 4°C. Después fue centrifugado a 16654 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante conteniendo la proteína celular fue almacenado en pequeños volúmenes y almacenado a -80°C. De una de las alícuotas se cuantificó la concentración de proteína con el reactivo de Bradford.

5.9 ANÁLISIS POR WESTERN BLOT (WT)

El ensayo de WT por el método de Preston et al., 1996, se basa en la identificación de la proteína citoplásmica por medio de la unión específica con el anticuerpo primario y el reconocimiento de este anticuerpo por un segundo

anticuerpo que lleva una marca fluorescente para mostrar que se encuentra presente.

Se tomaron 20 μ g de la proteína total y se adicionó el 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 incubar durante 5 min a 95°C y se colocaron en geles de acrilamida-bisacrilamida (29:1, Sigma) al 10% en un amortiguador formado por Tris HCl 1.5M pH 8.8, SDS al 10%, persulfato de amonio 10% y 5 μ l de TEMED. Después, las muestras se dejaron correr en una cámara de electroforesis (mini-Protean II, Bio Rad) con un amortiguador de corrida pH 8.3, formado por Tris-Base, glicina y SDS durante 45 min a 200 Volts a 25°C. La proteína fue transferida a una membrana de difloruro de polivinilideno (PVDF) polyscreen (Immobilon-P, Amersham Pharmacia Biotech) usando un amortiguador de transferencia pH 8.3, formado por Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0.05% y metanol al 20%, durante 14 h, 30 Volts a 25°C. Después la membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada al 5% en amortiguador TBS-Tween20 pH 7.5, formado por NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM y Tween 20 al 0.1%, por 30 min dos veces. Posteriormente se lavó con TBS-Tween20 varias veces y se le agregó el anticuerpo primario (p-ERK1/2, ERK1/2, p-p38, p38, p-JNK, JNK α -actina y Hsp70) humano con una dilución 1:500 (Santa Cruz, Biotechnology) por 1 h. Se lavó por duplicado con TBS-Tween20 suplementado con leche durante 10 min. Posteriormente se realizaron otros dos lavados con TBS-Tween20 durante 5 min y después se le agregó el anticuerpo secundario (anti-cabra-IgG, anti-ratón, anti-conejo) acoplado a la peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) 1:10000 por 1 h.

La membrana se lavó con TBS-Tween20 durante 10 min, por triplicado y 5 min con TBS. Finalmente la membrana fue tratada con el Ensayo SuperSignal[®] West Pico Substrate (Pierce, Chem, Co.) durante 10 min y expuesta en una placa radiográfica (Kodak). Los resultados fueron visualizados en un densitómetro GS 670 (Bio Rad) y analizados en el Molecular Analyst (Bio Rad).

5.10 PARTICIPACIÓN DE LA DEPLECIÓN DE GSH, FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y SISTEMA XO EN LA ACTIVACIÓN DE LAS MAPK

Para poder estudiar la fuente de ERO como mediador en la activación de las MAPK como respuesta al cadmio. Las células HepG2 fueron pre-tratadas durante 30 min con diferentes inhibidores: L-butionina-sulfoximina (BSO 2 mM) inhibidor de la γ -glutamyl-cisteinil sintetasa, cianuro de potasio (KCN 0.2 mM) inhibidor no desacoplante de la cadena respiratoria y alopurinol (Allo 0.02 mM) inhibidor de la xantina oxidasa. Después se les adicionó 5 μ M de CdCl₂ junto con el inhibidor correspondiente y fueron incubadas durante 2 h (ERK1/2) y 4 h (p38 y JNK). Los controles fueron las células incubadas solo con medio Williams sin suero en ausencia del metal y células incubadas únicamente con los inhibidores durante 4 h. Posteriormente fueron lavadas con PBS y se realizó la extracción de la proteína total para realizar la identificación de la activación de las MAPK (ERK1/2, p38 y JNK), así como de α -actina por el método de WT.

5.11 PARTICIPACIÓN DE LAS MAPK EN LA PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA

Hsp70

La proteína Hsp70 puede ser inducida por el cadmio a través de la activación del factor de transcripción AP1 vía las MAPK. Es por ello que las células HepG2 fueron expuestas con 20 μM de cada uno de los diferentes inhibidores de las MAPK PD98059 (inhibidor de ERK) o SB203580 (Inhibidor de p38) o SP600125 (Inhibidor de JNK) y se dejaron incubar durante 1 h a 37°C. Después se les adicionó 5 μM de CdCl_2 y se dejaron incubar durante 4 h a 37°C. Las células control estuvieron en ausencia del CdCl_2 y otro grupo control estuvo expuesto únicamente a los inhibidores en ausencia del metal. Pasado este tiempo las células fueron lavadas con PBS y se realizó la extracción de proteína total y la identificación de las proteínas Hsp70 y α -actina por el método de WT.

5.12 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA

El contenido de proteína en las muestras se realizó por el método de Bradford (1976) con el reactivo de Bradford (Bio Rad). Se tomó una alícuota de 5 μl de las muestras y se le agregó 2.5 ml del reactivo de Bradford (1:4) se incubó 20 min a 25°C. La cuantificación fue realizada con una curva patrón de albúmina sérica bovina en un rango de 0.1-0.5 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente se leyó la absorbancia y se determinó la concentración de la proteína.

5.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada experimento se realizó por triplicado en tres eventos independientes. El análisis estadístico de los resultados obtenidos, se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey. Se utilizó el programa SPSS versión 12 y el nivel de significancia de $p < 0.05$ fue tomado para considerar los valores estadísticamente diferentes.

6. RESULTADOS

6.1 ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP1

Las células HepG2 fueron tratadas con 5 μM de CdCl_2 , esta concentración fue elegida de experimentos previos en el laboratorio (Souza et al., 2004a), en la figura 5. Se observa que las células tienen una viabilidad del 90% a 6h. Es por ello que la activación del factor de transcripción AP1, se determinó por el ensayo de EMSA, el cual se basa en el retardo del oligonucleótido unido a la proteína nuclear. La señal ^{32}P emitida fue analizada en el Molecular Imagen para cuantificar la intensidad de la activación del factor. El valor basal del factor AP1 en las células control fue tomado de referencia (1 unidad DO). En la figura 5', se observa un incremento en la activación de AP1, de manera dependiente del tiempo (1-6 h) de exposición al tratar a las células HepG2 con 5 μM de CdCl_2 . Las células tratadas con 5 μM de CdCl_2 durante 1 y 2 h, mostraron un incremento en la activación del factor AP1 en función del tiempo de 2.1 y 9.5 veces respectivamente, siendo el último, significativo con respecto al control. Después de 3 h de exposición al Cd, se aprecia un incremento significativo con respecto a las células sin tratamiento de 19.4 veces. A partir de las 4, 5 y 6 h de tratamiento, las células HepG2 muestran un incremento constante en la activación del factor AP1, siendo de 24.5 veces. Para evaluar el estudio de competencia, se trataron a las células con 50 veces más del oligonucleótido no marcado de AP1 (control no marcado, NM). El ensayo de EMSA muestra la región correspondiente al factor de transcripción AP1 por la competencia. Para demostrar que las bandas que se observan en los geles son

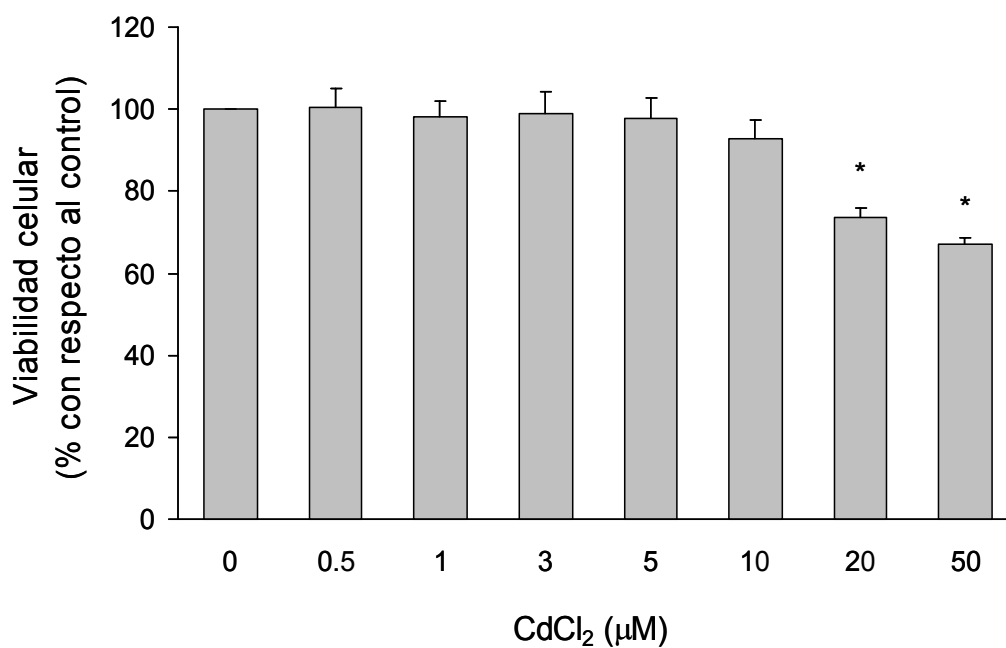


Figura 5. Curva de viabilidad de las células HepG2 después de 6h de tratamiento con diferentes concentraciones de CdCl₂ determinado por MTT. Cada barra representa el valor promedio ± error estándar (N = 9). * Diferencia significativa con respecto a las células control (p < 0.05). (Datos reportados en: Souza et al., 2004a)

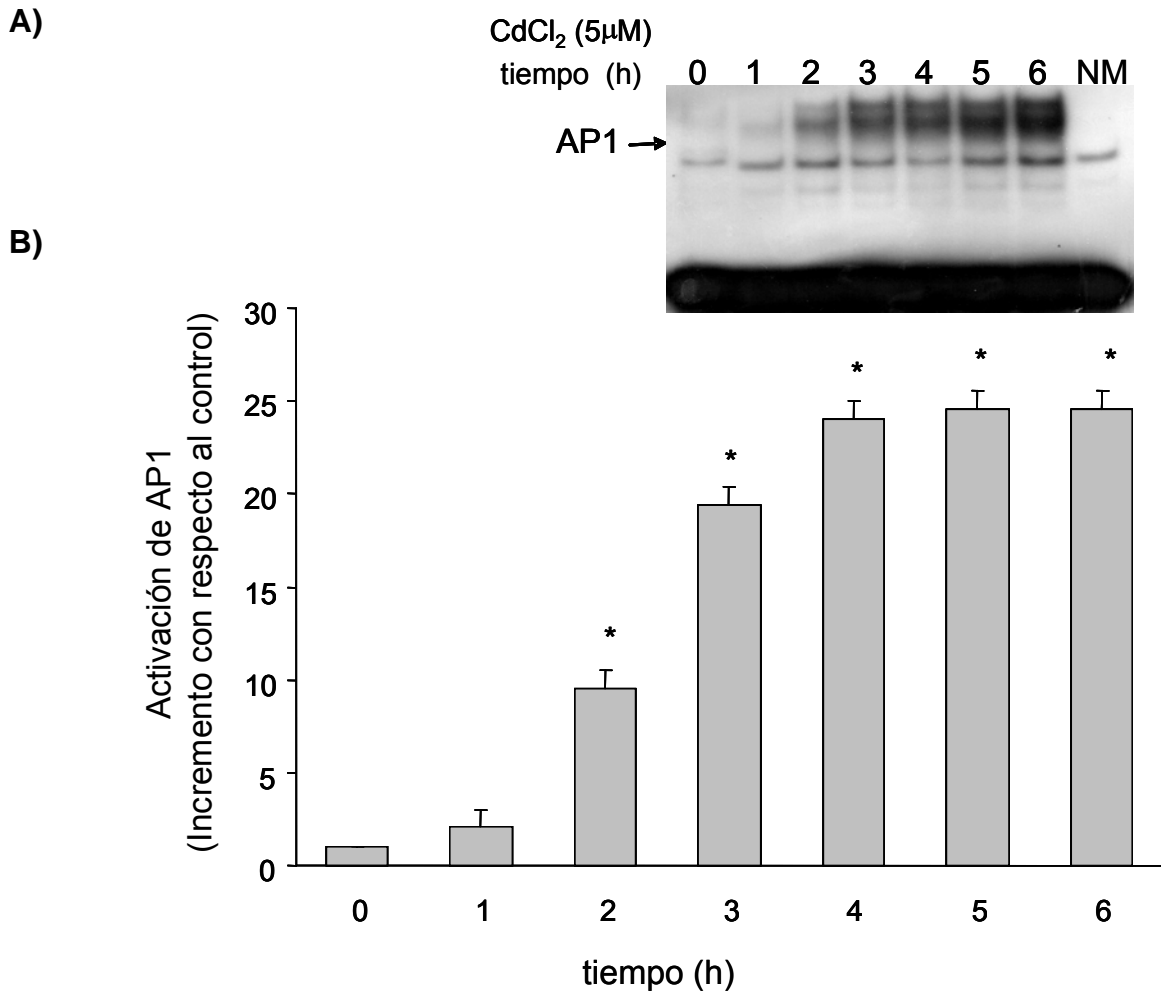


Figura 5'. Activación del factor de transcripción AP1 en células HepG2. Las células fueron tratadas con 5 μM de CdCl₂ a diferentes tiempos (1 a 6 h). A) Se extrajo la proteína nuclear y se evaluó la unión al DNA de AP1 por medio de EMSA, la imagen es representativa de al menos 3 experimentos independientes. NM corresponde a la sonda AP1 no marcada. B) Análisis densitométrico de la activación de AP1, cada barra representa el valor promedio ± error estándar. * Diferencia significativa con respecto a las células control (p < 0.05)

específicas para AP1, se realizó el siguiente estudio. Las células HepG2 fueron expuestas con 5 μM CdCl_2 durante 4 h. Después los extractos nucleares fueron tratados modificando únicamente la cantidad de Poly dI.dC (0.5, 1, 2 y 4 μl) en la realización del EMSA. En la figura 6, se muestra la desaparición de las bandas, conforme se incrementa la concentración de Poly dI.dC, las bandas se vuelve más homogéneas lo que nos confirmó que este patrón de bandas corresponden al factor AP1.

6.2 COMPOSICIÓN DEL FACTOR AP1 (c-Jun Y c-Fos)

En la figura 7, se observa un super-retardo (ss) cuando se adicionó 4 μl del anticuerpo c-Jun o c-Fos respectivamente. Claramente se aprecia un retardo del factor AP1 cuando se adiciona el anticuerpo c-Jun a los extractos nucleares extraídos de las células HepG2 tratadas con 5 μM de CdCl_2 durante 4 h. Sin embargo no hubo retardo del factor AP1 cuando se adicionó el anticuerpo c-Fos. Demostrando con esto que el factor AP1 inducido por Cd esta constituido por c-Jun/c-Jun y con menor participación de c-Jun/c-Fos.

6.3 PARTICIPACIÓN DE LAS MAPK EN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP1

Para evaluar la participación de las MAPK sobre la activación del factor AP1, las células HepG2 fueron pre-tratadas durante 1 h, con 20 μM de cada uno de los inhibidores (PD98059 inhibe a ERK, SB203580 inhibe a p38 y SP600125 inhibe a JNK), posteriormente se adicionó medio sin suero con 5 μM de CdCl_2 durante 4 h de incubación. En la figura 8, se aprecia que en las células tratadas con CdCl_2 hay

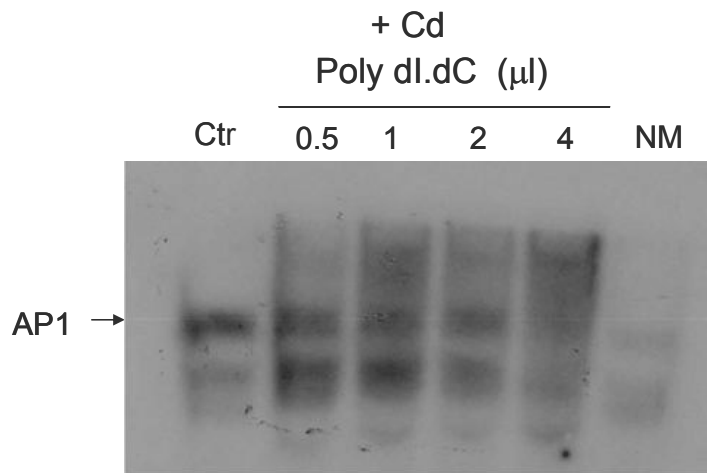


Figura 6. Validación del factor de transcripción AP1 en células HepG2. Las células fueron tratadas con 5 μ M de CdCl₂ durante 4h de incubación. Se extrajo la proteína nuclear y se evaluó la unión al DNA de AP1 por medio del EMSA, modificando la cantidad de Poly dI.dC (0.5, 1, 2, 4 μ l). La imagen es representativa de al menos 3 experimentos independientes.

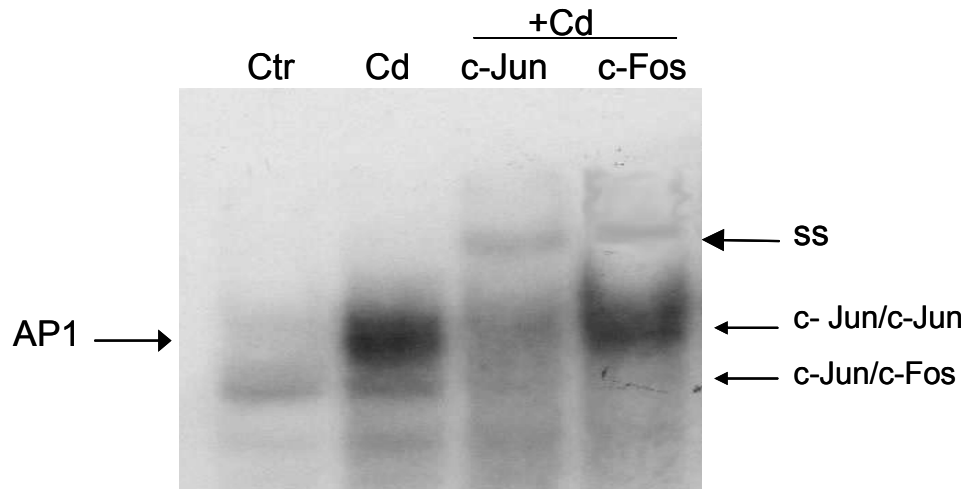


Figura 7. Composición de AP1 en células HepG2 tratadas con cadmio. Las células fueron tratadas con 5 μ M de CdCl₂ durante 4 h de incubación. Se extrajo la proteína nuclear y se evaluó la composición de AP1 por el método de EMSA. El ensayo de super-retardo (super shift, ss) fue realizado incubando con 4 μ l del anticuerpo contra c-Jun o c-Fos, durante 15 min a temperatura ambiente antes de adicionar la sonda marcada. La imagen es representativa de al menos 3 experimentos independientes, los homodímeros (c-Jun/c-Jun) o heterodímeros (c-Jun/c-Fos) se observan marcados por las flechas.

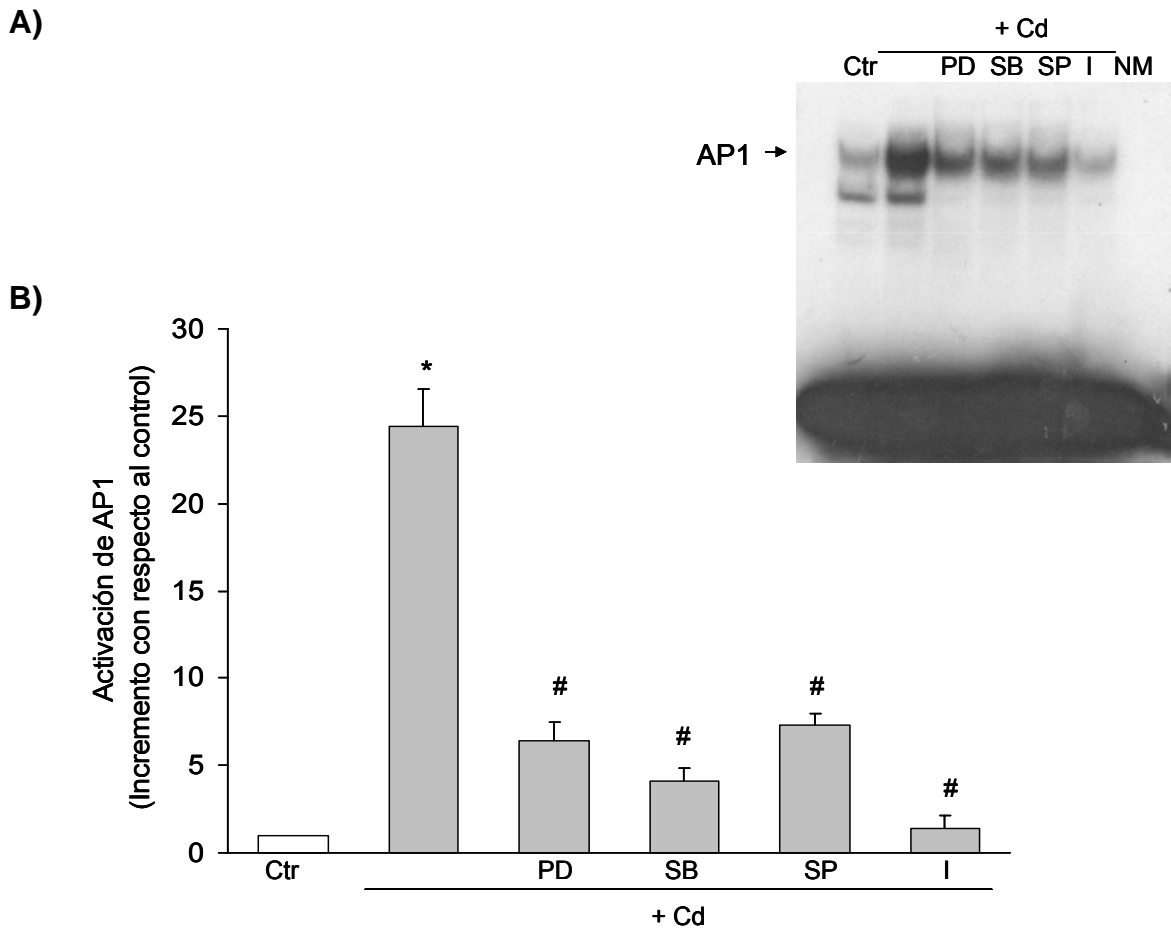


Figura 8. Efecto de las MAPK sobre la activación de AP1 inducida por cadmio en células HepG2. Las células fueron pre-tratadas durante 1h con 20 μ M de cada uno de los inhibidores de las MAPK (PD98059 inhibidor de ERK, SB203580 inhibidor de p38 y SP600125 inhibidor de JNK) o con los tres inhibidores juntos (I). Posteriormente fueron tratadas con 5 μ M de CdCl₂ durante 4h. A) Se extrajo la proteína nuclear y se evaluó la unión al DNA usando el oligonucleotido marcado con ³²P-AP1 por medio del ensayo EMSA. La imagen es representativa de al menos 3 experimentos independientes. B) Análisis densitométrico de la activación de AP1, cada barra representa el valor promedio \pm error estándar. * Diferencia significativa con respecto a las células control (p < 0.05). # Diferencia significativa con respecto a las células tratadas con cadmio (p < 0.05).

un aumento en la activación del factor AP1 de 24.5 veces más y significativo con respecto a las células no tratadas. Al pre-tratar a las células con los inhibidores: de ERK, p38 y JNK, se encontró una disminución en la activación de AP1 del 74%, 83% y 70% respectivamente con respecto a las células tratadas con el metal. La activación de AP1 se mantiene en condiciones basales cuando son agregados los tres inhibidores al mismo tiempo que el metal. En la figura 9 (A y B), se muestra que los inhibidores de las MAPK, no activan al factor de transcripción AP1, cuando las células fueron incubadas en ausencia del metal. Lo que demuestra de manera indirecta la participación de las MAPK en el mecanismo de activación del factor por Cd.

6.4 ACTIVACIÓN DE LAS MAPK EN LAS CÉLULAS HepG2 EXPUESTAS A CdCl₂

Utilizando el método de Western blot, el cual se basó en el marcaje con un anticuerpo primario específico poli-clonal para cada una de las proteínas y α -actina (sonda constitutiva), seguido de un anticuerpo secundario para poder identificar la presencia de la proteína. Las células HepG2 fueron tratadas con 5 μ M de CdCl₂ a diferentes tiempos de exposición (0.5, 1, 2, 4, y 6 h), las células control permanecieron 6 h en medio Williams sin suero en ausencia del metal.

En la figura 10, se aprecia que la máxima activación de ERK (p44 y p42), es dependiente del tiempo, incrementando significativamente con respecto al control a partir de los 30 min de exposición al Cd, la proteína pERK1/2. La activación de ERK1/2 disminuyó después de las 3 h del tratamiento con Cd. En la figura 11, se

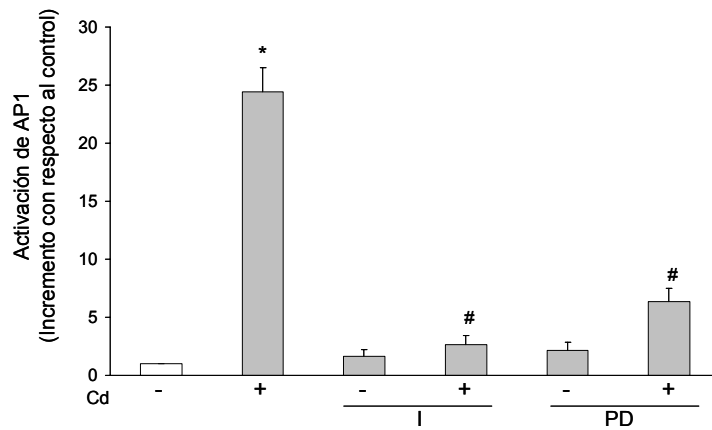
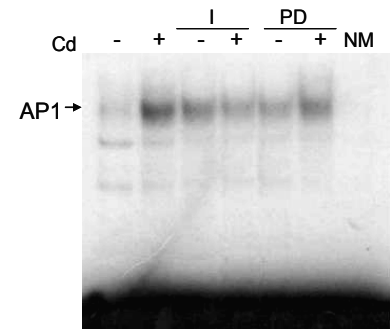
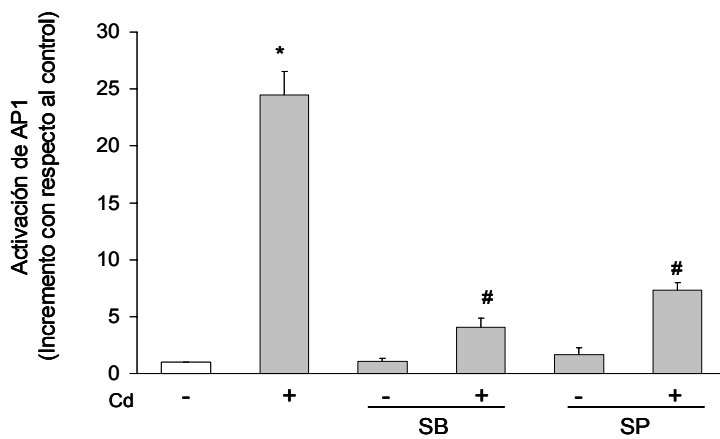
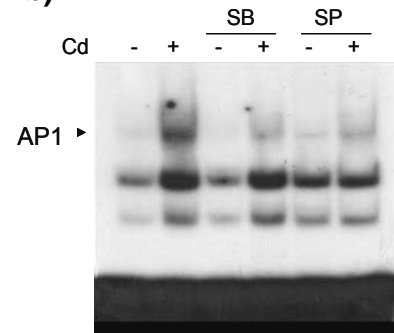
A)**a)****B)****b)**

Figura 9. Efecto de las MAPK en la activación de AP1 en células HepG2 tratadas con cadmio. Tratamientos: A) Las células fueron pre-tratadas durante 1h con 20 μ M de PD 980559 (inhibidor de ERK) o con la mezcla de los 3 inhibidores (I) de cada una de las MAPK (PD98059, SB203580 inhibidor de p38 y SP600125 inhibidor de JNK). B) Las células fueron pre-tratadas durante 1h con 20 μ M de SB203580 o con 20 μ M de SP600125. Posteriormente fueron tratadas con 5 μ M de CdCl₂ durante 4h. a) y b) Se extrajo la proteína nuclear y se evaluó la unión al DNA de AP1 por medio del ensayo EMSA. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes. Cada barra representa el valor promedio \pm error estándar. * Diferencia significativa con respecto a las células control ($p < 0.05$). # Diferencia significativa con respecto a las células tratadas con cadmio ($p < 0.05$).

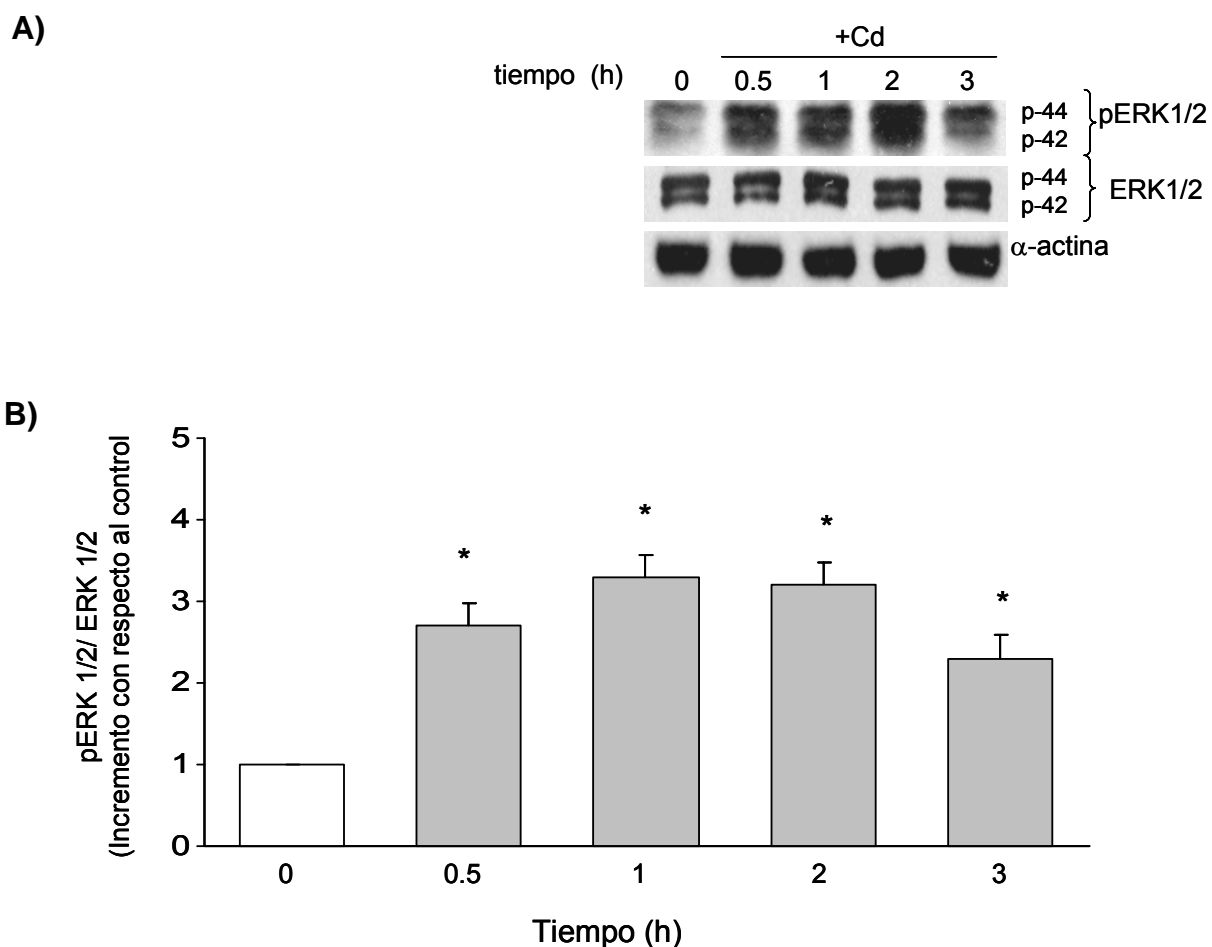
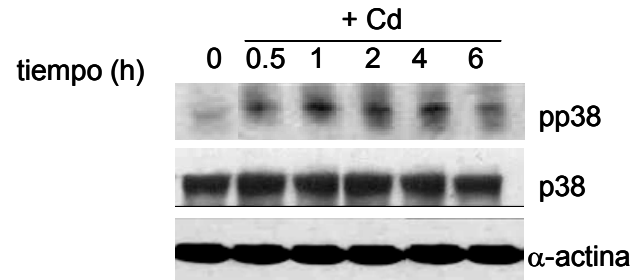


Figura 10. Activación de ERK1/2 inducida por el cadmio. Las células HepG2 fueron tratadas con 5 μ M de CdCl₂ durante (0.5, 1, 2, y 3h). Posteriormente la proteína total fue extraída y preparada por el análisis de Western blot. A). La imagen es representativa de al menos 3 experimentos independientes del Western blot, La activación se determinó por el uso de anticuerpos específicos para pERK1/2, ERK1/2 y α -actina. B). Análisis densitométrico de la expresión de pERK1/2. Cada barra representa el valor promedio \pm error estándar.

* Diferencia significativa con respecto a las células control ($p < 0.05$)

A)



B)

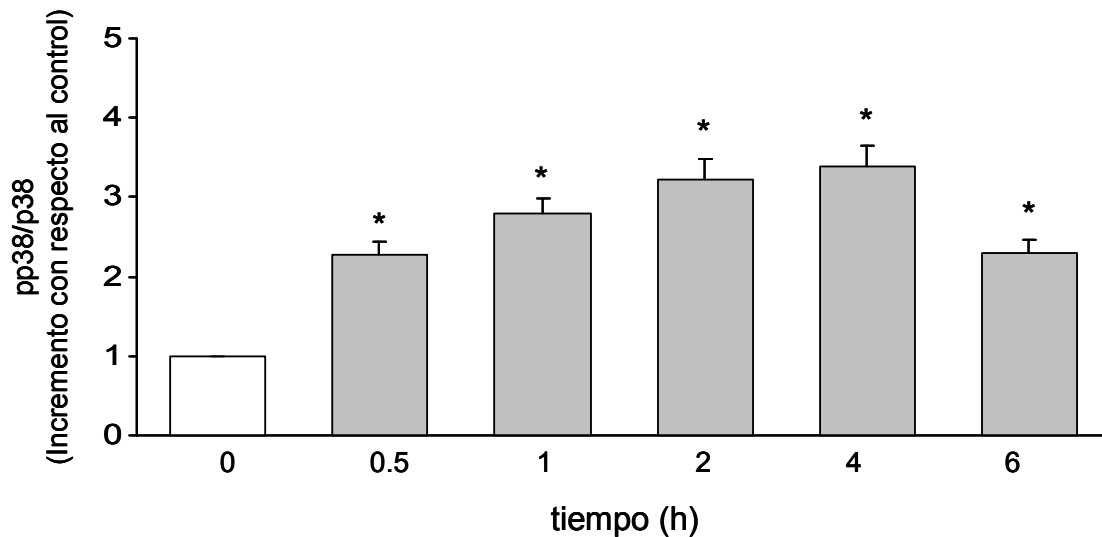


Figura 11. Activación de p38 inducida por el cadmio. Las células HepG2 fueron tratadas con 5 μ M de CdCl₂ durante (0.5, 1, 2, 4, y 6h). Posteriormente las células fueron lisadas para obtener la proteína total. La activación de p38 se realizó por la prueba de Western blot. A) La imagen es representativa de al menos 3 experimentos independientes utilizando anticuerpos específicos para pp38, p38 y α -actina. B) Análisis densitométrico de la expresión de pp38. Cada barra representa el valor promedio \pm error estándar. * Diferencia significativa con respecto a las células control ($p < 0.05$)

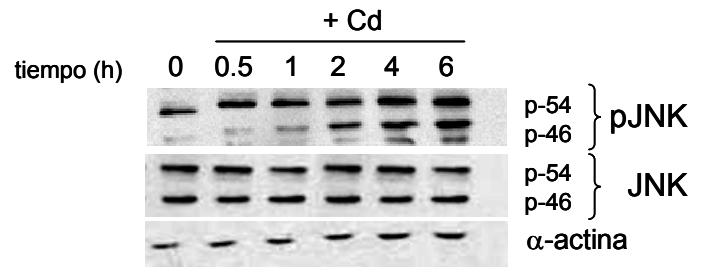
observa que la activación de la proteína p38, se incrementó significativamente después de los 30 min de exposición al Cd, de manera dependiente del tiempo. A las 4 h se apreció que la máxima activación de p38 fue de 3.4 veces más elevado que las células control y a las 6 h disminuye su activación.

La activación de JNK (p46 y p54), se observa en la figura 12, se aprecia un comportamiento diferencial. Observamos que la activación de la proteína pp54 permaneció constante a los 30 min y a la hora de exposición al CdCl₂, con respecto a las células control. Sin embargo, la fosforilación p46 se incrementó de forma dependiente del tiempo después de las 2h de exposición al metal, siendo su valor significativamente mas elevado (3.6 veces) con respecto a las células en ausencia del metal. Para las 4 y 6 h de exposición al Cd, la activación de la JNK fue de 4.9 y 6.1 veces respectivamente con respecto a las células control.

6.5 PARTICIPACIÓN DE LA DEPLECIÓN DE GSH, FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y SISTEMA XO EN LA ACTIVACIÓN DE LAS MAPK

Para evaluar la fuente de ERO como mediador en la activación de las MAPK como respuesta al cadmio, se pre-trataron a las células con diferentes inhibidores: BSO, KCN y alopurinol durante 30 min seguido de una incubación con 5 µM de CdCl₂. Las células control estuvieron en ausencia del metal y presencia de los agentes. Después de este tiempo se realizó el Western blot. En la figura 13, se observa que en las células HepG2 pre-tratadas con cada uno de los inhibidores BSO, KCN y alopurinol al mismo tiempo que el metal durante 2 h, disminuyen significativamente la activación de ERK1/2 con respecto a las células que fueron

A)



B)

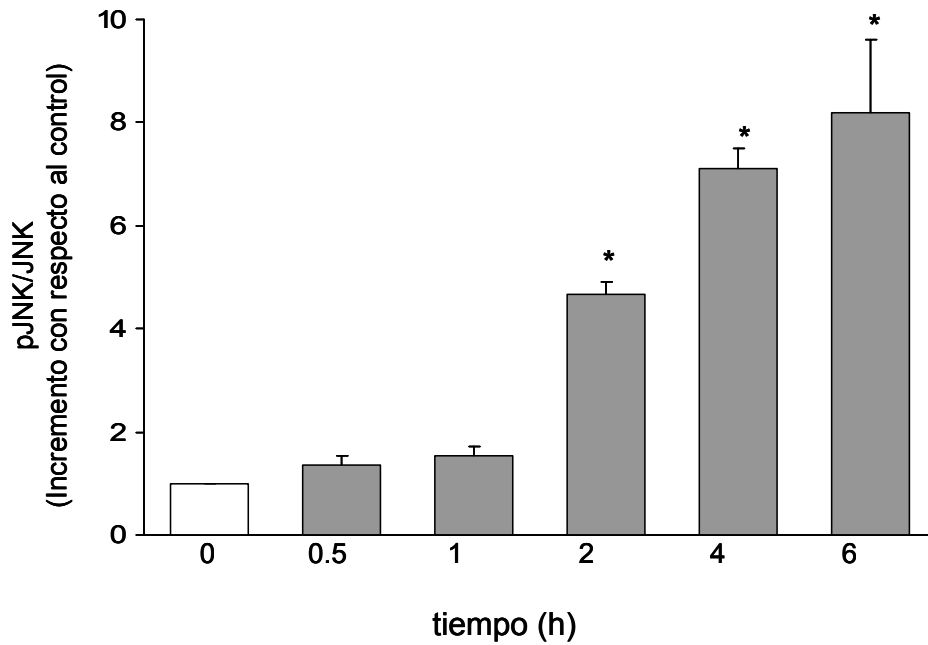


Figura 12. Activación de JNK inducida por el cadmio. Las células HepG2 fueron tratadas con 5 μ M de CdCl₂ durante (0.5, 1, 2, 4, y 6h). Posteriormente las células fueron lisadas para obtener la proteína total y preparada para usarla en la prueba de Western blot. A) La activación de JNK se realizó utilizando anticuerpos específicos para pJNK, JNK y α -actina. La imagen es representativa de al menos 3 experimentos independientes. B) Análisis densitométrico de la expresión de pJNK. Cada barra representa el valor promedio \pm error estándar. * Diferencia significativa con respecto a las células control ($p < 0.05$)

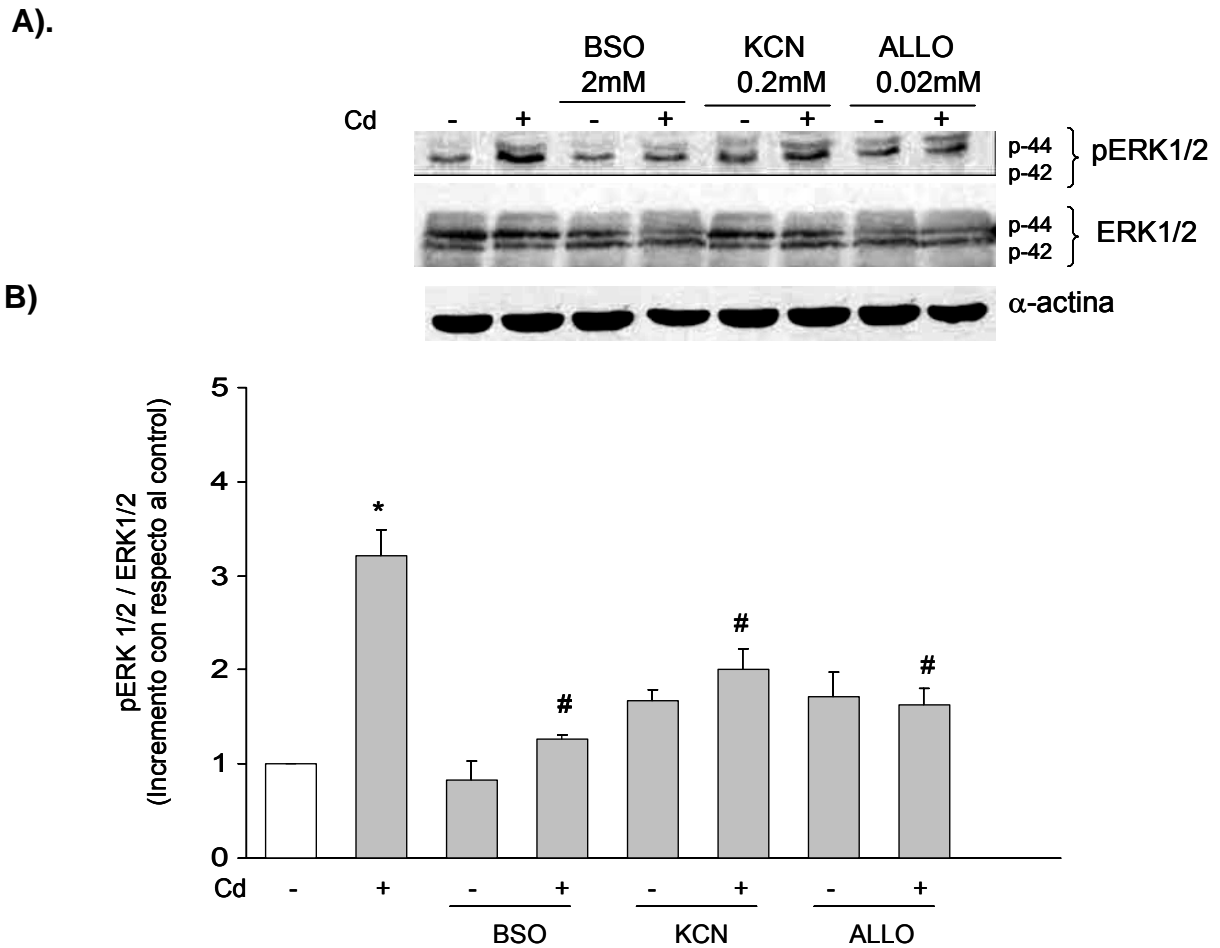


Figura 13. Efecto del BSO, KCN y Alopurinol en la activación de ERK1/2 inducido por cadmio. Las células HepG2, fueron pre-tratadas durante 30 min con BSO (2 mM) inhibidor de la γ -glutamyl-cisteinil sintetasa, ó KCN (0.2 mM) inhibidor de la cadena mitocondrial ó Alopurinol (0.02 mM) inhibidor de la xantina oxidasa. Posteriormente fueron tratadas con 5 μ M de CdCl₂ durante 2h al mismo tiempo del inhibidor correspondiente. A). Las células fueron lisadas para obtener la proteína total. La activación se realizo por Western blot utilizando anticuerpos específicos para pERK1/2, ERK1/2 y α -actina. La imagen es representativa de al menos 3 experimentos independientes. B) Análisis densitométrico de la activación de ERK1/2. Cada barra representa el valor promedio \pm error estándar. * Diferencia significativa con respecto a las células control ($p < 0.05$). # Diferencia significativa con respecto a las células tratadas con cadmio ($p < 0.05$).

tratadas con 5 μ M de CdCl₂, en un 59% para BSO, 44% para KCN y 47% para alopurinol.

En la figura 14, se observa que a las células HepG2 pre-tratadas con cada uno de los inhibidores BSO, KCN y alopurinol seguidas del tratamiento de Cd por 4h, disminuyó la activación de la p38 con BSO en un 74% y con KCN en un 29% significativamente con respecto a las células tratadas con el metal.

En la figura 15, se observa un comportamiento parecido a la proteína ERK1/2. La activación de JNK (p46 y p54) se incrementó cuando las células son tratadas con cadmio. Al pre-tratar a las células HepG2 con los inhibidores BSO, KCN y alopurinol, seguidas de Cd durante 4h, disminuyeron significativamente la activación de JNK (p46) con respecto a las células que fueron tratadas con 5 μ M de CdCl₂, en un 69%, 37% y 22% respectivamente.

6.6 PARTICIPACIÓN DE LAS MAPK COMO MEDIADORAS EN LA PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA Hsp70

Antecedentes previos en el laboratorio (Souza et al., 2004) se demostró el efecto del Cd en la producción de Hsp70 en células HepG2 expuestas a 5 μ M de CdCl₂ por diferentes tiempos de exposición, a través de Western blot, utilizando un anticuerpo primario poli-clonal contra la proteína Hsp70 y α -actina (sonda constitutiva), seguido de un anticuerpo secundario que reconoce al primer anticuerpo unido a la proteína. Los resultados se muestran en la figura 16 y son expresados como el % del valor control. Se observa una producción dependiente del tiempo y significativa con respecto al control. Es por ello que conociendo esté

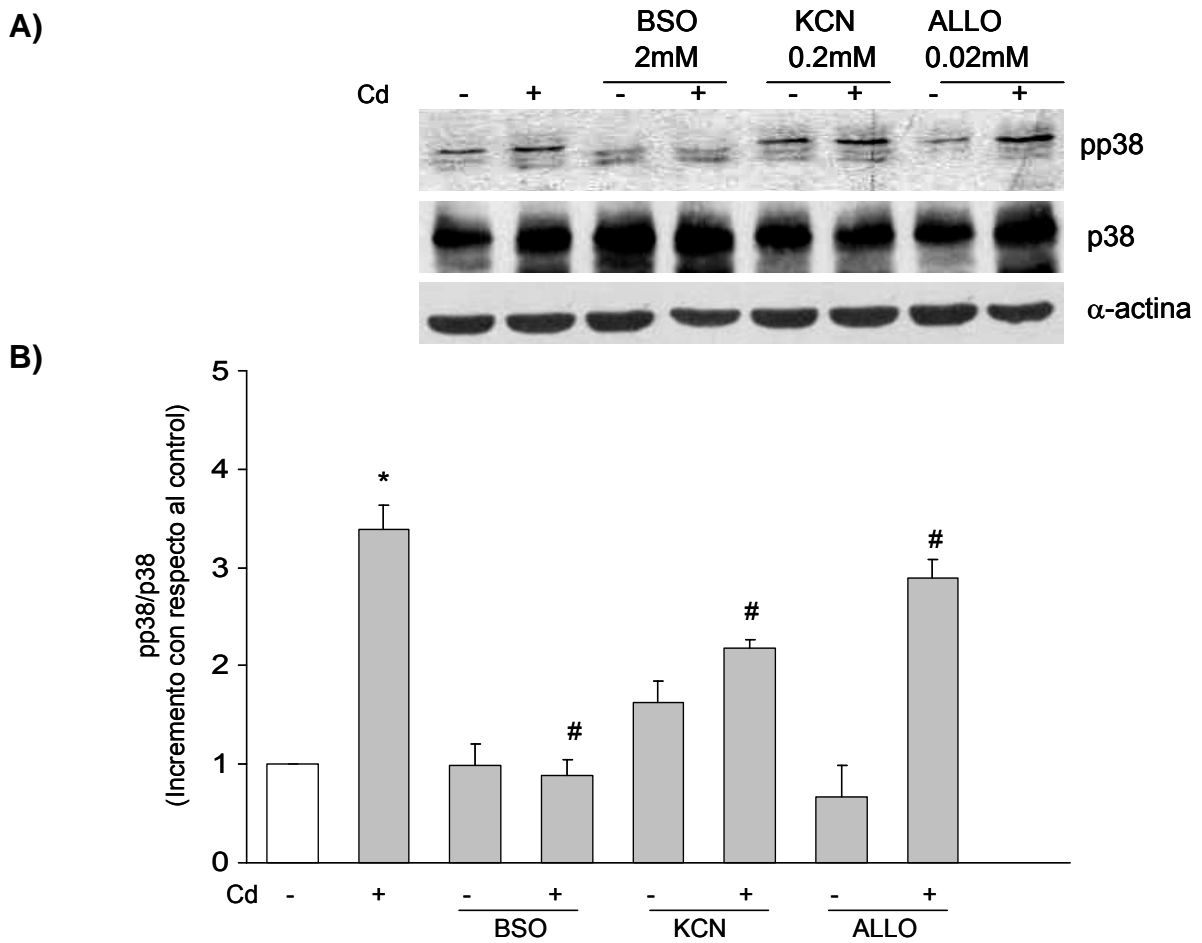


Figura 14. Efecto del BSO, KCN y Alopurinol en la activación de p38 inducido por cadmio. Las células HepG2, fueron pre-tratadas durante 30 min, con BSO (2 mM) inhibidor de la γ -glutamyl-cisteinil sintetasa, ó KCN (0.2 mM) inhibidor de la cadena mitocondrial ó Alopurinol (0.02 mM) inhibidor de la xantina oxidasa. Posteriormente fueron tratadas con 5 μ M de CdCl₂ durante 4h al mismo tiempo del inhibidor correspondiente. A) Las células fueron lisadas para obtener la proteína total. La activación de p38 se realizo por Western blot utilizando anticuerpos específicos para pp38, p38 y α -actina. La imagen es representativa de al menos 3 experimentos independientes. B) Los datos expresan el análisis densitométrico de la expresión de pp38. Cada barra representa el valor promedio \pm error estándar. * Diferencia significativa con respecto a las células control ($p < 0.05$). # Diferencia significativa con respecto a las células tratadas con cadmio ($p < 0.05$).

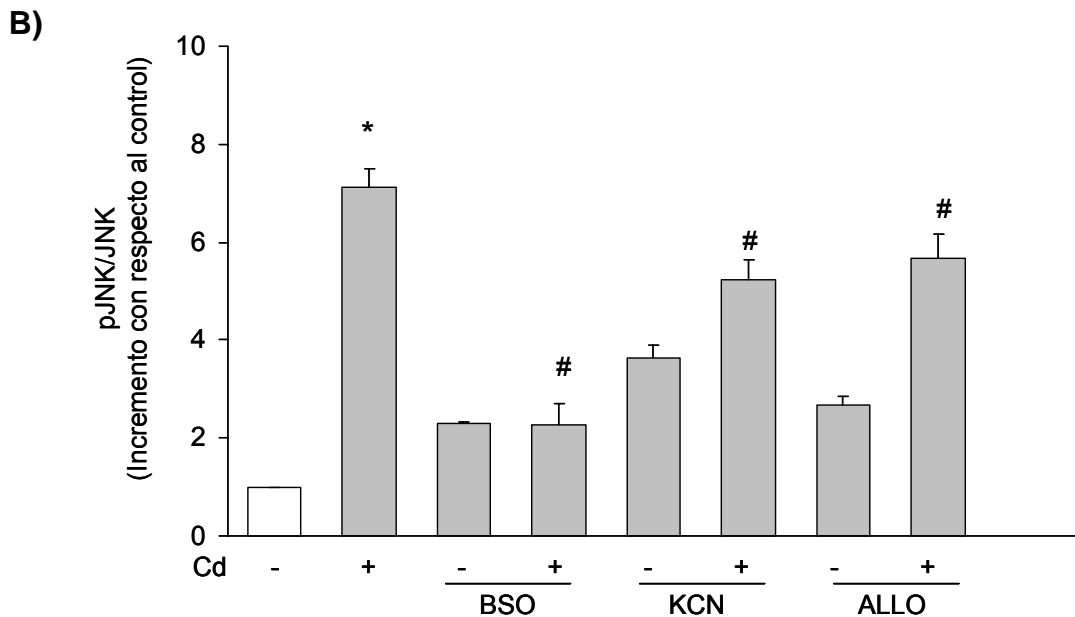
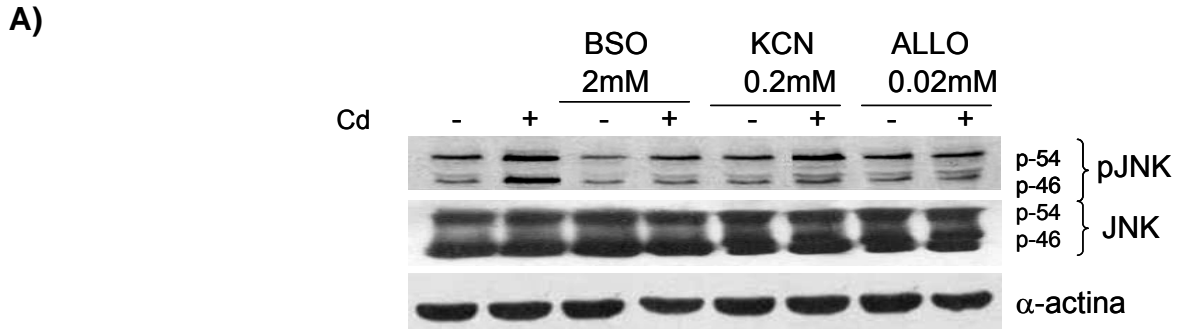


Figura 15. Efecto del BSO, KCN y Alopurinol en la activación de JNK inducido por cadmio. Las células HepG2, fueron pre-tratadas durante 30 min, con BSO (2 mM) inhibidor de la γ -glutamyl-cisteinil sintetasa, ó KCN (0.2 mM) inhibidor de la cadena mitocondrial ó Alopurinol (0.02 mM) inhibidor de la xantina oxidasa. Posteriormente fueron tratadas con 5 μ M de CdCl₂ durante 4h al mismo tiempo del inhibidor correspondiente. A). Las células fueron lisadas para obtener la proteína total. La activación de JNK se realizo por la prueba de Western blot utilizando anticuerpos específicos para pJNK, JNK y α -actina. La imagen es representativa de al menos 3 experimentos independientes. B) Análisis densitométrico de la expresión de pJNK. Cada barra representa el valor promedio \pm error estándar. * Diferencia significativa con respecto a las células control ($p < 0.05$). # Diferencia significativa con respecto a las células tratadas con cadmio ($p < 0.05$).

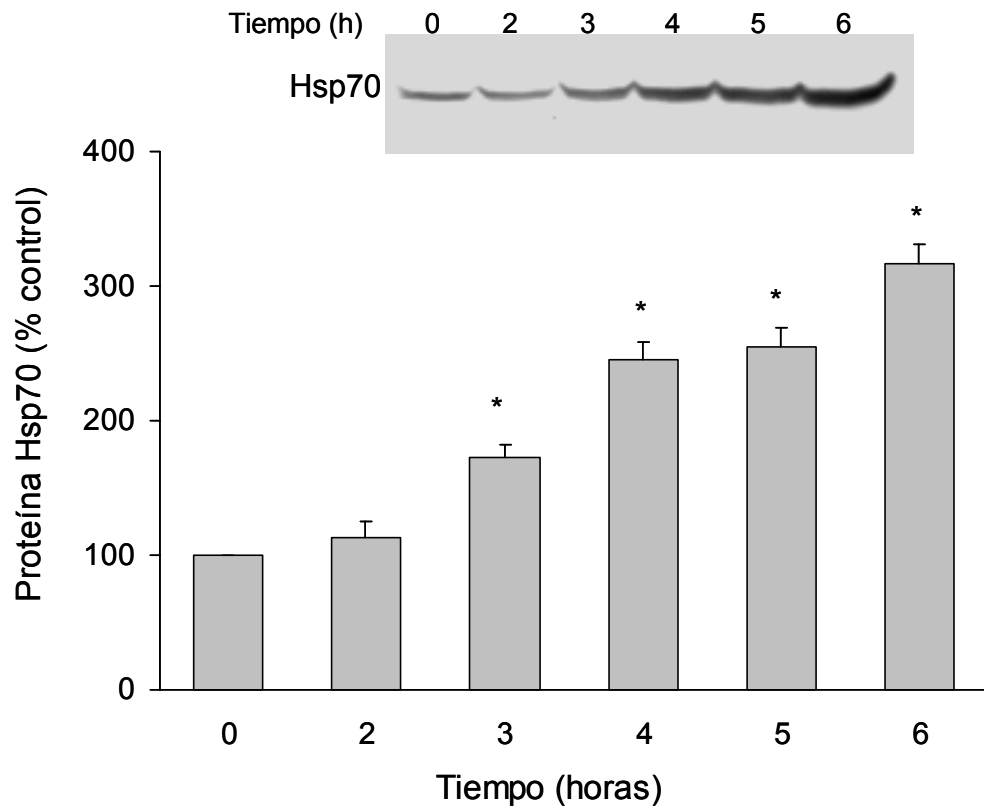
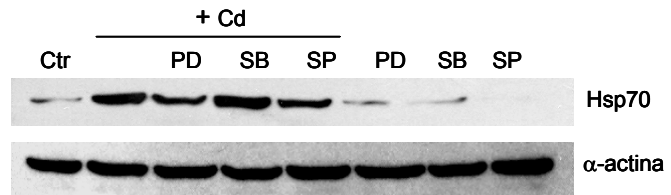


Figura 16. Inducción de la proteína Hsp70 en las células HepG2 expuestas a $5\mu\text{M}$ de CdCl_2 durante por diferentes tiempos de incubación. Las células fueron lisadas para obtener la proteína total. La secreción de la proteína se realizo por Western blot utilizando anticuerpos específicos para Hsp70. Los datos están expresados como el valor promedio \pm error estándar. * Diferencia significativa con respecto a las células control ($p < 0.05$). (Datos reportados en: Souza et al., 2004a)

comportamiento decidimos evaluar a 4 h la participación de las MAPK. Demostramos en la figura 16', un incremento significativo de 3.5 veces en la producción de la proteína Hsp70 después de que las células HepG2 fueron tratadas con cadmio con respecto a las células control. Cuando las células fueron pre-tratadas durante 1 h, con 20 μ M de PD980558 (inhibidor de ERK), expuestas posteriormente a 5 μ M de CdCl₂ durante 4 h, se observó una disminución del 32% significativa en la producción de Hsp70 y con SP600125 (inhibidor de JNK), se observó una disminución del 23% con respecto a las células tratadas sólo con el metal. Las células que fueron tratadas con cada uno de los inhibidores en ausencia del metal y al dejarlos incubar durante 4 h, tienen una producción basal de la proteína Hsp70.

A)



B)

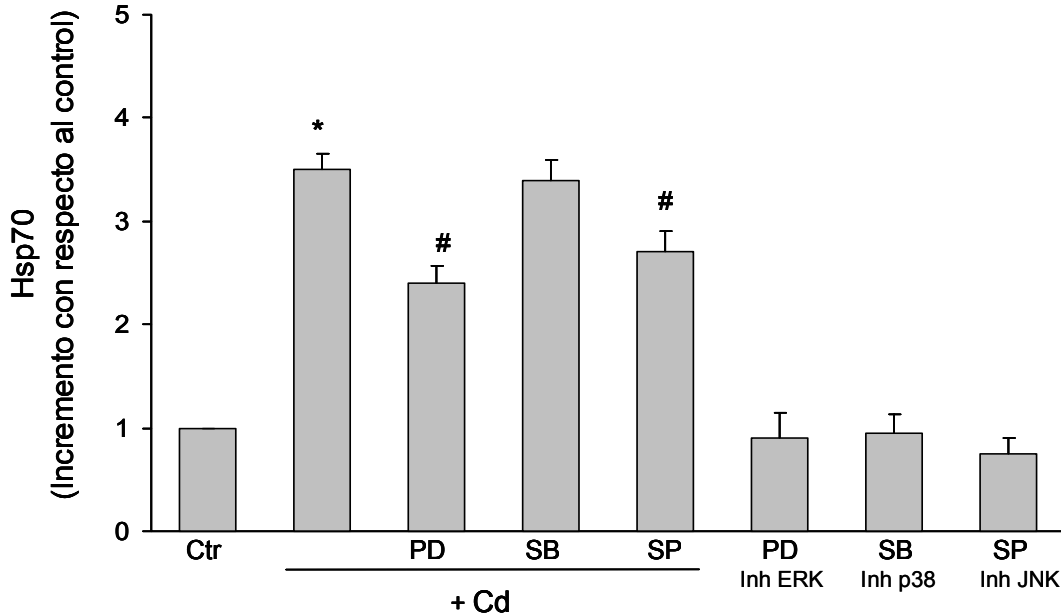


Figura 16'. MAPK como mediadoras en la producción de la proteína Hsp70 inducida por el cadmio. Las células HepG2 fueron pre-tratadas durante 1h con 20 μ M de cada uno de los inhibidores de las MAPK (PD98059 o SB203580 o SP600125), Posteriormente, fueron tratadas con 5 μ M de CdCl₂ durante 4h al mismo tiempo del inhibidor correspondiente. A). Las células fueron lisadas para obtener la proteína total. La secreción de la proteína se realizó por Western blot utilizando anticuerpos específicos para Hsp70 y α -actina. La imagen es representativa de al menos 3 experimentos independientes. B). Análisis densitométrico de la expresión de Hsp70. Los datos están expresados como el valor promedio \pm error estándar. * Diferencia significativa con respecto a las células control ($p < 0.05$). # Diferencia significativa con respecto a las células tratadas con cadmio ($p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

Diversos estudios demuestran que el cadmio es capaz de regular la expresión génica, afectando los patrones de la actividad transcripcional (Bertin y Averbeck 2006). La reprogramación de la expresión de genes es un mecanismo importante que realizan las células para responder y tener la posibilidad de adaptarse a los cambios ambientales adversos a sustancias tóxicas (Valko et al., 2005). Las ERO son capaces de activar diferentes rutas de transducción de señales, que culminan en la inducción de factores de transcripción necesarios para estimular genes específicos (Tacchini et al., 2002; Chen et al. 2008). Entre los factores, está el AP1, que es un factor sensible a las ERO y es activado por las MAPK (Ioanna-Katerina et al., 2006), es por ello que en el presente estudio, el objetivo fue estudiar las vías de señalización MAPK/AP1 como una respuesta inducida por el cadmio en células HepG2 y su participación en la producción de la proteína Hsp70.

Demostramos que la activación de AP1 en células HepG2 tratadas con 5 μ M CdCl₂, está en función del tiempo de exposición y se inicia su activación después de las 2h, alcanzando su máximo a las 4h y se mantiene constante. En cultivo primario de hepatocitos de rata tratados con 4 μ M de CdCl₂, se demostró un incremento significativo en la activación de AP1 a las 3h con respecto al control y a las 6h se observa una tendencia a disminuir (Hsiao y Stapleton, 2004).

El factor AP1, está constituido por proteínas de la familia Jun y Fos, formando un homodímero (Jun-Jun) o heterodímero (Jun/Fos). Es por ello que decidimos evaluar la composición de este factor realizando un retardo de sus subunidades y

observamos que la composición del complejo AP1 activado por CdCl₂, conserva su estabilidad principalmente por el homodímero c-Jun/c-Jun y en menor proporción del heterodímero c-Jun/c-Fos. Hsiao y Stapleton (2004) demostraron de igual manera que en el cultivo primario de hepatocitos, c-Jun es el principal componente de AP1.

Las MAPK (ERK, p38, JNK) proteínas cinasas son importantes en la regulación de procesos celulares como la proliferación, desarrollo, diferenciación y muerte (necrosis o apoptosis). Diversos trabajos describen que las MAPK son esenciales en la activación de factores de transcripción, tales como ATF2, Elk1, HSF1, y AP1 (Chuang et al. 2000; Dai et al. 2004; Hsiao y Stapleton, 2004; Ioanna-Katerina et al. 2006; Junttila et al. 2008). Estas proteínas cinasas dependen de la fosforilación inicial por parte de PKA o PKC (Domenicotti et al., 2000) y la subsecuente fosforilación de las MAPKKK o MKKK, las cuales participan fosforilando a las MAPKK o MEK (MEK1 y MEK2; para fosforilar a las ERK), (MKK3 y MKK6; para fosforilar a las p38) y (MKK4 y MKK7; para fosforilar a las JNK). Sin embargo, se desconoce el proceso de cómo el Cd contribuye en la activación de AP1 mediado por las MAPK en las células HepG2. Al utilizar los inhibidores de las MAPK en las células HepG2 tratadas con CdCl₂ encontramos una disminución significativa en la activación de AP1 con respecto a las células tratadas con Cd. En cultivo primario de hepatocitos, también se encontró una disminución en la activación de AP1 al utilizar los inhibidores de las MAPK (Hsiao y Stapleton, 2004; Park et al., 2009). En células de riñón de embrión humano (HEK-293T) preincubadas con 10 μM de SB203580 (inhibidor de p38), se observó una

disminución de AP1 (Tanos et al. 2005). Este factor puede ser inducido en respuesta a ciertos estímulos como H_2O_2 , citocinas y basta con disminuir un 50% el contenido de GSH en cultivo primario de hepatocitos de rata para favorecer la activación del factor AP1 que se relaciona con un cambio moderado del estado redox, sin que necesariamente exista lipoperoxidación (Domenicotti et al., 2000; Shaulian y Karin 2001, 2002). En células de cardiomioblastos (H9c2), al ser preincubadas con 10 μM de SP600125 (inhibidor de JNK) y expuestas con 200 μM de H_2O_2 disminuyen la intensidad de la activación del factor AP1 (Ioanna-Katerina et al. 2006). Estos resultados demuestran el papel potencial de JNK y p38 en el posible mecanismo de transducción de señales inducida por ERO para la activación de AP1.

La activación de las MAPK fue evaluada en las células HepG2 tratadas con $CdCl_2$, encontrando una activación dependiente del tiempo de exposición para ERK, p38 y JNK. Resultados similares se observaron en la línea celular de fibroblastos de embrión de ratón (NIH3T3), al ser tratadas con $CdCl_2$ (1-20 μM) durante (1-9 h), demostrando que la activación de las MAPK dependen tanto de la concentración como del tiempo de exposición al metal (Sugisawa et al., 2004). En células endoteliales de cerebrovascular (bEnd.3), se aprecia que la fosforilación de ERK, p38 y JNK se presenta a tiempos cortos (5-15 min) al incubarse con 10 μM de $CdCl_2$. Sin embargo, en las mismas células al tratarlas con 30 μM de $CdCl_2$, se incrementa la activación de p38 a partir de los 30 min y de JNK después de 1h, mientras que las ERK se fosforilan después de 4h (Jung et al., 2008). Con lo anterior es evidente que el Cd estimula a la célula y responde de manera diferente

dependiendo del tipo celular, del tiempo y de la concentración. En células HEK-293T, tratadas con 2 μ M de Cd durante (1-8h), se observa un incremento en la activación de las ERK comúnmente asociada con la proliferación celular, este comportamiento puede estar relacionado con la protección celular (Martin et al., 2006). Nuestros resultados aportan evidencias de que las HepG2 pueden presentar cierto grado de sensibilidad al CdCl₂ y dar una respuesta positiva, permitiendo con ello la expresión de proteínas como la MT y/o la Hsp70, las cuales tienen secuencias específicas para ciertos factores de transcripción como HSF1 o AP1 y promover la inducción de estas proteínas. Generalmente las MAPK son activadas por diferentes estímulos, como son las citocinas, alteración en el estado redox, las ERO (Martín et al., 2006). En células trofoblastos humano (HTR-8/SV), se observó un incremento en la activación de las MAPK en presencia de H₂O₂ de manera dependiente de la concentración, así como de diferentes concentraciones de CdCl₂ (6-100 μ M) y de tiempo de exposición (Valbonesi et al., 2008). En células PC12 se han encontrado evidencias de que Cd induce la generación indirecta de ERO, activando a las MAPK, así como la activación de cinasas como ASK1, MKK1/2, MKK4 y MEK3/6 (Chen et al., 2008).

Para evaluar la fuente de las ERO en la activación de las MAPK utilizamos agentes específicos como: KCN para inhibir cadena respiratoria y Alopurinol para inhibir la XO. Se utilizó el BSO para inhibir a la GGS. A nivel celular existen procesos que producen continuamente las ERO como resultado del metabolismo normal y la mitocondria es la responsable del consumo del 90% del oxígeno celular, así como de la producción de las ERO. Está reportado que el Cd bloquea la cadena

respiratoria mitocondrial e incrementa las ERO (Cannino et al., 2009). Es por ello que las células HepG2 fueron preincubadas con KCN y tratadas con CdCl₂, encontrando una disminución en la fosforilación de las MAPK con respecto a las células que fueron tratadas únicamente con el metal. Esto indica que las ERO que provienen de la mitocondria participan en parte en la activación de las MAPK. Souza et al., (2009), reportan que las ERO que activan al factor STAT3 por el Cd, provienen de la mitocondria cuando las células HepG2 fueron tratadas con KCN seguida de 5 μM de CdCl₂. Cabe mencionar que la fosforilación del factor STAT3 es en parte regulado por la vía de las MAPK. Otro mecanismo para generar la producción de las ERO es a través del sistema de la XOR, integrado por la xantina oxidasa que es capaz de oxidar NADPH formando ERO, debido a que en su estructura contiene un cofactor de molibdeno el cual puede ser desplazado por el Cd. La regulación de la expresión de esta enzima puede estar dada por hipoxia, citocinas como IL1, IL6, TNFα, entre otros, ocasionando un incremento en las ERO (George y Struthers, 2009). Utilizando alopurinol que es un inhibidor de XO y CdCl₂ en células HepG2, encontramos una disminución en la activación de las MAPK. En estudios realizados en hígado y células Kupffer aisladas de ratas pre-tratadas con alopurinol, en ausencia o presencia de 40 μmol/Kg de CdCl₂, se encontró una disminución en la producción de las ERO y con ello una disminución en la activación de las MAPK (Liu et al., 2008). En general se considera que las ERO activan a las MAPK, sin embargo, la respuesta de los diferentes miembros de la familia de las MAPK es un proceso que depende del tipo celular (Lee y Kim, 2009). Se sugiere que JNK y p38 participan cooperativamente dando una respuesta celular.

Se sugiere que las ERO pueden ser producidas por citocinas y óxido nítrico, para de esta manera actuar como segundos mensajeros y estimular a las JNK y a proteínas G (p21ras, Rac1, y CDC42), las cuales participarían como sensores dependientes de las ERO para transmitir la señal activando a JNK. Se ha considerado que la presencia del grupo tiol del GSH, le permite participar de manera directa en la unión de metales divalentes como el Cd formando un complejo Cd-GSH que provoca el desbalance intracelular. Es por ello que las células HepG2 fueron preincubadas con BSO y tratadas con CdCl₂, encontrando una disminución en la fosforilación de las MAPK con respecto a las células que fueron tratadas únicamente con el metal. En células epiteliales de retina humana (ARPE19) al ser incubadas con 1 mM de BSO y/o 20 µM de Cd, se observó un incremento en la generación de ERO con respecto a las células control, mientras que en las células tratadas con N-acetil cisteína (NAC) tiende a disminuir las ERO y por lo tanto una disminución de la activación de las MAPK (Kalariya et al., 2009). Estos resultados indican que una disminución en el contenido basal de GSH, por el BSO genera un incremento de las ERO intracelular y por lo tanto la activación de las MAPK por el Cd.

Bajo condiciones fisiológicas normales, las células mantienen un porcentaje basal de ciertas proteínas y de las ERO. La inducción de Hsp70 generalmente es considerada como una respuesta adaptativa para que la célula lleve a cabo funciones esenciales para sobrevivir bajo condiciones de estrés (Waisberg et al., 2003). Por ejemplo el contenido basal de las Hsp70 es de 1-2%, mientras que en células sometidas a estrés puede incrementar hasta un 20%. La inducción de la

proteína Hsp70 es regulada a través de algunos factores de transcripción como el factor de transcripción CCAAT (CTF), el SP1, el HSF1, el ATF, el AP1 y AP2 que reconocen secuencias específicas en el promotor de la proteína. Estos factores dependen de la participación de las MAPK, las cuales son fundamentales en la expresión de ellos y en consecuencia de la proteína. Urani et al., (2005 y 2007), describen resultados similares al tratar a las células HepG2 con distintas concentraciones de CdCl₂ (0.1-10 μM) demostrando que sólo 5 y 10 μM, fueron capaces de disparar la sobre-expresión de la proteína Hsp70. En células de Sertoli se demostró un incremento significativo en la inducción de Hsp70 dependiente de la concentración (2.5-10 μM) de Cd (Kusakabe et al., 2008). Se reporta que la expresión de Hsp70 puede ser regulada por las MAPK a través de la fosforilación HSF1 (Park y Liu, 2001). Al analizar los resultados en las células HepG2 tratadas con cada uno de los inhibidores de las MAPK al mismo tiempo que el CdCl₂, se observó una disminución, en la producción de Hsp70. Estudios semejantes se encontraron en células madre de ratón (ES) transfectadas con siRNA específico para ERK, p38 y JNK, encontrando una disminución en la producción de Hsp70 inducido por el Cd (Nishitai y Matsuoka, 2008). Esto indica que la producción de Hsp70 por el Cd está regulada en parte por la activación de la vía de las MAPK. En células HTR-8/SV, se encontró un incremento en la producción de Hsp70 de manera dependiente tanto de la dosis como del tiempo de exposición al Cd. Así mismo encontraron una activación de las MAPK en presencia de Cd y de H₂O₂ (Valbonesi et al., 2008). En células NIH3T3 preincubadas con 25 ng/ml de LL-Z1640-2 (inhibidor de las JNK/p38) en presencia o ausencia de 10 μM CdCl₂

durante 6h, se encontró una disminución en la producción de la proteína Hsp68 (Sugisawa et al., 2004). Ellos concluyen que la expresión de la Hsp68 requiere la participación de JNK y p38. Se conoce que la expresión de las Hsp requiere la activación del factor de transcripción de choque térmico (HSF), el cual está localizado dentro de la región promotora de estas proteínas. Por otro lado, en células U-937 tratadas con 10 μ M de rottlerin inhibidor de PKC y SB203580 inhibidor de p38 seguido de Cd, se observó una ligera disminución en la producción de Hsp70. Concluyendo que existen diversos estudios que demuestran una relación entre la PKC y las MAPK. Sin embargo, se observa que específicamente la PKC δ precede y regula específicamente a las p38 en las células U-937 (Miguel et al., 2005). El Cd puede sustituir tanto al Zn como al Ca que forman parte estructural de la PKC incrementando la activación de las diferentes isoformas de la PKC.

8. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente tesis proporcionan evidencia de que el cadmio de manera indirecta puede activar al factor de transcripción AP1 en las HepG2 para generar una respuesta de sobrevivencia. El factor de transcripción AP1 activado por el Cd está compuesto por las proteínas c-Jun/c-Jun. Este factor participa en numerosas funciones fisiológicas durante el desarrollo y crecimiento celular. La activación de AP1 es un mecanismo importante sujeto a la regulación por parte de las MAPK (ERK, p38 y JNK). En nuestro modelo *in vitro* las HepG2 expuestas al Cd se activaron a ERK, p38 y JNK, lo que da evidencia de que el Cd tiene la capacidad de inducir de manera indirecta la producción de las ERO. Así mismo, estas ERO pueden participar en la activación de las MAPK, es importante resaltar que ERK1/2 y JNK participan en la producción de la Hsp70 en las células HepG2 tratadas con Cd y puede ser mediada por el AP1. Confiriendo una protección celular regulada por las MAPK.

9. REFERENCIAS

Adams JP, y Sweatt JD. (2002), Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 42:135-163

Akesson A, Bjellerup P, Lundh T, Lidfeldt J, Nerbrand C, Samsioe G, Skerfving S, Vahter M. (2006), Cadmium-induced effects on bone in a population-based study of women, *Environ Health Perspect.*, 114(6):830-834

Akesson A, Julin B, Wolk A. (2008), Long-term dietary cadmium intake and postmenopausal endometrial cancer incidence: a population-based prospective cohort study., *Cancer Res.* 68(15):6435-6441

Alcantara HR. (1998), AP1, un factor de transcripcion clasico, *BEB*, 17(3): 123-129

Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. (1995), PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo., *J Biol Chem.*, 17;270(46):27489-27494

Amzal B, Julin B, Vahter M, Wolk A, Johanson G, Akesson A. (2009), Population toxicokinetic modeling of cadmium for health risk assessment, *Environ Health Perspect.*, 117(8):1293-1301

Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M. (1987), Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor, *Cell*, 19;49(6):729-739
Annu Rev Physiol., 61:243-82

Arias M, Boyer LJ, Fausto N, Jakoby WB, Schachter D, Scafritz DA. (1994), The liver biology and pathobiology, Cap. 23 "Gluthatione" third edition, Ed. Raven Press, Lth., U.S., p.p. 401-417

ATSDR. (1999), Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Department of Health and Human Services (HHS). Cadmium, CAS # 7440-43-9, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/phs5.html>

Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. (2001), SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(24):13681-13686

Benzi G y Moretti A. (1995), Age and peroxidative stress related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Rad. Biol. Med.* 19: 77-101

Bernard A. (2008), Cadmium & its adverse effects on human health. *Indian J Med Res.*, 128(4):557-564

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

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254

Bucio L, Souza V, Albores A, Sierra A, Chávez E, Cárabez A, Gutiérrez-Ruiz MC. (1995), Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology.*, 102(3):285-299

Cannino G, Ferruggia E, Luparello C, Rinaldi AM. (2009), Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion*, 9(6):377-384

Chan CP, Chang MC, Wang YJ, Chen LI, Tsai YL, Lee JJ, Jia HW, Jeng JH. (2008), Thrombin activates Ras-CREB/ATF-1 signaling and stimulates c-fos, c-jun, and c-myc expression in human gingival fibroblasts., *J Periodontol.*, 79(7):1248-1254

Chan H.M. y **Cherian M.G.** (1992), Protective roles of metallothionein and glutathione in hepatotoxicity of cadmium, *Toxicology.* 72: 281-290

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

Chinenov Y y **Kerppola TK.** (2001), Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity., *Oncogene.* 30;20(19):2438-2452

Chuang SM, Wang IC, Yang JL. (2000), Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium., *Carcinogenesis.*, 21(7):1423-1432

Clerk A y **Sugden PH.** (1998), The p38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases (SAPKs/JNKs), *FEBS Lett.*, 10;426(1):93-96

Cobb MH. (1999), MAP kinase pathways., *Prog Biophys Mol Biol.*, 71(3-4):479-500

Curran T y **Franza BR Jr.** (1988), Fos and Jun: the AP-1 connection, *Cell*, 55(3):395-397

Dai J, Huang C, Wu J, Yang C, Frenkel K, Huang X. (2004), Iron-induced interleukin-6 gene expression: possible mediation through the extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *Toxicology.*, 203:199-209

Dally H y Hartwig A. (1997), Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 18: 1021-1026

Dehen PF, White CM, Connors DE, Shipkey G, Cumbo TA. (2004), Characterization of the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies, *In Vitro Cell Dev. Biol.* 40: 172-182

Dérillard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. (1994), JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain, *Cell.*, 25;76(6):1025-1037

Desouki MM, Kulawiec M, Bansal S, Das GM, Singh KK. (2005), Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors, *Cancer Biol Ther.*, 4(12):1367-1373

Domenicotti C, Paola D, Vitali A, Nitti M, d'Abramo C, Cottalasso D, Maloberti G, Biasi F, Poli G, Chiarpotto E, Marinari UM, Pronzato MA. (2000), Glutathione depletion induces apoptosis of rat hepatocytes through activation of protein kinase C novel isoforms and dependent increase in AP-1 nuclear binding., *Free Radic Biol Med.*, 29(12):1280-90

Donati YRK, Slosman DO y Polla BS. (1990), Oxidative injury and the heat shock response. *Biochem. Pharmacol.* 40: 2571-2577

Dong C, Davis RJ, Flavell RA. (2002), MAP kinases in the immune response, *Annu Rev Immunol.*, 20:55-72

Dudley RE, Svoboda DJ, Klaassen CD. (1984), Time course of cadmium-induced ultrastructural changes in rat liver, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 76(1):150-160

Escobar MC, Souza V, Bucio L, Hernández E, Damián-Matsumura P, Zaga V, Gutiérrez-Ruiz MC., (2002) Cadmium induces alpha(1)collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells., *Toxicology.*, 170(1-2):63-73

Fay RM y Mumtaz MM. (1996), Development of a priority list of chemical mixtures occurring at 1188 hazardous waste sites, using the HazDat database., *Food Chem Toxicol.*;34(11-12):1163-1165

Feder ME y Hofmann GE. (1999), Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology,

George J y Struthers AD. (2009), Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress, *Vasc Health Risk Manag.*, 5(1):265-272

Goering PL, Fisher BR y Kish CL. (1993), Stress protein synthesis induced in rat liver by cadmium precedes hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 122: 139-148

Goyer RA. (1997), Toxic and essential metal interactions., *Annu Rev Nutr.*, 17:37-50

Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B, Davis RJ. (1996), Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors, *EMBO J.*, 15(11):2760-2770

Gutiérrez MC, Bucio L, Souza V, Gómez JJ, Campos C y Cárabez A. (1994), Expression of some hepatocyte-like functional properties of WRL-68 cells in culture, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 30A: 366-371

Gutiérrez-Ruiz MC, Gomez-Quiroz LE, Hernández E, Bucio L, Souza V, Llorente L y Kershenovich D. (2001), Cytokines response and oxidative stress produced by ethanol, acetaldehyde and endotoxin treatment in HepG2 cells., *Isr. Med. Assoc. J.*, 3: 131-136

Gutiérrez-Ruiz MC, Quiroz SC, Souza V, Bucio L, Hernández E, Olivares IP, Llorente L, Vargas-Vorackova F y Kershenovich D. (1999), Cytokines, growth factors, and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde, and LPS., *Toxicology*, 134: 197-207

Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P. (1988), c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities, *Cell.*, 55(5):917-924

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. (1994), A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells, *Science.*, 265(5173):808-11

Hartwig A. (1994), Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ Health Perspect.*, 102 Suppl 3:45-50

Hernandez E, Gutierrez-Ruiz MC. y Garcia Vargas G. (1998), Effect of acute lead treatment on coproporphyrinogen oxidase activity in HepG2 cells, *Toxicology*, 126: 163-171

Hirasawa N, Yashima K, Ishihara K. (2009), Enhancement of ligand-dependent down-regulation of glucocorticoid receptor by lipopolysaccharide., *Life Sci.*,85(15-16):578-585

Hirose N, Maekawa T, Shinagawa T, Ishii S. (2009), ATF-2 regulates lipopolysaccharide-induced transcription in macrophage cells., *Biochem Biophys Res Commun.*, 385(1):72-77

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

Huang C, Zhang Q, Li J, Shi X, Castranova V, Ju G, Costa M y Dong Z. (2001), Involvement of Erks activation in cadmium-induced AP-1 transactivation in vitro and vivo. *Mol. Cel. Biochem.* 222: 141-147

IARC (International Agency for Research on Cancer). (1993), Cadmium and cadmium compounds. Monografia, IAR Press, Lyon.

Ioanna-Katerina SA, Gaitanaki C, Beis I. (2006), Involvement of JNKs and p38-MAPK/MSK1 pathways in H₂O₂-induced upregulation of heme oxygenase-1 mRNA in H9c2 cells, *Cellular Signalling* 18:1801–1812

Jarup L y Akesson A. (2009), Current status of cadmium as an environmental health problem, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 238(3):201-208

Joiakim A, Mathieu PA, Palermo C, Gasiewicz TA, Reiners JJ Jr. (2003), The Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 is a ligand and antagonist of the aryl hydrocarbon receptor., *Drug Metab Dispos.* 31(11):1279-1282

Joseph P. (2009), Mechanisms of cadmium carcinogenesis, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 238(3):272-279

Jung YS, Jeong EM, Park EK, Kim YM, Sohn S, Lee SH, Baik EJ, Moon CH. (2008), Cadmium induces apoptotic cell death through p38 MAPK in brain microvessel endothelial cells, *Eur J Pharmacol.*, 578(1):11-18

Junttila MR, Li S, Westermarck J. (2008), Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival, *FASEB J.*, 22: 1-12

Kagi JHR. (1993), Evolution, structure, and chemical activity of class I metallothioneins: a overview. In: Suzuki, K.T. Imura N., Kimura M., eds. *Metallothionein III: biological roles and medical implications.* Berlin: Birkhauser Verlag. 29-56

Kalariya NM, Wills NK, Ramana KV, Srivastava SK, van Kuijk FJ. (2009), Cadmium-induced apoptotic death of human retinal pigment epithelial cells is mediated by MAPK pathway, *Exp Eye Res.*, 89(4):494-502

Kalmes A, Deou J, Clowes AW, Daum G. (1999), Raf-1 is activated by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, SB203580. *FEBS Lett.*, 444(1):71-74

Karcher SC y Laufer SA. (2009), Successful structure-based design of recent p38 MAP kinase inhibitors., *Curr Top Med Chem.*, 9(7):655-676

Karin M, Liu Z, Zandi E. (1997), AP-1 function and regulation, *Curr. Opin. Cell Biol*, 9(2):240-246

Karin M. (1995), The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases, *J Biol Chem*, 270(28):16483-16486

Kawata K, Shimazaki R, Okabe S. (2009), Comparison of gene expression profiles in HepG2 cells exposed to arsenic, cadmium, nickel, and three model carcinogens for investigating the mechanisms of metal carcinogenesis, *Environ Mol Mutagen*, 50(1):46-59

Koyuturk M, Yanardag R, Bolkent S, Tunali S. (2007), The potential role of combined anti-oxidants against cadmium toxicity on liver of rats., *Toxicol. Ind. Health.*, 23(7):393-401

Kregel KC. (2002), Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance, *J Appl Physiol.*, 92(5):2177-2186

Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, Hand AT, Lee JC, Young PR. (1997), Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun.*, 235(3):533-538

Kuo CT, Chen BC, Yu CC, Weng CM, Hsu MJ, Chen CC, Chen MC, Teng CM, Pan SL, Bien MY, Shih CH, Lin CH. (2009), Apoptosis signal-regulating kinase 1 mediates denbinobin-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cells., *J Biomed Sci.*, May 1;16:43

Kusakabe T, Nakajima K, Nakazato K, Suzuki K, Takada H, Satoh T, Oikawa M, Arakawa K, Nagamine T. (2008), Changes of heavy metal, metallothionein and heat shock proteins in Sertoli cells induced by cadmium exposure, *Toxicol In Vitro*, 22(6):1469-1475

Kyriakis JM y Avruch J. (2001), Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation., *Physiol Rev.*, 81(2):807-869

Lechner C, Zahalka MA, Giot JF, Moller NP, Ullrich A. (1996), ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93(9):4355-4359

Lee JS, Zhang MH, Yun EK, Geum D, Kim K, Kim TH, Lim YS, Seo JS. (2005), Heat shock protein 27 interacts with vimentin and prevents insolubilization of vimentin subunits induced by cadmium, *Exp Mol Med.*, 37(5):427-435

Lee KH y Kim JR. (2009), Reactive oxygen species regulate the generation of urokinase plasminogen activator in human hepatoma cells via MAPK pathways after treatment with hepatocyte growth factor, *Exp Mol Med.*, 41(3):180-188

Lee SB, Bae IH, Bae YS, Um HD. (2006), Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death., *J Biol Chem.*, 281(47):36228-36235

Liu J, Kadiska MB, Corton C, Qu W, Waalkes MP, Mason RP, Liu Y, Klaassen CD. (2002), Acute cadmium exposure induces stress-related gene expression in wild-type and metallothionein-I/II-null mice. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 525-535

Liu J, Qian S, Guo Q, Jiang J, Waalkes MP, Mason RP, Kadiiska MB. (2008), Cadmium generates reactive oxygen- and carbon-centered radical species in rats: Insights from in vivo spin-trapping studies, *Free Rad. Biol. & Med.*, 45: 475-481

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

Llobet JM, Falcó G, Casas C, Teixidó A, Domingo JL. (2003), Concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in common foods and estimated daily intake by children, adolescents, adults, and seniors of Catalonia, Spain., *J Agric Food Chem.*, 29;51(3):838-842

López-Rodríguez C, Kluin-Nelemans HC, Corbí AL. (1996), AP-1 regulates the basal and developmentally induced transcription of the CD11c leukocyte integrin gene, *J Immunol.*, 156(10):3780-3787

Lu Y y Cederbaum AI. (2009) CYP2E1 potentiation of LPS and TNF α -induced hepatotoxicity by mechanisms involving enhanced oxidative and nitrosative stress, activation of MAP kinases, and mitochondrial dysfunction, *Genes Nutr.* 2009 Oct 2, en prensa

Mannino DM, Holguin F, Greves HM, Savage-Brown A, Stock AL, Jones RL. (2004), Urinary cadmium levels predict lower lung function in current and former smokers: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey., *Thorax.*, 59(3):194-198

Martin P, Poggi MC, Chambard JC, Boulukos KE, Pognonec P. (2006), Low dose cadmium poisoning results in sustained ERK phosphorylation and caspase activation, *Biochem Biophys Res Commun.*, 350(3):803-807

McFarland R y Turnbull DM. (2009), Batteries not included: diagnosis and management of mitochondrial disease, *J Intern Med.*, 265(2):210-228

Meister A. (1995), Glutathione biosynthesis and its inhibition, *Methods Enzymol.* 252: 26-30

Merril CL, Ni H, Ion LW, Tirmenstein MA, Narayanan P, Benavides GR, Easton MJ, Creech DR, Hu CX, McFarland DC, Hahn LM, Thomas HC, Morgan KT. (2002), Etomoxir-induced oxidative stress in HepG2 cells detected by differential gene expression is confirmed biochemically, *Toxicol. Sci.* 68: 93-101

Miguel BG, Rodriguez ME, Aller P, Martinez AM, Mata F. (2005). Regulation of cadmium-induced apoptosis by PKCdelta in U937 human promonocytic cells. *Biochim Biophys Acta*, 15;1743(3):215-222

Mizukami Y, Okamura T, Miura T, Kimura M, Mogami K, Todoroki-Ikeda N, Kobayashi SY, Matsuzaki M. (2001), Phosphorylation of protein and apoptosis induced by c-Jun N-terminal kinase1 activation in rat cardiomyocytes by H₂O₂ stimulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1540: 213-220

Morales A, García-Ruíz C, Miranda M, Marí M, Colell A, Ardite E, Fernández-Checa JC. (1997). Tumor necrosis factor increases hepatocellular glutathione by transcriptional regulation of the heavy subunit chain of γ -glutamylcysteine synthetase, *J. Biol. Chem.* 272: 30371-30379

Nishijo M, Morikawa Y, Nakagawa H, Tawara K, Miura K, Kido T, Ikawa A, Kobayashi E, Nogawa K. (2006), Causes of death and renal tubular dysfunction in residents exposed to cadmium in the environment., *Occup Environ Med.*, 63(8):545-550

Nishitai G y Matsuoka M. (2008), Differential regulation of HSP70 expression by the JNK kinases SEK1 and MKK7 in mouse embryonic stem cells treated with cadmium, *J Cell Biochem.*, 104(5):1771-1780

Oishi Y, Ohnishi M, Kobayashi-Hattori K, Takita T, Noguchi T. (2007), Cadmium cation increases the production and mRNA levels of insulin-like growth factor-binding protein-1 in HepG2., *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71(5):1334-1337

Olsson IM, Bensryd I, Lundh T, Ottosson H, Skerfving S, Oskarsson A. (2002), Cadmium in blood and urine--impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking--association of renal effects., *Environ Health Perspect.*, 110(12):1185-1190.

Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. (2006), Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol., *Pharmacol Rev.*, 58(1):87-114

Park J, y Liu AY. (2001), JNK phosphorylates the HSF1 transcriptional activation domain: role of JNK in the regulation of the heat shock response, *J Cell Biochem.*, 82(2):326-338

Park SL, Kim YM, Ahn JH, Lee SH, Baik EJ, Moon CH, Jung YS. (2009), Cadmium stimulates the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and JNK activation in cerebrovascular endothelial cells., *J Pharmacol Sci*, 110(3):405-409

Preston GA, Lyon TT, Yin Y, Lang JE, Solomon G, Annab L, Srinivasan DG, Alcorta DA, Barrett JC. (1996), Induction of apoptosis by c-Fos protein, *Mol Cell Biol*, 16(1): 211-218

Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR. (1991), Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases., *Nature*, 353(6345):670-674

Rauscher FJIII, Voulalas PJ, Franza BR Jr, Curran T. (1988), Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro, *Genes Dev.*, 2(12B):1687-1699

Resnick L y Fennell M. (2004), Targeting JNK3 for the treatment of neurodegenerative disorders, *Drug Discov Today*, 9(21):932-939

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

Rodius S, Indra G, Thibault C, Pfister V, Georges-Labouesse E. (2007), Loss of alpha6 integrins in keratinocytes leads to an increase in TGFbeta and AP1 signaling and in expression of differentiation genes., *J Cell Physiol.*, 212(2):439-449

Roman J, Giménez A, Lluís JM., Gasso M, Rubio M, Caballeria J, Pares A, Rodes J, Fernández-Checa JC. (2000), Enhanced DNA binding and activation of transcription factors NF-kappa B AP-1 by acetaldehyde in HepG2 cells, *J. Biol. Chem.* 275: 14684-14690

Rutherford SL y Zuker CS. (1994), Protein folding and the regulation of signaling pathways, *Cell.*, 79(7):1129-1132

Sahmoun AE, Case LD, Jackson SA, Schwartz GG. (2005), Cadmium and prostate cancer: a critical epidemiologic analysis., *Cancer Invest.*, 23(3):256-263

Shaulian E, y Karin M. (2001), AP-1 in cell proliferation and survival, *Oncogene*, 30;20(19):2390-2400

Shaulian E y Karin M. (2002), AP-1 as a regulator of cell life and death, *Nat Cell Biol.*, 4(5):E131-E136

Singhal RK, Anderson ME, Meister A. (1987), Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity, *FASEB J.*, 1(3):220-223

Souza V, Bucio L, Gutiérrez-Ruiz MC. (1997), Cadmium uptake by a human hepatic cell line (WRL-68 cells), *Toxicology.*, 11;120(3):215-220

Souza V, Escobar MC, Bucio L, Hernández E, Gómez-Quiroz LE, Gutiérrez Ruiz MC. (2009), NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced-STAT3 activation in HepG2 cells, *Toxicol Lett.*, 187(3):180-186

Souza V, Escobar MC, Gómez-Quiroz L, Bucio L, Hernández E, Cossio EC, Gutiérrez-Ruiz MC. (2004a), Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells., *Toxicology.*, 197(3):213-228

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

Sugisawa N, Matsuoka M, Okuno T, Igisu H. (2004), Suppression of cadmium-induced JNK/p38 activation and HSP70 family gene expression by LL-Z1640-2 in NIH3T3 cells, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 196(2):206-214

Tacchini L, Fusar-Poli D, Bernelli-Zazzera A. (2002), Activation of transcription factors by drugs inducing oxidative stress in rat liver, *Biochem Pharmacol.*, 63(2):139-148

Tanos T, Marinissen MJ, Leskow CF, Hochbaum D, Martinetto H, Gutkind JS, Coso AO. (2005), Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family "role in the AP1 response to UV light"., *J. Biol. Chem.* 280(19): 18842-18852.

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

Tournier C, Dong C, Turner TK, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. (2001), MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines, *Genes Dev.*, 15(11):1419-1426

Turjanski AG, Vaqué JP, Gutkind JS. (2007), MAP kinases and the control of nuclear events, *Oncogene*, 26(22):3240-3253

Urani C, Melchiorretto P, Canevali C, Crosta GF. (2005), Cytotoxicity and induction of protective mechanisms in HepG2 cells exposed to cadmium, *Toxicology in Vitro*, 19:887-892

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

Valbonesi P, Ricci L, Franzellitti S, Biondi C, Fabbri E. (2008), Effects of cadmium on MAPK signalling pathways and HSP70 expression in a human trophoblast cell line, *Placenta*, 29(8):725-733

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

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

Waalkes MP, y Klaassen CD. (1985), Concentration of metallothionein in major organs of rats after administration of various metals, *Fundam Appl Toxicol.*, 5(3):473-477

Wagner EF. (2002), Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development, *Ann Rheum Dis*. 61 Suppl 2:ii40-42

Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. (2003), Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis, *Toxicology*, 192: 95-117

Wisdom R. (1999), AP-1: one switch for many signals, *Exp Cell Res.*, 253(1):180-185

Yeh CT y Yen GS. (2005), Effect of sulforaphane on metallothionein expression and induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells, *Carcinogenesis.*, 26(12):2138-2148

Yoo SM, Oh SM, Lee BW, Ko WG, Moon CK, Lee BH. (2002), Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by tetrandrine in HepG2 cells, *J. Ethnopharmacol*. 81: 225-229

Yoon YS, Lee JH, Hwang SC, Choi KS, Yoon G. (2005), TGF beta1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mv1Lu cells. *Oncogene.*, 24(11):1895-1903

Zhang Z, Blake DR, Stevens CR, Kanczler JM, Winyard PG, Symons MC, Benboubetra M, Harrison R. (1998), A reappraisal of xanthine dehydrogenase and oxidase in hypoxic reperfusion injury: the role of NADH as an electron donor, *Free Radic Res.*, 28(2):151-164

RESEARCH ARTICLE

MAPK activation is involved in Cadmium-induced Hsp70 expression in HepG2 cells

Ma. del Carmen Escobar¹, Verónica Souza², Leticia Bucio², Elizabeth Hernández², Luis Enrique Gómez-Quiroz², and Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz²

¹Doctorado en Biología Experimental, and ²Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Avenida San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, Iztapalapa, México D.F. 09340, México

Abstract

Cadmium is one of the most toxic elements to which man can be exposed at work or in the environment. By far, the most salient toxicological property of Cd is its exceptionally long half-life in the human body. Once absorbed, Cd accumulates in the human body, particularly in the liver and other vital organs. The cellular actions of Cd are extensively documented, but the molecular mechanisms underlying these actions are still not resolved. It is known that Cd activates the activator protein-1 (AP-1), but no data about the pathway involved are reported for liver. The objective was to provide a greater insight into the effect of cadmium on mitogen-activated protein kinases (MAPK's) involved in signal transduction, its relationship with AP-1 activation, and heat shock protein (Hsp) 70 expression, in HepG2 cells. AP-1 activation as a result of 5 μ M CdCl₂ exposure was increased 24.5-fold over control cells after 4 h treatment. To investigate the role of the extracellular signal-regulated protein kinases (ERK's), c-Jun N-terminal kinases (JNK's) and p38 kinases in cadmium-induced AP-1 activation, specific MAPKs inhibitors were used. AP-1 activation decreased by 74% with ERK inhibition, by 83% with p38 inhibition, while inhibition of JNK decreased by 70%. Only ERK and JNK participated in Hsp70 production, conferring cell protection against cadmium damage.

Keywords: AP-1; cadmium; Hsp70; MAPK

Introduction

Cadmium (Cd), a relatively rare heavy metal, is biologically non-essential and a highly toxic metal. It is mainly used in the battery, alloy manufacturing, and the electroplating industries. Food is recognized as the major source of Cd in humans, although many investigators have demonstrated that cigarettes are a major source of Cd exposure. Cd, apart from occupational concerns, also possesses environmental problems due to its extremely long biological half-life (Bhattacharyya 2009). Rodent-based studies have demonstrated that following acute Cd exposure, the preponderance of the dose accumulates in the liver, resulting primarily in liver damage (Diep et al. 2005). Cd-induced cytotoxicity in hepatocytes includes the generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation damage (Souza et al. 2004; Bucio et al. 2005), alteration of intracellular calcium homeostasis,

because Cd can competitively reduce extracellular calcium influx (Souza et al. 1996; 1997), sulfhydryl group inactivation, disruption of cytoskeletal organization (Jeong et al. 2000), DNA injury (López et al. 1999), and apoptosis induction (Lemarie et al. 2004) among others. Some or all of these events explain the cause of cadmium-induced carcinogenesis (Waalkes 2003). The cellular actions of Cd are extensively documented, but the molecular mechanisms underlying these actions are still not resolved (Hirano et al. 2005). It is established that Cd has pleiotropic effects including the induction of immediate early genes (c-Fos, c-Jun) and genes encoding for metallothioneins (MT) and heat shock proteins (Hsp) (Souza et al. 2004).

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are a family of highly conserved Ser/Thr kinases, which comprise ubiquitous groups of signaling proteins that play critical regulatory

Address for Correspondence: Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz, Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Avenida San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina Iztapalapa, México D.F. 09340, México. Tel: (55)58046451. Fax: (55)5804-4730. E-mail: mcgr@xanum.uam.mx

(Received 15 July 2009; revised 08 September 2009; accepted 10 September 2009)

ISSN 1537-6516 print/ISSN 1537-6524 online © 2009 Informa UK Ltd
DOI: 10.3109/15376510903325670

<http://www.informahealthcare.com/txm>

roles in cell physiology. Members of each major MAPK sub-family, the extracellular signal-regulated protein kinases (ERK1/2), cJun N-terminal kinases (JNK), and p38, have been shown to participate in a diverse array of cellular functions such as the control of gene expression, modulation of metabolism, cell proliferation or differentiation, and cell survival or death (Chang and Karin 2001). Generally ERK is activated by mitogenic stimuli, and the JNK and p38 pathways are activated by cellular stresses. It has been reported that environmentally contaminating toxic metals such as cadmium could activate each MAPK family member simultaneously (Sugisawa et al. 2004), as in the case of renal cells (Hirano et al. 2005), in macrophages (Misra et al. 2002), and in some tumor cells (Hung et al. 1998; Lee et al. 2005). Accumulated evidence has suggested MAPKs to be part of the upstream signal pathway of the activator protein-1 (AP-1) activation (Hsiao and Stapleton 2004). AP-1 is a redox sensitive transcription factor that plays an important role in cellular response to different stimuli including the presence of reactive oxygen species (ROS) as well as heavy metals (Karin 1995). AP-1 is composed of various combinations of Jun, Fos, activating transcription factor (ATF), and basic region leucine zipper proteins. Each of these proteins is differentially expressed and regulated, which means that every cell type has a complex mixture of AP-1 dimers with subtly different functions (Wagner 2001). The leucine zipper is responsible for dimerization, which is a prerequisite for DNA binding mediated by the basic domain. The composition of the leucine zipper is also responsible for the specificity and the stability of homo- and heterodimers formed by the various Jun and Fos proteins. Whereas the Jun proteins exist as homo- and heterodimers, the Fos proteins, which cannot homodimerize, form stable heterodimers with Jun proteins and thereby enhance their DNA-binding activity. The structural properties of the domains mediating transcriptional activation are not well understood (Hess et al. 2004). The expression of stress proteins such as Hsp's, heme oxygenase-1, and MT are induced in response to cadmium exposure (Pinot et al. 2000; Souza et al. 2004). Elevated levels of Hsp70 have been observed to result in cytoprotection and may represent an important cellular defense mechanism against diverse forms of cellular and tissue injury produced by hepatotoxicants (Urani et al. 2005). Although it is known that Cd activates AP-1, no data about signaling pathway involved was found in the literature. Recent data indicate that HepG2 cells a human hepatocellular carcinoma cell line is a useful in vitro model for cadmium toxicity studies (Dehn et al. 2004).

The goal of the present study is to investigate the intracellular signaling MAPKs pathways in CdCl₂ treated HepG2 cells and its participation in the induction of Hsp70. Also the composition of the AP-1 heterodimer is determined.

Materials and methods

Cell culture

Recent data indicate that HepG2 cells (a human hepatocellular carcinoma cell line) are a useful in vitro model to study

cadmium toxicity (Dehn et al. 2004). These were grown in Williams E medium (Sigma, St Louis, MO) supplemented with 8% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT), penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 mg/ml) in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air at 37°C. The medium was replaced twice a week and cells were harvested and diluted at 1:3 ratio every 7 days. The cells were cultured in 75 cm² cell culture flasks (Corning, Acton, MA).

Experimental design

Twenty-four hours after seeding, HepG2 cells were exposed to 5 μM of CdCl₂ in serum-free medium and incubated for 1, 2, 3, 4, 5, or 6 h at 37°C. Cells were washed twice with PBS, scraped off from the dishes to determine AP-1 DNA binding by EMSA assay. Control cells without CdCl₂ were seeded at the same time. In experiments to determine the effect of the different MAPK's inhibitors on AP-1 DNA binding activity and Hsp 70 induction (SP600125 (JNK inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor) and PD98059 (ERK inhibitor) (Calbiochem, San Diego, CA)) cells were pre-treated with the inhibitor for 1 h and then co-exposed with or without 5 μM CdCl₂ for 4 h at 37°C.

Cells lysis and Western blot analysis

For Western blot analysis, cells were washed with ice-cold PBS and scraped off into cell lysis buffer 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 120 mM NaCl, 0.5% IGEPAL, 10 mM NaF, 200 μM NaVO₄, and a complete inhibitor protease cocktail (Roche Diagnostics). The cells were incubated in lysis buffer for 15 min on ice and centrifuged at 16,654 × g for 15 min at 4°C. Protein concentration was determined by Bradford method (Bradford 1976), using bovine serum albumin as a standard. Protein samples (20 μg) were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels (Laemmli 1970), transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon-P, Amersham Pharmacia Biotech) and probed with anti-ERK1/2, anti-pERK1/2, anti-p38, anti-pp38, anti-JNK, anti-pJNK, and anti-Hsp70 (Santa Cruz Biotechnology, CA) antibodies. Membranes were incubated with anti-mouse or anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated anti-goat-IgG (Santa Cruz, Biotech). Blots were revealed using super-signal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce Chem. Co.). Protein bands were scanned and the band intensities quantified using a densitometer and accompanying molecular analyst software.

Nuclear protein preparation

Nuclear extracts were prepared as described by Gómez-Quiroz et al. (2008). Cells were washed in cold PBS, resuspended in 800 μl ice-cold buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 0.1 mM EGTA, 10 × IGEPAL, 1.0 mM dithiothreitol (DTT), and 0.5 mM phenol methyl sulfonyl fluoride (PMSF)). The cell lysate was chilled on ice for 15 min and then centrifuged at 12,235 × g for 30 s. The nuclei were then resuspended in a buffer C (20 mM HEPES, pH 7.9, 0.4 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1.0 mM DTT, and 1.0 mM PMSF) and incubated on ice for 15 min with occasional shaking. The

nuclear suspension was centrifuged at $16,654 \times g$ for 5 min at 4°C . The supernatant (nuclear protein) was then aliquoted and immediately frozen at -80°C . Protein concentration was determined using the Bradford reagent (Bio-Rad, Hercules, CA).

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

The AP-1 DNA binding activity was analyzed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Nuclear extracts were prepared essentially as described by Gómez-Quiroz et al. (2008). DNA binding activity was determined after incubation of nuclear protein (20 μg) with 0.5 ng of $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -labeled (NEN Life Science Products, Inc.) DNA probe for the AP-1 consensus site (5'CGCTTGATGACTCAGCCGAA) in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoethanol, 20% glycerol, 5 mM MgCl_2 , and 1 μg poly[dI.dC]. The reaction mixture was electrophoresed on 6% polyacrylamide gel in $0.5 \times \text{TBE}$ buffer at 150V. The gel was then exposed to Kodak film for autoradiography. In competition experiments, 50-fold excess of unlabeled AP-1 oligonucleotide was added before addition of the ^{32}P -labeled AP-1 oligonucleotide. For supershift analysis, nuclear extract were incubated with 4 μl anti c-Jun or anti c-Fos (Santa Cruz) at room temperature for 15 min before addition of the labeled probe.

Data analysis

Data are reported as mean \pm SE. The SPSS package version 12 was used to run the analysis. Comparisons among groups were done by means of ANOVA. Tukey's method was used for multiple comparisons. Differences between groups were considered statistically significant if $p < 0.05$.

Results

Previous reported data from our group indicate that HepG2 cell viability, determined as mitochondrial function in an MTT assay, exposed during 6 h to different CdCl_2 concentrations (0–50 μM) presented 100–90% viability in the presence of 0.5–10 μM CdCl_2 , decreasing to 73% with 20 μM CdCl_2 and 67% with 50 μM (Souza et al. 2004). Taking into consideration the cell viability and its proliferation capacity after cells had been re-seeded in the presence of the metal, the CdCl_2 concentration chosen for the present work was 5 μM . AP-1 activation as a result of 5 μM CdCl_2 treatment was evaluated in HepG2 cells by electrophoretic mobility shift assay. Nuclear extracts were prepared from HepG2 cells exposed for 1, 2, 3, 4, 5, and 6 h to the metal. After 2 h treatment DNA binding of AP-1 increased 9.5-fold, reaching 24.5-fold over control cells value after 4 h treatment. This increment was maintained after 6 h metal treatment (Figure 1). AP-1 could be formed as homodimer or heterodimer of Jun and Fos proteins family. Each of these proteins is differentially expressed and regulated, which means that every cell type has a complex mixture of AP-1 dimers with subtly different functions.

Our next objective was to address the composition of AP-1 complexes activated by Cd. Figure 2 shows that AP-1

is composed basically by c-Jun homodimers, with a minor participation of c-Jun/c-Fos heterodimer. An unknown specific lower complex not shifted by any of the antibodies used was identified, but with a slight activation due to cadmium treatment. AP-1 is a known target of the MAP kinase family, including ERKs, JNKs, and p38 kinases (Mukhopadhyay et al. 2008). The next step was to evaluate the time course of activation of each MAPK tested in

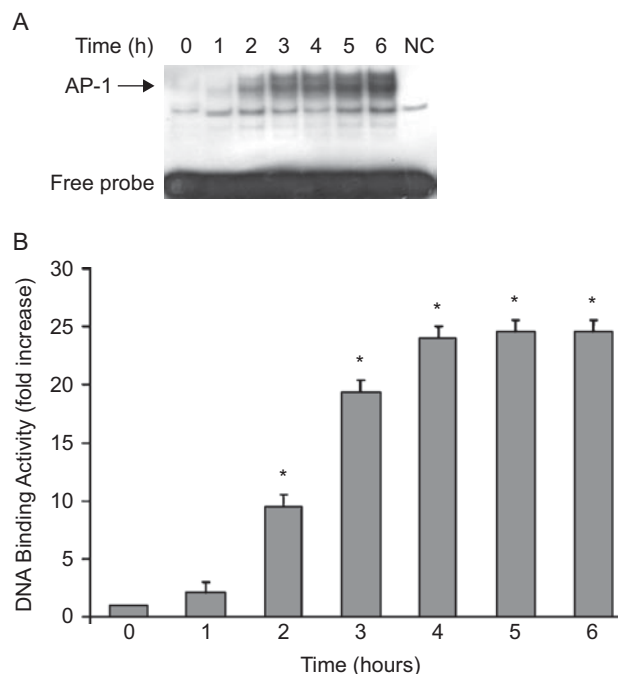


Figure 1. Time course of cadmium-induced AP-1 activation in HepG2 cells. HepG2 cells exposed from 1–6 h with 5 μM CdCl_2 . (A) Representative EMSA analysis of AP-1 in nuclear extracts. NC corresponds to unlabeled AP-1 probe. (B) Densitometric analysis of AP-1 activation. Results are expressed as fold increase compared with control cells. Each bar represents the mean \pm SE of at least three independent experiments. * Significantly different from control ($p < 0.05$).

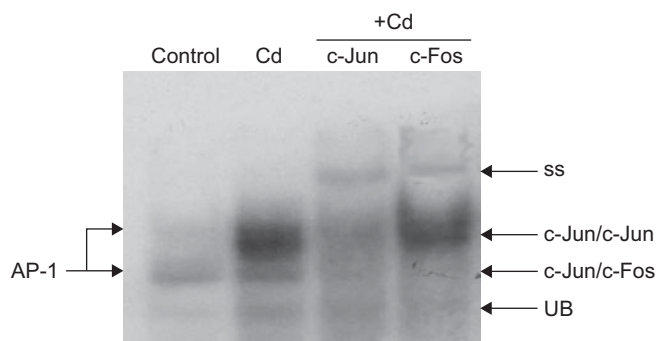


Figure 2. Composition of AP-1 in cadmium treated HepG2 cells. Cells were exposed with 5 μM CdCl_2 for 4 h. Representative EMSA analysis of composition AP-1 in nuclear extracts. For supershift analysis, nuclear extract were incubated with 4 μl anti c-jun or anti c-fos at room temperature for 15 min before addition of the labeled probe. Homodimer c-Jun/c-Jun and heterodimer c-Jun/c-Fos are marked by the arrows. An unknown specific lower complex not shifted by any of the antibodies used is denoted as UB and marked by the arrow. ss denotes shifted complexes. Image is representative of at least three independent experiments.

the presence of Cd. The activation of ERK, JNK, and p38 kinases were determined using specific antibodies recognizing the dual phosphorylation sites of the specific kinase. The time course of ERK activation in the presence of Cd shows a significant ERK 1/2 activation after 30 min Cd treatment, that increased by 1 and 2 h and decreased after 3 h (Figure 3). The p38 activation appeared to be sustained in all points determined after 15 min Cd treatment (Figure 4). The time course of JNK activation differed from those observed to ERK and p38 activation. The amount of activated JNK increased was delayed, because only after 2 h of treatment with 5 μM CdCl₂ appeared and continued increasing until 6 h (Figure 5). The Cd-induced activation kinetics is characteristic for each of the three analyzed MAPKs with regard to the time course and intensity in HepG2 cells.

To investigate the role of ERKs, JNKs, and p38 in cadmium-induced AP-1 activation, we determined the effects of specific inhibitors of each MAPKs in the transcription factor activation (Figure 6). HepG2 cells were pre-treated with each one of the specific MAPKs inhibitors or the three of them, and then treated with Cd. PD98059, a specific inhibitor of MEK1, a kinase immediately upstream of ERK; SB203580 an inhibitor of p38 and SP600125 an inhibitor of JNK were used. Inhibition of ERK decreased by 74%, inhibition of p38 decreased by 83%, while inhibition of JNK decreased by 70% AP-1 activation after 4 h Cd treatment. Using the three inhibitors together AP-1 activation fell to control cells values. The participation of all three MAPKs tested was involved in Cd-induced HepG2 AP-1 activation.

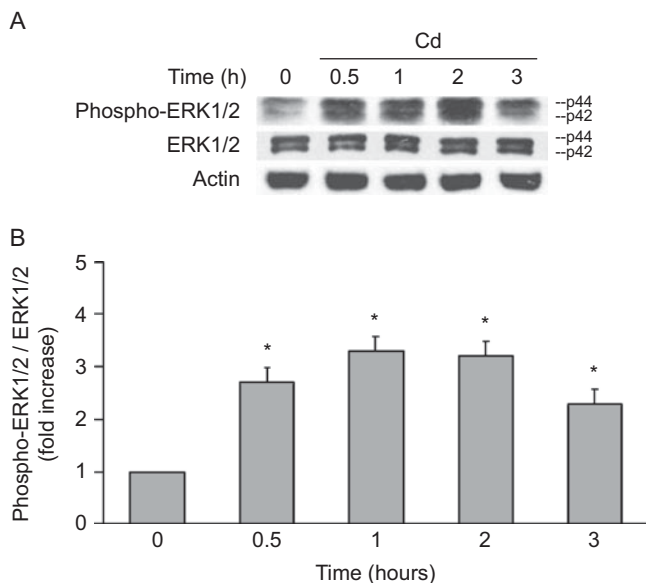


Figure 3. Time course on ERK1/2 activation in HepG2 cells treated with Cd. Control and cells treated with 5 μM CdCl₂ for 0.5, 1, 2, 3 h. The total protein was extracted and prepared for Western blot analysis. (A) Representative Western blot of phospho-ERK1/2, ERK1/2, and actin. (B) Densitometric analysis of phospho-ERK1/2 expression. The results are expressed as fold increased compared with control cells. Each bar represents the mean \pm SE of at least three independent experiments. * Significantly different from control ($p < 0.05$).

Hsp70 is produced by HepG2 cells after 3 h Cd treatment as our group reported previously (Souza et al. 2004). To elucidate the possible involvement of MAP kinases in

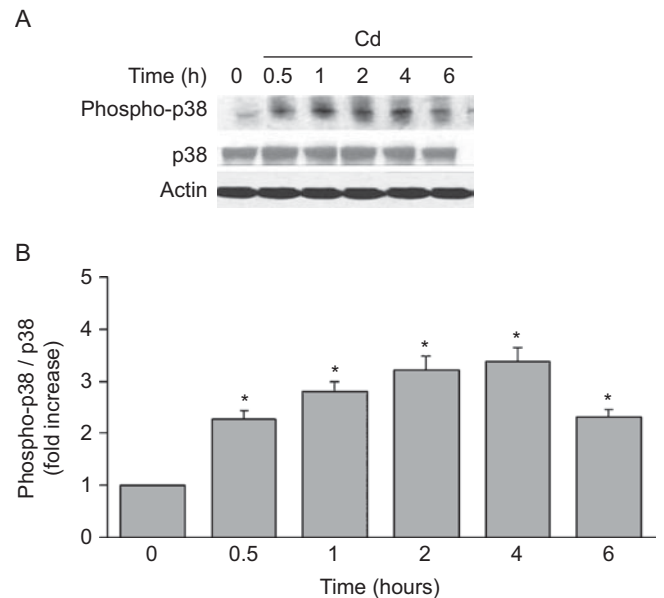


Figure 4. Time course on p38 activation in HepG2 cells treated with Cd. Control and cells treated with 5 μM CdCl₂ for 0.5, 1, 2, 4, 6 h. The total protein was extracted and prepared for Western blot. (A) Representative Western blot of phospho-p38, p38, and actin. (B) Densitometric analysis of phospho-p38 expression. The results are expressed as fold increased compared with control cells. Each bar represents the mean \pm SE of at least three independent experiments. * Significantly different from control ($P < 0.05$).

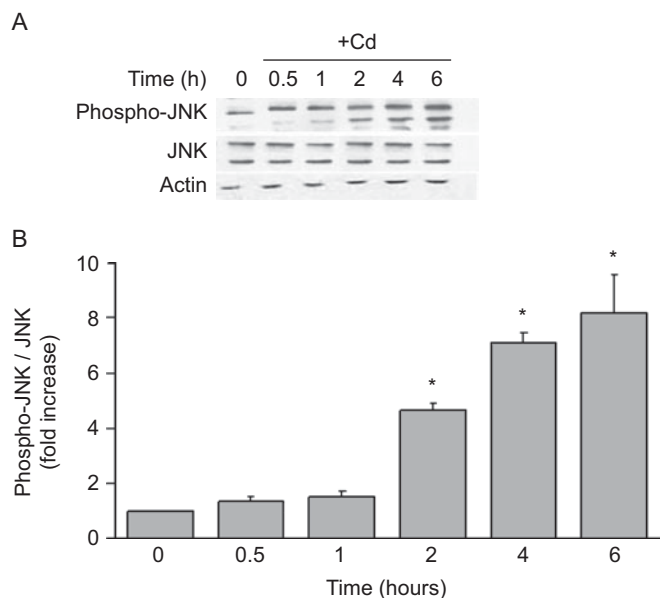


Figure 5. Time course on JNK activation in HepG2 cells treated with Cd. Control and cells treated with 5 μM CdCl₂ for 0.5, 1, 2, 4, 6 h. The total protein was extracted and prepared for Western blot. (A) Representative Western blot of phospho-JNK, JNK, and actin. (B) Densitometric analysis of phospho-JNK expression. The results are expressed as fold increased compared with control cells. Each bar represents the mean \pm SE of at least three independent experiments. * Significantly different from control ($p < 0.05$).

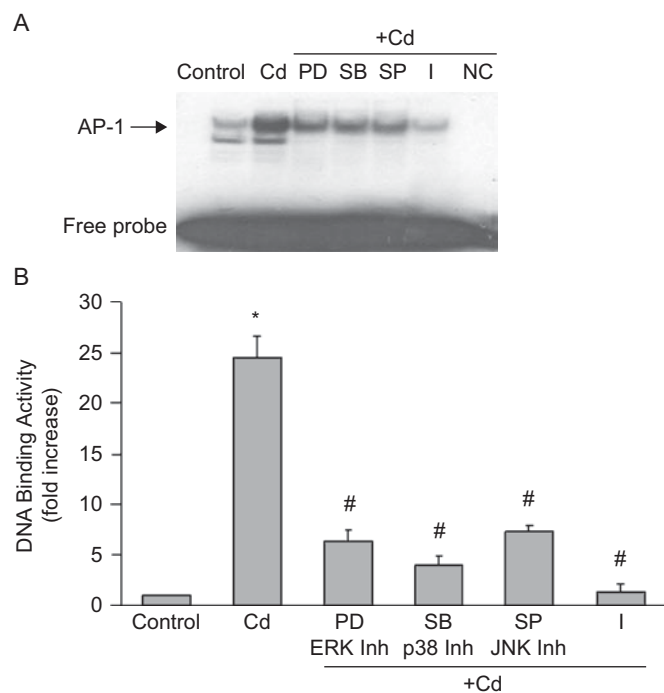


Figure 6. Effect of MAPKs inhibition on cadmium-induced AP-1 activation in HepG2 cells. The cells were pre-treated with 20 μ M SP600125, PD98059, SB203580, or the three inhibitors together (I) and exposed to 5 μ M CdCl₂ for 4 h. Nuclear extracts were isolated and prepared for EMSA using a ³²P-labeled AP-1 oligonucleotide. (A) Representative gel shift assay. (B) Densitometric analysis of AP-1 activation. DNA binding activity is expressed as fold increased compared with control cells. Each bar represents the mean \pm SE of at least three independent experiments. * Significantly different from control ($p < 0.05$). # Significantly different from CdCl₂ alone treated cells ($p < 0.05$).

the induction of Hsp70 under cadmium treatment, several protein kinases inhibitors, including PD98059, SB203580, and SP600125, were employed. Cells were respectively incubated with the above inhibitors for 1 h and then treated with Cd for 4 h. PD98059 and SP600125 appeared to inhibit partially the production of Hsp70, indicating that ERK and JNK participated in Hsp70 production. ERK inhibitor decreased in 32% while JNK inhibitor produced a 23% decrement in Hsp70 production (Figure 7).

Discussion

The present study shows that JNK, p38, and ERK were phosphorylated as a result of CdCl₂ treatment in a time-dependent manner in HepG2 cells. These three signal cascades lead to the activation of AP-1, which in turn confers Hsp70 induction. Only activation of ERK and JNK participate in Hsp70 production. Hung et al. (1998) demonstrated a differential activation of ERK and p38 upon Cd treatment in 9L rat brain tumour cells. Both of these two signal cascades lead to the phosphorylation and activation of HSF1, which in turn confers Hsp70 induction upon treatment with CdCl₂. Under low cadmium concentration (60 μ M), ERK was activated and then HSF1 was phosphorylated. On the other hand, p38 was activated and responsible for phosphorylation of HSF1 in

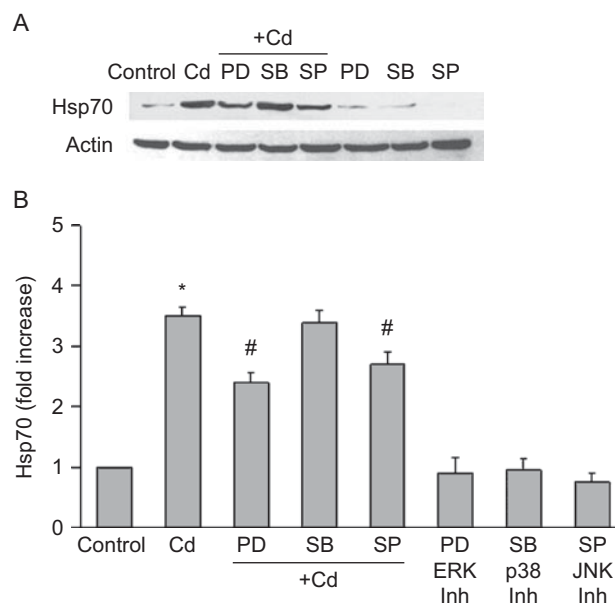


Figure 7. Effect of MAPK inhibition on cadmium-induced heat shock protein 70 expression in HepG2 cells. The cells were pre-treated with 20 μ M SP600125, PD98059, or SB203580 and then exposed to 5 μ M CdCl₂ for 4 h. The total protein was extracted and prepared for Western blot. (A) Representative Western blot of Hsp70 and actin. (B) Densitometric analysis of Hsp70 expression. The results are expressed as fold increased compared with control cells. Each bar represents the mean \pm SE of at least three independent experiments. * Significantly different from control ($p < 0.05$). # Significantly different from CdCl₂ alone treated cells ($p < 0.05$).

cells treated with a high concentration (100 μ M) of Cd. Both ERK and p38 were phosphorylated by 80 μ M CdCl₂.

Treatment of non-small cell lung carcinoma cell line CL3 with high doses (> 80 μ M) of cadmium induced activation of ERK, JNK, and p38 kinases, while low dose of Cd caused inhibition of ERK and had no effect on p38 activity, producing convergent signals transiently inhibiting cell growth (Chuang et al. 2000).

Huang et al. (2001) reported that exposure of JB6 cells to cadmium induced significant activation of AP-1 and also induced activation of ERK, p38, and JNK. The induction of AP-1 activity by Cd appears to involve activation of ERKs, since the induction of AP-1 activity by cadmium was blocked when cells were pre-treated with the ERK inhibitor PD98059.

Sugisawa et al. (2004) reported that JNK, p38, and ERK were phosphorylated by CdCl₂ exposure in a time- (1–9 h) and dose- (1–20 μ M) dependent manner in NIH3T3 cells. Treatment with a macrocyclic nonaketide compound, LL-Z1640-2, suppressed Cd-induced activation of JNK/p38 pathways and expression of Hsp70 family genes.

Urani et al. (2005) showed that Hsp70 was induced at high non-cytotoxic concentrations (5, 10 μ M) probably as a consequence of proteotoxicity, but its over-expression by a sub-lethal heat shock was not able to protect HepG2 cells from Cd cytotoxic concentrations (20, 50, 100, μ M). This research group reported that 72 h exposure of Cd induced high levels of MT that probably confer an acquired tolerance to the stress and protection against HepG2 cells injury, as

demonstrated by low cytotoxicity values (Urani et al. 2007). On the contrary, the unchanged pattern of Hsp70 expression suggests that this protective mechanism, unlike other members of the family, is less involved during CdCl₂ prolonged exposure. Kim et al. (2005) reported that MDA231 cells induced Hsp70 expression against arsenic trioxide exposure that protects cells from oxidative injury and apoptotic cell death, by means of JNK activity. SP600125 and dominant-negative SEK suppressed Hsp70 promoter-driven reporter gene expression, suggesting that JNK would be preferentially associated with the protective heat shock response against arsenic trioxide stress.

Nishitai and Matsuoka (2008) examined the effects of CdCl₂ treatment on MAPK phosphorylation and Hsp70 expression in mouse embryonic stem (ES) cells lacking the *sek1* gene, the *mkk7* gene, or both. Their data show that both SEK1 and MKK7 are required for JNK phosphorylation, whereas their role in p38 and ERK phosphorylation could overlap with that of another kinase. Transfection with siRNA specific for JNK1, JNK2, p38, ERK1, or ERK2 suppressed CdCl₂-induced Hsp70 expression. In contrast, silencing of p38 resulted in further accumulation of Hsp70 protein. These results suggest that Hsp70 expression is up-regulated by SEK1 and down-regulated by MKK7 through distinct MAPK isoforms in mouse ES cells treated with CdCl₂. Valbonesi et al. (2008), working with a trophoblast cell line HTR-8/SVneo exposed CdCl₂, reported that the metal triggered MAPK activation in a dose- and time-dependent manner. The temporal effects of cell exposure to 30 μM Cd, concentration in which cells decrease 30% viability, were evaluated in the range from 1–8 h. Phosphorylation of ERK and JNK were significantly triggered at 1 h of incubation, while phosphorylation of p38 increased significantly only after 8 h. The study did not determine MAPK's activation at early times. Cd also potently stimulated Hsp70 expression. A significant effect was observed after 4 h treatment. This work did not evaluate MAPK's participation in Hsp70 production. Chen et al. (2008) provide evidence that Cd (10 and 20 μM, 24 h) induced apoptosis of neuronal cells in part by activation of ERK and JNK, although Cd-induced ROS generation results in activation of JNK, ERK, and p38 MAPK. Leal et al. (2007) reported the action of cadmium (1–50 μM) in primary adrenal chromaffin cells. Only ERK and p38 were stimulated by cadmium. Additionally, Hsp27 is highly phosphorylated in response to the metal exposure, due to p38 activation.

It is clear that Cd induces a differential response depending on cell type origin, Cd concentration, and time of incubation, and this issue could be attributed to the primary signal transduction mechanism that is activated preferentially in each cell type. Under this context we recently published that NADPH oxidase is primary activated as a response of Cd treatment in HepG2 cells at early time points, triggering a ROS mediated signal that leads to the activation of Stat3 (Souza et al. 2009), by a mechanism driven, in part, by Erk. Our data suggest that this Cd-induced early effect mediated by MAPK is involved in the induction of an adaptation and survival response against

Cd toxicity. In this context, Thijssen et al. (2007) reported that Cd triggers a biphasic oxidative stress response in mice kidneys that was characterized by a decrement in anti-apoptotic and antioxidants proteins at early time points, confirming a stress effect induced by Cd, but after 23 weeks of treatment mice kidneys showed an increment in catalase, glutathione peroxidase, and heme oxygenase, together with NADPH oxidase, suggesting a clear adaptation and survival response to deal with Cd noxious effects.

In conclusion, we have identified that cadmium activates the MAPK pathway in HepG2 cells, a useful *in vitro* model for cadmium toxicity studies. ERK, p38, and JNK are involved in AP-1 induction as ERK inhibition decreased 74%, p38 inhibition decreased 83%, and JNK 70% AP-1 activation in HepG2 cells. Hsp70 is engaged in cell protection from Cd toxicity and it is produced by HepG2 cells after 3 h Cd treatment. Our results show that only ERK and JNK are involved in Hsp70 production in the cell model used. It is important to investigate the molecular events involved in high viability cadmium concentration exposure prior to the Cd-induced cellular toxicity and damage in HepG2 cells because the initial cadmium accumulation and toxicity is the liver.

Acknowledgements

This work was partially funded by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT 39618-M, CONACYT 137896 (Ma. del Carmen Escobar Villanueva) and Secretaría de Educación Pública (PIFI2006-35-129-346/CA 142006-35-40).

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Bhattacharyya MH. 2009. Cadmium osteotoxicity in experimental animals: mechanisms and relationship to human exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 283(3): 258–265.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Bucio L, Souza V, Albores A, Chávez E, Gutiérrez-Ruiz MC. 2005. Cadmium and Mercury toxicity in the WRL-68 cells. *Toxicology* 102:285–299.
- Chang L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 410:37–40.
- Chen L, Liu L, Huang S. 2008. Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5. *Free Radic Biol. Med* 45:1035–1044.
- Chuang SM, Wang IC, Yang JL. 2000. Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium. *Carcinogenesis* 21:1423–1432.
- Dehn PF, White CM, Connors DE, Shipkey G, Cumbo TA. 2004. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line as an *in vitro* model for cadmium toxicity studies. *In Vitro Cell Dev Biol* 40:172–182.
- Diep PT, Denizeau F, Jumarie C. 2005. Kinetics of the early subcellular distribution of cadmium in rat hepatocytes. *BioMetals* 18:255–267.
- Gomez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. 2008. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 283:14581–14589.

- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117:5965-5973.
- Hirano S, Sun X, DeGuzman CA, Ransom RF, McLeish KR, Smoyer WE, Shelden EA, Welsh MJ, Benndorf R. 2005. p38 MAPK/HSP25 signaling mediates cadmium-induced contraction of mesangial cells and renal glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F1133-F1143.
- Hsiao CJ, Stapleton SR. 2004. Characterization of Cd-induced molecular events prior to cellular damage in primary rat hepatocytes in culture: activation of the stress activated signal protein JNK and transcription factor AP-1. *J Biochem Mol Toxicol* 18:133-142.
- Huang C, Zhang Q, Li J, Shi X, Castranova V, Ju G, Costa M, Dong Z. 2001. Involvement of Erks activation in cadmium-induced AP-1 transactivation in vitro and in vivo. *Mol Cell Biochem* 222:141-147.
- Hung JJ, Cheng TJ, Lai YK, Chang MD. 1998. Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinases confers cadmium-induced Hsp70 expression in 9L rat brain tumor cells. *J Biol Chem* 273:31924-31931.
- Jeong SH, Habeebu SS, Klaassen CD. 2000. Cadmium decreases gap junctional intercellular communication in mouse liver. *Toxicol Sci* 57:156-166.
- Karin M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270:16483-16486.
- Kim YH, Park EJ, Han ST, Park JW, Kwon TK. 2005. Arsenic trioxide induces Hsp70 expression via reactive oxygen species and JNK pathway in MDA231 cells. *Life Sci* 77:2783-2793.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227:680-685.
- Leal RB, Posser T, Rigon AP, Oliveira CS, Goncalves CA, Gelain DP, Dunkley PR. 2007. Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology* 234:34-43.
- Lee JS, Zhang MH, Yun EK, Geum D, Kim K, Kim TH, Lim YS, Seo JS. 2005. Heat shock protein 27 interacts with vimentin and prevents insolubilization of vimentin subunits induced by cadmium. *Exp Mol Med* 37:427-435.
- Lemarie A, Lagadic-Gossmann D, Morzadec C, Allain N, Fardel O, Vernhet L. 2004. Cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver Hep3B cells: role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor. *Free Radic Biol Med* 36:1517-1531.
- López P, Souza V, Bucio L, Hernández E, Gutiérrez-Ruiz MC. 1999. DNA damage and recovery produced by Cadmium in a human fetal cell line. *Mutat Res* 439:301-306.
- Misra UK, Gawdi G, Akabani G, Pizzo SV. 2002. Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: the role of intracellular calcium and signal transduction mechanism. *Cell Signal* 14:327-340.
- Mukhopadhyay S, Mukherjee S, Smith M, Das SK. 2008. Activation of MAPK/AP-1 signaling pathway in lung injury induced by 2-chloroethyl ethyl sulfide, a mustard gas analog. *Toxicol Lett* 181:112-117.
- Nishitai G, Matsuoka M. 2008. Differential regulation of HSP70 expression by the JNK kinases SEK1 and MKK7 in mouse embryonic stem cells treated with cadmium. *J Cell Biochem* 104:1771-1780.
- Pinot F, Kreps SE, Bachelet M, Hainaut P, Bakonyi M, Polla BS. 2000. Cadmium in the environment: sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. *Rev Environ Health* 15:299-323.
- Souza V, Bucio L, Chávez E, Gutiérrez Ruiz MC. 1996. Effect of cadmium on calcium transport in human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology* 112:97-104.
- Souza V, Bucio L, Gutiérrez-Ruiz MC. 1997. Cadmium uptake by a human hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology* 120:215-220.
- Souza V, Escobar MC, Bucio L, Hernández E, Gómez-Quiroz LE, Gutiérrez Ruiz MC. 2009. NADPH oxidase and ERK 1/2 are involved in cadmium induced-STAT3 activation in HepG2 cells. *Toxicol Lett* 187:180-186.
- Souza V, Escobar MC, Gómez-Quiroz L, Bucio L, Hernández E, Chávez Cossio E, Gutiérrez-Ruiz MC. 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.
- Sugisawa N, Matsuoka M, Okuno T, Igisu H. 2004. Suppression of cadmium-induced JNK/p38 activation and HSP70 family gene expression by LL-Z1640-2 in NIH3T3 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 196:206-214.
- Thijssen S, Cuypers A, Maringwa J, Smeets K, Horemans N, Lambrechts I, Van Kerkhove E. 2007. Low cadmium exposure triggers a biphasic oxidative stress response in mice kidney. *Toxicology* 236:29-41.
- Urani C, Melchiorretto P, Canevali C, Crosta GF. 2005. Cytotoxicity and induction of protective mechanisms in HepG2 cells exposed to cadmium. *Toxicol in Vitro* 19:887-892.
- Urani C, Melchiorretto P, Canevali C, Morazzoni F, Gribaldo L. 2007. Metallothionein and Hsp70 expression in HepG2 cells after prolonged cadmium exposure. *Toxicol in Vitro* 21:314-319.
- Valbonesi P, Ricci L, Franzellitti S, Biondi C, Fabbri E. 2008. Effects of cadmium on MAPK signalling pathways and HSP70 expression in a human trophoblast cell line. *Placenta* 29:725-733.
- Waalkes MP. 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res* 533:107-120.
- Wagner EF. 2001. AP-1—Introductory remarks. *Oncogene* 20:2334-2335.