

T  
351

84820

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



**ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE CITOCINAS COMO MEDIADORES  
DE DAÑO PRODUCIDO POR EL CADMIO EN CÉLULAS HepG2 Y  
SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**P R E S E N T A**

**VERÓNICA SOUZA ARROYO**

Directora de Tesis: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz  
Asesora: Dra. Patricia Rojas Castañeda  
Asesor: Dr. Edmundo Chávez Cossío

México, D.F. 2004

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

---

El jurado designado por las  
Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud  
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Verónica Souza Arroyo

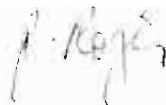
El día 27 de Febrero del año de 2004

Comité Tutorial:

Tutora: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz



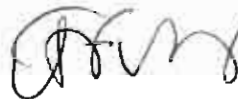
Asesora: Dra. Patricia Rojas Castañeda



Asesor: Dr. Edmundo Chávez Cossío



Sinodal: Dra. Teresa Imelda Fortoul Van Der Goes



Sinodal: Dra. Laura Colín Barenque



## DEDICATORIAS

A la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz con todo mi agradecimiento y admiración por su apoyo brindado y comprensión durante todos estos años de formación profesional.

A mis asesores:

Dra. Patricia Rojas Castañeda, Dr. Edmundo Chávez Cossío, Dra. Teresa Imelda Fortoul Van Der Goes y a la Dra. Laura Colín Barenque por todas sus observaciones y sugerencias importantes en el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros y amigos

Leticia Bucio, Elizabeth Hernández, Carmen Escobar, Luis Enrique Gómez, Blanca Farfán, Mina Konigsberg, Norma Guerrero, Mary Carmen Hernández y Judith Morales con mucho cariño.

A la memoria de mi Madre:

Ana María

y de mi hermana:

Ana María

A mis hermanas:

Sara

Sandra y

Claudia que siempre me apoyaron y confiaron en mí.

Y sobre todo a mi hija:

Ana Laura por toda su paciencia brindada.

## INDICE

ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN EN ESPAÑOL.....	II
RESUMEN DEN INGLÉS.....	III
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades del cadmio.....	1
1.2 Toxicidad producida por el cadmio.....	4
1.3 Estrés oxidativo y daño celular.....	6
1.4 Citocinas como mediadores intracelulares.....	9
1.5 Factores de transcripción NF-κB y AP-1.....	12
1.6 Proteína de choque térmico.....	14
1.7 Modelo celular.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	18
OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo General.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
HIPÓTESIS.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
3.1 Cultivo celular.....	21
3.2 Citotoxicidad celular.....	21
3.3 Determinación de la producción de las TBARS.....	22
3.4 Contenido de glutatión.....	23
3.5 Extracción del ARN total.....	24
3.6 Determinación del ARNm por RT-PCR.....	25
3.7 Extracción de la proteína nuclear.....	27
3.8 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA).....	28
3.9 Extracción de la proteína total.....	28
3.10 Análisis por Western blot.....	29
3.11 Determinación del contenido de proteína.....	30
3.12 Análisis estadístico.....	31
RESULTADOS.....	32
4.1 Viabilidad de las células HepG2 expuestas a CdCl <sub>2</sub> .....	32
4.2 Determinación de la producción de las TBARS.....	32
4.3 Contenido de glutatión.....	34
4.4 Efecto del cadmio en la expresión del TNF-α.....	36

---

4.5	Expresión de la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y de la IL-8 por el CdCl <sub>2</sub> .....	36
4.6	Expresión de la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y de la IL-8 por el TNF- $\alpha$ .....	42
4.7	Efecto del cadmio en la producción de la Hsp70.....	42
4.8	Efecto del cadmio en la activación del NF- $\kappa$ B y la AP-1.....	45
4.9	Efecto de la concentración de CdCl <sub>2</sub> en la AP-1.....	47
4.10	Efecto del TNF- $\alpha$ y del estrés oxidativo en la AP-1.....	47
DISCUSIÓN.....		50
5.1	Viabilidad de las células HepG2 expuestas a CdCl <sub>2</sub> .....	50
5.2	Efecto del cadmio en las TBARS y en el contenido de GSH.....	51
5.3	Expresión del TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y de la IL-8.por el CdCl <sub>2</sub> .....	52
5.4	Expresión de la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y de la IL-8 por el TNF- $\alpha$ .....	55
5.5	Efecto del cadmio en la producción de la Hsp70.....	56
5.6	Efecto del cadmio en la activación del NF- $\kappa$ B y la AP-1.....	57
5.7	Efecto del TNF- $\alpha$ y el estrés oxidativo en la AP-1.....	59
CONCLUSIÓN.....		62
BIBLIOGRAFÍA .....		65



## ABREVIATURAS

Antirh-TNF- $\alpha$	Anticuerpo recombinante humano para TNF- $\alpha$
AP-1	Proteína activadora 1
DMSA	Acido dimercaptosuccínico
DTNB	5,5'-ditiobis-2 ácido nitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
DEPC	Dietil pirocarbonato
EDTA	Acido etilendiamino tetra acético
ERO	Especie reactiva de oxígeno
GSH	Glutación reducido
Hsp 70	Proteína de estrés 70
IL	Interleucina
JNK	c-Jun cinasa amino terminal
MDA	Malondialdehido
MT	Metalotioneína
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil
NAC	N-acetil cisteína
NaF	Fluoruro de sodio
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
OH $^{\bullet}$	Radical hidroxilo
O $_2^{\bullet -}$	Radica anión superóxido

PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
RT-PCT	Transcriptasa reversa. Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecíl sulfato de sodio
TBARS	Substancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
U	Unidades

## RESUMEN

El cadmio se considera como uno de los xenobióticos relacionado con la inflamación. Este estudio fue realizado para examinar los efectos del cadmio en la expresión de la IL-1 $\beta$ , del TNF- $\alpha$ , la IL-6 y la IL-8 por RT-PCR, en la producción de la Hsp70 por Western-Blot y en la activación de los factores nucleares AP-1 y el NF- $\kappa$ B por el ensayo de EMSA o de retardo en las células HepG2. También se evaluó la participación del TNF- $\alpha$  y del estrés oxidativo en la activación de la AP-1. Las células HepG2 se expusieron a 1, 5 ó 10  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> durante 0.5, 1, 3 o 6 h de incubación y los ARN fueron aislados. El TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  presentaron una respuesta máxima en la primera hora de tratamiento, mientras que la IL-6 y la IL-8 fue a las 3 h. La producción de la Hsp70 se incrementó en las células HepG2 después de 3 h de tratamiento con CdCl<sub>2</sub>. La activación del NF- $\kappa$ B no se detectó, mientras que la AP-1 se incrementó 24 veces más con 5  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>. Las células HepG2 se pre-trataron con un anticuerpo anti-rhTNF- $\alpha$  o con 1 mM de la NAC durante una hora antes del tratamiento con CdCl<sub>2</sub>. El anti-rhTNF- $\alpha$  disminuyó la activación de la AP-1 en un 67%, mientras que la NAC en un 47.5 %. Estos resultados indican que el cadmio induce al TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  y que probablemente la activación del factor nuclear AP-1 participe en la inducción de la IL-6 y la IL-8. Todo esto parece indicar que hay varios factores implicados en la activación de la AP-1 inducido por el cadmio y que la producción de la Hsp70 regule de manera negativa al NF- $\kappa$ B como respuesta celular al tratamiento con CdCl<sub>2</sub>.

## ABSTRACT

Cadmium has been regarded as one of the inflammation-related xenobiotics. This study was undertaken to examine the effects of low cadmium concentrations in HepG2 cells in the IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 expression, production of Hsp70 and the activation of nuclear factors AP-1 and NF- $\kappa$ B. Also, the participation of TNF- $\alpha$  and oxidative stress in AP-1 activation was evaluated. RNA was isolated from HepG2 cells after 0.5, 1, 3 or 6 h incubation with 1, 5 or 10  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  presented a maximum response after 1 h treatment, while IL-6 and IL-8 maximum response was after 3 h treatment. The Hsp70, determined by Western blot, was constitutively produced, and it increased after 3 h Cd treatment. NF- $\kappa$ B activation, determined by EMSA, was not increased as a result of Cd treatment. DNA binding of AP-1 was detected and increased, with time up to 4 h with an increment of 24 times control value with 5 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>. The HepG2 cells were pretreated with anti-rhTNF- $\alpha$  antibody or 1 mM N-acetyl cysteine (NAC) one hour before Cd treatment. Anti-rhTNF- $\alpha$  treatment reduced 67% AP-1 activation, while NAC 47.5%. These data indicate that, Cd induced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , that probably, activate AP-1 transcription factor and IL-6 and IL-8 were induced. Anti-rhTNF- $\alpha$  and NAC partially inhibited AP-1 activation. All imply that, a number of factors participate in AP-1 cadmium-induced activation. The Hsp70 is produced by the HepG2 cells after cadmium treatment, and probably has a role in the non-participation of NF- $\kappa$ B in the cellular response.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 GENERALIDADES DEL CADMIO

El cadmio (Cd) es un metal pesado que está presente en el ambiente como una sal inorgánica, como óxido de cadmio (CdO), cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>) o sulfato de cadmio (CdSO<sub>4</sub>) (ATSDR 1999). Se estima que aproximadamente de 25,000 a 30,000 toneladas de cadmio son liberadas al ambiente por año debido a las aplicaciones industriales que se le ha dado (fabricación de baterías, pinturas, plásticos, fertilizantes, etc). Debido a esto se incrementa el riesgo tanto en humanos como de otros mamíferos a exponerse a este metal. La principal fuente de exposición al cadmio para la población en general es la ingesta de alimentos contaminados, donde aproximadamente el 70% del cadmio es absorbido por el organismo, porcentaje que se modifica en personas fumadoras. Cada cigarro puede contener de 1-2  $\mu$ moles de cadmio y del 40-60% del cadmio que se inhala pasa a través del epitelio pulmonar a la circulación sistémica (ATSDR 1999). En humanos y otros mamíferos, el cadmio afecta varios órganos y tejidos, incluyendo al riñón, el hígado, el pulmón, el páncreas, la placenta y los huesos (Diamond y Zalups 1998). Sin embargo, el riñón y el hígado son los principales órganos en donde los efectos tóxicos del cadmio se expresan. La vida media del metal es de entre 17-30 años en el humano (Goyer 1997). El cadmio puede inducir tumores en el pulmón y en los testículos (Beyersmann y Hechtenberg 1997). Basado en estudios epidemiológicos y toxicológicos en humanos y animales experimentales, la Agencia Internacional para

la Investigación del Cáncer (IARC), ha clasificado al cadmio como un carcinógeno de categoría I (IARC, 1993) y como una sustancia de alto riesgo por la Agencia de Protección Ambiental (Fay y Mumtaz, 1996). Recientes descubrimientos indican que los efectos carcinogénicos del cadmio están relacionados con la activación de protooncogenes (Joseph y col. 2002). En el hombre, se estima que la absorción del cadmio por el tracto gastrointestinal es de alrededor de 8% del total ingerido. Sin embargo, este valor puede variar por algunos factores nutricionales y fisiopatológicos. Así, en personas con bajas reservas de hierro, la proporción de cadmio absorbido es mayor. Por otra parte, se ha observado que en animales con una dieta baja en calcio y proteínas aumenta la absorción de cadmio. En general, la absorción de cadmio en el intestino se produce en dos etapas. En la primera, las células de la mucosa internalizan el cadmio presente en el lumen intestinal y en la segunda, una parte del cadmio atraviesa la membrana basolateral de los enterocitos para pasar a la circulación sanguínea (Anderson y col. 1994). Una vez absorbido, el cadmio pasa a la circulación sanguínea y es transportado por la albúmina a los tejidos. La albúmina se encuentra en altas concentraciones en el plasma (3-5 g/dl) y contiene un grupo sulfhidrilo reducido donde se une el metal (DelRaso y col 2003). De esta forma se almacena en el hígado y en los riñones (Elsenhans y col. 1997). Sólo entre estos dos órganos se acumula del 40 al 80% del cadmio presente en el organismo. Otras moléculas que sirven como transportadores del cadmio en la sangre son de bajo peso molecular y contienen grupos tioles como la cisteína, el glutatión (GSH), las metalotioneínas (MTs), la ferritina, las  $\gamma$ -globulinas y la

transferrina. En nuestro laboratorio se determinó que la entrada y la acumulación de cadmio en células hepáticas fueron por procesos sensibles a temperatura, probablemente canales de calcio o acarreadores que involucran interacción con grupos sulfhidrilo (Souza y col. 1997). Bajo condiciones fisiológicas el cadmio se une a los grupos sulfhidrilo con mayor afinidad que a los grupos fosfato, cloruro, carboxilo o amino (Goering y Klaassen 1997). La importancia de la interacción del cadmio con los grupos sulfhidrilo es demostrada por las MTs y el GSH que contienen residuos de cisteína en su estructura. Las MTs son una familia de proteínas de bajo peso molecular (6-7 kDa) constituida por cuatro isoformas que son la: MT-I, la MT-II, la MT-III y la MT-IV. La MT-I y la MT-II son expresadas en el hígado mientras que la MT-III es expresada en cerebro y la MT-IV es expresada en epitelio estratificado (Quaife y col. 1994). Se conoce que el Cd es el mejor inductor de la MT, seguido del Zn, de la Ag, del Hg, del Bi y del Cu, mientras que el Ni, el Ca, el Pb y el As son pobres inductores (Beyersmann y Hechtenberg 1997). La región promotora de la MT es muy compleja, contiene sitios de reconocimiento para elementos que responden a glucocorticoides, a metales, a antioxidantes (Dalton y col. 1994) y a factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1), la proteína específica 1 (Sp1) (Samson y Gedamu 1998) y el factor de transcripción de metalotioneína (MTF-1) (Palmiter 1994). Las MTs tienen un papel muy importante en la homeostasis de los metales esenciales como el Zn, el Cu y en la protección contra el daño que producen las ERO (Thornalley y Vasak 1985) y la toxicidad producida por el cadmio (Klaassen y Liu 1998; Klaassen y col. 1999). El cadmio en el hígado se une a la metalotioneína y este complejo MT-Cd formado es transportado al riñón donde se considera que

induce daño a la nefrona (Diamond y Zalups 1998). El cadmio es eliminado del organismo muy lentamente con la orina, las heces y sólo pequeñas cantidades del metal se llegan a eliminar con el sudor, la exfoliación epitelial y el pelo. El grupo de Ottenwalder y Simon (1987), demostró que en rats tratadas con NAC (100 mg/Kg) durante 6 días, presentaron un incremento de cuatro veces en la excreción urinaria del cadmio. Por otro lado, dosis repetidas de agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetra acético (EDTA) y el ácido dimercaptosuccínico (DMSA) después de la exposición al cadmio causa un incremento en la eliminación de este metal y una disminución en la concentración en sangre y en el hígado (Klaassen y col. 1984; Tandon y col. 2003).

## **1.2 TOXICIDAD PRODUCIDA POR EL CADMIO**

El daño celular inducido por el cadmio depende de diferentes factores incluyendo la dosis, la forma química, las propiedades fisicoquímicas, la ruta de exposición y la duración de la exposición. Cuando se ingieren alimentos o bebidas con altas concentraciones de cadmio se puede presentar irritación estomacal, náusea, vómito y diarrea, dolor abdominal y muscular (ATSDR 1999). Los efectos de la intoxicación por inhalación crónica (exposición prolongada a humos o polvos del metal) son más graves. En este caso, el cadmio puede provocar enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva, fibrosis, neumonitis química aguda y edema pulmonar. Está comprobado que el daño que provoca el cadmio en los fumadores es mayor y que la concentración de cadmio en los pulmones es más elevada en estos individuos. Las principales alteraciones sistémicas debidas a la absorción de cadmio consisten en



daño renal con proteinuria, anemia y aumento en la velocidad de sedimentación en los eritrocitos. De estos daños la proteinuria es el más típico, caracterizada por la  $\alpha, \beta, \gamma$ -globulinuria, albuminuria e inmunoglobulinuria y en etapas avanzadas puede haber un aumento en la excreción de aminoácidos, glucosa, calcio y fosfatos en la orina, lo cual puede causar la formación de cálculos renales (Diamond y Zalups 1998). La exposición crónica al cadmio causa desórdenes en el sistema nervioso central con cambios en la actividad motora (Antonio y col. 2002) y alteraciones en la neurotransmisión sináptica (Minami y col. 2001).

A nivel celular, se conoce que el cadmio causa la liberación de enzimas citosólicas como la aspartato amino transferasa, la alanino amino transferasa y la lactato deshidrogenasa indicando un daño en la membrana plasmática (Yoshida y col. 1993). También produce lipoperoxidación determinado por la producción de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) en donde los ácidos grasos poliinsaturados son peroxidados por la generación de radicales libres, dañando la membrana celular y provocando un aumento en la permeabilidad. Hay evidencia de que el cadmio inactiva enzimas importantes para la función celular, ya sea por unirse a los grupos tioles presentes en los sitios activos de las enzimas o por desplazamiento de metales esenciales por competir por los sitios de unión (Goyer 1997). Otros efectos del cadmio son: incremento en el calcio intracelular, inhibición en la producción de proteínas por el hígado y un incremento en la síntesis de la MT, a la cual se le ha dado un papel muy importante en la acumulación del metal en los tejidos.

### 1.3 ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO CELULAR

Muchos estímulos, incluyendo a los agentes químicos y a las citocinas, pueden generar altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO), los cuales pueden alterar el estado redox normal de la célula y por lo tanto entrar en un proceso de estrés oxidativo. Un balance perfecto de los sistemas que involucran la producción y eliminación de las ERO, es necesario para mantener la homeostasis celular. Los tres sistemas redox más importantes dentro de la células son: NADPH/NADP<sup>+</sup>, tioredoxina (TRX<sub>red</sub>/TRX<sub>ox</sub>) y glutatión (GSH/GSSG) (Filomeni y col. 2002). Entre éstos, el más importante es el GSH, ya que la concentración intracelular es de 500 a 1000 veces más grande que TRX y NADPH; así que cambios en el cociente reducido/oxidado del GSH refleja alteraciones en el estado redox de la célula (Filomeni y col. 2002). El glutatión es un tripéptido de bajo peso molecular y está presente en su forma reducida (GSH). En su estado oxidado (GSSG), es catalíticamente reducido a GSH por la glutatión reductasa dependiente de NADPH. Entre las funciones del GSH, están el ser un modulador de la actividad enzimática dependiente de tioles, participar en el metabolismo de agentes xenobióticos, en regular el ciclo celular y la expresión de genes (Arrigo 1999). Aunque el GSH no reacciona directamente con los hidroperóxidos, éste es usado como sustrato por la glutatión peroxidasa (GSHPx), una enzima que contiene selenio y que está involucrada en la reducción de muchos peróxidos, especialmente los formados en las membranas, así como en la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dickinson y Froman 2002). El GSH forma conjugados con una gran variedad de compuestos electrofílicos durante el metabolismo normal de la célula o con los xenobióticos (Eaton y Bammler 1999).

Esta conjugación puede resultar en la disminución del GSH y ha sido utilizado para estudiar el papel del GSH en la defensa antioxidante.

Existen evidencias de que las ERO tienen un papel importante en la regulación de muchas vías de señalización en la célula. La mitocondria es la principal fuente de la producción de estas especies. Entre ellas están el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y el peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ , que es generado básicamente por dos mecanismos: la dismutación del radical anión superóxido (Fridovich 1997) y por acción de ciertas oxidasas (Smith-Mungo y Kagan 1998). Esta molécula es más estable, menos reactiva y puede actuar como un segundo mensajero intracelular (Rojkind y col. 2002). Sin embargo, en presencia de  $Fe^{+2}$  o  $Cu^{+2}$ , el  $H_2O_2$  lleva a la formación de otro radical que es el hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) vía la reacción de Fenton. Este radical es muy inestable y altamente reactivo que induce lipoperoxidación, generando múltiples aldehídos muy reactivos. Se sabe que a bajas concentraciones las ERO son productos naturales de varias reacciones de transferencia de electrones y son toleradas por las células, mientras que a altas concentraciones de las ERO inducen estrés oxidativo y causan daño celular por peroxidación de los lípidos de las membranas, oxidación de las proteínas y ácidos nucleicos. También el exceso de estas ERO incrementa la permeabilidad de la membrana mitocondrial y daña la cadena respiratoria. Esto ocasiona una liberación del citocromo c de la mitocondria, y la liberación del GSH a través de transportadores específicos y esto inicia eventos de apoptosis (Ghibelli y col. 1998). Sin embargo, se conoce una gran variedad de moléculas antioxidantes y enzimas que protegen a las células de los efectos de las

ERO. Entre estos agentes tenemos aquellos que pueden metabolizar a los radicales libres y son el GSH, la superóxido dismutasa (MnSOD), la glutatión peroxidasa y la catalasa (Mates 2000); aquéllos que pueden inhibir las reacciones que producen radicales libres o que se unen con los propios radicales como el ascorbato, y la vitamina E (Young y Woodside 2001) y aquéllos que se unen a metales de transición para prevenir que interaccionen éstos con el  $H_2O_2$  como la MT, la ferritina y la transferrina (Young y Woodside 2001). De estos factores, el GSH es el que está principalmente en la célula en su forma reducida y la modificación en el cociente GSH/GSSG es un indicador de estrés oxidativo. Específicamente una disminución en este cociente, ya sea por una disminución en los niveles de GSH o un incremento en los niveles de GSSG. Así, las variaciones en el cociente GSH/GSSG tienen efecto en la célula, activando o inhibiendo vías de trasducción de señales (Schafer y Buettner 2001). Sin embargo, en respuesta al estrés oxidativo, la célula mantiene el estado redox del glutatión a través de diferentes mecanismos, por ejemplo la actividad de la glutatión reductasa puede ser incrementada o el exceso del GSSG generado puede ser eliminado o la enzima  $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetasa se activa para sintetizar nuevo GSH ( Filomeni y col. 2002).

Aunque el cadmio por sí solo no genera radicales libres, si se ha encontrado un incremento en la producción de las ERO como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y lipoperoxidación seguido de una exposición al metal (Koizumi y col. 1996).

#### 1.4 CITOCINAS COMO MEDIADORES INTRACELULARES

Las citocinas se conocen como mediadores intracelulares que son por todos los tipos celulares. Estas proteínas pueden ser clasificadas de acuerdo con su estructura o función en interleucinas, factores de crecimiento, interferones, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y quimocinas (Heinrich y col. 1998). Las citocinas están relacionadas con actividades inflamatorias, reacciones inmunológicas, daño o reparación de tejidos (Heinrich y col. 1998). Sin embargo, éstas juegan un papel muy importante en la modulación de las funciones fisiológicas y bioquímicas de la célula. El hígado es un órgano importante en el metabolismo de las citocinas ya que tienen la capacidad de producirlas y removerlas (Jaeschke y col. 2002). Ahora se sabe que todas las células residentes en el hígado como las células de Kupffer, las endoteliales, las células estelares (Ito) y los hepatocitos son capaces de producir y responder a las diversas citocinas. La respuesta inflamatoria consiste de la liberación secuencial de mediadores y de un reclutamiento de leucocitos circulantes. La activación de las células de Kupffer es el primer evento, éstas son las iniciadoras de la liberación de mediadores como las citocinas, quimocinas y radicales libres. La respuesta temprana de las citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  y la IL-1 es activar a otras células del hígado e inducir la expresión de moléculas de adhesión, tal como la molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1) en la superficie del endotelio (Simpson y col 1997). Esta activación induce la expresión de quimocinas como la IL-8, la cual atrae a las células inflamatorias circulantes y amplifica la respuesta inflamatoria. Las citocinas tienen una función fisiológica, sin embargo, en procesos

patológicos como toxicidad por cadmio, la concentración de estas citocinas se ve alterada ocasionando un desbalance entre ellas, ya que muchas de ellas regulan la secreción de otras, como por ejemplo el TNF- $\alpha$  regula la inducción de la IL-1 y la IL-6 (Manna y Aggarwal 1998) al disminuir el número de receptores en la célula. La función de las citocinas es mediada por su unión a receptores específicos expresados en la superficie de las células blanco (Foxwell y col. 1992) que estimulan un sistema de señalización complejo que lleva a efectos biológicos en la célula blanco. El TNF- $\alpha$  induce una gran variedad de segundos mensajeros incluyendo el NF- $\kappa$ B, proteínas cinasas activadas por estrés, ceramida/esfingomiolina, ERO (Garg y Aggarwal 2002) y fosfoinositol. Además el TNF- $\alpha$  tiene dos efectos celulares importantes que son: la iniciación de la muerte celular (necrosis o apoptosis) y la activación de factores de transcripción que llevan a la expresión de genes relacionados con la sobrevivencia celular (Leong y Karsan 2000). En la muerte celular por necrosis, la integridad de la bicapa lipídica cambia y hay un desbalance osmótico que lleva a un hinchamiento de la célula, seguido de un colapso (Grooten y col. 1993). La apoptosis es una muerte programada, donde la célula participa en su propia destrucción. Esta muerte juega un papel muy importante en la regulación del desarrollo, crecimiento y eliminación de células (Jacobson y col. 1997). Se sabe que la mitocondria es la mejor fuente de formación de las ERO por el TNF- $\alpha$  con una alteración en la permeabilidad de la mitocondria que lleva a la liberación del citocromo c y a la activación de la apoptosis (Higuchi y col. 1998).

La activación de factores de transcripción es el efecto celular más conocido por el TNF- $\alpha$ . Esos factores de transcripción regulan la expresión de genes (Sen y Packer 1996), que son responsables de muchos de los efectos fisiológicos y patológicos del TNF- $\alpha$ . Los principales factores de transcripción activados son el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y la proteína activadora 1 (AP-1) que son sensibles al estrés oxidativo (Gius y col. 1999). El TNF- $\alpha$  ha sido implicado como mediador en la hepatotoxicidad en numerosos sistemas incluyendo tetracloruro de carbono, acetaminofén y cadmio (Dong y col. 1998; Yamano y col. 2000).

La IL-6 es considerada como una interleucina que contribuye al proceso inflamatorio (Yu y col. 2002) así como el mejor mediador de la respuesta de fase aguda. Esta respuesta se caracteriza por una alteración en las concentraciones de diferentes proteínas plasmáticas, como son: la proteína reactiva C (CRP), la amiloide sérica A (SAA), el fibrinogeno, la  $\alpha$ 2 macroglobulina, la albúmina, la fibronectina y la transferrina (Moshage 1997). La IL-6 afecta la síntesis y secreción de las proteínas de fase aguda en hepatocitos primarios, en líneas celulares hepáticas y en animales completos. Además se sabe que la IL-6 utiliza la familia de las Jak (tirosina cinasa) y los factores de transcripción de la familia de STAT (Heinrich y col. 1998) como vía de señalización intracelular.

Entre las quimocinas tenemos a la IL-8 que está formada por dos cisteínas separadas por un aminoácido (CXC). Esta representa una proteína muy estable y media la activación de los neutrófilos y su subsecuente liberación de ERO en respuesta a un daño hepatotóxico.

## 1.5 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NF- $\kappa$ B Y AP-1

Las señales extracelulares, ya sean hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento o citocinas se unen a sus receptores específicos localizados en las membranas plasmáticas y desencadenan en el interior de la célula distintas cascadas de amplificación que terminan en respuestas celulares. Como respuesta, en la expresión de los genes, los elementos que funcionan como mensajeros nucleares son los llamados factores de transcripción. Estas 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 fosfatos a residuos de serina o treonina. La fosforilación es la señal para que los factores de transcripción puedan trasladarse al núcleo de la célula en donde reconocen secuencias específicas localizadas en el ADN. La interacción del factor con la secuencia consenso correspondiente tiene un efecto positivo o negativo sobre la frecuencia de transcripción del gen que regulan (Rigg y Sikora 1997), participando así en la regulación de una gran variedad de procesos celulares como el metabolismo, la proliferación, la diferenciación o la muerte celular.

El NF- $\kappa$ B pertenece a la familia Rel de los factores de transcripción y funciona como un homo o heterodímero, formado por cinco posibles subunidades: p50/105 (NF- $\kappa$ B1), p52/100 (NF- $\kappa$ B2), p65 (Rel A), RelB y c-Rel (Baeuerle y Baltimore 1996). La forma más común del NF- $\kappa$ B consiste del heterodímero p50/p65. El heterodímero permanece en el citosol en forma inactiva unido al inhibidor I $\kappa$ B (Baldwin 1996). La fosforilación del inhibidor I $\kappa$ B en residuos de serina y la subsecuente degradación,



permiten que el NF- $\kappa$ B sea translocado al núcleo y participe en la regulación de numerosos genes, muchos de los cuales están involucrados en las respuestas anti-apoptóticas e inflamatorias (Baeuerle y Baltimore 1996). El NF- $\kappa$ B fue uno de los primeros factores descritos que responden directamente a agentes que inducen estrés oxidativo, como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y el TNF- $\alpha$ . Además hay evidencias de que la activación del NF- $\kappa$ B es inhibida por varios agentes antioxidantes como la N-acetil-L-cisteína (NAC), el 2-mercaptoetanol, el ácido  $\alpha$ -lipoico, el dietil ditiocarbamato, el disulfirán y el  $\alpha$ -tocoferol (Flohe y col. 1997).

El AP-1 es un homodímero o heterodímero formado por las subunidades Jun (c-Jun, JunB y JunD) y Fos (c-Fos, FosB, , Fra1 y Fra2) (Karin y col. 1997). La secuencia reguladora de AP-1 está presente en la región promotora de muchos genes como por ejemplo en el de la colágena, el de la metalotioneína y en el de los genes que codifican para las proteínas Fos y Jun que son las subunidades que constituyen al factor de transcripción AP-1 (Shreiber y col. 1995). Las subunidades Fos y Jun son fosforiladas por cinasas específicas como la JNK (cinasa c-Jun N-terminal) para Jun y la específica de Fos (FRK), de esta forma son transcripcionalmente activas y se traslocan al núcleo donde inician la expresión de una gran variedad de genes entre ellos los de agentes proinflamatorios. La regulación del factor AP-1 es compleja y puede ocurrir por cambios en la transcripción de los genes de jun y fos, por procesos de fosforilación de las proteínas Jun y Fos mediada por cinasas como la proteína cinasa C (PCK) y las cinasas activadas por mitógenos (MAPS) (Karin 1995), las cuales se sabe que son activadas por el TNF- $\alpha$  (Kyriakis 1999). También el factor

AP-1 puede ser regulado por la interacción de éste con otros factores de transcripción que pueden sinergizar o interferir con la activación del factor (Chinenov y Kerppola 2001). Se conoce que el AP-1 también es activado por el  $H_2O_2$  (Karin y Shaulian 2001) y el mecanismo parece ser mediado por la cascada de señalización de la JNK y p38 (Chang y Karin 2001) o por inhibir la actividad de las fosfatasa mediante la oxidación de una cisteína que presenta en su sitio activo y por lo tanto se potencia la activación de las MAPS (Cavigelli y col 1999).

## **1.6 PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO**

El término de proteína de estrés o de choque térmico (Hsps), designa a una clase de proteínas que son inducidas por calor y agentes estresores como el cadmio (Goering y col. 1993) y las ERO (Vayssier y Polla 1998). Estas proteínas son clasificadas de acuerdo a su función y tamaño molecular (15-110k Da) (Kregel 2002). Las Hsps están presentes en el citosol, la mitocondria, el retículo endoplásmico, y en el núcleo (Feder y Hofmann 1999). Estas proteínas funcionan como chaperones; ellas se unen a otras proteínas sensibles y estabilizan su estructura. También participan en la localización, regulación, secreción y degradación de las proteínas. Así mismo, se les han atribuido efectos citoprotectores y están involucradas en la regulación de muchas vías celulares. Entre las Hsps más estudiadas están la familia Hsp70 (Hsp72, Hsp73, Hsp75 y Hsp78) ya que son las más sensibles al cambio de temperatura y las más conservadas. Entre las funciones de las Hsp70 están el mantener la estructura de las proteínas, la translocación de las proteínas a través de las membranas en varios compartimientos celulares, el prevenir la agregación de las

proteínas y la degradación de las proteínas inestables. El gen de la Hsp70 contiene dos elementos regulatorios que interactúan con un factor de transcripción de choque térmico (HSF). Este HSF se une a la región promotora en condiciones de estrés e induce la transcripción de la Hsp70 (Peterson y Lindquist 1989). Se conoce que la inducción de la Hsp70 por las ERO es por un mecanismo que involucra el factor HSF y la estabilidad del ARNm (Jacquier-Sarlin y Polla 1996). Hay evidencias de que la función principal de la Hsp70 es la tolerancia a una gran variedad de agentes estresores (Jaattela 1993). Aunque el mecanismo de citoprotección no se conoce exactamente, se le ha atribuido a la Hsp70, un papel muy importante en el estado redox de la célula por proteger de los efectos tóxicos de las ERO (Jacquier-Sarlin y col. 1994). También participa en mediar los efectos de las citocinas, en particular al TNF- $\alpha$  y la IL-1, por inhibir su transcripción y disminuir su secreción (Stojadinovic y col. 1997). La Hsp70 protege a la célula de la liperoxidación, la cual daña a la membrana celular con la subsecuente alteración en la homeostasis de calcio. Los niveles de calcio intracelular tiene un papel muy importante en la toxicidad y muerte celular mediada por las ROS (Dargel 1992).

## **1.7 MODELO CELULAR**

El hígado es el principal órgano involucrado en la biotransformación de sustancias exógenas para poder ser excretadas del organismo. Sin embargo, muchos de estos agentes xenobióticos son potencialmente hepatotóxicos. La capacidad de un agente para producir daño hepático *in vivo* a menudo resulta de la interacción de una serie

compleja de procesos celulares que están involucrados en la entrada, biotransformación y eliminación de estos compuestos tóxicos. Así los tóxicos pueden interaccionar con constituyentes celulares, tales como las proteínas, los lípidos, el ADN, el ARN y producir daño. Estos eventos de daño pueden ser analizados a nivel celular o molecular, sin embargo, esto es difícil *in vivo* debido a que las funciones del hígado están bajo la influencia de varios factores endógenos y exógenos que resultan en una interacción compleja con otros órganos (Guillouzo 1998). Los modelos hepáticos más frecuentemente usados son órganos perfundidos, cortes de tejidos, fracciones subcelulares y cultivo de hepatocitos aislados. Este último ha sido el más utilizado para estudios toxicológicos, aunque la desventaja más grande de los cultivos primarios es que las células pierden las funciones hepatocelulares en un corto tiempo (Donato y col. 1991). Además sufren alteraciones fenotípicas y disminuyen las actividades de los sistemas que metabolizan los xenobióticos, haciendo de esta manera imposible el analizar los efectos de un agente tóxico por períodos prolongados. Es por ello que el desarrollo de líneas celulares de hepatocitos representa una alternativa, ya que mantienen propiedades específicas del hígado por lapsos largos y no sufren alteraciones fenotípicas. Por lo tanto, es posible analizar en este sistema el efecto de un agente tóxico por períodos cortos o prolongados. Entre estas líneas celulares tenemos a las células Chang, las cuales son consideradas por muchos investigadores (Guillouzo 1998) como una línea poco diferenciada debido a que ha perdido algunas características de los hepatocitos, las WRL-68 de origen fetal hepático humano, las cuales han sido caracterizadas por nuestro laboratorio (Gutierrez y col. 1994) y ha sido utilizada para estudios de

toxicidad con cadmio (Souza y col. 1997). Actualmente contamos con otra línea celular que es la HepG2 que proviene de un hepatoblastoma y que ha sido utilizada en gran cantidad de estudios de daño por tóxicos (Gutiérrez-Ruiz y col. 1999), es por ello que consideramos que es un sistema adecuado para estudiar el papel de las citocinas como mediadores de daño ocasionado por el cadmio y su relación con el estrés oxidativo.

## JUSTIFICACIÓN

La exposición al cadmio se ha incrementado y los daños que se producen en el organismo son letales. El mecanismo mediante el cual el cadmio produce hepatotoxicidad no se conoce totalmente, aunque se le ha relacionado con procesos oxidativos en donde están involucradas la IL-1- $\beta$ , la IL-6, la IL-8 y el TNF- $\alpha$ . Se considera al TNF- $\alpha$  como uno de los primeros mediadores en la toxicidad producida por el cadmio y en la activación de factores de transcripción como el NF $\kappa$ B y la AP-1 que son sensibles al estrés oxidativo. Esos factores regulan la expresión de genes, cuyos productos son los responsables de muchos efectos fisiológicos y patológicos. Con base en esto, es importante estudiar la inducción de la IL-1- $\beta$ , la IL-6, la IL-8 y del TNF- $\alpha$  en células hepáticas tratadas con cadmio. Así mismo, evaluar el papel del TNF- $\alpha$  en la expresión de la interleucinas y en la activación del factor AP-1 con el fin de conocer más acerca del mecanismo por el cual el cadmio produce daño en los hepatocitos.

## OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de las citocinas inflamatorias, los factores de transcripción NF $\kappa$ B, la AP-1 y el estrés oxidativo en el daño producido por el CdCl<sub>2</sub> en las células HepG2.

### 2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el estrés oxidativo en las células HepG2 expuestas a CdCl<sub>2</sub> mediante la determinación de la producción de las TBARS y del contenido de GSH.
- Evaluar la inducción del ARNm de las IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y del TNF- $\alpha$  en las células HepG2 expuestas a CdCl<sub>2</sub>.
- Evaluar el papel del TNF- $\alpha$  como mediador de señalización en la inducción el ARNm de las IL-1- $\beta$ , IL-6, e IL-8 como respuesta al tratamiento con el CdCl<sub>2</sub>.
- Evaluar la inducción de la Hsp70 como respuesta al tratamiento con el CdCl<sub>2</sub> en las células HepG2.
- Evaluar la activación de los factores de transcripción NF $\kappa$ B y la AP-1 en la células HepG2 expuestas a CdCl<sub>2</sub>.
- Evaluar la relación del factor de transcripción AP-1 con el TNF- $\alpha$  y el estrés oxidativo mediado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el efecto de agentes antioxidantes como el NAC.

## **HIPÓTESIS**

En respuesta al estrés oxidativo producido por el cadmio en las células HepG2 se incrementarán los niveles de las TBARS, se disminuirá el contenido de GSH y se producirá la proteína Hsp70. Se inducirán citocinas inflamatorias como la IL-1 $\beta$ , la IL-6, la IL-8 y el TNF- $\alpha$ . Así mismo, el TNF- $\alpha$  al ser un mediador temprano de daño participará en la inducción de los ARNm de las interleucinas y podrá activar al factor de transcripción AP-1. También la AP-1 podrá ser activada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como respuesta al estrés oxidativo formado y su actividad será disminuida por el antioxidante NAC.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 CULTIVO CELULAR**

La línea celular HepG2 proveniente de un hepatoblastoma humano fue adquirida comercialmente de la América Type Culture Collection (ATCC). Las células HepG2 fueron mantenidas en medio de cultivo de Williams (Sigma) suplementado con 8% de suero fetal de bovino (Hyclone), penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml) (Microlab). Las células fueron cultivadas en botellas de plástico estériles (Nunc) y el medio de cultivo se cambió cada tercer día. Las células fueron sembradas en una relación de 1:3 y los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad a una temperatura de 37°C. Todos los experimentos fueron realizados cuando las células se encontraron en fase de crecimiento logarítmica y entre los pasajes de 130-135.

### **3.2 CITOTOXICIDAD CELULAR**

La citotoxicidad del CdCl<sub>2</sub> fue determinada con la prueba del MTT, de acuerdo con el método descrito por Mosmann (1983). Este ensayo mide la conversión del bromuro de difenil tetrazolium (MTT) a formazan por las deshidrogenasas de las mitocondrias de las células vivas. Se sembraron 200 000 células/pozo en multicámaras de 24 pozos (Nunc) y se dejaron crecer por 24 h. Después de este tiempo se les cambió el medio por otro sin suero y con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (0.5-50 µM) (Sigma) durante 6 h. Posteriormente se les retiró el medio y fueron lavadas con una

solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Se les agregó una solución de 0.5 mg/ml de MTT en PBS a pH 7.5 y se dejaron incubar por 3 h a 37°C. Después se les adicionó 500  $\mu$ l de una solución de HCl 0.04 N en 2-isopropanol, durante 15 min, para disolver el formazan. El cambio de absorbancia se midió a 570 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 640). La viabilidad celular se determinó por el porcentaje del cambio de absorbancia con respecto al control

### **3.3 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LAS TBARS**

La lipoperoxidación se determinó por el método de Buege y Aust (1978), el cual se basa en la formación de TBARS. Las células HepG2 se sembraron en cajas de cultivo (Corning) a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/caja y se dejaron crecer por 24h. Pasado ese tiempo, se les cambió el medio por otro sin suero y conteniendo 5  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> y se dejaron incubar por diferentes tiempos (1, 2, 4 y 6 h) a 37°C. Las células control estuvieron en ausencia del CdCl<sub>2</sub>. Las células se resuspendieron en 1 ml de PBS y se lisaron con un sonicador con 8 pulsos cada 30 segundos (Ultrasonic Processor XL2020). De este lisado se tomó 0.1 ml para la cuantificación de proteínas y a los 0.9 ml restantes se les adicionó 2 ml de una solución reactiva formada por ácido tricloroacético al 15%, ácido tiobarbitúrico al 0.5% y HCl 0.25 N. Las muestras se agitaron y se incubaron en una baño de agua a 100 °C durante 30 min. Las muestras se dejaron enfriar y se centrifugaron a 1431 g por 10 min. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 535 nm y la concentración de MDA se determinó con:  $C = A/\epsilon l$ . Donde: C=concentración de MDA, A=Absorbancia,  $\epsilon$ =Coeficiente de extinción

molar ( $1.56 \times 10^5/\text{cm M}$ ) y  $l$ =grosor de la celda. Los resultados fueron expresados como nmol MDA/mg de proteína.

### 3.4 CONTENIDO DE GLUTATIÓN

El contenido de GSH se determinó por el método de Tietze (1969) con el reactivo de Ellman. El método se basa en la reducción del 5,5'-ditiobis-2 ácido nitrobenzoico (DTNB) en presencia de grupos tioles (-SH). Las células HepG2 se sembraron en cajas de cultivo (Corning) a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/caja y se dejaron crecer por 24h. Pasado ese tiempo, se les cambió el medio por otro sin suero y conteniendo  $5 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  y se dejaron incubar por diferentes tiempos (1, 2, 4 y 6 h) a  $37^\circ\text{C}$ . Otro grupo de células fueron pre-tratadas con 1 mM de NAC por 1 h a  $37^\circ\text{C}$  y después, se les agregó  $5 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  y se dejaron incubar por 6 h a  $37^\circ\text{C}$ . Las células control estuvieron en ausencia del  $\text{CdCl}_2$ . Las células se resuspendieron en 0.6 ml de PBS. De este volumen se tomó 0.1 ml para la cuantificación de proteínas y a los 0.5 ml restantes se les adicionó 1 ml de buffer de Tris 0.2 M-EDTA 0.02M suplementado con SDS al 1% pH 8.2, agitando durante 15 min. Posteriormente se agregó 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% y se agitó durante 5 min. Después las muestras se centrifugaron a 3220 g durante 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . Del sobrenadante se tomó 0.2 ml y a ésta se le agregaron 2.5 ml de PBS 0.05 M pH 7.1, 800  $\mu\text{l}$  de EDTA 1 mM, 30  $\mu\text{l}$  de DTNB, 50  $\mu\text{l}$  de glutatión reductasa y 100  $\mu\text{l}$  de NADPH (2 mg/ml). La mezcla se agitó y se leyó la absorbancia a 412 nm. La cuantificación de GSH se realizó con base en

una curva estándar y los resultados fueron expresados como nmoles de SH/mg de proteína.

### **3.5 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL**

La extracción del ARN total se realizó de acuerdo al método descrito por Chomczynski (1993). Las células HepG2 fueron sembradas en cajas de cultivo (Corning) a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/caja y se dejaron crecer por 24h. Pasado ese tiempo, se les cambió el medio de cultivo por otro sin suero con diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  (1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) y se dejaron incubar por 1, 3 y 6 h a  $37^\circ\text{C}$ . Por otro lado, con el fin de evaluar el papel que juega el  $\text{TNF-}\alpha$  en la expresión de las citocinas las células HepG2 fueron pre-tratadas con 10 ng/ml de un anticuerpo recombinante humano anti- $\text{TNF}\alpha$  (R & D Systems) por 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Después, se les agregó 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  y se dejaron incubar por 1 ó 3 h a  $37^\circ\text{C}$ . Las células control estuvieron en ausencia del  $\text{CdCl}_2$ . Posteriormente, fueron lavadas con PBS y se les agregó 1 ml de trizol. El homogenado celular fue resuspendido varias veces y se dejó reposar 5 min a  $25^\circ\text{C}$ . Después se le agregó 0.2 ml de cloroformo y fue agitado vigorosamente por 15 seg. Se dejó reposar 5 min y las muestras fueron centrifugadas a 12879 g durante 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . Se tomó la fase acuosa y se le agregó 0.5 ml de isopropanol. Se dejó reposar 15 min a  $25^\circ\text{C}$ . Luego fue centrifugado a 12879 g durante 10 min a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante fue decantado y a la pastilla obtenida se le agregó 1 ml de etanol al 75%, el cual fue agitado vigorosamente con un vortex y fue centrifugado a 12879 g durante 5min a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante fue

desechado. Finalmente, la pastilla fue suspendida en agua-DEPC al 0.1%. El ARN fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm utilizando la siguiente relación:

Concentración de ARN = (D.O. 260 nm) (40) (factor de dilución).

### 3.6 DETERMINACIÓN DEL ARNm POR RT-PCR

Los ARNm extraídos de los cultivos celulares fueron sometidos a un análisis por transcripción reversa de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Sambrood y col. 1989), utilizando un ensayo comercial (GeneAmp, PCR Kit, Perkin Elmer). Para el RT, se tomaron 2.5 µg de ARN total de cada una de las muestras y se le agregó 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µl de dATP 10 mM, 1 µl de dGTP 10 mM, 1 µl de dCTP 10 mM, 1 µl de dTTP 10 mM. 0.5 µl de inhibidor de ARNasa 20 U/µl, 0.7 µl de oligo d(T)<sub>16</sub> 50 µM, 0.5 µl de transcriptasa reversa 50 U/µl, 0.8 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de buffer para PCR 10X formado por: KCl 500 mM, TRIS-HCl 100 mM pH 8.3. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer 480) a 42°C por 1 h, seguido de 5 min a 95°C. Para el PCR, se tomaron 3 µl del ADN complementario (ADNc) del RT y se le agregó 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 4 µl de buffer PCR 10X, 32.75 µl de agua estéril, 0.25 µl de AmpliTaq DNA polimerasa (5 U/µl) y 3 µl de los siguientes oligonucleótidos (10 µM):

TNF- $\alpha$ : sentido 5'-CTC TGG CCC AGG CAG TCA GA-3', antisentido 5'-GGC GTT TGG GAA GGT TGG AT-3' con las siguientes condiciones 94°C 1 min; 57°C 1 min; 72°C 1 min por 35 ciclos.

IL-1 $\beta$ : sentido 5'-GGA TAT GGA GCA ACA ACA AGT GG-3', antisentido 5'-ATG TAC CAG TTG GGG GAA CTG-3' con las siguientes condiciones 94°C 1 min; 55°C 1 min; 72°C 1 min por 35 ciclos.

IL-6: sentido 5'-TCA ATG AGG AGA CTT GCC TG-3', antisentido 5'-GAT GAG TTG TCA TGT CCT GC-3' con las siguientes condiciones 94°C 1 min; 57°C 1 min; 72°C 1 min por 35 ciclos.

IL-8: sentido 5'-TTG GCA GCC TTC CTG ATT-3', antisentido 5'-AAC TTC TCC ACA ACC CTC TG-3' con las siguientes condiciones 94°C 1 min; 63°C 1 min; 72°C 1 min por 35 ciclos.

$\beta_2$ -microglobulina: sentido 5'-GAT GCT GCT TAC ACG-3', antisentido 5'-CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC-3' con las siguientes condiciones 94°C 1 min; 53°C 1 min; 72°C 1min por 35 ciclos.

Los ADNc amplificados se identificaron en geles de agarosa (Ultra Pure Sigma) al 1.5% en TBE 0.5X formado por ácido bórico 0.5 M, Tris-base 0.5 M y EDTA 10 mM, teñidos con bromuro de etidio (1 mg/ml). Los ADNc se pusieron con amortiguador de muestra, el cual contenía azul de bromofenol 0.25%, xilen cianol 0.25%, y glicerol al 30% y se dejaron correr en una cámara de electroforesis (Bio-Rad) a 100 volts por 1 h. Los geles fueron observados en un Gel Doc 1000 (Bio Rad) y analizados en el Molecular Analyst (Bio Rad). Como sonda de normalización se utilizó a la  $\beta_2$  -microglobulina. Los tamaños de los productos fueron de 519 pb para el TNF- $\alpha$ , 263 pb para la IL-1 $\beta$ , 260 pb para la IL-6, 247pb para la IL-8 y 268 pb para la  $\beta_2$  -microglobulina.

### 3.7 EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA NUCLEAR

La extracción de la proteína nuclear se realizó de acuerdo al método descrito por Morales y col. (1997). Las células HepG2 se sembraron en cajas de cultivo (Corning) a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/caja y se dejaron crecer por 24h. Pasado ese tiempo, se les cambió el medio por otro sin suero y conteniendo  $5 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . Las células se dejaron incubar por diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 5 y 6 h) a  $37^\circ\text{C}$ . Por otro lado, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  (1, 3, 5, 10 y  $20 \mu\text{M}$ ) y se dejaron incubar por 4 h. Otro grupo de células fueron pre-tratadas con  $10 \text{ ng/ml}$  de un anticuerpo recombinante humano anti- $\text{TNF}\alpha$  (R & D Systems) o con  $1 \text{ mM}$  de NAC por 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Después, se les agregaron  $5 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  o  $0.25 \text{ mM}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se dejaron incubar por 4 h a  $37^\circ\text{C}$ . Las células control estuvieron en ausencia del  $\text{CdCl}_2$ . Posteriormente, fueron lavadas con PBS y se les agregó  $800 \mu\text{l}$  de un buffer de lisis, formado por Hepes  $10 \text{ mM}$  pH 7.9, KCl  $10 \text{ mM}$ , EDTA  $0.1 \text{ mM}$ , EGTA  $0.1 \text{ mM}$ , DTT  $1 \text{ mM}$  y PMSF  $0.5 \text{ mM}$ . El homogenado celular fue resuspendido varias veces y se dejó reposar  $15 \text{ min}$  a  $4^\circ\text{C}$ . Después se le agregó  $50 \mu\text{l}$  de IGEPAL 10X y fue agitado vigorosamente por  $10 \text{ seg}$ . Inmediatamente, las muestras fueron centrifugadas a  $12879 \text{ g}$  por  $30 \text{ seg}$  y se desechó el sobrenadante. Los núcleos obtenidos, fueron resuspendidos en  $50 \mu\text{l}$  de buffer C formado por Hepes  $20 \text{ mM}$  pH 7.9, NaCl  $0.4 \text{ mM}$ , EDTA  $1 \text{ mM}$ , EGTA  $1 \text{ mM}$ , DTT  $1 \text{ mM}$  y PMSF. El homogenado celular fue resuspendido varias veces y se dejó reposar  $15 \text{ min}$  a  $4^\circ\text{C}$ . Luego fue centrifugado a  $17530 \text{ g}$  durante  $5 \text{ min}$  a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante contenía la proteína nuclear, la cual fue almacenada en pequeños volúmenes y guardada a  $-80^\circ\text{C}$ . De

una de las alícuotas se cuantificó la concentración de proteína con el reactivo de Bradford.

### **3.8 ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)**

El ensayo de movilidad electroforética o de retardo 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 y col. (1997). Se tomaron 40  $\mu\text{g}$  de la proteína nuclear y se hicieron reaccionar con los oligonucleótidos NF $\kappa$ B (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') o AP-1 (5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3') que fueron marcados por la cinasa polinucleótido T4 con [ $\gamma^{32}\text{-P}$ ]-ATP (NEN) en un buffer formado por Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, glicerol 20%, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y poly (dl-dC) 0.05 mg/ml. La reacción se dejó durante 15 min a 25°C y las muestras se corrieron en geles de acrilamida-bisacrilamida (Sigma) al 6% en TBE 0.25X. Después a cada muestra se le agregaron 2  $\mu\text{l}$  de azul de bromofenol 0.1% y se dejaron correr en una cámara de electroforesis (Bio-Rad) 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).

### **3.9 EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA TOTAL**

Las células HepG2 fueron sembradas en cajas de cultivo (Corning) a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/caja y se dejaron crecer por 24h. Pasado ese tiempo, se les cambió



el medio por otro sin suero y conteniendo 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  y se dejaron incubar por diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 5 y 6 h) a  $37^\circ\text{C}$ . Las células control estuvieron en ausencia del  $\text{CdCl}_2$ . Posteriormente, fueron lavadas con PBS y se les agregaron 200  $\mu\text{l}$  de un amortiguador de lisis, formado por Tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, IGEPAL 0.5%, NaF 100 mM,  $\text{NaVO}_3$  200 mM y 80  $\mu\text{l}$  de un stock de inhibidor de proteasas (Complete, Roche). El homogenado celular fue resuspendido varias veces y se dejó reposar 5 min a  $25^\circ\text{C}$ . Después fue centrifugado a 17530 g por durante min a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante conteniendo la proteína celular fue almacenado en pequeños volúmenes y guardado a  $-80^\circ\text{C}$ . De una de las alícuotas se cuantificó la concentración de proteína con el reactivo de Bradford.

### **3.10 ANÁLISIS POR WESTERN BLOT**

El ensayo de Western blot se realizó de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). Se tomaron 75  $\mu\text{g}$  de la proteína total y se le agregó amortiguador de muestra 2X formado por Tris-HCl 0.1 M pH 6.8, glicerol, SDS al 20%, 2- $\beta$ -mercapto etanol y azul de bromofenol al 0.1%. Las muestras se dejaron 5 min a  $95^\circ\text{C}$  y se corrieron en geles de acrilamida-bisacrilamida (BioRad) al 10% en un amortiguador formado por Tris HCl 1.5M pH 8.8, SDS al 10%. Después las muestra se dejaron correr en una cámara de electroforesis (mini-Protean II, Bio-Rad) con un amortiguador de corrida 1X formado por Tris-Base, glicina y SDS a 200 Volts por 35 min. La proteína fue transferida a una membrana de difloruro de polivinilideno (PVDF, Amersham Biotech) usando un amortiguador de tranferencia formado por Tris-Base 25 mM pH 8.3, glicina

192 mM, SDS al 0.05% y metanol al 20m% por 14 h 30 Volts a 25°C. Después la membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada al 5% en amortiguador TBS-Tween formado por NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM y Tween 20 al 0.1% pH 7.5 por 30 min dos veces. Posteriormente se lavó con TBS-Tween 20 varias veces y se le agregó un anticuerpo primario de Hsp 70 humano a una dilución 1:500 (Santa Cruz Biotechnology) por 1 h. Se lavó con TBS-Tween suplementado con leche durante 10 min dos veces. Posteriormente se realizaron otros dos lavados con TBS-Tween durante 5 min. Después se le agregó el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) 1:10000 por 1 h. La membrana se lavó con TBS-Tween 10 min por triplicado y uno con sólo TBS. Finalmente la membrana fue tratada con el Ensayo SuperSignal® West Pico Substrate (Pierce) durante 15 min y expuesta en una placa radiográfica (Kodak) y revelada. Los resultados fueron visualizados en un densitómetro GS 670 (Bio Rad) y analizados en el Molecular Analyst (Bio Rad).

### **3.11 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA**

El contenido de proteína en las muestras se realizó con el reactivo de Bradford (Biorad) (1976). Se tomó una alícuota de las muestras y se le agregó 2.5 ml del reactivo de Bradford diluido 1:3. Se dejó incubar 20 min a 25°C. Se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina de 0.1-0.5 mg/ml. Posteriormente se leyó la absorbancia y se determinó la concentración de la proteína utilizando la curva estándar.

### **3.12 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 10 y el nivel de significancia de  $p < 0.05$  fue tomado para considerar los valores estadísticamente diferentes.

## RESULTADOS

### 4.1 VIABILIDAD DE LAS CELULAS HepG2 EXPUESTAS A CdCl<sub>2</sub>

La viabilidad de las células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (0-50 μM) durante 6 h de incubación, fue medida por la conversión de tetrazolium a formazan por las deshidrogenasas de las mitocondrias de las células viables. El producto formado fue cuantificado espectrofotométricamente y comparado con el de las células control. Los resultados son expresados como viabilidad celular (% control) y se muestran en la figura 1. Se observa que para las células tratadas desde 0.5 hasta 10 μM de CdCl<sub>2</sub> la viabilidad de las células está por arriba del 90% muy semejante a la viabilidad presentada por las células control, mientras que para las células tratadas con 20 y 50 μM del metal la viabilidad disminuyó a un 73.4% y 67%, respectivamente. Las células fueron capaces de proliferar en estas condiciones después de ser sembradas, por lo que se decidió utilizar varias concentraciones de CdCl<sub>2</sub> que fueron de 1, 5 y 10 μM con tiempos de incubación de 1, 3 y 6 h como tiempos de incubación.

### 4.2 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LAS TBARS

El estrés oxidativo producido en las células HepG2 por la exposición a 5 μM de CdCl<sub>2</sub> se determinó por la producción de las TBARS en función del tiempo de exposición. Los resultados se muestran en la tabla 1 y son expresados como nmoles de TBARS/mg proteína. Se observa un incremento significativo de 1.5 veces (3.15±0.141) en la

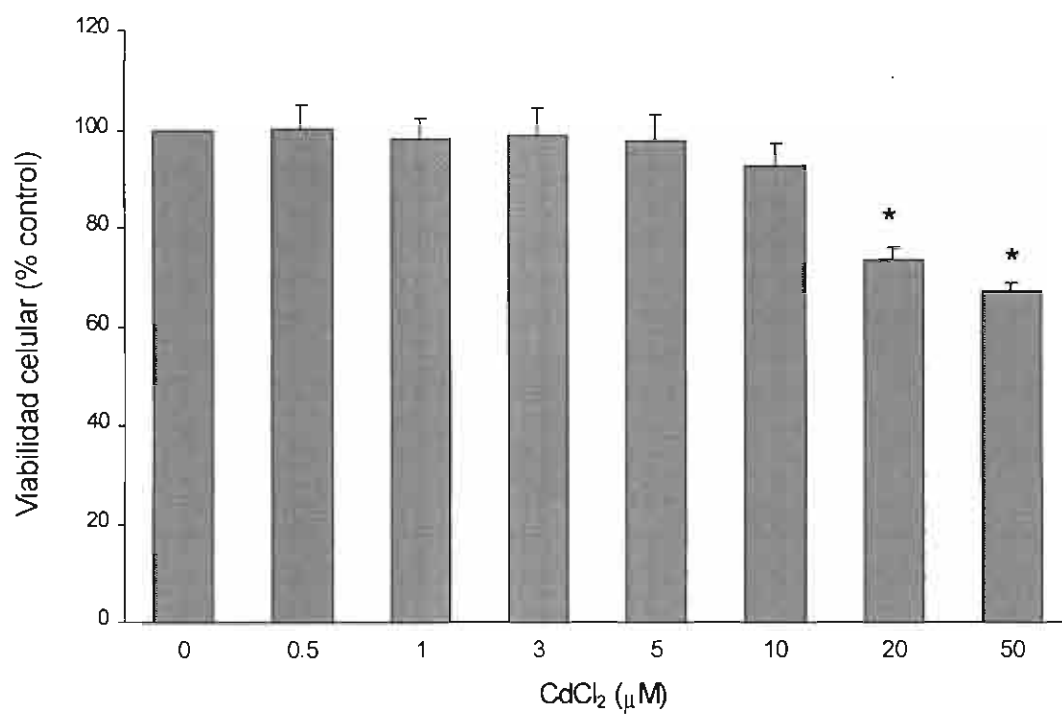


Figura 1. Curva de viabilidad de las células HepG2 después de 6 h de tratamiento con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> determinado por MTT. Cada punto expresa el promedio  $\pm$  error estándar (n=3). \*Diferencia significativa  $p < 0.05$  con respecto al control.

producción de TBARS a la primera hora de tratamiento y de 1.8 veces más ( $3.93 \pm 0.147$ ) para las 2 h con respecto al control ( $2.13 \pm 0.164$ ). A las 4 y 6 h de incubación, la producción de TBARS se mantuvo constante de 1.8 veces más alto con respecto al control. Estos resultados demuestran que las células HepG2 responden de manera inmediata a la presencia de cadmio generando las ROS y por lo tanto produciendo un daño por estrés oxidativo.

#### **4.3 CONTENIDO DE GLUTATIÓN**

El estrés oxidativo producido en las células HepG2 por la exposición a  $5 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  se determinó también por el contenido intracelular de GSH. Los resultados se muestran en la tabla 1 y son expresados como nmoles de GSH/mg de proteína. Se observa que para las primeras horas de exposición (1,2 y 4 h), el GSH disminuye ligeramente pero no de manera significativa. Sin embargo, a las 6 h, el contenido de GSH disminuyó drásticamente en un 65% ( $61.40 \pm 16.04$ ) con respecto al control ( $174.84 \pm 25.60$ ). Estos resultados demuestran que la pérdida en el GSH intracelular por la presencia del cadmio contribuye a un desbalance en el estado redox de la célula favoreciendo el estrés oxidativo. El pre-tratamiento con NAC, un agente antioxidante, en las células HepG2 seguidas con  $5 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , incrementó la concentración del GSH en un 286% ( $270.28 \pm 12.70$ ) con respecto a las células HepG2 tratadas con cadmio por 6 h ( $61.40 \pm 16.04$ ).

Tabla 1. Efecto del cadmio en la producción de TBARS y en el contenido de GSH en las células HepG2 expuestas a 5  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> a diferentes tiempos. Cada punto expresa el valor promedio  $\pm$  error estándar (n=3). \*Diferencia significativa p<0.05 con respecto al control. #Diferencia significativa con respecto a las células tratadas con CdCl<sub>2</sub> durante 6 h.

Tiempo (h)	TBARS (nmol/mg proteína)	GSH (nmol/mg proteína)
Control	2.13 $\pm$ 0.164	174.84 $\pm$ 25.60
1.0	3.15 $\pm$ 0.141*	163.17 $\pm$ 15.92
2.0	3.93 $\pm$ 0.147*	155.57 $\pm$ 23.61
4.0	3.87 $\pm$ 0.202*	162.46 $\pm$ 11.37
6.0	3.81 $\pm$ 0.198*	61.40 $\pm$ 16.04*
6.0 (NAC-Cd)	—————	270.28 $\pm$ 12.70#

#### **4.4 EFECTO DEL CADMIO EN LA EXPRESIÓN DEL TNF- $\alpha$**

Para determinar el efecto del cadmio en la expresión del TNF- $\alpha$ , Las células HepG2 fueron tratadas con 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por 0.5, 1, 3 y 6 h de incubación. Se aislaron los ARNs de las células y se analizaron por RT-PCR utilizando a la  $\beta_2$ -microglobulina como proteína de normalización. La expresión del TNF- $\alpha$  se muestra en la figura 2. A los 30 min de tratamiento, la expresión del TNF- $\alpha$  se presentó igual que el basal para todas las concentraciones del metal. Sin embargo, se observó un incremento significativo a la hora de tratamiento de 1.6 veces tanto para el tratamiento con 1 como para 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  y de 1.8 veces el valor control para 10  $\mu\text{M}$  del metal. Cabe mencionar que la máxima expresión del TNF- $\alpha$ , se encontró a la hora de incubación. Para los tratamientos de 3 y 6 h de incubación los niveles del ARNm tienden a disminuir para todas las concentraciones de  $\text{CdCl}_2$ .

#### **4.5 EXPRESIÓN DE LA IL-1 $\beta$ , LA IL-6 Y DE LA IL-8 POR EL $\text{CdCl}_2$**

Para determinar el efecto del cadmio en la expresión de la IL-1 $\beta$ , IL-6 y la IL-8 las células HepG2 fueron tratadas con 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por 0.5, 1, 3 y 6 h de incubación. Se aislaron los ARNs de las células y se analizaron por RT-PCR utilizando a la  $\beta_2$ -microglobulina como proteína de normalización. La expresión de la IL-1 $\beta$ , se puede apreciar en la figura 3, en donde se muestra un comportamiento muy similar al encontrado para el TNF- $\alpha$ . Se observa que para los 30 min de tratamiento, la expresión de la IL-1 $\beta$  presentó valores semejantes al valor basal para todas las concentraciones del metal. Sin embargo, se observó un incremento significativo a la



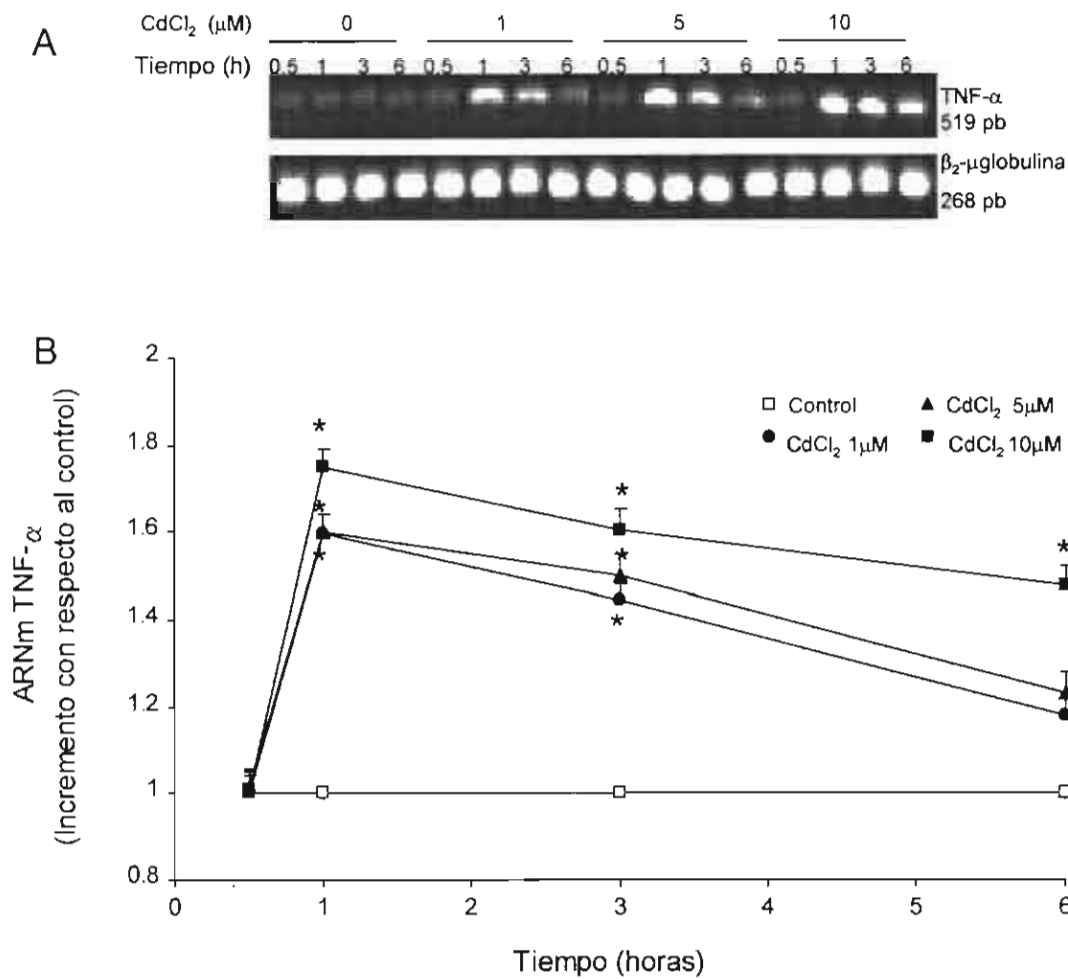


Figura 2. Inducción del ARNm del TNF- $\alpha$  por RT-PCR en las células HepG2 expuestas a 1, 5 y 10  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> con diferentes tiempos de incubación. Cada punto expresa el promedio  $\pm$  error estándar (n=3). \*Diferencia significativa  $p < 0.05$  con respecto al control. (A) Representación de los productos del RT-PCR. (B) Representación gráfica.

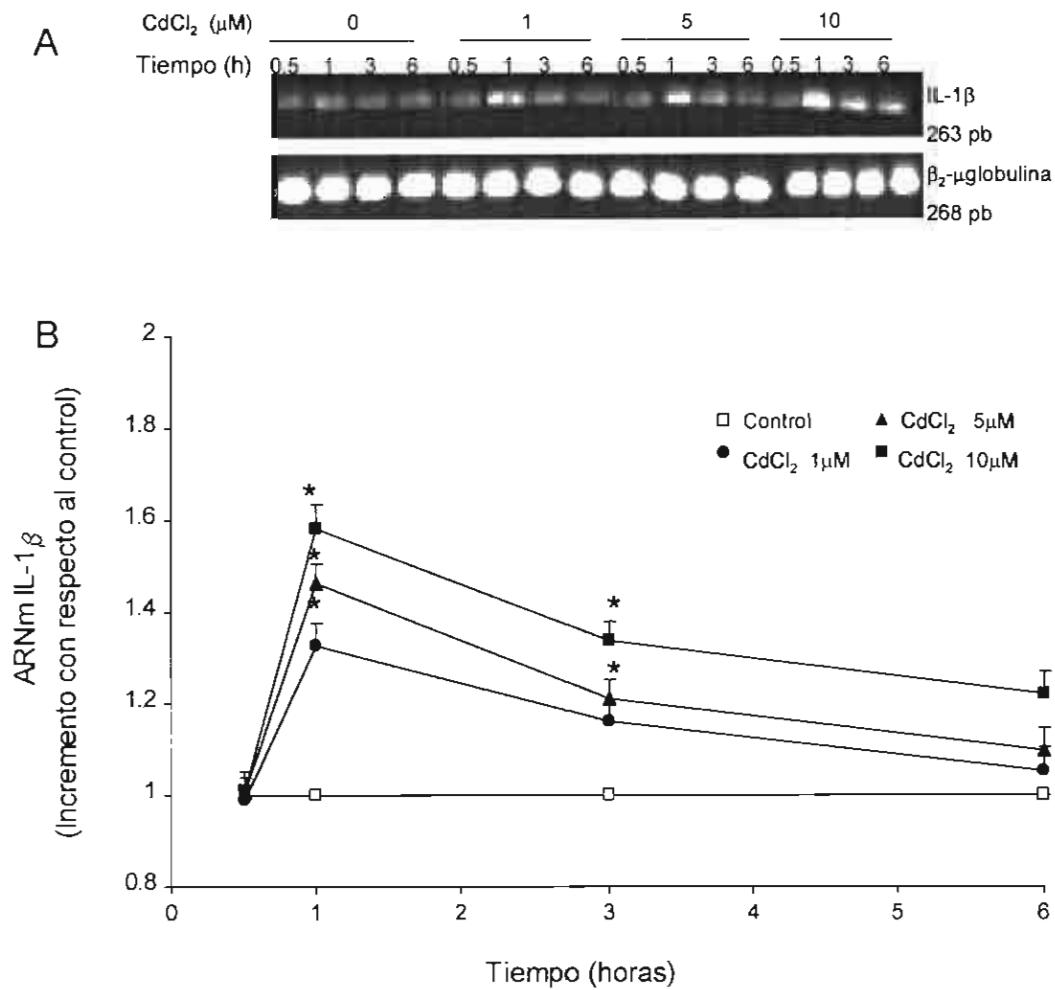


Figura 3. Inducción del ARNm del la IL-1β por RT-PCR en las células HepG2 expuestas a 1, 5 y 10 μM de CdCl<sub>2</sub> con diferentes tiempos de incubación. Cada punto expresa el promedio ± error estándar (n=3). \*Diferencia significativa p<0.05 con respecto al control. (A) Representación de los productos del RT-PCR. (B) Representación gráfica.

hora de tratamiento de 1.3 veces para 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , 1.5 veces para 5  $\mu\text{M}$  y 1.6 veces más para 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  con respecto al control. Cabe mencionar de nuevo que la máxima expresión de la IL-1 $\beta$  se encontró a la hora de incubación y para las 3 y 6 h los niveles del ARNm tienden a disminuir en todos los tratamientos. En la figura 4, se muestra la expresión de la IL-6. Para la primera hora de tratamiento, se observa un incremento ligero pero no significativo para todas las concentraciones del metal. Sin embargo, para las 3 h de tratamiento, se presentó un incremento significativo de 1.5 veces para 5  $\mu\text{M}$  y de 1.6 veces más para 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  con respecto al control. Además la máxima expresión de la IL-6 se encontró a las tres horas de incubación y para las 6 h de tratamiento los niveles del ARNm disminuyeron para todas las concentraciones de  $\text{CdCl}_2$ . Con respecto a la expresión de la IL-8, en la figura 5 se puede observar un comportamiento muy similar al encontrado para la IL-6. Se observa que para la primera hora de tratamiento, hay un incremento ligero pero no significativo de la expresión de la IL-6 para todas las concentraciones del metal. Sin embargo, para las 3 h de tratamiento, se presentó un incremento significativo de 1.3 veces para 5  $\mu\text{M}$  y de 1.4 veces más para 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  con respecto al control. Además la máxima expresión de la IL-8, se encontró a las tres horas de incubación y para las 6 h de tratamiento los niveles del ARNm disminuyeron para todas las concentraciones de  $\text{CdCl}_2$ . Como se observa, la expresión de la  $\beta_2$ -microglobulina es uniforme para todos los tratamientos, lo cual indica la integridad del ARNm en las células. Con estos resultados se demuestra que la expresión para cada interleucina debido al tratamiento con  $\text{CdCl}_2$  es un proceso diferencial.

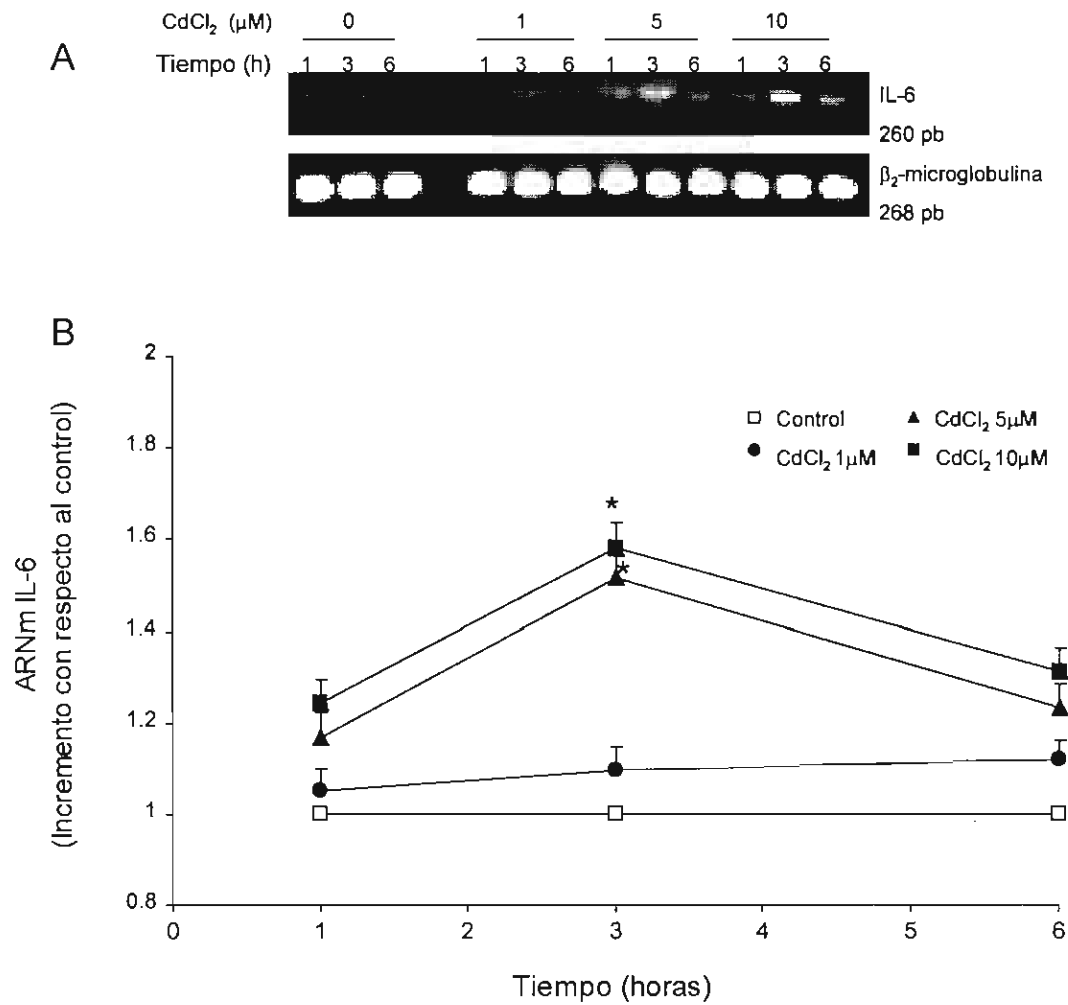


Figura 4. Inducción del ARNm de la IL-6 por RT-PCR en las células HepG2 expuestas a 1, 5 y 10 μM de CdCl<sub>2</sub> con diferentes tiempos de incubación. Cada punto expresa el promedio ± error estándar (n=3). \*Diferencia significativa p<0.05 con respecto al control. (A) Representación de los productos del RT-PCR. (B) Representación gráfica.

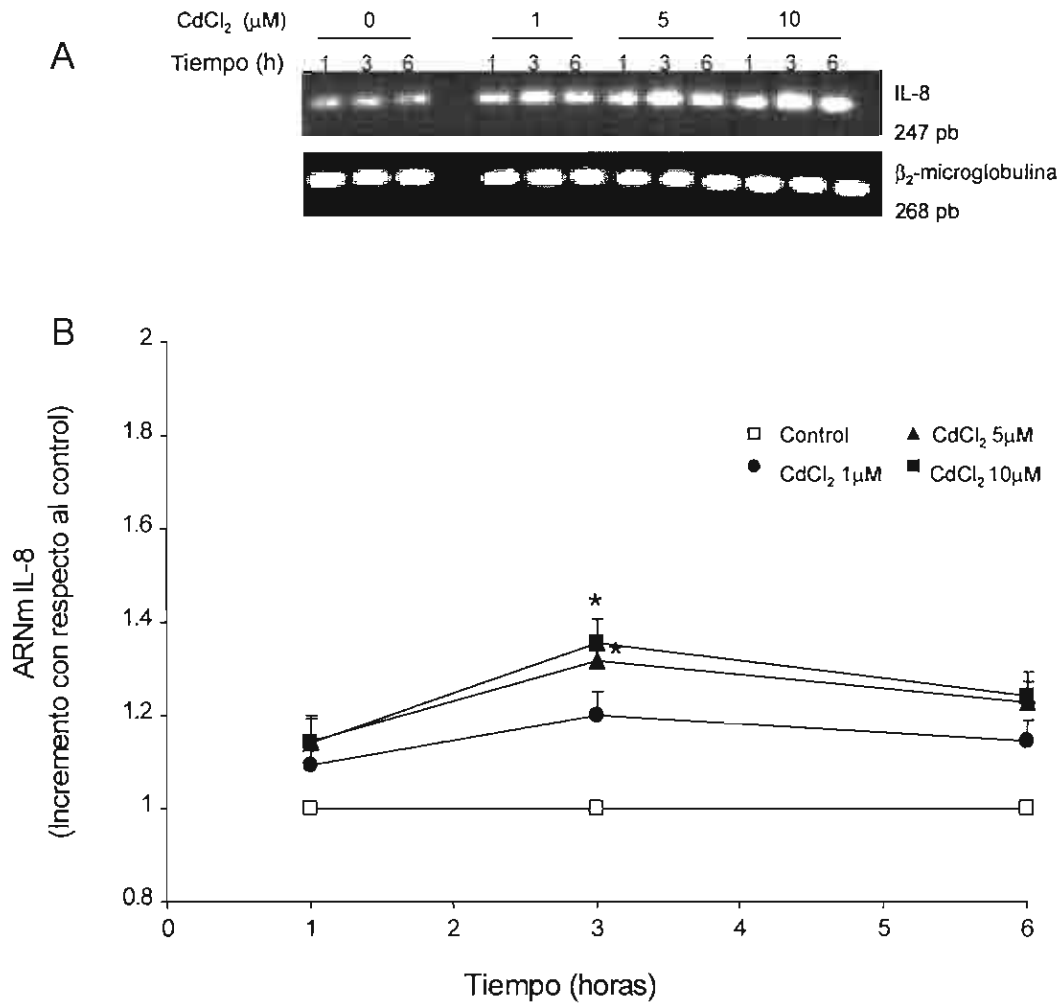


Figura 5. Inducción del ARNm de la IL-8 por RT-PCR en las células HepG2 expuestas a 1, 5 y 10 μM de CdCl<sub>2</sub> con diferentes tiempos de incubación. Cada punto expresa el promedio ± error estándar (n=3). \*Diferencia significativa p<0.05 con respecto al control. (A) Representación de los productos del RT-PCR. (B) Representación gráfica.

#### **4.6 EXPRESIÓN DE LA IL-1 $\beta$ , LA IL-6 Y DE LA IL-8 POR EL TNF- $\alpha$**

Para estudiar el papel del TNF- $\alpha$  como mediador de señalización en la expresión de las IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 por el CdCl<sub>2</sub>, las células HepG2, fueron pre-tratadas por 1 h con 10 ng/ml del anticuerpo anti-rhTNF- $\alpha$  seguido de 5  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> por 1 h para la IL-1 $\beta$  o 3 h para las IL-6 e IL-8, tiempos en los cuales se observó la máxima exposición de cada una de las citocinas. Se aislaron los ARNs de las células HepG2 y los ARNm de cada interleucina se analizaron por RT-PCR utilizando la  $\beta_2$ -microglobulina como proteína de normalización. Los resultados se muestran en la figura 6, en donde se observa un incremento significativo en la expresión de las interleucina 1.4 veces para la IL-1 $\beta$ , 1.6 veces para la IL-6 y 1.3 veces más para la IL-8 en las células tratadas con el CdCl<sub>2</sub> con respecto al control. El pre-tratamiento con el anti-rhTNF- $\alpha$  bloqueó significativamente la expresión de todas las interleucinas en las células tratadas con el CdCl<sub>2</sub>. Con estos resultados se demuestra que el TNF- $\alpha$  participa en la expresión de las IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 en las células HepG2 tratadas con el CdCl<sub>2</sub>.

#### **4.7 EFECTO DEL CADMIO EN LA PRODUCCIÓN DE LA HSP70**

El efecto del cadmio en la producción de la proteína de estrés Hsp70 en las células HepG2 expuestas a 5  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> por diferentes tiempos se determinó por Western blot con un anticuerpo específico para la proteína. Los resultados se muestran en la figura 7 y son expresados como % del valor control. Se observa una producción dependiente del tiempo y significativa con respecto al control. Para las 3 h de tratamiento, la proteína Hsp70 se incrementó en un 73%. Para las 4 h se incrementó

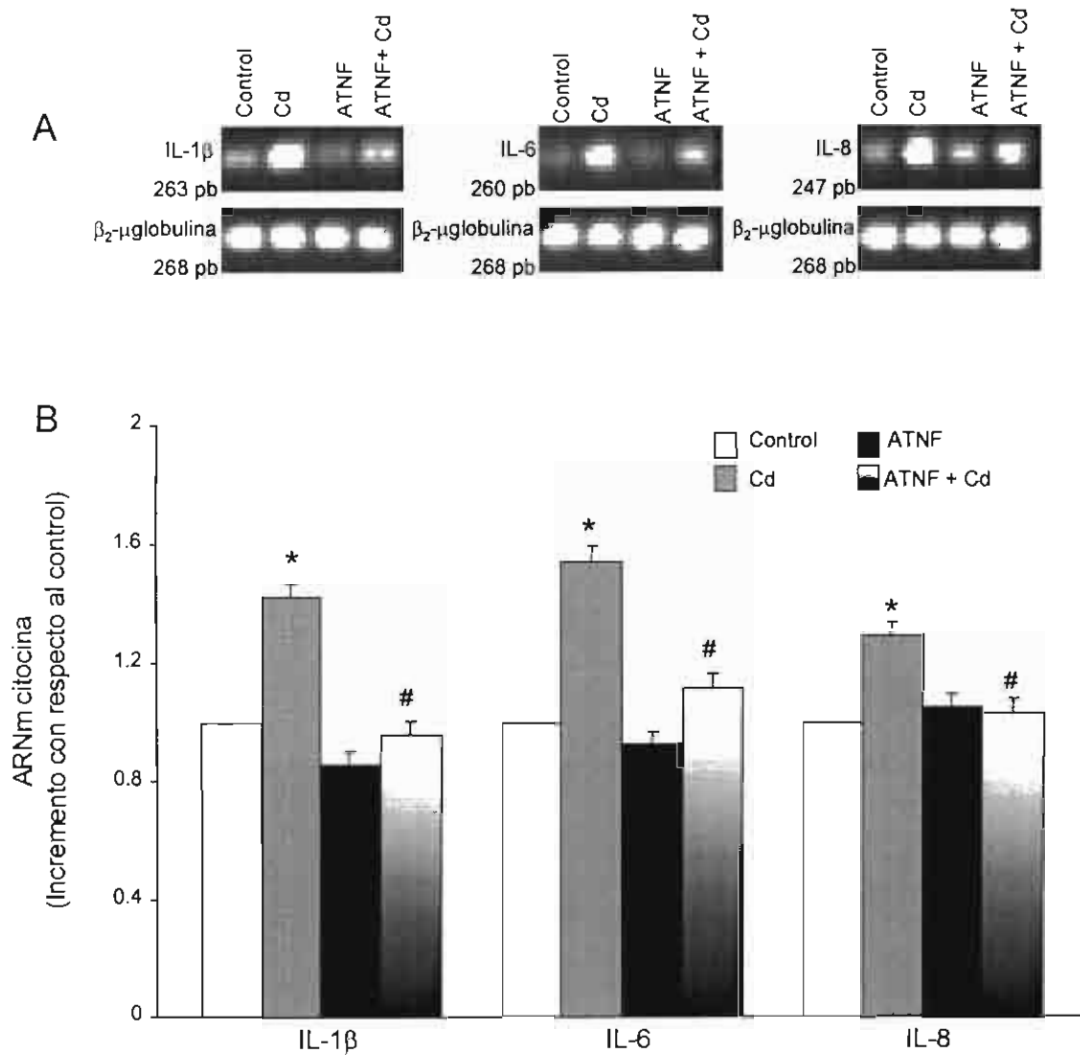


Figura 6. Efecto del pretratamiento del anti-rhTNF- $\alpha$  (ATNF) en la inducción del ARNm de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 en las células HepG2 expuestas a 5  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> por 1 ó 3 h. Cada punto expresa el promedio  $\pm$  error estándar (n=3). Diferencia significativa p<0.05 con respecto al control (\*) o al CdCl<sub>2</sub> (#). (A) Representación de los productos del RT-PCR. (B) Representación gráfica.

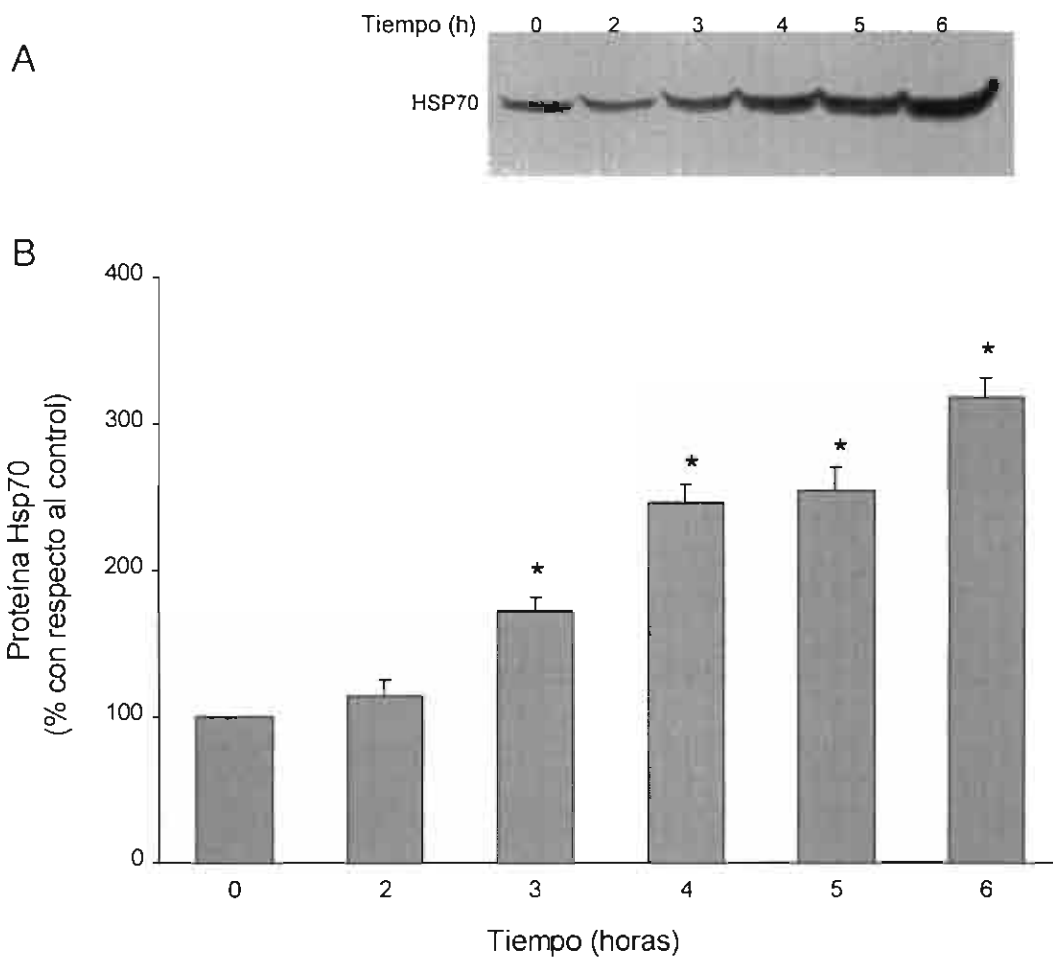


Figura 7. Inducción de la proteína HSP70 en las células HepG2 expuestas a 5  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> por diferentes tiempos de incubación determinado por Western blot. Cada punto expresa el promedio  $\pm$  error estándar (n=3). \*Diferencia significativa  $p < 0.05$  con respecto al control. (A) Representación del Western-Blot. (B) Representación gráfica.



146%. Para las 5 h se incrementó 154% y para las 6 h 217%. Estos resultados demuestran una respuesta inmediata de las células HepG2 como resultado del estrés oxidativo producido por la presencia del metal.

#### **4.8 EFECTO DEL CADMIO EN LA ACTIVACIÓN DEL NF- $\kappa$ B Y LA AP-1**

El efecto del cadmio en la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y la AP-1 se determinaron por el ensayo de EMSA o de retardo. Las células fueron tratadas con 5  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> a diferentes tiempos de exposición. No se presentó la activación del factor nuclear  $\kappa$ B en las células HepG2 tratadas con CdCl<sub>2</sub> (resultado no mostrado). Los resultados obtenidos en el caso de la AP-1, se muestran en la figura 8. La activación de este factor se encontró aumentada en función del tiempo de exposición. A la hora de tratamiento se observó un incremento de 2.1 veces más pero no fue estadísticamente diferente con respecto al control. A las 2 h se presentó un incremento significativo de 9.5 veces con respecto al control y para las 3 h de 19.4 veces más. A partir de las 4, 5 y 6 h se observó un incremento constante de 24 veces con respecto al control. Para el estudio de competencia, se trataron a las células con 50 veces más del oligonucleótido de AP-1 no marcado con respecto al marcado con <sup>32</sup>P (control negativo, CN). El ensayo de EMSA muestra la región correspondiente al factor de transcripción AP-1 por la competencia.

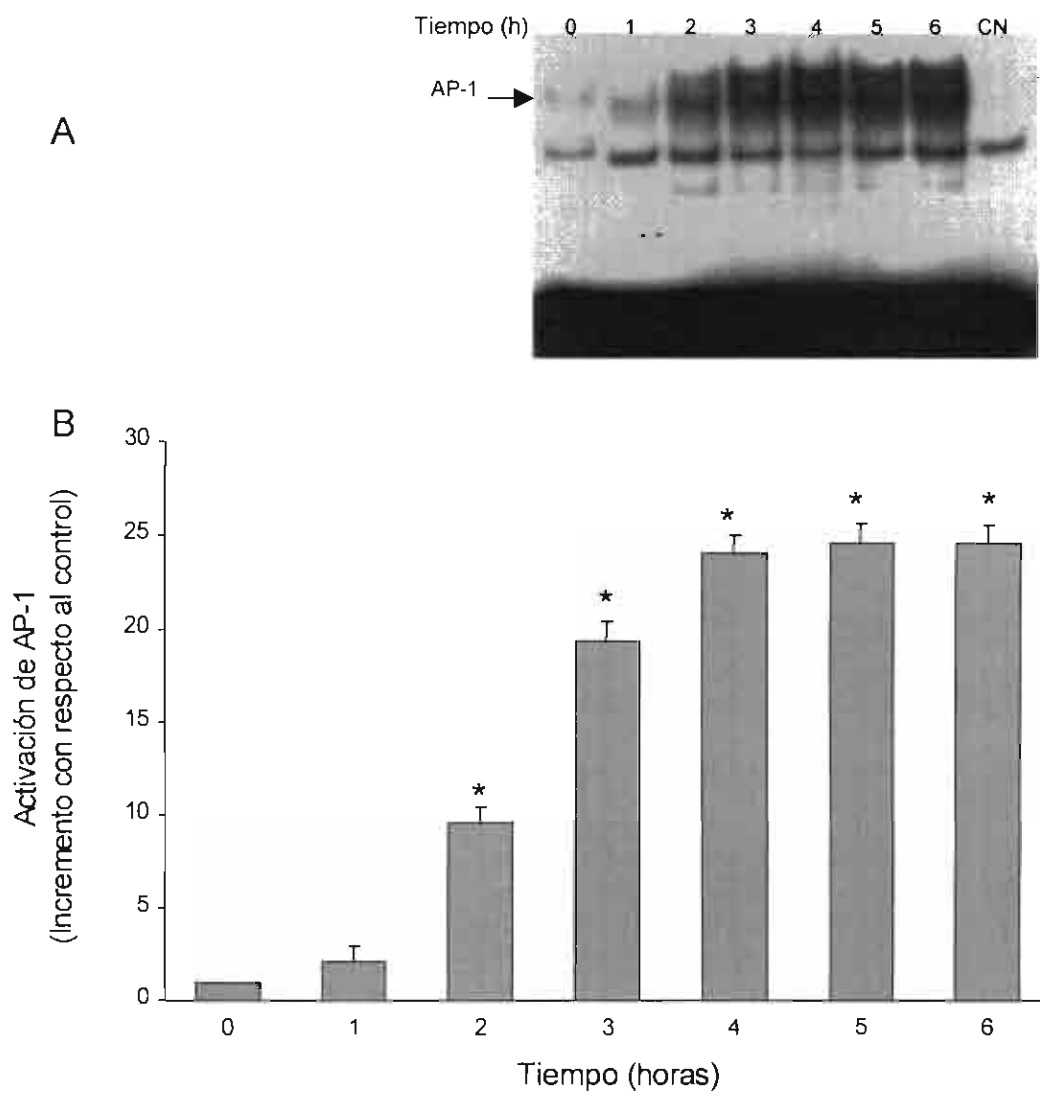


Figura 8. Activación de AP-1 en las células HepG2 expuestas a 5  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> por diferentes tiempos de incubación determinado por EMSA. Control negativo (CN). Cada punto expresa el promedio  $\pm$  error estándar (n=3). \*Diferencia significativa p<0.05 con respecto al control. (A) Representación del ensayo de EMSA. (B) Representación gráfica.

#### **4.9 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CdCl<sub>2</sub> EN LA AP-1**

Para determinar si la activación del AP-1 estaba en función de la concentración de CdCl<sub>2</sub>, las células fueron tratadas con 1, 3, 5, 10 y 20 μM de CdCl<sub>2</sub> por 4 h. La proteína nuclear fue extraída y utilizada para la determinación por EMSA. Los resultados se muestran en la figura 9 y se observa un incremento significativo entre 21 y 22.7 veces más para 1 a 10 μM de CdCl<sub>2</sub> con respecto al control. Estos resultados muestran que la activación de AP-1 es constante entre 1 y 10 μM del metal y sólo con 20 μM se presentó un mayor incremento y significativo de 30.3 veces más con respecto al control.

#### **4.10 EFECTO DEL TNF- $\alpha$ Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA AP-1**

Para determinar la participación del TNF- $\alpha$  y el estrés oxidativo en la activación de AP-1 por el CdCl<sub>2</sub>, las células fueron pre-tratadas por una hora con un anticuerpo contra TNF- $\alpha$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o un antioxidante como el NAC. Los resultados se muestran en la figura 10. Se observa un incremento significativo en la activación de AP-1 de 22 veces con CdCl<sub>2</sub> y 14.5 veces más con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto al control. El pre-tratamiento con el anti-rhTNF- $\alpha$  disminuyó significativamente esta activación del factor de transcripción en un 67%, mientras que con el NAC fue en un 47.5% con respecto a las células tratadas con el CdCl<sub>2</sub>. Estos resultados muestran que tanto el TNF- $\alpha$  y el estrés oxidativo participan de alguna manera en el mecanismo de señalización para la activación del factor de transcripción AP-1 en las células HepG2 tratadas con el CdCl<sub>2</sub>.

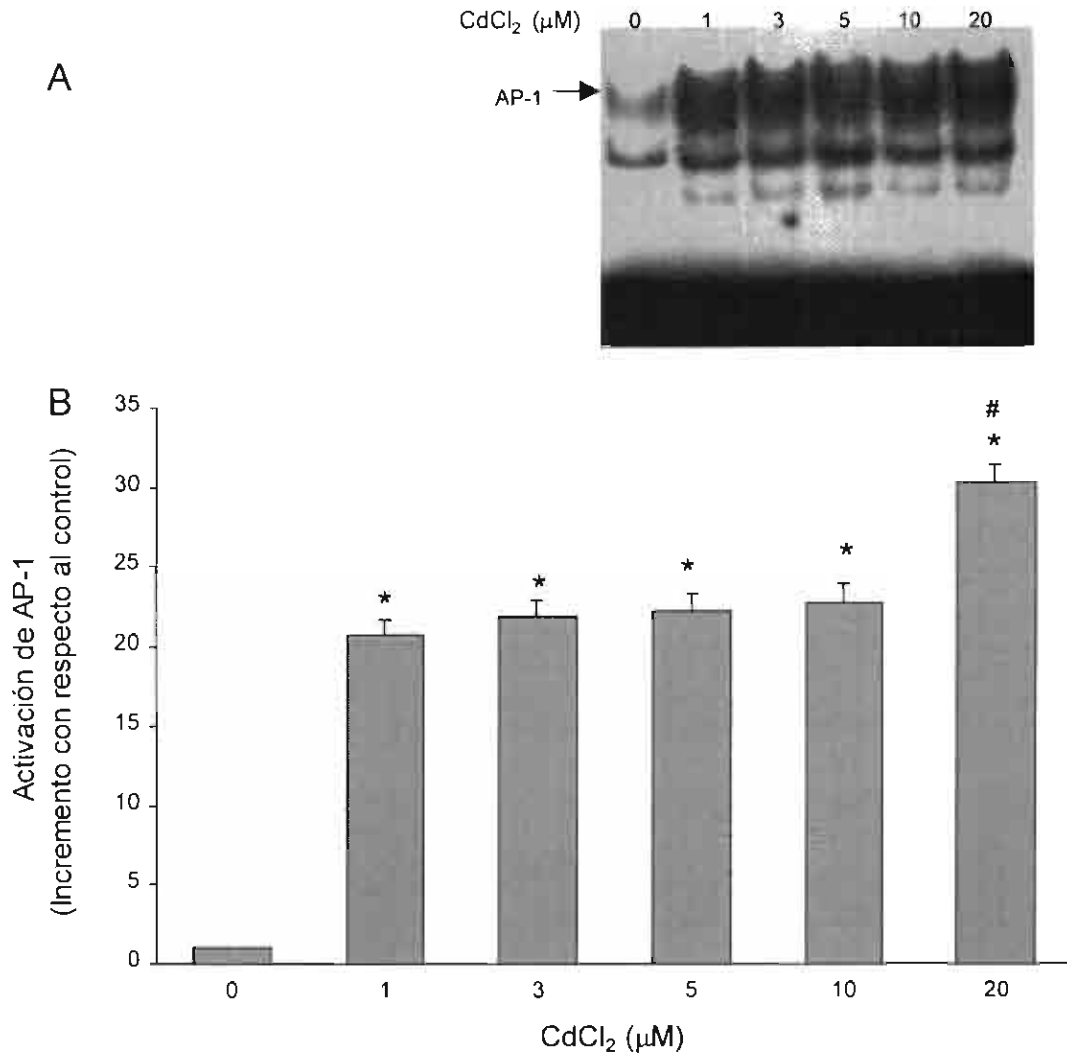


Figura 9. Activación de AP-1 en las células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> por 4 h determinado por EMSA. Cada punto expresa el promedio  $\pm$  error estándar (n=3). \*Diferencia significativa  $p < 0.05$  con respecto al control y con respecto a las otras concentraciones de CdCl<sub>2</sub>. (A) Representación del ensayo de EMSA. (B) Representación gráfica.

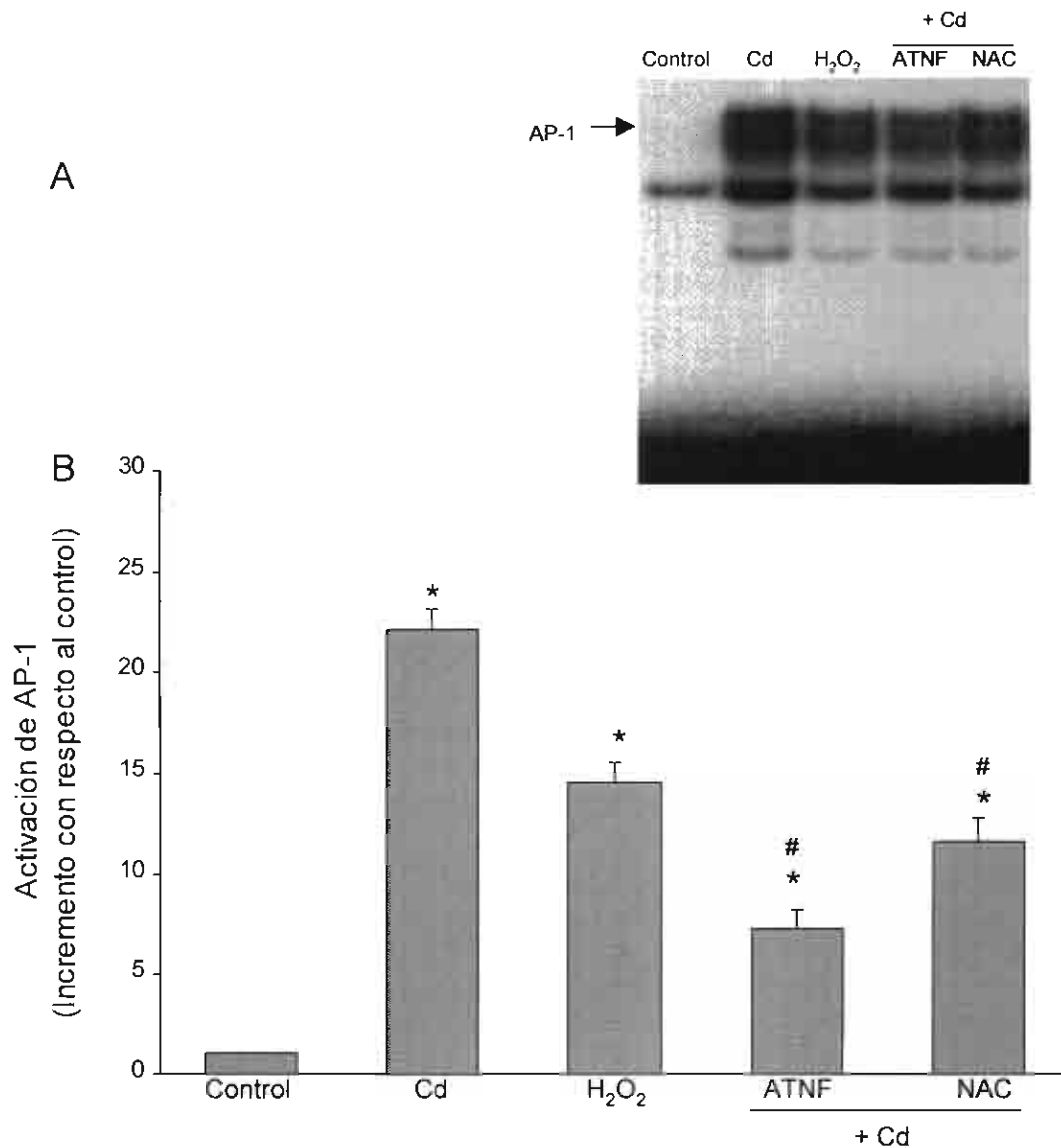


Figura 10. Efecto del pretratamiento del anti-rhTNF- $\alpha$  (ATNF) y NAC en la activación de AP-1 en las células HepG2 expuestas 5  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> por 4 h determinado por EMSA. Cada punto expresa el promedio  $\pm$  error estándar (n=3). Diferencia significativa  $p < 0.05$  con respecto al control (\*) o al CdCl<sub>2</sub> (#). (A) Representación del ensayo de EMSA. (B) Representación gráfica.

## DISCUSIÓN

### 5.1 VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS HepG2 EXPUESTAS A CdCl<sub>2</sub>

Los hepatocitos dañados con metales presentan una liberación de enzimas citosólicas y cambios estructurales tanto en la mitocondria como en el retículo endoplásmico (Bucio y col. 1995). El mecanismo responsable de estas alteraciones no se conoce exactamente y se le ha atribuido a la interferencia del metal con enzimas antioxidantes (Casalino y col. 2002). También a la alteración de los grupos tioles de las proteínas, a la inhibición del metabolismo energético, a la generación de ERO (Risso y col. 2001), a la lipoperoxidación (Yang y col. 1997), a la alteración en la estructura del ADN (Fatur y col. 2002), a la alteración en la estructura-función de la membrana y a la inducción de la expresión de genes de estrés (Wang y Templeton 1998). En el presente trabajo se investigó el efecto del CdCl<sub>2</sub> en la inducción de citocinas consideradas como parámetro de respuestas pro-inflamatorias, su relación con el factor de transcripción AP-1 sensible a estrés oxidativo y la producción de la Hsp 70, utilizando una línea celular de hepatoblastoma humana (HepG2) altamente diferenciada como modelo experimental (Kelly y Darlington 1989). Las células HepG2 fueron capaces de proliferar y crecer en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (0.5-10 μM) presentando una viabilidad por arriba del 90%. Estudios epidemiológicos de CdCl<sub>2</sub> fundamentan que la dosis de este metal que produce efectos sobre la salud es de 200 mg total, la cual podría corresponder a las concentraciones submicromolares de cadmio presentes en los

órganos blanco (Klaassen 2001). Otros estudios utilizando células hepáticas de rata (H4IIE) tratadas con 0.3 y 1.0  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durante 6 h (Kim y col. 2003), células PLC/PRF/5 (línea celular de hepatoblastoma humano) y células Chang (Shimoda y col. 2001) y las mismas HepG2 en presencia de 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por 4 h (Majumder y col. 2003), 1  $\mu\text{M}$  por 6 h (Fatur y col. 2002) y de 5–40  $\mu\text{M}$  por 3 o 6 h de incubación, presentaron resultados similares a los nuestros, con una viabilidad por arriba del 90%. También en hepatocitos aislados de rata, no se encontraron cambios en la viabilidad celular, cuando fueron tratados con 1 y 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por 6 h de incubación (Kuester y col. 2002).

## **5.2 EFECTO DEL CADMIO EN LAS TBARS Y EN EL CONTENIDO DE GSH**

Las principales fuentes de producción de ERO en la célula son el metabolismo oxidativo mitocondrial, el metabolismo de los fosfolípidos y proteólisis (Haddad 2002). Los sistemas biológicos tienen mecanismos de defensa antioxidantes tales como el GSH, la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la tioredoxina reductasa. A pesar de ello, cualquier cambio en la célula que favorezca la producción de prooxidantes y disminuya la defensa antioxidante puede llevar al estrés oxidativo. El cadmio produce estrés oxidativo (Shaikh y col. 1999) porque inhibe la actividad de enzimas antioxidantes (Casalino y col. 2002) y disminuye las reservas de GSH (Gong y Hart 1997). Aunque el cadmio no cataliza directamente la formación de las ERO vía la reacción de Fenton, sí puede inducir la movilización de Fe de la mitocondria probablemente por una competencia directa por el sitio de unión con las proteínas de

la cadena respiratoria y posteriormente causar estrés oxidativo y lipoperoxidación (Dorta y col. 2003). Nuestros resultados demostraron un incremento en la producción de TBARS desde la primer hora de tratamiento, mientras que el contenido de GSH disminuyó significativamente hasta las 6 h. Hay evidencias que sugieren que a las ERO formadas en la célula oxidan al GSH (Kagan y col 2001).

La disminución en el contenido de GSH puede potenciar la muerte celular por facilitar la acumulación de las ERO, debido a la reducción de la actividad de la glutatión peroxidasa (Dickinson y Froman 2002) que es una enzima importante en la detoxificación de  $H_2O_2$ , hidroperóxidos lipídicos e hidroperóxidos orgánicos. Además, hay evidencias de que el cadmio produce ROS en cultivos celulares y que éstos pueden ser los responsables del efecto tóxico (Bucio y col. 1995; Szuster-Clesielska y col 2000). Sin embargo, el pre-tratamiento con NAC, un agente antioxidante, en las células HepG2 seguidas con  $5 \mu M$  de  $CdCl_2$  durante 6 h, incrementó la concentración del GSH en un 286%, muy probablemente porque el NAC está siendo utilizado para la síntesis de GSH, ya que al NAC se le considera un precursor en esta vía de síntesis, además hay evidencias de que el cadmio induce la transcripción del gen de la enzima  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetasa que es un paso limitante en la síntesis del GSH (Hatcher y col. 1995).

### **5.3 EXPRESIÓN DEL TNF- $\alpha$ , LA IL-1 $\beta$ , LA IL-6 Y DE LA IL-8 POR EL $CdCl_2$**

La hepatotoxicidad producida por el cadmio está relacionada con la respuesta inflamatoria y a menudo está acompañada por la infiltración de células inflamatorias



principalmente neutrófilos (Horiguchi y col. 2000), la expresión de numerosas citocinas pro-inflamatorias y proteínas de fase aguda. Hay evidencias de que las células de Kupffer, que son los macrófagos residentes del hígado tratadas con cadmio (Yamano y col. 2000; Harstad y Klaassen 2002) son las principales productoras de un número de moléculas citotóxicas. Entre estas están las ERO, las especies de nitrógeno y proteínas tales como el IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  que dañan al hepatocito. Además, la habilidad de estas células para remover varias sustancias exógenas y endógenas es un proceso fisiológico importante (Arteel 2003), sin embargo, con un estímulo inapropiado estas células pueden causar daño a un tejido normal. Se sugiere que otros tipos celulares tales como células endoteliales y epiteliales liberan IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y otros mediadores inflamatorios que amplifican la respuesta inflamatoria (Haddad 2002). Sin embargo, la expresión de TNF- $\alpha$  y otras citocinas incluyendo a la IL-1 $\beta$ , y a la IL-6 se ha observado en hepatocitos tratados con cadmio (Marth y col. 2000) y peróxido de hidrógeno (Dalton y col. 1999). En las células HepG2 se demostró la expresión de las citocinas en presencia de CdCl<sub>2</sub>. Para la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , se encontró la máxima expresión una hora después de la exposición al metal, mientras que para la IL-6 y la IL-8 fueron a las 3 h. Resultados similares, se presentaron en células mononucleares humanas tratadas con cadmio, en donde se muestra que el ARNm de la IL-1 $\beta$  y del TNF- $\alpha$  disminuyen en función del tiempo (Marth y col. 2000). El grupo de Karlsson y col. (1998) reporta las cinéticas de tiempo para la expresión de las citocinas, encontrando que para el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  están entre 1-3 h y para la IL-6 de 2-3 h. La IL-6 es considerada como una interleucina que

contribuye al proceso inflamatorio (Yu y col. 2002) y es considerada como el mediador principal de la respuesta de fase aguda en las células HepG2 (Karlsson y col. 1998). Esta IL-6 se une a su receptor y activa la vía de señalización JAK1/STAT3 que juega un papel importante en la inflamación y en la producción de citocinas (Hanada y Yoshima 2002). Sin embargo, también se le han dado propiedades protectoras a la IL-6, como la habilidad para inhibir la producción del TNF- $\alpha$  y de la IL-1 $\beta$ . Así como también incrementar los niveles del receptor antagonista IL-1 $\beta$ , del receptor soluble para el TNF- $\alpha$  (Xing y col. 1998) y en la síntesis de la proteína metalotioneína que se induce durante la respuesta de fase aguda, bajo condiciones de estrés oxidativo y en presencia de CdCl<sub>2</sub> en células HepG2 (Shimoda y col. 2001). Esta proteína tiene una elevada afinidad por el cadmio y por lo tanto reduce las concentraciones de cadmio libre en la célula (Klaassen y col. 1999). La IL-6 puede activar a las células mononucleares para secretar la IL-8 que es una citocina quimiotáctica que tiene un papel importante en la infiltración de neutrófilos y en el daño hepático por incrementar la producción de las ERO. Esta quimocina contiene en su región promotora un sitio de unión para el NF- $\kappa$ B, el NF-IL6 y la AP-1 que interaccionan cooperativamente para inducirla (Roebuck 1999). Así mismo, se ha demostrado que la expresión del gen de la IL-8 tanto por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lakshminarayanan y col. 1998) como por citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  puede ser un proceso independiente del NF- $\kappa$ B y que sólo puede requerir de la AP-1 (Roebuck y col. 1999; Wu y col. 2002) vía la activación de las MAPS. Resultados reportados por Haddad (2002), indican un papel potencial para las citocinas en inducir la

acumulación intracelular de diferentes especies de oxígeno tales como  $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$ ,  $H_2O_2$  que son tóxicos para la célula y que ejercen su efecto en la activación de los factores de transcripción.

#### **5.4 EXPRESIÓN DE LA IL-1 $\beta$ , LA IL-6 Y DE LA IL-8 POR EL TNF- $\alpha$**

Se le ha dado al TNF- $\alpha$  un papel importante como mediador en el daño hepático (Bradham y col. 1998) porque induce el estrés oxidativo y produce las ERO que están implicados en la muerte celular (Liu y col. 2002). Kayama y col. (1995), mencionan que la presencia de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en el hígado es una respuesta primaria ante la agresión y que son los primeros mediadores que están involucrados en la inducción de otras citocinas como la IL-6 y la IL-8. En las células HepG2, se demostró que la inducción de los ARNm de las interleucinas 1 $\beta$ , 6 y 8 por el cadmio es en parte vía el TNF- $\alpha$ . El grupo de Dong (1998) demostró que las células HepG2 responden al TNF- $\alpha$  y que es por estrés oxidativo. El mecanismo mediante el cual el TNF- $\alpha$  actúa no se conoce con exactitud, pero parece ser que están involucradas las ROS, tales como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que son generados por este factor (Chandel y col. 2001). Las ERO dentro el hígado pueden ser originados de fuentes endógenas como sub-producto de las células de Kuffer activadas, de la actividad de enzimas oxidantes y de una alteración en el estado redóx celular seguido de un daño mitocondrial (Fernández-Checa y col. 1997). Hay reportes que indican que la mitocondria es la principal fuente de las ERO que median la señalización TNF- $\alpha$ . Por ejemplo, el TNF- $\alpha$  altera la permeabilidad de

la mitocondria con la liberación del citocromo c y subsecuentemente la activación de las caspasas llevando a la célula a la apoptosis (Chandel y col. 2001). El TNF- $\alpha$  se une a su receptor y se expresa la IL-6. Carter y col. (1997), menciona que la expresión de la IL-6 e IL-8 pueden ser reguladas por eventos de señalización por un incremento de la fosforilación de la proteína tirosina. La regulación de la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$  es mediada por la activación de factores de transcripción como la AP-1 y el NF- $\kappa$ B, por unirse a los elementos regulatorios en el promotor de los genes de las citocinas (Pryhuber y col. 2003). Además la presencia de las ROS activan a estos factores de transcripción (Gius y col. 1999; Karin y col. 2001).

## **5.5 EFECTO DEL CADMIO EN LA PRODUCCIÓN DE LA HSP70**

Las células responden al estrés mediante la expresión de proteínas de choque térmico (Hsps), particularmente la Hsp 70 que funciona como un chaperon molecular que contribuye a la estabilización de las proteínas intracelulares (Hartl 1996). La familia de las proteínas Hsp 70 es la más estudiada y es inducida en respuesta a un estímulo externo incluyendo al cadmio (Goering y col. 1993; Salminen y col. 1996). En nuestro estudio, las células HepG2 tratadas con 5  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>, incrementaron la proteína Hsp 70 de manera dependiente del tiempo de exposición, a partir de las 3 h. El grupo de Tchounwou y col. 2001, también utilizaron las células HepG2 y encontraron un incremento de cuatro veces en la inducción de la Hsp 70 con 5  $\mu$ g/ml de CdCl<sub>2</sub> durante 6h. En hepatocitos de rata tratadas con CdCl<sub>2</sub>, encontraron un incremento en la inducción de la proteína Hsp 70 también a partir de las 3 h de

tratamiento (Kuester y col. 2002). Las Hsps sido asociadas con mecanismos de citoprotección contra una gran variedad de tóxicos (Goering y col 1993), a través de la interacción proteína-proteína para preservar la conformación de la proteína dañada. Además se conoce que las Hsps se producen tempranamente después de un daño hepático (Dai y col. 1998). Por lo tanto la síntesis inmediata de estas Hsps pueden contribuir a la habilidad del hígado para reparar el daño producido por el cadmio. Se conoce que el CdCl<sub>2</sub> incrementa la expresión de la Hsp70 y el grupo de Majumder (2003), reporta un incremento de cinco veces en el ARNm de la Hsp 70 en las células HepG2 tratadas con 30 μM de CdCl<sub>2</sub> por 3 h. Sin embargo, no se conoce exactamente como el CdCl<sub>2</sub> incrementa esta expresión pero existen evidencias de que el CdCl<sub>2</sub> estimula la unión del factor de transcripción de choque al promotor de la Hsp70 (Gordon y col. 1997).

## **5.6 EFECTO DEL CADMIO EN LA ACTIVACIÓN DEL NF-κB Y LA AP-1**

Existen evidencias de que el cadmio puede estimular señales de traducción dentro de las células. Entre estas cascadas tenemos a las MAPS (ERK, p38 y c-Jun) (Saydam y col. 2002), a los moduladores de la apoptosis como Bcl-2 (Ishido y col. 2002), a la caspasa-3 en células HepG2 (Shimoda y col. 2003) y a los factores de transcripción como el NF-κB y AP-1 que son sensibles al estrés oxidativo (Browie y O'Neill 2000; Karin y Shaulian 2001). AP-1 es una proteína dimérica que tiene un papel muy importante en la proliferación, diferenciación, apoptosis, inflamación y respuesta al estrés (Tacchini y col. 2002) y está compuesta por el heterodímero

Fos/Jun o el homodímero Jun/Jun derivados de los productos de los genes c-fos y c-jun. Shukla y colaboradores (2000), demostraron que c-fos y c-jun, se activan rápidamente en células alveolares tratadas con CdCl<sub>2</sub> dentro de los 15-30 min y que este incremento en la activación de AP-1 está asociado a la proteína c-Jun pero no a c-Fos. Además AP-1 permanece inactiva hasta que la subunidad c-Jun es fosforilada en un residuo de serina específico (Wisdom 1999). En este trabajo se demostró que la activación del factor de transcripción AP-1 se incrementó nueve veces con 5 μM de CdCl<sub>2</sub> a las 2 h de tratamiento en células HepG2 y en células alveolares fue de cuatro veces con 10 μM de CdCl<sub>2</sub> (Shukla y col. 2000). Esto hace suponer que las células hepáticas son más sensibles al tratamiento con CdCl<sub>2</sub> que las células de pulmón. El grupo de Huang (2001), también reporta la activación de AP-1 a partir de la 1.5 h con un pico máximo a las 4 h. Se sabe que AP-1 regula muchos genes asociados con la producción de citocinas proinflamatorias (Pennypacker 1998). TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8 tienen sitios de unión para los factores de transcripción tales como NF-κB y AP-1 (Grandjean y col. 2002; Pryhuber y col. 2003). Por otro lado, se sabe que el NF-κB tiene un papel muy importante en la regulación de muchos genes involucrados en la respuesta inflamatoria, en el crecimiento celular y en la apoptosis (Bours y col. 2000). Sin embargo, este factor de transcripción no se activó. Normalmente el NF-κB es retenido en el citoplasma por un inhibidor (I-κB) y en respuesta a una variedad de estímulos, el complejo NF-κB/I-κB se disocia y el NF-κB libre migra al núcleo donde se une al ADN. Respecto a esto hay evidencias de que la inhibición en la activación de NF-κB por su represor I-κB disminuye la muerte celular por estrés oxidativo por un

incremento en la expresión del gen de la I- $\kappa$ B en una línea celular hepática (Jones y col. 2000). Otro mecanismo inhibitorio del NF- $\kappa$ B, es con respecto a la Hsp70 ya que se ha propuesto que esta interactúa con I- $\kappa$ B, previniendo la subsecuente degradación o disociación del NF- $\kappa$ B (Cuervo y col. 1998). En nuestras células tratadas con CdCl<sub>2</sub> se demostró un incremento en la inducción de la proteína Hsp 70, la cual podría estar regulando de manera negativa al factor NF- $\kappa$ B como mecanismo de protección. Además se conoce que las ERO pueden incrementar o reprimir las actividades biológicas de los factores de transcripción de manera directa, a través de modificaciones por oxidación en los residuos de los grupos sulfhidrilos (cisteína o metionina) o por otras señales tales como las alteraciones en sus estados de fosforilación/desfosforilación (Kim y col. 2000). La sensibilidad de los factores de transcripción a cambios en el estado redox es variable y depende en parte de la conformación y contenido de cisteína/metionina (Kim y col. 2000), ya que estos residuos tienen un papel muy importante en la habilidad del factor para reconocer y unirse al ADN y a la interacción con otros factores de transcripción (Gius y col. 1999).

## **5.7 EFECTO DEL TNF- $\alpha$ Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA AP-1**

Se conoce que AP-1 es activado por el TNF- $\alpha$  (Garg y Aggarwal 2002) y que es regulado por una serie de enzimas conocidas como las MAPS (Dong y col. 2002) que son consideradas como intermediarios importantes en las vías de señalización en muchos procesos patológicos incluyendo el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. JNK1 y JNK2 pertenecen a la familia de las MAPS y fosforilan a c-Jun, el

cual es un componente de AP-1 (Dong y col. 2002) y se sabe que estas cinasas son activadas por el TNF- $\alpha$  (Garg y Aggarwal 2002; Hirano y col. 2003), por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chuang y col. 2000; Show y col. 2003) y por el cadmio (Son y col. 2001; Show y col. 2003). En nuestras células se demostró que la activación del factor AP-1 por el cadmio es en parte vía TNF- $\alpha$ , ya que el anticuerpo contra este factor de necrosis disminuyó significativamente la activación de AP-1. Esto podría deberse, muy probablemente a que el TNF- $\alpha$  active las vías de señalización de las MAPS, las cuales regulan al AP-1. El TNF- $\alpha$  se une a su receptor de TNF, sucesivamente activa a la proteína AP-1 y activa la expresión de la IL-6 y la IL-8. Esto hace suponer que el incremento encontrado en la expresión de los ARNm de las IL-6 e IL-8 por el cadmio es vía TNF- $\alpha$  mediante la vía de señalización de la proteína AP-1. Además la activación prolongada de la proteína AP-1 puede ser responsable para mantener y regular los ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8. Las ERO regulan la expresión de una gran variedad de genes involucrados en la respuesta inflamatoria y el estrés a través de la activación de factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B y la AP-1 (Karin y Shaulian 2001). Los ERO puede mediar eventos de señalización celular y su participación en la activación de AP-1 fue evaluada. En este trabajo se demostró que el cadmio puede activar el AP-1 mediante los radicales libres, ya que la activación de este factor disminuyó por la presencia del antioxidante NAC (Wispiyono y col. 1998). Esto podría deberse a que el NAC suprime la activación de la enzima JNK que regula a AP-1 (Shrivastava y Aggarwal 1999). Se considera al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como un mediador intracelular que está involucrado en la regulación de las vías de transducción



mediante la activación de múltiples cinasas y fosfatasas (Rojkind y col. 2002), así mismo, activa al AP-1 (Tacchini y col. 2002). En nuestras células tratadas con peróxido de hidrógeno la activación de AP-1 se incremento 14 veces, sin embargo el mecanismo mediante el cual actúa no se conoce con exactitud, pero parece ser que es a través de la activación de las JNK1 y JNK2 que regulan al AP-1 (Show y col. 2003) o por el TNF- $\alpha$ , ya que se sabe que el estrés oxidativo formado por el peróxido en hepatocitos produce y secreta este factor de necrosis (Horbach y col. 1997). También parece estar involucrada la proteína cinasa C y eventos dependientes de fosforilación. Además se sabe que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la reacción de Fenton y metales como el fierro (Fe<sup>2+</sup>), se convierte en un radical muy potente que es el hidroxilo, el cual genera estrés oxidativo en la célula activando al factor sensible al estrés. Esto sugiere que la activación de este factor es mediado por las ERO en respuesta a un estímulo específico.

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente tesis indican que el cadmio induce estrés oxidativo en las células HepG2 (figura 11). Hay evidencia de que las ERO son formadas en presencia del cadmio y que estas pueden ser las responsables de los efectos tóxicos del metal. Así mismo se sabe que el cadmio disminuye la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD, la catalasa y la GSH peroxidasa que controlan la concentración de las ERO formadas de tal manera que se genera un estrés oxidativo. Como consecuencia de este estrés se incrementaron los niveles de TBARS y se disminuyó el contenido de GSH considerado también como un mecanismo de defensa contra el daño oxidativo de las ERO. El cadmio incrementó los ARNm de la IL-1 $\beta$  y del TNF- $\alpha$  de manera temprana y generó la activación del factor de transcripción AP-1 que muy probablemente participe en la inducción de la IL-8 y de la IL-6. La IL-6 es considerada como una proteína de fase aguda y tiene un papel muy importante en la producción de la MT que se une al cadmio para disminuir la concentración intracelular del metal y el daño oxidativo. El cadmio incrementó la producción de la Hsp70 que controla el daño oxidativo por interaccionar con las ERO y regula la activación de AP-1 por dos vías: por activar a la enzima JNK que fosforila la subunidad Jun de la AP-1 para activarlo y por controlar la inducción y la secreción de las citocinas inflamatorias especialmente el TNF- $\alpha$  que se sabe que activa a la AP-1. Por otro lado la Hsp70 regula de manera negativa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B por inhibir la fosforilación del I $\kappa$ B que es un inhibidor que mantiene al NF- $\kappa$ B en el citosol. Todo esto parece indicar que hay varios factores implicados en la

activación de la AP-1 inducido por el cadmio. Sería interesante continuar con estudios moleculares para poder conocer de que manera el cadmio activa las vías de señalización que regulan a la AP-1 para poder comprender más el mecanismo de la hepatotoxicidad.

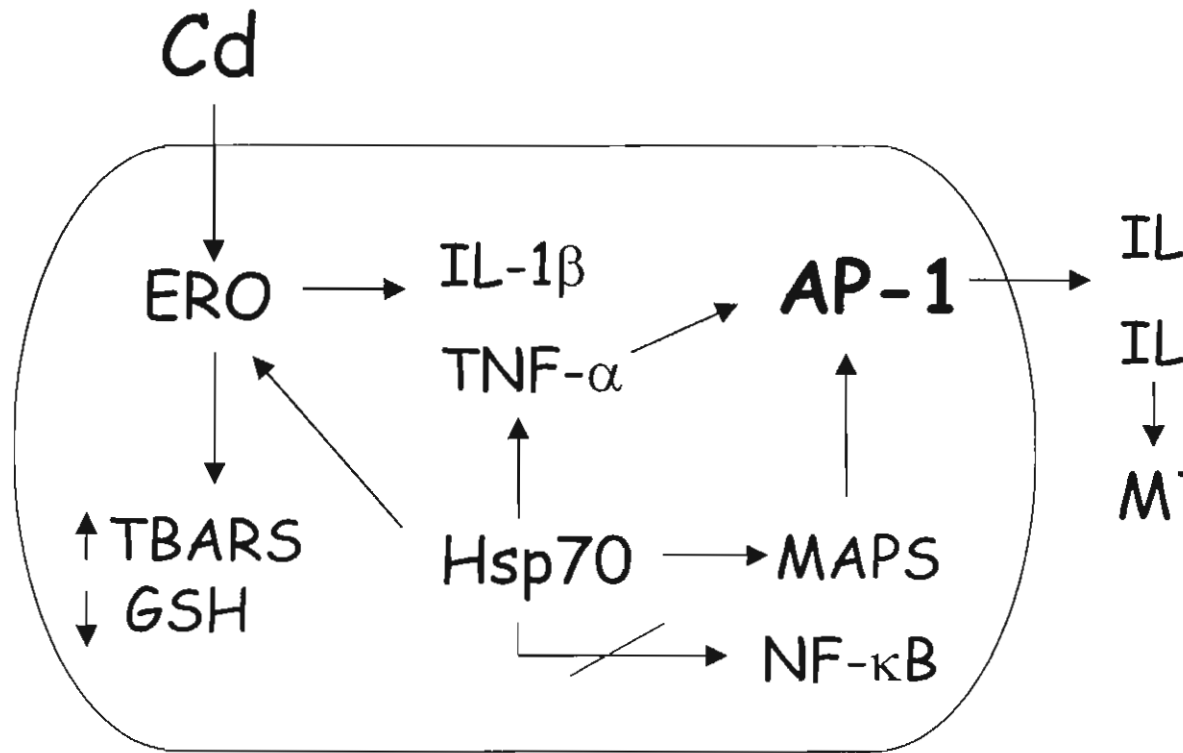


Figura 11. Mecanismo de acción posible del cadmio en las células HepG2.

## BIBLIOGRAFIA

- Andersen O., Nielsen J.B., Sorensen J.A. y Scherrebek L. (1994). Experimental localization of intestinal uptake site for metals (Cd, Hg, Zn, Se) in vivo in mice. *Environ. Health Perspect.* 102: 199-206.
- Antonio M.T., Lopez N. y Leret M.L. (2002). Pb and Cd poisoning during development alters cerebellar and striatal function in rat. *Toxicology* 176: 69-66.
- Arrigo A.P. (1999). Gene expresión and the thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 936-944.
- Arteel G.E. (1993). Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterology* 124: 778-790.
- ATSDR. (1999). Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, GA.
- Baeuerle P.A. y Baltimore D. (1996). NF- $\kappa$ B: 10 years after. *Cell* 87: 13-20.
- Baldwin A.S. (1996). The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Ann. Rev. Immunol.* 14: 649-683.
- Beyersmann D. y Hechtenberg S. (1997). Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144: 247-261.
- Bours V., Bonizzi G., Bentires-Alj M., Bureau F., Piette J., Lekeux P. y Merville M. (2000). NF- $\kappa$ B activation in response to toxic and therapeutic agents: role in inflammation and cancer treatment. *Toxicology* 153: 27-38.
- Bradford M.M. (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.
- Bradham C.A., Plumpe J., Manns M.P., Brenner D.A. y Trautwein C. (1998). Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 275: G387-G392.
- Browie A. y O'Neill L.A.J. (2000). Oxidative stress and nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Biochem. Pharmacol.* 59: 13-23.

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

Buege J.A. y Aust S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. En: *Methods in Enzymology* (S. Fleischer and L. Packer, eds). Academic Press, New York, vol. 52, pp 302-310.

Carter J.D., Ghio A.J., Samet J.M. y Devlin R.B. (1997). Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particles is metal-dependent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146: 180-188.

Casalino E., Calzaretto G., Sblano C. y Landriscina C. (2002). Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 179, 37-50.

Cavigelli M., Li W.W., Lin A., Su B., Yoshioka K. y Karin M. (1999). The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J.* 15: 6269-6279

Chang L. y Karin M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40.

Chandel N.S., Schumacker P.T. y Arch R.H. (2001). Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* 276: 42728-42736.

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

Chomczynski P. A. (1993). Reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue sample. *Biotechniques.* 15: 532-536.

Chuang S.M., Liou G.Y. y Yang J.L. (2000). Activation of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases by chromium (VI) is mediated through oxidative stress but does not affect cytotoxicity. *Carcinogenesis* 21: 1491-1500.

Cuervo A.M., Hu W., Lim B. y Dice J.F. (1998). I- $\kappa$ B is a substrate for a selective pathway of lysosomal proteolysis. *Mol. Biol. Cell* 9: 1995-2010.

Dai C.L., Kume M., Yamamoto Y., Yamagami K., Yamamoto H., Nakayama H., Ozaki N., Shapiro A.M., Yamamoto M. y Yamaoka Y. (1998). Heat shock protein 72 production in liver tissue after experimental total hepatic inflow occlusion. *Br. J. Surg.* 85: 1061-1065.

Dalton T.P., Palmiter R.D. y Andrews G.K. (1994). Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factor/antioxidant response element and metal response promoter elements. *Nucleic. Acids. Res.* 22: 5016-5023.

Dalton T.P., Shertzer H. G. y Puga A. (1999). Regulation of genes expression by reactive oxygen. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 39: 76-101.

Dargel R. (1992). Lipid peroxidation. ¿A common pathogenetic mechanism?. *Exp. Toxic. Pathol.* 44: 169-181.

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

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

Dickinson D.A. y Froman H.J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolis. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1019-1026.

Donato M.T., Castell J.V. y Gomez Lechon J. (1991). Co-cultures of hepatocytes with epithelial-like cell lines: expressiono of drugs biotransformation activities of hepatocytes. *Cell. Biol. Toxicol.* 7:1-14.

Dong C., Davis R.J. y Flavell R.A. (2002). MAP kinases in the immune response. *Ann. Immunol.* 20: 55-72.

Dong W., Simeonava P.P., Gallucci R., Matheson J., Flood L., Wang S., Hubbs A. y Lustet M.I. (1998). Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151:359-366.

Dorta D.J., Leite S., DeMarco K.C., Prado I.M.R., Rodríguez T., Mingatto F.E., Uyemura S.A., Santos A.C. y Curti C. (2003). A proposed séquense of events for cadmium-induced mitochondrial impairent. *J. Inorg. Bioch.* 97: 251-257.

Eaton D.L. y Bammler T.K. (1999). Concise review of the glutathione S- transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.* 49: 156-164.

Elsenhans B., Strugala G.L. y Schafer S.G. (1997). Small-intestinal absorption of cadmium and the significance of mucosal metallothionein. *Hum. Exp. Toxicol.* 16: 429-434.

Fatur T., Tusek M., Falnoga I., Scancar J., Lah T.T. y Filipic M. (2002). DNA damage and metallothionein synthesis in human hepatoma cells (HepG2) exposure to cadmium. *Food Chem. Toxicol.* 40: 1069-1076.

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

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

Fernández-Checa J.C., Kaplowitz N., García-Riuz C., Colell A., Miranda M., Mari M., Ardite E. y Morales A. (1997). GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am. J. Physiol.* 273: G7-G17.

Filomeni G., Rotilio G. Y Cirilol M.A. (2002). Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1057-1064.

Flohe I., Briglius-Flohe R., Saliou C., Traber M.G. y Packer L. (1997). Redox regulation of NF- $\kappa$ B activation. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 1115-1126.

Foxwell B.M.J., Barrett K. y Feldman M. (1992). Cytokine receptors, structure and signal transduction. *Clin. Exp. Immunol.* 90: 161-169.

Fridovich I. (1997). Superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 272: 18515-18517.

Garg A.K. y Aggarwal B.B. (2002). Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol. Immunol.* 39: 509-517.

Ghibelli L., Fanelli C., Rotilio G., Lafavia E., Coppola S., Colussi C., Civitareale P. y Ciriolo M.R. (1998). Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J.* 12: 479-486.

Gius D., Botero A., Shah S. y Curry H.A. (1999). Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1. *Toxicol. Lett.* 106: 93-106.

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

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



Gong Q. y Hart B.A. (1997). Effect of thiols on cadmium-induced expression of metallothionein and other oxidant stress genes in rat lung epithelial cells. *Toxicology* 119: 179-191.

Gordon S., Bharadwaj S., Hnatov A., Ali A. y Ovsenek N. (1997). Distinct stress-inducible and developmentally regulated heat shock transcription factor in xenopus oocytes. *Dev. Biol.* 181: 47-63.

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

Grandjean-Laquerriere A., Gangloff S. C., Naour R. L., Trentesaux Ch., Hornebeek W. y Guenounou M. (2002). Relative contribution of NF- $\kappa$ B and AP-1 in the modulation by curcumin and pyrrolidine dithiocarbamate of the UVB-induced cytokine expression by keratinocytes. *Cytokine* 18, 168-177.

Grooten J., Goossens V., Vanhaesebroeck B. y Fiers W. (1993). Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: early events in tumour necrosis factor induced cytotoxicity. *Cytokine* 5: 546-555.

Guillouzo A. (1998). Liver cell models in vitro toxicology. *Environ. Health Persp.* 106: 511-525.

Gutierrez M.C., Bucio L., Souza V., Gomez J.L., Campos C y Carabez A. (1994). Expresión of some hepatocyte-like functional properties of WRL-68 in culture. *In Vitro Cell & Develop. Biol.* 30A: 366-371.

Gutierrez-Ruiz M.C., Quiroz S.C., Souza V., Bucio L., Hernández E., Olivares I.P., Liorente L., Alvarado C., Vargas Voráckova F. y Kershenobich D. (1999). Cytokines, growthfactors and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde and LPS. *Toxicology* 134: 197-207.

Haddad J.J. (2002). Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell. Signal.* 14: 879-897.

Hanada T. y Yoshima A. (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cyt. Grow Factor Review.* 13: 413-421.

Harstad E. B. y Klaassen C. D. (2002). Gadolinium chloride pretreatment prevents cadmium chloride-induced liver damage in both Wild-Type and MT-Null mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 180, 178-185.

Hartl F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular proteins folding. *Nature* 381: 571-579.

Hatcher E.L., Chen Y. y Kang Y.J. (1995). Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities. *Free Radicals Biol. Med.* 19:805-812.

Heinrich P.C., Behrmann I., Muller G., Schaper F. y Graeve L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the pg130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334: 297-314.

Higuchi M., Proske R.J. y Yeh E.T. (1998). Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene* 17: 2515-2524.

Hirano F., Komura K., Fukawa E. y Makino I. (2003). Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced RANTES chemokine expression via activation of NF- $\kappa$ B and p38 MAP kinase: roles of TNF- $\alpha$  in alcoholic liver diseases. *J. Hepatol.* 38: 483-489.

Horbach M., Gerer E. y Kahl R. (1997). Influence of acetaminophen treatment and hydrogen peroxide treatment on the release of a CINC-related protein and TNF- $\alpha$  from rat hepatocyte cultures. *Toxicology* 121: 117-126.

Horiguchi H., Harada A., Oguma E., Sato M., Ho A. Y., Kayama F., Fukushima M. y Matsushima K. (2000). Cadmium-induced acute hepatic injury is exacerbated in human interleukin-8 transgenic mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 163, 231-239.

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 *in vivo*. *Mol. Cell. Biochem.* 222: 141-147.

IARC. (1993). Cadmium and certain cadmium compounds, in: IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human: beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. IARC monographs, vol. 58. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, pp. 119-146, 210-236.

Ishido M., Ohtsubo R., Adachi T. y Kunimoto M. (2002). Attenuation of both apoptotic and necrotic actino of cadmium by Bcl-2. *Environ. Health Perspect.* 110: 37-42.

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

Jacobson M.D., Weil M. y Raff M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354.

Jacquier-Sarlin M.R. y Polla B.S. (1996). Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: role of thioredoxin. *Biochem. J.* 318: 187-193.

Jacquier-Sarlin M.R., Fuller K., Dinh-Xuan A.T., Richard M.J. y Polla B.S. (1994). Protective effects of hsp70 in inflammation. *Experientia* 50: 1031-1038.

Jaeschke H., Gores G.J., Cederbaum A.I., Hinson J.A., Pessayre D. y Lemasters J.J. (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65: 166-176.

Jones B.E., Lo C.R., Liu H., pradhan Z., Garcia L., Srinivasan A., Valentino K.L. y Czaja M.J. (2000). Role of caspases and NF- $\kappa$ B signaling in hydrogen peroxide and superoxide induced hepatocyte apoptosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 278: G693-G699.

Joseph P., Lei Y.X., Whong W.Z. y Ong T.M. (2002). Oncogenic potential of mouse translation elongation factor-1 delta: a novel cadmium-responsive proto-oncogene. *J. Biol. Chem.* 277: 6131-6136.

Kagan V.E., Kuzmenko A.I., Tyurina Y.Y., Shvedova A.A., Matsura T. y Yalowich J.C. (2001). Pro-oxidant and antioxidant mechanisms of etoposide in HL-60 cells: Role of myeloperoxidase. *Cancer Res.* 61: 7777-7784.

Karlsson J.O., Yarmush M.L. y Toner M. (1998). Interaction between heat shock and interleukin 6 stimulation in the acute-phase response of human hepatoma (HepG2) cell. *Hepatology* 28: 994-1004.

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

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

Karin M. y Shaulian E. (2001). AP-1: linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death. *IUBMB Life* 52: 17-24.

Kayama F., Yoshida T., Elwells M.R. y Luster M.I. (1995). Cadmium-induced renal damage and proinflammatory cytokines: Possible role of IL-6 in tubular epithelial cell regeneration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 134: 26-34.

Kelly J.H. y Darlington G.J. (1989). Modulation of the liver specific phenotype in the human hepatoblastoma line HepG2. *In vitro Cell. & Dev. Biol.* 25: 217-222.

Kim J.R., Yoon H.W., Know K.S., Lee S.R. y Rhee S.G. (2000). Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Anal. Biochem.* 283: 214-221.

Kim S.C., Cho M.K., Kim S.G. (2003). Cadmium-induced non-apoptotic cell death mediated by oxidative stress under the condition of sulfhydryl deficiency. *Toxicol. Lett.* 144: 325-336.

Klaassen C.D. (2001). *Casarett and Doull's Toxicology*. McGraw-Hill Medical Publishing Division. New York, pp. 822-826.

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

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

Klaassen C.D., Waalkes M.P. y Cantilena Jr. L.R. (1984). Alteration of tissue disposition of cadmium by chelating agents. *Environ. Health. Perspect.* 54: 233-242.

Koizumi T., Shirakura H., Kumagai H., Tatsumoto H. y Suzuki K.T. (1996). Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium-induced active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane. *Toxicology* 114: 125-134.

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

Kuester R. K., Waalkes M. P., Goering P. L., Fisher B. L., McCuskey R. S. y Sipes I. G. (2002). Differential hepatotoxicity induced by cadmium in Fischer 344 and Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* 65, 151-159.

Kyriakis J.M. (1999). Activation of the AP-1 transcription factor by inflammatory cytokines of the TNF family. *Gene Expr.* 7: 217-231.

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227, 680-685.

Lakshminarayanan V., Weiss E. Y Roebuck K. (1998). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tumor necrosis factor- $\alpha$  induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cell. *J. Biol. Chem.* 273: 32670-32678.

- Leong K.G. y Karsan A. (2000). Signaling mediated by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Histol Histopathol.* 15:1303-1325.
- Liu H., Jones B.E., Bradham C. y Czaja M.J. (2002). *Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 282: G257-G266.
- Majumder S., Ghoshal K., Summers D., Bai S., Datta J. y Jacob S.T. (2003). Chromium (VI) down-regulated heavy metal-induced metallothionein gene transcription by modifying transactivation potential of the key transcription factor, metal-responsive transcription factor 1. *J. Biol. Chem.* 278: 26216-26226.
- Manna S.K. y Aggarwal B.B. (1998). Interleukine-4 down-regulates both form of tumor necrosis factor receptor and mediated apoptosis, NF- $\kappa$ B, AP-1 and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 273: 33333-33341.
- Marth E., Barth S. y Jelovcan S. (2000). Influence of cadmium on the immune system: Description of stimulating reactions. *Cent. Eur. J. Public Health* 8: 40-44.
- Mates J.M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153: 83-104.
- Minami A., Takeda A., Nishibaba D., Takefuta S. y Oku N. (2001). Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. *Brain Res.* 16: 336-339.
- Morales A., García-Ruiz C., Miranda M., Marí M., Colell A., Ardite E. y Fernández-Checa J.C. (1997). Tumor necrosis factor increases hepatocellular glutathione by transcriptional regulation of the heavy subunit chain of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase, *J. Biol. Chem.* 272: 30371-30379.
- Moshage H. (1997). Cytokines and the hepatic acute phase response. *J. Pathol.* 181: 257-266.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and Cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63.
- Ottenwalder H. y Simon P. (1987). Differential effect of N-acetylcysteine on excretion of the metals Hg, Cd, Pb and Au. *Arch. Toxicol.* 60: 401-402.
- Palmiter R.D. (1994). Regulation of metallothionein genes appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active MTF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1219-1223.
- Pennypacker K. (1998). AP-1 transcription factors. *Int. Rev. Neurobiol.* 42: 169-197.

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

Pryhuber G.S., Huyck H.L., Baggs R., Oberdörster G. y Finkelstein J.N. (2003). Induction of chemokines by low-dose intratracheal silica is reduced in TNFRI (p55) null mice. *Toxico. Sci.* 72: 150-157.

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

Rigg A. y Sikora K. (1997). Genetic prodrug activation therapy. *Mol. Med. Today* 3: 359-365.

Risso-de Faverney C., Devaux A., Lafaurie M., Girard J.P., Bailly B. y Rahmani R. (2001). Cadmium induced apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquat. Toxicol.* 53: 65-76.

Roebuck K.A. (1999). Regulation of interleukin-8 gene expression. *J. Interferon cytokine Res.* 19: 429-438.

Roebuck K.A., Carpenter L.R., Lakshminarayanan V., Page S.M., Moy J.V. y Thomas L.L. (1999). Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B. *J. Leukoc. Biol.* 65: 291-298.

Rojkind M., Dominguez J.A., Nieto N. y Greenwel P. (2002). Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell. Mol. Life. Sci.* 59:1-20.

Salminen W. F., Voellmy R. Jr. y Roberts S.M. (1996). Induction of hsp 70 in HepG2 cells in response to hepatotoxicants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141, 117-123.

Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis T. (1989). *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory. Press, Cold Spring Harbor, New York.

Samson S.L. y Gedamu L. (1998). Molecular analices of metallothionein gene regulation. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 59: 257-288.

Saydam N., Adams T.K., Steiner F., Schaffner W. y Freedman J.H. (2002). Regulation of metallothionein transcription by the metal responsive transcription factor MTF-1. *J. Biol. Chem.* 276: 25487-25495.

Schafer F.Q., Buettner G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 1191-1212.

Sen C.K. y Packer L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 10: 709-720.

Shaikh Z. A., Vu T. T. y Zaman K. (1999). Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154, 256-263.

Shimoda R., Achanzar W.E., Qu W., Nagamine T., Takagi H., Mori M. y Waalkes M.P. (2003). Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicol. Sci.* 73: 294-300.

Shimoda R., Nagamine T., Takagi H., Mori M. y Waalkes M.P. (2001). Induction of apoptosis in cells by cadmium: Quantitative negative correlation between basal or induced metallothionein concentration and apoptotic rate. *Toxicol. Sci.* 64: 208-215.

Show M.C., I C.W., Yi S.H. y Jia L.Y. (2003). Short-term depletion of catalase suppresses cadmium-elicited c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis: role of protein phosphatases. *Carcinogenesis* 24: 7-15.

Shreiber M., Baumann B., Cotton M., Angel P y Wagner E. (1995). Fos is a essential component of the mammalian uv response. *EMBO J.* 14: 5338-5349.

Shrivastava A. y Aggarwal B.B. (1999). Antioxidants differentially regulate activation of nuclear factor- $\kappa$ B, activator protein-1, c-Jun amino-terminal Kinases, and apoptosis induced by tumor necrosis factor: evidence that JNK and NF- $\kappa$ B activation are not linked to apoptosis. *Antioxid. Redox Signal* 1: 181-191.

Shukla G. S., Shukla A., Potts R. J., Osier M., Hart B. A. y Chiu J. F. (2000). Cadmium-mediated oxidative stress in alveolar epithelial cells induced the expression of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase catalytic subunit and glutathione S-transferase  $\alpha$  and  $\pi$  isoforms: Potential role of activator protein-1. *Cell Biol. Toxicol.* 16, 347-362.

Simpson K.J., Lukacs N.W., Colletti L., Strieter R.M. y Kunkel S.L. (1997). Cytokines and the liver. *J. Hepatol.* 27:1120-1132.

Smith-Mungo L.I. y Kagan H.M. (1998). Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol.* 16: 387-398.

Son M.H., Kang K.W., Lee C.H. y Kim S.G. (2001). Potentiation of cadmium-induced cytotoxicity by sulfur amino acid deprivation through activation of extracellular signal-

regulated Kinase  $\frac{1}{2}$  (ERK  $\frac{1}{2}$ ) in conjunction with p38 kinase or c-Jun N-terminal kinase (JNK): complete inhibition of the potentiated toxicity by U0126 and ERK  $\frac{1}{2}$  and p38 kinase inhibition. *Biochem. Pharmacol.* 62: 1379-1390.

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

Stojadinovic A., Kiang J., Goldhill J., Matin D., Smallridge R., Galloway R. y Shea-Donohue T. (1997). Induction of the heat shock response prevents tissue injury during acute inflammation of the rat ileum. *Crit. Care. Med.* 25: 309-317.

Szuster-Clesielska A., Stachura a., Slotwinska M., Kaminska T., Sniezk R., Paduch R., Abramczyk D., Filar J. y Kandefer-Szerzen M. (2000). The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* 145: 159-171.

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

Tandon S.K., Singh S., Prasad S., Khandekar K., Dwivedi V.K., Chatterjee M. y Mathur N. (2003). Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicol. Lett.* 145: 211-217.

Tchounwou P.B., Ishaque A.B. y Schneider J. (2001). Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (Hepg2) exposed to cadmium chloride. *Mol. Cel. Biochem.* 222: 21-28.

Thornalley P.J. y Vasak M. (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress: Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 27: 36-44.

Tietze F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27: 502-522.

Vayssier M. y Polla B.S. (1998). Heat shock proteins chaperoning life and death. *Cell stress* Chap. 3: 221-227.

Wang Z. y Templeton D.M. (1998). Induction of c-fos proto-oncogene in mesangial cells by cadmium. *J. Biol. Chem.* 273: 73-79.

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



Wispriyono B., Matsuoka M., Igisu H. y Matsuno K. (1998). Protection from cadmium cytotoxicity by N-Acetylcycteine in LLC-PK<sub>1</sub> cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287: 344-351.

Wu H.M., Wen H.C. y Lin W.W. (2002). Proteosoma inhibitors stimulate interleukin-8 expression via ras and apoptosis signal-regulateting kinase-dependent extracellular signal-related kinase and c-Jun N-terminal kinase activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27: 234-243.

Xing Z., Gauldie J., Cox G., Baumann H., Jordan M., Lei X.F. y Achong M.K. (1998). IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* 101: 311-320.

Yamano T., DeCicco L. A. y Rikans L. E. (2000). Attenuation of cadmium-induced liver injury in senescent male Fischer 344 rats: Role of Kupffer cells and inflammatory cytokines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162, 68-75.

Yang C.F., Shen H.M., Shen Y., Zhuang Z.X. y Ong C.N. (1997). Cadmium-induced oxidative cellular damage in human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells). *Environ. Health Perpect.* 195: 712-716.

Yoshida M., Fukumoto M., Kishimoto T., Yamamura Y., Shimizu H. y Sakai O. (1993). Effects of zinc, selenium and calcium on the nephrotoxicity of cadmium in primary cultures of rat renal proximal epithelial cells. *Biol. Tr. Elem. Res.* 36: 219-227.

Young I.S. y Woodside J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 54: 176-186.

Yu M., Zheng X., Witschi H. y Pinkerton K.E. (2002). The role interleukin-6 in pulmonary inflammation and injury induced by exposure to environmental air pollutants. *Toxicol. Sci.* 68: 488-497.



## Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells

Verónica Souza<sup>a</sup>, Ma. del Carmen Escobar<sup>a</sup>, Luis Gómez-Quiroz<sup>a</sup>, Leticia Bucio<sup>a</sup>, Elizabeth Hernández<sup>a</sup>, Edmundo Chávez Cossio<sup>b</sup>, Ma. Concepción Gutiérrez-Ruiz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco #186, Colonia La Vicentina, México, D.F. 09340, Mexico

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", México, D.F., Mexico

Received in revised form 5 December 2003; accepted 9 January 2004

### Abstract

Cadmium (Cd) has been regarded as one of the inflammation-related xenobiotics. Cd has been extensively studied in many cellular systems, but a lot of parameters have been evaluated in different experimental conditions. This study was undertaken to examine the effects of low cadmium concentrations in HepG2 cells in the oxidative stress produced, the IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), IL-6, and IL-8 expression, production of heat shock protein 70 (Hsp70) and the activation of nuclear factors activation protein-1 (AP-1) and NF- $\kappa$ B under the same experimental conditions. Also, the participation of TNF- $\alpha$  and oxidative stress in AP-1 activation was evaluated. Lipid peroxidation damage increased 1.5 times after the first hour of Cd treatment and increased 1.9 times after 2 h. Similar values were maintained until 6 h. Reduced glutathione (GSH) diminished 65% after 6 h CdCl<sub>2</sub> treatment. *N*-acetylcysteine (NAC) pre-treatment increased 332% GSH in Cd-treated cells. RNA was isolated from HepG2 cells after 0.5, 1, 3, or 6 h incubation with 1, 5, or 10  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  presented a maximum response after 1 h treatment, while IL-6 and IL-8 maximum response was after 3 h treatment. The Hsp70, determined by Western blot, was constitutively produced, and it increased after 3 h Cd treatment. NF- $\kappa$ B activation, determined by EMSA, was not increased as a result of Cd treatment. DNA binding of AP-1 was detected and increased, with time up to 4 h with an increment of 24 times control value with 5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>. The HepG2 cells were pretreated with anti-TNF- $\alpha$  antibody or 1 mM *N*-acetylcysteine 1 h before Cd treatment. Anti-TNF- $\alpha$  treatment reduced 67% AP-1 activation, while NAC 47.5%. These data indicate that, Cd-induced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , that probably, activate AP-1 transcription factor and IL-6 and IL-8 were induced. Anti-TNF- $\alpha$  and NAC partially inhibited AP-1 activation. All imply that, a number of factors participate in AP-1 cadmium-induced activation. The Hsp70 is produced by the HepG2 cells after cadmium treatment, and probably has a role in the non-participation of NF- $\kappa$ B in the cellular response.

© 2004 Published by Elsevier Ireland Ltd.

**Keywords:** Cadmium; AP-1; Hsp70; TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; IL-6; IL-8; HepG2

\* Corresponding author. Tel.: +52-5-55-804-6451; fax: +52-5-55-804-6451.  
E-mail address: [mcgr@xanum.uam.mx](mailto:mcgr@xanum.uam.mx) (Ma.C. Gutiérrez-Ruiz).

## 33 1. Introduction

34 The heavy metal cadmium (Cd) is a widespread industrial pollutant used in the manufacture of batteries, paints, plastics, and fertilizers. Cd is continuously released into the atmosphere by the burning of fossil fuels. Cd is also a contaminant of tobacco. As a consequence, many humans are exposed to increased levels of this metal (Watkin et al., 2003). In humans and other mammals, Cd adversely affects a number of organs and tissues. Liver and kidneys are the two primary organs in which the toxic effects of this metal are expressed (Kayama et al., 1995; Habeebu et al., 1998; Casalino et al., 2002). Cd has been regarded as one of the inflammation-related xenobiotics. In particular, Cd hepatotoxicity is closely related to inflammation, since after acute Cd exposure, the damaged liver tissues are often accompanied with infiltration of inflammatory cells (Yamano et al., 2000; Horiguchi et al., 2000; Kuester et al., 2002). The expression of the numerous genes in acute-phase proteins or inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) has been reported in Cd-treated cells (Dong et al., 1998; Harstad and Klaassen, 2002). Pathophysiological responses proximally or distally mediated by TNF- $\alpha$  in the liver include inflammatory cell infiltration, hyperlipidemia, oxygen radical generation, fibrogenesis, and cholestasis (Andus et al., 1991; Dinarello, 1993; Dong et al., 1998). The mechanism by which Cd causes this damage is incompletely understood, but the ability of Cd to elicit oxidant stress appears central. It has been shown that Cd is capable of depressing the level of endogenous thiol antioxidant, glutathione (GSH), and to inhibit mitochondrial electron transport at sites that stimulate the generation of the superoxide radical (Bucio et al., 1995; Stohs et al., 2000; Robertson and Orrenius, 2000; Escobar et al., 2002).

70 Cd evokes a varied series of responses that are dependent upon concentration, frequency of exposure, and cell type. One way Cd could exert diverse effects on cells is by modifying the activity of transcription factors, which ultimately are responsible for regulating gene expression (Watkin et al., 2003). This could occur by a direct interaction with Cd or by an indirect method involving the participation of signal transduction molecules. Activation protein-1 (AP-1) transcription factors are early response genes involved

in a diverse set of transcriptional regulatory processes (Shukla et al., 2000). Oxidants, inflammatory TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  modulate the activation of redox-sensitive AP-1 (Daffada et al., 1994; Grandjean-Laquerriere et al., 2002), which ultimately culminate in the downstream synthesis of a variety of acute-phase proteins. AP-1 refers to a family of related transcription factors, which frequently consists of either a *c-jun/c-fos* heterodimer or a *c-jun/c-jun* homodimer. Most dimer combinations bind the AP-1 recognition site, also known as the 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)-responsive element. Only one TPA-responsive element is present in the 5' untranslated region of some cytokines studied, that is to say TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 genes and some acute-phase proteins such as heat shock 70 (Hsp70).

A diverse array of metabolic insults including the exposure of cells to heavy metals, result in the increased expression of genes encoding Hsp. 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 (Yoo et al., 2000; Urani et al., 2001). Cd could induce the level of Hsp70 (Salminen et al., 1996).

The localization of Hsp in the nucleus, and the demonstration that Hsp's control the assembly of protein complexes has led to the suggestion that Hsp's may affect gene expression at the level of transcription through modulation of a transcription factor complex assembly (Carter, 1997). Some studies demonstrate that induction of heat shock response is associated with inhibition of NF- $\kappa$ B by a mechanism involving inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  degradation via a specific inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation (Shanley et al., 2000; Malhotra and Wong, 2002; Uchinami et al., 2002; Yamaoka, 2002).

The HepG2 cell line, derived from a human liver hepatoma, was chosen as the model system, since it is reported to retain many of the properties of primary cells. Also, this cell line displays the classic heat shock response (Urani et al., 2001).

Although cadmium toxicity has been extensively studied in many cellular systems, a lot of parameters have been evaluated independently and in different experimental conditions.

The purpose of the present study was to examine the effects of low cadmium concentrations, in which

128 cells presented high viability, in HepG2 cells. Oxidative stress damage, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 expression, production of Hsp70 and the activation of nuclear factors AP-1 and NF- $\kappa$ B were determined. The participation of TNF- $\alpha$  and oxidative stress in AP-1 activation were also evaluated under the same experimental conditions trying to propose a possible mechanism by which AP-1 is activated in HepG2 cadmium treated cells. We hypothesized, that different Cd concentrations induced cytokines with a differential profile depending on the concentration and time of exposure. TNF- $\alpha$  and oxidative stress participate in AP-1 activation. Cd-treated cells produce Hsp70 and could activate AP-1. Also NF- $\kappa$ B could not be activated due to the production of Hsp70 by the Cd treatment.

## 144 2. Materials and methods

### 145 2.1. Cell culture

146 The HepG2 cells, a human hepatocellular carcinoma cell line were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). HepG2 were routinely grown in a monolayer culture in the presence of a Williams E medium supplemented with 8% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories Inc., Logan Utah, USA), penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 mg/ml). Cells were grown at 37°C in disposable plastic bottles (Nunc, USA), in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. The medium was replaced twice a week, and cells were trypsinized and diluted every 7 days at a ratio of 1:3.

### 159 2.2. Cytotoxicity assays

160 The cytotoxicity of CdCl<sub>2</sub> was determined with an 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-dihenzotetrazolium bromide (MTT) test according to Mosmann (1983). The assay measures the conversion of MTT to insoluble formazan by dehydrogenase enzymes of the intact mitochondria of living cells. The HepG2 cells were seeded into 24-well microplates at a semi-confluent density (200,000 cells/well). After 24 h, the medium was replaced by one without serum containing 0.5, 1, 3, 5, 10, 20, and 50  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> (Sigma, St. Louis, MO,

USA) and allowed to be in contact with cells for 6 h. The cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 and a solution of MTT 0.5 mg/ml in PBS, pH 7.5 was added. The cells were incubated for 3 h at 37°C and after that, washed with PBS. Then, 500  $\mu$ l of 0.04 M HCl (prepared in isopropanol) was added and maintained during 15 min to solubilize the formazan produced. The solution of each well was centrifuged during 5 min at 1500 rpm and the optical density (OD) was read at 570 nm. The data are expressed as the percentage of viable cells in cadmium-treated cells compared to control cells.

### 2.3. Experimental design

183 Twenty-four hours after seeding HepG2 cells, the culture media was replaced for one containing 1, 5, or 10  $\mu$ M of CdCl<sub>2</sub>. After incubation for 0.5, 1, 3, or 6 h, cells were washed twice with PBS, scrapped from the dishes to determined cytokine mRNA. Control cells without CdCl<sub>2</sub> were seeded at the same time.

189 Experiments of TNF- $\alpha$  neutralization were performed in the presence of 10 ng/ml of recombinant human anti-TNF antibodies (R&D systems). After incubation at 37°C for 1 h, HepG2 cells were treated with 5.0  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> or recombinant TNF- $\alpha$  for 1 or 3 h. Cells were washed twice with PBS, scrapped from dishes to determined cytokine mRNA. Control cells were seeded at the same time as treated cells and a human IgG (R&D systems) was used.

198 For H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated cells, 0.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added instead of cadmium. In order to study the effect of antioxidant treatment, HepG2 cells were treated during 1 h with 1 mM NAC, and then CdCl<sub>2</sub> was added.

### 2.4. Oxidative stress determination

203 HepG2 cells were treated with 5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> for 1, 2, 4, or 6 h. Lipid peroxidation was assayed by determining the rate of production of malondialdehyde in presence of thiobarbituric acid as described previously (Bucio et al., 1995). Reduced glutathione was measured by the method given by Tietze (1969) in which GSH content was determined by the colorimetric reagent 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid). To study the effect of NAC in GSH content, HepG2 cells were treated 1 h with NAC and after that, cells were treated with 5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> for 6 h.

213 2.5. RNA isolation and reverse transcriptase  
214 polymerase chain reaction (RT-PCR)

215 Total RNA was extracted from the HepG2 cells  
216 as described by Chomczynski (1993). At the end  
217 of the incubation period, cells were washed with  
218 1 ml ice-cold PBS and solubilized with 1 ml of tri-  
219 zol. RNA was treated with chloroform, centrifuged  
220 at 12,000 rpm during 15 min at 4°C and finally  
221 precipitated with ethanol. RNA was extracted and  
222 re-dissolved in diethylpyrocarbonate treated water,  
223 and the OD at 260 nm determined its concentration.  
224 To synthesize cDNA, 2.5 µg of RNA was resus-  
225 pended in a 10 µl final volume of the reaction buffer  
226 (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 100 mM dithio-  
227 threitol, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM of each dNTP, 0.5 µg  
228 of oligo dT, 20 U RNase inhibitor, and 50 U of MuLV  
229 reverse transcriptase) (Perkin-Elmer) and incubated  
230 for 1 h at 42°C. The reaction was stopped by dena-  
231 turing the enzyme at 95°C for 5 min.

232 Reverse transcriptase polymerase chain reaction  
233 were performed as follows. Three microliters of  
234 the synthesized cDNA were added to 45 µl of PCR  
235 mixture containing 4 µl of 10 × PCR buffer, 1.5 µl  
236 of primers (IL-1β sense: 5'GGATATGGAGCAAC-  
237 AACAAGTGG3', antisense: 5'AT GTACCAGTTG-  
238 GGGGAAGTGG3', TNF-α sense: 5'CTCTGGCCCA-  
239 GGCAGTCAGA3', antisense: 5'GGCGTTTGGGA-  
240 AGGTTGGAT3', IL-6 sense: 5'TCAATGAGGAGA-  
241 CTTGCCTG3', antisense: 5'GATGAGTTGTTCATG-  
242 TCCTGC3', IL-8 sense: 5'TTGGCAGCCTTCCTG-  
243 ATT3', antisense: 5'AACTTCTCCACAACCCTCT-  
244 G 3', and β<sub>2</sub>-microglobulin sense: 5'CCAGCAG-  
245 AGAATGGAAAGTC3', antisense: 5'GATGCTGCT-  
246 TACATGTCTCG3'), and 0.25 µl DNA polymerase  
247 (Gene Amp PCR Kit, Perkin-Elmer). The amplifi-  
248 cation was performed with 35 cycles, that was the  
249 optimal condition for linearity and permit semiquanti-  
250 tative analysis of signal strength, (temperature profile  
251 94°C for 1 min; 55°C for 1 min; 72°C for 1 min).  
252 The specificity of the PCR bands were previously  
253 confirmed by restriction site analysis of the ampli-  
254 fied cDNA, which generated restriction fragments of  
255 the expected size (data not shown). Amplified PCR  
256 products were separated electrophoretically on 1.5%  
257 agarose gel (UltraPure, Sigma) containing 0.05 µg/ml  
258 ethidium bromide. The mRNA expression was vi-  
259 sualized using a Gel-Doc and analyzed using the

molecular analyst software and was standardized by  
260 the β<sub>2</sub>-microglobulin housekeeping gene signal to  
261 correct any variability in gel loading. PCR products  
262 from cytokine mRNA were 263 bp for IL-1β, 519 bp  
263 for TNF-α, 260 bp for IL-6, 247 bp for IL-8, and  
264 268 bp for β<sub>2</sub>-microglobulin. Results are presented as  
265 fold change relative to control.  
266

267 2.6. Cells lysis and Western blot analysis

268 Cells were lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) con-  
269 taining 120 mM NaCl, 0.5% IGEPAL, 10 mM NaF,  
270 200 µM NaVO<sub>4</sub>, and a complete inhibitor protease  
271 cocktail (Roche Diagnostics). Protein concentration  
272 was determined by Bradford method (1976), using  
273 bovine serum albumin as a standard. Samples were an-  
274 alyzed under reducing conditions on 10% SDS-PAGE  
275 electrophoresis according to Laemmli (1970). The  
276 protein bands were transferred (30 V for 12 h) onto  
277 polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P,  
278 Amersham Pharmacia Biotech) using a transfer buffer  
279 consisting of 25 mM Tris (pH 8.3), 192 mM glycine,  
280 0.05 % (w/v) SDS, and 20% (v/v) methanol. Mem-  
281 branes were blocked (60 min) with skimmed milk in  
282 TBS-t (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v)  
283 tween 20). Primary and secondary antibodies were  
284 diluted in the blocking solution to the appropriate  
285 concentration as indicated below. For the detection of  
286 Hsp70, goat anti-human Hsp70 (Santa Cruz Biotech)  
287 a 1:500 dilution was used. The secondary antibody  
288 (1:10,000) was horseradish peroxidase-conjugated  
289 anti-goat-IgG (Santa Cruz, Biotech). Blots were re-  
290 vealed using supersignal West Pico chemiluminescent  
291 substrate (Pierce Chem. Co.). Protein bands were  
292 scanned and the band intensities quantified using a  
293 densitometer and accompanying molecular analyst  
294 software.

295 2.7. Nuclear protein preparation

296 Cells were scraped into ice-cold PBS, pH 7.4, and  
297 centrifuged at 12,000 rpm. The supernatant was dis-  
298 carded and the cells in the pellet were lysed with a  
299 buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl,  
300 0.1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA),  
301 0.1 mM EGTA, 10 × IGEPAL, 1.0 mM dithiothreitol  
302 (DTT), and 0.5 mM phenol methyl sulfonyl fluoride  
303 (PMSF). The cell lysate was chilled on ice for 15 min

304 and then centrifuged at 12,000 rpm for 30 s. Nuclei  
 305 in the pellet were re-suspended in a buffer contain-  
 306 ing 20 mM HEPES, pH 7.9, 0.4 mM NaCl, 1.0 mM  
 307 EDTA, 0.1 mM EGTA, 1.0 mM DTT, and 1.0 mM  
 308 PMSF. The preparation was kept on ice for 15 min,  
 309 vortexed several times, and then centrifuged for 5 min  
 310 (14,000 rpm at 4 °C). The supernatant, containing nu-  
 311 clear protein, was divided into aliquots, snap frozen,  
 312 and stored at -80 °C (Morales et al., 1997). Protein  
 313 concentration was measured by the Bradford reagent  
 314 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### 315 2.8. Electrophoretic gel mobility shift assays (EMSA)

316 A mobility shift assay was performed, es-  
 317 sentially as described by Morales et al. (1997).  
 318 DNA binding activity was determined after incu-  
 319 bation of nuclear protein (25 µg) with 0.5 ng  
 320 of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP-labeled (NEN Life Science Prod-  
 321 ucts, Inc.) DNA probe for the AP-1 consensus site  
 322 (5'CGCTTGATGACTCAGCCGGAA) or for the  
 323 NF- $\kappa$ B consensus site (5'AGTTGAGGGGACTTTC-  
 324 CCAGGC) in a buffer containing 50 mM Tris-HCl,  
 325 pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM  $\beta$ -mercap-  
 326 toethanol, 20% glycerol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 µg  
 327 poly[dIdC]. For competition assays, binding reactions  
 328 were performed in the presence of a 50-fold molar ex-  
 329 cess of unlabeled oligonucleotide. The reaction mix-

330 ture was electrophoresed on 6% polyacrylamide gel in  
 331 0.5 × TBE buffer at 150 V. The gel was then exposed  
 332 to Kodak film for autoradiography. In competition ex-  
 333 periments, 50-fold of unlabeled AP-1 oligonucleotide  
 334 was added before addition of the <sup>32</sup>P-labeled AP-1  
 335 oligonucleotide.

### 2.9. Data analysis

336 Data are reported as mean ± S.E. The SPSS pack-  
 337 age version 10 was used to run the analysis. Compar-  
 338 isons among groups were done by means of ANOVA.  
 339 Tukey's method was used for multiple comparisons.  
 340 A *P* < 0.05 was considered as statistically significant.  
 341

## 3. Results

### 3.1. Cell viability

342 HepG2 cell viability, determined as mitochondrial  
 343 function in an MTT assay, exposed during 6 h to  
 344 different CdCl<sub>2</sub> concentrations (0–50 µM) presented  
 345 100–90% viability in the presence of 0.5–10 µM  
 346 CdCl<sub>2</sub>, decreasing to 73% with 20 µM CdCl<sub>2</sub> and  
 347 67% with 50 µM (Fig. 1). Taking into consideration  
 348 the cell viability and its proliferate capacity after been  
 349 re-seeded in the presence of the metal, the experimen-  
 350

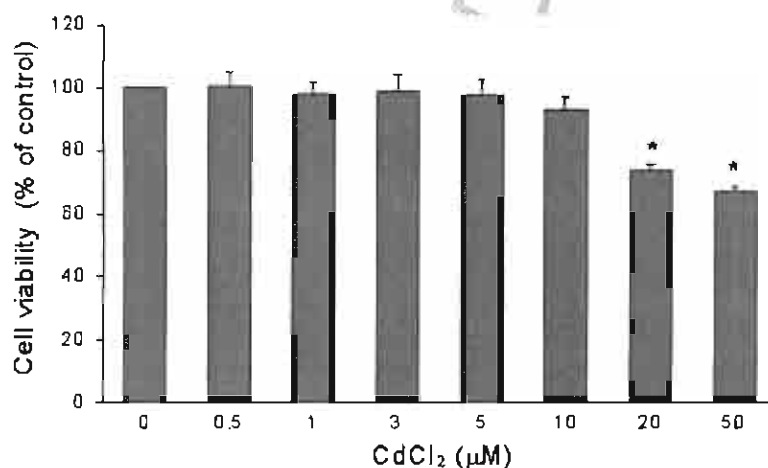


Fig. 1. Effect of CdCl<sub>2</sub> treatment on the viability of HepG2 cell line. The cells were exposed to 0, 0.5, 1, 3, 5, 10, 20, or 50 µM CdCl<sub>2</sub> for 6 h. The cytotoxic effect was quantified by MTT assay. The results are expressed as percent viability vs. control cells. Each bar represents the mean ± S.E. of at least three independent experiments. \*Significantly different from control (*P* < 0.05).

351 tal conditions chosen were 1, 5, and 10  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  for  
352 one, 3 and 6 h exposure.

### 353 3.2. Oxidative stress damage

354 Lipid peroxidation damage increased 1.5 times  
355 control values after 1 h  $\text{CdCl}_2$  treatment. An slight in-  
356 crease were obtained after 2, 4, and 6 h (1.9 times con-  
357 trol values) of Cd treatment. Reduced GSH decreased  
358 65% after 6 h treatment. Pre-treatment with NAC re-  
359 versed cadmium induced alteration in GSH content in-  
360 creasing it 332% when compared with 6 h Cd-treated  
361 cells (Table 1).

### 362 3.3. Cytokine expression

363 To establish whether HepG2 cells increase mRNA  
364  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ , and  $\text{IL-8}$  in the presence of  
365  $\text{CdCl}_2$ , RNA was isolated from cells after 0.5, 1, 3, or

Table 1

Effect of  $\text{CdCl}_2$  on lipid peroxidation damage and GSH content in HepG2 cells

Time (h)	MDA (nmol/mg protein)	GSH (omol/mg protein)
Control	2.13 $\pm$ 0.164	174.84 $\pm$ 25.60
1.0	3.15 $\pm$ 0.141 <sup>a</sup>	163.17 $\pm$ 15.92
2.0	3.93 $\pm$ 0.147 <sup>a</sup>	155.57 $\pm$ 23.61
4.0	3.87 $\pm$ 0.202 <sup>a</sup>	162.46 $\pm$ 11.37
6.0	3.81 $\pm$ 0.198 <sup>a</sup>	61.40 $\pm$ 16.04 <sup>a</sup>
6.0 (NAC-Cd)		270.28 $\pm$ 12.70 <sup>b</sup>

The cells were exposed to 5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  for 1, 2, 4, and 6 h and lipid peroxidation, measured as production of malondialdehyde (MDA) in presence of thiobarbituric acid, was determined. Glutathione (GSH) content was determined by the method of Tietze as described in Section 2. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments.

<sup>a</sup> Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Significantly different from 6 h Cd-treated cells ( $P < 0.05$ ).

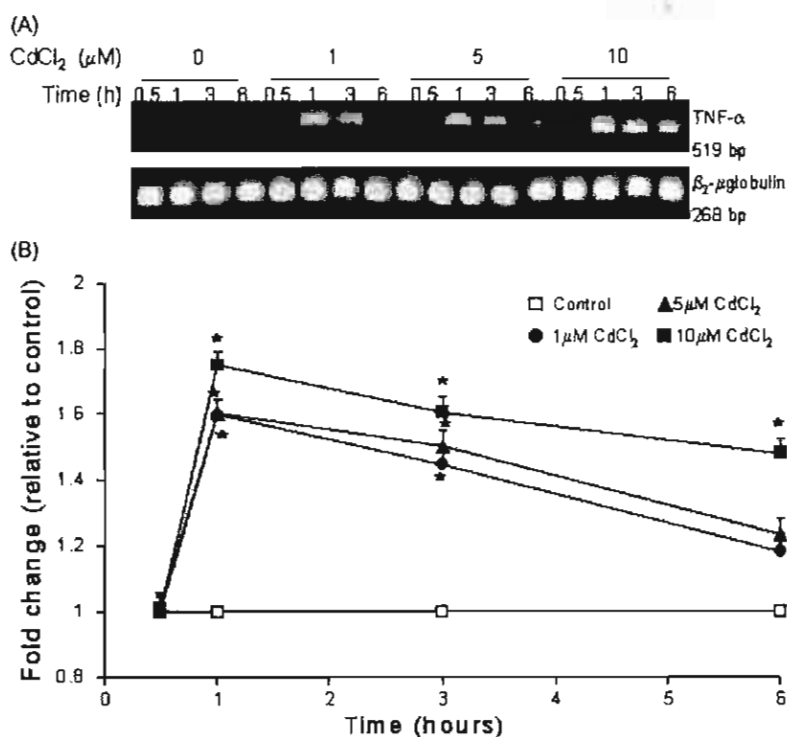


Fig. 2. Time course of  $\text{TNF-}\alpha$  gene expression of HepG2 cells treated with  $\text{CdCl}_2$ . The cells were exposed to 0, 1, 5, or 10  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  for 0.5, 1, 3, or 6 h and total RNA was isolated and prepared for RT-PCR analysis. A representative gel is presented in (A). (B) Densitometric analysis of RT-PCR products. Each value of  $\text{TNF-}\alpha$  mRNA level was normalized with  $\beta_2$ -microglobulin mRNA. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments. \*Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

366 6 h of incubation with the metal and the relative numbers of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 transcripts were  
 367 determined by RT-PCR. RNA concentration among test samples was normalized using the constitutively  
 368 expressed  $\beta_2$ -microglobulin gene. We observed no change after 0.5 h treatment with all CdCl<sub>2</sub> concentra-  
 369 tions tested. Relative increases in mRNA for TNF- $\alpha$  were observed in HepG2 following incubation with all  
 370 CdCl<sub>2</sub> concentrations and were tested 1, 3, and 6 h after metal treatment (Fig. 2). After 1 h, an increment of  
 371 59, 65, and 83% were observed with 1, 5, and 10  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>, respectively, when compared with non-treated  
 372 cells. A slight decrease of mRNA TNF- $\alpha$  was observed after the 3 h treatment. There was no difference  
 373 in mRNA TNF- $\alpha$  among different concentrations. At the 6 h treatment, only the 10  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> treatment  
 374 presented a value significantly different from control cells (1.5-fold). Fig. 3 shows the IL-1 $\beta$  mRNA after  
 375 different exposure times and concentrations. After  
 376  
 377  
 378  
 379  
 380  
 381  
 382  
 383  
 384

1 h, a 33% increment with 1  $\mu$ M, a 47% with 5  $\mu$ M, 385  
 and 58% with 10  $\mu$ M were observed. After the 3 h 386  
 treatment, only the 5 and 10  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> treatments 387  
 presented values significantly different from control 388  
 cells (1.2- and 1.3-fold control values, respectively). 389  
 At the 6 h treatment values return to control cell value 390  
 IL-1 $\beta$  mRNA. IL-6 mRNA presented a different pro- 391  
 file when compared with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA. 392  
 The IL-6 mRNA increment was presented later than 393  
 the other cytokines studied (Fig. 4). There was an 394  
 increment of IL-6 mRNA only with 5 and 10  $\mu$ M 395  
 CdCl<sub>2</sub> after the 3 h treatment, presenting similar in- 396  
 crements with both concentrations, 1.6-fold relative 397  
 to control values. IL-6 mRNA returned to control cell 398  
 value at 6 h Cd treatment. IL-8 mRNA showed a sim- 399  
 ilar pattern as IL-6 mRNA. There was an increment 400  
 in mRNA after the 3 h treatment with 5 and 10  $\mu$ M 401  
 CdCl<sub>2</sub> (Fig. 5). At this time, IL-8 mRNA presented 402  
 similar values with both concentrations, 1.35-fold rel-

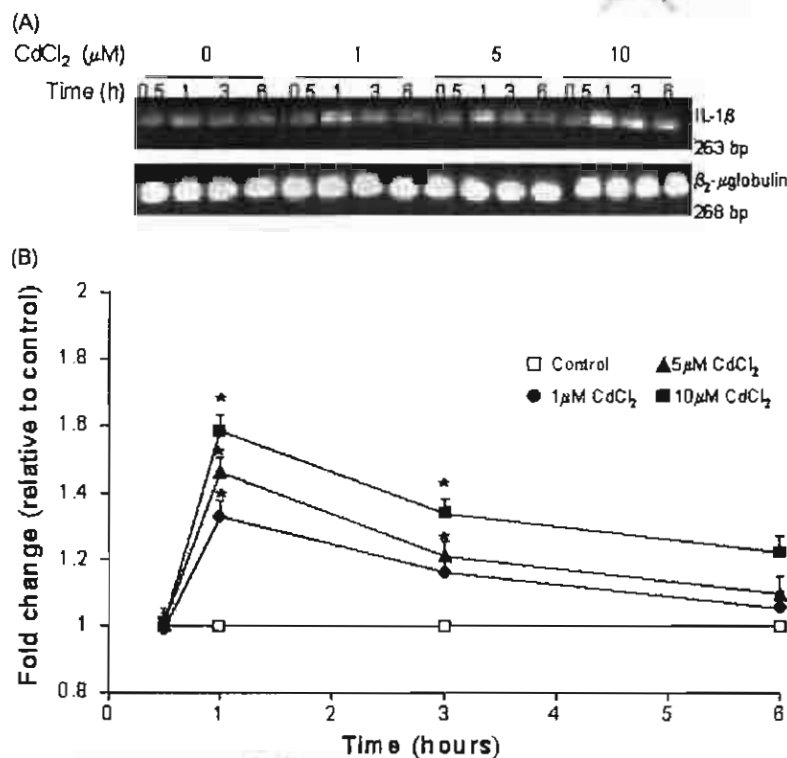


Fig. 3. Time course of IL-1 $\beta$  gene expression of HepG2 cells treated with CdCl<sub>2</sub>. The cells were exposed to 0, 1, 5, or 10  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> for 0.5, 1, 3, or 6 h and total RNA was isolated and prepared for RT-PCR analysis. A representative gel is presented in (A). (B) Densitometric analysis of RT-PCR products. Each value of IL-1 $\beta$  mRNA level was normalized with  $\beta_2$ -microglobulin mRNA. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments. Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).



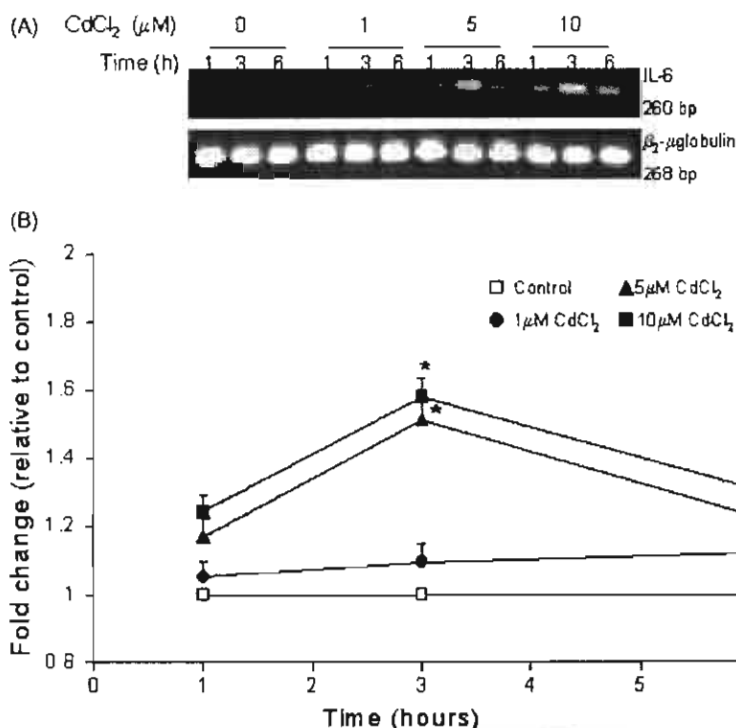


Fig. 4. Time course of IL-6 gene expression of HepG2 cells treated with CdCl<sub>2</sub>. The cells were exposed to 0, 1, 5, or 10 μM CdCl<sub>2</sub> for 1, 3, or 6 h and total RNA was isolated and prepared for RT-PCR analysis. A representative gel is presented in (A). (B) Densitometric analysis of RT-PCR products. Each value of IL-6 mRNA level was normalized with β<sub>2</sub>-microglobulin mRNA. Each point represents the mean ± S.E. of at least three independent experiments. \*Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

403 ative to control values. After a 6 h treatment, values  
404 returned to control cell value.

405 To evaluate the participation of TNF-α in the induc-  
406 tion of other cytokines, cells were pretreated for  
407 1 h with anti-TNF-α and exposed to 5 μM CdCl<sub>2</sub> for  
408 1 h for IL-1β expression and 3 h for IL-6 and IL-8,  
409 expression. Fig. 6 shows that the anti-TNF-α prevents  
410 the expression of IL-1β, IL-6, and IL-8.

#### 411 3.4. Production of Hsp70

412 The Hsp70 was constitutively produced in control  
413 cells, as shown in Fig. 7, and apparently the same  
414 expression was evidenced after a 2 h of treatment with  
415 CdCl<sub>2</sub>. Production of Hsp70 could be seen after 3 h  
416 and increased with time.

#### 417 3.5. Gel-shift assay of AP-1 and NF-κB

418 Responsiveness of HepG2 cells to oxidative stress  
419 caused by Cd exposure was evaluated with mobility

420 shift assays involving two redox-sensitive transcrip-  
421 tion factors, AP-1 and NF-κB. Nuclear extracts were  
422 prepared from cells exposed to 5 μM CdCl<sub>2</sub> to either  
423 1–6 h. The specificity of binding was verified using  
424 50-fold molar excess of the unlabeled oligonucleotide  
425 probes which resulted in a decrease in the intensity  
426 or abolishment of the shifted bands seen after cad-  
427 mium treatment. NF-κB activation was not increased  
428 as a result of the Cd treatment (data not presented).  
429 No DNA binding of AP-1 was observed after 1 h treat-  
430 ment. After a 2 h treatment DNA binding of AP-1 was  
431 detected and increased, with time up to 4 h with an in-  
432 crease of 24 times control value. DNA binding of AP-1  
433 presented the same value with 5 and 6 h treatments  
434 (Fig. 8). Taking into account that CdCl<sub>2</sub> increases  
435 DNA binding of AP-1 to the highest value after a 4 h  
436 treatment, different concentrations of the metal were  
437 studied. After a 4 h treatment, DNA binding of AP-1  
438 was observed with small concentrations of up to 1 μM  
439 CdCl<sub>2</sub>. The intensity of the shift band was similar for

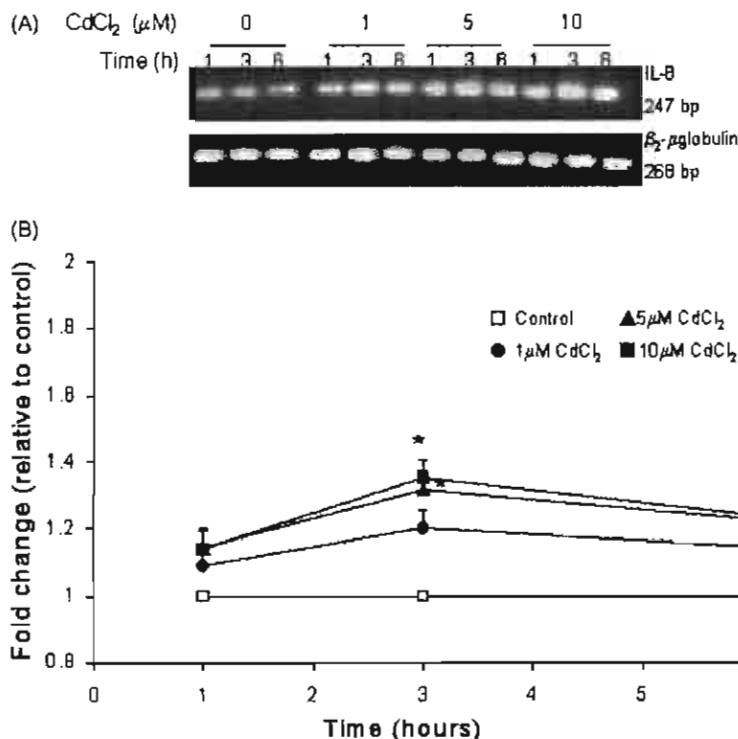


Fig. 5. Time course of IL-8 gene expression of HepG2 cells treated with CdCl<sub>2</sub>. The cells were exposed to 0, 1, 5, or 10 μM CdCl<sub>2</sub> for 1, 3, or 6 h and total ARN was isolated and prepared for RT-PCR analysis. A representative gel is presented in (A). (B) Densitometric analysis of RT-PCR products. Each value of IL-8 mRNA level was normalized with β<sub>2</sub>-microglobulin mRNA. Each point represents the mean ± S.E. of at least three independent experiments. \*Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

440 3, 5, and 10 μM CdCl<sub>2</sub>. A 20 μM CdCl<sub>2</sub> treatment re- 456  
 441 sulted in a significantly increase in the binding activity 457  
 442 (Fig. 9), probably due to an increase of cytotoxicity 458  
 443 effect. The next experiments were designed in order 459  
 444 to evaluate the participation of TNF-α and oxidative 460  
 445 stress in the AP-1 response (Fig. 10). The HepG2 cells 461  
 446 were pretreated with an anti-TNF-α antibody or 1 mM 462  
 447 *N*-acetylcysteine 1 h before CdCl<sub>2</sub> (5 μM) treatment. 463  
 448 AP-1 was determined 4 h after. As a control, oxidative 464  
 449 stress was induced with a 0.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. 465  
 450 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone induces AP-1. Anti-TNF-α treatment re- 466  
 451 duced 67% AP-1 Cd-induced activation, while NAC 467  
 452 47.5% when compared with Cd DNA binding activity. 468

#### 453 4. Discussion

454 The mechanism of acute Cd-mediated hepatotoxi- 469  
 455 city involves two pathways, one for the initial injury 470

466 produced by direct effects of Cd and the other for the 471  
 467 subsequent injury produced by the inflammatory re- 472  
 468 sponse. Primary injury probably results from the bind- 473  
 469 ing of Cd to sulphhydryl groups on critical molecules in 474  
 470 cells causing oxidative stress. Secondary injury from 475  
 471 acute Cd exposure is thought to occur from the ac- 476  
 472 tivation of Kupffer cells and a complex series of in- 477  
 473 teractive events involving several types of liver cells 478  
 474 and a large number of inflammatory and toxic medi- 479  
 475 ators. Kupffer cells represent a major source of hep- 480  
 476 atic cytokines, and it is known that parenchymal cells 481  
 477 not only respond to cytokines, but also secrete spe- 482  
 478 cific cytokines in response to chemical injury (Dong 483  
 479 et al., 1998). These cytokine responses may in fact be 484  
 480 involved in cellular repair acting at local sites of injury 485  
 481 to help facilitate repair, rather than being a true patho- 486  
 482 logical response that often accompanies marked over- 487  
 483 expression of inflammatory cytokines. The exact role 488  
 484 that hepatocyte-derived cytokines play is unknown. It 489

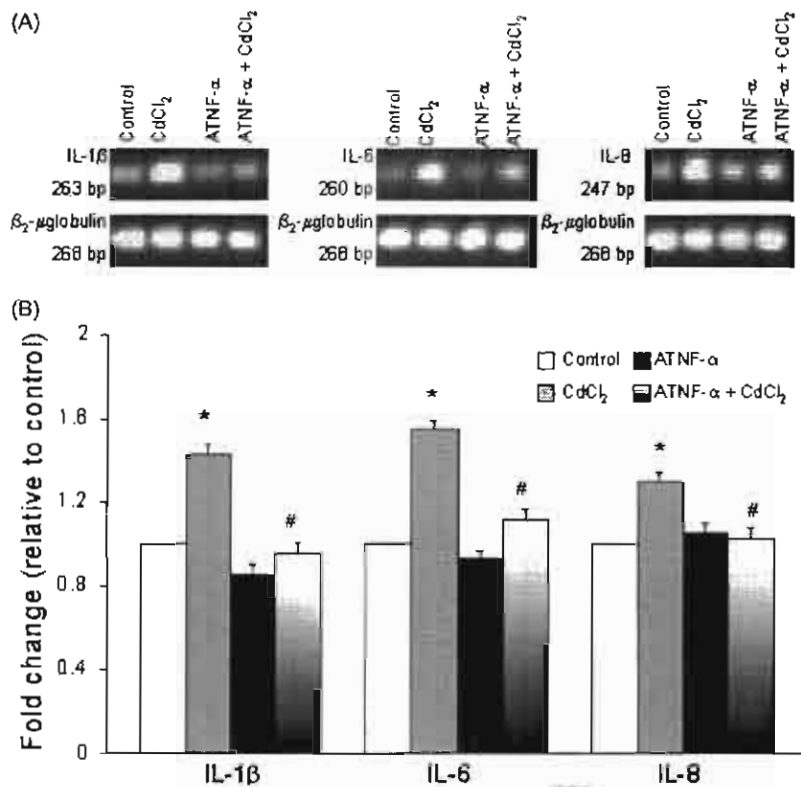


Fig. 6. Effect of anti-TNF- $\alpha$  on cadmium induced gene expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8. Cells were pretreated with 10 ng/ml anti-rhTNF- $\alpha$  (ATNF- $\alpha$ ) for 1 h and exposed to 5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> for 1 or 3 h and total RNA was isolated and prepared for RT-PCR analysis. A representative gel is presented in (A). (B) Densitometric analysis of RT-PCR products. Each value of IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 mRNA level was normalized with  $\beta_2$ -microglobulin mRNA. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments. \*Significantly different from control ( $P < 0.05$ ). #Significantly different ATNF- $\alpha$  + CdCl<sub>2</sub> from CdCl<sub>2</sub> alone treated cells ( $P < 0.05$ ).

475 is important to examine their role in hepatotoxicity  
 476 following cadmium administration, as cytokines have  
 477 been shown to be responsible, at least in part, for a  
 478 number of pathophysiological responses in the liver.  
 479 The results showed that 5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> produced  
 480 oxidative stress in HepG2 cells. Lipid peroxidation  
 481 damage is an early event that occur 1 h after cadmium  
 482 treatment and increased slightly with time. Reduced  
 483 GSH decreased significantly after 6 h treatment.  
 484 Pre-treatment with NAC, an antioxidant, reversed  
 485 cadmium induced alteration of GSH. This antioxidant  
 486 is effective scavenger of reactive oxygen species,  
 487 which maintain the intracellular concentrations of  
 488 glutathione, thus, generally increasing the ability of  
 489 cells to scavenge reactive oxygen species (Dong et  
 490 al., 1998). Tandon et al. (2003) reported that rats  
 491 treated with CdCl<sub>2</sub> during 5 days showed depletion of

GSH and an increase in lipid peroxidation in the liver. 492  
 Treatment of cadmium intoxicated animals with NAC 493  
 reversed cadmium induced oxidative stress alteration, 494  
 but without lowering the elevated cadmium concentrations 495  
 in the liver. This shows that NAC was devoid 496  
 of any cadmium chelating ability. Antioxidants such 497  
 as NAC have been used as tools for investigating the 498  
 role of ROS in numerous biological and pathological 499  
 processes (Zafarullah et al., 2003). It has also 500  
 been shown that NAC has both an oxygen-radical 501  
 scavenger and a heavy-metal chelating effect in high 502  
 intravenous doses (Hjortso et al., 1990). However, 503  
 although NAC could chelate Cd, based in the results 504  
 obtained in the present study, we consider that NAC 505  
 is acting as an antioxidant. 506

We demonstrate that exposure of HepG2 cells to 507  
 CdCl<sub>2</sub> produce time- and concentration-dependent al- 508

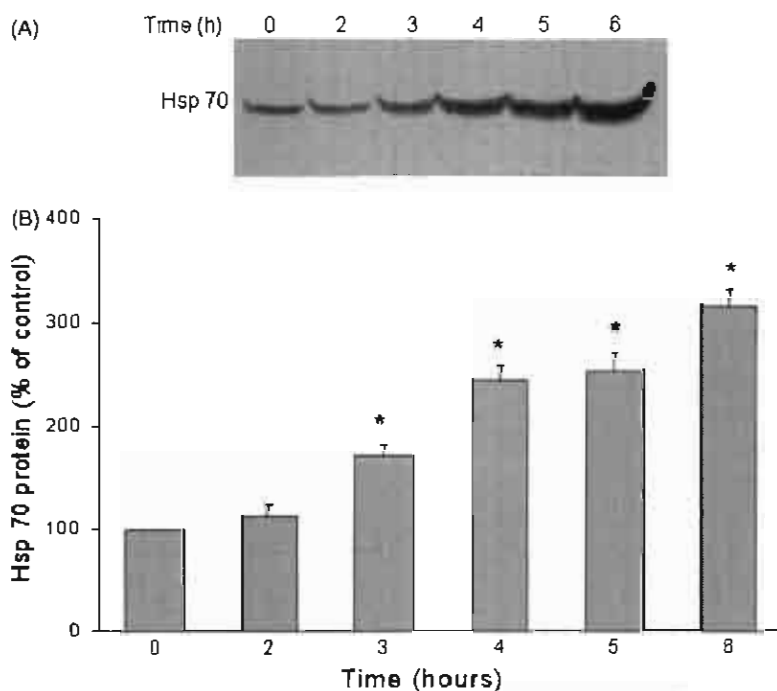


Fig. 7. Effect of CdCl<sub>2</sub> on heat shock protein 70 (Hsp70) expression in HepG2 cells. The cells were exposed to 5 μM CdCl<sub>2</sub> for 2, 3, 4, 5, or 6 h and total protein was extracted and prepared for Western blot analysis with an antibody against Hsp70. Representative Western blot analysis of Hsp70 (A). (B) Densitometric analysis of Hsp70 expression. The results are expressed as percent of control. Each bar represents the mean ± S.E. of at least three independent experiments. \*Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

509 terations in the expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and  
 510 IL-8. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are recognized as the critical  
 511 early mediators of tissue injury (Kayama et al., 1995)  
 512 and HepG2 cells treated with Cd expressed these cy-  
 513 tokines sooner than IL-6 and IL-8. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$   
 514 are central players in so many disease conditions be-  
 515 cause these cytokines activate a broad spectrum of  
 516 signaling events and transcriptional programs (Garg  
 517 and Aggarwal, 2002). They both potently activate the  
 518 AP-1 pathway which increases transcription of inflam-  
 519 matory genes such as IL-6 and IL-8 (Pryhuber et al.,  
 520 2003). The induction of AP-1 by pro-inflammatory  
 521 cytokines is mostly mediated by the JNK and p38  
 522 MAP kinase (MAPK) cascade (Shaulian and Karin,  
 523 2002). TNF- $\alpha$  participates in Cd-induced AP-1 ac-  
 524 tivation in HepG2 cells because pre-treatment with  
 525 anti-TNF- $\alpha$  decreased Cd-induced AP-1 activation by  
 526 67%. In a present study, an increase in cytotoxicity  
 527 with 20 μM CdCl<sub>2</sub> increased eight-fold AP-1 activa-  
 528 tion comparing with non-cytotoxic Cd concentrations.  
 529 There are some studies in which arsenite resulted in

a concentration-dependent increase of AP-1, and it is 530  
 related to the cell viability (Wijeweera et al., 2001). 531  
 As (III) has been shown to be a potent stimulator of 532  
 AP-1 and there are some evidence support that MAPK 533  
 pathway is involved in this response (Liu et al., 2001). 534  
 Simeonova et al. (2001) reported that minimal, but ob- 535  
 servable AP-1 activity occurred in bladder tissue at ex- 536  
 posure levels below which histopathological changes 537  
 or arsenic tissue accumulation was detected. Marked 538  
 AP-1 DNA-binding changes only occurred at expo- 539  
 sure levels of sodium arsenite above 20 μg/ml, where 540  
 histopathological changes or arsenic tissue accumula- 541  
 tion was detected. A dose-responsive increase in AP-1 542  
 activity was noted. 543

It has been reported that the signal protein, MAPK, 544  
 is induced by Cd and NAC, that can decrease the level 545  
 of reactive oxygen species (Aruoma et al., 1989), 546  
 could blocked the Cd-induced MAPK. Exposure of 547  
 cells to cadmium induced significant activation of 548  
 AP-1 and all three members of the MAP kinase fam- 549  
 ily in mouse epidermal JB6 cells. The induction of 550

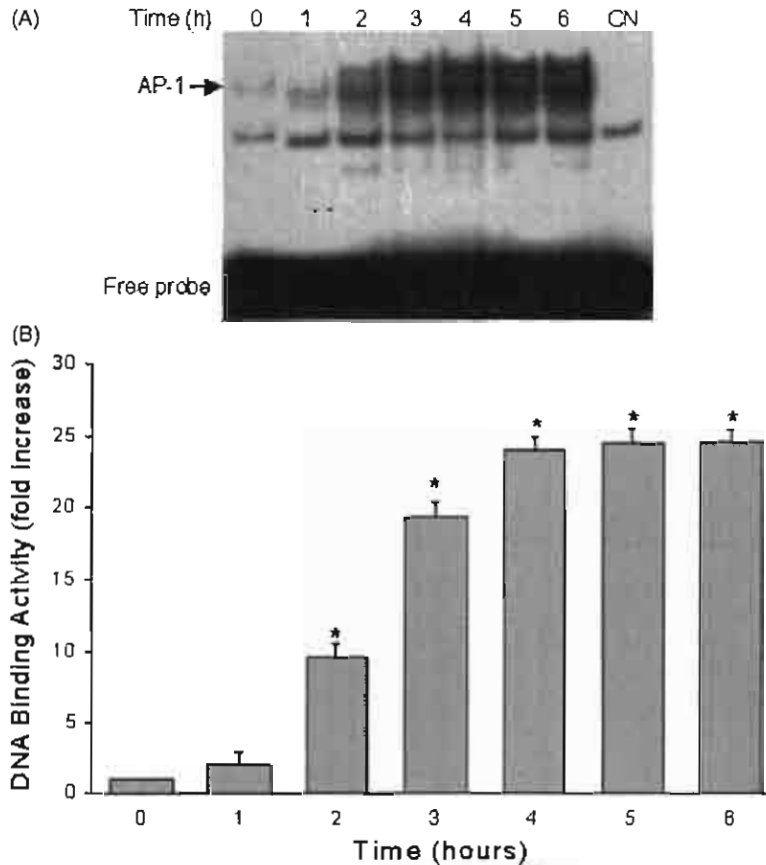


Fig. 8. Time course on cadmium induced AP-1 activation in HepG2 cells. The cells were exposed to  $5 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  for 1, 2, 3, 4, 5, or 6 h and nuclear extracts were isolated and prepared to EMSA using a  $^{32}\text{P}$ -labeled AP-1 oligonucleotide. A representative gel shift assay (A). NC: negative control; pre-incubated with a 50-fold excess of the unlabeled probe. (B) Densitometric analysis of AP-1 activation. DNA binding activity is expressed as fold increased compared with control cells. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments. \*Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

551 AP-1 activity by cadmium appears to involve activa-  
 552 tion of Erks, since the induction of AP-1 activity by  
 553 the metal was blocked by pre-treatment of cells with  
 554 PD98058 (Huang et al., 2001). Metallothionein-null  
 555 mice were more sensitive than wild type mice to  
 556 cadmium-induced stress-related gene expression, in  
 557 accord with greater activation of the transcription of  
 558 factor AP-1, a phosphorylated JNK and ERK (Liu  
 559 et al., 2002). Reactive oxygen species have been  
 560 proposed to be involved in cytotoxic actions of Cd  
 561 (Sugiyama, 1994). Different studies, using another  
 562 human hepatic cell line (WRL-68) demonstrate that  
 563 under similar conditions of this study, there was an  
 564 increase in lipid peroxidation damage and a decrease

in glutathione (Bucio et al., 1995; Souza et al., 1997).  
 NAC inhibited activation of c-Jun-terminal kinase,  
 p38 MAP kinase and redox sensitive AP-1 activa-  
 tion (Zafarullah et al., 2003). NAC can suppress  
 Cd-induced cellular damage and accumulate c-fos  
 protein in LLC-PK<sub>1</sub> (Wispiyono et al., 1998). In  
 the present study, a 47.5% inhibition of Cd-induced  
 AP-1 activation was determined after 1 mM NAC  
 pre-treatment. The decrease in AP-1 activation pro-  
 duced by Cd after anti-TNF- $\alpha$  and NAC pre-treatment  
 suggests that Cd-induced transcriptional activation is  
 induced by a variety of factors. It has been suggested  
 that Cd cytotoxicity might be related to alterations  
 in cellular glutathione and that an increase of glu-

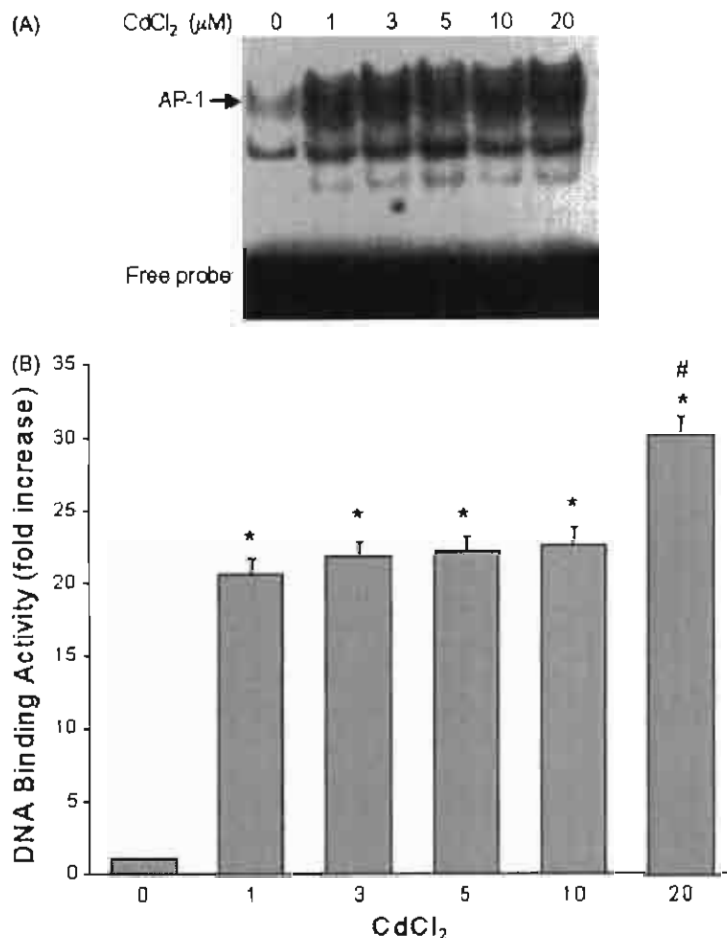


Fig. 9. CdCl<sub>2</sub> dose effect on AP-1 activation in HepG2 cells. The cells were exposed to 0, 1, 3, 5, 10, or 20 μM CdCl<sub>2</sub> for 4 h and nuclear extracts were isolated and prepared to EMSA using a <sup>32</sup>P-labeled AP-1 oligonucleotide. A representative gel shift assay (A). (B) Densitometric analysis of AP-1 activation. DNA binding activity is expressed as fold increased compared with control cells. Each bar represents the mean ± S.E. of at least three independent experiments. \*Significantly different from control ( $P < 0.05$ ). #Significantly different from 1, 3, 5, and 10 μM CdCl<sub>2</sub> treated cells.

579 tathione may protect cells from the cytotoxicity. NAC  
 580 could maintain the intracellular concentrations of glu-  
 581 tathione, thus, generally increasing the ability of cells  
 582 to seavenge reactive oxygen species, and consider it  
 583 as an hydroxyl radical quencher (Dong et al., 1998).  
 584 NAC diminished Cd-induced AP-1 activation by de-  
 585 creasing cellular oxidative stress. Effects of NAC on  
 586 HepG2 cells exposed to Cd were different from those  
 587 of other cell types, that have reported that NAC in-  
 588 creased transactivation of AP-1 (Meyer et al., 1993;  
 589 Li and Spector, 1997). The redox active components  
 590 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NAC regulate expression of c-jun and c-fos

in different systems (Li et al., 1994). The ability of  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to directly activate AP-1 is consistent with ob-  
 servations demonstrating that reactive oxygen species  
 could regulate the activation of AP-1. Hart et al.  
 (1999) suggests that the main reactive oxygen species  
 involved in Cd toxicity are hydrogen peroxide.

One of the major Cd-responsive stress proteins pro-  
 duced in liver is the 70 kDa inducible Hsp. This pro-  
 tein is a major gene product induced by stress in a  
 number of cellular systems. It translocates between  
 the nucleus and cytosol during stress and has been im-  
 plicated in the protection against harmful insults, al-

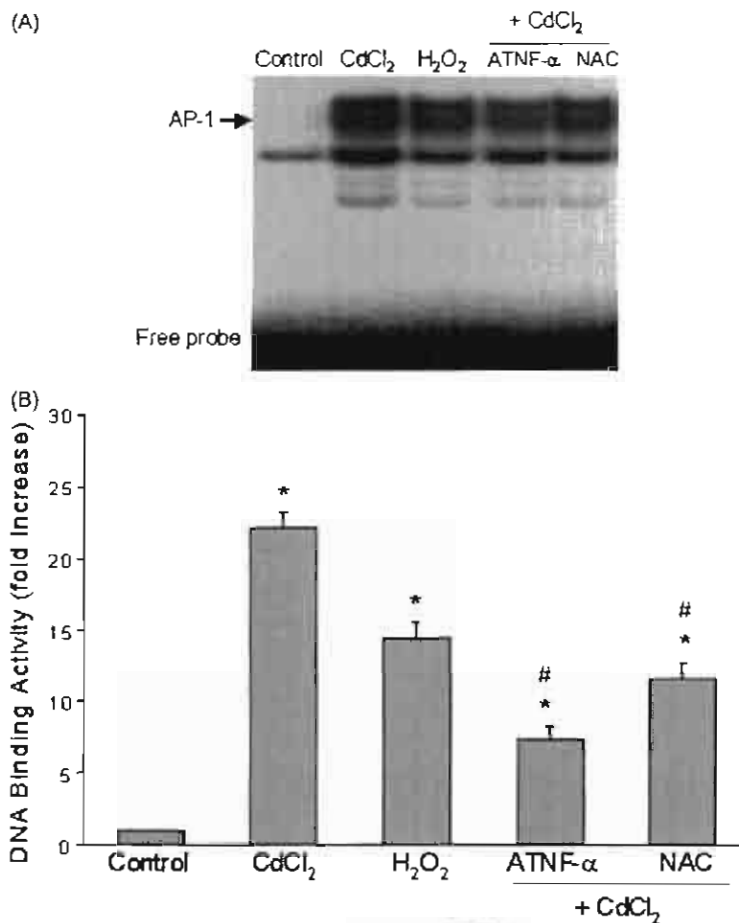


Fig. 10. Effect of anti-rhTNF- $\alpha$  and NAC on cadmium induced AP-1 activation in HepG2 cells. Cells were pretreated for 1 h with 10 ng/ml anti rhTNF- $\alpha$  or 1 mM NAC and exposed to 5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> or with 0.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 4 h. Nuclear extracts were isolated and prepared to EMSA using a <sup>32</sup>P-labeled AP-1 oligonucleotide. A representative gel shift assay (A). (B) Densitometric analysis of AP-1 activation. DNA binding activity is expressed as fold increased compared with control cells. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \*Significantly different from control ( $P < 0.05$ ). #Significantly different ATNF- $\alpha$  + CdCl<sub>2</sub> or NAC + CdCl<sub>2</sub> from CdCl<sub>2</sub> alone treated cells ( $P < 0.05$ ).

603 though the mechanisms of action are not clearly un-  
 604 derstood (Urani et al., 2001). Induction of Hsp's is  
 605 believed to be triggered by denatured proteins (Baler  
 606 et al., 1992). Cadmium could bind to proteins di-  
 607 rectly through interaction with sulfhydryls. As molec-  
 608 ular chaperones, Hsp's has the capacity to bind to  
 609 folding intermediates and misfolded or denatured pro-  
 610 teins, and prevent their irreversible denaturation. The  
 611 present study demonstrates that Cd enhanced Hsp70  
 612 production, with 5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>, after a short period of  
 613 time, and with a Cd concentration that is not cyto-  
 614 toxic. Urani et al. (2001) observed that induction of

Hsp70 could occur before metals accumulate within  
 the cells. The expression of Hsp70 can be modulated  
 by cell signal transducers. These molecular elements  
 might promote a protective response before accumu-  
 lation of stress compounds.

Induction of Hsp in human bronchial epithelial  
 cells inhibited pro-inflammatory cytokine expression  
 in vivo (Yoo et al., 2000). This means that Hsp may  
 exert a cytoprotective effect to respiratory epithelial  
 cells by blocking the inflammatory response related  
 to the blocking of NF- $\kappa$ B activation. This inhibitory  
 effect may be related to stabilization of I $\kappa$ B $\alpha$ , pos-

sibly through the prevention of IKK activation. In HepG-2 cells, NF- $\kappa$ B is not activated as a result of Cd treatment. This could be explained as Hsp70, being translocated to the nucleus, impedes NF- $\kappa$ B nuclear translocation by competing for access to nuclear pore complexes, through which NF- $\kappa$ B is transported. Another possibility is that up-regulation of I $\kappa$ B $\alpha$  may be a potential mechanism by which Hsp70 block NF- $\kappa$ B activation or that Cd-mediated degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  involves specific inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation subsequent I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitination. Therefore, the non-activation of NF- $\kappa$ B via the Hsp70 as a result of Cd treatment in HepG2 cells, remains to be examined.

In summary, our results show that Cd produced oxidative stress and induces TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in HepG-2 cells. As a result of this, AP-1 is activated and IL-6 and IL-8 are induced. Anti-TNF- $\alpha$  and NAC partially inhibited AP-1 activation. All imply that AP-1 cadmium-induced activation is participated in by a number of factors. The Hsp70 is produced by the HepG2 cells after cadmium treatment and probably has a role in the non-participation of NF- $\kappa$ B in a Cd cellular response.

## Acknowledgements

This investigation was partially funded by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (no. 400200-5-30671-M and 39618-M). We want to thank Mr. Harry Porter for his critical reviewing of the manuscript.

## References

- Andus, T., Bauer, J., Geruk, W., 1991. Effect of cytokines on the liver. *Hepatology* 13, 364–375.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J., 1989. The antioxidant action of *N*-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 6, 593–597.
- Baler, R., Welch, W.J., Voellmy, R., 1992. Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: Hsp70 as a potential autoregulatory factor. *J. Cell Biol.* 117, 1151–1159.
- Bradford, M., 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, M.C., 1995. Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line WRL-68. *Toxicology* 102, 285–290.
- Carter, D.A., 1997. Modulation of cellular AP-1 DNA binding activity by heat shock proteins. *FEBS Lett.* 416, 81–85.
- Casalino, E., Calzaretto, G., Sblauo, C., Landriscina, C., 2002. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 179, 37–50.
- Chomczynski, P.A., 1993. Reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532–536.
- Daffada, A.A.I., Murray, E.J., Young, S.P., 1994. Control of activator protein-1 and nuclear factor kappa B activity by interleukin-1, interleukin-6 and metals in HepG2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1222, 234–240.
- Dinarello, C.A., 1993. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists in liver. *Hepatology* 18, 1132–1138.
- Dong, W., Simeonova, P.P., Gallucci, R., Matheson, J., Flood, L., Wang, S., Hubbs, A., Lustet, M.I., 1998. Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151, 359–366.
- Escobar, M.C., Souza, V., Bucio, L., Hernández, E., Damián-Matsumura, P., Zaga, V., Gutiérrez-Ruiz, M.C., 2002. Cadmium induces alpha (1) collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells. *Toxicology* 170, 63–73.
- Garg, A.K., Aggarwal, B.B., 2002. Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol. Immunol.* 39, 509–517.
- Grandjean-Laquerriere, A., Gangloff, S.C., Naour, R.L., Trentesaux, C.H., Homebeck, W., Guenounou, M., 2002. Relative contribution of NF- $\kappa$ B and AP-1 in the modulation by curcumin and pyrrolidine dithiocarbamate of the UVB-induced cytokine expression by keratinocytes. *Cytokine* 18, 168–177.
- Habeebu, S.S.M., Liu, J., Klaassen, C.D., 1998. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149, 203–209.
- Harstad, E.B., Klaassen, C.D., 2002. Gadolinium chloride pretreatment prevents cadmium chloride-induced liver damage in both wild-type and MT-null mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 180, 178–185.
- Hart, B.A., Lee, C.H., Shukla, G.S., Shukla, A., Osier, M., Eneaman, J.D., Chiu, J.-F., 1999. Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology* 133, 43–58.
- Horiguchi, H., Harada, A., Oguma, E., Sato, M., Hoa, Y., Kayama, F., Fukushima, M., Matsushima, K., 2000. Cadmium-induced acute hepatic injury is exacerbated in human interleukin-8 transgenic mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 163, 231–239.
- Hjortso, E., Fomsgaard, J.S., Fogh-Andersen, N., 1990. Does *N*-acetylcysteine increase the excretion of trace metals (calcium, magnesium, iron, zinc and copper) when given orally? *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 39 (1), 29–31.
- 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.



- 725 Kayama, F., Yoshida, T., Elwell, M.R., Lusfer, M.I., 1995. Cadmium-induced renal damage and proinflammatory  
726 cytokines: possible role of IL-6 in tubular epithelial cell  
727 regeneration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 134, 26–34.  
728
- 729 Kuester, R.K., Waalkes, M.P., Goering, P.L., Fisher, B.L.,  
730 McCuskey, R.S., Sipes, I.G., 2002. Differential hepatotoxicity  
731 induced by cadmium in Fischer 344 and Sprague–Dawley rats.  
732 *Toxicol. Sci.* 65, 151–159.
- 733 Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the  
734 assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227, 680–  
735 685.
- 736 Li, D.W.C., Spector, A., 1997. Hydrogen peroxide-induced  
737 expression of the proto-oncogenes, *c-jun*, *c-fos* and *c-myc* in  
738 rabbit lens epithelial cells. *Mol. Cell Biochem.* 173, 59–69.
- 739 Li, W.C., Wang, G.M., Wang, R.R., Spector, A., 1994. The  
740 redox active components H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and *N*-acetylcysteine regulate  
741 expression of *c-jun* and *c-fos* in systems. *Exp. Eye Res.* 59,  
742 179–190.
- 743 Liu, J., Kadiiska, M.B., Liu, Y., Lu, T., Qu, W., Waalkes, M., 2001.  
744 Stress-related gene expression in mice treated with inorganic  
745 arsenicals. *Toxicol. Sci.* 61, 314–320.
- 746 Liu, J., Kadiska, M.B., Corton, J.C., Qu, W., Waalkes, M.P.,  
747 Mason, R.P., Liu, Y., Klaassen, C.D., 2002. Acute cadmium  
748 exposure induces stress-related gene expression wild-type and  
749 metallothionein-III-null mice. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 525–  
750 535.
- 751 Malhotra, V., Wong, H.R., 2002. Interactions between the heat  
752 shock response and the nuclear factor-kappa B signaling  
753 pathway. *Crit. Care Med.* 30, S89–95.
- 754 Meyer, M., Schreck, R., Baeuerle, P.A., 1993. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and  
755 antioxidants have opposite effects on activation of NF-κB  
756 and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-  
757 responsive factor. *EMBO J.* 12, 2005–2015.
- 758 Morales, A., Garcia-Ruiz, C., Miranda, M., Mari, M., Colell,  
759 A., Ardite, E., Fernández-Checa, J.C., 1997. Tumor necrosis  
760 factor increases hepatocellular glutathione by transcriptional  
761 regulation of the heavy subunit chain of γ-glutamylcysteine  
762 synthetase. *J. Biol. Chem.* 272, 30371–30379.
- 763 Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth  
764 and survival: application to proliferation and cytotoxicity  
765 assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- 766 Pryhuber, G.S., Huyck, H.L., Baggs, R., Oberdorster, G.,  
767 Finkelstein, J.N., 2003. Induction of chemokines by low-dose  
768 intratracheal silica is reduced in TNFRI (p55) null mice.  
769 *Toxicol. Sci.* 72, 150–157.
- 770 Robertson, J.D., Orrenius, S., 2000. Molecular mechanisms of  
771 apoptosis induced by cytotoxic chemical. *Crit. Rev. Toxicol.*  
772 30, 609–627.
- 773 Salminen, W.F., Voellmy Jr, R., Roberts, S.M., 1996. Induction of  
774 Hsp70 in HepG2 cells in response to hepatotoxicants. *Toxicol.*  
775 *Appl. Pharmacol.* 141, 117–123.
- 776 Shaulian, E., Karin, M., 2002. AP-1 as a regulator of cell life and  
777 death. *Nat. Cell Biol.* 4, E131–E136.
- 778 Shanley, T.P., Ryan, M.A., Eaves-Pyles, T., Wong, H.R., 2000.  
779 Heat shock inhibits phosphorylation of I-kappaBalpha. *Shock*  
14 (4), 447–450.
- Shukla, G.S., Shukla, A., Potts, R.J., Osier, M., Hart, B.A., Chiu, 780  
J.F., 2000. Cadmium-mediated oxidative stress in alveolar 781  
epithelial cells induced the expression of γ-glutamylcysteine 782  
synthetase catalytic subunit and glutathione s-transferase α and 783  
π isoforms: potential role of activator protein-1. *Cell Biol.* 784  
*Toxicol.* 16, 347–362.
- Simeonova, P.P., Wang, S., Kashon, M.L., Kommineni, C., 785  
Crecelius, E., Luster, M.I., 2001. Quantitative relationship 786  
between arsenic exposure and AP-1 activity in mouse urinary 787  
bladder epithelium. *Toxicol. Sci.* 60, 279–284. 788  
789
- Souza, V., Bucio, L., Gutiérrez Ruiz, M.C., 1997. Cadmium uptake 790  
by a human hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology* 120, 791  
215–220. 792
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., 2000. Oxidative 793  
mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. 794  
*J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 19, 201–213. 795
- Sugiyama, M., 1994. Role of cellular antioxidants in metal-induced 796  
damage. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 1–22. 797
- Tandon, S.K., Singh, S., Prasad, S., Khandekar, K., Dwivedi, 798  
V.K., Chatterjee, M., Mathur, N., 2003. Reversal of cadmium 799  
induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their 800  
combination in rat. *Toxicol. Lett.* 145, 211–217. 801
- Tietze, F., 1969. Enzymatic method for quantitative determination 802  
of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: 803  
applications to mammalian blood and other tissues. *Anal.* 804  
*Biochem.* 27, 502–522. 805
- Uchinami, H., Yamamoto, Y., Kume, M., Yonezawa, K., Ishikawa, 806  
Y., Nakajima, A., Hata, K., Yamaoka, Y., 2002. Effect of heat 807  
shock preconditioning of NF-kappaB/I-kappaB pathway during 808  
I/R injury of the rat liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver* 809  
*Physiol.* 282, G962–971. 810
- Urani, C., Melchiorretto, P., Morazzoni, F., Canevali, C., Camatini, 811  
M., 2001. Copper and zinc uptake and Hsp70 expression in 812  
HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* 15, 497–502. 813
- Watkin, R.D., Nawrot, T., Potts, R.J., Hart, B.A., 2003. 814  
Mechanisms regulating the cadmium-mediated suppression of 815  
Sp1 transcription factor activity in alveolar epithelial cells. 816  
*Toxicology* 184, 157–178. 817
- Wijeweera, J.B., Gandolfi, A.J., Parrish, A., Lantz, R.C., 2001. 818  
Sodium arsenite enhances AP-1 and NF-κB DNA binding 819  
and induces stress protein expression in precision-cut rat lung 820  
slices. *Toxicol. Sci.* 61, 283–294. 821
- Wispryiono, B., Matsuoka, M., Igisu, H., Matsuno, K., 1998. 822  
Protection from cadmium cytotoxicity by *N*-acetylcysteine in 823  
LLC-PK<sub>1</sub> cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 344–351. 824
- Yamano, T., DeCicco, L.A., Rikans, L.E., 2000. Attenuation of 825  
cadmium-induced liver injury in senescent male Fischer 344 826  
rats: role of Kupffer cells and inflammatory cytokines. *Toxicol.* 827  
*Appl. Pharmacol.* 162, 68–75. 828
- Yoo, C.G., Lee, S., Lee, C.T., Kim, Y.W., Han, S.H., SM, Y.S., 829  
2000. Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction 830  
is related to stabilization of IκBα through preventing IκB 831  
kinase activation in respiratory epithelial cells. *J. Immunol.* 164, 832  
5416–5423. 833
- Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J., Ahmad, M., 2003. Molecular 834  
mechanism of *N*-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci.* 835  
60, 6–20.