ESTUDIO DEL MECANISMO DE FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS COMO RESPUESTA CELULAR HEPÁTICA INDUCIDA POR ADRIAMICINA, CON O SIN PROTECCIÓN CON L-CARNITINA

Narváez¹, María; Strauss², Miriam; Tabban¹ George; Hermoso¹Tomas

Sección de Bioquímica de Parásitos¹, Sección de Biología Celular², Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela,

Caracas, Venezuela.

Recibido: 27-06-2005

RESUMEN. Los cambios en los estados de fosforilación de proteínas han sido asociados a numerosas patologías de diferentes orígenes y severidad, y estas alteraciones, pueden estar vinculadas a estrés oxidativo y modificaciones en proteínas quinasas y fosfatasas. En este sentido, la terapia con adriamicina ha sido vinculada con estrés oxidativo cardiaco y hepático con subsecuente disfunción de tales órganos. Adicionalmente, al estrés cardiaco por adriamicina, el hígado podría representar otro blanco tóxico de la droga. Sin embargo, las alteraciones hepáticas han sido pobremente estudiadas. En este trabajo se estudio el patrón de fosforilación de proteínas de tejido hepático, ante la administración de adriamicina. Ratas Sprague Dawley se distribuyeron en cuatrogrupos al azar: control, adriamicina, carnitina y adriamicina-carnitina. Los tratamientos administrados por via intravenosa (VI) cada tres días/3 dosis fueron: 5 mg/Kg de peso de ADR y 20mg/Kg de peso de carnitina y combinando ambos agentes. Los animales se sacrificaron, tomándose el lóbulo hepático medio para ensayos de: fosforilación con [ã 32 -P] ATP, inmunodetección de fosforilación com serina y tirosina, proteína JNK y C-jun. Los patrones de fosforilación de proteínas entre los grupos fueron diferentes observándose mayor expresión de proteínas fosforiladas en los grupos adriamicina. La carnitina revierte el efecto sobre la fosforilación comportándose como hepatoprotector ante la droga. **Palabras Claves:** Adriamicina, hígado, fosforilación de proteínas, L-carnitina, JNK, C-jun.

STUDY OF PROTEIN PHOSPHORYLATION MECHANISM INDUCED BY ADRIAMYCIN IN HEPATIC TISSUE WITH OR WITHOUT L-CARNITINE PROTECTION

ABSTRACT. The changes in the pattern of protein phosphorylation have been associated to numerous pathologies of different origins and severity; these alterations can be linked to oxidative stress and subsequent modifications in the protein kinases and phosphatases. In this regard, adriamycin therapy have been related to the heart and liver oxidative stress and organ disfunction. Therefore, in addition to the heart, the liver might be another adriamycin toxic target. However, adriamycin liver alterations have been poorly studied. The aim of this work was to determined liver protein phosphorylation before and after adriamycin administration. Female Sprague-Dawley rats (n=3), 40-60g body weight, were randomized into four groups: control, adriamycin, carnitine and adriamycin-carnitine. Saline adriamycin (15mg/Kg body weight) and carnitine (20 mg before adriamycin) were given intravenously (0,1 ml). Samples from the medium liver lobe were taken for biochemical experiments including phosphorylation with [ã 32 -P] ATP, inmunodetection of phosphoproteins in serine and tirosine, JNK and C-jun proteins. The protein phosphorylation was different between the groups studied. The greater expression of protein phosphorylates was determined in the adriamycin group. We suggest that there is a relationship between carnitine administration and decreased expression of protein phosphorylates. Carnitine may be a hepatoprotector. **Key words**: Adriamicine, liver, protein phosphorylation, L-carnitine, JNK, C-jun.

INTRODUCCIÓN

La arquitectura hepática puede verse alterada luego del uso de ciertas drogas, y fármacos como es el caso de la adriamicina (ADR), ocasionando una patología hepática. Las alteraciones hepáticas inducidas por la ADR han sido poco estudiadas a pesar de las evidencias de disfunción hepática relacionadas a las terapias con este agente antitumoral². La ADR pertenece al grupo de los antibióticos tipo antraciclinas y está firmemente establecido como el agente terapéutico más utilizado en el tratamiento de una gran variedad de tumores⁴. Su acción antitumoral aún no ha sido clarificada, pero se han propuesto mecanismos para tratar de explicar su modo de acción; se cree que sus efectos biológicos pueden ser los responsables de la inhibición del crecimiento de la célula tumoral; entre estos efectos tenemos: interferencia con la síntesis de macromoléculas, unión covalente al ADN que dificulta la expresión de proteínas, inhibición de la topoisomerasa II, interferencia en la progresión del ciclo celular en la fase G2, la inducción de

Abreviaturas: adriamicina (ADR), L-carnitina (L-car), control (CON), carnitina (CAR), vía intravenosa (VI), buffer fosfato salino (PBS), ácido etilen diamino tetra acético (EDTA), dodecil sulfato de sodio (SDS), fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), proteínas quinasas mitógenos activas (MAPKs).

apoptosis y generación de radicales libres¹⁶. La ADR se metaboliza casi totalmente en el hígado, una parte que no se metaboliza se elimina por la orina y otra pequeña parte se excreta por la bilis. Esta droga puede causar toxicidad: hematológica, gastroentérica, hepática y cardiaca; es por ello que su uso se ve limitado en algunos casos o se combina con otros compuestos para mitigar los efectos tóxicos y mantener el efecto terapéutico deseado. La L-carnitina (L-car) es utilizada ampliamente como terapia conjunta con la ADR debido a sus efectos citoprotectores. Esta sustancia es sintetizada en el hígado en forma fisiológica pero es necesaria su administración exógena para lograr efectos terapéuticos. La reducción enzimática generada por la ADR a través de una variedad de oxidasas, reductasas y deshidrogenasas produce especies oxígeno reactivas incluyendo radicales libres oxidrilos y anión superóxido produciendo estrés oxidativo en el entorno celular²⁸, el exceso de radicales libres es acompañado de un incremento en la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados. Por su naturaleza lipofílica la ADR se une a las membranas celulares y a proteínas plasmáticas formando fuertes complejos que producen perturbación en la estructura de las membranas celulares, generando inactivación de los sistemas asociados como, desregulación iónica, con pérdida de la homeostasis de

sistemas regulados por calcio y la consecuente alteración en la producción de energía, expresada en una disminución de los niveles de ATP^{1,14,38}. Durante el daño citotóxico se liberan macromoléculas y proteínas esenciales para el funcionamiento normal de las células que pueden considerarse determinantes bioquímicos potenciales. Dentro de estos determinantes bioquímicos las proteínas MAP quinasas son proteínas serinas/ treoninas quinasas que se activan por fosforilación dual en ambos aminoácidos. Son importantes componentes de las vías de señalización que traducen estímulos extracelulares al interior celular. Datos recientes sugieren que la proteína JNK perteneciente al grupo de las MAP quinasas, es activada en respuesta a diferentes tipos de estrés celular que induce daño al ADN como el producido por ADR³¹. En este trabajo se evalúa la inducción de la fosforilación de proteínas como respuesta celular del tejido hepático luego del tratamiento con ADR con o sin protección con L-car.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo Experimental y protocolo de Administració.

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague Dawley de aproximadamente 40 a 60 g de peso corporal y 21 días de nacidas adquiridas en el Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (Caracas-Venezuela). Las ratas se distribuyeron al azar en cuatro grupos de trabajo de 3 individuos cada uno: control (CON) (agua destilada, vía intravenosa (VI) 0,1ml), adriamicina (ADR) (5mg/Kg de ADR en 0,1 ml de agua destilada, tres subdosis iguales cada tres dias VI), carnitina (CAR) (20 mg/Kg de L-car en 0,1 ml de agua destilada VI) y adriamicina-carnitina (ADR-CAR) (ADR y L-car en las dosis anteriores). Luego de la última subdosis de ADR, los animales fueron sacrificados con vapores de cloroformo y el hígado fue disecado. Lo anterior, siguiendo las normas especificadas en "Guide for Care and Use of Laboratory Animals "of the U.S. National Institute of Health (NIH publication № 85-23, revised 1985).

Materiales

La L-car fue donada por Laboratorios Elmor S.A (Caracas-Venezuela), la ADR fue suministrada por Sigma Company (Miami USA) y el resto de los reactivos fueron de grado analítico.

Obtención de las muestras y lisis celular

Los lóbulos medios hepáticos removidos se colocaron en amortiguador fosfato salino (PBS). Luego se seccionaron en bloques de 2-4mm de diámetro en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.4. Los bloques se colocaron en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 735g por 1 minuto, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 ml de amortiguador de extracción Tris-HCl 20mM pH 7.4, PMSF 1mM y EDTA 2mM. Se homogenizó el material, se centrífugo a 16.000g por 10 minutos y se conservó el sobrenadante a -20º C hasta el momento de su uso.

Determinación de Proteínas.

Se realizó mediante el microensayo de Bradford⁶. *Análisis de Electroforesis y Western blot.*

Los homogenatos de los hígados se trataron con amortiguador de muestra que contenía SDS al 2% y se

desnaturalizaron por calor durante 5 minutos. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% según el método de Laemmli,25. Los volúmenes de muestra se colocaron en cada bolsillo, respetando la linealidad de concentración de proteínas en todas las muestras estudiadas. Las proteínas fueron transferidas a papel de nitrocelulosa para su inmovilización según el método de Towbin y col,42. Luego se procedió al bloqueo con leche descremada al 5% en PBS 0,1% tween 20. Se incubaron con el anticuerpo primario respectivo (anti-fosfoserina, anti-fosfotirosina, anti-C-jun, anti JNK) y posteriormente con el anticuerpo secundario adecuado acoplado con peroxidasa. Todos los análisis semicuantitativos de densitometría la determinación de los pesos moleculares fueron realizados utilizando el software Multi-Analyst (Bio-Rad).

Ensayos de Fosforilación.

Las muestras fueron colocadas en amortiguador de incubación Tris-HCI 20mM, EDTA 2mM y MgCl₂ y una mezcla de ATP ([ã 32 -P] ATP y ATP frío), la mezcla se incubó a 37°C por un periodo de 15 min. Posteriormente, las muestras se sometieron a desnaturalización con amortiguador de muestra para detener la reacción. La concentración final en cada carril fue de 22 μ g en un volumen de 70 μ l. Se procedió a separar las proteínas por electroforesis para posteriormente evidenciar las proteínas contenidas en los geles por tinción con azul de Coomassie. Los geles fueron secados y colocados por 24 horas en un cassette intensificador con una película de autoradiografía para detectar las proteínas fosforiladas.

Péptidos sintéticos en la Obtención de Anticuerpos policionales

En el Laboratorio de síntesis de péptidos del Instituto de Medicina Tropical se obtuvieron los anti-péptidos contra la proteína C-jun, que es uno de los sustratos de la proteína quinasa JNK así como también antipéptidos contra la proteína JNK. Para lograr ese objetivo se realizó una búsqueda en la base de datos Swiss-Prot, seleccionándose las proteínas: mitogen-activated protein kinase MK-8 (access number P-45983) y la proteína quinasa humana protein kinase JNK1 (access number A-53063), de estas proteínas se escogieron las secuencias DLLTSPDVG and MMTPYVVTR correspondientes a un sitio de fosforilación y a partir de esta secuencia se sintetizaron los péptidos IMT 518 e IMT-517, según el Método de Merrifield²⁷, el cual utiliza la química de T-boc como agente protector de los aminoácidos adicionados. Utilizando una concentración de 0,5 mg los péptidos 518 y 517, se inocularon a conejos hembras de la cepa Nueva Zelandia provenientes del Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Previa a la inoculación del péptido, se procedió a tomar 10 ml de sangre del conejo (Suero pre-inmune), luego se procedió con el protocolo de inmunización que sigue: 1 semana después de la toma del suero pre -inmune se inoculó el animal en la región dorsal con partes iguales del péptido y adyuvante completo de Freund (en 9 sitios diferentes con 0,1 ml c/inoculación). Posteriormente a los 15 días se realizó una segunda inoculación igual a la anterior, pero con adyuvante incompleto de Freund, luego de aproximadamente 5 días se procedió a tomar muestra del suero inmune. La evaluación de los antipéptidos obtenidos se realizó utilizando el Ensayo del blot de múltiples antígenos (MABA) de Noya y Alarcón de Noya³⁰, que consiste en un Western blot modificado a través del cual, se puede evaluar el reconocimiento del suero utilizando varios antígenos y así determinar la especificidad de los sueros inmunes.

RESULTADOS

Ensayos de Fosforilación.

La figura 1 muestra la autoradiografía de un gel de poliacrilamida al 10% correspondiente al experimento de fosforilación. Se observa la presencia de diversas bandas de proteinas fosforiladas con pesos molecualares entre 21 y 100 kDa. Las proteínas de pesos moleculares de 22, 36, 54, 61, 95 y 97kDa fueron las que presentaron las mayores variaciones en la intensidad de fosforilación entre los grupos en estudio.



Figura1. Cambios en la fosforilación de proteínas en muestras de tejido hepático. Las muestras se incubaron por 15 minutos con una mezcla de ATP ([³²-P]-ATP y ATP frío), y posteriormente fueron evaluadas por SDS-PAGE y autoradiografía. Los carriles 1,2,3 y 4 se corresponden con los: grupos CON, ADR, CAR y ADR-CAR.

Al comparar los grupos CON y ADR se evidenció un incremento tanto en el número de bandas de proteínas fosforiladas como en su intensidad. En el grupo ADR, se observan más de 16 bandas de proteínas fosforiladas en contraste con las 13 bandas proteicas evidenciadas en el grupo CON. Se observa una dupleta alrededor de 90kDa y otra a nivel de 54kDa. El mismo comportamiento se aprecia en las bandas proteicas de 66 y 70kDa. Los grupos CAR y ADR-CAR, mostraron un

número menor de bandas fosforiladas en relación al grupo ADR. En el caso del grupo CAR se observa una marcada disminución en la intensidad de la fosforilación de todas las bandas. El grupo ADR-CAR recuerda el perfil del CON, destacándose en ambos grupos la presencia de dos dupletas, una a nivel de 90kDa y la otra a nivel de 54kDa. En general se encontró una mayor fosforilación de proteínas endógenas en los grupos tratados con ADR.

Inmunodetección de las proteínas fosforiladas en serina y tirosina.

En la figura 2 se muestra la inmunodetección de antifosfoproteínas del tipo serina. Se evidencia una banda de aproximadamente 33 kDa de peso molecular en todos los grupos. Al comparar la intensidad de la banda del grupo ADR y CON se observó un mayor reconocimiento inmunológico en el grupo ADR con respecto al grupo CON. Por otra parte, en los grupos ADR-CAR se detectó la presencia de la misma banda pero de menor intensidad y similar a la del grupo CON. Con el anticuerpo antifosfotirosina se evidenciaron varias bandas de pesos moleculares entre 26 y 90 kDa en todos los grupos en estudio (figura 3); las bandas de 35, 66 y 90kDa respectivamente se destacan con mayor intensidad que el resto de las bandas. En el grupo ADR se evidencia una banda de 66kDa que no se aprecia en el grupo CON, mientras que la banda de aproximadamente 71kDa disminuye su intensidad en el grupo ADR. Esta última banda de 71kDa se hace más intensa en el grupo CAR, mientras que en el grupo ADR-CAR se expresa de igual intensidad que en el grupo ADR. A nivel de 90kDa se observa una banda bien intensa en el carril 4 correspondiente al grupo ADR-CAR, esta misma banda esta pobremente expresada en ADR y CAR y desaparece en el CON.







Figura 3. Inmunodetección de proteínas fosforiladas en tirosina en tejido hepático, se utilizaron anticuerpos antifosfotirosina. Carriles 1, 2, 3 y 4 corresponden a los grupos: CON, ADR, CAR y ADR-CAR respectivamente.

Inmunodetección de la proteína JNK

Los sueros pre y post inmunes que se obtuvieron a partir del péptido 518 se enfrentaron a las proteínas de los homogenatos hepáticos provenientes de los diferentes grupos experimentales, separados por electroforesis. Esto nos permitió identificar la presencia de la isoforma JNK1 de la proteína JNK. No se evidenció reconocimiento de la proteína JNK (datos no mostrados), al enfrentarla al suero preinmune, en contraste con lo observado en el suero inmune anti-péptido 518 que reconoce un rango de proteínas de pesos moleculares que van desde 30kDa hasta 127kDa aproximadamente (figura 4). Las bandas proteicas reconocidas con mayor intensidad fueron las de 30, 35, 45, 60, 75 y una dupleta alrededor de 98kDa. Llama la atención el aumento en la expresión y en la intensidad de las bandas de proteínas que se evidencia en el carril 2 (ADR) al compararse con el CON. La mayor diferencia entre estos grupos es a nivel de las proteínas ubicadas entre 30 y 75kDa respectivamente, que se expresan con mayor relevancia en el grupo ADR. Al comparar los grupos CAR y ADR-CAR, se observa una mayor expresión de estas mismas bandas en el segundo grupo. En contraste, la dupleta ubicada a nivel de 98kDa es más intensa en el grupo CAR que en el grupo ADR-CAR





Inmunodetección del sustrato de la proteína JNK (C-jun).

Los sueros inmunes, se enfrentaron a los grupos experimentales CON, ADR, CAR y ADR-CAR para evidenciar la presencia del sustrato de proteína JNK, (Cjun), observándose el reconocimiento de varias bandas de proteínas (figura 5).

En esta figura, se evidenció un patrón de reconocimiento de bandas inmunológicas con pesos moleculares de 31 a 97kDa. Al comparar el grupo CON y el grupo ADR se ve una tendencia de mayor reconocimiento en una banda de 66kDa en el grupo ADR, mientras que en este mismo grupo aparece una banda de 68kDa aproximadamente que no está presente en el CON. Cuando estudiamos los grupos CAR y ADR-CAR, se evidenció que la banda de 66kDa está presente en ambos grupos con una mayor expresión en CAR. Una banda a nivel de 31kDa se observó en todos los grupos experimentales; es interesante hacer notar que no se hallaron cambios notables en esta proteína en ninguno de los grupos estudiados. Por otra parte, alrededor de los 72kDa se observó una banda altamente reconocida por el grupo ADR-CAR, mientras que en los demás grupos se expresó débilmente.



Figura 5. Inmunodetección de las proteínas sustrato de JNK, C-jun, utilizando anticuerpos policionales monoespecíficos obtenidos por síntesis de péptidos. Carriles 1, 2, 3 y 4 corresponden a los grupos: CON, ADR, CAR y ADR-CAR respectivamente.

DISCUSIÓN

En este trabajo se estudia por primera vez los cambios de fosforilación de proteínas en tejido hepático de ratas tratadas con ADR y su posible paralelismo con los mecanismos de toxicidad inducidos por la droga. De igual forma se evaluó el rol hepatoprotector de la L-car en la terapia antineoplásica. El aumento en la fosforilación de proteínas endógenas en las muestras provenientes de hígados tratados con ADR con y sin protección de L-car, sugiere que la presencia de la droga en los grupos tratados induce un incremento en la expresión de proteínas celulares de protección, que podría traducirse en un aumento en la fosforilación de proteínas. En tal sentido, diferentes tipos de estrés, son capaces de activar proteínas quinasas mitógeno activas del tipo JNK112. La proteína JNK fue identificada por primera vez en hígado de ratas por inyección de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, como una proteína quinasa que fosforila la proteína 2 asociada a microtúbulos²⁴. Tales hallazgos corroboran los resultados de este trabajo, donde el incremento en la fosforilación de proteínas, puede asociarse a proteínas tipo JNK, en este caso la ADR puede actuar uniéndose al ADN y ARN disminuyendo la síntesis de muchas de las proteínas sintetizadas en tejido hepático, dando un estímulo, capaz de disparar los mecanismos de defensa y homeostasis del hígado, generándose un incremento en la actividad de las proteínas de choque térmico, así como también de las proteínas JNK que son reguladas vía fosforilación de residuos de treonina y tirosina por quinasas SEK1/MKK4 y SEK2/MKK7¹². La disminución en la síntesis de proteínas hepáticas totales podemos asociarla paralelamente a mecanismos de regulación celular que activen la síntesis de otras proteínas protectoras ante el daño causado por agentes tóxicos o drogas. Por otra parte, la fosforilación de las proteínas es un sistema de regulación biológico, dinámico y ubiquitario, que se va activando en forma de cascadas de fosforilaciones, ante la acción de agentes exógenos o celulares. Adicionalmente, se ha demostrado que hay un

aumento en la actividad de la proteína JNK asociado con la diferenciación celular²⁹ e inducción de disfunción celular^{46,47}. De igual manera, estudios realizados por diferentes grupos de investigadores han encontrado que algunos procesos o situaciones de agresión a los cuales se ve sometido el hígado pueden generar muerte celular. Estudios recientes, realizados en hígados sometidos a procesos de isquemia y reperfusión durante un transplante, mostraron una disminución de viabilidad celular¹⁵. Esta disminución en la viabilidad celular, en células de Kupffer, puede ser causada por la generación de radicales libres de oxígeno y el factor de necrosis tumoral (FNT)^{7,9}. Estos factores causan disfunción celular a través de un incremento en la actividad de la proteína JNK en hígados de ratas y cultivos primarios de hepatocitos^{5,10}. Cuando el hígado es sometido a procesos de estrés, se desencadenan mecanismos de actividad celular inmediata en diferentes regiones del tejido hepático según sea la intensidad y tipo de situación. Por ejemplo, la condición de isquemia, hipotermia o hipoxia son estímulos potentes que pueden activar la proteína JNK en las células. Se ha demostrado que bajo condición de hipoxia solo se induce la activación de JNK1 en hepatocitos de ratas, mientras que en hipoxia-reoxigenación se estimula la activación exacerbada de JNK1/SAPK1, lo cual induce un mecanismo de muerte programada en el hepatocito^{10,11}. Con respecto a los cambios en la actividad de la proteína JNK, luego de la agresión tóxica con ADR, se desconoce si hay o no un verdadero incremento en la actividad específica de esta proteína, ya que el anticuerpo empleado no diferencia entre la forma fosforilada (activa) y no fosforilada (inactivada); verificándose solo la presencia de los niveles de la proteína JNK en las muestras estudiadas; sin embargo los resultados en este sentido sugieren un aumento en la actividad enzimática de la misma. Otros estudios realizados por Bagchi y col, 1995³, concuerdan que la administración de ADR produce a corto plazo peroxidación lipídica, así como daño en el ADN, lo que está asociado con producción de especies oxígeno reactivas. En tal sentido, las MAPKs son proteínas quinasas que regulan procesos de proliferación celular, diferenciación y sobrevida, pero además intervienen en los mecanismos de adaptación a condiciones de estrés, incluyendo el estrés oxidativo, resultante del incremento de los radicales libres. Las quinasas pertenecientes a la familia MAPK son activadas bajos ciertas condiciones de estrés celular, y son fosforiladas por reacciones sucesivas en residuos de serina y treonina en el extremo N-terminal C-jun. En este sentido, la presencia de los residuos de fosforilación de serina en las muestras estudiadas, así como la presencia de una banda de aproximadamente 31kDa que se expresó en todos los grupos experimentales, y en especial en el grupo ADR, ha sido corroborada por Osborn y Chambers en 1996³¹.Estos investigadores, demostraron que algunas proteínas quinasas son fosforiladas en serina en respuesta al tratamiento con drogas antitumorales.

Los resultados revelaron la presencia de la proteína JNK en las muestras estudiadas, destacándose una banda de 35kDa en los grupos tratados con ADR que pudiera ser la isoforma JNK-1. Esta misma banda aparece de menor intensidad en el grupo ADR-CAR lo que sugiere una posible hepatoprotección en los grupos ADR-CAR, y este resultado pudiera estar relacionado al efecto cardioprotectivo demostrado por otros investigadores ^{39,48} y por Sayed-Ahmed y col.³⁶, específicamente con la L-propionil carnitina, la cual al ser incubada junto a las células cardíacas, las protege del daño causado por la droga. De igual forma en trabajos realizados recientemente por nuestro equipo de investigación se observa la existencia de un paralelismo citoprotectivo de L-car tanto en corazón como en hígado con el común denominador de incremento en la expresión de la proteína JNK.

En tal sentido, varios grupos de investigación han indicado que la vía de señalización JNK/C-jun juega un papel importante en el mecanismo de apoptosis²². De igual manera se ha mostrado que, los ácidos biliares activan múltiples vías de señalización en las células que pueden afectar la sobrevida y proliferación celular ^{35,37,40,42}. Qiao L y col.³³, revelaron que al usar ácido deoxicolico (DCA), se induce señalización protectiva de JNK2, mientras que la inducción de JNK1 fue tóxica para los hepatocitos. En nuestros experimentos la detección de la proteína JNK se realizó utilizando anticuerpos policionales contra la isoforma JNK1. Esto no descarta la posibilidad de que este anticuerpo tenga la sensibilidad de detectar otras de las 10 isoformas conocidas para las complejas JNK quinasas¹⁸. Lo anterior pudiera explicar las diferentes bandas de proteínas visualizadas en la inmunodetección de la proteína JNK. Otros estudios, han sugerido que JNK1 y JNK2 pueden regular diferencialmente la respuesta apoptótica en estas células^{21,23}. La expresión de la proteína JNK detectada en los inmunoensayos, se corrobora con lo hallado por estos investigadores, no obstante, debido a la gran complejidad de las estructuras de las proteínas JNK, son necesarios mas estudios a fin de conocer el mecanismo o los mecanismos asociados a la activación de la vía de señalización JNK/C-jun en este sistema.

Las MAPKs guinasas, que se activan en forma de cascadas de fosforilación vía quinasas citoplasmáticas, en respuesta a estímulos extracelulares, a su vez fosforilan y activan otros factores de transcripción. La proteína JNK, activada por estrés celular, tóxicos y citoquinas, se fosforila y activa C-jun y otros factores de transcripción^{5,13,17}. En tanto que, C-jun componente activador de factores de transcripción junto con los miembros de c-fos, y ATF2 forman la familia de heterodímeros; se unen a diferentes regiones del ADN y son capaces de transactivar los promotores de C-jun ^{19,20,44}. La expresión de C-jun es evidenciada en homogenatos de hígados provenientes de los grupos experimentales tratados con ADR por la presencia de una banda de aproximadamente 33 kDa, similar al peso molecular descrito para la proteína C-jun³⁴.

La activación de la vía JNK/AP-1, ha sido asociada con inducción de apoptosis^{37,45,46}, mientras que la activación de ERK esta asociada con proliferación³².

Este trabajo aporta evidencias para sugerir los mecanismos potenciales y señales celulares que pudiesen estar involucrados en la respuesta hepática ante el estrés tóxico inducido por ADR. Aún cuando el papel de la proteína JNK no esta bien definido en los hepatocitos; varios reportes indican que la activación de dicha proteína tiene efectos célula-específicos y depende de la magnitud del estimulo inicial⁸. En el hígado, hay evidencias que indican la asociación entre la activación de JNK y el daño

celular; así mismo, el estudio del efecto de la concanavalina A, también ha sido vinculado al paralelismo entre daño celular hepático y activación de JNK a través de la vía del factor de necrosis tumoral (TNF)^{41,43}. Un incremento en la expresión de anticuerpos anti TNF bloquea el daño celular inducido por concanavalina A; reduciendo la activación de JNK, a través de una vía independiente del TNF^{41,43}. Un modelo dependiente de TNF es el de isquemia/reperfusión hepática. En este último, el daño celular se correlaciona directamente con la activación de JNK y los mecanismos que previenen las lesiones, las cuales están asociadas con reducción de la actividad de esta proteína^{5,26}. Estos resultados, in vivo, indican que la activación de JNK dependiente de TNF se correlaciona con daño hepático., sin embargo el papel proapoptótico versus antiapoptótico aún no está clarificado.

En conclusión, el aumento en la fosforilación de las proteínas quinasas ante estrés tóxico por ADR parece promover la activación de mecanismos citoprotectores hepáticos. En tal sentido, el aumento en la fosforilación de proteínas, conjuntamente con el aumento en la expresión de la proteína JNK representa una respuesta celular citoprotectora.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-aleem, S., El-Merzabini, M., Sayed-Ahmed, M., Taylor, D. A., Lowe, J. E. Acuteand choronic effectcs of adriamycin on fatty acid oxidation in isolated cardiac myocytes. *J. Mol.Cell. Cardiol.* 29: 789-797, 1997.
- Aviles, A., Herrera, J., Ramos, E., Ambriz, R., Aguirre, J., Pizzuto, J. Hepatic injury during doxorubicin therapy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 108: 912-913, 1984.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E., Nelly, J., and Stohs, S. Adriamycin-induced hepatic and micocardial lipic peroxidation and DNA damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites. *Toxicology*. 30: 2299-2304, 1995.
- 4. Bartoszek, A. Metabolic activation of adriamycin by NADPH-cytochrome P450 reductase; overview of its biological and biochemical effects. *Acta Biochim. Pol.*. 49: 323-331, 2002.
- Bradham, C. A., Stachlewitz, R. F., Gao, W., Qian, T., Jayadev, S., Jenkins, G., Hannun, Y., Lemasters, J. J., Thurman, R. G., Brenner, D. A. Reperfusion after liver trasplantation in rats differentially activates the mitogen-activated protein kinases. *Hepatology*. 25: 1128-1135, 1997.
- Bradford, M. A rapidid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities ofprotein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 27: 246-254, 1976.
- Caldwell-Kenkel, J. C., Currin, R. T., Tanaka, Y., Thurman, R. G., Lemasters, J. J.Kuffler cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology*. 13: 83-95, 1991.
- Chaudhary, P. M., Eby, M. T., Jasmin, A., Hood, L. Activation of the C-jun N-terminal kinase/ stressactivated protein kinase pathway by over expression of caspase-8 and its homologs. *J. Biol. Chem.* 274: 19211-19219, 1999.
- 9. Colletti, L. M., Remick, D. G., Burtch, G. D., Kunkel, S. L., Strieter, R. M., Campbell, D.A.

Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiological alterations after ischemia/ reperfusion injury in the rat. *J. Clin. Invest.* **85:** 1936-1943, 1990.

- Crenesse, D., Gugenhein, J., Hornoy, J., Tournieri, K., Laurens, M., Cambien, B., Lenegrate, G., Cursio, R., De Souza, G., Auberger, P., Heurteaux, C., Rossi, B., Schmid-Alliana,A. Protein kinase activation by warm and cold hypoxia-reoxygenation in primarycultured rat hepatocytes-JNK/SAPK involvement in apoptosis. *Hepatology*. 32: 1029-1036, 2000.
- 11. Crenesse, D., Schmid-Alliana, A., Laurens, M., Cursio, R., Gugenhein, J. JNK1/SAPK1 involvement in hypoxia-oxygenation-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Transpl. Proc.* **33**: 260-261, 2001.
- Davis, R. J. Signal transduction by the C-jun N -terminal kinase. *Biochem. Soc. Symp.* 64: 1-12, 1999.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barret, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., Davis RJ JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Has-Ras that binds and phosphorylates the C-jun activation domain. *Cell.* 76: 1025-1037, 1994.
- Fu, L. X., Waagstein, F., Hjalmarson A. A new insinght into adriamycin induced cardiotoxity. *Intern. J. Cardiol.* 29: 15-20, 1990.
- Furukawa, H., Todo, S., Invertarza, O., Casavilla, A., Wu, Y. M., Scotti-Foglieni, C., Broznick, B., Bryant, J., Day, R., Starzl, T. E. Effect of cold ischemia time on the early outcome of human hepatic allografts preserved with UW solution. *Transplatation.* 51: 1000-1004, 1991.
- Gewirtz, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 57: 727-741, 1999.
- Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B., Davis, R. J. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*. 267: 389-393, 1995.
- Gupta, S., Barret, T., Whitmarsh, A.J., Cayanagh, J., Sluss, H.K., Dérijard, B., Davis, R.J. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* 15: 2760-2770,1996.
- Hai, T., Curran, T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 3720-3724, 1991.
- Halazonetis, T. D., Georgopoulos, K., Greenberg, M. E., Leder, P. C-jun dimerizes with itself and with c-Fos forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell.* 55: 917-924, 1988.
- **21. Hochedlinger, K., Wagner, E. F., Sabapathy, K**.. Differential effects of JNK1 and JNK2 on signal specific induction of apoptosis. *Oncogen*e. **21**: 2441-2445, 2002.
- 22. Koo, M. S., Kwo, Y. G., Park, J. H., Choi, W. J., Billiar, T. R., Kim, Y. M. Signaling and unction of caspase and c-Jun N-terminal kinase in cis-platininduced apoptosis. *Mol. Cell.* 13: 194-201, 2002.
- Kuan, C. Y., Yan, D. D., Samanta Roy, D. R., Davis, R. J., Rakic, P., Flavell, R. A. The JNK1 and JNK2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron.* 22: 667-676, 1999.
- 24. Kyriakis, J. M., Avruch, J. pp54 microtubuleassociated protein 2 kinase. A novel serine /threonine

protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J. Biol. Che*m. **265**: 17355-17363, 1990.

- **25. Laemmli,** U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685, 1970.
- 26. Lehmann TG, Heger M, Munch S, Kirschfink M., Klar E In vivo microscopy reveals that complement inhibition by C1-esterase inhibitor reduces ischemia/ reperfusion injury in the liver. *Transpl. Int.*;13:S547-50,2000.
- 27. Merrifield, R. Solid phase syntesis the Merrifield technique. *J. Amer. Chem. So*c. 85: 2149-2160, 1962.
- Montvéale N.. Adriamycin FSP (Computer program). MS-DOS versión. Physicians desk reference. Medical Economist Data production Company, 1996.
- Nagata, Y., Takahashi, N., Davis, R. J., Todokoro, K. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is requiered for erythropoietin-induced erythroid differentation. *Blood.* 92: 1859-1869, 1998.
- **30.** Noya, O., Alarcón de Noya, B. The multiple antigen Blot assay (MABA): a simple inmunoenzymatic technuque for simultaneous screening of multiple antigens. *Immunol. Lett.* **63**: 53-56, 1998.
- **31. Osborn, M.T., Chambers, T.C.** Role of the stressactivate/c-Jun NH2 terminal protein kinase pathway in the cellular response to doxorrubicin and other chemotherapeutic drugs. *J. Biol. Chem.* **273**: 4928-4936, 1996.
- 32. Page, G., Lenormand, P., L' Allemain, G., Chambard, J. C., Meloche, S., Pouyssegur, J. Mitogen- activated protein kinases p42 MAPK and p44 MAPK are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. **90**: 8319-8323, 1993.
- 33. Qiao, L., Han, S. I., Fang, Y., Park, J. S., Gupta, S., Gilfor, D., Amorino, G., Valerie, K., Sealy, L., Engelhardt, J. F., Grant, Steven, Hylemon, P: B. Dent, P. Bile acid regulation ofC/EBP?, CREB, and c-Jun function,via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* 23: 3052-3066, 2003.
- 34. Rieder, M. J. et al Genome Sciences, University of Washington, 1705 NE Pacific, Seattle, WA 98195,USA. 2003
- 35. Rao YP, Stravitz RT, Vlahcevic ZR, Gurley EC, Sando JJ., Hylemon PB Activation of protein kinase C alpha and delta by bile acids: correlation with bile acid structure and diacylglycerol formation. J. Lipid. Res. 38:2446-54, 1997.
- 36. Sayed-Ahmed M, Salman TM, Gaballah HE, About El-Naga SA, Nicolai R, Calvani M., Propionil L-Carnitine as Protector Aainst Adriamycin-induced Cardiomiopathy. *Pharmacol. Res.* 43: 513-520, 2001.
- 37. Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, H., Okano, H., Takeda, Y., Tashima, M., Sawada, H., et al. Requeriment of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 270: 27326-27331, 1995.

- Signal, P., Deally, C., Weinberg, L. Subcellular effectcs of adriamycin in the heart: a concise review. J. Mol. Cell. Cardiol. 19: 817-828, 1987.
- Strauss M, Anselmi G, Hermoso T., Tejero F. Carnitine promotes heat shock Protein Synthesis in a neonatal rat Experimental model. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:2319-2325, 1998.
- 40. Stravitz RT, Rao YP, Vlahcevic ZR, Gurley EC, Jarvis WD., Hylemon PB. Hepatocellular protein kinase C activation by bile acids: implications for regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase. A. J . Physiol. 271(2 Pt 1):G293-303, 1996.
- 41. Streetz, K. L., Fregien, B., Pülmpe, J., Körber, K., Kubicka, S., Sass, G., Manns, M. P., Tiegs, G., Trautwein, C. Dissection of the intracellular pathways in hepatocytes reveals a direct role of jun kinase and IRF-1 in con A-induced liver failure. *J. Inmunol.* 167: 514-523, 2001.
- **42. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** Electrophoretic tranfer of protein from polyacrilamude gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*A. **76**: 4350-4354,1979.
- 43. Trautwein, C., Rakemann, T., Brenner, D. A., Streez, K., Licato, L., Manns, M. P., Tiegs, G. Concanavalin A-induced liver cell damage: activation of intracellular pathways triggered by tumor necrosis factor in mice. *Gastroenterology*. 114: 1035-1045, 1998.
- 44. van Dam, H., Duyndam, M., Rotier, R., Bosch, A., Vries-Smits, L., Herrlich, P., Zantema, A., Angel, P., van der Eb AJ. Heterodimer formation of c-jun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 aminoacid adenovirus E1A protein. *EMBO* J. 12: 479-487, 1993.
- 45. Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M. J., Szabo, E., Zon, Ll., Kyriakys, JM., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Kolesnick, RN. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. Nature. 380: 75-79, 1996.
- 46. Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., Greenberg, M. E. Opposing effects of ERK and JNK p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 270: 1326-1331, 1995.
- 47. Zanke, B. W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L. A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F.F., Woodgett, J.R. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis platinum, UV irradiation or heat. *Curr. Biol.* 6: 606-613, 1996.
- 48. Zeidán, Q., Strauss, M., Porras, N., Anselmi, G. Differential long-term subcellular responses in heart and liver to adriamycin stress. Exogenous L-carnitine cardiac and hepatic protection. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 34: 315-321, 2002.

Correspondencia: Tomas Hermoso, Sección de Bioquímica de Parásitos, Instituto de Medicina Tropical Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela. Correo electrónico: <u>hermosot@ucv.ve</u>.