



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad De Estudios Superiores
Iztacala



Expresión de factores transcripcionales STAT3 y STAT5 en individuos expuestos a benceno

Tesis
Que para obtener el título de:
Biólogo
Presenta:
Miguel Angel Fonseca Sánchez

Director de Tesis:
Dr. José Efraín Garrido Guerrero
2004-06-05

Esta tesis se realizó bajo el apoyo del proyecto del CONACyT No. 38516 N



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El principito se fue a ver de nuevo a las rosas y les dijo:

- *Son realmente hermosas, pero vacías. Uno no se siente impulsado a dejarse morir por ustedes. Cualquiera pensará que mi rosa se parece a ustedes; pero ella sola es para mí más importante que todas ustedes juntas, porque ella es la que he cuidado y regado; ella es la que cubrí con el globo de cristal; ella es la que resguardé con el biombo; ella es la que libré de las orugas que la molestaban, dejando sólo aquellas que se volvieron mariposas; es ella la rosa que oí quejarse, alabarse o mantenerse callada. En fin, ella es mi rosa...*

Antoine de Saint – Exupéry. El Principito

“En la memoria todo puede hacerse milagroso. No tienes más que desearlo y el invierno crudo se convierte en primavera, los cuartos tristes se llenan de tapices dorados, los asesinos se hacen buenos y los niños abandonados reciben piadosos maestros que son ellos mismos que se han desplazado desde la edad adulta hacia sus primeros años. Sí, hija mía, el pasado no es algo fijo he inalterable. Con fe y voluntad lo podemos cambiar, no borrando su oscuridad, sino agregándole luces para irlo embelleciendo cada vez más como quien talla un diamante”.

Alejandro Jodorowsky. Donde mejor canta un pájaro.

- *Estoy aquí, boca arriba, pensando en aquel tiempo para olvidar mi soledad. Porque no estoy acostada sólo por un rato. Y ni en la cama de mi madre, sino dentro de un cajón negro como el que se usa para enterrar a los muertos. Porque estoy muerta- .*

Juan Rulfo. Pedro Páramo

Dedicatorias

A mis Padres Alfonso y Rosario que me educaron y me enseñaron las cosas y valores más importantes de la vida. Porque este logro no sólo es personal sino también el fruto de su esfuerzo.

A mis Hermanos Luis y Efraim con quienes he crecido y me han acompañado, apoyado y hasta molestado, pero que siempre me han hecho reír y han sido mis mejores amigos.

A Delos Angeles, por tu cariño y amor que me han dado vida. Por las tristezas y alegrías que he vivido y el camino que aún me queda por recorrer.

Agradecimientos

Al Dr. José Efraín Garrido Guerrero por haberme permitido trabajar y brindarme un espacio en su laboratorio durante más de dos años, estancia que le aseguro disfrute al máximo, donde no sólo aprendí ciencia también la sufrí. Le agradezco su confianza, tiempo y amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 1 del Departamento de Genética y Biología molecular del CINVESTAV, Rubén, Emilio, Fede, Ara, Eli, Karen, Pedro, Armando, Panchote, Adolfo y Anabel. Por su apoyo, consejos y el tiempo juntos, aprendí mucho de cada uno. Definitivamente sin ustedes no hubiera sido lo mismo.

A mis amigos de la carrera de Biología, Jorge, Omar y Paco que han sido mis buenos amigos y compañeros de aventuras, desvelos y despechos, tengo tantas cosas que agradecerles que nunca terminaría. No cabe duda que una carrera como biología te une como hermano. Cambiaría muchas cosas de mi vida si pudiera pero su amistad jamás.

A mis Padres y Hermanos, que me acompañaron en los desvelos y se preocuparon por mí cuando llegaba tarde o muy temprano. Me dieron la vida y me han acompañado en cada etapa de ella. Esta es una más, que no termina aquí, comienza de nuevo. Me siento muy orgulloso de poder decir que ustedes son mi familia. Los quiero a todos.

A Delos Angeles, por ser la mujer de mi vida, aguantarme y soportarme por más de nueve años. Has sido mi apoyo, mi compañera, mi amiga, mi novia, mi todo. Juntos, como desde ese entonces nos queda toda una historia que contar.

A Dios, por todos ellos.

INDICE

Resumen.....	I
Introducción.....	II

Capítulo 1. Benceno

Benceno usos y características fisicoquímicas.....	1
Benceno en el medio ambiente.....	2
Toxicidad del Benceno.....	3
El benceno como carcinógeno.....	6
Metabolismo del benceno.....	7
Metabolitos del benceno en médula ósea.....	9
Estrés oxidativo.....	10

Capítulo 2. Leucemia

Definición.....	14
Clasificación.....	15
Incidencia.....	16
Leucemia por exposición a Benceno.....	18

Capítulo 3. Vía de Señalización Intracelular JAK/STAT

Vía de señalización JAK/STAT.....	21
La familia Janus.....	22
Estructura de las cinasas Jak.....	23
La familia STAT.....	25
Estructura de los factores transcripcionales STAT.....	26
STAT 3.....	30
STAT 5.....	32
Regulación negativa de la vía Jak/Stat.....	32
Hipótesis.....	36
Objetivos.....	37
Objetivo General.....	37
Objetivos Particulares.....	37

Capítulo 4. Estrategia Experimental y Resultados

Material y métodos.....	39
Recolección de muestras de sangre periférica.....	39
Línea celular K-562.....	39
Anticuerpos.....	40
Separación de leucocitos.....	40
Obtención de extractos citoplasmáticos y nucleares.....	40
Obtención de extractos totales.....	41
Cuantificación de proteína.....	42
Ensayos de Electrotransferencia e Inmunodetección (Western Blot).....	43
Resultados.....	44
Análisis de STAT 3 en personas expuestas a benceno.....	44
Análisis de STAT 3 fosforilada en personas expuestas a benceno.....	49
Análisis de STAT 5 en personas expuestas a benceno.....	52
Expresión de proteínas Stat3y Stat5 en personas expuestas a benceno.....	55
Expresión de Factores transcripcionales STAT 3 en un modelo celular.....	58
Expresión de proteínas Stat3y Stat5 en células U-937.....	58
Expresión de la proteína fosforilada Stat3 en células U-937.....	59

Capítulo 5. Discusión y Conclusiones

Discusión.....	62
Stat 3 y su expresión en personas expuestas a benceno.....	62
Expresión de Stat 3 inducida por p-benzoquinona.....	77
Stat 5 y su expresión en personas expuestas a benceno.....	79
Expresión de Stat 5 inducida por p-benzoquinona.....	80
Conclusiones.....	82
Bibliografía.....	84

RESUMEN

El benceno es un compuesto utilizado en una amplia variedad de procesos industriales, lo cual provoca que se encuentre presente en la atmósfera en niveles variables. Se ha observado una relación entre la exposición de individuos al benceno y el desarrollo de Leucemia Mielógena Aguda. Diversos estudios, han establecido la relación entre la exposición al benceno y sus derivados y la pérdida parcial o total de cromosomas como el 5 y el 7, lo cual es considerado como un estado pre-leucémico. El objeto de nuestros estudios, es identificar la posible variación en los niveles protéicos o en la actividad de los factores transcripcionales STAT 3 y STAT 5 (los cuales han sido detectados sobre-expresados en pacientes con leucemia), como una alteración primaria precedente de una deleción cromosomal. Para determinar esto se analizaron 60 muestras de sangre periférica de personas expuestas a benceno y mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos, se encontró que existe una tendencia a la localización citoplásmica de estos factores así como su posible activación en estos individuos. También se analizó la expresión de estos factores en un modelo celular (la línea celular U-937, derivada de leucemia monocítica), que mostró la inducción pero no la activación de STAT 3 después de haber sido estimulado con uno de los metabolitos del benceno, la p-benzoquinona.

De comprobar y complementar los resultados aquí mostrados se abriría la posibilidad de que estos factores puedan servir como un marcador de riesgo de exposición a benceno. Además serían los primeros resultados en mostrar elementos de la teoría “Raft-Stat signaling” en leucocitos humanos.

INTRODUCCIÓN

Las diversas actividades de la industria humana han provocado que en el ambiente se encuentren sustancias y compuestos que pueden ser perjudiciales para la calidad de vida, la salud, o el funcionamiento natural de los sistemas naturales. Algunos de ellos han sido objeto de diversos estudios, tal es el caso del benceno, el cual ha sido asociado al desarrollo de distintos padecimientos distinguiéndose entre ellos la Leucemia Mielógena Aguda (LMA).

Un gran número de grupos de investigación han tratado de establecer modelos predictivos fundamentados en el tiempo y el nivel de exposición a la que los trabajadores de las industrias petroleras y sus derivados estuvieron sometidos. El empleo de indicadores biológicos ha sido una de las herramientas más útiles para evaluar la exposición y los efectos causados por este compuesto. Sin embargo, hay que tomar en cuenta las múltiples variables que se encuentran en este tipo de análisis como el tiempo de exposición, el efecto causado, y la susceptibilidad de cada persona lo que hace difícil establecer algún método de evaluación de manera contundente.

Es por estos motivos que surge la inquietud de profundizar en los cambios que puedan producirse ante la exposición a este compuesto. Es este mismo interés el que nos ha llevado a analizar la posible inducción de la vía de transducción de señales JAK/STAT como un posible mecanismo de la inducción de leucemia por benceno.

El mecanismo por el cual se produce la leucemia por exposición a benceno es aún desconocido; sin embargo se ha propuesto que la exposición a este compuesto causa daños al ADN, así como a proteínas que participan de manera importante en la homeóstasis celular. La bioactivación del benceno es un evento importante para la toxicidad del mismo, por lo que en el capítulo uno se abordan los temas sobre la molécula de benceno, sus principales fuentes de exposición y mecanismos de biotransformación.

En el capítulo dos se revisan algunos conceptos sobre la leucemia, su etiología y se hace énfasis en los dos principales mecanismos mediante los cuales se ha intentado explicar el desarrollo de leucemia por este compuesto como son: a) Daños causados por los metabolitos del benceno y sus transformaciones adicionales que alteran el DNA y el funcionamiento normal de la médula ósea, b) Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que ejercen efectos regulatorios sobre eventos de proliferación, diferenciación y apoptosis.

Normalmente, las células hematopoyéticas requieren de la presencia de citocinas para regular su diferenciación y proliferación. Dicha condición podría verse afectada ante la exposición al benceno y/o alguno de sus metabolitos induciendo la activación de factores transcripcionales, así como de proteínas que son clave en la regulación de los procesos de apoptosis, diferenciación y división celular. Esta desregulación es apreciable en padecimientos como la leucemia, donde se presenta un crecimiento celular anormal en ausencia de citocinas. Uno de los mecanismos propuestos para explicar estas anomalías es la alteración en la vía de señalización intracelular conocida como JAK/STAT que se relaciona con los procesos de diferenciación y proliferación celular.

En el capítulo tres se aborda esta vía y cada uno de sus principales componentes como las proteínas STAT, de las cuales STAT 3 y 5, han sido encontradas expresadas constitutivamente en pacientes con Leucemia. Principalmente se ha detectado la presencia de proteínas STAT 3 en un 73% y STAT 5 en un 80% en pacientes con dicho padecimiento.

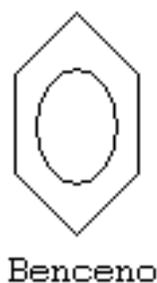
Tomando en cuenta que estas proteínas son un elemento importante dentro de la ruta JAK/STAT consideramos importante evaluar la presencia de estas proteínas en personas expuestas a benceno, pues es posible que sufran alteraciones en sus mecanismos de señalización intracelular dando lugar a alteraciones en la expresión de estos factores transcripcionales, lo cual podría dar lugar a eventos pre-leucémicos que eventualmente llevarían al desarrollo de procesos patológicos como la LMA.

En el capítulo cuatro se muestra la estrategia experimental así como los resultados obtenidos durante el desarrollo de este proyecto, los cuales son analizados y discutidos finalmente en el capítulo cinco.

CAPÍTULO 1. BENCENO

Benceno usos y características fisicoquímicas.

El benceno es un hidrocarburo aromático que se presenta como un líquido incoloro, volátil, de olor dulce, y muy inflamable. Se usa ampliamente en la industria química y es un componente menor de las gasolinas. Se utiliza en las industrias del calzado, del caucho, del cuero sintético, y pintura. Se usa como materia prima en la producción de estireno, nylon y detergentes. Frecuentemente es utilizado en procesos industriales como parte de solventes de resinas naturales y sintéticas, siendo además constituyente de colorantes, adhesivos y agentes de limpieza (Kim, S.K. and Kim, Y.C. 1996). La molécula de benceno está formada por seis átomos de carbono que se enlazan unos a otros formando un anillo hexagonal, cada uno de los cuales está unido a un átomo de hidrógeno.



DATOS FÍSICO-QUÍMICOS BÁSICOS

<i>Fórmula química:</i>	C ₆ H ₆
<i>Masa molecular:</i>	78,12 g
<i>Densidad:</i>	0,879 g/cm ₃
<i>Punto de ebullición:</i>	80,1° C
<i>Punto de fusión:</i>	5,5° C
<i>Presión de vapor:</i>	102 hPa

Fig. y Tabla 1. Estructura molecular del benceno y sus características fisicoquímicas.

Puede encontrarse en el ambiente tanto en comida como en agua, y bebidas debido principalmente a los conservadores y aditivos, sin embargo el principal medio de exposición personal (más del 99%) es a través del aire (Wallace, L.A. 1996) debido principalmente a los procesos de extracción, refinación y transformación del petróleo siendo aún mayor su presencia en la atmósfera debido a las emisiones generadas por su combustión en automóviles (Gilli, G. *et al.* 1996).

La exposición a este compuesto también se da durante las actividades de producción envasado, transporte y utilización del mismo benceno, así como los productos que lo contienen como impureza (como el tolueno y el xileno). Otra fuente importante de exposición es el humo de los cigarrillos, ya que algunos reportes indican que un fumador tiene en promedio de 6 a 10 veces más carga corporal de benceno que los no fumadores (Wallace, L.A. 1996).

Benceno en el medio ambiente

El benceno es un moderado componente del "smog". Reacciona rápidamente con radicales oxidrilos, de cuya concentración depende su permanencia en la atmósfera, la que oscila entre unas horas y varios días. El efecto de "deslave" al ser arrastrado por las precipitaciones sólo lo elimina transitoriamente de la atmósfera, puesto que vuelve a evaporarse rápidamente de las superficies en que se deposita, ya sean acuáticas o terrestres. Debido a la extrema volatilidad del benceno, el agua y los estratos superiores del suelo pierden la mayor parte de esta sustancia retornando a la atmósfera.

En estratos más profundos del suelo, el benceno es relativamente móvil y puede infiltrarse, arrastrado por el agua hasta las capas subterráneas acumulándose también en los lodos de clarificación.

En la atmósfera se produce la descomposición del benceno principalmente por fototransformación indirecta; no hay fotólisis con longitudes de onda > 290 nm. El tiempo de vida media en la troposfera oscila entre 7 y 22 días, con un valor medio de 13 días. En la troposfera inferior (hasta aproximadamente 1-2 km de altura) los valores promedio de vida media del benceno oscilan entre 3 y 10 días. En los cuerpos de agua superficiales, subterráneos y en el suelo, la descomposición se produce fundamentalmente por biodegradación aeróbica la cual es más rápida que la anaeróbica. Los metabolitos microbianos son: 1,2-dihidroxi-1,2-dihidrobenceno, pirocatecol, mientras que los metabolitos de los mamíferos son: fenoles y compuestos relacionados (hidroquinona, pirocatecol). La descomposición térmica se produce a 600° C y es poco probable que se produzca hidrólisis en condiciones normales.

Toxicidad del Benceno.

Debido a las condiciones ambientales propias de su actividad laboral, los trabajadores de la industria petrolera se encuentran expuestos de manera continúa a una gran variedad de sustancias químicas, de las cuales han sido pocos los compuestos que han sido bien establecidos como carcinógenos. De entre todas estas sustancias, un gran número de estudios han señalado al benceno como uno de los principales agentes cancerígenos (Guenel, P. *et al.* 2002).

La relación entre la exposición a benceno y el incremento de mortalidad por leucemia y mieloma múltiple, ha sido objeto de análisis profundos y estudios de cohorte que han confirmado la exposición a este compuesto como un factor de riesgo para el desarrollo de leucemia (Rinsky, R. A. *et al.* 2002; Raabe G. and Wong. 1996).

En estos estudios se observó que la duración de la exposición está más relacionada con la incidencia de leucemia, que la intensidad de la exposición, lo que indica que ante una prolongada jornada de trabajo los trabajadores incrementan el riesgo de desarrollar leucemia independientemente de la concentración de benceno a la que se expongan. Así mismo, también se ha demostrado que existen algunos factores de riesgo no ocupacionales como son el hábito de fumar y la historia familiar los cuales incrementan hasta en un 50% la probabilidad de padecer este mal (Siegel, M. 1993) e incluso también se piensa que los hábitos alimenticios y medicamentos pueden influir en el desarrollo del mismo (McDonald, T. A., *et al.* 2001).

Durante una exposición aguda, los efectos causados por este compuesto varían según la concentración y duración de la misma. La inhalación de vapores de benceno puede provocar trastornos en el sistema nervioso central que se manifiestan en mareos, dolores de cabeza, náuseas, somnolencia, perturbaciones psíquicas con estados de excitación y convulsión que finalizan en desvanecimiento y parálisis del centro respiratorio; en casos extremos, coma y muerte. El benceno líquido irrita las mucosas y la piel y puede ser absorbido a través de ella. Si llega a los pulmones en forma líquida, puede provocar edema pulmonar y hemorragia (<http://www.scorecard.org/>).

Los primeros indicios de la hematotoxicidad crónica del benceno fueron observados durante la década de los 60's en trabajadores de la industria del calzado en Italia y Turquía. Ellos mostraron síntomas como leucopenia la cual fue reversible cuando fue sustituido el benceno como solvente, sin embargo fue posible observar que exposiciones prolongadas a altas dosis conducían a un daño irreversible en la médula ósea. Actualmente, se sabe que personas expuestas a solventes con benceno muestran diversos padecimientos incluyendo anemia, leucopenia, y trombocitopenia, cada uno asociado a la disminución en la producción de algún tipo celular sanguíneo (Rangan, U. and Snyder, R. 1997).

La exposición crónica a benceno origina un deterioro progresivo de la función hematopoyética, y es hematotóxico y carcinógeno en altas concentraciones. Así mismo, la exposición a benceno se ha asociado al desarrollo de Leucemia Mielógena Aguda (AML por sus siglas en inglés) (Raabe, G. and Wong, O. 1996; Paxton, M.B. 1996; Crump, K.S. 1996; Yin, S.N., *et al.* 1996; Douer, D., *et al.* 1996).

La inducción de AML es generalmente precedida por la función anormal de la médula ósea y por el crecimiento de los precursores pluripotenciales de las células sanguíneas. Estas anomalías han sido descritas como un síndrome preleucémico o síndrome mielodisplásico (MDS). El MDS es caracterizado por anemia, leucopenia, y trombocitopenia en varias combinaciones. Una disminución en la actividad metabólica del hígado causado por una hepatectomía parcial reduce la toxicidad del benceno, sugiriendo que el metabolismo primario del benceno es un factor crítico para su toxicidad (Rangan, U. and Snyder, R.1997).

Aunado a esto, el procesamiento secundario de los metabolitos del benceno puede ocurrir en la médula ósea para comenzar a ejercer sus efectos tóxicos causando depresión y daño que se podría traducir más tarde como un síndrome mielodisplásico (Rangan, U. and Snyder, R.1997).

El benceno como carcinógeno

Compuestos conocidos como carcinógenos clásicos (aflatoxinas y aminas aromáticas) se caracterizan por ser altamente electrofílicos y unirse de manera covalente al DNA. Estos carcinógenos clásicos son altamente mutagénicos en pruebas del tipo Ames realizadas en *Salmonella* produciendo mutaciones puntuales y pequeñas deleciones. En contraste, el benceno muestra un mecanismo distinto, donde se genera no uno, sino diversos metabolitos de los cuales ninguno es “altamente” electrofílico (aunque presentan esta propiedad), teniendo una “débil” afinidad por el DNA. Así pues, en análisis con *Salmonella*, el benceno y sus metabolitos no son mutagénicos. Sin embargo en ensayos *in vitro* e *in vivo* se produce daño cromosomal (Smith, M.T. 1996).

La manera por la cual el benceno puede producir cáncer es aún desconocida; sin embargo se sabe que los metabolitos del benceno y sus transformaciones secundarias alteran el funcionamiento normal de la médula ósea, ya sea por generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o por la presencia misma de los metabolitos, modificando las funciones normales de proliferación, diferenciación e incluso los eventos apoptóticos (Rangan, U. and Snyder, R. 1997; Smith, M.T. 1996; Snyder R. and Hedli, C. C. 1996; Schrenk, D. *et al.* 1996).

Metabolismo del benceno

La manera en que el benceno funciona como un agente mielotóxico, se debe a la activación metabólica del mismo. Mediante estudios realizados desde 1949 sobre el metabolismo del benceno en conejos, se identificaron metabolitos como el fenol, catecol, y ácido mucónico en orina. En 1977 se reportó la acumulación *in vivo* de metabolitos de benceno en médula ósea, así como la formación de aductos de DNA hepático en ratas tratadas con benceno. En 1979 se sugirió que la transportación de los metabolitos de benceno a la médula ósea y otros órganos (donde podrían ser metabolizados en intermediarios reactivos) puede mediar la toxicidad del benceno, a través de daños como la formación de aductos de DNA como el (3'OH)benceteno o la (1,N²)desoxiguanosina, los cuales son formados por la reacción de la benzoquinona o hidroquinona con la deoxyguanosina. La formación de estos aductos suponía la reducción en la síntesis de RNA llevando a un estado crítico la función celular (Bauer, H. *et al.* 1989).

Actualmente se sabe que el benceno al ser absorbido por el organismo, viaja por el torrente sanguíneo y es oxidado en el hígado por el citocromo P450-2E1 (CYP2E1) formando óxido de benceno (en equilibrio con su forma oxepin). Esta forma intermedia puede ser hidratada para formar el dihidrodiol llevando a la formación de catecol. De manera alternativa el óxido de benceno puede sufrir un rearreglo para formar fenol, que a su vez al ser hidroxilado por mono-oxigenasas dependientes del citocromo P450 como P450-2E1 (CYP2E1) y P450-2B1 (CYP2B1) forma metabolitos reactivos como la hidroquinona y el catecol (Gut, I., *et al.* 1996).

Finalmente la hidroquinona, puede entonces producir *p*-benzoquinona o 1,2,4-trihidroxibenzeno. Por otro lado el catecol puede formar *o*-benzoquinona, y de manera alternativa producir 1,2,4-trihidroxibenzeno aunque este último parece ser formado primariamente de hidroquinona.

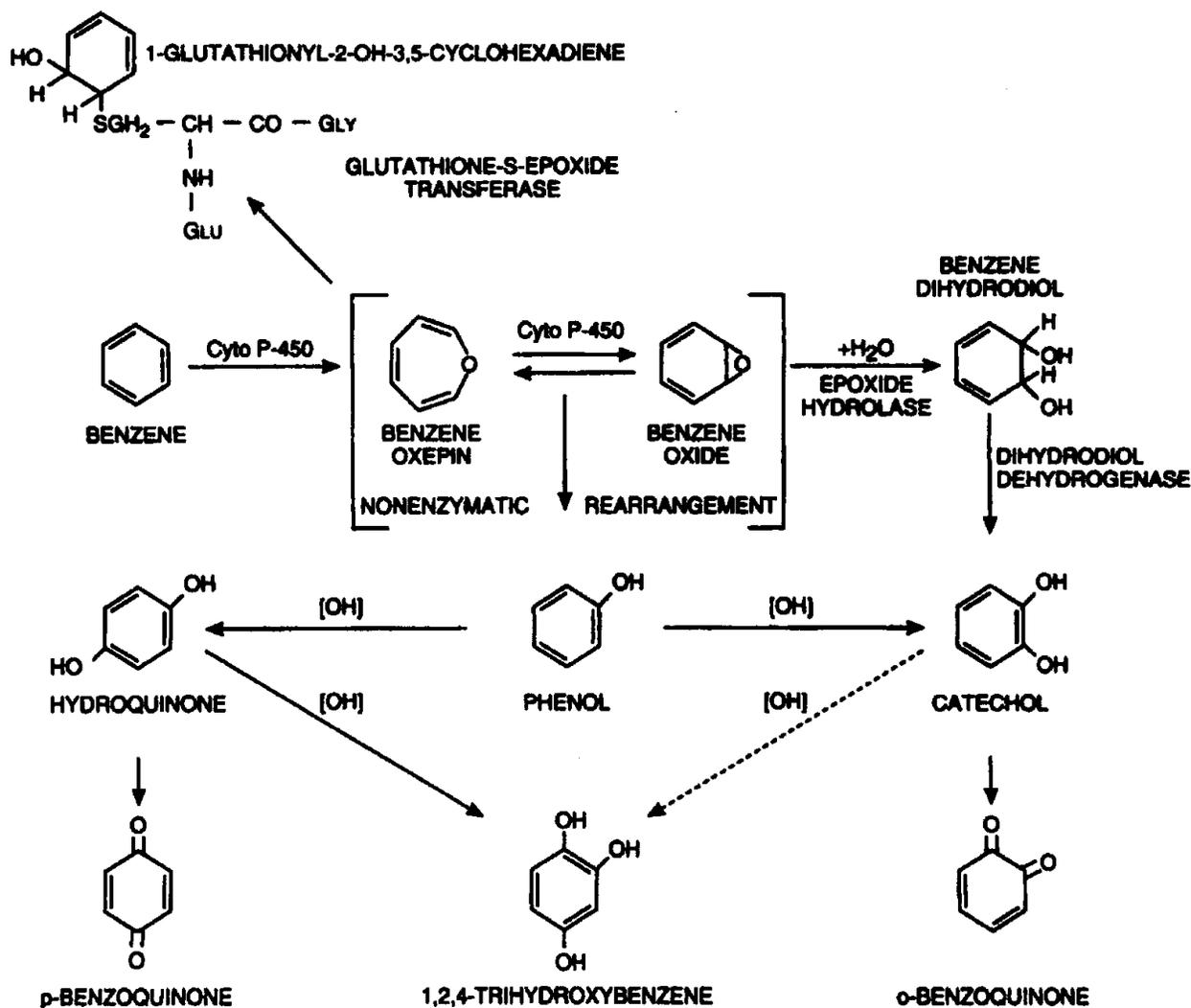


Fig. 2 Metabolismo del benceno. Se muestran los cambios que sufre el benceno una vez que ha ingresado al organismo y es oxidado en el hígado por el citocromo P450-2E1 para formar óxido de benceno que puede ser hidratado para formar el dihidrodiol que genera catecol. De manera alternativa el óxido de benceno puede sufrir un rearrreglo para formar fenol el cual puede ser hidroxilado a hidroquinona y producir *p*-benzoquinona. El fenol también puede formar catecol, y formar *o*-benzoquinona (Tomado de Rangan, U., Snyder, R. 1997).

Sin embargo, los metabolitos del benceno también pueden sufrir una transformación secundaria como ejemplos se encuentran el ácido mercaptúrico, metabolitos de anillos abiertos, conjugados sulfatados y aductos de DNA. Muchos de los productos mencionados anteriormente han sido investigados para ser usados como control del monitoreo en trabajadores expuestos a benceno y son conocidos como marcadores de exposición (Schrenk, D., *et al.* 1996.; Rangan, U. and Snyder, R. 1997).

Metabolitos del benceno en médula ósea

Por otro lado, se sabe que algunos metabolitos pueden escapar a la transformación secundaria, por lo que algunos de ellos pueden salir del hígado hacia el torrente sanguíneo y de esta manera llegar a la médula ósea (Gut, I. *et al.* 1996; Schrenk, D. *et al.* 1996).

También se ha demostrado que en la médula ósea ocurren transformaciones metabólicas dependientes de mieloperoxidasas que en este caso oxidan a la hidroquinona dando lugar a la generación de metabolitos como la benzoquinona, la cual al ser altamente reactiva podría unirse a macromoléculas formando aductos (Smith, M.T. and Zhang, L. 1998; Henschler, R. *et al.* 1996).

La manera en que se da la bioactivación del benceno implica que sus metabolitos actúen de manera conjunta sobre las células de la médula ósea para producir rompimientos en las hebras de DNA, inhibición de la topoisomerasa II, y daño al huso mitótico, lo cual eventualmente llevaría a la recombinación mitótica, translocación cromosómica y aneuploidias.

El conjunto de eventos genotóxicos podrían entonces causar la activación de proto-oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores (Frantz, C. E. et al. 1996.; Smith, M.T. 1996). Los datos que indican de manera más contundente que los metabolitos de benceno actúan de manera conjunta, fueron reportados mediante experimentos donde la administración simultánea de fenol e hidroquinona produjeron daños tóxicos en ratones similares a los producidos por el benceno, no así cuando fueron administrados por separado (Eastmond, D. A. 1987). El daño al DNA debido a una administración conjunta de los metabolitos del benceno es una (y el primer mecanismo propuesto) de las posibles explicaciones a la generación de leucemia por exposición a benceno (Rangan, U. and Snyder, R. 1997).

Estrés oxidativo

Como se dijo anteriormente, los metabolitos fenólicos del benceno pueden ser oxidados por mieloperoxidasas a otros compuestos como las quinonas, que son sumamente tóxicas por su capacidad de unirse directamente a macromoléculas y participar activamente en la generación de especies reactivas de oxígeno. De manera general las especies reactivas de oxígeno (H_2O_2 peróxido de hidrógeno, $\overset{\cdot}{O}_2$ anión superóxido, y OH radicales hidroxilo) son producto del metabolismo del oxígeno en organismos aeróbios y se originan de la producción de energía de las mitocondrias, como una respuesta fisiológica contra microorganismos o como reacciones de destoxificación llevadas a cabo por los citocromos P450. El estado de estrés oxidativo ocurre cuando las concentraciones de ROS sobrepasan la capacidad oxidante de las células (Trush, M. A. and Kensler, T. W. 1991).

El estado redox intracelular ejerce distintos efectos regulatorios sobre los eventos de proliferación, diferenciación y apoptosis a través de la activación de factores transcripcionales, así como de proteínas que son clave en la regulación de dichos procesos. Las alteraciones en la regulación de estos procesos se han asociado a padecimientos como el cáncer (Wiemels, J. and Smith, M.T. 1999).

Lo anterior ha sido mostrado en diversos trabajos de investigación en los que se ha observado que la exposición de cultivos celulares a metabolitos de benceno como HQ, incrementan la generación de ROS teniendo efectos de incremento en la proliferación celular (Shen, Y. *et al.* 1996). En otro estudio se observó que la hidroquinona y la p-benzoquinona aumentan de manera específica las concentraciones del anión superóxido y del óxido nítrico, además se observó una disminución en la concentración de la enzima superóxido dismutasa ante el tratamiento con hidroquinona (Snyder R. and Hedli, C. C. 1996).

Otros estudios han sugerido la participación del estrés oxidativo (especies reactivas de oxígeno) como factor alquilante del DNA, siendo una segunda explicación factible al síndrome leucémico inducido por benceno. Esto se ha visto en células HL-60, las cuales al ser expuestas a metabolitos como la hidroquinona y 1,2,4-trihidroxibenceno, evaden en ambos casos la diferenciación celular inducida por ácido retinóico.

Al comparar la formación de aductos de estos metabolitos, se observó la presencia de aductos hidroquinona-DNA pero no de 1,2,4-trihidroxibenceno, el dato más importante y concluyente fue la generación de estrés oxidativo por ambos metabolitos (Hedli, C. C. et al. 1996).

De esta manera surgen dos posibles explicaciones por las cuales la exposición a benceno puede provocar distintos padecimientos: la primera involucra la biotransformación del benceno a metabolitos secundarios que pueden unirse al DNA y producir mutagenicidad expresada como leucemia. El segundo mecanismo conlleva a la producción de los mismos metabolitos secundarios pero dicha generación causa estrés oxidativo, lo cual daña al DNA mutándolo y originando consecuencias similares (Rangan, U. and Snyder, R. 1997).

Aunque aún esté en discusión el mecanismo por el cual el benceno puede ser un factor importante para el desarrollo de leucemia, es evidente que la transformación metabólica origina metabolitos a los cuales se les atribuye su potencial cancerígeno. El estrés oxidativo causado por estos metabolitos ha sido comparado en diversos estudios para determinar las relaciones entre los distintos metabolitos y las especies reactivas de oxígeno generadas por estos metabolitos. La generación de las especies reactivas de oxígeno por metabolitos del benceno fue demostrada de manera significativa gracias a la formación dosis dependiente de ROS intracelular, demostrando que el incremento en la concentración de metabolitos de benceno era seguida por un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno en células HL-60, una línea celular promielocítica de humano. De entre todos los metabolitos la p-benzoquinona (1,4-benzoquinona) demostró ser la máxima inductora de especies reactivas de oxígeno. El incremento de ROS por p-benzoquinona fué

inhibido por la adición de catalasa, así como de dimetil-sulfóxido (DMSO). Sin embargo esta inducción no fué bloqueada cuando se agregó la enzima superóxido dismutasa, lo que sugirió que el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo son las dos especies reactivas más involucradas. También se observó que el metabolito de benceno p-benzoquinona puede causar peroxidación lipídica y citotoxicidad. Estos resultados sugieren que uno de los principales metabolitos del benceno asociados al incremento de especies reactivas de oxígeno es la p-benzoquinona y por lo tanto puede jugar un papel importante en el mecanismo de la carcinogénesis inducida por benceno (Shen, Y. *et al.* 1996. Rangan, U. and Snyder, R. 1997. Hedli, C. C. *et al.* 1996. Wiemels, J. and Smith, M.T. 1999. Smith, M.T. and Zhang, L. 1998. Henschler, R. *et al.* 1996).

CAPÍTULO 2. LEUCEMIA

Definición

La leucemia es un tipo de cáncer del sistema hematopoyético que se caracteriza por una descontrolada proliferación y la pérdida de la diferenciación celular. Como en otros tipos de cáncer, la leucemia no se origina mediante un cambio inmediato, sino mediante cambios progresivos en la expresión génica. Algunos de los cambios que se han asociado con la inducción de esta enfermedad, implican alteraciones en genes supresores de tumor (GST) que suprimen la proliferación celular y por tanto la transformación neoplásica. En la mayoría de los casos la pérdida o mutación de ambos alelos de GST's son suficientes para que se produzca un padecimiento neoplásico. Actualmente sabemos que los eventos de proliferación masiva son resultado de cambios progresivos donde la activación de un oncogén o la pérdida de un gen supresor de tumor es solo un paso en el desarrollo de padecimientos como la leucemia (Irons, R. D. and Stillman, W. S. 1996; Look, A.T. 1997).

Por otro lado, se sabe que algunas neoplasias como la mielodisplasia y la leucemia crónica evolucionan a leucemia aguda al producirse anormalidades progresivas en la regulación genética de proteínas que desempeñan una función importante en la regulación del crecimiento y diferenciación celular. Esto sugiere que mutaciones múltiples y/o cambios en la expresión génica de proto-oncogenes podrían estar involucrados en la incidencia de este trastorno (Irons, R. D. and Stillman, W. S. 1996).

Clasificación

La leucemia se clasifica en dos amplios grupos según el origen de la clona celular afectada ya sea mieloide o linfoide, clasificándose a su vez como leucemias agudas o crónicas. La leucemia aguda se caracteriza por una rápida colonización de la médula ósea debido a una proliferación celular progresiva y no regulada de células inmaduras que escapan al proceso apoptótico. Esta acumulación de precursores hematopoyéticos inmaduros e incapaces de diferenciarse a células sanguíneas normales es lo que impide la maduración normal del resto de las células sanguíneas. Finalmente, las células inmaduras son vertidas a la sangre periférica y producen leucocitosis.

Las leucemias crónicas en cambio, son clínicamente menos agresivas, caracterizándose por un progreso más lento y una acumulación celular en la médula ósea con un estado morfológico más avanzado, de igual manera estas células son vertidas a la sangre periférica produciendo también leucocitosis (Douer, D. *et al.*1996; Raabe, G. and Wong, O. 1996).

Tomando en cuenta los criterios mencionados (agresividad y origen) se reconocen principalmente cuatro tipos de leucemia: Leucemia mieloblástica aguda (LMA), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia linfocítica crónica (LLC). Existe evidencia de que factores hereditarios pueden influir en la susceptibilidad a este padecimiento lo cual se ha visto en estudios sobre familias enteras donde se ha encontrado un aumento en el número de casos de leucemia mielógena aguda y crónica entre parientes de primer grado.

Incidencia

En México la leucemia linfoblástica aguda es el tipo de cáncer más frecuente en los infantes y de manera general tan sólo en el Distrito Federal llega a representar hasta el 40% de todos los cánceres en menores de 15 años (entre 5 y 14) y a nivel nacional se encuentra como la segunda causa de muerte más frecuente en este mismo rango de edad, mientras que para los niños de entre 1 a 4 años de edad, se encuentra como la séptima causa de defunción a nivel nacional (Fuente SSA, INEGI 2001).

Aunque en países como Estados Unidos de América aproximadamente el 40% de los niños con LMA alcanzan una edad mayor de 3 años, en nuestro país no se encuentran reportes confiables sobre estos casos. Aún así durante los años de 1982 a 1991 se reportó un incremento muy importante en la incidencia de la leucemia pasando de una tasa de 7.75 por millón de niños menores de 15 años a una tasa de 22.19, por lo que existe la posibilidad de que algunos factores ambientales o contaminantes cuya presencia se ha incrementado, puedan estar ocasionando el aumento en la frecuencia de este mal.

Han sido pocos los estudios realizados en la Cd. de México para identificar las posibles causas del incremento o las causas de la enfermedad. En un estudio inicial realizado en 1992, se encontró que algunas actividades laborales, uso de insecticidas en el hogar y la exposición a campos electromagnéticos (CEM) de baja frecuencia, estuvieron asociadas al riesgo de desarrollar leucemia aguda

En otro estudio, donde se compararon niños con alta susceptibilidad para desarrollar leucemia aguda como son los niños con síndrome de Down, se compararon niños con este síndrome y que padecen leucemia aguda contra niños con síndrome de Down sanos y se encontró una asociación importante entre el tabaquismo y consumo de alcohol por parte del padre antes de la concepción del niño, aumentando el riesgo un 6.08% más cuando el padre o la madre fumó entre uno a cinco cigarros al día y de 6.63 % más cuando hubo un consumo de alcohol mayor de dos copas a la semana. La exposición pasiva del niño al humo del tabaco también incrementa el riesgo. De confirmarse estas asociaciones, se podrían evitar entre el 60 y 70% de los casos de leucemia que se presentan en población altamente susceptible al desarrollo de esta enfermedad (Unidad pediátrica ambiental www.upa-pehsu.com).

Por otro lado, la leucemia ocupa el lugar número 19 como la causa de muerte a nivel nacional en edad productiva (entre los 15 y 64 años) y en mujeres es considerada la causa de muerte número 20 a nivel nacional (Fuente SSA, INEGI 2001). En los niños derechohabientes del IMSS, residentes de la Cd. de México, hay también una tendencia al incremento de esta enfermedad y la mortalidad por cáncer no tiende a disminuir. Los datos epidemiológicos de cáncer para niños de otros estados de nuestro país son muy escasos (Fuente SSA, INEGI 2001; Unidad Pediátrica Ambiental www.upa-pehsu.com).

Mundialmente algunos patrones de incidencia muestran que la leucemia es más frecuente en los hombres que en las mujeres, en sujetos menores de 5 años, y en la raza blanca y al parecer en el medio urbano. Aparentemente hay una tendencia al incremento en la frecuencia de la enfermedad en países en vías de desarrollo, mientras que en países del

primer mundo la mortalidad por cáncer ha disminuido significativamente (Douer, D. *et al.* 1996; Raabe, G. and Wong, O. 1996).

La incidencia global de la leucemia es de 8 a 9 casos por 100,000 personas al año a nivel mundial, mientras que en infantes es la segunda causa de mortalidad. Asimismo, la leucemia aguda es más común que la crónica en todas las edades, y específicamente la LMA se presenta en un 80 a 90% de las leucemias del tipo agudo en adultos y su incidencia se incrementa en hombres mayores de 40 años, registrándose que algunos grupos son más susceptibles que otros, particularmente los latinos; los cuales son más propensos a padecer leucemia promielocítica aguda y LMA. Esta susceptibilidad se ha relacionado a una predisposición genética. Sin embargo el hecho de que la incidencia de leucemia sea mayor en áreas industriales, refuerza la idea que la exposición a ciertos factores ambientales favorece de alguna manera el desarrollo de esta enfermedad (Douer, D. *et al.* 1996; Shen, Y. *et al.* 1996; Raabe, G. and Wong, O. 1996).

Leucemia por exposición a Benceno

Estudios realizados con trabajadores de la industria petrolera en Estados Unidos de América e Inglaterra, mostraron que las personas expuestas a concentraciones de benceno mayores a 200 ppm/año tienen 20 veces mayor probabilidad de desarrollar LMA que la población en general (Wong, O. and Raabe, G.K. 1995).

El mecanismo por el cual se induce la leucemia por exposición a benceno es aún desconocido, sin embargo se han propuesto diversas teorías para explicar como se genera dicho proceso. Como ya se había visto antes, una de las hipótesis propone que los

metabolitos de benceno se unen de manera covalente con el DNA así como a algunas proteínas que participan de manera importante en la homeóstasis celular, generando alteraciones que inducirán leucemia (Kalf G.F. *et al.*, 1996).

Otra teoría basándose en estudios *in vivo* e *in vitro*, sugiere eventos tempranos, donde se observa que el benceno y algunos de sus metabolitos generan durante el proceso de desintoxicación algunos tipos de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales alteran los niveles de expresión de algunos proto-oncogenes y algunas proto-oncoproteínas, entre ellas c-jun y c-fos, así como modifican la actividad de unión de factores transcripcionales como AP-1 y NF- κ B. Así, se propone que eventualmente estas alteraciones podrían inducir leucemia (Nimmaguda, R. R. and Snyder, R. 1995).

De manera general, estudios *in vivo* han demostrado que la exposición a benceno puede inducir cierto tipo de daños estructurales como las aberraciones cromosómicas. Estas aberraciones pueden consistir en aneuploidias, translocaciones, inversiones y deleciones cromosomales (Look, A.T. 1997). Un ejemplo de translocación relacionado a la exposición con benceno es el caso de la t(8,21) (Smith, MT. *et al.* 1998), en la cual se bloquea la transactivación de genes que regulan la hematopoyesis, como aquellos que codifican para la síntesis de elastasas, mieloperoxidasas, interleucina 3 y el factor estimulante de macrófagos y granulocitos (Wang, J. *et al.* 1998).

En células mieloides normales, las citocinas controlan una variedad importante de respuestas biológicas relacionadas con la hematopoyesis y la respuesta inmune, incluyendo eventos como la proliferación y diferenciación celular, así como señales anti-apoptóticas (Imada, K. and Leonard, W.J. 2000). Muchos estudios han demostrado que blastos de LMA expresan receptores a citocinas para factores de crecimiento mieloide y se ha sugerido que un disturbio en las vías de transducción de señales de los receptores de citocinas, puede ser responsable del fenotipo maligno (Biethahn, *et al.*1999). Un ejemplo de esto puede ser la vía de señalización intracelular conocida como JAK/STAT relacionada con los procesos de diferenciación y proliferación celular (Goiulleux-Gruart, V. *et al.* 1996; Xia, Z. *et al.* 1998).

CAPÍTULO 3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR JAK/STAT.

Vía de señalización JAK/STAT

De manera normal las citocinas regulan diversos aspectos de la hematopoyesis y la respuesta inmune además de mediar la comunicación celular. Una característica común de muchas citocinas es el tipo de receptores celulares a los que se acoplan conocidos como receptores “no tirosina cinasa” (receptores NTK). Estos receptores son incapaces de transmitir su mensaje por lo que requieren proteínas accesorias para efectuar su función. Estas respuestas son mediadas a través de la activación de la vía de señalización intracelular JAK/STAT (Sehgal, P. B. 2000).

Los principales componentes de esta vía son las proteínas JAK una familia de proteínas con actividad tirosina cinasa y las proteínas STAT, una familia de factores transcripcionales que se unen a secuencias específicas de DNA en regiones promotoras de genes blanco conocidas como ISRE (IFN's Response Element) y a la familia de enhancers GAS (Gamma Activated Site) (Darnell, J.E. *et al*, 1994; Imada, K. and Leonard, W.J. 2000). Las proteínas STAT son de gran importancia ya que estos factores transcripcionales han sido encontrados sobrexpresados de manera constitutiva en pacientes con Leucemia Mielogena Crónica (LMC) y además se ha detectado la presencia de proteínas activadas STAT 3 y STAT 5 en pacientes con LMA (Shau, K., *et al*. 1996; Gouilleux-Gruart, V. *et al*. 1996).

La familia Janus.

En mamíferos cuatro Jak's (Janus Kinases) han sido identificadas (Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2), y al parecer en el genoma humano sólo existen cuatro miembros para esta familia de receptores. Las cinasas Jak1, Jak2 y Tyk2 se expresan de manera ubicua (en todos los tipos celulares hasta ahora analizados), mientras que la expresión de Jak3 es restringida a las células de los linajes linfoides y mieloides lo que sugiere un papel limitado pero fundamental en la transducción de señales en dichos tipos celulares (Imada, K. and Leonard, W. J. 2000; Kisseleva, T. *et al.* 2002. O'Shea J. *et al.* 2002).

Las cinasas Jak son activadas por una gran variedad de citocinas entre las que se encuentran los Interferones, el GM-CSF, y un gran número de Interleucinas. Las Jak's están asociadas con muchos receptores de citocinas, en algunos casos la unión es reforzada por la estimulación de una citosina. La unión del ligando con el receptor lleva a un cambio conformacional en la porción citoplásmica del receptor activando algún miembro de la familia de cinasas Jak's. Las cinasas Jak's se encuentran asociadas con una región membranal rica en prolina próxima a los receptores, el cambio conformacional sufrido por éstos permite a las cinasas Jak's estar en proximidad para efectuar un proceso de transfosforilación (Imada, K. and Leonard, W. J. 2000; Kisseleva, T. *et al.* 2002; O'Shea J. *et al.* 2002).

Las Jak's activadas proceden a fosforilar el receptor y por ende conducen a la generación de "docking sites" para las Stat's las cuales se unen mediante su dominio SH2

al receptor. Las Stat's reclutadas por el receptor son entonces fosforiladas por las Jak's activadas (Imada, K. and Leonard, W. J. 2000; Kisseleva, T. *et al.* 2002).

La importancia de estas proteínas dentro de la regulación de procesos hematopoyéticos, queda demostrada mediante la expresión de los fenotipos mostrados por ratones deficientes en estas proteínas. Ratones deficientes en Jak3 mostraron severos defectos en el desarrollo de células B, mientras que ratones deficientes en Jak1 muestran letalidad perinatal, aunque es posible apreciar alteraciones en la mielopoiesis (más no en la linfopoiesis). Así mismo, ratones deficientes en Jak2 exhiben letalidad embriónica debido a la ausencia de eritropoiesis. Reportes con ratones deficientes en Tyk2 no han sido realizados hasta hoy (Imada, K., and Leonard, W. J. 2000).

Estructura de las cinasas Jak

Las proteínas Jak son cinasas constituidas por al menos 1000 aminoácidos y con peso molecular de aproximadamente 120 a 140 kda. Poseen siete regiones conservadas denominadas JH, y entre ellas hay dos dominios kinase-like (JH1 y JH2) con funciones importantes. El dominio JH1 tiene una función catalítica, mientras el JH2 es un dominio pseudo-cinasa el cual parece ser requerido para la actividad catalítica del dominio JH1. El nombre de "cinasas janus" es derivado de un dios romano mitológico haciendo alusión a las "dos caras": los dominios cinasa y pseudo-cinasa de estas proteínas.

La función del dominio JH2 aún no es del todo clara, y es una característica única que distingue a estas cinasas del resto. La delección de este dominio lleva a la hiperactivación de Jak 2 (Kisseleva, T., *et al.* 2002), lo que supone que su función pueda ser regulatoria. Mientras que otros datos sugieren que es un potencial sitio de unión para las proteínas STAT (Ward, A., *et al.* 2000.; Imada, K. and Leonard, W.J. 2000).

En el caso de los dominios amino-terminales JH3-JH7, se piensa de manera general, que su función comprende la asociación al receptor, aunque la participación del dominio JH7 no ha sido confirmada, aún más parecen jugar un papel importante en determinar la especificidad de esta unión. Modelos estructurales han determinado que los dominios JH3-JH4 tienen alguna similitud con los dominios SH2, y que los dominios JH4-JH7 constituyen un dominio llamado FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin homology domain), el cual media las interacciones con otras proteínas, habiendo sido inicialmente involucrado en las interacciones con otras Jak y con otras cinasas.

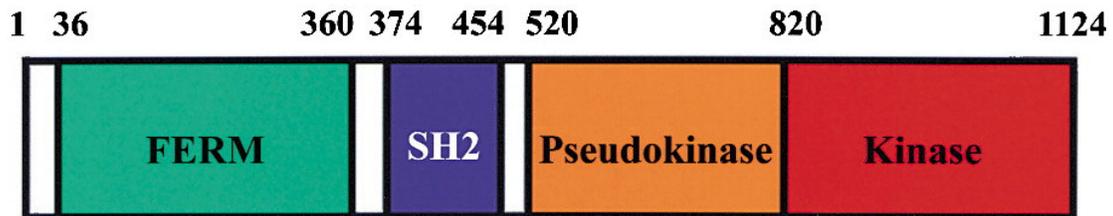


Fig. 3 Estructura de las cinasas Jak. La figura muestra la organización estructural de las proteínas Jak en una organización más compacta, el dominio Cinasa (JH1) se localiza en el extremo carboxilo, seguida por el dominio pseudo-cinasa (JH2). El dominio SH2 (JH3) se localiza casi de manera central, mientras que el dominio FERM (JH4-JH7) en el extremo amino terminal esta implicado en la unión al receptor y la selectividad hacia éste (Tomado de. O'Shea J. J. *et al.* 2002).

La familia STAT.

Siete miembros de esta familia proteica han sido detectados en células de mamíferos (STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6). La masa molecular de estos factores incluyendo las formas variantes truncadas de splicing oscila entre los 80-115 daltons y constan de 750 a 800 aminoácidos. Los genes de Stat's están organizados en grupos dentro de los cromosomas. Stat1 y Stat4 se localizan en el cromosoma 1, Stat2 y Stat 6 en el cromosoma 10 y Stat 3, Stat5a y Stat5b en el cromosoma 17. Su organización sugiere que estos genes surgieron mediante duplicación de un gen ancestral común. Dichas duplicaciones aparentemente reflejan la creciente necesidad de la comunicación celular en eucariontes. En este sentido, un dato interesante ha sido el encuentro de genes homólogos a Stat's en *Dictyosteryium* y *Drosophila* (Imada, K. and Leonard, W. J. 2000; Kisseleva, T. *et al.* 2002; O'Shea J. *et al.* 2002).

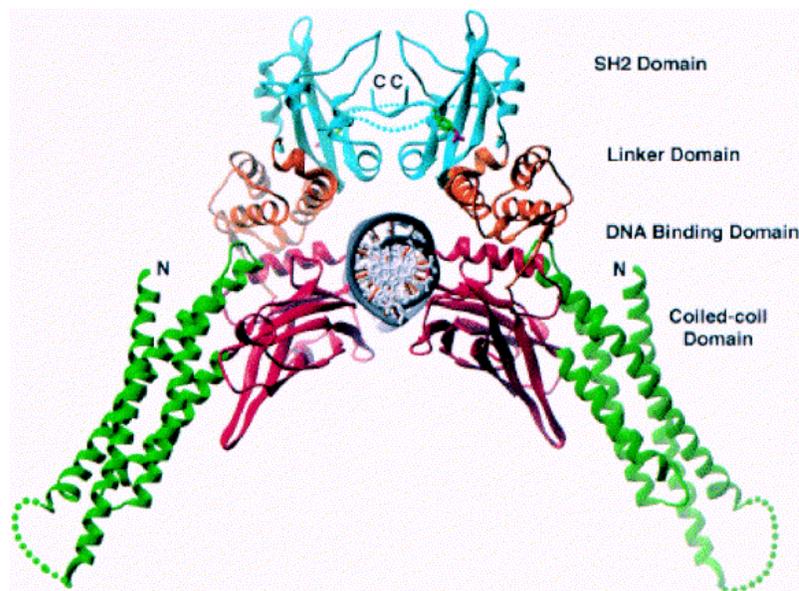


Fig. 4. Estructura de la proteína STAT. La figura muestra la estructura terciaria de la proteína Stat 1. En el centro de la estructura se encuentra el dominio de unión al DNA, el cual se complementa con otra proteína Stat al dimerizarse (Tomado de Kisseleva, T. *et al.* 2002).

Estructura de los factores transcripcionales STAT.

Esta familia de factores transcripcionales muestra dominios estructural y funcionalmente conservados, entre los cuales es posible identificar el dominio amino terminal (NH₂), el dominio coiled-coiled (CCD), el dominio de unión al DNA (DBD), el dominio linker y el dominio de activación SH₂/Tirosina, el cual juega un papel importante en la asociación entre la proteína y su receptor. En contraste el dominio de activación transcripcional carboxilo terminal (TAD) es sumamente divergente y contribuye a la especificidad de las Stat's (Kisseleva, T., et al. 2002).

El dominio amino terminal comprende aproximadamente 130 aminoácidos y es ampliamente conservado entre las Stat's teniendo porcentajes de identidad en su secuencia que van del 51% entre Stat 1 y Stat 4, 20% entre Stat 5 y Stat 6. Diversos estudios han mostrado que este dominio facilita la unión a los receptores, además de promover la interacción con los coactivadores transcripcionales CBP/p300, así como con la familia PIAS (Protein Inhibitor of the Activated Stat), y está implicado en la translocación nuclear. Por otro lado, según la estructura cristalográfica de Stat 1 y Stat 3, el dominio CCD el cual consiste en cuatro alfa hélices (aproximadamente 135-315 aminoácidos), forma una superficie predominantemente hidrofílica que es capaz de interactuar con otras proteínas helicoidales. Algunos de los últimos estudios han involucrado a este dominio con la asociación al receptor, con la fosforilación en tirosina y la translocación nuclear (Kisseleva, T. *et al.* 2002; O'Shea J. *et al.* 2002).

La mayoría de los factores de transcripción tienen la capacidad de interactuar con el DNA, y en el caso de las proteínas Stat el dominio de unión al DNA consta de aproximadamente entre 320 y 480 aminoácidos, y forma una estructura de β -barril. En su forma dimerizada cada componente Stat reconoce bases en el elemento GAS, el número de sitios de contacto directo entre los residuos de aminoácidos y el DNA son modestos y sufren de una disociación constante por lo que la cooperatividad del dímero en la unión al DNA es importante para una efectiva actividad transcripcional (O'Shea J. et al. 2002).

El dominio linker de entre 465 y 585 aminoácidos, enlaza el dominio de unión al DNA con el dominio de dimerización SH2. Mediante el análisis de la estructura cristalográfica de Stat 1 se ha observado que el dominio linker interactúa con el dominio SH2, lo cual sugiere que la capacidad de unión al DNA así como la regulación transcripcional puede estar modulada por cambios conformacionales en el dominio SH2. Aunque éste dominio (SH2) localizado entre los residuos 580 - 680 es totalmente divergente de otros dominios SH2 es sumamente conservado en las proteínas Stat. Por otra parte, el dominio SH2 juega un papel importante en la señalización gracias a su capacidad de unirse a motivos fosfo-tirosina específicos (Kisseleva, T., et al. 2002).

Como se muestra en la figura 5, después de que las citocinas se unen a su receptor, las Stat's son reclutadas por los receptores y sufren una fosforilación tirosina cinasa por las proteínas Jak's. Después de esto las proteínas Stat's son capaces de disociarse del receptor, y se dimerizan en el citoplasma para translocarse al núcleo modulando de esta forma la expresión de genes blanco (Darnell, J.E., et al, 1994).

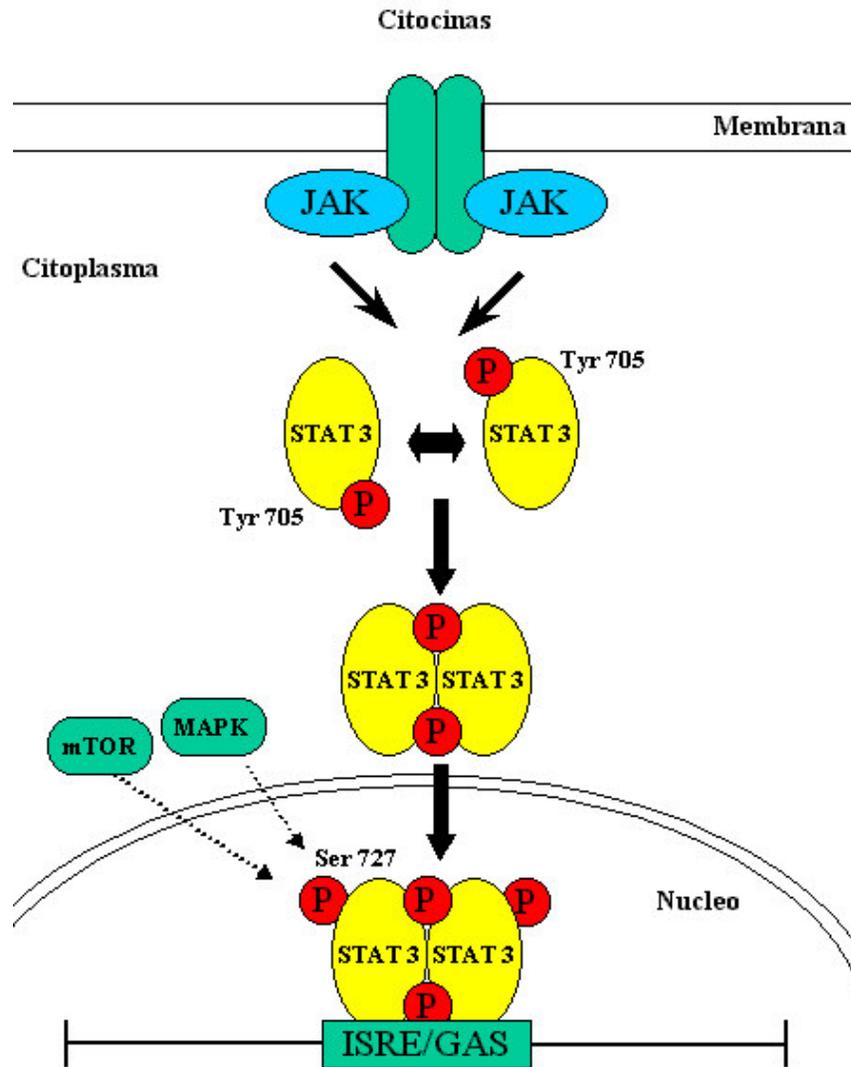


Fig. 5. Vía de Señalización Intracelular JAK/STAT. La figura muestra particularmente la ruta que siguen las proteínas STAT 3. Una vez que la citosina se une a su receptor, las STAT son reclutadas y fosforiladas por las JAK, luego dichos factores forman un dímero el cual se transloca al interior del núcleo y se une a las regiones promotoras. En el caso de STAT 3 se requiere de una segunda fosforilación para que las STAT promuevan la transcripción. Modificado de Imada, K. and Leonard, W. J. (2000).

Las proteínas STAT están constituidas por 750 a 850 aminoácidos y poseen diversos dominios funcionales, entre ellos los dominios SH2 juegan un papel importante en la asociación entre la proteína y su receptor, diferencias en los dominios SH2 determinan la selectividad de la unión de la proteína STAT con los receptores a citocinas. Una tirosina conservada aproximadamente a 700 residuos del extremo amino terminal es fosforilada por las Jak activadas. La manera en que la dimerización es llevada a cabo se debe a la interacción de los dominios SH2 de cada STAT y el dominio tirosina fosforilado en el otro, de esta manera los dímeros son estabilizados por interacciones bivalentes (Ward, A. *et al.* 2000; Imada, K. and Leonard, W.J. 2000).

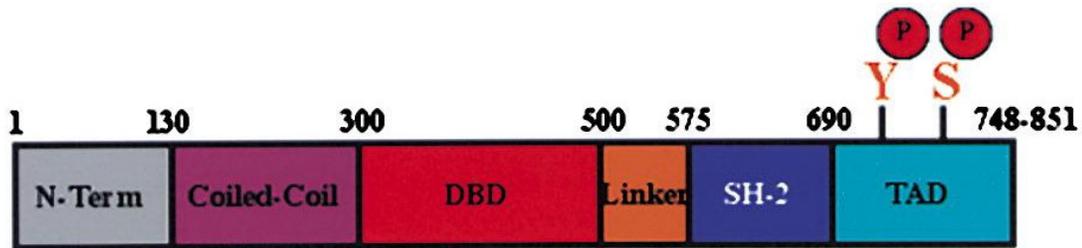


Fig. 6 Estructura de las proteínas STAT. La figura muestra la estructura hasta ahora propuesta para las proteínas Stat, también se indican los posibles sitios de fosforilación para el caso de Stat 3 que supone una doble fosforilación en una serina para reforzar su actividad transcripcional (Tomado de. O'Shea J. J. *et al.* 2002).

Además de que la dimerización es sumamente importante para activar la función de unión al DNA, los dominios amino altamente conservados parecen estar involucrados en la oligomerización de dímeros STAT para formar tetrámeros o oligómeros altamente ordenados (Imada, K. and Leonard, W. J. 2000).

La estructura cristalográfica de los dominios de oligomerización sugiere que están compuestos de ocho hélices con una estructura hook-like. Una mutación de un residuo conservado de triptofano en este dominio bloquea la interacción entre dos dímeros y reduce la activación transcripcional (Imada, K. and Leonard, W. J. 2000). Al menos ésta formación tetramérica a sido demostrada en la activación de Stat5 inducida por IL-2 en el promotor humano de IL-R2a. La región carboxilo terminal de las Stat's es el dominio de activación transcripcional. Un residuo conservado de serina en estos dominios en Stat1 y 3 es blanco de fosforilación por lo que es considerado importante en la regulación de la actividad transcripcional en estas Stat's, al menos estos factores requieren de una doble fosforilación posiblemente mediada por cinasas de la familia MAP, ERKs o p38 (Imada, K. and Leonard, W. J. 2000; Kisseleva, T. *et al.* 2002).

Se han reportado distintas isoformas funcionales resultado del procesamiento (splicing) alternativo de proteínas Stat 3 denominadas Stat 3 α y Stat 3 β , de las cuales la última ha sido detectada en blastos de LMA. Asimismo, la proteína Stat 5 ha sido asociada con la Leucemia Mielogena Crónica y LMA. Adicionalmente se han detectado proteínas activadas Stat 3 en un 73% y Stat 5 en un 80% en pacientes con LMA (Shau, K. *et al.* 1996; Gouilleux-Gruart, V. *et al.* 1996).

STAT 3

Es un factor clave en la vía de señalización de muchas citocinas y factores de crecimiento, además de estar activado constitutivamente en numerosos tumores humanos,

posee un potencial oncogénico y actividad antiapoptótica (Bromberg, J.F. *et al.*, 1999).

Stat 3 es activada por fosforilación de la Tyr 705, lo cual induce dimerización, translocación nuclear y unión al DNA. La actividad transcripcional es activada por fosforilación en la Ser 727, en apariencia por la vía MAPK o mTOR (Wen, Z. *et al.* 1995). La expresión relativa de las isoformas de STAT 3: STAT 3 α (92 kDa) y STAT 3 β (83 kDa) reflejan una función biológica distinta dependiendo del tipo de célula, del ligando o del estado de maduración celular (Biethahn, S. *et al.* 1999).

Stat 3 ha sido ampliamente estudiada debido a sus múltiples funciones dentro de la regulación del crecimiento celular, procesos inflamatorios y desarrollo embrionario temprano. La activación de esta proteína ha sido registrada en diversos tumores sólidos y hematopoyéticos y su presencia se ha correlacionado con la estimulación del crecimiento y el efecto anti-apoptótico en estos padecimientos (Imada, K. and Leonard, W. J. 2000; Kisseleva, T. *et al.* 2002).

Existen muchas rutas que llevan a la activación de Stat 3. Además de ser estimulada por citosinas (incluyendo factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal ‘EGF’, y el factor de crecimiento derivado de plaquetas ‘PDGF’) que usan los receptores con actividad cinasa de tirosinas, algunos otros receptores oncogénicos no tirosina cinasa pueden activar Stat 3. Se ha demostrado que Stat 3 puede ser activada a través de proteínas G, lo que sería un claro ejemplo de “cross talk” e interconexiones entre dos vías de señalización funcional y conceptualmente distintas (Imada, K. and Leonard, W. J. 2000; Kisseleva, T. *et al.* 2002).

STAT 5

STAT 5 ha sido encontrada activa constitutivamente en algunos tipos de células leucémicas (Biethahn, S. *et al.* 1999). Es activada en respuesta a una amplia variedad de ligandos como IL-2, GM-CSF, hormona del crecimiento y prolactina. STAT 5 es activada por fosforilación en Tyr 694. Esta forma fosforilada ha sido también encontrada en células endoteliales tratadas con IL-3 lo cual sugiere que está involucrada en la angiogénesis y en la motilidad celular. Asimismo, se han encontrado dos isoformas de esta proteína STAT 5 A y STAT 5 B, las cuales a diferencia de STAT 3 son codificadas por distintos genes (Ambrosio, R. *et al.* 2002; Kisseleva, T. *et al.* 2002).

Regulación negativa de la vía Jak/Stat

La vía Jak/Stat es importante no sólo en la diferenciación y proliferación celular, sino que también lo es para la defensa del hospedero ante invasores patógenos y además se ha mostrado su participación en procesos tumorales. Por esto no debe sorprendernos que existan mecanismos de regulación finamente controlados, que no sólo controlan la regulación positiva sino también la regulación negativa de esta ruta, es decir los mecanismos que finalizan con la señal, proceso que se da en una cascada de eventos que involucran desde los receptores, las Jak's y finalmente las Stat's (O'Shea J. *et al.* 2002). La importancia de tales elementos radica en que existe la posibilidad de que las alteraciones en la vía de transducción de señales Jak/Stat se deban no únicamente a una sobre-expresión de

tales factores, sino también al incremento de supresores e inhibidores de esta vía que eventualmente afectarían la correcta transducción de mensajes (O'Shea J. *et al.* 2002).

En el caso de los receptores, la mayoría de las células se protegen contra su prolongada activación, lo cual incluye la generación de isoformas de receptores solubles, competentes para una limitada cantidad de ligandos. Estas isoformas son generadas mediante cambios postraduccionales o mediante "splicing" alternativo, aunque son también enviadas a degradación mediante endocitosis una vez que han sido activados. En el caso de esta vía no es la excepción y algunos de los receptores asociados a las proteínas Stat poseen un motivo conservado de diez aminoácidos en el dominio intracelular de los receptores, el cual se sabe que regula su endocitosis y de esta manera da término con la señal (O'Shea J. *et al.* 2002; Kisseleva, T. *et al.* 2002).

Otro mecanismo propuesto para dar fin a esta señal es la degradación proteosómica dependiente de ubiquitinación de sus componentes. Estudios con inhibidores de fosfatasa han mostrado ser eficientes al mantener estables las isoformas tirosina fosforiladas de Stat 4, Stat 5 y Stat 6, además de prolongar la actividad de las Jak's, sin embargo hasta el momento aún no se ha establecido claramente como estos procesos pueden estar involucrados en la regulación de esta vía (O'Shea J. *et al.* 2002; Kisseleva, T. *et al.* 2002).

Por otro lado la actividad de las cinasa Jak es dependiente de fosforilación, y no resulta sorprendente que fosfatasa como las SHP1 y la SHP2 regulen de manera negativa estas cinasas a través de la desfosforilación del receptor al que se encuentran asociadas. De manera interesante la fosfatasa SHP1 es expresada principalmente en células de origen

hematopoyético, mientras que la SHP2 es expresada en la mayoría de los linajes celulares. (O'Shea J. *et al.* 2002).

Otros estudios han sugerido que SHP1 y SHP2 pueden desfosforilar directamente a las Jak's y a Stat 5. De manera inesperada se encontró que CD45 regula negativamente la vía Jak-Stat cuando esta ha sido estimulada por IL-3, IL-4, EPO e IFN- γ (O'Shea J. *et al.* 2002).

La retroalimentación negativa también forma parte de las estrategias de término para la señal de esta vía. La familia de supresores de la señalización de citocinas (SOCS) son genes blancos de Stat's y antagonizan la activación de las mismas. El primer miembro encontrado de esta familia fue CIS-1 (proteína citosina- inducible SH2). La sobre-expresión de esta proteína bloquea el reclutamiento de las Stat's por el receptor, y de igual manera otras proteínas como SOCS-1, SOCS-2, y SOCS-3 las cuales fueron identificadas por su semejanza estructural y funcional, son expresadas de manera Stat dependiente. Aunque muchas de las funciones de estas proteínas han sido determinadas mediante ratones knockout y transgénicos, poco se sabe sobre el mecanismo por el cual antagonizan la señal Jak-Stat (O'Shea J. *et al.* 2002; Imada, K. and Leonard, W. J. 2000; Kisseleva, T. *et al.* 2002).

Entre todas las proteínas que han sido identificadas al interactuar con las Stat's podemos encontrar a la familia PIAS (proteínas inhibidoras de las stat's activadas). PIAS1 ejerce su función al unirse a los dímeros de Stat 1 y de esta manera impidiendo su unión al

DNA. Este es el mismo mecanismo mediante el cual PIAS3 impide la unión de Stat 3 al DNA. También la proteína dPIAS, el homólogo de esta proteína en *Drosophila* ha sido encontrada y se ha comprobado que ejerce la misma función en la mosca (O'Shea J. *et al.* 2002; Imada, K. and Leonard, W. J. 2000; Kisseleva, T. *et al.* 2002).

Así mismo, la actividad de las Stat puede ser regulada negativamente mediante modificaciones directas, la más notable de todas ellas es la desfosforilación. También la generación de isoformas truncadas en el extremo carboxilo es otra modificación que ha sido bien caracterizada. Aunque éstas isoformas de Stat's son a menudo generadas a nivel transcripcional, también pueden ser generadas por procesamiento post-transcripcional. Estas isoformas truncadas parecen funcionar interfiriendo la señal transducida al interior de la célula. Por otra parte, otro mecanismo de modificación directa ha sido la metilación de proteínas Stat's, sin embargo la importancia fisiológica de esta alteración no ha sido totalmente entendida (Kisseleva, T. *et al.* 2002).

HIPÓTESIS

Diversos autores han mencionado que los distintos tipos de cáncer y algunas enfermedades ocasionadas por factores ambientales, se asocian con la expresión anormal de genes que codifican para proteínas involucradas en la transducción de señales de crecimiento celular y factores de crecimiento (Brand – Rauf, P.W. 1997). La LMA es un desorden clonal maligno caracterizado por el arresto de la diferenciación y una incontrolada proliferación de las células precursoras mieloides. Alteraciones en la ruta de transducción de señales de los receptores de citocinas vía cinasas Janus (Jak's) y Transductores de Señal y Activadores de la Transcripción (STAT) pueden estar involucradas en el desarrollo de esta patología.

Tomando en cuenta que STAT 3 y STAT 5 son factores que se han encontrado en pacientes que ya han desarrollado LMA, y que a su vez estas proteínas son un elemento importante dentro de la ruta JAK/STAT como uno de los mecanismos de señalización intracelular en los procesos de diferenciación y proliferación, consideramos importante evaluar la presencia de estas proteínas en individuos expuestos a benceno, pues es posible que sufran alteraciones en los mecanismos de regulación de dichos factores, dando lugar a eventos pre-leucémicos que podrían conducir al desarrollo de procesos patológicos como la LMA. Basados en la hipótesis de que una alteración en las vías de señalización intracelular puede reflejarse en un incremento en la presencia de ciertas proteínas STAT como consecuencia de una exposición a benceno, se pretende analizar la presencia de las proteínas STAT 3 y STAT 5 en personas expuestas de manera crónica a benceno.

OBJETIVOS

Objetivo General

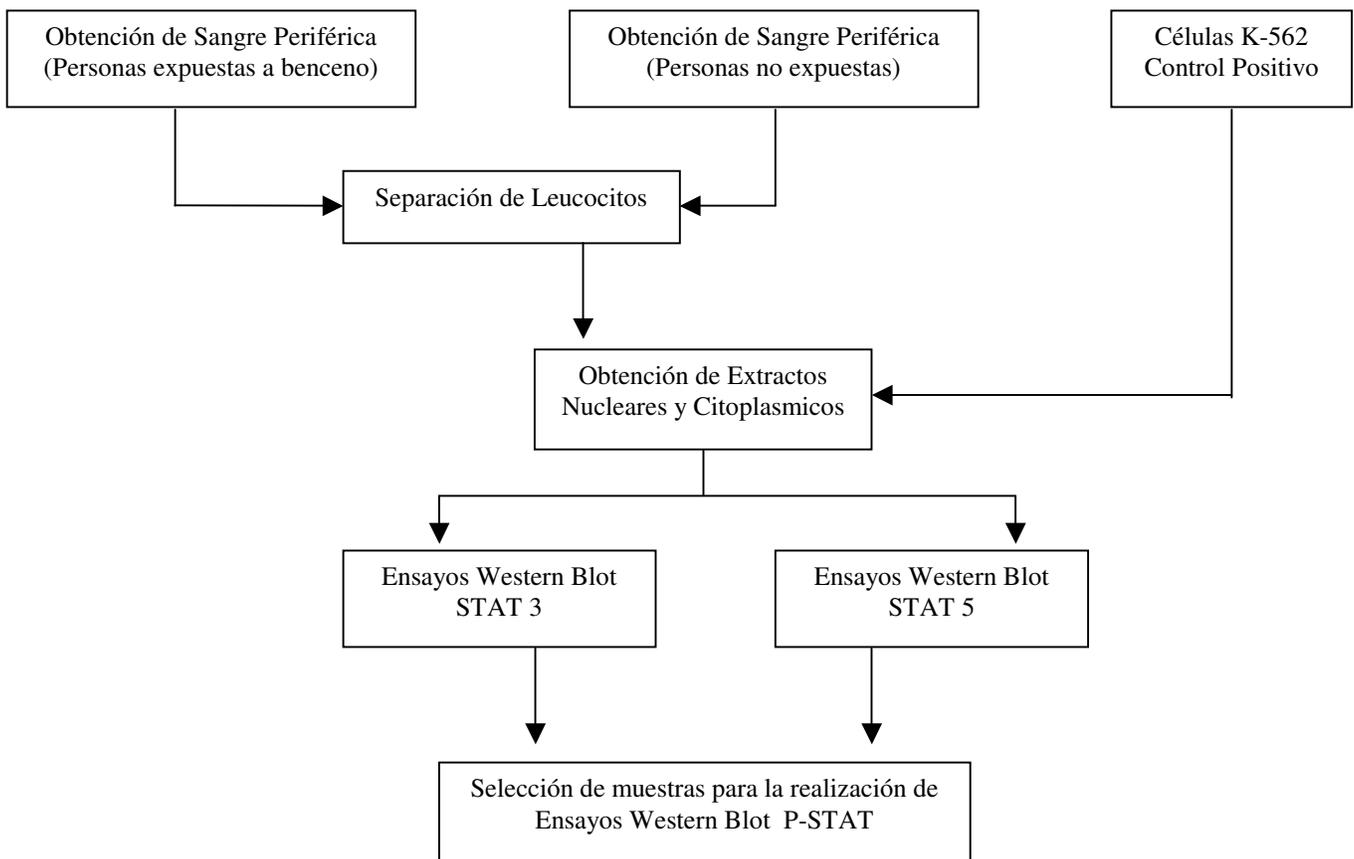
Analizar el efecto de la exposición crónica de benceno sobre los niveles de las proteínas STAT 3 y STAT 5

Objetivos Particulares

1. Obtener muestras de sangre periférica de personas expuestas a altas concentraciones de benceno.
2. Separar células mononucleares y obtener extractos protéicos.
3. Evaluar los niveles de expresión de las proteínas STAT 3 y STAT 5 por ensayos de Western blot.
4. Evaluar el estado de fosforilación de la proteína Stat en estas muestras
5. Observar la expresión de los factores STAT 3 y STAT 5 en un modelo celular.
6. Realizar ensayos P-STAT 3 en un modelo celular.

CAPÍTULO 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

PRIMERA FASE:



MATERIAL Y METODOS

Recolección de muestras de sangre periférica.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de un volumen aproximado de 5 ml (15 ml totales) mediante el sistema de toma de sangre estéril al vacío tipo vacutainer con EDTA. Las muestras fueron obtenidas mediante punción sanguínea en el brazo de personas expuestas a altas concentraciones de benceno (trabajadores de la industria petrolera) así como de personas no expuestas a dichas concentraciones. La recolección se hizo preferentemente en condiciones de ayuno y con material nuevo y estéril.

Línea celular K-562.

El uso de líneas celulares nos proporciona ventajas, como la de estudiar poblaciones celulares homogéneas y abundantes. Una de las líneas celulares más comúnmente utilizadas para este tipo de estudios, son las células de eritroleucemia K-562. Esta línea de origen mieloide expresa en particular altos niveles de proteínas STAT 3 y 5, por lo que fue utilizada como control positivo. La línea fue crecida en medio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, UK) +2mM de glutamina + 10% de suero fetal bovino (FBS) + penicilina/streptomycin a 37°C, 5%CO₂.

Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales de ratón usados contra STAT 3 y STAT 5 fueron obtenidos de Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA). El anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína fosforilada STAT 3 (Tyr 705) fue obtenido de Cell Signaling (Cell Signalling Technology).

Separación de leucocitos.

Los diferentes tipos de células sanguíneas blancas se denominan en conjunto leucocitos, se caracterizan por presentar núcleo y son incoloros en la sangre fresca. Se clasifican en a) Granulares: eosinófilos, basófilos y neutrófilos y b) Agranulocitos: linfocitos y monocitos. Una vez obtenidas las muestras tanto de personas expuestas como no expuestas, los leucocitos fueron aislados por medio de un gradiente de centrifugación en Lymphoprep (Ficol, densidad: 1.077 g/ml) y posteriormente lavados con PBS (Phosphate Buffer Saline). Dichas muestras fueron procesadas o almacenadas en congelación en 1 ml de buffer TD con 30% de glicerol en tubos para microfuga hasta su uso posterior.

Obtención de extractos citoplasmáticos y nucleares.

El siguiente protocolo fue seleccionado de entre otros métodos tal y como se discutirá más adelante y se realizó en base al descrito por Nancy Andrews (Nucleic Acid Research 19(9):2499, 1991).

Todo el proceso descrito a continuación se realizó a 4°C. Las células se descongelaron lentamente y fueron centrifugadas a 2000 rpm para empastillar y ser resuspendidas con 1 ml de PBS, para posteriormente volver a centrifugar a la misma velocidad. Las células son resuspendidas en 200µl de buffer A frío (Hepes-KOH pH 7.9 10mM, KCl 10mM, DTT 0.5mM, PMSF 0.2mM y MgCl 1.5 mM) y se incuban en hielo durante 10 minutos. Al término de ese tiempo fueron agitadas con vortex vigoroso durante 10 segundos y fueron centrifugadas durante un tiempo igual (spin) a 12,000 rpm. El sobrenadante corresponde a la fracción citoplásmica y se almacenó a -70°C para su análisis posterior. Los tubos para microfuga que contienen la pastilla (fracción nuclear) son colocados unos escasos segundos boca a bajo para eliminar la mayor cantidad de residuos del sobrenadante.

La pastilla se resuspende con puntas de micropipeta en 100µl de buffer C (Hepes-KOH pH 7.9 10mM, NaCl 420mM, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5mM, PMSF 0.2mM, MgCl₂ 1.5mM y glicerol 25%). Hecho esto, el tubo es colocado en hielo e incubado durante 20 minutos, para posteriormente centrifugarse a 12,000rpm durante 5min. El sobrenadante corresponde a la fracción nuclear y se almacenó a -70°C hasta su procesamiento.

Obtención de extractos totales

Para la obtención de extractos totales se realizó el siguiente protocolo el cual fue seleccionado después de realizar distintas pruebas y ensayos que nos permitieron establecer las condiciones óptimas para continuar con el procedimiento experimental.

Las células fueron recuperadas y centrifugadas para ser lavadas dos veces con PBS centrifugando cada vez a 2000 rpm. La pastilla fue resuspendida en 500 µl Buffer Lisis (50mM Tris pH 8.0, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 0.5% NP-40, 1mM PMSF) y agitada vigorosamente con vortex durante 10 seg. Los tubos fueron colocados en hielo durante 20 minutos, y al término de ese tiempo se sonicaron (30%, Output 5, Hold 0) las muestras durante 5 ó 10 segundos evitando la formación de espuma. Las muestras fueron entonces centrifugadas a 14,000 rpm durante 5 minutos y se colectó el sobrenadante el cual fue almacenado a -70°C .

Cuantificación de proteína

Extractos totales. Para medir la cantidad de proteína total presente en los extractos se ocupó el kit “DC protein assay” de Biorad para cuantificación de proteína. Este método se basa en la reacción de las proteínas con una solución alcalina de tartrato cúprico dando una mezcla de color azul desarrollada por la presencia de tirosina, triptófano y en menor medida cistina, cisteína e histidina. La curva patrón se realizó con albúmina (1mg/ml) y las lecturas fueron tomadas a 655 nm a través de un lector de ELISA.

Extractos citoplásmicos y nucleares. En este tipo de extractos el método ocupado para medir la concentración proteica fue mediante el kit “Bio-Rad Protein assay” que se basa en la reacción de Bradford ante el cambio de color debido al azul de Coomassie cuando este se une a proteínas. La curva patrón se realizó con albúmina (1mg/ml) y las lecturas fueron tomadas a 595 nm a través de un lector de ELISA.

Ensayos de Electrotransferencia e Inmunodetección (Western Blot).

Preparación de muestras. A las fracciones citoplásmicas y nucleares de las células se les adicionó un volumen de buffer de carga 2X (ver apéndice) igual al volumen de la muestra y se incubaron durante 3 minutos a 90°C. Para cargar las mismas concentraciones de proteína en un volumen similar las muestras fueron diluidas con el buffer de extracción correspondiente cuando así se requirió. Posteriormente se colocaron 20, 35 y hasta 50 µg (según se especifica más adelante) de proteína total por carril en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%.

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, y dichas membranas fueron bloqueadas en PBS o TBS (este último para el anticuerpo contra la proteína fosforilada STAT 3) con leche al 5% durante una hora para ser incubadas con anticuerpos específicos STAT 3, STAT 5 y P-STAT 3 durante toda la noche. Al día siguiente, después de 3 lavados de 10 minutos con PBS-T o TBS-T las membranas fueron incubadas durante una hora con el anticuerpo anti-ratón o anti-conejo acoplados a peroxidasa. Después de tres lavados finales las proteínas fueron visualizadas mediante quimioluminiscencia y autoradiografía usando el kit ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK).

RESULTADOS

Análisis de STAT 3 en personas expuestas a benceno.

Para poder determinar si la expresión de proteínas Stat 3 era alterada en personas que habían sido expuestas a benceno, se realizaron ensayos Western blot contra dicha proteína. Debido a que la proteína Stat 3 al ser fosforilada se dimeriza y se transloca al núcleo, la diferencia entre el nivel de “localización” nuclear o citoplásmico, nos podría dar una idea de que tan activo podría ser el factor transcripcional. Este es el motivo por el cual en cada muestra fue analizado y comparado el nivel de expresión en las fracciones nucleares y citoplásmicas. Estos ensayos se realizaron con 20µg de cada muestra por carril, las membranas de transferencia fueron teñidas para ser utilizadas como control de carga.

Los resultados que se obtuvieron al analizar mediante Western blot las 60 muestras se resumen en las tablas 2 y 3 indicándose mediante símbolos el nivel de expresión que mostraron las muestras – (sin expresión), + (Muy baja), ++ (Normal), +++ (Alta). Es importante destacar que en los resultados obtenidos contra la proteína Stat 3 fue posible observarla como una banda doble variando en ocasiones su expresión superior o inferior lo cual se intenta explicar más adelante. A continuación se muestran algunos de los resultados más representativos obtenidos durante el desarrollo del proyecto.

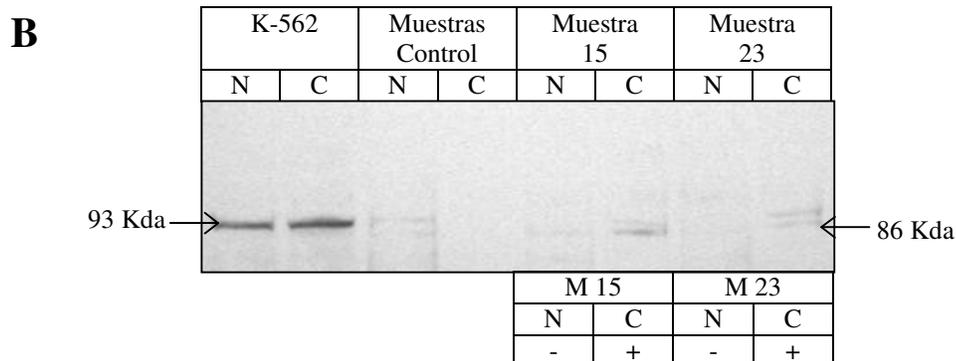
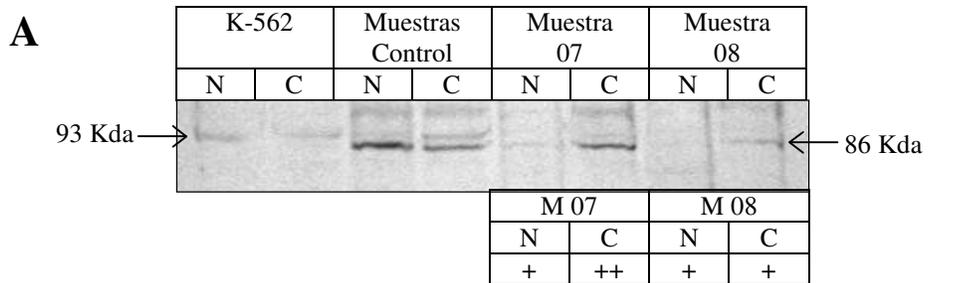


Fig. 7. La figura muestra los resultados del análisis de la expresión la proteína STAT 3. Se indica sobre las imágenes el carril correspondiente a fracción nuclear (N) o fracción citoplásmica (C). Las células K-562 fueron utilizadas como control positivo, mientras que los carriles indicados como muestras control son extractos de personas no expuestas de manera laboral a benceno. El número de la muestra analizada también es indicado arriba. También se indica el nivel de expresión con el que se calificó dicha expresión. A) Muestras 07 y 08. La expresión de Stat 5 en K-562 no es apreciable pero aún así es posible comparar la expresión de las muestras problema con la muestra control. En ambos casos la expresión se denota más en el citoplasma. Cabe destacar que se observa dicha expresión como una doble banda. B) Muestras 15 y 23. La expresión en las muestras es relativamente baja en la fracción citoplásmica para ambas muestras en comparación con el control positivo (K-562).

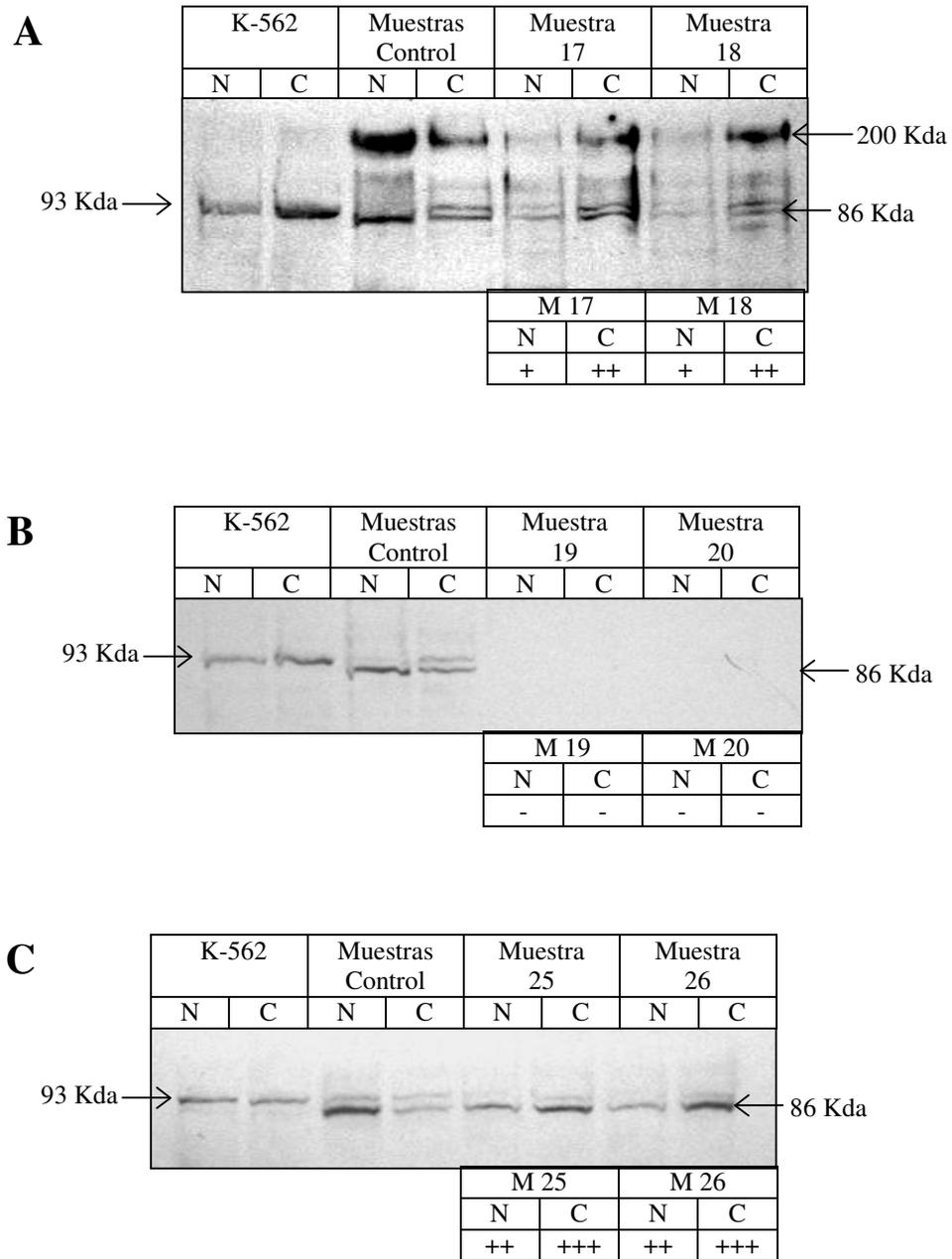


Fig. 8. La figura muestra los resultados del análisis de la expresión la proteína STAT 3. Se indica sobre las imágenes el carril correspondiente a fracción nuclear (N) o fracción citoplásmica (C). Las células K-562 fueron utilizadas como control positivo, mientras que los carriles indicados como muestras control son extractos de personas no expuestas a benceno. El número de la muestra analizada también es indicado arriba. También se indica el nivel de expresión con el que se calificó dicha expresión. A) Muestra 17 y 18. En estos casos la expresión es muy parecida a las muestras control, siendo más evidente en el citoplasma. Lo más interesante es la banda de elevado peso molecular presente en las muestras de personas (no así en células K-562) y que es más apreciable en la fracción citoplásmica que en la nuclear. B) Muestras 19 y 20. En ningún caso la proteína Stat 3 es apreciable, aunque sí en los controles. C) Muestras 25 y 26. Se aprecia la mayor expresión de Stat 3 en la fracción citoplásmica de dichas muestras contrario a lo que se observó con las muestras control.

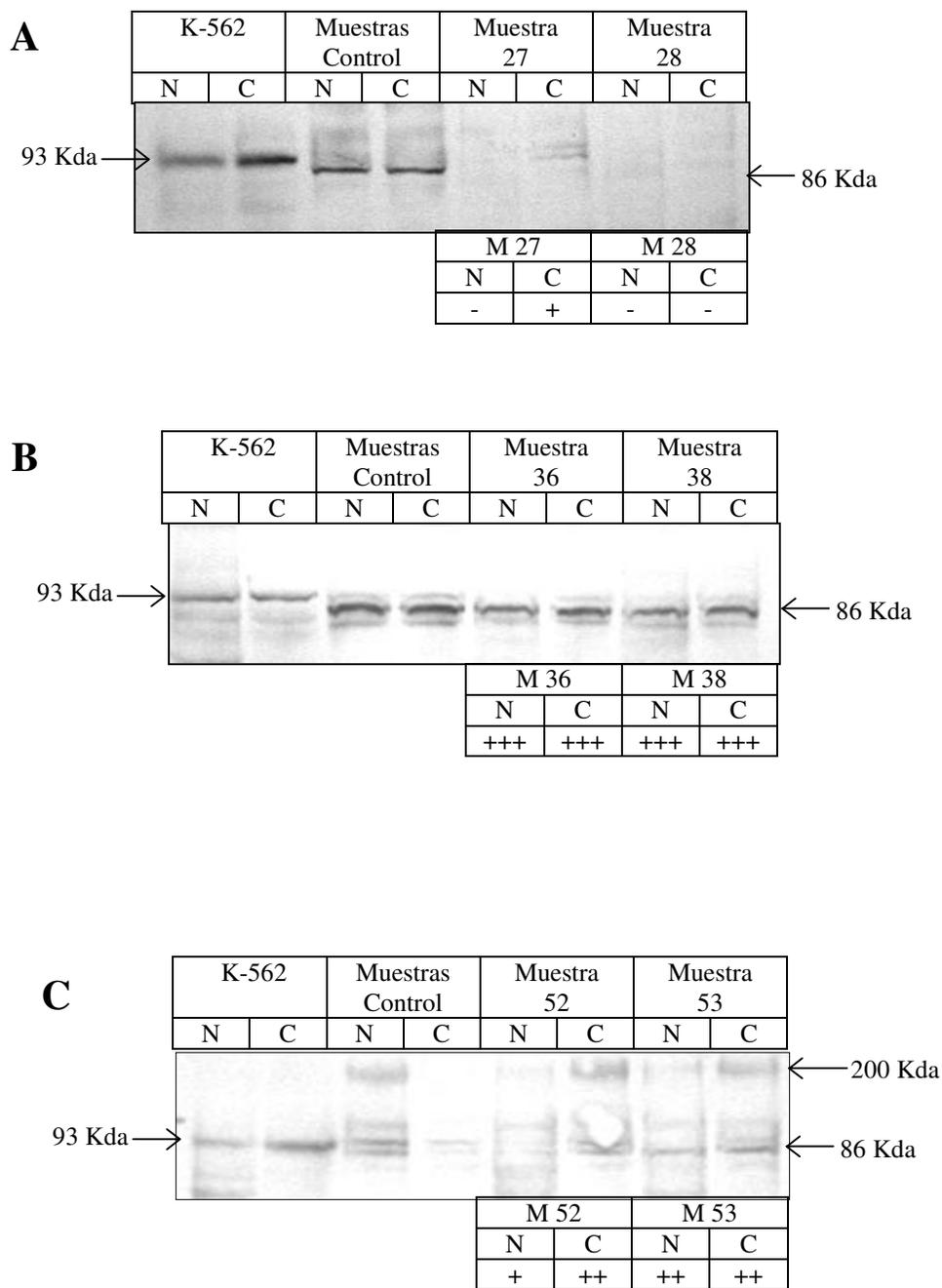


Fig. 9. La figura muestra los resultados del análisis de la expresión la proteína STAT 3. Se indica sobre las imágenes el carril correspondiente a fracción nuclear (N) o fracción citoplásmica (C). Las células K-562 fueron utilizadas como control positivo, mientras que los carriles indicados como muestras control son extractos de personas no expuestas a benceno. El número de la muestra analizada también es indicado arriba. También se indica el nivel de expresión con el que se calificó dicha expresión.

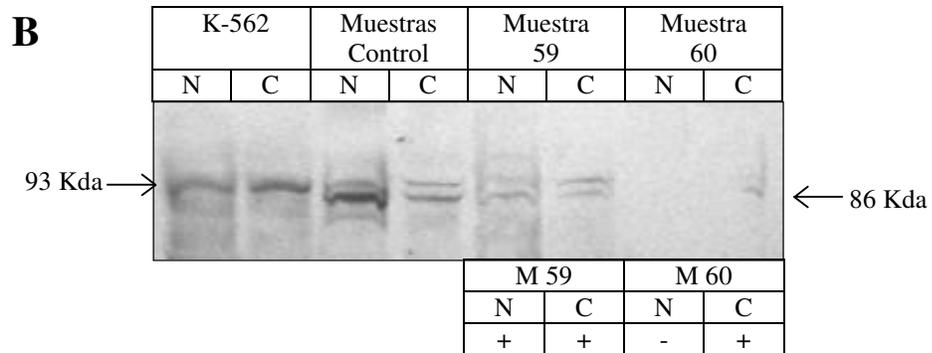
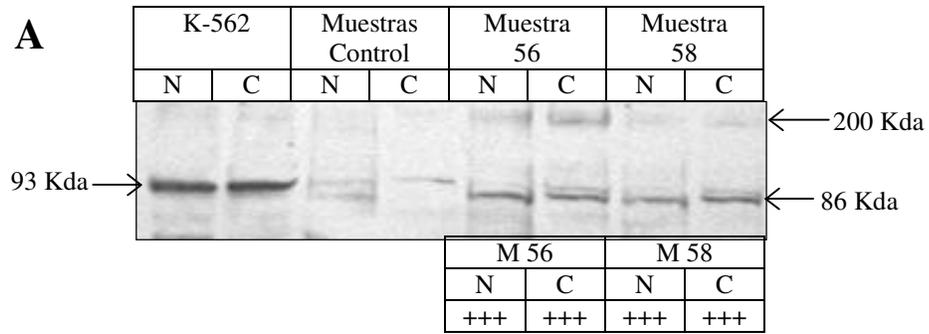


Fig. 10. La figura muestra los resultados del análisis de la expresión la proteína STAT 3. Se indica sobre las imágenes el carril correspondiente a fracción nuclear (N) o fracción citoplásmica (C). Las células K-562 fueron utilizadas como control positivo, mientras que los carriles indicados como muestras control son extractos de personas no expuestas a benceno. El número de la muestra analizada también es indicado arriba. También se indica el nivel de expresión con el que se calificó dicha expresión.

Análisis de STAT 3 fosforilada en personas expuestas a benceno.

Una vez analizadas las 60 muestras de personas expuestas a benceno, se realizó el análisis de la expresión de la proteína Stat 3 fosforilada, para poder determinar si la actividad de la proteína Stat 3 era alterada en personas que habían sido expuestas a benceno, se realizaron ensayos Western blot contra dicha proteína en su forma fosforilada (Stat 3 Tyr 705). La vía clásica Jak/Stat indica que la proteína Stat 3 al ser fosforilada se dimeriza y se transloca al núcleo, dicho evento de activación, podría ser un suceso importante que se presente en éstas persona. Los ensayos se realizaron con 35µg de cada muestra por carril, las membranas de transferencia fueron teñidas para ser utilizadas como control de carga.

Al igual que los resultados anteriores fue posible detectar la proteína Stat 3, como una banda doble que también varía en su expresión. Solamente se realizaron escasos ensayos debido a la limitada cantidad de extracto de cada muestra. A continuación se muestran los resultados obtenidos en esta fase del proyecto.

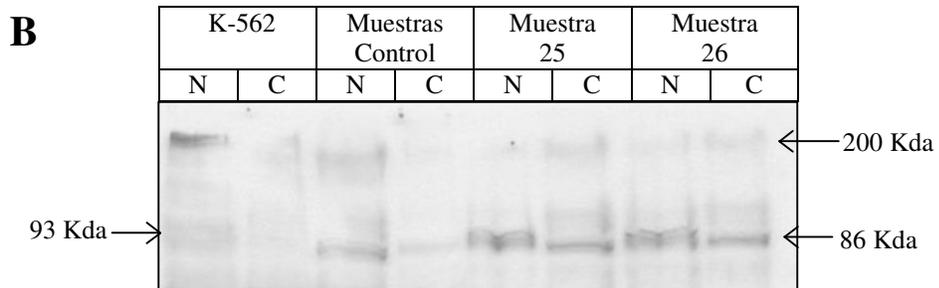
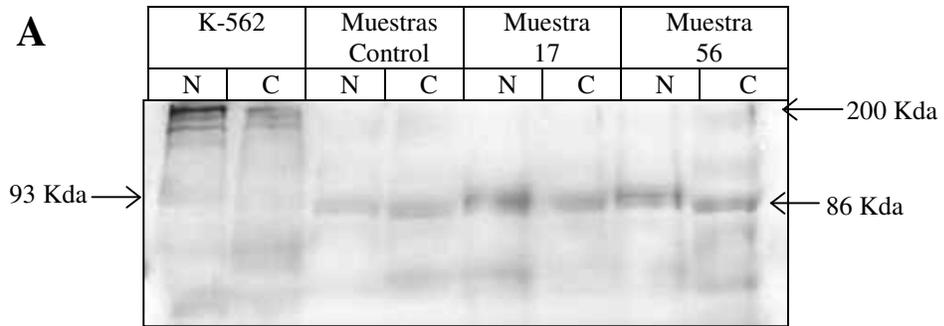


Fig. 11. La figura muestra los resultados del análisis de la expresión la proteína P-STAT 3 Tyr 705. Se indica sobre las imágenes el carril correspondientes a fracción nuclear (N) o fracción citoplásmica (C). Las células K-562 fueron utilizadas como control positivo, mientras que los carriles indicados como muestras control son extractos de personas no expuestas a benceno. El número de la muestra analizada también es indicado arriba.

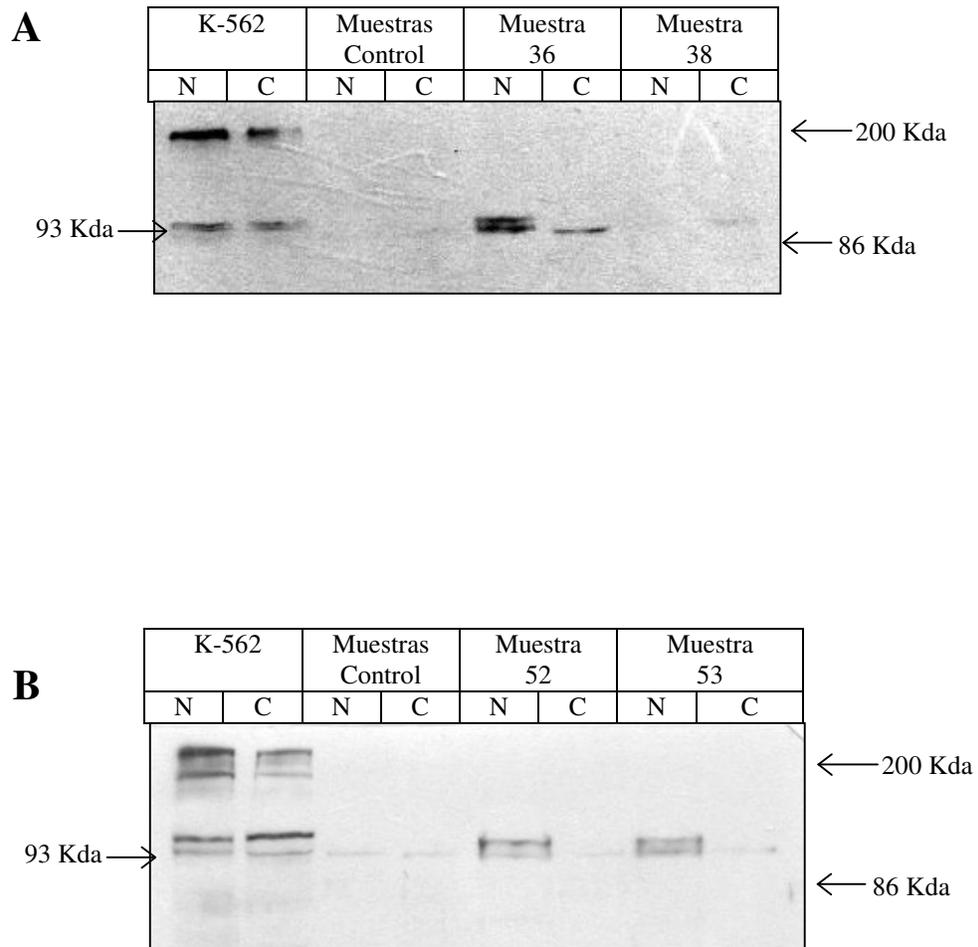


Fig. 12. La figura muestra los resultados del análisis de la expresión la proteína P-STAT 3 Tyr 705. Se indica sobre las imágenes el carril correspondiente a fracción nuclear (N) o fracción citoplásmica (C). Las células K-562 fueron utilizadas como control positivo, mientras que los carriles indicados como muestras control son extractos de personas no expuestas a benceno. El número de la muestra analizada también es indicado arriba.

Análisis de STAT 5 en personas expuestas a benceno.

Al igual que para la proteína Stat 3, se realizaron ensayos Western blot contra el factor transcripcional Stat 5 para poder determinar si la expresión de esta proteína es alterada en personas expuestas a benceno. Como indica la vía clásica JAK/STAT la proteína Stat 5 al ser fosforilada se dimeriza y se transloca al núcleo, la diferencia entre el nivel de “localización” nuclear o citoplásmico, nos podría dar una idea de que tan activo podría ser el factor transcripcional. Este es el motivo por el cual en cada muestra fue analizado y comparado en nivel de expresión en las fracciones nucleares y citoplásmicas.

Los resultados que se obtuvieron al analizar mediante Western blot las 60 muestras se resumen en la tabla 1 y 2 indicándose mediante símbolos el nivel de expresión que mostraron las muestras – (sin expresión), + (Muy baja), ++ (Normal), +++ (Alta). Los resultados obtenidos contra la proteína Stat 5 fueron nulos en cualquiera de las 60 muestras analizadas. A continuación se muestran algunos de los resultados más representativos obtenidos durante el desarrollo de esta fase del proyecto los cuales no mostraron diferencias en ningún caso.

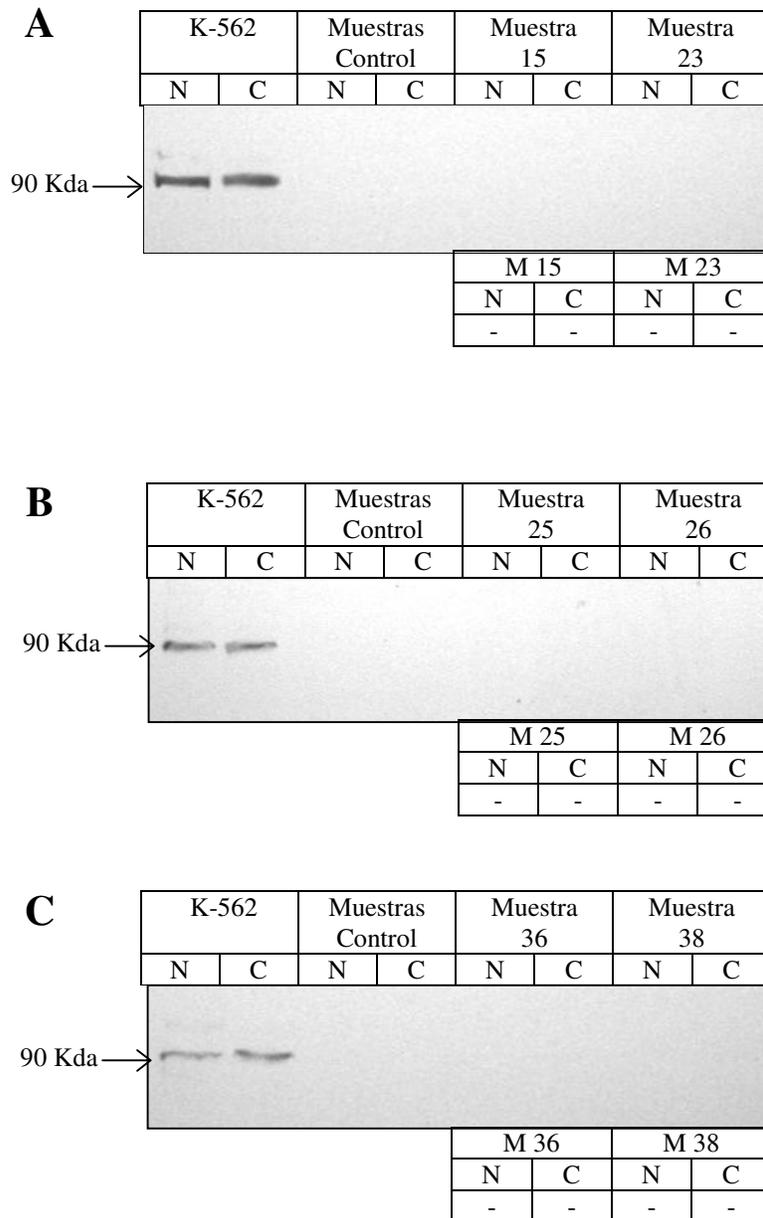


Fig. 13. La figura muestra los resultados del análisis de la expresión la proteína STAT 5. Se indica sobre las imágenes el carril correspondiente a fracción nuclear (N) o fracción citoplásmica (C). Las células K-562 fueron utilizadas como control positivo, mientras que los carriles indicados como muestras control son extractos de personas no expuestas a benceno. También se indica el nivel de expresión con el que se calificó dicha expresión.

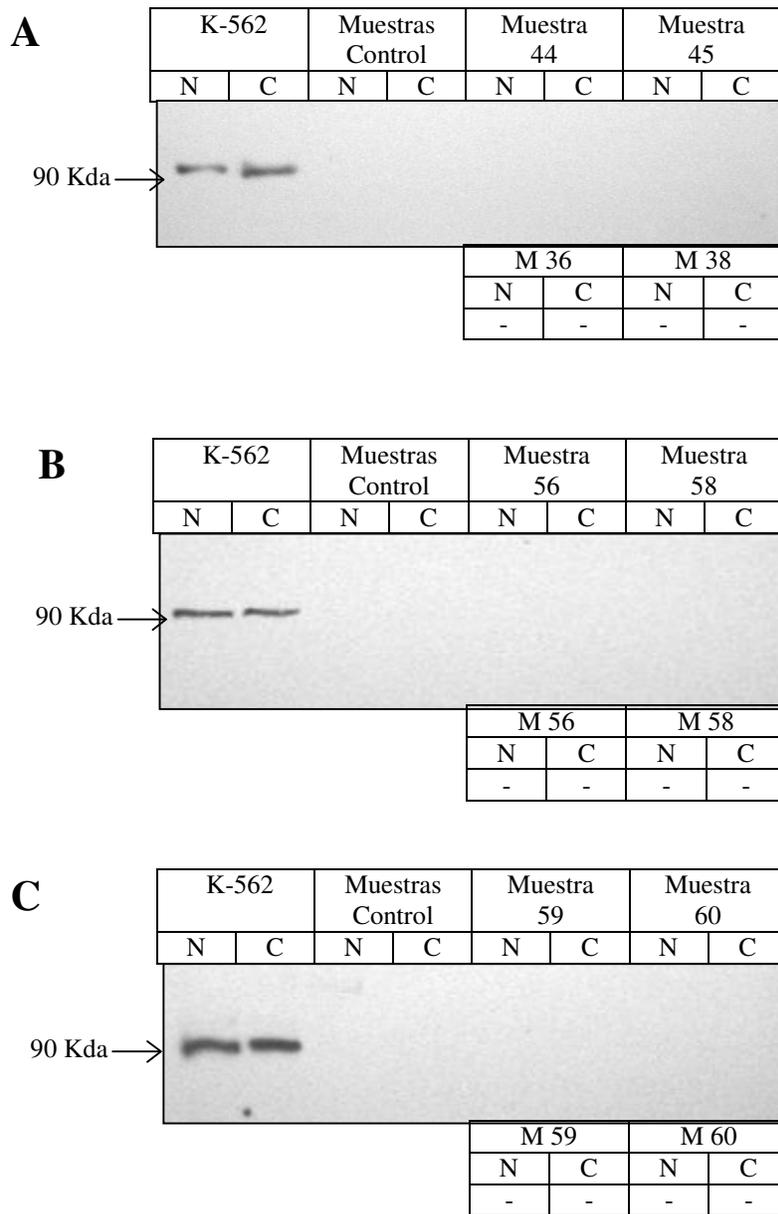


Fig. 14. La figura muestra los resultados del análisis de la expresión la proteína STAT 5. Se indica sobre las imágenes el carril correspondiente a fracción nuclear (N) o fracción citoplásmica (C). Las células K-562 fueron utilizadas como control positivo, mientras que los carriles indicados como muestras control son extractos de personas no expuestas a benceno. El número de la muestra analizada también es indicado arriba. También se indica el nivel de expresión con el que se calificó dicha expresión.

Expresión de proteínas Stat3y Stat5 en personas expuestas a benceno

MUESTRA	STAT3		STAT5	
	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	++	-	-
6	+	++	-	-
7	+	+++	-	-
8	-	+	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	+	-	-
12	-	+	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	+	++	-	-
16	-	-	-	-
17	+	+++	-	-
18	+	++	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	+	++	-	-
24	-	-	-	-
25	+++	+++	-	-
26	++	+++	-	-
27	-	++	-	-
28	-	-	-	-
29	+	+	-	-
30	-	-	-	-

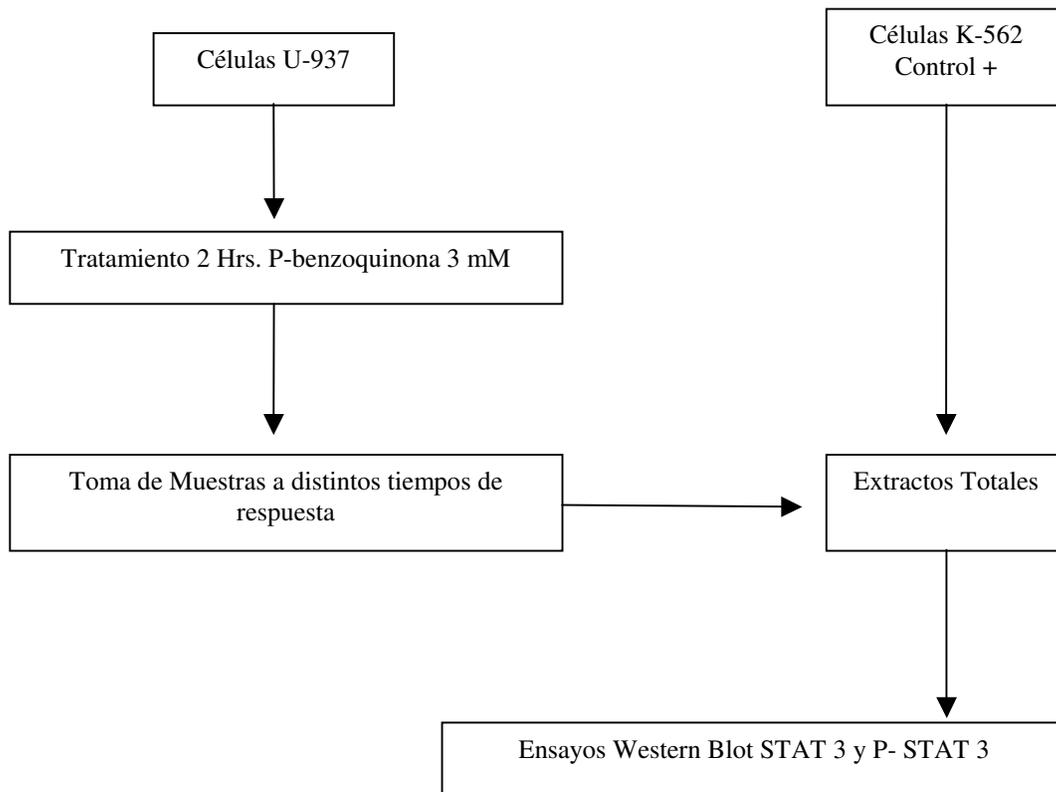
Tabla 2. Expresión de los factores transcripcionales Stat 3 y Stat 5. De acuerdo a la intensidad mostrada se clasificaron como: + expresión baja, ++ expresión regular, +++ expresión alta, – sin expresión.

Expresión de proteínas Stat3y Stat5 en personas expuestas a benceno (Continuación).

MUESTRA	STAT3		STAT5	
	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
31	+	+	-	-
32	-	-	-	-
33	+	++	-	-
34	-	++	-	-
35	-	++	-	-
36	+++	+++	-	-
37	+	++	-	-
38	+++	+++	-	-
39	-	-	-	-
40	+	+	-	-
41	+	+	-	-
42	+	++	-	-
43	+	++	-	-
44	+	+	-	-
45	+	+	-	-
46	+	+++	-	-
47	+	+	-	-
48	-	-	-	-
49	-	-	-	-
50	-	-	-	-
51	-	-	-	-
52	+	++	-	-
53	++	++	-	-
54	-	-	-	-
55	-	-	-	-
56	+++	+++	-	-
57	-	-	-	-
58	+++	+++	-	-
59	+	+	-	-
60	-	+	-	-

Tabla 3. Expresión de los factores transcripcionales Stat 3 y Stat 5. De acuerdo a la intensidad mostrada se clasificaron como: + expresión baja, ++ expresión regular, +++ expresión alta, – sin expresión.

SEGUNDA FASE:



Expresión de Factores transcripcionales STAT 3 en un modelo celular.

Con el objetivo de reforzar o apoyar nuestros resultados se analizó la expresión de las proteínas STAT 3 en la línea celular de origen mieloide U-937, expuestas al metabolito de benceno p-benzoquinona. Se incubaron células U-937 durante dos horas con 3 μ M de p-benzoquinona tomando muestras a distintos tiempos de respuesta posteriores a la exposición. Los extractos totales fueron analizados por medio de ensayos Western blot con el anticuerpo de STAT 3 y STAT 5.

Expresión de proteínas Stat3y Stat5 en células U-937

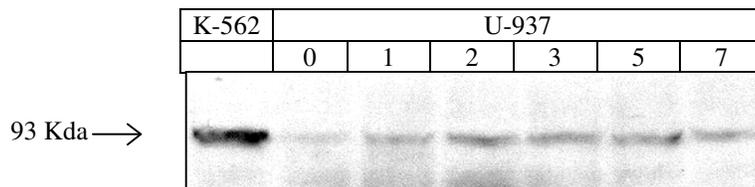


Fig. 15. La figura muestra los resultados del análisis de la expresión la proteína STAT 3 en células U-937. Se indica sobre las imágenes el carril correspondiente al tiempo de respuesta (desde 0 hasta 7 horas) en que las muestras fueron procesadas después del estímulo con p-benzoquinona 3mM durante dos horas. Las células K-562 fueron utilizadas como control positivo. Se aprecia un ligero aumento en la expresión de STAT 3 del tiempo 0 al tiempo 2 (2 horas) que se mantiene hasta las 5 horas con una leve disminución posterior a las 7 horas.

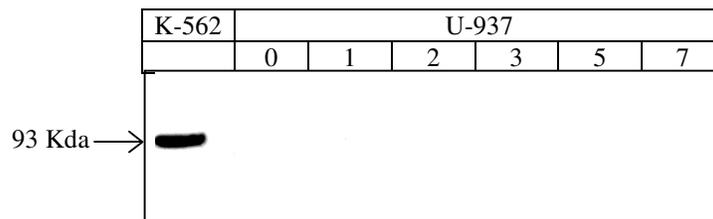


Fig. 16. La figura muestra los resultados del análisis de la expresión la proteína STAT 5 en células U-937. Se indica sobre las imágenes el carril correspondiente al tiempo de respuesta (desde 0 hasta 7 horas) en que las muestras fueron procesadas después del estímulo con p-benzoquinona 3mM durante dos horas. Las células K-562 fueron utilizadas como control positivo. Se observa únicamente la banda del control positivo de células K-562, no así en alguno de los tiempos de respuesta con las células U-937.

Expresión de la proteína fosforilada Stat3 en células U-937.

Basándonos en los resultados anteriores se evaluó la expresión de la proteína fosforilada STAT 3 en células U-937. Células U-937 fueron expuestas al metabolito de benceno p-benzoquinona. Se incubaron células U-937 durante dos horas con 3 μ M de p-benzoquinona tomando muestras a distintos tiempos de respuesta posteriores a la exposición. Se analizaron los extractos totales de dichas células U-937 además de K-562 con el anticuerpo P-STAT 3, sin embargo nunca se pudo apreciar un resultado contundente lo cual se atribuyo al tipo de extracto con que se realizó el experimento (datos no mostrados). Debido a esto se realizaron extractos de fracciones nucleares y citoplásmicos que anteriormente ya se habían probado y en los cuales se había podido apreciar la banda correspondiente a P-STAT 3.

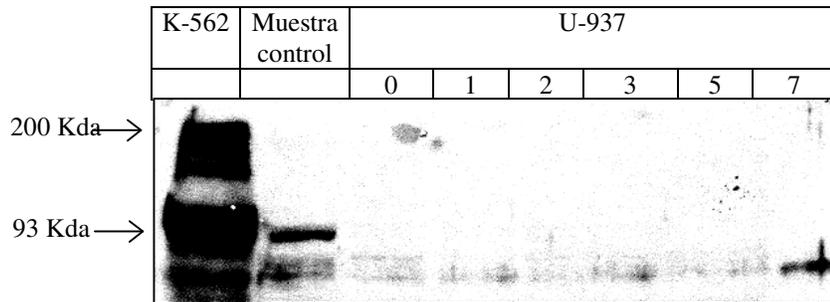


Fig. 17. La figura muestra los resultados del análisis de la expresión la proteína P – STAT 3 en extractos citoplásmicos de células U-937. Se indica sobre las imágenes el carril correspondiente al tiempo de respuesta (desde 0 hasta 7 horas) en que las muestras fueron procesadas después del estímulo con p-benzoquinona 3mM durante dos horas. Las células K-562 fueron utilizadas como control positivo. Se observa únicamente la banda del control positivo de células K-562 y en el control, no así en alguno de los tiempos de respuesta con las células U-937.

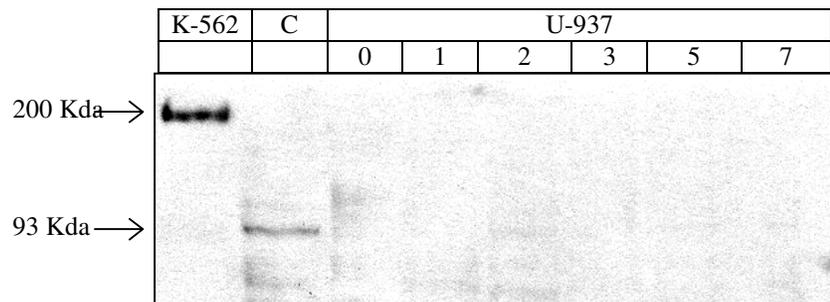


Fig. 18. La figura muestra los resultados del análisis de la expresión la proteína P – STAT 3 en extractos nucleares de células U-937. Se indica sobre las imágenes el carril correspondiente a el tiempo de respuesta (desde 0 hasta 7 horas) en que las muestras fueron procesadas después del estímulo con p-benzoquinona 3mM durante dos horas. Las células K-562 fueron utilizadas como control positivo. Se observa únicamente la banda del control positivo de células K-562 y en control, no así en alguno de los tiempos de respuesta con las células U-937.

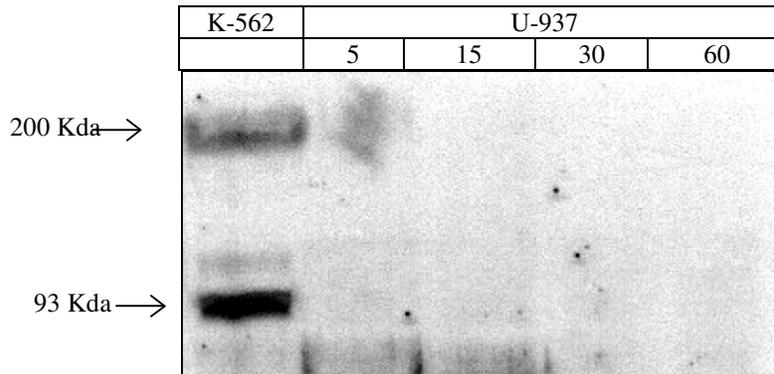


Fig. 19. La figura muestra los resultados del análisis de la expresión la proteína P – STAT 3 en extractos citoplásmicos de células U-937. Se indica sobre las imágenes el carril correspondiente al tiempo del estímulo con p-benzoquinona 3mM (desde 5 hasta 60 minutos). Las células K-562 fueron utilizadas como control positivo. Se observa únicamente la banda del control positivo de células K-562, no así en alguno de los tiempos de respuesta con las células U-937.

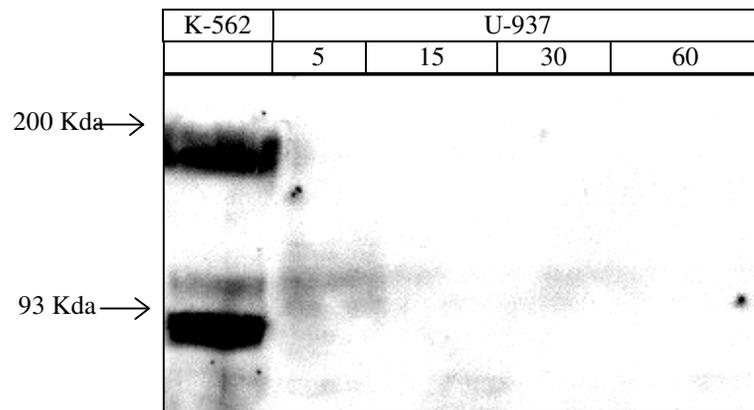


Fig. 20. La figura muestra los resultados del análisis de la expresión la proteína P – STAT 3 en extractos nucleares de células U-937. Se indica sobre las imágenes el carril correspondiente al tiempo del estímulo con p-benzoquinona 3mM (desde 5 hasta 60 minutos). Las células K-562 fueron utilizadas como control positivo. Se observa únicamente la banda del control positivo de células K-562, no así en alguno de los tiempos de respuesta con las células U-937.

CAPITULO 5. DISCUSIÓN.

Stat 3 y su expresión en personas expuestas a benceno.

El benceno ha sido ampliamente estudiado y se le ha considerado como un potencial factor de riesgo relacionado con la leucemia. Sin embargo, aunque se han tratado de establecer modelos predictivos basados en estudios de cohorte o con marcadores de exposición, diversos factores como la historia familiar, la susceptibilidad genética, e incluso la alimentación de cada individuo, hacen difícil establecer un modelo predictivo que se base en las concentraciones y frecuencia de exposición y que eventualmente se vea reflejado en enfermedades como cánceres o displasias (Crump, K.S. 1996).

Las múltiples alteraciones genéticas de protooncogenes y de genes supresores de tumores junto con diversos factores epigenéticos y factores ambientales como la exposición a benceno, contribuyen al desarrollo de padecimientos malignos. Un gran número de evidencias sugiere que protooncogenes y otros genes involucrados en el crecimiento celular como aquellos que codifican para citocinas o sus receptores pueden estar jugando un papel importante en la carcinogénesis. Este es el caso que nosotros proponemos para las proteínas Stat, ya que son factores que participan activamente en procesos como la diferenciación, proliferación y migración celular, los cuales son afectados durante el desarrollo de padecimientos como la leucemia (Biethahn, S. *et al.* 1999; Brand – Rauf, P.W. 1997; Crump, K.S. 1996; Gouilleux-Gruart, V. *et al.* 1996).

El papel que estas alteraciones podrían desempeñar en la generación de leucemia es complejo pero se ha mostrado que inducen una mayor expresión o respuesta a factores de crecimiento como GM-CSF o IL-3 (Eastmond, D. A. *et al.* 1987). Resulta interesante el hecho de que en algunos modelos animales la exposición a benceno cause una respuesta similar. Por ejemplo, en un estudio se observó que cuando un grupo de ratones fue expuesto a benceno la respuesta al factor GM-CSF fue incrementada e incluso exposiciones crónicas a altas concentraciones de este mismo compuesto indujeron desordenes mieloproliferativos (Kim, S.K. and Kim, Y.C. 1996; Tofk, K. *et al.*1982)

Sin embargo aún hoy en día no se tiene un patrón específico de protooncogenes que puedan asociarse con el desarrollo de leucemia mielógena aguda, lo que supone que múltiples productos génicos de distintas vías puedan interactuar en este padecimiento. Aunado a esto, una hipótesis con respecto a la generación de leucemia ha sido propuesta y no se relaciona con alteraciones clonales o mutaciones sino con una sobreproducción de factores de crecimiento por fibroblastos, células endoteliales y macrófagos ante microambientes y contaminantes ambientales como el benceno (Wong, O. and Raabe, G.K. 1995). Esta propuesta no descarta nuestra hipótesis de que la exposición a benceno pueda reflejarse en un incremento en la presencia de ciertas proteínas STAT como consecuencia de la exposición a benceno, ya que existe a su vez una gran cantidad de factores de crecimiento que pueden ser inducidos por estas proteínas. Sin embargo estas alteraciones o eventos podrían no siempre suceder de manera secuencial y constante (Kalf G.F. *et al.*1996; Darnell, J.E. *et al.* 1994).

La suposición de que enfermedades como la leucemia no sea un padecimiento final sino una enfermedad progresiva precedida por displasias y/o distintos patrones de anormalidades clonales, ha generado el concepto de la existencia de un estado “pre-leucémico”. Diversos estudios han establecido un patrón en el cual el desarrollo de leucemia es precedido en un 33 al 80% por un periodo de pre-leucemia con displasias que afectan uno o más tipos celulares sanguíneos y con la pérdida parcial o total de cromosomas como el 5 y el 7. Es en este último punto donde podemos enfatizar la elección de las proteínas STAT como objeto de nuestros estudios, ya que estos factores podrían ser un ejemplo de alteración, si no inicial, al menos primaria antes de una deleción cromosomal, ya que como se ha mostrado en los diversos estudios y antecedentes mencionados al inicio de este trabajo, estos factores pueden ser activados por los distintos mecanismos propuestos para mediar la toxicidad del benceno (Ward, A. C. *et al.* 2000. Smith, M.T. 1996).

Por otra parte, las deleciones totales o parciales de los cromosomas 5 y 7 son alteraciones clonales tempranas (desde el punto de vista clínico) que han sido detectadas en síndromes mielodisplásicos y leucemias agudas. En países como China se han realizado estudios donde se ha demostrado que en los linfocitos de sangre periférica de individuos expuestos a benceno ocurren aneuploidias en cierto grupo de cromosomas con un marcado efecto sobre el cromosoma 7 donde se registraron hiper e hipodiploidias con una frecuencia mayor en estos trabajadores que en los casos control (Yin, S.N. *et al.*1996; Irons, R. D. and Stillman, W. S. 1996).

El estudio que nosotros hemos realizado se enfocó en el análisis de lo que proponemos puede ser un factor inicialmente alterado en personas expuestas a benceno: los factores transcripcionales Stat 3 y Stat 5. Estos factores podrían verse alterados en su expresión de manera previa a una alteración mayor como serían los ejemplos arriba citados.

Como se mencionó en la metodología, con el propósito de obtener resultados confiables se realizaron experimentos preliminares al análisis de las muestras problema. Durante estos experimentos se eligió el método de fraccionamiento celular desarrollado por Nancy Andrews (Nucleic Acid Research 19(9):2499, 1991) el cual se consideró más adecuado debido a la calidad (claridad y definición) de las bandas correspondientes a las proteínas Stat 3 y Stat 5 observada por Western blot (datos no mostrados). Esto mismo se confirmó mediante estudios de retardamiento en gel (*Shift-assays*) que mostraron una mejor detección del complejo STAT-DNA esperado en estos ensayos (datos no mostrados).

Esto se atribuyó inicialmente al fundamento de esta metodología que se basa en una lisis hipertónica, seguida de una hipotónica, sin la necesidad de ocupar detergentes para romper la membrana celular. La elección de este método nos llevó a encontrar durante el análisis de las muestras problema, así como de las muestras de personas no expuestas a benceno resultados realmente inesperados.

El primer resultado inesperado fue detectar a la proteína Stat 3 mediante Western blot en estos extractos como una doble banda. La localización de estas bandas (núcleo-citoplasma) mostró ser variable, así como diferente en su intensidad.

La presencia de estas dos bandas podría explicarse mediante dos posibilidades: 1) es probable que con esta metodología de obtención de extractos, sea posible detectar el factor transcripcional tanto en su forma activa como inactiva; esto quiere decir que podríamos estar observando la misma proteína (Stat 3) sin fosforilar además de una variante de peso molecular originada por la fosforilación en los residuos de tirosina, y/o una fosforilación conjunta con los residuos de serina en los cuales también ha sido demostrado ocurren eventos de fosforilación (Bromberg, J.F. *et al.* 1999; Yokogami, K. *et al.* 1999; Hevehan, D. L. *et al.* 2002).

Estas fosforilaciones dobles detectadas en los factores Stat 3, pueden deberse a la respuesta del individuo a algún otro estímulo particular el cual puede tener la capacidad de activar este mismo factor (fosforilando los residuos de tirosina, serina o ambos). Se ha mostrado ampliamente que estos eventos de fosforilación son muy importantes para la actividad de la proteína Stat 3 como factor transcripcional (activador o inhibidor), y que es igualmente importante para determinar su unión a promotores de determinados genes de respuesta, así como para la formación de heterodímeros con otras proteínas Stat (Bromberg, J.F. *et al.* 1999; Yokogami, K. *et al.* 1999; Hevehan, D. L. *et al.* 2002).

La identificación de estos sitios de fosforilación en serina ha generado la idea de que existe un efecto de comunicación cruzada (*cross-talk*) entre distintas cascadas de señalización. La presencia del motivo PMSP (que contiene la serina que es fosforilada en Stat 1 y Stat 3), en las proteínas Stat 1, Stat 3, Stat 4 y Stat 5 supone que también éstas últimas pueden ser objeto de fosforilación por cinasas de serina.

Esto ha generado una gran controversia ya que hasta el momento se han identificado distintas cinasas de serina que fosforilan Stat 1 y Stat 3 dependiendo el estímulo y el co-estímulo. Los reportes al respecto han sido contradictorios ya que la fosforilación en serina no sólo parece activar la función transcripcional de las Stats, sino que en algunos casos esta función ya se encuentra presente y sólo es incrementada cuando sucede esta fosforilación. De manera interesante, algunos estudios que han empleado genes reporteros (con promotores que poseen sitios Stat) han mostrado que esta fosforilación incrementa la expresión solamente de algunos, pero no de todos los genes blanco (al menos para Stat 1) (Hevehan, D. L. *et al.* 2002; Kisseleva, T. *et al.* 2002; O'Shea J. J. *et al.* 2002; Wen, Z. *et al.* 1995).

2) También es posible explicar la presencia de esta doble banda suponiendo la existencia de isoformas del factor transcripcional Stat 3. Recordemos la existencias de Stat 3 β , una isoforma truncada y que recientemente se ha determinado que posee funciones importantes e independientes de su forma completa (Maritano, D. *et al.* 2004; Hevehan, D. L. 2002). Debido a la escasa cantidad de reportes al respecto, este punto se encuentra aún en discusión, pero definitivamente se trata de una atractiva posibilidad aún por estudiar: la activación específica de alguna isoforma de Stat 3 ante el estímulo de benceno.

Si bien se requieren análisis más extensos para determinar cuál de las posibilidades estamos presenciando, lo cierto es que nuestros resultados indican que la expresión de la proteína Stat 3 es más elevada en la forma de bajo peso molecular, lo cual se puede apreciar en la mayoría de los resultados aquí mostrados.

De manera cualitativa, el elemento más concluyente que arroja el análisis de la expresión de Stat 3 en personas expuestas a benceno, es la mayor expresión o localización de este factor en la fracción citoplásmica de las muestras analizadas, misma que contrasta con la expresión o localización preferencial en la fracción nuclear, que muestran las personas no expuestas a benceno de manera laboral. Aunque en casos aislados como las muestras 56, 58 y 59 la expresión diferencial no fue apreciable, solamente esto se observó en los 3 casos aislados referidos. Es decir, la abundancia relativa de la proteína preferencialmente en la fracción citoplásmica podría ser inducida por efecto del benceno. Al realizar un análisis detallado de los ensayos de Western blot para Stat 3, notamos la presencia frecuente de una banda de elevado peso molecular (200-400 Kda) en varias de las muestras analizadas tanto en controles como en muestras problema, y no así en la línea celular K-562 (se discute esto más adelante).

Estos datos permanecieron como datos curiosos hasta que se continuó con el análisis de la proteína Stat 3 en su forma fosforilada Tyr 705. Una vez registrados los resultados de las 60 muestras de personas expuestas a benceno se seleccionaron las muestras más representativas (considerando niveles de expresión) y fueron analizadas mediante Western blot con el anticuerpo contra la proteína Stat 3 fosforilada (P-Stat 3 Tyr 705). Resultó evidente el contraste que se obtuvo con éste anticuerpo: en los primeros resultados la banda correspondiente a P-Stat 3, desaparece en algunas ocasiones en las células K-562, no así en las muestras problema por ejemplo las muestras 36 y 38, cuando éstas fueron analizadas con el anticuerpo Stat 3 (sin fosforilar) se observa una banda de intensidad semejante en ambas muestras sin alguna expresión diferencial entre el núcleo y el citoplasma, sin embargo estos nuevos resultados (P-Stat 3) indican que la muestra 36 presenta una

importante fosforilación en la fracción nuclear de dos bandas, mientras que en la fracción citoplásmica sólo se observa una sola banda correspondiente a esta proteína con más bajo peso molecular. Para la muestra 38 no se aprecia ninguna fosforilación evidente más que una ligera expresión en la fracción citoplásmica, lo que es sumamente notable ya que en el análisis de la proteína sin fosforilar se observa que el factor está presente en esta muestra. Ahora bien, la presencia de ésta doble banda no aclara la pregunta inicialmente expuesta ¿es la doble banda una isoforma o una forma fosforilada en serina o tirosina? Para resolver esta incógnita sería necesario realizar más ensayos contra esta proteína fosforilada en serina ya que hasta el momento se sabe que las isoformas α y β son susceptibles de fosforilación en los residuos de tirosina, por lo que ambas isoformas podrían ser también visualizadas (Yokogami, K.*et al.*1999).

La razón por la cual es necesario referirse a la fosforilación selectiva (tirosina y/o serina) en estos factores y sus isoformas, radica en que si pudiéramos comprender las funciones celulares que dependen de determinada fosforilación o isoforma de Stat 3, resultaría más interesante aún observar (como se dijo antes) la posible inducción de alguna isoforma específica por benceno o bien la fosforilación de este factor en un residuo específico, lo que podría explicar mejor las alteraciones que sufren las personas expuestas a benceno.

Los receptores específicos que se relacionan con esta vía muestran una habilidad para activar específicamente sólo ciertas Stat. Por ejemplo la estimulación con Interferon- α (IFN- α) o Interferon β (IFN- β) induce la fosforilación de Stat 1 y Stat 2. En contraste la

estimulación con G-CSF lleva a la activación de homodímeros Stat 3 y Stat 5 ó heterodímeros Stat 1/3 y Stat 3/5. La capacidad de formar homodímeros y heterodímeros de Stat 3 amplía el rango de sitios de unión para estas proteínas en promotores de genes específicos; de hecho, se ha demostrado también que las Stats pueden interactuar con un amplio número de factores y coactivadores transcripcionales, lo cual ha sido utilizado para explicar como la diversidad del tipo de complejos activados contribuye a la especificidad de la respuesta dada por una citocina o un factor de crecimiento, o bien la capacidad que tiene un receptor de activar a una u otra proteína. Cabe mencionar que las distintas isoformas de Stats son expresadas de manera diferencial y específica, dependiendo del tipo celular, lo cual puede tener un impacto sobre la expresión de los genes responsivos a las Stats (Heim, M. H. 1999; O'Shea J. J. *et al.* 2002; Darnell, J.E. *et al.* 1994).

La especificidad de una respuesta dada por las Stats, también puede ser atribuida a los patrones específicos de expresión tisular y a la activación de vías adicionales o alternas por los mismos receptores. Para el caso de Stat 3 en la cual se ha demostrado que se requiere una fosforilación adicional en una serina en el dominio carboxilo para completar su activación como factor transcripcional, es probable que también se requiera de ésta fosforilación para que esta región de la proteína funcione como motivo de unión a otros factores y coactivadores transcripcionales (Wen, Z. *et al.* 1995; Maritano, D. *et al.* 2004., Hevehan, D. L. 2002).

Algunos reportes recientes nos permiten explicar algunos de los resultados que encontramos con respecto a estas bandas de alto peso molecular. Estos reportes, aunque escasos, son muy sólidos y conforman las bases para la teoría de la existencia de la vía

“*Raft-Stat signaling*”. El origen de esta teoría se debe a observaciones realizadas en infecciones virales y bacterianas en donde durante la fase conocida como “fase aguda de respuesta” son producidas muchas de las proteínas de respuesta como la “Proteína C-Reactiva” (CRP) la cual es generada en el hígado y regulada por el “factor estimulante de hepatocitos.” El factor de transcripción mayormente involucrado en la regulación del gen CRP fue identificado en 1994 resultando ser el factor de transcripción Stat 3. De manera similar el “factor estimulante de hepatocitos” resultó ser la Interleucina 6 (IL-6). Desde entonces se ha tratado de explicar ¿Cómo es posible que la señal IL-6/Stat 3 sea mantenida en hepatocitos a pesar de las elevadas temperaturas del cuerpo?

Datos obtenidos en años recientes han mostrado que muchos de los receptores a citocinas son localizados en microdominios especializados de la membrana plasmática llamados “Rafts” los cuales se caracterizan por ser sumamente ricos en colesterol y esfingolípidos, además de ser dinámicos (con movilidad en la membrana plasmática) y resistentes a la lisis con detergentes. Datos que complementan estas observaciones muestran la asociación de la proteína chaperona de choque térmico 90 (HSP90 por sus siglas en inglés) en la preservación de la señalización iniciada por IL-6 en el hígado durante el tiempo que dura la fiebre (Sehgal, P. B. 2000; 2003; Ndubuisi, M. I. *et al.* 1999).

Actualmente es ampliamente aceptado que los microdominios llamados “rafts” o “lipid rafts” representan la unidad funcional mediante la cual la señalización de las citocinas es iniciada dando origen a la hipótesis de “la vía de señalización raft-stat.” Estos microdominios organizan la membrana celular en unidades funcionales donde se co-localizan múltiples proteínas de anclaje membranal que pueden actuar como plataformas

para conducir una gran variedad de funciones celulares incluyendo la transducción de señales. Los procesos de señalización iniciados en los "lipid rafts" incluyen la señalización de la inmunoglobulina E, la respuesta Antígeno-Linfocito T, la respuesta Antígeno-Linfocitos B, así como las señalizaciones que involucran al receptor II de angiotensina, los receptores del factor de crecimiento epidermal, del factor de crecimiento derivado de plaquetas y el receptor a insulina e integrinas (Sehgal, P. B. 2000; 2003., Ndubuisi, M. I. *et al.*1999).

Gracias al desarrollo de técnicas de aislamiento de fracciones de membrana, mediante el uso de detergentes no iónicos para la lisis celular, seguida por centrifugación diferencial, ha sido posible aislar fragmentos de membrana que contienen estos microdominios. Esto se debe a que estos microdominios "rafts" son resistentes a la solubilización por detergentes no iónicos como el Triton X-100. La caracterización de esos microdominios llevó al encuentro de la proteína caveolae (Caveolin-1, 2, 3), que representa la primera proteína integral de los microdominios "raft" en ser identificada. La proteína caveolae parece estar involucrada en la formación de invaginaciones en la membrana plasmática y al igual que los "lipid rafts" han sido implicados en las vías de transducción de señales (Sehgal, P. B. 2003).

La presencia de estos microdominios de la membrana plasmática, asociados a moléculas receptoras ha sido demostrada en la membrana de células del linaje hematopoyético. Esta organización multiproteica y lipídica resistente a detergente no iónico, es claramente funcional en el contexto de la señalización entre las células T y B, y en las señales mediadas por citocinas. Datos recientes de distintos grupos de investigación

han mostrado también la localización de las proteínas cinasas Jak 1 y 2 y la cinasa Tyk2, además de los factores de transcripción Stat 1 y Stat 3 así como sus formas activas P-Stat 1 y P-Stat 3 en estos complejos. De manera interesante también se encontraron cadenas de los receptores para IL-6, IL-2, IFN- γ , IFN- α/β , TNF- α dentro de estos microdominios ‘raft’ asociados a cav-1 (Sehgal, P. B. 2000; 2003; Ndubuisi, M. I. *et al.* 1999).

Pero este no es el único cambio que se ha propuesto a la vía Jak-Stat, ya que recientemente se ha observado la asociación de proteínas chaperonas dentro de esta vía. Tradicionalmente, las proteínas chaperonas regulan la eficiencia de los procesos bioquímicos y celulares, además de proteger la continuidad y la integridad de las señalizaciones aún en etapas de estrés. Se han identificado varias proteínas entre ellas las llamadas GRP58, ER-60, ERp57 como proteínas asociadas a Stat 3, a nivel de ‘lipid raft’ en la membrana plasmática y en complejos citosólicos. En experimentos con GRP58 recombinante, el exceso de esta proteína inhibe la unión al DNA de P-Stat 3 citosólico y en experimentos de transfección, la sobre-expresión de GRP58 inhibe tanto la actividad basal como la habilidad de la IL-6 para activar la respuesta de un gen reportero de luciferasa con el promotor de Stat 3. Dicho de otra manera la proteína GRP58 puede funcionar secuestrando a P-Stat 3 en células estimuladas con citocinas. Así mismo, otra proteína llamada HSP90 fue encontrada co-precipitada utilizando un anticuerpo anti-Stat 3 en las fracciones raft-membrana y citoplásmicas. De la misma manera se encontró que las proteínas Stat 3, Cav-1 y la HSP90 interaccionan en unidades físicamente resistentes a detergentes dentro de ‘lipid rafts’ en la membrana celular y en el compartimiento citoplásmico, lo cual permitiría explicar la conservación de la respuesta IL-6/Stat 3 a

temperaturas relativamente altas, considerando que 39.5°C corresponde una temperatura febril (Sehgal, P. B. 2000; 2003).

Los elementos antes mencionados comprenden parte de lo que inicialmente fue la teoría del Statosoma, en la cual se encontró la presencia de proteínas Stat 3 en complejos de elevado peso molecular 200-400 Kda conocidos como Statosomas (lo cual coincide con nuestros resultados) y que ahora también se acopla a la teoría de la vía ‘Raft-Stat signaling’.

La expresión de este complejo de elevado peso molecular conteniendo Stat 3 fosforilada también ha sido reportada por Pravin Sehgal y colaboradores. Nuestros resultados han mostrado de manera coincidente las primeras evidencias que apoyarían la teoría de la vía ‘Raft-Stat signaling’ en leucocitos humanos.

Como se mencionó antes, atribuimos en parte estos resultados a la elección del método de fraccionamiento celular de Nancy Andrews, ya que los elementos asociados a ‘Rafs’ como pueden ser estos Statosomas en complejos que puedan o no contener a la proteínas Stat 3 fosforilada, son insolubles en soluciones con detergentes como el Triton y posiblemente el Nonidet NP-40.

Una explicación alterna que pudiera también permitirnos entender los resultados obtenidos, es que durante el transcurso del proyecto, al procesar las muestras y obtener los extractos celulares, ocasionalmente los periodos de incubación a 40C para la lisis celular fueron ligeramente sobrepasados, lo que causaba en estos casos que al tratar de separar las

fracciones celulares encontraríamos una delgada película blanca en la parte superior del sobrenadante de la fracción deseada. Suponemos que esta fracción, podría contener elementos de membrana asociados a “lipid rafts”, ya que como lo menciona Pravin Sehgal los elementos “Raft” tienen baja densidad y pueden flotar hacia la parte superior durante procesos de fraccionamiento membranar. Esto nos permitiría entender el por qué en ciertas ocasiones la proteína P-Stat 3 desaparecía o aparecía en células K-562.

El descubrimiento de los Stats organizados en Rafts, sugiere que la eficiente conducción de la señal de la membrana plasmática al citosol y de aquí al núcleo, involucra procesos de activación aún desconocidos pero que involucran a proteínas específicas que no solo pueden funcionar como proteínas de anclaje a la membrana sino también como compañeras o chaperonas de los factores transcripcionales Stat en el citoplasma. La posibilidad de la alteración o disrupción de los mecanismos de señalización Raft-Stat pueden representar el inicio patológico de un proceso maligno como el cáncer. (Sehgal, P. B. 2003)

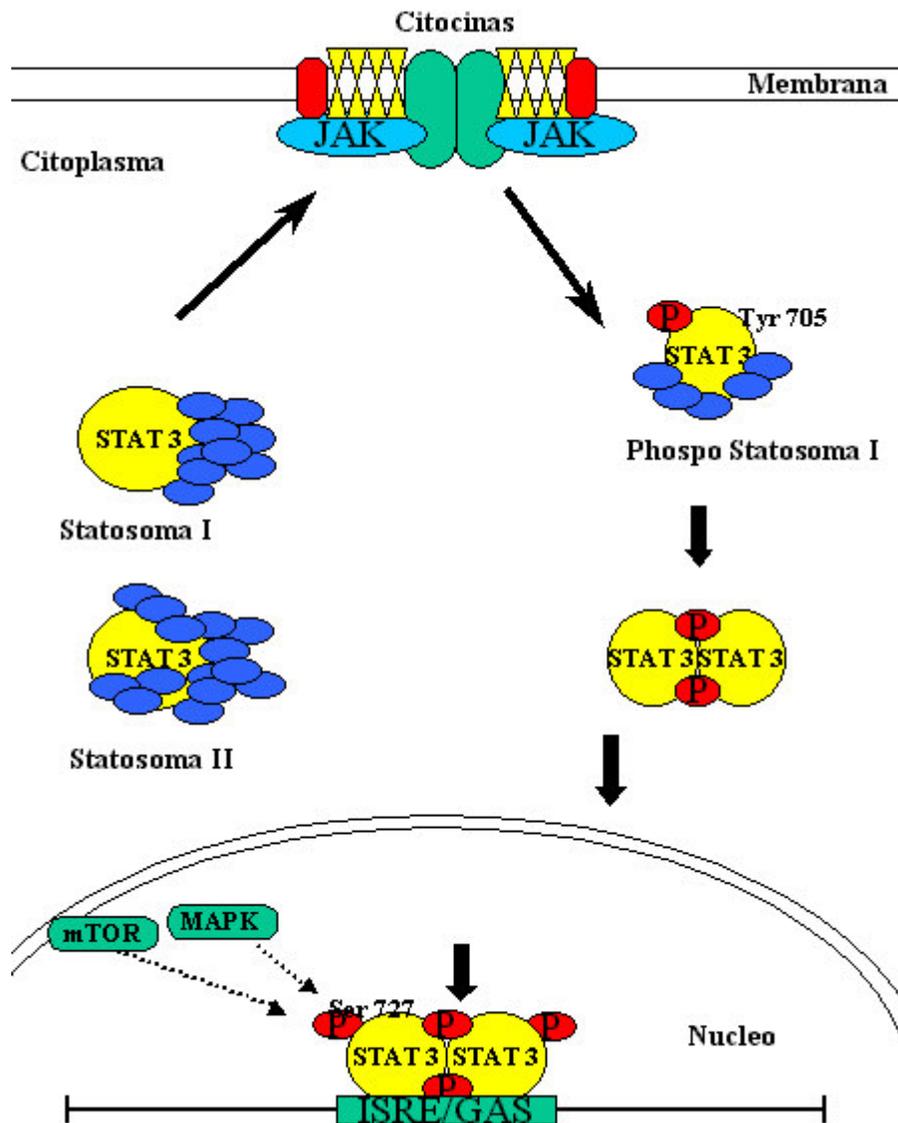


Fig. 12. Modelo de la Vía Raft-Stat. La figura se basa en el modelo propuesto por Sehgal, y que apoya nuestros resultados. A la izquierda se muestran las representaciones de los determinados Statosomas, que incluyen a la proteína Stat 3 junto con otras proteínas chaperonas en complejos de 200-400 Kda, (Statosoma I) y en complejos de hasta 1-2 Mda, (Statosoma II). También es posible notar el complejo fosfo-Statosoma I y la liberación posterior de los monómeros de Stat 3 que una vez disociados se dimerizan y translocan al núcleo donde sufren o no, fosforilaciones adicionales en la Serina 727 a través de la acción de MAPK o mTOR. En la membrana se aprecia marcada con triángulos amarillos la región correspondiente a las regiones ‘lipid Raft’ con proteínas asociados a los elementos de esta vía como pueden ser HSP90 o Cav-1, representados en rojo.

Expresión de Stat 3 inducida por p-benzoquinona

Una parte fundamental en este trabajo consistió en demostrar la inducción de proteínas Stat por metabolitos del benceno. La manera en que el benceno induce leucemia es aún tema amplio de discusión, sin embargo independientemente del mecanismo propuesto es claro que ante la exposición prolongada a benceno, existen alteraciones genéticas claramente establecidas. Sin embargo los principales agentes mediadores de la toxicidad del benceno son sus metabolitos, de entre los cuales se destaca la p-benzoquinona como uno de los metabolitos más reactivos y tóxicos (Hedli, C. C. *et al.*1996. Shen, Y. *et al.* 1996).

Fue por este motivo que decidimos utilizar dicho compuesto, ya que en estudios previos realizados por nuestro grupo hemos comprobado que un estímulo de 3 μ M p-benzoquinona es óptimo para inducir proliferación mediante la generación de especies reactivas de oxígeno en células HL-60 (datos no mostrados).

Inicialmente realizamos estos ensayos preparando los extractos celulares mediante lisis con buffer RIPA, sin embargo este método fue descartado ya que a pesar de realizar múltiples ensayos, no fue posible observar el monómero de la proteína Stat 3. Este hecho coincide con lo reportado por Ndubuisi, M. I. en 1999, por lo que decidimos probar otro método de extracción, el cual se apoya en la lisis mediante sonicación. Los resultados a partir de este momento fueron evidentes y son los mostrados en este documento.

Los datos analizados por triplicado indican que después del estímulo de 2 horas con 3 μM p-benzoquinona, es posible observar la inducción de la expresión de Stat 3 desde la primera hora, con un incremento máximo hasta las cinco horas de respuesta, y un inicio de decaimiento a las siete horas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Simon, R. A. (1998) quien observó la inducción de esta vía traduccional por especies reactivas de oxígeno. Aunque el modelo difícilmente resulta extrapolable al ser humano, es conveniente considerar que las personas que están expuestas de manera laboral a benceno, permanecen en exposición por largos periodos durante el día, por lo que se considera una exposición crónica. Considerando el tiempo que nosotros exponemos la línea celular U-937 podríamos hablar solamente de una exposición aguda, que a pesar de ser transitoria provoca efectos a mediano plazo al menos para la expresión de proteínas Stat, posiblemente como consecuencia de la activación de otras rutas metabólicas.

El análisis P-Stat 3, se realizó a los mismos tiempos evaluados anteriormente (de cero a siete horas), sin embargo no fue posible observar la proteína fosforilada. Esto nos sugiere que en caso de haber fosforilación en estas proteínas, esta modificación se pueda dar a tiempos muy cortos y que no sea mantenida a lo largo del tiempo. Para probar esto se analizaron tiempos cortos de exposición (5, 15, 30 y 60 minutos). Los datos obtenidos fueron claros: no existe fosforilación de estas proteínas ante la exposición p-benzoquinona 3 μM aún a tiempos cortos. Si bien es cierto que hemos detectado la presencia de especies reactivas de oxígeno producidas por este compuesto, esto se ha observado en la línea celular HL-60, mientras que estos ensayos fueron realizados en células U-937.

Esto indicaría además que la respuesta a metabolitos del benceno como la p-benzoquinona puede variar dependiendo del contexto y del tipo celular.

En conclusión, aunque es posible observar que la exposición al metabolito de benceno p-benzoquinona induce la expresión de proteínas Stat 3 a mediano plazo, aparentemente en estas células este compuesto no induce cambios en la fosforilación de la proteína.

Stat 5 y su expresión en personas expuestas a benceno.

Stat 5, es otro de los factores de transcripción analizados y propuesto como posible blanco debido a la exposición a benceno. Al igual que Stat 3, Stat 5 fue también analizada en extractos celulares obtenidos mediante el método de fraccionamiento de Nancy Andrews (Nucleic Acid Research 19(9):2499, 1991).

Resulta contundente que durante el análisis de las 60 muestras de personas expuestas a benceno, así como de las muestras obtenidas de personas no expuestas, no fue posible detectar a esta proteína. Debido a lo anterior esta proteína fue descartada como un marcador temprano de exposición a benceno.

Expresión de Stat 5 inducida por p-benzoquinona

A pesar de los evidentes resultados obtenidos en leucocitos de sangre periférica, no puede descartarse la posibilidad de que exista inducción de proteínas Stat 5 ante el estímulo de 3 μ M p-benzoquinona en modelos celulares en cultivo derivados de linaje hematopoyético temprano. Por esta razón, evaluamos el efecto de este metabolito del benceno en la línea celular U-937, derivada de leucemia promonocítica. Estos ensayos se realizaron con el método original de extracción que se apoya en la lisis mediante sonicación, los resultados al igual que en personas expuestas a benceno fueron nulos y son los mostrados en este documento.

Los datos analizados por triplicado indican que después del estímulo de 2 horas con 3 μ M p-benzoquinona, no existe una expresión aparente de Stat 5, ni siquiera al tiempo cero que equivale a la expresión basal antes del estímulo. Este resultado fue inesperado, ya que la presencia de Stat 5 había sido probada y demostrada por otros autores en esta misma línea celular. Sin embargo, nuestros datos concuerdan con los de Ahmed, M. (2001) quien demostró que la línea celular U-937 expresa una forma truncada en el extremo carboxilo de esta proteína, el cual por lo tanto no es detectable por anticuerpos que reconozcan esta región.

Al igual que en Stat 3, aunque este modelo de trabajo para Stat 5 es difícil de extrapolar al ser humano, no podemos descartar aún la idea de que una exposición a metabolitos de benceno pueda inducir la expresión de proteínas Stat 5.

Esta expresión podría ser transitoria y por lo tanto no ser evidente en personas que estén continuamente expuestas a benceno. Una razón adicional por la cual no podemos descartar la inducción de Stat 5 por p-benzoquinona, es que en experimentos realizados por nuestro grupo de trabajo, observamos una aparente expresión de esta proteína en la línea celular HL-60 después de su exposición a p-benzoquinona. Sin embargo estas observaciones aún deben confirmarse.

CONCLUSIONES.

Aún falta mucho por entender sobre la estructura y las funciones de esta vía de señalización, así como de las posibles relaciones entre ésta y otras rutas de transducción de señales que puedan ser estimuladas de manera simultánea dentro de las células del linaje hematopoyético. Dentro del complejo panorama de los distintos papeles que desempeñan las Stat en el crecimiento y diferenciación celular, cabe mencionar que los mecanismos por los cuales esta vía es negativamente regulada son escasamente comprendidos. Sin embargo, la aplicación de los conocimientos hasta ahora obtenidos sobre esta vía y las perturbaciones en las que se ve implicada brindan un futuro prometedor para el desarrollo de tratamientos innovadores para enfermedades hematológicas. Por ejemplo, el diseño de inhibidores específicos para las Jak o las Stats , podría tener importantes aplicaciones en el tratamiento de la leucemia aguda.

En la leucemia aguda la investigación se ha centrado principalmente en los protooncogenes que codifican para factores del crecimiento de células del linaje hematopoyético y receptores para factores de crecimiento. Las alteraciones en las interacciones de factores de crecimiento y los receptores de la membrana, interrupciones de la señalización del receptor al núcleo y los defectos en la transcripción de genes, tienen el potencial de conferirle a una célula las propiedades que le permitan escapar a los mecanismos reguladores normales. Ahora sabemos de manera concluyente que no hay algún factor único responsable de la leucemia, sino que más bien esta enfermedad es producto de una diversidad de factores etiológicos entre los que se encuentran factores genéticos y ambientales.

En conclusión podemos decir que aunque estadísticamente no podemos afirmar que existe una alteración de los niveles de expresión de la proteína Stat 3 en personas expuestas a benceno, de manera descriptiva podemos aseverar que existe una alteración en el patrón de localización de estos factores encontrados principalmente en el citoplasma en individuos expuestos a benceno, lo cual resulta contrario al analizar las muestras de la proteína Stat 3 fosforilada donde encontramos dicha proteína de manera activa en la fracción nuclear de dichas personas. A primera vista estos resultados abren la posibilidad de que estos factores puedan servir como un marcador de riesgo de exposición a benceno. Para corroborar esto, se requiere de estudios a nivel de expresión/fosforilación de proteínas, pero adicionalmente y de manera muy importante, debe tomarse en cuenta la teoría de “Raft-Stat signaling”.

Seguramente el uso de métodos finos de separación de proteínas y lisis con agentes no-detergentes sería muy útil, sin embargo, en particular el demostrar la activación de los factores transcripcionales Stat 3 en personas expuestas a benceno requiere de análisis más extensos, ya que ni siquiera por medio de ensayos de retardamiento es posible determinar con claridad que tan activo puede ser el factor transcripcional ya que la unión de la proteína a su sitio consenso sólo nos indica la cantidad de esta proteína que se encuentra dissociada de los complejos principales de activación. Es clara la evidencia creciente que sugiere de manera substancial que la mayoría, si no es que todas las respuestas Cytosina/Stat son iniciadas a nivel de los microdominios “lipid raft” en diversos tipos celulares. Si bien para el caso de Stat 5 podemos concluir que es un factor que no funcionaría como un marcador temprano de exposición, es posible que su señal se difunda a través de un modelo similar y por lo tanto aun se requiere de estudios adicionales para saber esto, lo cual es un nuevo campo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, M.; Dusanter-Fourt, I.; Dugray, A.; Dubrez, L.; Novault, S.; Bonnet, M. L.; Gisselbrecht, S.; Varet, B.; Solary, E.; Vainchenker, W.; Turhan, A. G. (2001). BCR-ABL fails to inhibit apoptosis in U937 myelomonocytic cells expressing a carboxyl-terminal truncated STAT5. *Leuk Lymphoma* 42(3):445-55.
- Ambrosio, R., Fimiani, G., Monfregola, J., Sanzari, E., Felice, N., Salerno, M.C., Pignata, C., D'urso, M., Ursini, M.V. (2002). The structure of human STAT 5 A and B genes reveals two regions of nearly identical sequence and an alternative tissue specific STAT 5 B promoter. *Gene* 285: 311 – 318.
- Bauer, H., Evangelos, Dimitriadis, E. A., Zinder, R. (1989). An in vivo study of benzene metabolite DNA adduct formation in liver of male New Zealand rabbits. *Arch. Toxicol.* 63: 209 – 213.
- Benekli, M., Baer, M. R., Baumann, H., Wetzler, M. (2003). Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* 101(8): 2940 – 2954.
- Brand – Rauf, P.W. (1997). Biomarkers of gene expression: Growth factors and Oncoproteins. *Environ. Health Perspect.* 105 (4):807 –816.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., Darnell, J.E., Jr. (1999). Stat 3 as an oncogene. *Cell* 98: 295 – 303.
- Biethahn, S., Alves, F., Wilde, S., Hiddeman, W., Spiekermann, K. (1999). Expression of granulocyte colony stimulating factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor associated signal transduction proteins of the JAK/STAT pathway in

normal granulopoiesis and in blast cells of acute myelogenous leukemia. *Experimental Hematology* 27:885-894.

- Carballo, M.; Conde, M.; El Bekay, R.; Martin-Nieto, J.; Camacho, M. J.; Monteseirin, J.; Conde, J.; Bedoya, F. J.; Sobrino, F. (1999). Oxidative stress triggers stat3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 274(25):17580-6.
- Crump, K.S. (1996). Risk of benzene-induced leukemia predicted from the Pliofilm cohort. *Environ. Health Perspect.* 104 (suppl. 6): 1437-1441.
- Darnell, J.E. Jr., Kerr, I. M., Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264(5164):1415-21.
- Douer, D., Preston-Martin, S., Chang, E., Levine, A.M. (1996). High frequency of acute promyelocytic leukemia among latinos with acute myeloid leukemia. *Blood* 87 (1):308-313.
- Eastmond, D. A., Smith, M. T., Irons, R. D. (1987). An interaction of benzene metabolites reproduces the mielotoxicity observed with benzene exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 91:85-95.
- Frantz, C. E., Chen, H., Eastmond, D. A. (1996). Inhibition of human topoisomerase II in vitro by bioactive benzene metabolites. *Environ. Health Perspect.* 104 (suppl. 6): 1319-23.
- Gilli, G., Scursatone, E., Bono, R. (1996). Geographical distribution of benzene in air in northwestern Italy and personal exposure. *Environ. Health Perspect.* 104 (suppl. 6): 1137-1140.

- Gouilleux-Gruart, V., Gouilleux, F., Desaint, C., Dreyfus, J., Groner, B., Prin, L.(1996). STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood*.87(5):1692-1697.
- Guenel, P., Imbernon, E., Chevalier, A., Crinquand-Calastreng, A., Goldberg, M. (2002). Leukemia in relation to occupational exposures to benzene and other agents: a case-control study nested in a cohort of gas and electric utility workers. *Am. J. Ind. Med.* 42(2):87-97.
- Gut, I., Nedelcheva, V., Soucek, P. (1996). The role of CYP2E1 and 2B1 in metabolic activation of benzene derivatives. *Arch. Toxicol.* 71:45-56.
- Hedli, C. C., Rao, N. R., Reuhl, K. R. (1996). Effects of benzene metabolite treatment on granulocytic differentiation and DNA adduct formation in HL60 cells. *Arch. Toxicol.* 70:135.
- Heim, M. H. (1999). The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 19(1-4):75-120.
- Henschler, R.; Glatt, H. R.; Heyworth, C.M. (1996). Hydroquinone stimulates granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro and in vivo. *Environ. Health Perspect.* 104 (suppl. 6): 1271- 1274.
- Hevehan, D. L., Miller, W. M., Papoutsakis, E. T. (2002). Differential expression and phosphorylation of distinct STAT3 proteins during granulocytic differentiation. *Blood* 99(5): 1627 – 1637.
- Hoey, T., Schindler, U. (1998). Stat structure and function in signaling. *Current Opinión in Genetics and Development* (8):582-587.

- Imada, K., Leonard, W. J. (2000). The Jak-STAT pathway. *Molecular Immunology* 37:1-11.
- Irons, R. D., Stillman, W. S. (1996). The process of leukemogenesis. *Environ. Health Perspect.* 104 (suppl. 6): 1239-1246.
- Kalf G.F., Renz J.F., Niculescu R. (1996). p-benzoquinone, a reactive metabolite of benzene, prevents the processing of pre-interleukins-1 α and 1 β to active cytokines by inhibition of the processing enzymes, calpain and interleukin-1 β converting enzyme. *Environ. Health Perspect.* 104 (suppl. 6): 1251- 1256
- Kim, S.K., Kim, Y.C. (1996). Effect of a single administration of benzene, toluene or m-xylene on carboxyhaemoglobin evaluation and metabolism of dichloromethane in rats. *Journal of Applied Toxicology* 16(5): 437-444.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., Schindler, C.W. (2002). Signal through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285: 1 – 24.
- Look, A.T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278: 1059- 1064.
- McDonald, T. A., Holland, N. T., Skibola, C., Duramad, P., Smith, M. T. (2001). Hypothesis: phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukemia. *Leukemia* 15(1): 10-20.
- Madamanchi, N. R.; Li, S.; Patterson, C.; Runge, M. S. (2001). Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21(3):321-6.

- Maritano, D. Sugrue, M. L., Tininini, S., Dewilde, S., Strobl, B., Fu, X., Murria-Tait, V., Chiarle, R., Poli, V. (2004). The STAT 3 isoforms a and b have unique and specific functions. *Nature Immunology* 5(4): 401 - 409.
- Ndubuisi, M. I., Guo, G. G., Fried, V. A., Etlinger, J. D. Sehgal, P. B. (1999). Cellular physiology of STAT3: Where's the cytoplasmic monomer? *The Journal of Biological Chemistry* 274(36): 25499-25509.
- Nimmaguda, R. R.; Snyder, R. (1995). Oxidative modifications produced in HL-60 cells on exposure to benzene metabolites. *J. Applied. Toxicol.* 15(5): 403 – 409.
- Paxton, M.B. (1996). Leukemia risk associated with benzene exposure in the Pliofilm cohort. *Environ. Health Perspect.* 104 (suppl. 6): 1431-1436.
- O'Shea J. J., Gadina, M., Schreiber, R. D. 2002. Cytokine signaling in 2002: New surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109, S121-S131.
- Raabe, G., Wong, O. (1996) leukemia mortality by cell type in petroleum workers with potential exposure to benzene. *Environ. Health Perspect.* 104 (suppl. 6): 1381 – 1392.
- Rangan, U., Snyder, R. (1997). Scientific Update on Benzene. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 837(1): 105 - 113.
- Rinsky R. A, Hornung RW, Silver SR, Tseng CY. (2002). Benzene exposure and hematopoietic mortality: A long-term epidemiologic risk assessment. *Am. J. Ind. Med.* 42(6): 474 – 480.
- Schreiber, E.; Matthias, P.; Müller, M.; Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with “mini-extracts”, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acid Research* 17(15): 6419.

- Schrenk, D., Orzechowski, A., Schwarz, L. R., Zinder, R., Burchell, B., Ingelman-Sundberg, M., Bock, K. W. (1996). Phase II metabolism of benzene. *Environ. Health Perspect.* 104 (suppl. 6): 1183- 1188.
- Sehgal, P. B. (2000). STAT-signalling through the cytoplasmic compartment. Consideration of a new paradigm. *Cellular Signalling* 12:525-535.
- Sehgal, P. B. 2003. Plasma membrane rafts and chaperones in cytokine/STAT signaling. *Acta Biochimica Polonica* 50(3): 583-594.
- Shau, K.; Halpern, J.; Hoeve, J.T.; Rao, X.; Sawyers, Ch. (1996). Constitutive activation of STAT 5 by the BCR-ABL oncogene myelogenous leukemia. *Oncogene* 13: 247-254.
- Shen, Y.; Shen, HM.; Shi, CY.; Ong, CN. (1996). Benzene metabolites enhance reactive oxygen species generation in HL60 human leukemia cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 15(5): 422-7.
- Siegel, M. (1993). Smoking and leukemia: evaluation of a causal hypothesis. *Am. J. Epidemiol.* 138: 1-9.
- Simon, R. A.; Rai, U.; Fanburg, B. L.; Cochran, B. H. (1998). Activation of the Jak-Stat pathway by reactive oxygen species. *AJP- Cell Physiology* 275(6): 1640-1652.
- Smith, M.T. (1996). The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on causes of leukaemia. *Environ. Health Perspect.* 104 (suppl. 6): 1219-1225.
- Smith, M.T.; Zhang L. (1998). Biomarkers of leukemia risk: benzene as a model. *Environ Health Perspect.* 106 (suppl. 4): 937-943.

- Smith, M.T.; Zhang L.; Wang, Y.; Hayes, R.B.; Li, G.; Wiemels, J.; Dosemeci, M.; Titenko-Holland N.; Xi, L.; Kolachana, P.; Yin, S.; Rothman, N. (1998). Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene. *Cancer Research* 58: 2176-2128.
- Snyder R., Hedli, C. C. 1996. An overview of benzene metabolism. *Environ. Health Perspect.* 104 (suppl. 6): 1165-1171.
- Tofk, K.; Olofsson, T.; Tunek, A.; Berlin, M. (1982). Toxic effects on mouse bone marrow caused by inhalation of benzene. *Arch. Toxicol.* 51:295-302.
- Trush, M. A., Kensler, T. W. (1991). An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.* 10:201-09.
- Wallace, L.A. (1996). Environmental exposure to benzene : An update . *Environ. Health Perspect.* 104 (suppl. 6): 1129-1136.
- Wang, J.; Hoshino, T.; Redner, R.L.; Kajigaya, S.; Liu, J.M. (1998). Fusion partner in t(8,21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10860-10865.
- Ward, A. C.; Touw, I.; Yoshimura, A. (2000). The Jak-STAT pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 95(1): 19 - 29.
- Wen, Z., Zhong, Z., Darnell, J.E. Jr. (1995). Maximal activation of transcription by STAT 1 and STAT 3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 85: 241 – 250.
- Wiemels, J., Smith, M.T.(1999). Enhancement of myeloid cell growth by benzene metabolites via the production of active oxygen species. *Free Radical Research.* 30: 93-103.

- Wong, O.; Raabe, G.K. (1995). Cell-Type-Specific leukemia analyses in a combined cohort of more than 208,000 petroleum workers in the United States and the United Kingdom. 1937-1989. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 21:307-321.
- Yin, S.N, Hayes, R.B., Linet, M.S. (1996). An expanded cohort study of cancer among benzene-exposed workers in China. *Environ. Health Perspect.* 104 (suppl. 6): 1339-1341.
- Yokogami, K.; Wakisaka, S.; Avruch, J.; Reeves, S. A. (1999). Serine phosphorylation and maximal activation of Stat 3 during CNTF signalling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Current Biology* 10(1): 47 – 50.
- Xia, Z., Baer, M.R., Block, A. W., Baumann, H., Wetzler, M. (1998). Expression of signal transducers and activators of transcription proteins in acute myeloid leukemia blasts. *Cancer Research* 58: 3173 – 3180.