



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

La inducción de HSP27 protege del efecto tóxico  
del acetaminofén en células de túbulo proximal

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARCELA HERNÁNDEZ RUIZ



MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**Jurado asignado**

<b><i>Presidente</i></b>	<b>HOMERO HERNÁNDEZ MONTES</b>
<b><i>Vocal</i></b>	<b>MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA</b>
<b><i>Secretario</i></b>	<b>MARCO VELASCO VELÁZQUEZ</b>
<b><i>1er suplente</i></b>	<b>MARIA EVA GONZÁLEZ TRUJANO</b>
<b><i>2do suplente</i></b>	<b>PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ</b>

**La tesis se desarrolló en:**

**Laboratorio de Farmacología Molecular, Departamento de Farmacología.  
Facultad de Medicina. UNAM**

**El presente trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto CONACYT  
50077-M. Adicionalmente, Marcela Hernández Ruiz contó con una beca  
obtenida de dicho proyecto.**

**Asesor del tema:**

**Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez**

**Sustentante:**

**Marcela Hernández Ruiz**

## ***DEDICATORIA***

Dedico esta tesis a mi padre quien ha sido un ejemplo de perseverancia. Gracias por confiar en mí y apoyarme siempre.

A mi madre por respetar y apoyar mis decisiones, por su paciencia y cariño.

A mi hermana que es también mi mejor amiga y siempre me recibe con una sonrisa.

A todos mis amigos que me acompañaron en éste camino.  
Los quiero mucho y les deseo éxito.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM y a la Facultad de Química, por darme las herramientas para formarme profesionalmente y permitirme ser parte de la máxima casa de estudios.

Al Dr. Marco Velasco por darme la oportunidad de trabajar con él y por sus enseñanzas.

Al CONACYT por otorgarme el apoyo para realizar mi tesis.

## Índice

Resumen	1
I. Antecedentes	2
1. Acetaminofén	2
1.1 Efecto terapéutico	2
1.2 Biotransformación	3
1.3 Toxicidad	5
1.4 Insuficiencia renal aguda	6
2. Citoesqueleto	8
2.1 Generalidades de la proteína actina	10
2.2 Polimerización de F-actina	11
2.3 Importancia del citoesqueleto de actina para otras proteínas	13
3. Proteínas de choque térmico	14
3.1 sHSP	17
3.2 Participación de HSP27 en la supervivencia celular ante condiciones de estrés	18
II. Hipótesis	21
III. Objetivos	22
IV. Material y métodos	23
V. Resultados	27
VI. Discusión	36
VII. Conclusiones	45
VIII. Bibliografía	46

## RESUMEN:

El acetaminofén es un analgésico-antipirético comúnmente empleado en el sector salud. Se ha demostrado que su administración por periodos prolongados o la sobredosificación (más de 10 g/ día) de este medicamento provoca daño en las células del túbulo proximal de la nefrona. El daño tubular provocado generalmente por sustancias tóxicas e isquemia evoluciona a insuficiencia renal aguda (IRA).

Con el objeto de conocer algunos cambios que sufren las células de túbulo proximal al ser incubadas con acetaminofén, se montó un modelo *in vitro* con células de la línea celular LLC-PK1. Se analizó como afecta el acetaminofén el arreglo del citoesqueleto de actina y la viabilidad celular, también se evaluó la participación de la proteína HSP27 sobreexpresada, la cual disminuye o evita los efectos citotóxicos del fármaco.

Las concentraciones tóxicas y subtóxicas de acetaminofén se obtuvieron por ensayos de viabilidad con rojo neutro. La expresión de las proteínas actina y HSP27 se determinó por "Western blot". La localización de F-actina se realizó tiñéndola con falotoxina fluorescente y la de HSP27 por inmunofluorescencia. El choque térmico se aplicó exponiendo a las células a 43°C durante 1 hora.

Se determinó que la concentración tóxica 50 en este modelo es de 11 mM. En células tratadas con acetaminofén se observó que a partir de la concentración 2 mM del fármaco los microfilamentos de actina pierden su arreglo, disminuyen en tamaño y cantidad y se agregan. Al someter a las células a choque térmico antes de tratarlas con acetaminofén se observó lo siguiente:

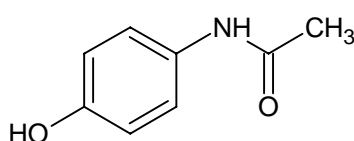
- La expresión de HSP27 se incrementa de forma apreciable
- La concentración tóxica 50 se desplaza de 11 mM a 20 mM
- La concentración a la cual se observan los cambios en el citoesqueleto de actina, descritos para células sin choque térmico, se incrementa
- La cantidad de F-actina en las células se incrementa drásticamente
- La localización de HSP27 no se modifica

De acuerdo con los resultados obtenidos, tenemos que HSP27 protege a las células de los efectos citotóxicos que ocasiona el acetaminofén, evitando la disrupción del citoesqueleto de actina e incrementando la supervivencia en células de túbulo proximal de cerdo.

# I. ANTECEDENTES

## 1. ACETAMINOFÉN

El acetaminofén (Figura 1) es un derivado del aminofenol. Su fórmula química es  $C_8H_9NO_2$  y tiene un peso molecular de 151.16 g/ mol. Este fármaco se encuentra dentro del cuadro básico de medicamentos del sector salud y se puede disponer de éste en diferentes formas farmacéuticas como tabletas, comprimidos, supositorios y solución oral.



**Figura 1.** Estructura del acetaminofén también conocido como paracetamol o N-acetil-p-aminofenol.

### 1.1 Efecto terapéutico

El acetaminofén posee propiedades analgésicas y antipiréticas, por lo que se utiliza en el tratamiento del dolor moderado, agudo y crónico. Se desconoce su mecanismo exacto de acción aunque se sabe que actúa a nivel central. Se cree que el acetaminofén aumenta el umbral al dolor inhibiendo las ciclooxygenasas en el sistema nervioso central, enzimas que participan en la síntesis de las prostaglandinas (Boutand, 2002). El acetaminofén también parece inhibir la síntesis y/ o los efectos de varios mediadores químicos que sensibilizan los receptores del dolor a los estímulos mecánicos o químicos. Los efectos antipiréticos del acetaminofén tienen lugar bloqueando la formación y salida de prostaglandinas en el centro hipotalámico regulador de la temperatura (Milton, 1976). El hecho de que el acetaminofén posea una actividad antiinflamatoria pobre se atribuye a que es un inhibidor débil de las ciclooxygenasas en presencia de altas concentraciones de peróxidos en lesiones inflamatorias.

En adultos se recomienda la administración de 250 a 500 mg cada 4 ó 6 horas. La dosis máxima no debe exceder de 2 g en 24 horas y el tratamiento no se debe prolongar por más de 5 días. En niños la dosis varía de 40 a 480 mg



según la edad y el peso corporal. También se emplea el criterio de 10 mg/ kg de peso corporal por dosis. No se deben administrar más de 5 dosis por día ni durante más de 5 días.

Tras su administración oral, el acetaminofén se absorbe rápida y completamente por el tracto digestivo. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan de 30 a 60 minutos después de la administración del fármaco; su vida media es de 2 horas. Se distribuye de manera relativamente uniforme en líquidos corporales y se une a las proteínas del plasma en un 25 %.

Del 90 % al 100 % de los metabolitos del acetaminofén se excretan por orina en las primeras 24 horas después de su administración.

## **1.2 Biotransformación**

El acetaminofén es principalmente metabolizado en el hígado por las vías de glucuronidación, sulfatación y oxidación (Lee, 1991; Miners, 1992). La vía de glucuronidación y oxidación presentan una cinética de primer orden por lo que la cantidad de acetaminofén metabolizada se incrementa cuando la concentración de acetaminofén en hígado se incrementa. La vía de sulfatación sigue una cinética de Michaelis-Menten, lo que indica que la cantidad de acetaminofén metabolizada permanece constante una vez que se ha alcanzado un nivel de saturación.

Menos del 9 % de una dosis terapéutica de acetaminofén es excretada sin cambios por la orina (Miners, 1992). De un 47 % a un 62 % del fármaco sigue la vía de glucuronidación. Los conjugados glucurónicos son inactivos y no tóxicos, son secretados en bilis y eliminados en la orina. La formación de conjugados glucurónicos es catalizada por la isoforma UGT1A6 de la glucuroniltransferasa (Court, 2001). Un 25 % a un 36 % del fármaco se conjuga con sulfato, los conjugados son inactivos y no tóxicos (Koch, 1976) y son completamente excretados por orina. Esta vía es mediada por sulfotransferasas, que son enzimas que se encuentran en citosol de la célula. Por otro lado, de un 5 % a un 8 % de acetaminofén es oxidado por el sistema enzimático citocromo P-450. La isoenzima responsable del metabolismo del acetaminofén es la CYP2E1 que forma un intermediario altamente reactivo, el

N-acetyl-p-benzoquinoneimina (NAPQI). Este intermediario es rápidamente inactivado por glutatión formando conjugados de cisteína y ácido mercaptúrico, ambos inactivos y no tóxicos (Koch, 1976) (Figura 2).

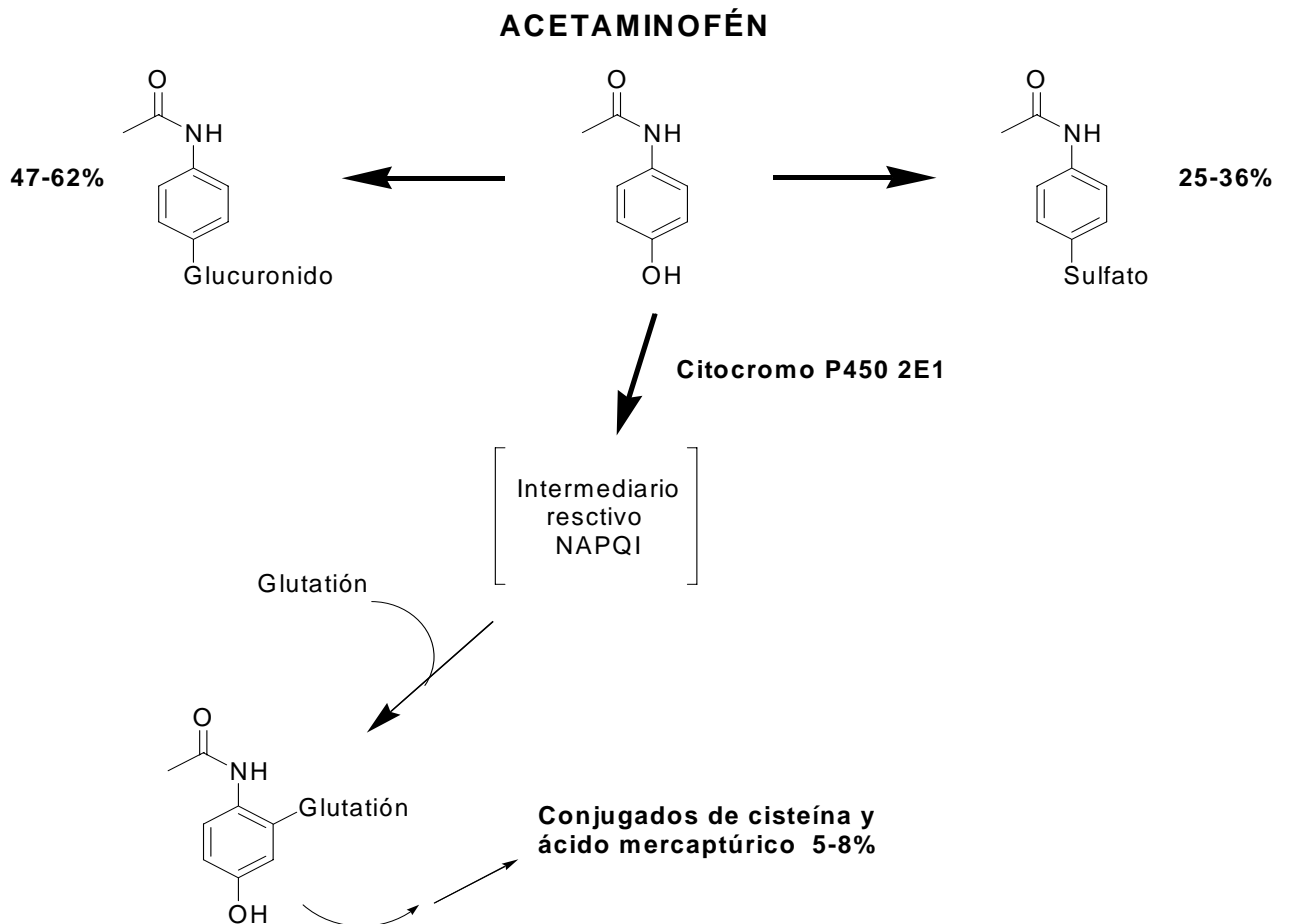


Imagen tomada de:  
[http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/briefing/3882B1\\_13\\_McNeil-Acetaminophen.htm](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/briefing/3882B1_13_McNeil-Acetaminophen.htm)

**Figura 2.** Biotransformación del acetaminofén. Las vías metabólicas por las cuales se elimina el acetaminofén son glucuronidación, sulfatación y oxidación.

### 1.3 Toxicidad

El uso continuo del acetaminofén o la sobredosis de este fármaco (más de 10 g en 24 horas) pueden ocasionar hepatotoxicidad y nefrotoxicidad. La ingestión aguda de altas dosis de acetaminofén provoca la saturación del sistema de

conjugación con sulfato. Debido a la saturación de éste sistema la fracción metabolizada por oxidación y glucuronidación se incrementa (Tabla 1), por lo que se genera mayor cantidad del metabolito intermediario NAPQI que se conjuga instantáneamente con glutatión. El NAPQI es capaz de provocar hepatotoxicidad o nefrotoxicidad después de una sobredosis si la velocidad a la cual se sintetiza excede la velocidad a la cual se conjuga con glutatión. El NAPQI que no es inactivado por glutatión, se une a proteínas en hepatocitos y células renales. Recientes análisis han demostrado que el glutatión se encuentra en cantidades suficientes en hígado para conjugarse con el NAPQI generado por CYP2E1 a dosis terapéuticas, por lo que la toxicidad no ocurre a dosis terapéuticas a menos que se modifiquen las concentraciones de glutatión (Manyike, 2000).

VÍA METABÓLICA	DOSIS TERAPÉUTICA	SOBREDOSIS
Glucuronidación	47 a 62 %	41 a 75 %
Sulfatación	25 a 36 %	9 a 16 %.
Oxidación	5 a 8 %	21 a 28 %

**Tabla 1.** Porcentaje de acetaminofén biotransformado modificando la dosis (Manyike, 2000).

Los mecanismos por el cual el acetaminofén provoca nefrotoxicidad no han sido extensamente estudiados, pero deben diferir de aquellos que inducen hepatotoxicidad. Esto se sugiere porque *in vivo* N-acetilcisteína evita daño hepático pero no la muerte por apoptosis de células de túbulo proximal. La N-acetilcisteína es un antioxidante y precursor del glutatión.

Se ha observado que el acetaminofén provoca cambios morfológicos relacionados con la apoptosis. Por ejemplo, en la línea celular MTC (células de túbulo proximal de murino) provoca condensación de la cromatina, pérdida de la asimetría de la membrana y fragmentación internucleosomal de ADN. La inducción de apoptosis causada por acetaminofén es un proceso dependiente de caspasas, como las caspasas 12, 9 y 3 e independiente del citocromo c, ya que no se observan cambios en el potencial de la membrana mitocondrial ni salida de proteínas de la mitocondria como citocromo c o Smac/DIABLO (Lorz, 2004).

#### **1.4. Insuficiencia renal aguda**

El túbulo proximal reabsorbe del 60 al 80 % de solutos y agua filtrada en el glomérulo, así como a los electrolitos sodio, potasio, bicarbonato, cloruro, fosfato, calcio y magnesio. También reabsorbe proteínas de bajo peso molecular y péptidos pequeños. Debido a la acumulación selectiva de xenobióticos, el túbulo proximal es el sitio en donde ocurre más comúnmente daño. La gran cantidad de epitelio en esta zona favorece el flujo de compuestos y su acumulación en las células (Brunton, 2006).

La nefrotoxicidad producida por efecto del acetaminofén se caracteriza por necrosis en el túbulo proximal, que si no se detecta a tiempo puede provocar insuficiencia renal aguda (IRA). La IRA se caracteriza por el deterioro de la función renal en un periodo que comprende desde horas hasta días. Cuando ocurre necrosis del túbulo proximal se incrementan los valores de BUN (nitrógeno ureico sanguíneo, por sus siglas en inglés) y creatinina plasmática, también se incrementa la excreción de sodio, potasio, glucosa urinaria, proteínas y enzimas. Por el contrario, debido al daño en el glomérulo, la GFR (velocidad de filtración glomerular, por sus siglas en inglés) disminuye (Lorenzo, 2005).

En la población derechohabiente del IMSS la IRA es la décima causa de muerte. En el grupo de personas en edad productiva (15 a 64 años) ocasiona la muerte del 3.3 % en mujeres y 3.5 % en hombres. En el grupo de edad escolar (niños y jóvenes de 5 a 14 años) ocupa el cuarto lugar de descensos provocando la muerte de 1.3 por cada 100,000 derechohabientes (IMSS, 2006).

De los pacientes que presenten el cuadro de IRA y que sobrevivan, sólo un tercio recuperará su función renal normal, otro tercio presentará una regresión parcial del cuadro con deterioro progresivo de ésta, un grupo de ellos y el grupo restante no mostrará mejoría. Una forma de reconocer la presentación de la IRA es por el desarrollo de oligoanuria. La oliguria (< 400 mL de orina/ 24 horas) o anuria (< 100 mL de orina/ 24 horas) siempre implican una forma de IRA. El diagnóstico requiere de: el análisis del BUN y creatinina, la determinación del volumen urinario, FENa (fracción excretada de sodio) y un

estudio del sedimento urinario. La urea es un producto terminal del metabolismo de las proteínas y se elimina por el riñón. El BUN es una medida de la GFR que está en relación directa con la ingestión de proteínas y el metabolismo de sustancias nitrogenadas. Debido a que la urea se filtra a través del glomérulo su concentración en plasma está en relación inversa con la tasa de formación de orina. Otra prueba para medir la GFR es la depuración de creatinina, la cual disminuye al presentarse la insuficiencia renal aguda (Jiménez, 2005). Se calcula con la siguiente fórmula:

$$DCr\left(\frac{mL}{min}\right) = \frac{UCr \times V}{PCr}$$

donde :

UCr es la concentración de creatinina urinaria en  $\frac{mg}{dL}$

PCr es la concentración plasmática o sérica de creatinina en  $\frac{mg}{dL}$

$$V\left(\frac{mL}{min}\right) = \frac{\text{Volumen de orina de 24 horas (mL)}}{1440}$$

En IRA el valor de FENa es mayor al 1 % y se calcula con la siguiente fórmula :

$$FENa = \frac{\left(\frac{[Na]_{orina}}{[Na]_{suero}}\right)}{\left(\frac{[creatinina]_{orina}}{[creatinina]_{suero}}\right)} \times 100$$

Cuando existe IRA, se observan cilindros granulosos y células tubulares renales en el sedimento urinario (Schroeder, 1991).

La insuficiencia renal se clasifica en pre-renal, renal o post-renal, de acuerdo al mecanismo que la desencadena. La insuficiencia pre-renal ocurre generalmente debido a hipotensión debido a shock y/ o deshidratación y problemas vasculares debidos a trombosis de la vena renal. Las causas que provocan insuficiencia renal son infecciones, tóxicas, medicamentos, hemólisis,

entre otras. Finalmente la insuficiencia post-renal ocurre por obstrucciones en la zona urinaria debido a medicamentos que interfieren con el vaciado normal de la vejiga, hipertrofia de próstata, cálculos renales, etc. Debido a que el daño por sobredosis de acetaminofén se efectúa en células de túbulo proximal, la IRA que se presenta comúnmente es renal (Lorenzo, 2005).

## 2. CITOESQUELETO

El citoesqueleto es propio de las células eucarióticas. Es una matriz fibrosa de proteínas que se extiende por el citoplasma entre el núcleo y la cara interna de la membrana plasmática, ayudando a definir la forma de la célula e interviniendo en la locomoción y división celular. Las principales funciones del citoesqueleto son:

- Locomoción celular
- División celular
- Movimiento de los orgánulos internos
- Regulación metabólica

Los tres sistemas primarios de fibras que componen el citoesqueleto son: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios (Alberts, 1994).

### Microtúbulos

Los microtúbulos son tubos cilíndricos de 20-25 nm de diámetro. Están compuestos de subunidades alfa y beta de la proteína tubulina. La alfa y beta tubulina se asocian y forman dímeros. En presencia de GTP, los dímeros de tubulina se unen y forman un tubo cuya parte central se mantiene vacía. Los fragmentos de microtúbulos flagelares actúan como sitios de nucleación, incrementando la velocidad de polimerización de los dímeros de tubulina.

Los microtúbulos manifiestan polaridad, un extremo tiende a la polimerización o despolimerización a mayor velocidad (extremo +) y en el otro extremo ocurre lo mismo pero a menor velocidad (extremo -). La estabilidad del ensamblaje de los microtúbulos es dependiente de la temperatura. A 4 °C los microtúbulos despolimerizan. Cuando los dímeros de tubulina son calentados a 37 °C en

presencia de GTP los dímeros vuelven a polimerizar. La polimerización también depende de la concentración de los dímeros de tubulina. A concentraciones menores a la concentración crítica los dímeros polimerizan en tanto que a concentraciones mayores a la concentración crítica éstos despolimerizan.

Entre las funciones de los microtúbulos está formar las fibras del huso para separar los cromosomas durante la mitosis y la meiosis. Cuando se disponen en forma geométrica dentro de cilios y flagelos, son usados para la locomoción (autopropulsión) o para mover líquido circundante o partículas (motilidad). Los microtúbulos se organizan a partir de centros organizadores especializados (MTOC por sus siglas en inglés), que controlan su localización y orientación en el citoplasma (Harvey, 2001).

### Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios tienen 10 nm de diámetro y proveen fuerza de tensión (resistencia mecánica) a la célula. La organización de filamentos intermedios y su asociación con la membrana plasmática sugiere que su principal función es estructural. Se cree que su función principal es proveer soporte mecánico en la membrana plasmática, la cual tiene contacto con otras células o con la matriz extracelular. No participan en la motilidad celular. A diferencia de los microfilamentos y los microtúbulos, los filamentos intermedios son muy estables. Son proteínas alfa helicoidales que se ensamblan para formar los filamentos.

La expresión de los diferentes filamentos intermedios varía de acuerdo al tipo de tejido, por lo que se encuentran clasificados en seis tipos. Por ejemplo, en células epiteliales son abundantes las queratinas ácidas (tipo I) y las queratinas básicas (tipo II), también llamadas filamentos de queratina o tonofilamentos. Las queratinas ácidas y básicas se asocian en una proporción 1:1 para formar heterodímeros que se ensamblan en filamentos heteropoliméricos. Una de las proteínas que conforma el tipo III de filamentos intermedios es la vimentina. Esta proteína es el filamento intermedio que se encuentra en mayor proporción. Se expresa en leucocitos, vasos sanguíneos, células mesenquimiales como fibroblastos y en algunas células endoteliales. Entre otras proteínas se encuentran las desmina, periferina y laminina (Harvey, 2001).

## Microfilamentos

La actina es la proteína base de los microfilamentos, son las fibras más delgadas de 3-6 nm de diámetro. La actina es una proteína con funciones contráctiles, es también la proteína celular más abundante. La asociación de estos microfilamentos de actina con la proteína miosina es la responsable de la contracción en músculo estriado. Los microfilamentos también pueden llevar a cabo movimientos en otras estirpes celulares, incluyendo desplazamiento, contracción y citocinesis (Harvey, 2001).

### **2.1 Generalidades de la proteína actina**

La molécula de actina tiene un peso molecular de 42 kDa, es un polipéptido de 375 aminoácidos y está asociado con una molécula de ATP. La actina es codificada por una familia multigénica que ha evolucionado a partir de un gen precursor común. En los mamíferos y las aves existen 6 isoformas de actina estructuralmente relacionadas, clasificadas según su patrón de expresión en 4 actinas musculares ( $\alpha$ -esquelética,  $\alpha$ -cardíaca,  $\alpha$ -vascular y  $\gamma$ -entérica), y 2 actinas no musculares ( $\beta$ -actina y  $\gamma$ -actina) (Guirado, 2002).

Las isoformas de actina que se expresan en músculo difieren entre sí en 4 a 6 aminoácidos y en 25 aminoácidos de las no musculares. En cambio, las actinas no musculares se diferencian en 4 aminoácidos en el extremo amino-terminal (Lodish, 2000). La  $\beta$ -actina es la principal isoforma de las actinas no musculares y está expresada en la mayoría de las células eucarióticas no musculares, así como en mioblastos indiferenciados (Nudel, 1983).

El gen funcional humano de la  $\beta$ -actina (ACTB) ha sido mapeado en el cromosoma 7p22 (Nayama, 1996). Está formado por 5 intrones y 6 exones. En la región no transcrita 3' no aparecen intrones en el humano; sin embargo, la región no transcrita 5' presenta un largo intrón (intrón I), 6 nucleótidos hacia adelante del codón de iniciación. El gen de la  $\gamma$ -actina (ACTG1) se halla localizado en el cromosoma 17q2512 y presenta una elevada homología estructural con el de la otra actina no muscular. Está formado por igual número de intrones y exones, también el intrón I es el más largo y se encuentra ubicado



en la misma posición. Tal similitud estructural indica que ambos genes se originaron por duplicación génica de un gen ancestral común (Erdo, 1998).

Los ARNm de ambas actinas no musculares se hallan segregados dentro de la misma célula, y aunque existe coexpresión, está sujeta a regulación diferencial e independiente para cada isoforma en los diferentes tipos celulares. Se ha demostrado que el ARNm de la  $\beta$ -actina se localiza en las regiones periféricas móviles y la región perinuclear, mientras el ARNm de la  $\gamma$ -actina sólo se asocia con la región perinuclear, lo que implicaría una señal de localización que es única para la isoforma  $\beta$  y podría reflejar procesos relacionados con la motilidad celular (Hill, 1993; Hoock, 1991).

## **2.2 Polimerización de F-actina**

El monómero es conocido como G-actina o actina globular, que se polimeriza o se enrolla entre sí formando una proteína filamentososa con estructura cuaternaria (F-actina). Para que se lleve a cabo la polimerización, los monómeros de G-actina se deben agregar para formar oligómeros estables de tres o cuatro subunidades. Los oligómeros se elongan para formar F-actina por adición de más monómeros en ambos extremos. A medida que los microfilamentos de F-actina aumentan, la concentración de G-actina decrece hasta alcanzar un equilibrio llamado estado estacionario. En estado estacionario los monómeros de actina se intercambian con subunidades en los extremos de los microfilamentos sin haber un cambio neto en la concentración de G-actina o F-actina dentro de la célula.

Generalmente, los monómeros de G-actina están unidos a una molécula de ATP. Después de que son incorporados a los microfilamentos el ATP es hidrolizado a ADP. Como resultado de la hidrólisis, la mayoría de los microfilamentos están formados por F-actina-ADP. Sin embargo, la hidrólisis de ATP no es necesaria para que ocurra la polimerización, ya que se conoce que G-actina unida a ADP o a ATP no hidrolizable es capaz de polimerizar a F-actina.

La actina presenta polaridad. Tiende a polimerizarse (alargarse) a gran velocidad por un extremo + y a despolimerizarse (acortarse) por el extremo – (Harvey, 2001) (Figura 3).



Imagen tomada de:

Harvey L et al., 2001. Molecular cell biology. 4ª ed. New York: Freeman, 762.

**Figura 3.** Fases de la polimerización de G-actina. Durante la nucleación los monómeros de G-actina forman complejos de actina lentamente. Los núcleos formados se elongan por adición de subunidades en ambos extremos, esta adición ocurre a mayor velocidad en el extremo (+). Cuando se llega a un equilibrio entre G-actina y F-actina, los monómeros de actina se intercambian con subunidades en los extremos de los microfilamentos sin haber un cambio neto en su concentración dentro de la célula, a lo que se le llama estado estacionario.

De acuerdo a su distribución, los microfilamentos de actina se clasifican en transcelulares (atraviesan el citoplasma en todas las direcciones) y corticales (por debajo de la membrana plasmática). Desempeñan las siguientes funciones:

- Intervienen en la contracción muscular al asociarse a filamentos de miosina y otras proteínas
- Intervienen en los procesos de fagocitosis
- Forman el anillo contráctil que da lugar a la separación de las células hijas durante la mitosis
- Refuerzan la membrana plasmática, formando por debajo de la misma una densa red de filamentos conocida como *cortex celular*

El ensamblaje de la actina del citoesqueleto está regulado a múltiples niveles, incluida la organización monomérica de la actina dentro del polímero y la superorganización de los polímeros de actina en una red de filamentos. Un gran número de proteínas de unión a la actina regulan el ensamblaje y

controlan la formación de los microfilamentos y el entrecruzamiento de la red de actina (Shelden, 2002).

### 2.3 Importancia del citoesqueleto de actina para otras proteínas

El correcto ensamblaje del citoesqueleto de actina es necesario para el funcionamiento a una variedad de proteínas que se asocian a éste. Por ejemplo, FAK (cinasa de adhesión focal, por sus siglas en inglés) es una proteína que se relaciona con la formación de adhesiones focales.

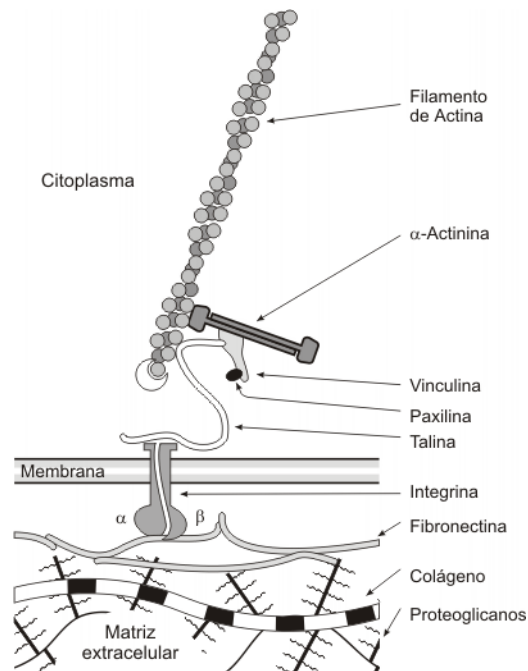


Imagen tomada de:  
<http://www.genomasur.com/lecturas/Guia06.htm>

**Figura 4.** Integración del citoesqueleto con la matriz extracelular (MEC). Las integrinas que atraviesan la membrana plasmática, por uno de sus extremos se unen a moléculas de la MEC, en este caso fibronectina. Por el lado intracelular, se unen al citoesqueleto. La unión al citoesqueleto esta formada por el agregado molecular complejo (adhesión focal).

Las adhesiones focales se conforman por integrinas y otras proteínas que conforman a la ECM (matriz extracelular, por sus siglas en inglés), que se unen al citoesqueleto para efectuar procesos como la adhesión, extensión y migración celular.

La activación de la FAK por fosforilación en su residuo de tirosina, se asocia a ECM o factores de crecimiento. FAK también regula la expresión de las GTPasas Rho, que

controlan la formación y el desensamblaje de estructuras formadas por actina como fibras de estrés, lamelipodios y filipodios (Mitra, 2005).

La función de las integrinas depende en gran parte de su unión con el citoesqueleto de actina. Las integrinas se acumulan en adhesiones focales y matrices de unión extracelular. Por sus dominios extracelulares se unen a las fibras de colágeno a través de una proteína adhesiva, la fibronectina o laminina. Por sus dominios citosólicos se une a los filamentos de actina a través de un conjunto de proteínas ligadoras, como la talina, vinculina, paxilina y  $\alpha$ -actinina. La unión de las integrinas es dependiente de calcio y magnesio (Figura 4).

Las caderinas se encuentran principalmente en sitios de unión célula-célula. Se conectan al citoesqueleto de actina a través de las cateninas. La actividad de las cateninas  $\alpha$  y  $\beta$  es regulada por su fosforilación, que es necesaria para la actividad de unión homofílica de las caderinas con otras proteínas (Ruoslahti, 1996).

En éste estudio se hace énfasis en el citoesqueleto de actina ya que en nuestros experimentos se tiñó F-actina para conocer los cambios que provocan diferentes concentraciones de acetaminofén y/ o la exposición de las células a choque térmico.

Debido a la abundancia de actina en el citoesqueleto y a su relación con otras proteínas como integrinas y caderinas (proteínas de adhesiones focales) cuya función es primordial para la supervivencia de la célula, en diversas publicaciones se analiza su arreglo y se emplea como parámetro para conocer el estado de éstas.

### **3. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO**

Las proteínas de choque térmico (HSP) son un grupo de proteínas de estructura altamente conservada, cuya transcripción es activada en respuesta a diversos tipos de estrés celular (Beere, 2004). Constituyen un amplio conjunto proteico que se localiza en prácticamente todas las células vivas desde procariontes hasta eucariontes, existiendo una estrecha similitud entre HSP de bacterias y humanos (Schlesinger, 1990).

El primer estímulo descrito capaz de provocar aumentos en la expresión de HSP y que además dio nombre a tales proteínas, fue la exposición celular a incrementos en su temperatura normal. La respuesta de choque térmico fue descubierta por Ritossa en 1962 cuando se observó en las glándulas salivales de *Drosophila* que a una temperatura de 25-30 ° C se promovía la expresión de determinados genes hasta entonces desconocidos (Park, 2005). Los productos de este fenómeno fueron entonces identificados como un grupo de proteínas a las que se les nombró HSP. Otros estímulos capaces de generar la sobreexpresión de proteínas de choque térmico son: metales pesados, agentes sulfhidrilo, alcoholes, oxidantes, algunos fármacos, exposición a algunas hormonas, situaciones de isquemia, estados de anoxia, hiperoxia, radiaciones ultravioleta, factores de necrosis tumoral, entre otros (Pivovarova, 2007).

Las HSP se encuentran en casi todos los compartimentos de la célula como lo son citoplasma, mitocondria, núcleo, nucleolo, retículo endoplásmico y membrana (Welsh, 1996). El nivel de expresión de HSP en células de diferentes tejidos es variable.

Las funciones principales de las HSP durante el estrés celular son:

- i) inhibir la agregación de los monómeros de actina una vez desnaturalizada la proteína
- ii) inhibir el proceso de apoptosis, modulando las cascadas intrínseca y extrínseca a través de una regulación negativa en uno o más puntos en múltiples cascadas de señalización

En mamíferos, algunas HSP son expresadas de manera constitutiva en determinadas estirpes celulares, ayudando a mantener el estado de homeostasis facilitando el transporte, plegamiento y ensamblaje de polipéptidos (Haley, 2000).

Ante una determinada situación de estrés celular, las proteínas intracelulares pueden sufrir desnaturalización e inactivación, por lo que las HSP aumentan dramáticamente su expresión y síntesis para reconocer tales proteínas desnaturalizadas y tras unirse a ellas, conducir las hacia la adquisición de una nueva estructura terciaria, oligomerización y translocación a distintos compartimentos intracelulares, o degradación lisosómica y secreción de los productos proteicos afectados. De este modo, se ha llegado a considerar a las

HSP como análogos de las enzimas reparadoras del ADN, jugando un papel similar en la reparación de proteínas (Kozutsumi, 1988).

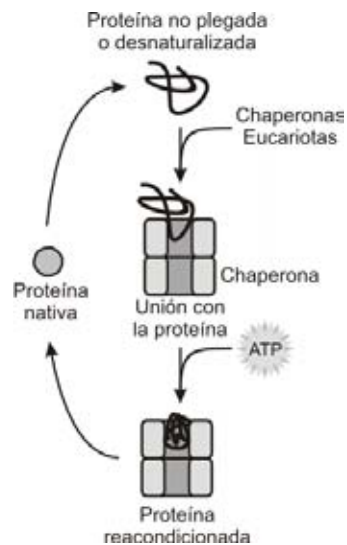


Imagen tomada de:  
<http://www.genomasur.com/lecturas/Guia06.htm>

**Figura 5.** Modelo de la actividad reparadora de las chaperonas sobre las proteínas desnaturalizadas.

La actividad de chaperonas de las HSP que contienen un dominio de ATPasa (HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 y HSP100), está regulada por medio de una reacción cíclica de unión e hidrólisis de ATP (Buchberger, 1995) (Figura 5).

Cuando las HSP se encuentran unidas a ATP, muestran una baja afinidad a otras proteínas; esto es, la unión y disociación a proteínas es rápida. Cuando las HSP están unidas a ADP la unión a proteínas se realiza lentamente pero con mayor estabilidad (Palleros, 1994). Esta reacción de interconversión entre la forma unida a ADP y la forma unida a ATP, es estabilizada por diversas co-chaperonas (Beere, 2004).

La activación de HSP durante condiciones de estrés celular va acompañada de una represión en la síntesis general de proteínas y mRNA, esto es importante porque puede constituir un mecanismo por medio del cual se reduce el riesgo de aumentar el número de proteínas en el interior de la célula que puedan desnaturalizarse durante el estrés celular (Cuesta, 2000).

Las proteínas de choque térmico están divididas en diversas familias de acuerdo a su tamaño, función y estructura. Una clasificación de las HSP considera la existencia de 6 familias: sHSP (proteínas pequeñas de choque térmico), HSP40 (proteínas de dominio J), HSP60, HSP70, HSP90 y HSP 100

(Westerheide, 2005). En éste estudio se realizó el análisis de una sHSP. En la familia de las sHSP actualmente se conocen 9 miembros: HSP27, HSP20, HSPB3, HSPB2 (ó MKBP), HSPB8 (ó HSP22), HSPB9, cvHSP (ó HSPB7),  $\alpha$ A-cristalina y  $\alpha$ B-cristalina (Kappe, 2001; Kappe, 2003; Krief 1999).

### 3.1. sHSP

Las proteínas de la familia sHSP se encuentran distribuidas en todo el organismo: HSP27,  $\alpha$ B-cristalina, HSP20, cvHSP y HSPB9 se encuentran abundantemente expresadas en músculo esquelético y corazón. HSP27, HSP20 y  $\alpha$ B-cristalina también están presentes en riñones, vejiga, pulmones, estómago y piel (Krief, 1999; Benndorf, 2001; Kappe, 2001).

La familia de las sHSP se caracteriza por tener una estructura diferente al resto de las HSP. En lugar del dominio ATPasa presente en el resto de las HSP, las sHSP poseen un extremo amino de 24 a 247 residuos, que posee la secuencia WDPF (Van Montfort, 2001). En el carboxilo terminal, las sHSP poseen una región homóloga conocida como dominio  $\alpha$ -cristalino, de 80 a 100 residuos de largo (Jong 1998). El dominio  $\alpha$ -cristalino está conformado por una estructura supersecundaria característica, compuesta de varias láminas  $\beta$  antiparalelas colocadas en forma de sándwich (Van Montfort 2001), éstos son importantes ya que son capaces de mediar la formación de oligómeros (Kim, 1998). Se ha observado que en las sHSP los dominios hidrofóbicos presentes en el carboxilo terminal y la secuencia WDPF del extremo amino, son críticos para la oligomerización (Studer, 2002; Van Montfort, 2001). Ambos extremos de las sHSP son flexibles, lo que les confiere gran estabilidad. Se ha demostrado que las sHSP forman oligómeros de diferentes longitudes y masa total de 140 a 800 kDa, con estructuras dinámicas que intercambian subunidades constantemente (Sobott, 2002). Las estructuras cuaternarias predominantes en los oligómeros de sHSP se conforman de 12 subunidades y son de 2 tipos: tetraédrico (esférico) hueco y de barril (Van Montfort, 2001). El comportamiento dinámico de las sHSP permite a los sitios de unión al sustrato, contenidos en el interior del complejo, quedar expuestos en la superficie y de esta manera, ser capaces de interactuar con un número diverso de proteínas (Giese, 2002). Por ejemplo,

HSP27 interacciona con otras sHSP como  $\alpha$ B-cristalina, HSP20 y HSP22 (Benndorf, 2001) y con las proteínas Ubc9, PASS1 y Daxx (Charette, 2000).

Otra característica importante de las sHSP es que presentan residuos de serina (ser15, ser78 y ser82) susceptibles a ser fosforilados. Por ejemplo, la fosforilación de HSP27 se inicia con la activación de la cascada de la MAPK p38, quien a su vez fosforila a las cinasas MAPK-2 y MAPK-3, responsables directas de la fosforilación de la sHSP (Landry, 1995). La fosforilación de las sHSP es muy importante en la regulación de su actividad. La activación de la cascada de MAPK p38, responsable de la fosforilación de las sHSP, es un evento subsecuente a la activación de las GTPasas Rac y Cdc42; lo cual indica una posible conexión entre la fosforilación de las sHSP y los rearrreglos en el citoesqueleto (Guay, 1997). La introducción de moléculas de HSP27 no fosforilables (mutadas) en células sometidas a estrés oxidativo, no produce ningún efecto protector (Huot, 1997).

### **3.2 Participación de HSP27 en la supervivencia celular ante condiciones de estrés**

Cuando una célula está estresada, ocurre una reorganización rápida del citoesqueleto acompañada de un incremento en la síntesis de diversas HSP. En una situación de estrés los microtúbulos se desensamblan, los filamentos intermedios se colapsan hacia la región perinuclear y los microfilamentos de actina se desorganizan (Shelden, 2002). Las sHSP parecen desempeñar un papel importante en la mantención de la integridad de los microfilamentos y los filamentos intermedios. Las sHSP participan en la protección de los microfilamentos de actina neutralizando las proteínas que los dañan y que son inducidas por el estrés celular. La actividad de protección del citoesqueleto se diferencia de su función como chaperonas debido a que en este caso, la acción la ejercen los diferentes monómeros de sHSP, mientras que la función de chaperonas requiere de una conformación multimérica.

La proteína HSP25, homóloga de HSP27 en ratones y originalmente nombrada proteína IAP (inhibidora de la polimerización de actina, por sus siglas en inglés), es capaz de inhibir el acoplamiento de los microfilamentos previniendo la adición de monómeros (Miron, 1991), sin embargo HSP27 no ejerce ningún



efecto sobre la desnaturalización de actina (Schneider, 1998). HSP27 sólo previene la disrupción del citoesqueleto de actina, tras un evento de estrés (Concannon, 2003). La sobreexpresión de HSP27 incrementa la polimerización de los microfilamentos de F-actina en la corteza, lo que resulta en migración celular y acumulación de fibras de estrés. También se ha demostrado que la tasa de supervivencia de las células que sobreexpresan HSP27 se ve incrementada como resultado de la estabilización de los microfilamentos de actina y su rápida recuperación (Mounier, 2003).

Se ha observado que una disminución en los niveles de HSP27 provoca desorganización del citoesqueleto e inhibición del crecimiento (Mairesse, 1996). A pesar de que se ha comprobado que existe una interacción entre las sHSP y actina, no se ha encontrado ninguna similitud en la secuencia o estructura que sugieran cual es el sitio de unión entre ambas proteínas. La habilidad de HSP27 de reparar proteínas desnaturalizadas puede incrementar la tasa de supervivencia de la célula, limitando el número de proteínas en mal estado que pueden desencadenar la apoptosis (Concannon, 2003).

HSP27 protege ante las ROS (especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés) generadas tras la estimulación con  $TNF\alpha$  y ante el estrés oxidativo provocado por peróxido de hidrógeno o menadiona, incrementando los niveles celulares de glutatión y modulando el potencial redox de la célula. (Mehlen, 1996).

HSP27 y otras HSP inhiben la formación del complejo del apoptosoma, regulando negativamente la actividad de las caspasas 9 y 3. HSP27 interactúa directamente con el citocromo c (Bruey, 2000), previniendo la oligomerización del componente del apoptosoma Apaf-1 y regulando negativamente la activación de la pro-caspasa 9. También se ha comprobado que HSP27 es capaz de inhibir la cascada de apoptosis iniciada por la unión de ligandos al receptor Fas (Mehlen 1996). Este efecto lo logra por medio de 2 mecanismos: la interacción con procaspasa-3 y Daxx. La interacción de HSP27 con la procaspasa-3 previene su activación. La unión de HSP27 con Daxx inhibe su interacción tanto con el receptor de Fas como con Ask 1 (Charette, 2000). Estudios recientes han implicado a HSP27 en la modulación de la apoptosis dependiente de Bid. Bid es cortada por medio de la caspasa-8 para generar Bid truncado (tBid), el cual favorece la salida de factores pro-apoptóticos de la

mitocondria de manera dependiente a Bax. Este evento integra las cascadas intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis. La supresión en la translocación de Bid provocada por HSP27 se correlaciona con la inhibición de la salida del citocromo C (Gabai, 2002) (Figura 6).

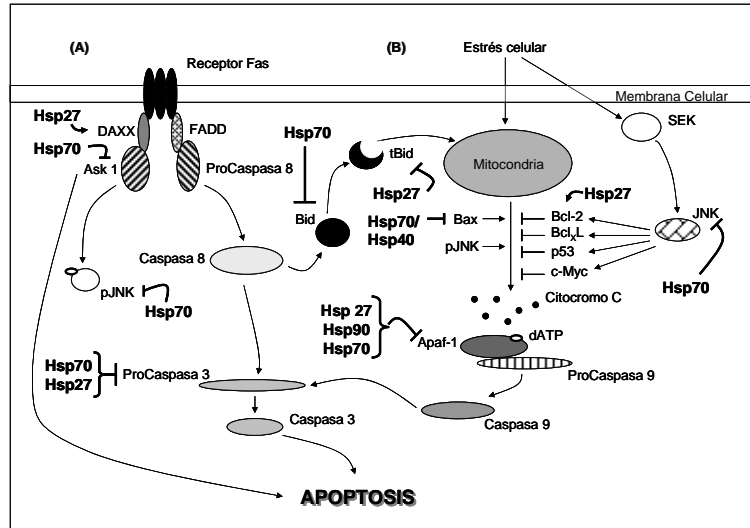


Imagen tomada de:  
 Gabai VL et al., 2002. Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 22: 3415-3424.

**Figura 6.** Inhibición de los componentes de las cascadas extrínseca (A) e intrínseca (B) de la apoptosis a través de HSP. Además de HSP27, otras HSP pueden regular diferentes etapas del proceso apoptótico.

En el estudio descrito a continuación, se evaluó la participación de HSP27 en la supervivencia de las células de túbulo proximal de cerdo, así como su relación con el arreglo del citoesqueleto de actina al tratar a las células con acetaminofén, un fármaco que provoca daño renal al consumirlo de forma aguda o por sobredosis.

## **II. HIPÓTESIS**

La sobreexpresión de HSP27 provocada por el choque térmico en células de la línea celular LLC-PK1, incrementará la supervivencia de las células cuando sean tratadas con acetaminofén.

### III. OBJETIVOS

#### Objetivos generales.

- Estudiar la participación de HSP27 en la supervivencia de células LLC-PK1 tratadas con acetaminofén.
- Evaluar el efecto del choque térmico en el arreglo del citoesqueleto de actina de células tratadas con acetaminofén.

#### Objetivos particulares.

- Montar un modelo *in vitro* con la línea celular LLC-PK1 para determinar las concentraciones tóxicas y subtóxicas del acetaminofén.
- Evaluar la expresión de HSP27 en células tratadas con acetaminofén.
- Evaluar la expresión de HSP27 en células con choque térmico y posteriormente tratadas con acetaminofén.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de HSP27 en la viabilidad celular.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de HSP27 en el arreglo del citoesqueleto de actina en células con y sin tratamiento con acetaminofén.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

- **Material biológico.**

Se empleó a línea celular LLC-PK1 que corresponde a células de túbulo proximal de cerdo. Éstas se cultivaron en medio D-MEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (10 %) y neomicina (0.5 %), estreptomycin (0.25 %) y penicilina (0.25 %) (Gibco) en cajas de cultivo de 80 cm<sup>2</sup> de área (Nunc). Las células se mantuvieron en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a una temperatura constante de 37 °C en una incubadora (NUAIRE).

Las células se cosecharon con tripsina (0.05 %)/ EDTA(0.5 mM) (Gibco). Una vez que las células se tuvieron en suspensión, se tomó una alícuota de ésta y se diluyó 9/ 10 con azul tripán (0.4 %). Las células en suspensión se contaron en una cámara de Neubauer y se evaluó su viabilidad por la exclusión de azul tripán. Este colorante permite distinguir entre las células vivas y las muertas porque ingresa al interior de las células que han perdido la permeabilidad selectiva de la membrana tiñéndolas de azul. Para realizar los experimentos abajo descritos se utilizaron cultivos con viabilidad mayor o igual al 95 %. En todos ellos las células se sembraron a una densidad de 45,000 células/ cm<sup>2</sup> que corresponde a un 70 % de confluencia. En los experimentos en los cuales las células se sometieron a choque térmico, éstas se sembraron y una vez adheridas se incubaron a una temperatura de 43 °C durante 1 hora.

- **Ensayos de citotoxicidad.**

La determinación de las concentraciones tóxicas y subtóxicas de acetaminofén se realizó mediante el ensayo de acumulación de rojo neutro. Las células se sembraron en placas de 96 pozos (Nunc). Una vez que las células se adherieron a la superficie de los pozos se adicionó el fármaco a las concentraciones de 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5.0, 10, 20 o 40 mM. Después de transcurridas 24 horas se adicionó una solución del colorante rojo neutro a una concentración final de 50 µg/ mL en PBS y se incubaron durante 90 minutos a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró cuidadosamente el colorante que no se introdujo a las células empleando una micropipeta multicanal. Las células se fijaron con una

solución de cloruro de calcio (0.1 %)/ formaldehído (0.5 %). La solución se decantó y finalmente el colorante se solubilizó con una solución de ácido acético (1 %)/ etanol (50 %). La absorbancia del color que se desarrolló en los pozos se leyó a la longitud de 570 nm.

Los resultados fueron analizados a través del programa GraphPad Prism 4.0. Para normalizar los datos se tomó como el 100 % de las células vivas al promedio de absorbancias de pozos con células sin tratamiento.

- **Obtención de lisados celulares y cuantificación de proteína total.**

Las células se sembraron en cajas de 6 pozos (Nunc) y una vez adheridas se adicionó acetaminofén a las concentraciones de 0.4, 2 o 10 mM. A las células de los controles no se adicionó acetaminofén, sólo se incubaron con medio D-MEM. Para dar tratamiento a las células se eligió la concentración 0.4 mM porque es una concentración subtóxica, 2 mM porque es una concentración subtóxica límite y 10 mM porque es una concentración cercana a la concentración tóxica 50.

Por cada concentración de fármaco se obtuvieron lisados, antes de la aplicación del choque térmico (tiempo -1), inmediatamente después del choque térmico (tiempo 0) y después de 1, 3, 6, 12 y 24 horas después de su incubación con acetaminofén.

Las células se lisaron con 200 µL de buffer de lisis (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 1 %, NP-40, 1 mM DTT, 5 % glicerol, 5 mM de EDTA, 1 mM de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF), 1 mM o-vanadato, 1 µg/ mL de pepstatina A, leupeptina y aprotinina y 10 mM NaF). Cada lisado se depositó en un tubo Ependorff, se incubó en hielo durante 10 minutos y después se centrifugó durante 8 minutos a 13,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se conservó a -4 °C hasta su utilización.

La cuantificación de proteína total en los lisados se realizó mediante el método de Bradford. Los reactivos empleados son de BioRad y la metodología que se utilizó es la indicada por los fabricantes. Para conocer la concentración de proteína total se realizó una curva patrón con albúmina, en la que se interpolaron las lecturas de los lisados.

- **“Western blot”**

De cada lisado se tomó el volumen que contenía 25 µg de proteína total y se depositó en los pozos de un gel de acrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El gel se corrió en una cámara húmeda a 15 mA durante 2 horas y posteriormente se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore). La membrana se bloqueó con una solución de albúmina (1 %) durante 1 hora, a temperatura ambiente y con agitación constante. Después se incubó con los anticuerpos primarios anti-HSP27 hecho en ratón (IgG monoclonal, Santa Cruz Biotechnology) o anti-actina hecho en ratón y por último con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa. Al término de cada incubación con los anticuerpos la membrana se lavó tres veces con una solución de PBS/ Tween 20 (0.5 %) durante 10 minutos. El anticuerpo secundario se detectó por quimioluminiscencia y se reveló con el kit Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las membranas se expusieron a placas de autoradiografía (Kodak) y las bandas de interés se analizaron con el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

- **Tinción con falotoxina fluorescente.**

Para analizar el contenido de microfilamentos de actina se sembraron las células en portaobjetos con pozos desmontables (Nunc). Una vez que las células se adherieron al pozo se adicionó el acetaminofén a las concentraciones de 0, 0.4, 2 o 10 mM. En los experimentos que así se requirió las células se sometieron a choque térmico antes de la adición del acetaminofén. Después de 24 horas de exposición al fármaco se retiró el medio y se lavaron los pozos repetidamente con PBS. Las células se fijaron con formaldehído (3 %) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar las células con PBS se permeabilizaron adicionando Tritón X-100 (0.1 %) durante 5 minutos. Posteriormente las células se lavaron y se expusieron a 1 U/ mL de la solución con faloidina-Alexa 488 y se dejaron incubar durante 1 hora a temperatura ambiente protegidos de la luz. Posteriormente se lavó abundantemente con PBS y finalmente se adicionó una

solución de glicerina (DABCO 2 g, Glicerol 90 mL, PBS 10 mL) y se montó un cubreobjetos sellándolo por los extremos con barniz.

Para tener evidencia de los cambios observados en el citoesqueleto de actina se tomaron fotografías empleando un microscopio de fluorescencia (Nikon modelo Eclipse 600).

- **Detección de HSP27 por inmunofluorescencia.**

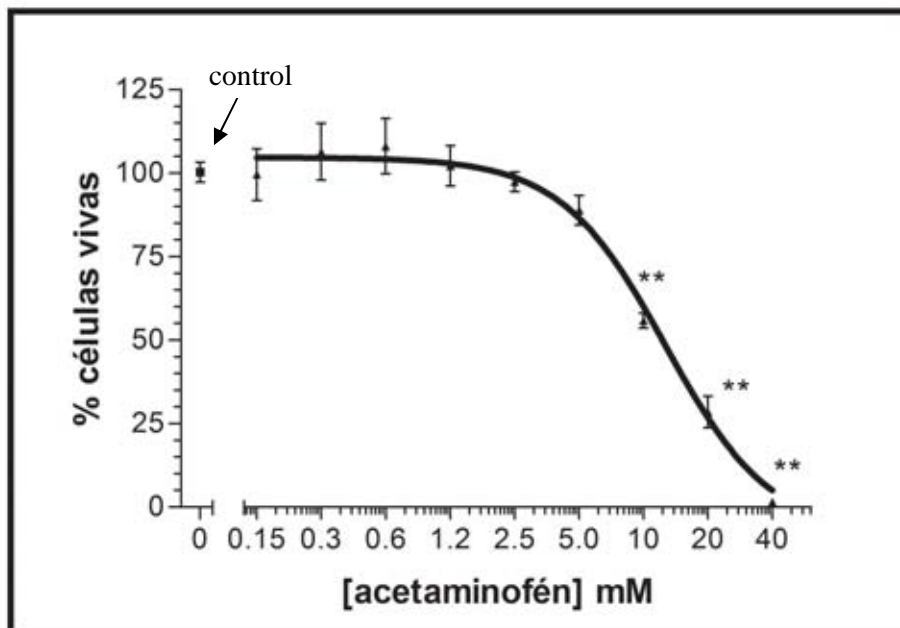
Para analizar los cambios que ocurren en la localización de la proteína HSP27 al adicionar el fármaco con y sin inducción de choque térmico, se sembraron las células LLC-PK1 en portaobjetos con pozos desmontables (Nunc). Una vez adheridas, se adicionó el fármaco y después de 24 horas de incubación se retiró el medio y se lavaron los pozos con PBS. El choque térmico se realizó antes de la adición del fármaco en los experimentos que así lo requerían. Las células se fijaron con formaldehído (3 %), pH 7.2 durante 15 minutos, se permeabilizaron con Tritón X-100 (0.1 %) durante 5 minutos, y después se adicionó una solución de borohidruro de sodio (0.2 %) en PBS para reducir el fondo producido por los aldehídos. Después de la incubación de las células con cada reactivo se realizaron repetidos lavados para eliminar el exceso de dichos reactivos. Una vez permeabilizadas las células se bloquearon con albúmina (1 %) durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante. Se adicionó el anticuerpo primario anti-HSP27 monoclonal hecho en ratón (Santa Cruz Biotechnology) y posteriormente el anticuerpo secundario anti-ratón hecho en burro conjugado con el fluorocromo Alexa 546 (Santa Cruz Biotechnology). Ambos anticuerpos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, después de cada incubación se realizaron múltiples lavados con PBS. Finalmente se adicionó una solución de glicerina (DABCO 2 g, Glicerol 90 mL, PBS 10 mL) para montar un cubreobjetos que se selló por los extremos con barniz. Para tener evidencia de los cambios observados en la localización de HSP27 se tomaron fotografías empleando un microscopio de fluorescencia (Nikon modelo Eclipse 600).



## V. RESULTADOS

### EFFECTO DEL ACETAMINOFÉN EN LA VIABILIDAD CELULAR.

Evaluamos el daño que provoca el acetaminofén en células de túbulo proximal de cerdo, para lo cual realizamos ensayos de acumulación de rojo neutro. Expusimos a las células a diferentes concentraciones de acetaminofén (0.15 a 40 mM en progresión geométrica base 2). En la figura 7 se observa que para las concentraciones de 0.15, 0.3, 0.6, 1.2 y 2.5 mM la viabilidad celular no se altera por el acetaminofén. Para la concentración de 5.0 mM la viabilidad disminuye ligeramente (viabilidad de 88 %) pero las diferencias no son significativas. A la concentración de 10 mM la viabilidad disminuye hasta 56 %, para la concentración de 20 mM disminuye a un valor de 28 % y finalmente para 40 mM la viabilidad celular es prácticamente nula (de 2 %). La dosis tóxica cincuenta corresponde a una concentración de 11 mM de acetaminofén.

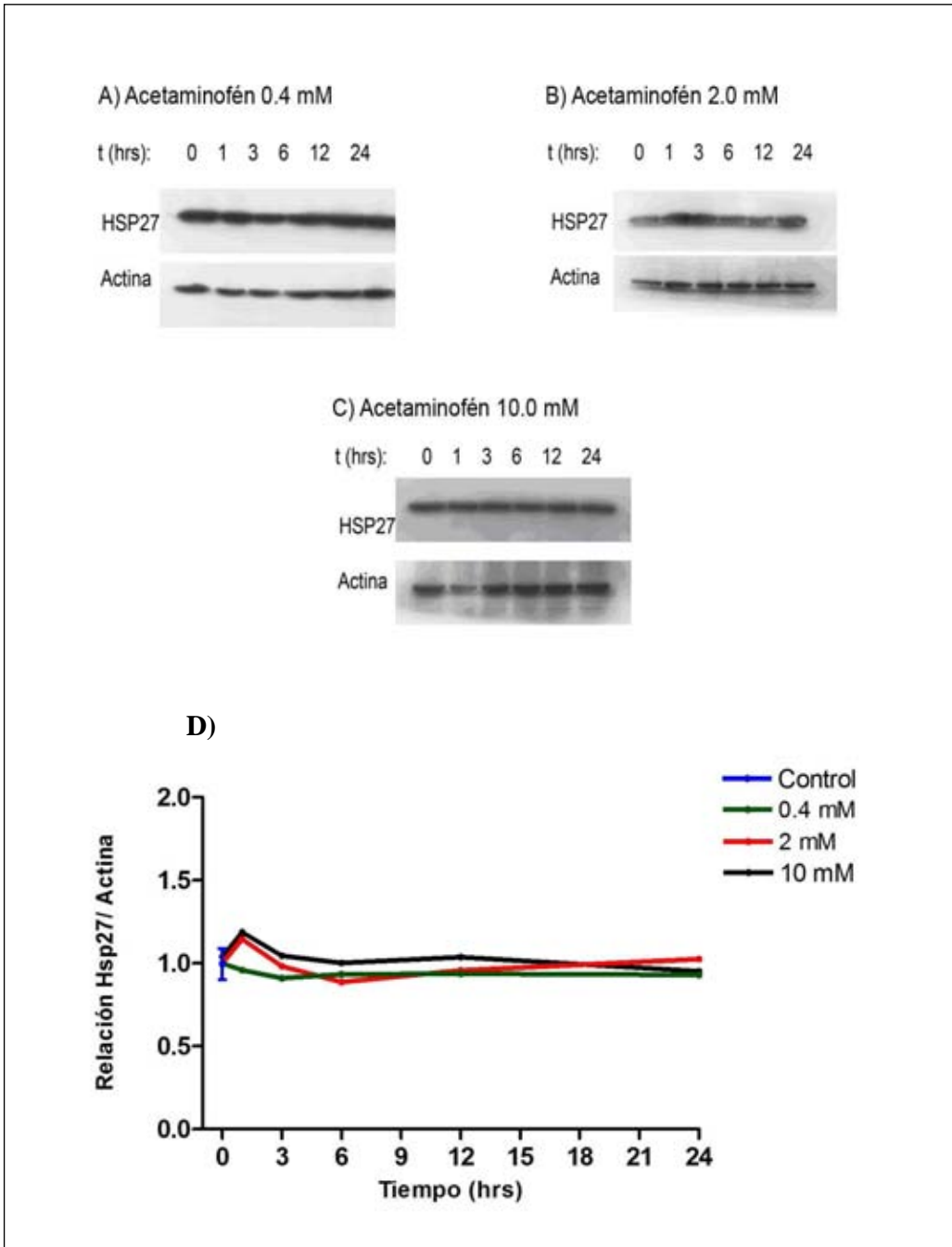


**Figura 7. Citotoxicidad por acetaminofén en la línea celular LLC-PK1.** Las células se incubaron con acetaminofén por 24 horas y posteriormente la viabilidad se estimó mediante el ensayo de acumulación de rojo neutro. Las lecturas de absorbancia se normalizaron contra las lecturas generadas por células que no se expusieron a acetaminofén (células control). La viabilidad de las células decrece significativamente a partir de 10 mM de acetaminofén. \*\*  $P < 0.01$  (Prueba de Dunnett).

## **EXPRESIÓN DE HSP27 EN CÉLULAS TRATADAS CON ACETAMINOFÉN.**

Con el fin de conocer si la expresión de HSP27 se estaba modificando debido a la adición del acetaminofén, realizamos "Western blot" empleando lisados de células incubadas con acetaminofén a las concentraciones subtóxicas 0.4 mM (8A) o 2 mM (8B), o la concentración tóxica 10 mM (8C). La expresión de HSP27 en células a las cuales no se les adicionó acetaminofén, es la expresión basal de esta proteína en la línea celular LLC-PK1 y corresponde al control. Los lisados se fueron obteniendo después de 1, 3, 6, 12 o 24 horas de incubar a las células con el fármaco con el fin de analizar el curso temporal de los cambios en la exposición de HSP27 y en caso de observar alteraciones en la expresión de HSP27, el tiempo al cual se está efectuando mayoritariamente.

En la figura 8 se observan las bandas de HSP27 y de actina para cada uno de los tres tratamientos con acetaminofén. La banda de actina sirve para corroborar que se está adicionando igual cantidad de proteína en los pozos cuando se realiza la electroforesis y para estandarizar los resultados. Para realizar el análisis densitométrico de los "Western blots" se les asignó el valor numérico de 1 a la relación HSP27/ actina de los controles. La expresión de la proteína HSP27 no se modificó con ninguna de las concentraciones de acetaminofén estudiadas (8A, 8B y 8C). Debido a que no observamos cambios en la expresión de la proteína a ningún tiempo ni concentración de acetaminofén, no repetimos estos experimentos. En resumen observamos que el tratamiento de las células con acetaminofén, aún con una concentración tóxica, no es un estímulo en esta línea celular, para provocar cambios en la expresión de HSP27 (ver figura 8D).



**Figura 8. Efecto del acetaminofén en la expresión de HSP27 en células de túbulo proximal de cerdo.** Para realizar los Western blots se emplearon lisados totales de la línea celular LLC-PK1 tratados con 0.4 (A), 2 (B) o 10 mM (C) de acetaminofén. Los lisados para el tiempo 0 se realizaron antes de la adición del fármaco, mientras que los lisados 1, 3, 6 y 24 se realizaron después de incubarlo con acetaminofén el número de horas indicadas. Para realizar el análisis, los valores se normalizaron considerando que para los lisados de las células sin tratamiento la relación HSP27/ actina es igual a 1. D. Expresión de la proteína HSP27 en la línea celular LLC-PK1.

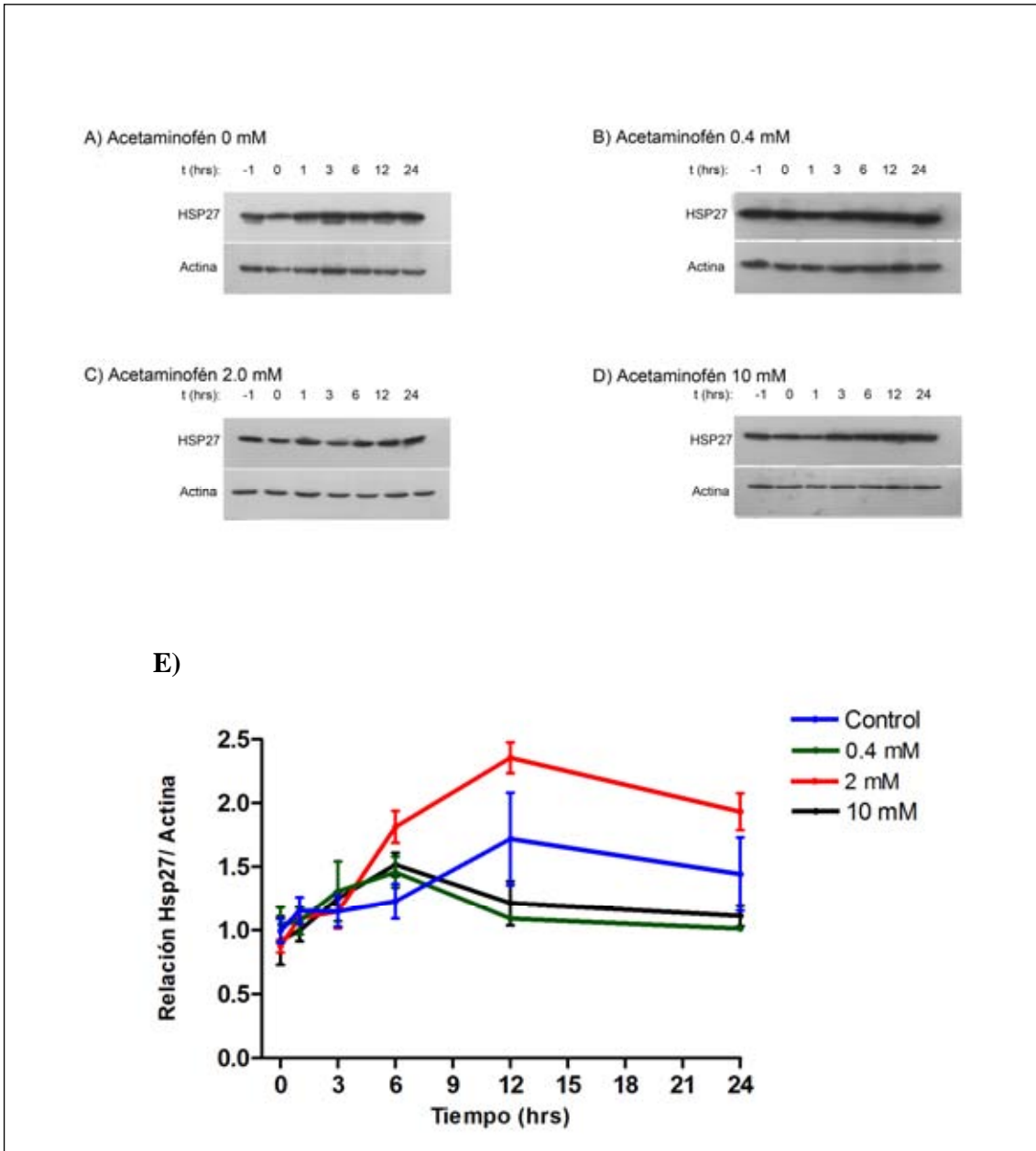
## **EXPRESIÓN DE HSP27 EN CÉLULAS SOMETIDAS A CHOQUE TÉRMICO Y POSTERIORMENTE TRATADAS CON ACETAMINOFÉN.**

Una vez que observamos los efectos que provoca el acetaminofén en células de la línea celular LLC-PK1, las sometimos a choque térmico para provocar la sobreexpresión de proteínas de choque térmico. En la figura 9 se observa un incremento en la cantidad de HSP27 en los lisados de células a las cuales se les sometió a choque térmico. Para conocer si el comportamiento de HSP27 difiere en células tratadas con acetaminofén de aquellas que no se trataron, se realizaron "western blots" de células sólo con choque térmico (9A) y células tratadas con acetaminofén 0.4 mM, 2 mM o 10 mM (9B, 9C y 9D).

En la figura 9E se observa que en la curva que corresponde a células con choque térmico y sin incubación con acetaminofén, la expresión de HSP27 se incrementa y para el tiempo de 12 horas la relación HSP27/ actina es 1.7. A las 24 horas dicha relación disminuye hasta 1.4; aún no ha disminuido hasta su estado basal. En la curva que corresponde a 0.4 mM la relación HSP27/ actina se incrementa hasta 1.5 a las 6 horas después de las cuales disminuye hasta regresar a su expresión basal. Para 2 mM la máxima expresión de HSP27 se observa a las 12 horas con una relación HSP27/ actina de 2, para las 24 horas la expresión ha disminuido a 1.9. A la concentración de 10 mM se observa un ligero incremento de HSP27 que alcanza su máxima expresión con una relación HSP27/ actina de 1.5 a las 6 horas, después de las cuales decrece hasta su nivel basal. El comportamiento en la expresión de HSP27 entre las células que se trataron con las concentraciones 0.4 mM y 10 mM de acetaminofén es muy parecido. La mayor expresión de HSP27 ocurre en células tratadas con una concentración de 2 mM de acetaminofén.

## **EFFECTO DEL CHOQUE TÉRMICO EN LA VIABILIDAD DE CÉLULAS INCUBADAS CON ACETAMINOFÉN.**

Realizamos ensayos de citotoxicidad sometiendo a las células a choque térmico para inducir la expresión de HSP27 y conocer si ésta proteína ayuda a la supervivencia de las células.

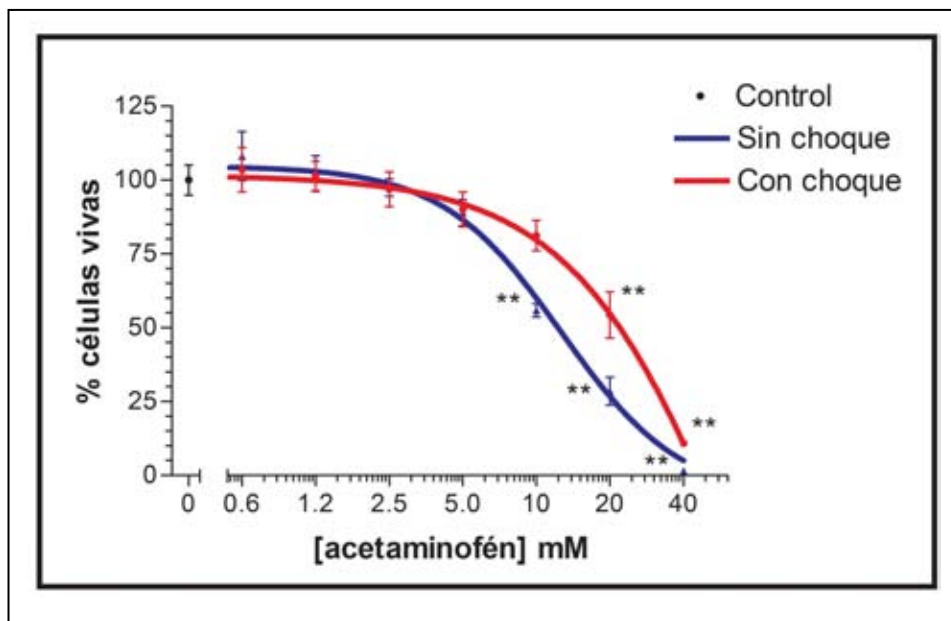


**Figura 9. Efecto del acetaminofén en la expresión de HSP27 en células de túbulo proximal de cerdo sometidas a choque térmico.** Para realizar los Western blots se emplearon lisados totales de la línea celular LLC-PK1 expuestas a acetaminofén después de aplicar choque térmico durante 1 hora.

El tiempo -1 indica que los lisados se realizaron antes de aplicar el choque térmico y sin adición del fármaco; en todos los casos la expresión basal de HSP27 en ausencia de choque térmico se utilizó para normalizar las lecturas densitométricas. En las células control (A) el choque térmico incrementa la expresión de HSP27 con un pico a las 12 horas. La expresión de HSP27 se modifica por la exposición a 0.4 (B), 2 (C) o 10 mM (D) de acetaminofén. En la gráfica (E) se observa la cuantificación por densitometría de la expresión de la proteína HSP27. Cada experimento se realizó al menos 3 veces.

El tratamiento con acetaminofén lo realizamos 3 horas después del choque térmico ya que en los Western blots de células que sometimos a choque térmico se observa que a éste tiempo la expresión de HSP27 comienza a aumentar (ver figura 9E).

En la figura 10 se compara la viabilidad de las células con y sin choque térmico antes del tratamiento con acetaminofén. La concentración necesaria para provocar la muerte al 50 % de las células se incrementa a 20 mM.



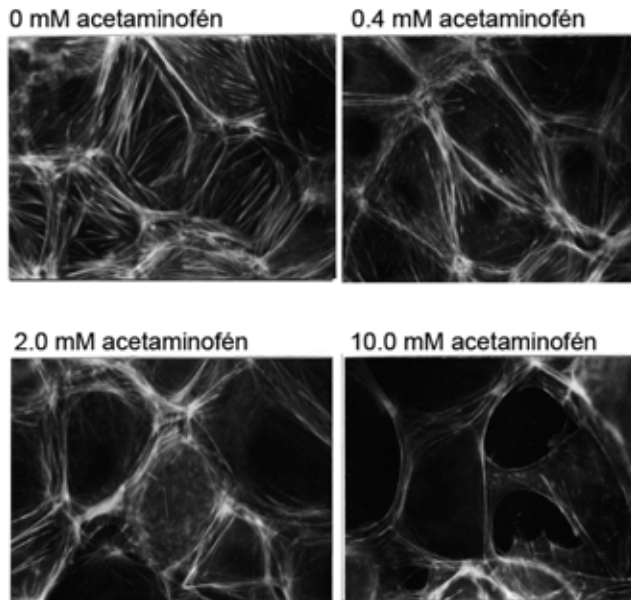
**Figura 10. Efecto del choque térmico en la citotoxicidad por paracetamol en la línea celular LLC-PK1.** En células que recibieron choque térmico antes de la incubación con el fármaco (línea roja) la concentración tóxica 50 se duplica en comparación con las células que no recibieron choque térmico (línea azul).

## **CITOESQUELETO DE ACTINA.**

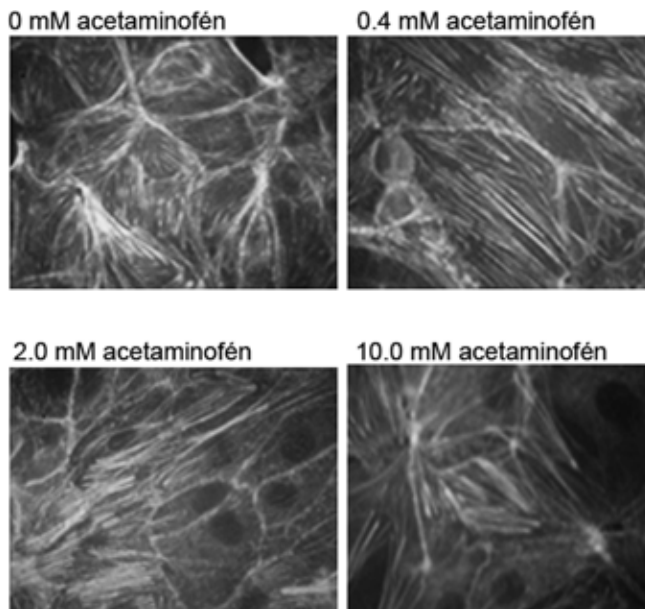
Debido a que el citoesqueleto de actina es fundamental para mantener algunas funciones y la estructura de las células, teñimos F-actina para observar si había modificaciones en el citoesqueleto que se relacionaran con el comportamiento de las células.

En la figura 11A se observa que para los controles los filamentos de actina se encuentran distribuidos en el centro y en los límites de la célula. Los microfilamentos son largos y se encuentran paralelos unos con otros. Para la concentración de 0.4 mM la cantidad de microfilamentos de actina disminuye ligeramente en el citoesqueleto. Para 2 mM la cantidad de microfilamentos en el citoesqueleto es casi nula, éstos se ven más cortos y se concentran encimados en ciertas zonas, a lo lejos se observan como puntos. Las fibras que le dan la forma a la célula comienzan a disminuir. Para 10 mM se han perdido gran parte de los microfilamentos de actina en el interior de la célula y en los límites que dividen a una célula de otra, las células comienzan a perder su forma y se empiezan a alargar. Entonces, en general se observa que a mayor concentración de fármaco las fibras son menos abundantes y más cortas. Cuando las células se exponen a choque térmico (figura 11B), se observa que para 0 mM los microfilamentos de actina son más abundantes en el interior y en los bordes de la célula en comparación con el control de las células sin choque térmico, al igual que en éstas, las fibras son alargadas y parecen estar dirigidas hacia un sentido. Para 0.4 mM no se observan cambios con respecto a las células tratadas con 0 mM de acetaminofén con choque térmico. Para 2 mM las fibras son aún abundantes, largas y orientadas hacia un mismo lado, pero la cantidad en los bordes de las células ha disminuido en comparación con 0 mM. Para 10 mM no se distingue la división entre una célula y otra, los microfilamentos de actina son largos pero su arreglo no es homogéneo. En éstas células los microfilamentos de actina son más abundantes a cualquier concentración de acetaminofén si se comparan con aquellos que se encuentran en las células sin choque térmico, por lo que se concluye que el choque térmico protege al citoesqueleto de actina de las células de túbulo proximal de cerdo de los efectos que provoca el acetaminofén.

**A) F-actina. Células sin choque térmico.**



**B) F- actina. Células con choque térmico.**

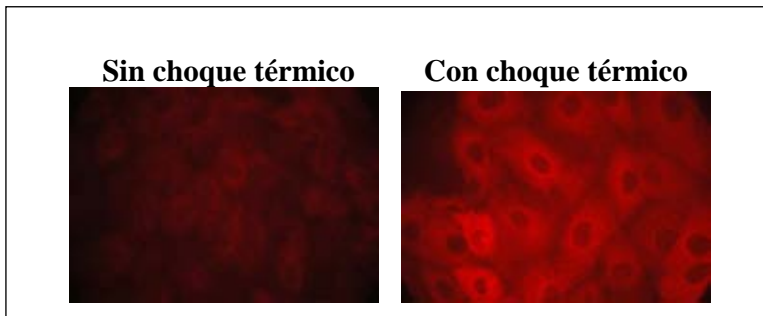


**Figura 11.** Localización de F-actina en células con y sin choque térmico tratadas con diferentes concentraciones de acetaminofén. En A los microfilamentos de actina se van perdiendo conforme se incrementa la concentración de acetaminofén. En B se observa que al someter a las células a choque térmico los microfilamentos de actina se incrementan en todos los tratamientos con acetaminofén. Los microfilamentos de actina también disminuyen en tamaño y proporción a mayor concentración de acetaminofén.



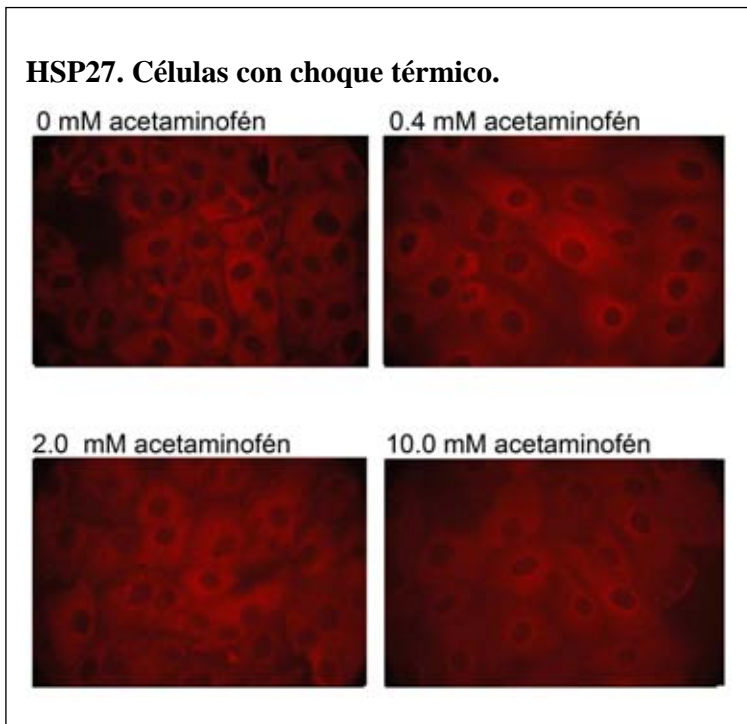
## LOCALIZACIÓN DE HSP27

Se realizaron inmunofluorescencias a células sin incubarlas con acetaminofén. A unas células se les sometió a choque térmico y a otras no. En la figura 12, se observa que la localización de las células no se modifica por acción del choque térmico, pero si la intensidad de la señal que detecta a HSP27.



**Figura 12. Localización de la proteína HSP27 en células control.** Se observa que a las células a las cuales se les sometió a choque térmico, no se modifica la distribución de la proteína con respecto a las células sin choque térmico.

También empleamos la técnica de inmunofluorescencia para conocer si la localización de HSP27 en células sometidas a choque térmico se modifica por acción del acetaminofén. Se encontró que las diferencias entre las células a las que no se les adicionó fármaco no son importantes al compararlas con aquellas que se incubaron con 0.4 mM, 2 mM o 10 mM de acetaminofén (ver figura 11).



**Figura 13. Localización de HSP27 en células sometidas a choque térmico e incubadas con diferentes concentraciones de acetaminofén.** Se observa la localización de HSP27 es independiente de la concentración de fármaco debido a que no hay cambios significativos entre cada tratamiento.

## VI. DISCUSIÓN

En el modelo *in vitro* que empleamos para conocer los daños en el riñón a causa del tratamiento con acetaminofén, utilizamos células de túbulo proximal de cerdo, ya que se ha encontrado que la pérdida de células tubulares es una característica del daño por acetaminofén (Ortiz, 2000).

En nuestros experimentos encontramos que la incubación de las células con acetaminofén es suficiente para provocar efectos tóxicos, sin embargo en la clínica se ha observado que un daño renal preexistente o el consumo simultáneo de más de un analgésico es necesario para que los pacientes desarrollen daño renal a causa de la administración de acetaminofén (Granese, 2007).

En nuestros resultados, se observa que en la línea celular LLC-PK1 la muerte provocada por acetaminofén es dependiente de la concentración. Los efectos tóxicos significativos se aprecian a partir de la concentración de 10 mM. Cuando el acetaminofén se administra a humanos, se requieren concentraciones en plasma de 0.07 a 0.2 mM para producir efectos terapéuticos y se sabe que las concentraciones tóxicas son mayores a 1.3 mM (Larson, 1991). También se ha reportado que en el 90 % de los individuos con sobredosis por acetaminofén, la concentración plasmática después de 4 horas de ingerido el fármaco es de 2 mM (Brunton, 2006). Aunque en nuestro modelo la concentración a la cual se observa toxicidad es mayor, debemos considerar que la concentración del fármaco en plasma y en riñón no es la misma. Esto se debe a que el acetaminofén o uno de sus metabolitos tóxicos tienden a acumularse en las células del túbulo proximal, generando el daño.

Aunque las concentraciones que empleamos para evaluar el daño en células de túbulo proximal no son parecidas a las concentraciones en plasma después de administrado el fármaco, en otros modelos *in vitro* y *ex vivo* se han encontrado resultados parecidos a los nuestros.

- i. En células de túbulo epitelial de humano, línea celular HK-2, la incubación con acetaminofén se realizó durante 24 horas. Posteriormente, al igual que en nuestros experimentos, se midió la viabilidad por rojo neutro. La concentración tóxica 50 encontrada para dichas células fue de 7 mM (Zhang, 2007).

- ii. En experimentos realizados por perfusión en riñones de ratas, se ha encontrado que con acetaminofén 10 mM se pierde la homeostasis celular, incrementándose los valores de excreción de agua excreción de agua en un 172 %, FENa en un 79 %, excreción de glucosa en un 55 % y disminuyendo el valor de GFR 23 % (Trumper, 1995).
- iii. En cortes de riñones de ratones machos CD-1 incubados con diferentes concentraciones de acetaminofén, se midieron los niveles de potasio y de ATP. A través de estos indicadores de función renal se puede conocer el daño en las células. El ATP refleja el almacenamiento de energía y es un indicador sensitivo de la viabilidad y el contenido de potasio refleja la integridad de la membrana. Cambios significativos se comenzaron a observar a partir de la concentración 5 mM de acetaminofén. A 10 mM, una concentración empleada en nuestros experimentos, se observa que el ATP y el potasio disminuyen sus valores 67 % y 40 % respectivamente. También se observó que para la concentración de 10 mM el daño en túbulo proximal renal ocurre a las 12 horas (Hoivik, 1996). Aunque no se está midiendo viabilidad directamente, se observa que a la concentración de 10 mM funciones vitales para la integridad celular han disminuido hasta valores cercanos al 50 %.

En contraste con nuestros resultados, otros investigadores han encontrado que al incubar a células MTC (células de túbulo proximal de murino) con concentraciones de acetaminofén tóxicas en plasma (2 mM) durante 24 horas, el 50 % de las células mueren por apoptosis (Lorz, 2004). Estos resultados difieren de los obtenidos en nuestros experimentos porque la concentración de acetaminofén de 2 mM en nuestro modelo corresponde a una concentración subtóxica en la que la viabilidad celular es de 97 %. A pesar de que ambas líneas celulares corresponden a células de túbulo proximal, la sensibilidad de cada una hacia el acetaminofén varía, lo que se puede deber a que corresponden a diferentes especies.

Aunque no se conoce con precisión como el acetaminofén provoca la muerte de las células de túbulo proximal del riñón, se sabe que en IRA se modifica la expresión de marcadores de apoptosis extracelulares e intracelulares (Musso, 2008). Disminuyen los niveles de factores de crecimiento, se incrementa la

expresión de TNF y FasL. En pared tubular y en lumen se incrementa la expresión de Bax y Bcl-X<sub>L</sub> y disminuye la de Bcl-2 (Ortiz, 2000). Por ello, en gran parte de los experimentos para evaluar el mecanismo por el que el acetaminofén genera toxicidad se ha estudiado la inducción de apoptosis. Los resultados de dichas investigaciones sugieren que la inducción de apoptosis debe ser la base del potencial nefrotóxico del acetaminofén.

En células MCD se observa que el incremento en la expresión de Bcl-X<sub>L</sub>, una proteína de la familia Bcl-2 que inhibe la salida del citocromo c de la mitocondria, al adicionar factores de crecimiento al medio con acetaminofén, disminuye la muerte por apoptosis en un 60 % (Lorz, 2004).

Otros experimentos sugieren que la apoptosis es provocada por estrés en retículo endoplásmico (RE) ya que al tratar células epiteliales tubulares con acetaminofén se incrementa el marcador de estrés de retículo endoplásmico GADD153 (Lorz, 2004). Por otra parte se ha encontrado en ratas, que tras su exposición a dosis nefrotóxicas de acetaminofén los niveles de la caspasa 12 se encontraban elevados en los riñones. La caspasa 12 es un mediador de muerte por estrés en retículo endoplásmico (Peyrou, 2007).

En nuestros experimentos observamos que después de algunas horas de incubar a las células con concentraciones tóxicas de acetaminofén se aprecia al microscopio como las células sufren cambios morfológicos; por ejemplo, pérdida de la asimetría de la membrana. Sin embargo estas observaciones no son suficientes para decir que en nuestro modelo la muerte se está efectuando por apoptosis. Para conocer si en nuestro sistema la muerte se está efectuando por apoptosis, hay que realizar mediciones en las cuales se determinen marcadores de apoptosis como las caspasas, el citocromo c, receptores de muerte, cambios en el potencial de la membrana mitocondrial, entre otros. Una técnica útil para conocer que fracción de las células muere por apoptosis, es la citometría de flujo. En ésta técnica se analizan las características ópticas de partículas individuales presentes en una suspensión celular. Es posible detectar células que mueren por apoptosis temprana y tardía, así como células que mueren por necrosis. En la membrana de células que mueren por apoptosis las moléculas de fosfatidilserina se translocan desde la cara interna de la membrana citoplasmática a la cara externa. Este cambio puede detectarse mediante la unión a Annexina V (conjugada con un fluorocromo) a la

fosfatidilserina. Las células que mueren por necrosis pierden la permeabilidad celular y se pueden medir tiñéndolas con yoduro de propidio, que se une al DNA accesible tras la pérdida de la permeabilidad selectiva. Las células que únicamente se tiñan con Annexina V se encuentran en apoptosis temprana. Las células que se tiñan únicamente con yoduro de propidio corresponderían a la población que muere por necrosis. Las células que se unan a Annexina V y a yoduro de propidio corresponderían a la población de células que se encuentran en apoptosis tardía, ya que después de cierto tiempo también pierden la permeabilidad celular.

Debido a que en la terapéutica es necesario buscar blancos que ayuden a contrarrestar los efectos tóxicos provocados por agentes farmacéuticos, en la actualidad se estudian a las HSP ya que se ha visto que incrementan su expresión en situaciones de estrés y ayudan así a la supervivencia de la célula. Por ejemplo, la hipertermia en células del sistema nervioso provoca un incremento de HSP70 que tiene efectos protectores a nivel de transmisión sináptica y bloqueando la apoptosis. HSP70 también previene necrosis en células endoteliales vasculares inducida por leucocitos polimorfonucleares (Grover, 2002).  $\alpha$ B-cristalina y HSP27 evitan la agregación de F-actina después de un evento de estrés, translocándose del citosol al citoesqueleto (Pivovarova, 2005).

En éste trabajo, se midió la expresión de la proteína HSP27 en células LLC-PK1 sin tratamiento para conocer los niveles basales de expresión de la proteína y en células tratadas con acetaminofén para conocer si el fármaco provoca cambios la expresión de HSP27, puesto que se sabe que algunos estímulos físicos, químicos o biológicos son capaces de provocar la síntesis de HSP en respuesta a bajos niveles de estrés (Concannon, 2003). Se encontró que el acetaminofén no incrementa la expresión de HSP27. Al contrario de lo que ocurre en nuestros experimentos, otros estímulos estresantes si modifican la expresión de HSP27. Al exponer células LLC-PK1 a dosis subletales de cadmio se encontró la acumulación de HSP de alto y bajo peso molecular. Esto puede ser un indicador del daño celular inducido por cadmio (Bonham, 2003). También en células LLC-PK1 al provocar daño por isquemia, la expresión de HSP27 se incrementa, asociándose con F-actina en uniones laterales de la

célula y con actina agregada en citoplasma, limitando el daño en uniones laterales célula-célula y célula-sustrato (Van Why, 2003).

En nuestro modelo se provocó la sobreexpresión de HSP27 por choque térmico, y se demostró por análisis de "Western blot". Al tratar a las células con acetaminofén después de aplicar choque térmico no se observó una relación clara entre la sobreexpresión de HSP27 y las distintas concentraciones del fármaco. Para las células que se incubaron con choque térmico y sin acetaminofén el pico máximo para HSP27 se obtuvo a las 12 horas con un incremento de un 70 % con respecto a la expresión basal. A las concentraciones de 0.4 y 10 mM el pico máximo de expresión de HSP27 se dio a las 6 horas con un incremento del 50 % con respecto al nivel basal y a la concentración de 2 mM el pico máximo se observa a las 12 horas con un incremento de aproximadamente 150 % con respecto al nivel basal.

Al igual que en los resultados que obtuvimos, se ha encontrado que el incremento en la expresión de HSP27 se observa después de pocas horas de la incubación con choque térmico, y que la proteína regresa a sus niveles basales después de retirar el evento de estrés (Landry, 1991). HSP27 es una de las principales HSP inducibles inhibidora de apoptosis por lo que tiene efectos citoprotectores en respuesta al estrés. Esta proteína es fosforilada en los residuos de serina 15, 78 y 82, y posteriormente se incrementa su expresión (Pivovarova, 2005). La fosforilación es catalizada por las cinasas MAPK 2 y 3 que a su vez son activadas por la cinasa MAP p38. Por otra parte, estudios han reportado que la fosforilación de HSP27 no es necesaria para proveer protección y que está es mediada por un cambio redox en el que HSP27 actúa como amortiguador que previene oxidación de proteínas observadas generalmente cuando ocurre incremento en ROS (Grover, 2002). Por ello, en posteriores experimentos sería interesante determinar en que medida se expresa HSP27 en sus diferentes estados de fosforilación, inhibiendo las cinasas que catalizan la fosforilación y observando el efecto protector contra el acetaminofén. El mecanismo por el cual las HSP protegen a la célula no se entiende por completo, y probablemente involucre diferentes funciones que en conjunto evitan daños tóxicos y así la muerte.

La viabilidad de las células expuestas a choque térmico y posteriormente tratadas con acetaminofén se incrementó de forma importante. La

concentración tóxica 50 de acetaminofén sin aplicar choque térmico es de 11 mM mientras que con choque térmico es de 20 mM. El choque térmico activa la inducción intermediaria de genes que codifican a chaperonas moleculares, proteasas y otras proteínas necesarias para la protección y recuperación al daño celular originado por la aparición de proteínas desnaturalizadas (Westerheid, 2005). Entre estas proteínas se encuentran las HSP. Nuestros resultados muestran que los cambios en la expresión de HSP27 correlacionan con la supervivencia de las células.

El factor de choque térmico (Hsf) es una proteína clave para la regulación de HSP (Voellmy, 2004), ya que existe evidencia de que anticuerpos específicos anti-Hsf inhiben la activación de las HSP (Baler,1993, Ali,1998). La estructura de Hsf se compone de un dominio de unión al DNA en el extremo amino que es capaz de interactuar con el elemento del choque térmico (HSE). Este dominio muy conservado de DNA precede al promotor de los genes de las HSP (Green,1995). La activación de Hsf ocurre a través de la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína localizados en su sitio activo (Ahn, 2003). Como ya se mencionó, las HSP actúan como chaperonas uniéndose a proteínas dañadas o desnaturalizadas mediando su renaturalización o degradación (Djamali, 2000). Adicionalmente, HSP27 disminuye la síntesis de proteínas bajo condiciones de estrés a las cuales se pueden producir agregados de proteínas por desnaturalización o incorrecto ensamblaje (Carper, 1997). HSP27 también inhibe la muerte por apoptosis al parecer por diversos mecanismos como unión a receptores de muerte como Fas, interactúa con Daxx bloqueando interacción con Fas y Ask1 e inhibiendo la activación de caspasas (Samali, 2001).

Con respecto al citoesqueleto de actina, al incubar a las células con acetaminofén se observó que provoca modificaciones en el patrón de los filamentos. Los microfilamentos de actina se observan más pequeños, se agregan y se pierden en mayor proporción a mayor concentración de acetaminofén, siendo más resistentes los microfilamentos corticales que los transcelulares. Al someter a las células a choque térmico se aprecia que los microfilamentos corticales y transcelulares de actina son más abundantes. Esto ocurre en células con y sin tratamiento con acetaminofén. La sobreexpresión de HSP27 protege al citoesqueleto de actina por acción del acetaminofén,

evitando la pérdida de F-actina en los sitios de unión, manteniendo la integridad de la monocapa de células. El mecanismo por el cual HSP27 estabiliza a actina es pobremente entendido. Se estudia F-actina porque en la función del tejido epitelial es muy importante la integridad del citoesqueleto de actina y de ésta depende la estabilidad de los complejos que promueven el anclaje célula – célula y célula – sustrato.

Los agregados de actina que se forman en el citoesqueleto ya se han observado anteriormente en diferentes líneas celulares por acción de diversos agentes que provocan toxicidad. Al igual que en los experimentos que realizamos, en la línea celular MCT se forman los agregados de microfilamentos de actina en el citoplasma al incubar a las células con acetaminofén 2 mM (Lorz, 2004). En las líneas celulares LLC-PK1 y MDCK también se forman los agregados de actina por inducción de isquemia y exposición a cadmio (Meldrum, 2003; Wiegele, 1998; Bonham, 2003). Dichos agregados se pueden estar formando como mecanismo de protección de la célula a concentraciones de acetaminofén que provocan cambios en citoesqueleto de actina (Lorz, 2004).

En células de la línea celular LLC-PK1 privadas de ATP se encontraron similitudes con lo observado en nuestros experimentos con respecto a las modificaciones en el citoesqueleto de actina. Al inducir isquemia ocurren alteraciones como inhibición del ensamblaje de actina en el citoesqueleto. La disrupción de fibras de estrés es más gradual y persistente ya que la actina asociada a adhesiones focales es muy resistente y su ensamblaje se incrementa drásticamente en los sitios de unión célula–célula, por lo que el contenido total de los microfilamentos de actina en células epiteliales se incrementa. Lo anterior puede constituir un elemento del daño inducido por isquemia o un mecanismo de protección (Shelden, 2002).

Una explicación de como la viabilidad va disminuyendo por acción del efecto tóxico del acetaminofén en el citoesqueleto de actina, es que cuando la estructura del citoesqueleto está dañada, otras proteínas que transducen señales extracelulares, especialmente receptores de adhesión, no pueden regular adecuadamente procesos tales como proliferación, motilidad, diferenciación y transporte celular, ya que estos procesos dependen de la interacción de las proteínas con el citoesqueleto de actina (Ruoslahti, 1996).



La supervivencia debida a la sobreexpresión de HSP27 se correlaciona con un mayor nivel de elongación, migración y adhesión. Esto se observó en fibroblastos mutados que sobreexpresan HSP27 (SS12) y en fibroblastos mutados que expresan menor cantidad de HSP27 que la correspondiente a la cantidad basal (AS10). Los fibroblastos SS12 lograron una elongación, migración y adhesión de forma más rápida y efectiva que los fibroblastos AS10 (Hirano, 2004). Aunque los fibroblastos no corresponden a las células del tejido que se está estudiando, en nuestros experimentos se observó que la sobreexpresión de HSP27 nos permite conservar la integridad de la monocapa de células, lo que nos sugiere que también se debe a que la función de adhesión se conserva. Esta mayor adhesión se relaciona directamente con el efecto protector de HSP27 en el citoesqueleto de actina. También se ha reportado que bajo condiciones de estrés HSP27 actúa como un agente antioxidante, antiapoptótico y estabilizando al citoesqueleto de actina (Pivovarova, 2007).

La mayor cantidad de actina encontrada en células sometidas a choque térmico antes del tratamiento se debe a que entre otras HSP, HSP27 ayuda a que los microfilamentos repolaricen, evitando la pérdida de F-actina en el citoesqueleto (Pivovarova, 2005). En células RTE (células de túbulo epitelial de riñón) a las que se les provocó una situación de isquemia se encontró que la actina se encuentra asociada a HSP27, la cual se aloja principalmente en sitios de adhesión célula-célula (Shelden, 2002). En nuestro estudio se observó que HSP27 se encuentra distribuida homogéneamente en el citoplasma, no se realizaron estudios para observar si en nuestro modelo también se encuentran colocalizadas actina y HSP27, por lo que en estudios posteriores se deberán emplear técnicas como microscopía cofocal.

En posteriores experimentos se pretende medir la expresión de otras HSP para saber si alguna otra se sobreexpresa como respuesta al efecto citotóxico del acetaminofén o participa en el rearrreglo del citoesqueleto de actina. Por ejemplo, se sabe que en condiciones de isquemia, HSP72 restaura la estructura celular, estabiliza la bomba Na-K-ATPasa y evita la formación de agregados en el citoesqueleto (Aufricht, 1998). También se sabe que HSP72 protege previniendo la activación y traslocación del factor NF- $\kappa$ B que es un mediador de daño isquémico renal capaz de inducir apoptosis en células tubulares renales.

La función de NF- $\kappa$ B en daño renal isquémico es complejo ya que puede proveer protección o muerte celular en respuesta a diversos factores (Meldrum, 2003).

El modelo *in vitro* que montamos nos permitió evaluar efectos funcionales y morfológicos en células específicas de túbulo proximal de riñón de cerdo, pero los resultados obtenidos no se pueden aplicar directamente en la clínica.

En los ensayos de citotoxicidad *in vitro*, las células que se emplean muestran buena compatibilidad con la toxicidad que muestra el órgano blanco *in vivo*. Sin embargo, los resultados obtenidos no se pueden escalar a la clínica porque en un cultivo celular las células no sufren los procesos del metabolismo (administración, distribución, biotransformación y eliminación).

## VII. CONCLUSIONES

Se encuentra a HSP27 como un elemento de protección que permite a las células LLC-PK1 sobrevivir o realizar funciones celulares cuando son expuestas a acetaminofén. El conocimiento del mecanismo de citoprotección de HSP27 u otras HSP podría ser útil en estrategias terapéuticas que limiten o eviten el daño renal generado por medicamentos.

El acetaminofén promueve el desarreglo del citoesqueleto de actina, siendo más evidentes los cambios en los microfilamentos transcelulares. A dosis tóxicas también se ven afectados los microfilamentos corticales y así las uniones célula-célula. El estrés que provoca el acetaminofén no induce la sobreexpresión de HSP27.

Al exponer a las células a choque térmico no se modifica la localización de HSP27 pero si su expresión. La sobreexpresión de HSP27 promueve la estabilidad del citoesqueleto de actina e incrementa la cantidad de microfilamentos en la célula, ayudando a evitar la pérdida de las uniones célula-célula y célula-sustrato. Lo anterior se relaciona con la mayor supervivencia celular.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Ahn SG, Thiele DJ. 2003. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.* 17: 516-528.

Alberts B, Dennis B, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. 2002. 4<sup>a</sup> edición. *Molecular Biology of the cell.* Garland Publishing Inc. USA. Cap 23, 24.

Ali A, Bharadwaj S, O' Carroll R, Ovsenek N. 1998. Hsp90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Mol. Cell Biol.* 18: 4949-4960.

Aufricht C, Lu E, Thulin G, Kashgarian M, Siegel NJ, Van Why SK. 1998. ATP releases HSP-72 from protein aggregates after renal ischemia. *Am J Physiol.* 43: 268-274.

Baler R, Dahl G, Voellmy R. 1993. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor Hsf1. *Mol. Cell Biol.* 13: 2486-2496.

Beere HM. 2004. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci.* 117: 2641-2651.

Benndorf R, Sun X, Gilmont RR, Biederman KJ, Molloy MP, Goodmurphy CW, Cheng H, Andrews PC, Welsh MJ. 2001. HSP22, a new member of the small heat shock protein superfamily, interacts with mimic of phosphorylated HSP27 ((3D)HSP27). *J Biol Chem.* 276: 26753-26761.

Bonham TR, Fine RM, Pollock MF, Shelden AE. 2003. Hsp27, Hsp70, and metallothionein in MDCK and LLC-PK1 renal epithelial cells: effects of prolonged exposure to cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol.* 19: 63-73.

Boutand O, Arnoff DM, Richardson JH, Marnett LJ, Oates JA. 2002. Determinants

of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H2 synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7130-7135.

Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C. 2000. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol.* 2: 645-652.

Brunton LL, Lazo SJ, Parker LK. 2006. Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 11<sup>a</sup> edición. The McGraw-Hill Companies. USA. Cap 27.

Buchberger A, Theyssen H, Schröder H, McCarty JS, Virgallita G, Milkereit P, Reinstein J, Bukau B. 1995. Nucleotide-induced conformational changes in the ATPase and substrate binding domains of the DnaK chaperone provide evidence for interdomain communication. *J Biol Chem.* 270: 16903-16910.

Carper SW, Rocheleau TA, Cimino D, Storm FK. 1997. Heat shock protein 27 stimulates recovery of RNA and protein synthesis following a heat shock. *J Cell Biochem.* 66: 153-164.

Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H, Landry J. 2000. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol.* 20: 7602-7612.

Concannon CG, Gorman AM, Samali A. 2003. The role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis.* 8: 61-70.

Court MH, Duan SX, Von Moltke LL, Greenblatt DJ, Patten CJ, Miners JO, Mackenzie PI. 2001. Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *J Pharmacol Exp Ther.* 299: 998-1006.

Cuesta R, Laroia G, Schneider RJ. 2000. Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev.* 14: 1460-1470.

Djamali A, Reese S, Oberley T, Hullett D, Becker B. 2005. Heat shock protein 27 in chronic allograft nephropathy: a local stress response. *Transplantation*. 79: 1645-1657.

Erdo F, Erdo SL. 1998. Bimoclomol protects against vascular consequences of experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Res Bull*. 45: 163-166.

Gabai VL, Mabuchi K, Mosser DD, Sherman MY. 2002. Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 22: 3415-3424.

Giese KC, Vierling E. 2002. Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein in vivo and in vitro. *J Biol Chem*. 277: 46310-46318.

Granese J, Brightbill K, Osborne P, Cox CE, Gaber LW. 2007. Analgesic nephropathy selectively affecting a unilateral non-functioning hypoplastic kidney. *Clin Nephrol*. 68: 115-120.

Green M, Schuetz TJ, Sullivan EK, Kingston RE. 1995. A heat-shock-responsive domain of human Hsf1 that regulates transcription activation domain function. *Mol Cell Biol*. 15: 3354-3362.

Grover A. 2002. Molecular biology of stress responses. *Cell Stress Chap*. 7: 1-5.

Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Hout J, Landry J. 1997. Regulation of actin filament dynamics by p38 MAP kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Cell Sci*. 110: 357-368.

Guirado BO, Solanas GM, Costa TI, Escrich EE. 2002. El citoesqueleto de actina: una perspectiva desde la biología molecular del cáncer. *Rev Cubana Invest Bioméd*. 21: 115-122.

Haley DA, Bova MP, Huang QL, Mchaourab HS, Stewart PL. 2000. Small heat-shock protein structures reveal a continuum from symmetric to variable

assemblies. *J Mol Biol.* 298: 261-272.

Harvey L, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnel J. 2001. Molecular cell biology. 4<sup>a</sup> edición. New York: Freeman. Cap 17.

Hill MA, Gunning P. 1993. Beta and gamma actin mRNAs are differentially located within myoblasts. *J Cell Biol.* 122: 825-832.

Hirano S, Sheldon EA, Gilmont RR. 2004. HSP27 regulates fibroblast adhesion, motility, and matrix contraction. *Cell Stress Chap.* 9: 29-37.

Hoivik DJ, Fisher RL, Brendel K, Gandolfi AJ, Khairallah EA, Cohen SD. 1996. Protein arylation precedes acetaminophen toxicity in a dynamic organ slice culture of mouse kidney. *Fundam Appl Toxicol.* 34: 99-104.

Hook TC, Newcomb PM, Herman IM. 1991. Beta actin and its mRNA are localized at the plasma membrane and the regions of moving cytoplasm during the cellular response to injury. *J Cell Biol.* 112: 653-664.

Huot J, Houle F, Marceau F, Landry J. 1997. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res.* 80: 383-392.

IMSS. El IMSS en cifras. La demanda de servicios en urgencias, 2004. Rev Med Inst Mex Seguro Soc [Revista en Internet] 2006. [acceso 2 de marzo de 2008]; 44: 261-273. Disponible en: <http://www.imss.gob.mx/nr/imss/dpm/dties>

Jiménez ML, Montero PF. 2005. Compendio de Medicina de Urgencias: guía terapéutica. 2<sup>a</sup> edición. Madrid: Elsevier.

Jong WW, Caspers GJ, Leunissen JA. 1998. Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol.* 22: 151-162.

Kappé G, Franck E, Verschuure P, Boelens WC, Leunissen JA, de Jong WW.

2003. The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10. *Cell Stress Chap. 8*: 53-61.

Kappé G, Verschuure P, Philipsen RL, Staalduinen AA, Van de Boogaart P, Boelens WC, De Jong WW. 2001. Characterization of two novel human small heat shock proteins: protein kinase-related HspB8 and testis-specific HspB9. *Biochim Biophys Acta*. 1520: 1-6.

Kim KK, Kim R, Kim SH. 1998. Crystal structure of a small heat shock protein. *Nature*. 394: 595-599.

Koch WJ. 1976. Drug therapy. Acetaminophen. *N Engl J Med*. 295: 1297-1300.

Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. 1988. The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*. 332: 462-464.

Krief S, Faivre JF, Robert P, Le Douarin B, Brument-Larignon N, Lefrère I, Bouzyk MM, Anderson KM, Greller LD, Tobin FL, Souchet M, Brill A. 1999. Identification and characterization of cvHsp. A novel human small stress protein selectively expressed in cardiovascular and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem*. 274: 36592-36600.

Landry J, Hout J. 1995. Modulation of actin dynamics during stress and physiological stimulation by signaling pathway involving MAP kinase and heat shock protein 27. *Biochem Cell Biol*. 73: 703-707.

Lee CA, Thummel KE, Kalhorn TF, Nelson SD, Slattery JT. 1991. Activation of acetaminophen-reactive metabolite formation by methylxanthines and known cytochrome P-450 activators. *Drug Metab Dispos*. 19: 966-971.

Lodish H, Berk A, Ziprusky S.L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2000. Molecular and Cell Biology. Freeman. 4<sup>a</sup> edición. USA. Cap 12.

Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Lizasoain I, Moro MA. 2005. 17<sup>a</sup> edición.



Velázquez. Farmacología Básica y Clínica. Medica Panamericana. Madrid, España. Cap 71.

Lorz C, Justo P, Sanz A, Subirá D, Egido J, Ortiz A. 2004. Paracetamol-induced renal tubular injury: a role for ER stress. *J Am Soc Nephrol.* 15: 380-389.

Mairesse N, Horman S, Mosselmans R, Galand P. 1996. Antisense inhibition of the 27 kDa heat shock protein production affects growth rate and cytoskeletal organization in MCF-7 cells. *Cell Biol Int.* 20: 205-212.

Manyike PT, Kharasch ED, Kalhorn TF, Slattery JT. 2000. Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation. *Clin Pharmacol Ther.* 67: 275-282.

Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP. 1996. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem.* 271: 16510-16514.

Meldrum KK, Burnett LA, Xianzhong M, Misseri R, Shaw MB, Gearhart PJ, Meldrum RD. 2003. Liposomal delivery of Heat Shock Protein 72 into renal tubular cells blocks nuclear factor- $\kappa$ B activation, tumor necrosis factor production, and subsequent ischemia-induced apoptosis. *Circ Res.* 92: 293-299.

Milton AS. 1976. Modern views on the pathogenesis of fever and the mode of action of antipyretic drugs. *J Pharm Pharmacol.* 28: 393-399.

Miners JO, Osborne NJ, Tonkin AL, Birkett DJ. 1992. Perturbation of paracetamol urinary metabolic ratios by urine flow rate. *J Clin Pharmacol.* 34: 359-362.

Miron T, Vancompernelle K, Vandekerckhove J, Wilchek M, Geiger B. 1991. A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *J Cell Biol.* 114: 255-261.

Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. 2005. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nature.* 6: 55-67.

Mounier N, Arrigo AP. 2003. Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones*. 7: 167–176.

Musso GC, Reynaldi J, Macías NJ. Fisiopatología de la insuficiencia renal aguda. Nuevas claves para un viejo dilema. *Electron J Biomed [Revista en Internet]* 2008 (en prensa). [acceso 4 de abril de 2008]. Disponible en: <http://biomed.uninet.edu/2008/n1/musso-es.html>

Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z, Yaffe D. 1983. The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Res*. 11: 1759-1771.

Ortiz A, Lorz C, Catalán MP, Justo P, Egido J. Role and regulation of apoptotic cell death in the kidney, Y2K update. *Front Biosci Biomed [Revista en Internet]* 2000 [acceso 4 abril de 2008]. 5: 735-749. Disponible en: <http://www.bioscience.org/2000/v5/d/Ortiz/fulltext.htm>

Palleros DR, Shi L, Reid KL, Fink AL. 1994. hsp70-protein complexes. Complex stability and conformation of bound substrate protein. *J Biol Chem*. 269: 13107-13114.

Park HG, Han SI, Oh SY, Kang HS. 2005. Cellular responses to mild heat stress. *Cell Mol Life Sci*. 62: 10-23.

Peyrou M, Hanna PE, Cribb AE. 2007. Cisplatin, gentamicin, and p-aminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys. *Toxicol Sci*. 99: 346-353.

Pivovarova AV, Chebotareva NA, Chernik IS, Gusev NB, Levitsky DI. 2007. Small heat shock protein Hsp27 prevents heat induced aggregation of F-actin by forming soluble complexes with denatured actin. *FESB*. 274: 5937-5940.

Pivovarova AV, Mikhailova VV, Chernik IS, Chebotareva NA, Levitsky DI, Gusev NB. 2005. Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin. *Biochem Biophys Res Commun*. 331: 1548-1553.

Ruoslahti E, Obrink B. 1996. Common Principles in Cell Adhesion. *Experimental Cell Research*. 227: 1-11.

Samali A, Robertson JD, Peterson E, Manero F, van Zeijl L, Paul C, Cotgreave IA, Arrigo AP, Orrenius S. 2001. Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress Chap*. 6: 49-58.

Schlesinger MJ. 1990. Heat shock proteins. *J Biol Chem*. 265: 12111-12114.

Schneider GB, Hamano H, Cooper LF. 1998. In vivo evaluation of hsp27 as an inhibitor of actin polymerization: hsp27 limits actin stress fiber and focal adhesion formation after heat shock. *J Cell Physiol*. 177: 575-584.

Schroeder S, Krupp M, Tierney L, McPhee S. 1991. 30<sup>a</sup> edición. Current Medical Diagnosis & Treatment. Appleton and Lange. California, USA. Cap 17.

Shelden AE, Weinberg MJ, Sorenson RD, Edwards AC, Pollock MF. 2002. Site-specific alteration of actina assembly visualized in Living renal epithelial cells during ATP depletion. *J Am Soc Nephrol*. 13: 2667-2680.

Shelden EA, Borrelli MJ, Pollock FM, Bonham R. 2002. Heat shock protein 27 associates with basolateral cell boundaries in heat-shocked and ATP-depleted epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 13: 332-341.

Sobott F, Benesch JL, Vierling E, Robinson CV. 2002. Subunit exchange of multimeric protein complexes. Real-time monitoring of subunit exchange between small heat shock proteins by using electrospray mass spectrometry. *J Biol Chem*. 277: 38921-38929.

Studer S, Obrist M, Lentze N, Narberhaus F. 2002. A critical motif for oligomerization and chaperone activity of bacterial alpha-heat shock proteins. *Eur J Biochem*. 269: 3578-3586.

Trumper L, Monasterolo LA, Ochoa E, Elias MM. 1995. Tubular effects of acetaminophen in the isolated perfused rat kidney. *Arch Toxicol.* 69: 248-252.

Van Montfort RL, Basha E, Friedrich KL, Slingsby C, Vierling E. 2001. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol.* 8: 1025-1030.

Van Why KS, Mann SA, Ardito T, Thulin G, Ferris S, Macleod AM, Kashgarian M, Siegel JN. 2003. Hsp27 Associates with Actin and Limits Injury in Energy Depleted Renal Epithelia. *J Am Soc Nephrol.* 13: 98-106.

Voellmy R. 2004. On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. *Cell Stress Chap.* 9: 122-123.

Welsh MJ, Wu W, Parvinen M, Gilmont RR. 1996. Variation in expression of hsp27 messenger ribonucleic acid during the cycle of the seminiferous epithelium and co-localization of hsp27 and microfilaments in Sertoli cells of the rat. *Biol Reprod.* 55: 141-151.

Westerheide SD, Morimoto RI. 2005. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J Biol Chem.* 280: 33097-33100.

Wiegele G, Brandis M, Zimmerhackl BL. 1998. Apoptosis and necrosis during ischaemia in renal tubular cells (LLC-PK1 and MDCK). *Nephrol Dial Transplant.* 13: 1158-1167.

Zhang L, Mu X, Fu J, Zhou Z. 2007. In vitro cytotoxicity assay with selected chemicals using human cells to predict target-organ toxicity of liver and kidney. *Toxicol In Vitro.* 21: 734-740.