

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

Biol. Exp. Verónica Souza Arroyo

*Estudio de algunas alteraciones en células fetales hepáticas humanas (WRL-68)
producidas como resultado de exposición al cadmio. Efecto del metal
sobre la entrada de calcio a la célula*

TESIS

*para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biomédicas en la especialidad
de Bioquímica*

México, D.F. 1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección de la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz y la asesoría del Dr. Edmundo Chávez Cossio del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

El presente proyecto contó para su realización con apoyo parcial del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de Convenio 1346-M9206. Agradezco a CONACYT por la beca otorgada con No. de registro 80960 durante mi trabajo de tesis. También quiero dar mis mas sinceros agradecimientos a la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz y a la M. en C. Leticia Bucio Ortiz por su paciencia y dedicación en mi formación profesional.

A:

LA MEMORIA DE MI MADRE

MIS HERMANOS

MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS

***ESTUDIO DE ALGUNAS ALTERACIONES EN CELULAS FETALES HEPATICAS
HUMANAS (WRL-68) PRODUCIDAS COMO RESULTADO DE EXPOSICION AL
CADMIO. EFECTO DEL METAL SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO A LA
CELULA***

INDICE

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS..... | i |
| I-INTRODUCCION | |
| 1.1 <i>Antecedentes Históricos.....</i> | <i>1</i> |
| 1.2 <i>Fuentes de contaminación por cadmio.....</i> | <i>1</i> |
| 1.3 <i>Metabolismo del cadmio.....</i> | <i>3</i> |
| 1.4 <i>Generalidades en relacion con la toxicidad inducida por cadmio</i> | |
| 1.4.1 <i>Individuos.....</i> | <i>5</i> |
| 1.4.2 <i>Nivel celular.....</i> | <i>7</i> |
| 1.5 <i>Metalotioneína y glutatión como protectores de la citotoxicidad inducida por cadmio.....</i> | <i>8</i> |
| 1.6 <i>Mecanismos para explicar la toxicidad producida por cadmio.....</i> | <i>10</i> |
| 1.6.1 <i>Lipoperoxidación.....</i> | <i>11</i> |
| 1.6.2 <i>Interacción con grupos sulfhidrilo (SH).....</i> | <i>12</i> |
| 1.6.3 <i>Desplazamiento de metales esenciales.....</i> | <i>14</i> |
| 1.7 <i>Modelos utilizados para estudiar el efecto del cadmio.....</i> | <i>16</i> |
| II-OBJETIVOS..... | 18 |
| III-MATERIALES Y METODOS | |
| III.1 <i>Cultivo celular.....</i> | <i>19</i> |
| III.2 <i>Viabilidad de las células WRL-68 expuestas a cadmio.....</i> | <i>19</i> |
| III.3 <i>Tipos de tratamientos de las células WRL-68 con el cadmio.....</i> | <i>20</i> |
| III.4 <i>Microscopía</i> | |
| III.4.1 <i>Microscopía óptica.....</i> | <i>20</i> |

| | |
|---|----|
| III.4.2 Microscopía electrónica de transmisión..... | 20 |
| III.5 Cinética de proliferación de las células tratadas crónicamente con cadmio..... | 21 |
| III.6 Determinación de las actividades enzimáticas..... | 21 |
| III.6.1 Lactato deshidrogenasa (LDH)..... | 21 |
| III.6.2 Aspartato amino transferasa (ASAT)..... | 22 |
| III.6.3 Alanina amino transferasa (ALAT)..... | 22 |
| III.7 Determinación del grado de lipoperoxidación..... | 23 |
| III.8 Determinación del contenido de metalotioneína..... | 24 |
| III.9 Determinación del contenido de grupos sulfhidrilo (SH)..... | 25 |
| III.10 Acumulación de cadmio en las células WRL-68..... | 26 |
| III.11 Efecto de la nifedipina, verapamil y cadmio en la entrada de calcio en las células WRL-68..... | 26 |
| III.12 Efecto de diferentes concentraciones de cadmio en la acumulación de calcio..... | 27 |
| III.13 Determinación del tipo de inhibición que presenta el cadmio sobre la entrada de calcio..... | 28 |
| III.14 Determinación de la constante de inhibición (Ki) del cadmio sobre la acumulación de calcio..... | 28 |
| III.15 Participación de los grupos sulfhidrilo (SH) en la inhibición de la entrada de calcio por el cadmio..... | 29 |
| III.16 Contenido de proteína..... | 29 |
| III.17 Tratamiento estadístico de los datos..... | 30 |

IV-RESULTADOS

| | |
|---|-----------|
| <i>IV.1 Viabilidad de las células WRL-68 expuestas a cadmio.....</i> | <i>31</i> |
| <i>IV.2 Alteraciones morfológicas de las células WRL-68 expuestas a cadmio</i> | |
| <i>IV.2.1 Microscopía óptica.....</i> | <i>33</i> |
| <i>IV.2.2 Microscopía electrónica de transmisión.....</i> | <i>33</i> |
| <i>IV.3 Cinética de proliferación de las células WRL-68 tratadas "crónicamente" con CdCl₂.....</i> | <i>42</i> |
| <i>IV.4 Determinación de las actividades enzimáticas en las células WRL-68 expuestas a cadmio</i> | |
| <i>IV.4.1 Lactato deshidrogenasa.....</i> | <i>44</i> |
| <i>IV.4.2 Aspartato amino transferasa.....</i> | <i>44</i> |
| <i>IV.4.3 Alanina amino transferasa.....</i> | <i>46</i> |
| <i>IV.5 Grado de lipoperoxidación en las células WRL-68 intoxicadas con cadmio..</i> | <i>49</i> |
| <i>IV.6 Efecto del cadmio en la inducción de metalotioneína.....</i> | <i>49</i> |
| <i>IV.7 Efecto del cadmio en el contenido de grupos sulfhidrilo.....</i> | <i>51</i> |
| <i>IV.8 Contenido de cadmio total, pegado e internalizado en las células WRL-68</i> | <i>54</i> |
| <i>IV.9 Efecto de la nifedipina, verapamil y cadmio sobre la entrada de calcio en las célula WRL-68.....</i> | <i>57</i> |
| <i>IV.10 Efecto de diferentes concentraciones de cadmio sobre la entrada de calcio en la células WRL-68.....</i> | <i>59</i> |
| <i>IV.11 Determinación del tipo de inhibición y el valor de la constante de inhibición (K_i) del cadmio sobre la entrada de calcio.....</i> | <i>61</i> |

| | |
|---|-----------|
| <i>IV.12 Participación de los grupos sulfhidrilo (SH) en la inhibición de la entrada de calcio por el cadmio.....</i> | <i>64</i> |
|---|-----------|

V-DISCUSSION

| | |
|--|-----------|
| <i>V.1 Alteraciones funcionales y morfológicas producidas por el cadmio en las células WRL-68.....</i> | <i>68</i> |
|--|-----------|

| | |
|--|-----------|
| <i>V.2 Efecto del cadmio sobre el transporte de calcio en las células WRL-68....</i> | <i>78</i> |
|--|-----------|

| | |
|-----------------------------|-----------|
| VI-BIBLIOGRAFIA..... | 82 |
|-----------------------------|-----------|

ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|--|
| <i>ASAT</i> | <i>Aspartato Amino Transferasa</i> |
| <i>ALAT</i> | <i>Alanina Amino Transferasa</i> |
| <i>LDH</i> | <i>Lactato Deshidrogenasa</i> |
| <i>SH</i> | <i>Grupos Sulfhidrilo</i> |
| <i>MT</i> | <i>Metaltioneína</i> |
| <i>GSH</i> | <i>Glutati3n</i> |
| <i>BSO</i> | <i>Buionina Sulfoximina</i> |
| <i>LPO</i> | <i>Lipoperoxidaci3n</i> |
| <i>FA</i> | <i>Fosfatasa Alcalina</i> |
| <i>NEM</i> | <i>N-etilmaleimida</i> |
| <i>DTT</i> | <i>Ditiotreit3l</i> |
| <i>K_i</i> | <i>Constante de inhibici3n</i> |
| <i>DMEM</i> | <i>Medio Modificado de Eagle de Dulbecco</i> |
| <i>h</i> | <i>Horas</i> |
| <i>d</i> | <i>Días</i> |
| <i>min</i> | <i>Minuto</i> |
| <i>cel</i> | <i>C3lulas</i> |
| <i>rpm</i> | <i>Revoluciones por minuto</i> |
| <i>NADH</i> | <i>Nicotinamida Aden3n Dinucle3tido Reducido</i> |
| <i>NAD</i> | <i>Nicotinamida Aden3n Dinucle3tido Oxidado</i> |
| <i>°C</i> | <i>Grados cent3grados</i> |
| <i>nm</i> | <i>Nan3metros</i> |

| | |
|------------------------|--|
| <i>mU</i> | <i>Miliunidades</i> |
| <i>ml</i> | <i>Mililitros</i> |
| ΔE | <i>Cambio de extinción</i> |
| <i>U</i> | <i>Unidades</i> |
| <i>MDA</i> | <i>Malondialdehído</i> |
| <i>PBS</i> | <i>Solución Amortiguadora de Fosfatos</i> |
| <i>ppm</i> | <i>Partes por millón</i> |
| μg | <i>Microgramos</i> |
| <i>vol</i> | <i>Volumen</i> |
| <i>mg</i> | <i>Miligramos</i> |
| <i>DTNB</i> | <i>5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico</i> |
| <i>EDTA</i> | <i>Acido etilendiamino-tetra-acético</i> |
| <i>cpm</i> | <i>Cuentas por minuto</i> |
| <i>sol</i> | <i>Solución</i> |
| <i>DL₅₀</i> | <i>Concentración que causa un 50% en la perdida de la viabilidad celular</i> |
| <i>kg</i> | <i>Kilogramo</i> |
| <i>RNAm</i> | <i>Acido Ribonucleico mensajero</i> |
| <i>l</i> | <i>Litro</i> |

I-INTRODUCCION

I.1 ANTECEDENTES HISTORICOS

El cadmio es un elemento que se encuentra en la naturaleza asociado a muchos minerales. El hombre ha liberado cadmio al ambiente sin saberlo desde que estuvo capacitado para fundir y refinar metales como zinc, plomo y cobre. Dos investigadores alemanes, Strohmeier y Hermann, descubrieron el cadmio de manera independiente y casi simultánea en 1817. Estos investigadores examinaron algunas muestras de carbonato de zinc procedentes de Salzgitter, Alemania, un óxido de color café y un sulfuro amarillo que al calentarlo se obtuvo un metal nuevo en estado impuro, al que llamaron erróneamente cadmio, ya que deriva de una palabra griega que significa óxido de zinc (Nriagu 1980).

I.2 FUENTES DE CONTAMINACION POR CADMIO

El cadmio es un metal pesado que se encuentra en la corteza terrestre en una concentración en promedio de 0.15-0.2 ppm. Está ampliamente distribuido en rocas, carbón, arena, cal, sedimentos oceánicos y en el suelo (Waldron 1980). Las actividades mineras tanto para el cadmio como para otros metales, son la fuente más evidente de contaminación y las que pueden causar las concentraciones más altas del cadmio en el ambiente, ya que este metal se encuentra frecuentemente asociado a diversos minerales (Friberg et al 1974). El cadmio está presente en las actividades industriales, ya sea formando parte de la materia prima (Nriagu 1980), o como subproducto del proceso, como es el caso de la obtención del zinc (Cammarota 1980). Las industrias que contribuyen al incremento ambiental del cadmio son las de las

baterías, acumuladores, cables eléctricos, celdas fotoeléctricas, cloruro de polivinilo, colorantes, equipos nucleares, fusibles, joyería, soldadura, tapones de extinguidores, obtención del zinc, etc. (Nriagu 1980). La mayor parte del cadmio que se emite a la atmósfera se deposita en la tierra y en las aguas de la región cercana a la fuente de emisión (Nriagu 1982). A partir de éstas, el cadmio ingerido por los organismos es transportado a todos los eslabones de la cadena alimenticia. Esta vía es la principal fuente de contaminación por cadmio para los animales y el hombre. En las aguas superficiales, el cadmio se presenta como un ion libre y su solubilidad depende de la dureza, del pH, en este medio se une a la materia particulada (Street 1978). Cuando las aguas dulces llegan al mar, el Cd^{+2} , al igual que los iones de otros metales pesados, tiende a depositarse en los sedimentos y así queda limitado en las aguas de las costas y los estuarios (Waldron 1980). Por lo general, las concentraciones de este elemento en el agua potable son menores a $5\mu\text{g/l}$ mientras que en el agua de mar, oscilan entre 0.03 y 0.04 $\mu\text{g/l}$ (Albert 1990). Las principales fuentes de contaminación del agua potable son las áreas metalúrgicas, los desechos industriales y los desagües de minas (Waldron 1980), también la filtración de cadmio a los mantos freáticos a partir de los lodos que contengan óxidos de cadmio (Friberg et al 1974). Generalmente, las concentraciones de este metal en los suelos oscilan entre 0.01 y 0.5mg/kg (Albert 1990). Las principales variaciones en el contenido de cadmio en el suelo se deben a la composición de la roca madre y al suministro de metales que provienen de los fertilizantes (Herrero y Martín 1993), los abonos y la contaminación atmosférica. En los suelos ácidos, el cadmio se intercambia fácilmente, lo que lo hace disponible para las plantas (Cavallaro y McBride 1978). Los lodos de las aguas negras y los fertilizantes que se utilizan en la agricultura pueden también contaminar el suelo con cadmio (Garate et al 1993). Las principales fuentes de contaminación del aire por el cadmio son la industria metalúrgica

(Waldron 1980) y los valores son de aproximadamente 0.002 µg/m³ (Albert 1990). Este elemento, al igual que el plomo, se transfiere de un lugar a otro a través de procesos físicos como el viento y la erosión y de los procesos biológicos. Los vegetales, pueden asimilar cantidades considerables de cadmio a partir de suelos contaminados (Garate et al 1993). Se sabe que en esta asimilación pueden influir una serie de factores tales como el tipo de suelo, el pH y la concentración de otros minerales (Street 1978). Aunque los mecanismos de translocación no se han estudiado del todo, se sabe que, por lo general, las semillas y los granos tienen concentraciones más bajas del metal que las hojas (Street 1978). En los organismos marinos, las concentraciones de cadmio son mucho más elevadas que en el agua de mar. La información sobre la contaminación y los efectos tóxicos en los animales terrestres es escasa (Albert 1990).

1.3 METABOLISMO DEL CADMIO

Actualmente se ha puesto más atención al metabolismo de este metal ya que su concentración en el ambiente ha aumentado y, por lo tanto, puede tener efectos adversos sobre el ser humano. A nivel general se sabe que el metal se absorbe a nivel de la mucosa intestinal, de la piel y del pulmón (Rahola 1972). La absorción va a depender de la vía de administración y de la forma química en que se encuentre el cadmio. El metal en el agua puede estar en cuatro diferentes formas: a) disuelto, b) como complejo soluble, c) como partícula inorgánica u orgánica, d) como partícula adsorbida (Eichhorn 1973). En varios reportes en los que se estudió la absorción de cadmio radiactivo en ratas, ratones y monos, se encontró que la proporción fluctuaba entre 0.5 y 3% del total (Albert 1990). En los seres humanos, estos porcentajes son más elevados, entre el 3 y el 8%, aunque los límites son muy amplios 0.5 a 12%. Las personas con baja concentración de hierro en la sangre tienen una absorción de cadmio cuatro veces

mayor que los individuos con concentraciones normales de hierro. Este factor y otros, como son la deficiencia de proteínas, calcio, etc., pueden favorecer considerablemente la absorción del cadmio (Nomiyama et al 1975). El cadmio, entra al organismo también por vía respiratoria y entre el 10 y 50% de las partículas de cadmio que son inhaladas, se depositan en la parte alveolar de los pulmones (Bus et al 1978). Se ha estudiado muy poco la absorción del cadmio a través de la piel.

Después de ser absorbido, el cadmio se transporta por la sangre a todas las partes del organismo. La distribución de los metales en los diversos órganos u organelos subcelulares va a depender de los mecanismos de transporte a través de la membrana plasmática y de la afinidad por los ligandos presentes en la célula. Por ejemplo, el transporte del ion hierro es mediado por un acarreador, la transferrina y la gran afinidad del Cu, del Zn, del Cd y del Hg por la metalotioneína (Yamada y Koizumi 1993) que parece ser importante en el transporte de estos metales a los órganos. En animales de experimentación, se ha encontrado que se retiene en los glóbulos rojos, en donde se une con proteínas de bajo peso molecular, probablemente las metalotioneínas (Garty et al 1986). El cadmio se acumula principalmente en el hígado y en el riñón (Ballatori y Boyer 1986, Blazka et al 1988) también, pero en menor concentración se encuentra en otros órganos y tejidos como los músculos, el páncreas, las glándulas salivales y el sistema nervioso central, aunque en éste último se presenta en muy bajas concentraciones (Waldron 1980).

La principal vía de eliminación del cadmio en el ser humano es la orina; en promedio, las concentraciones en ella son inferiores a 5 µg/día. En animales de experimentación, después de la administración continua de una dosis conocida de Cd⁺², la eliminación urinaria de este elemento fue menor al 2% de la cantidad diaria absorbida (Rehm y Waalkes 1990). Tanto la

bilis, como las secreciones de las glándulas paróidas y del páncreas, contribuyen a la eliminación fecal del cadmio y solo pequeñas cantidades de él se llegan a eliminar por el sudor, la exfoliación epitelial y el pelo (Elinder 1979).

I.4 GENERALIDADES EN RELACION CON LA TOXICIDAD INDUCIDA POR CADMIO

I.4.1 INDIVIDUOS

La intoxicación por cadmio en el hombre puede resultar de la inhalación o de la ingestión. La ingestión de alimentos o bebidas contaminadas con cadmio pueden causar transtornos agudos en el tracto gastrointestinal. Los síntomas incluyen náusea, salivación, vómito, dolor abdominal y cefalea. En casos más severos se pueden presentar diarrea y llegar hasta la conmoción (Waldron 1980). La dosis letal oral para el hombre se ha determinado en rangos de miligramos (90mg/kg). Los síntomas que produce la inhalación de cadmio son: cefalea, irritación del tracto respiratorio, resequedad nasal y traqueal, tos, disnea, escalofríos, debilidad general, fiebre y en casos más severos insuficiencia respiratoria con conmoción y finalmente la muerte (Waldron 1980). El cadmio produce neumonitis química y en algunas ocasiones, edema pulmonar (Chowdhury et al 1993). Este tipo de intoxicación se debe principalmente, a la inhalación de humos generados durante la soldadura de materiales que contienen cadmio o por la refinación o fundición de otros materiales. Algunos investigadores sugieren que la concentración letal de polvos de óxido de cadmio para seres humanos es de 5 mg/m³, inhalados durante un período de ocho horas (Waldron 1980). La exposición crónica de cadmio en el hombre y animales experimentales (Friberg et al 1974, Iturri y Peña 1986) causa daño en el riñón con proteinuria, caracterizada por alfa, beta y gamma-globulinuria,

albúminuria, transferrina e inmunoglobulinas, aminoaciduria, hipercalciuria y glucosuria. Los pesos moleculares de las proteínas varían desde 10,000 a 200,000 daltones. Entre otras están presentes muramidasa y ribonucleasa (Lauwerys et al 1974). También se ha determinado que el cadmio cambia la hidroxilación de la 25-hidroxivitamina D a 1,25-hidroxivitamina D en el riñón, reduciendo la absorción de calcio en el tracto gastrointestinal (Feldman y Cousins 1973), causando una alteración general en el metabolismo celular. El cadmio induce hipertensión "in vivo", así como vasoconstricción "in vitro" y arterioesclerosis "in vitro" (Kagi et al 1992), sugiriendo que puede inducir daño endotelial. Nolan y Shaikh (1986), sugieren que el primer efecto en una administración aguda de cadmio, es la pérdida de la integridad del endotelio vascular y la permeabilidad de éste. En ratas o conejos tratados crónicamente con cadmio se induce hipertensión, la cual fue prevenida por Zn o agentes quelantes (Kostrzewska y Laudanski 1991). Se ha observado desmineralización ósea (osteomalasia) y daño renal (nefropatía) como resultado de una exposición crónica al cadmio (Vallee y Ulmer 1972). También se ha reportado que la administración crónica de cadmio en animales induce atrofia gonadal, mientras que una aguda, ocasiona su destrucción; esto, aparentemente debido a un daño vascular. Antes o simultáneamente a la administración de cadmio, el Zn, Mn, Se, tioles y ciertas hormonas previenen los cambios antes mencionados, a través de una redistribución de Cd a otros órganos y tejidos (Vallee y Ulmer 1972). El cadmio tiene efectos teratogénicos (Mills y Ferm 1989) y mutagénicos (Ramel y Magnusson 1969). Una manifestación de toxicidad aguda por cadmio es la necrosis hepática (Dudley et al 1984), reflejada por la liberación de transaminasas a la sangre y cuantificadas como un indicador de hepatotoxicidad (Salaspuro 1987). En el hígado humano, la aspartato amino transferasa (ASAT) tiene dos isoenzimas, una asociada con el citoplasma y otra con la mitocondria. Se considera que el cadmio induce la liberación de esta enzima. El

mecanismo por el cual sucede esto no es conocido. La alanina amino transferasa (ALAT), es la otra enzima y se encuentra casi exclusivamente en el citoplasma de las células hepáticas, la cual se libera al torrente sanguíneo como consecuencia del incremento en la permeabilidad de la membrana debido al daño hepático (Salaspuro 1987). La ALAT se considera la enzima más sensible y específica indicadora de daño hepatocelular agudo (Coodley 1971).

I.4.2 NIVEL CELULAR

A nivel celular se conoce poco acerca de la citotoxicidad inducida por el cadmio. En células aisladas de hígado y riñón, el cadmio causa una liberación de enzimas citosólicas como la aspartato amino transferasa, la alanina amino transferasa, la gama-glutamyl transpeptidasa y la beta-N-acetilglucosaminidasa (Yoshida et al 1993). Un incremento extracelular de la lactato deshidrogenasa (LDH) en respuesta a la exposición al metal, indica daño inducido en la membrana plasmática (Beattie et al 1990). Se ha reportado también una disminución en la actividad de la superóxido dismutasa (Hussain et al 1987), en el potasio intracelular (Farris 1985), aumento de lipoperoxidación (Stacey et al 1980a, Müller 1983), disminución en el contenido de glutatión (Müller y Ohnesorge 1982), inhibición de enzimas como la glutatión peroxidasa (Müller 1986), la catalasa (Shukla et al 1989) y la citocromo oxidasa (Müller y Stacey 1988). También se presenta una acumulación de Ca^{+2} intracelular dado por un flujo de calcio extracelular (Farber 1981). Beattie et al (1990), reportan que el cadmio inhibe la secreción de proteínas en hepatocitos, probablemente porque interfiere con la membrana plasmática y la exocitosis de la proteína. Se ha demostrado que el cadmio induce la síntesis de metalotioneína (Eaton et al 1980), la cual puede considerarse como responsable de la acumulación del metal en los tejidos (Elinder 1987).

1.5 METALOTIONEINA Y GLUTATION COMO PROTECTORES DE LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR CADMIO

Se le ha dado a la metalotioneína (MT) intracelular un papel protector en la intoxicación inducida por el cadmio (Goering y Klaassen 1984a). Gran parte (75-80%) del cadmio que se acumula en el hígado y los riñones de los mamíferos se une a esta proteína soluble, inducible y de bajo peso molecular con alta afinidad para metales (Waalkes et al 1984a, Nielson et al 1985). Esta proteína, que tiene una extraordinaria afinidad por este catión, fue aislada por primera vez en 1957 y se encontró que contenía concentraciones elevadas de zinc, entre 2-25% y cadmio 5-9%, de ahí se deriva su nombre de metalotioneína (Waldron 1980). Su peso molecular varía entre 6000 y 7000 daltones. Aunque hay pocos estudios de la conformación de la proteína, se ha establecido que tres grupos sulfhidrilo (SH) están involucrados en la unión con el metal y se le atribuyen al aminoácido cisteína (Waalkes et al 1984b, Waalkes y Klaassen 1984c). Es probable que las metalotioneínas desempeñen una función biológica muy importante en la regulación del Cu^{+2} , del Zn^{+2} y en la desintoxicación de metales pesados (Goering y Klaassen 1984b, Christie y Costa 1984, Cousins 1985, Webb 1986, Dunn et al 1987). Tanto en el hombre como en los animales, esta proteína se encuentra distribuida en todo el organismo y se ha aislado de riñón, de hígado, de bazo, de intestino, de corazón, de cerebro, de pulmón y de piel (Cousins 1985). En el hígado de rata, de ratón y de conejo (Webb 1972), la metalotioneína es conocida como una proteína inducible, la cual es sintetizada en respuesta a la entrada de cationes tóxicos. En cultivos primarios de hepatocitos (Failla et al 1979) y en líneas celulares hepáticas (Gerson y Shaikh 1982), el cadmio induce la síntesis de MT como resultado de un incremento en la transcripción del gen (Karin et al 1981). Al parecer, es la causante de la larga vida media biológica del cadmio y, mientras persiste este catión, hay una

rotación continua entre la degradación completa y la resíntesis de la proteína.

El glutati3n (GSH), es un reservorio no proteico del hígado que est3 involucrado en muchos procesos celulares, tales como: el transporte membranal, las vías metab3licas, las actividades enzim3ticas, el mantenimiento en la integridad de la membrana celular, la sntesis de macromol3culas, la protecci3n de la c3lula contra radicales libres y los metabolitos t3xicos de origen end3geno y ex3geno, etc. (Arrick et al 1984, Kang y Enger 1990). El GSH est3 presente en altas concentraciones en el hígado, que es el 3rgano mayormente involucrado en la biotransformaci3n de xenobi3ticos por conjugaci3n e inactivaci3n de los metabolitos (Ponsoda et al 1991). Los compuestos que como una consecuencia de su biotransformaci3n disminuyen el GSH hep3tico, pueden indirectamente causar efectos t3xicos debido a un incremento en el estres oxidativo. La toxicidad en este caso depende probablemente del balance entre la formaci3n de metabolitos reactivos y la disponibilidad de GSH y de su sntesis (Ponsoda et al 1991). Estudios recientes sugieren que el GSH juega un papel protector importante en las primeras respuestas citot3xicas al cadmio (Kang y Enger 1988). El GSH puede unirse con ciertos metales divalentes tales como el Cd a trav3s de los grupos sulfhidrilo (SH) libres presentes en este trip3ptido. Singhal et al (1987), reportan un aumento en la toxicidad producida por cadmio al pre-tratar ratones con butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor de la sntesis de GSH. La citotoxicidad producida por cadmio parece explicarse en funci3n de la cantidad de ion Cd libre presente en la c3lula, el cual no es secuestrado por el GSH o la MT (Suzuki y Cherian 1989). El Zinc (Zn) es un elemento esencial y protege de la hepatotoxicidad producida por varios agentes y metales pesados, entre ellos el Cd (Goering y Klaassen 1984b, Fukino et al 1986). El mecanismo de protecci3n del Zn ha sido atribuido a: 1) estabilizaci3n de las membranas de los lisosomas, las mitocondrias y los microsomas, resultando en una resistencia a la lipoperoxidaci3n en las

membranas (Thomas et al 1986); 2) inhibición de la actividad de la monooxigenasa dependiente de citocromo P-450, así reduce la cantidad de metabolitos tóxicos disponibles para unirse covalentemente a organelos o proteínas (Liu et al 1992b); 3) estabilización de los grupos tioles y activación de enzimas asociadas a glutatión (Fukino et al 1986, Cho y Fong 1990) y 4) secuestro de radicales libres e iones metálicos por la metalotioneína inducida por el Zn (Goering y Klaassen 1984b, Dunn et al 1987).

1.6 MECANISMOS PARA EXPLICAR LA TOXICIDAD PRODUCIDA POR CADMIO

En general se considera que la unión del metal a un ligando puede ser a través de numerosos grupos tales como el hidroxilo, el amino, el carboxilo, el sulfhidrilo, etc. La concentración de un metal en un tejido depende de la presencia y la biodisponibilidad del grupo químico al cual se une el metal. Esta existencia varía con el tipo de tejido, de célula que forma el tejido y aún con el tipo de estructura subcelular. La biodisponibilidad de los ligandos depende en su organización en las macromoléculas (Eichhorn 1973). El mecanismo bioquímico de la citotoxicidad inducida por cadmio, no se conoce con exactitud, aunque se han descrito algunos con base a los datos obtenidos experimentalmente entre los cuales están la lipoperoxidación, la interacción con los grupos sulfhidrilo (SH) y el desplazamiento de metales esenciales.

1.6.1 LIPOPEROXIDACION

El proceso de lipoperoxidación (LPO) ha sido relacionado con fenómenos como la inflamación, el envejecimiento, el cáncer y la toxicidad de agentes químicos (Halliwell y Gutteridge 1985). Durante la lipoperoxidación los ácidos grasos poliinsaturados son peroxidados por un mecanismo de radicales libres (Yamamoto 1991). La lipoperoxidación se ha considerado como un posible mecanismo de toxicidad inducida por el cadmio (Sunderman 1986,

Ochi et al 1987), lesionando la membrana celular con un aumento en la permeabilidad. Afortunadamente, la célula hepática tiene mecanismos de defensa los cuales pueden protegerla de los efectos de la LPO. En el hígado, los componentes más importantes de este mecanismo de defensa son el glutatión y la vitamina E (Kawase et al 1989). "In vivo" se ha demostrado el aumento en el grado de lipoperoxidación en el hígado, el riñón, el cerebro, el pulmón, el corazón y el testículo de rata como consecuencia del tratamiento con cloruro de cadmio (Sato et al 1983, Manca et al 1991). El mismo efecto ha sido observado en hepatocitos tratados "in vitro" (Stacey et al 1980a). La peroxidación de los ácidos grasos insaturados dentro de las membranas biológicas resulta en una serie de eventos bioquímicos, los cuales llevan a la inactivación de funciones enzimáticas en varios organelos subcelulares. Shukla et al (1987) y Hussain et al (1987), reportan inhibición de la actividad de la superóxido dismutasa con cadmio, tanto "in vivo" como "in vitro" en el hígado, el riñón y el cerebro. Ellos sugieren que la principal causa en el incremento de la lipoperoxidación y las lesiones tóxicas en estos tejidos se puede atribuir a la inactivación de ésta enzima que trae como consecuencia una acumulación del anión superóxido. Andersen y Andersen (1988) sugieren otra posible causa en el incremento de la lipoperoxidación causado por el cadmio y se refieren a los niveles de glutatión (GSH), ya que lo consideran un factor importante en la regulación de la lipoperoxidación (Halliwell y Gutteridge 1985, Yujinagasaka et al 1989). El cadmio disminuye los niveles de glutatión (Sugawara y Sugawara 1984) y la actividad de la glutatión peroxidasa en hígado y riñón (Jamall y Smith 1985). La actividad de esta enzima depende del contenido del glutatión, de tal manera que el incremento en la LPO puede ser causada por un decremento en la concentración de GSH por el cadmio, o por una acción directa en la glutatión peróxidasa (Jamall y Smith 1985). Los peróxidos orgánicos llevan a la muerte celular, posiblemente por dos mecanismos: 1)

peroxidación de los lípidos de la membrana celular y 2) alterando la homeostasis de Ca^{+2} como una consecuencia de la oxidación de los tioles de las proteínas (Poli et al 1987). Varios estudios "in vivo" e "in vitro" han demostrado la presencia de lipoperoxidación en diferentes órganos después de una exposición a cadmio y se ha postulado si esta LPO es el mecanismo responsable para la toxicidad causada por el cadmio, o es sólo un resultado del daño en el tejido causado por otras reacciones tóxicas (Andersen y Andersen 1988). Algunos experimentos "in vitro" indican que la lipoperoxidación no es el primer evento responsable de la citotoxicidad inducida por cadmio (Stacey et al 1980a, Müller 1986), sino un proceso secundario del daño producido en la membrana celular. Sin embargo, el ataque peroxidativo a los fosfolípidos de la membrana celular por el Cd, puede alterar la integridad de la membrana celular, integridad necesaria para una función normal de la célula (Müller 1986).

1.6.2 INTERACCION CON GRUPOS SULFHIDRILLO (SH)

La exposición a metales pesados, resulta en una variedad de alteraciones bioquímicas tanto en el hígado como en el riñón. Muchos de esos efectos se han explicado en función de la capacidad de los metales para unirse a sitios nucleofílicos en la célula, entre ellos, los grupos sulfhidrilo (SH) libres (Maines y Kappas 1977). Entre los efectos están una desactivación de sistemas enzimáticos "in vitro" e "in vivo" (Vallee y Ulmer 1972). La hemo oxigenasa microsomal hepática es una enzima dependiente de sulfhidrilo y es responsable de la degradación oxidativa del grupo hemo a tetrapirrol. Muchos metales pesados inhiben la actividad de la hemo oxigenasa "in vitro", por interactuar directamente en el sitio regulatorio de la enzima (Maines y Kappas 1977). Así la interacción con los grupos sulfhidrilo que contiene la enzima, disminuye la biotransformación hepática. La fosfatasa ácida (FA), es una enzima que hidroliza ésteres de fosfato y se localiza en los lisosomas. Los lisosomas son capaces de almacenar metales

no esenciales como el Cd. Se ha reportado que el Cd inhibe la actividad de esta enzima por unirse a los grupos sulfhidrilo de la enzima, causando la pérdida de su función (Vallee y Ulmer 1972). Prasada y Gardner (1986), reportan que el cadmio reduce la actividad de la citocromo oxidasa, probablemente debido a la interacción del metal con el grupo sulfhidrilo en la porción hemo del citocromo. El glutatión reducido y los tioles son muy importantes en regular la permeabilidad de la membrana por mantener los grupos sulfhidrilo en estado reducido. Ciertas proteínas son altamente sensibles a los cambios en los grupos SH, tal es el caso de la ATPasa dependiente de Ca, la cual funciona como una bomba que mantiene los niveles de calcio intracelular (Olafsdottir et al 1988). El cadmio inhibe la actividad de esta proteína (Verboost et al 1989), y una alteración en la homeostasis de Ca lleva a la muerte celular. Li et al (1993) han estudiado distintas alteraciones en el citoesqueleto inducidas por el cadmio, sugiriendo que este puede jugar un papel importante para explicar el daño celular por este metal. Las proteínas del citoesqueleto como la tubulina contienen residuos de cisteína y ciertos grupos sulfhidrilo que son importantes para la polimerización y para mantener la estructura y función del mismo. Por lo tanto, la despolimerización de los microtúbulos en células tratadas con cadmio, puede resultar de la pérdida de esos grupos esenciales presentes en la proteína tubulina como un resultado de la unión de cadmio durante un período inicial (Li et al 1993) y esto puede representar una parte integral de la respuesta tóxica debida al metal. Failla et al (1979) reportan que la entrada de cadmio y zinc en hepatocitos aislados ocurre por un acarreador dependiente de grupos sulfhidrilo y que el bloqueo de estos reduce la entrada de ambos metales a la célula (Failla et al 1979). Gerson y Shaikh (1984) reportan que la acumulación de cadmio en hepatocitos aislados depende de la interacción con grupos sulfhidrilo de las proteínas de la membrana plasmática ya que bloqueando éstos con N-etilmaleimida (NEM), se disminuye la entrada de Cd. Stacey (1986)

estudió la relación de los grupos SH en los eventos citotóxicos del cadmio. Utilizando ditioneitrilo (DTT), un agente reductor de grupos SH, encontró una disminución en la citotoxicidad inducida por el metal. El DTT tiene la habilidad de mantener en estado reducido a los grupos SH, así que el mecanismo de toxicidad causado por el cadmio, parece involucrar la interacción del metal con los grupos tioles de la membrana celular.

1.6.3 DESPLAZAMIENTO DE METALES ESENCIALES

El hígado es el órgano crítico en la homeostasis de los metales esenciales tales como el Ca, el Cu, el Fe y el Zn (Blazka y Shaikh 1992b). El cadmio es uno de los metales más tóxicos y puede alterar el metabolismo y función de metales esenciales como el Cu, el Zn, el Fe, el Mn, el Se y el Ca al competir por los ligandos en los sistemas biológicos (Petering et al 1979, Schafer y Forth 1984). No se conoce el mecanismo por el cual los metales no esenciales penetran a la célula, se propone que podría ser a través de los sistemas existentes para los metales esenciales (Blazka y Shaikh 1992b), desplazándolos de sus sitios de unión y alterando por lo tanto la función celular. Se ha demostrado que el cadmio inhibe muchas enzimas (Valle y Ulmer 1972), compete con el calcio (Babitch 1988) y altera patrones de fosforilación (Suzuki et al 1985). Un sitio blanco del cadmio es la unión a la proteína calmodulina, la cual contiene cuatro dominios de unión al Ca^{+2} . El cadmio puede ocupar esos cuatro sitios causando cambios conformacionales en la calmodulina (Flik et al 1987). La entrada de calcio a la célula hepática es por canales específicos y el cadmio inhibe esta entrada, probablemente porque interactúa directamente con el canal (Blazka y Shaikh 1991). Varios investigadores han demostrado que el cadmio disminuye los niveles de Fe "in vivo" (Bonner et al 1980). La entrada hepática de Fe ocurre por procesos dependientes de transferrina e independientes de ella (Morgan y Baker 1986, Thorstensen y Romslo 1988). La entrada de Fe que se une a la transferrina, ocurre por

endocitosis mediada por receptor (Thorstensen y Romslo 1988), mientras que el Fe que penetra independientemente de esta proteína, puede hacerlo por un acarreador o canal de membrana (Sturrock et al 1990). El cadmio inhibe la entrada de Fe, probablemente por competir por el sitio de unión del acarreador o del canal de membrana (Sturrock et al 1990). El cadmio compite con los metales esenciales por los sitios de unión de los acarreadores y canales iónicos en la membrana celular. Esto es apoyado por estudios (Stacey y Klaassen 1980b, 1981, Ettinger et al 1986, Blazka y Shaikh 1991) en los que se sugiere que el cadmio compite con el Ca, el Cu y el Zn por una misma vía de entrada. La internalización de Cu a la célula hepática involucra proteínas específicas de membrana ya sea por un acarreador o por un canal iónico (Harris 1991). Existen evidencias en hepatocitos de que el Cd y el Cu compiten por ligandos que involucran grupos SH (Ettinger et al 1986, Harris 1991). Se ha reportado que la entrada de Zn a los hepatocitos es a través de un acarreador dependiente de grupos sulfhidrilo (Stacey y Klaassen 1981) y se ha observado que el Cd compite con el Zn por esos mismos sitios de unión (Pattison y Cousins 1986). El cadmio altera el transporte de los metales esenciales a la célula por competir por los sitios de unión presentes en los acarreadores o canales iónicos, de tal manera que afecta el metabolismo y la función de estos metales esenciales.

1.7 MODELOS UTILIZADOS PARA ESTUDIAR EL EFECTO DEL CADMIO

Los efectos toxicológicos de los metales pesados pueden deberse a una exposición de tipo "agudo" o "crónico". Para describir la dosis puede estar en términos de la cantidad del agente tóxico al cual el organismo esté expuesto, así como el período de exposición. Los efectos producidos con diferentes tipos de exposición son distintos, ya que la toxicidad crónica puede resultar de la acumulación del agente en el organismo o la acumulación del daño biológico por

dosis repetidas. Hay variaciones en los efectos toxicológicos entre las especies. Los criterios determinados para la selección del modelo animal están dados por una alta sensibilidad al metal y por una similitud en el metabolismo con respecto al hombre (Eichhorn 1973). Una variedad de observaciones revelan que en el hombre los metales pesados pueden producir numerosas alteraciones fisiológicas. La intoxicación con Cd ocasiona nefrotóxicidad, hepatotóxicidad, problemas respiratorios, efectos teratogénicos, carcinogénicos, etc. (Garattini 1986). Tradicionalmente, los animales han sido utilizados como sistemas modelo para predecir los efectos adversos en humanos causados por la exposición a diferentes agentes tóxicos. Utilizando animales, generalmente roedores, ha sido posible determinar y explicar algunos de las alteraciones fisiológicas que se producen debido a la exposición al cadmio. Sin embargo, es difícil contestar en el animal íntegro algunas preguntas a nivel celular, debido a los sistemas homeostáticos presentes, por ello es conveniente utilizar cultivos primarios o líneas celulares. En los cultivos primarios, la exposición al agente tóxico puede ser controlada y pueden ser un sistema para estudiar mecanismos de toxicidad (Sinclair et al 1991). La desventaja más grande de trabajar con cultivos primarios hepáticos, es que las células pierden en un lapso corto las funciones hepatocelulares (Donato et al 1991), sufren alteraciones fenotípicas y disminuyen las actividades de los sistemas que metabolizan los xenobióticos, haciendo de esta manera imposible el analizar en este sistema el efecto de un agente tóxico por períodos prolongados. Las líneas celulares son otro modelo que se ha utilizado para estudiar los efectos tóxicos del cadmio, entre ellas están las LLC-PK de epitelio renal porcino (Prozialeck y Lamar 1993), las MDCK de riñón de perro (Mills y Ferm 1989), las NRK-49F de fibroblastos de riñón de rata (Kang y Enger 1991), las A549-T27 de carcinoma de pulmón humano (Kang y Enger 1990), etc. Las características que presentan los cultivos celulares son: 1) se trata de un solo tipo celular sin

glándulas, sin vasos ni terminales nerviosas, 2) todas las células tienen la misma edad y se les puede sincronizar para que estén en la misma fase del ciclo celular, 3) la composición del medio es conocido, 4) se pueden obtener grandes cantidades de las células, lo que posibilita su análisis bioquímico y 5) se puede conocer las respuestas a nivel celular, sin interferencia de procesos homeostáticos. En el laboratorio se cuenta con una línea celular de origen fetal hepático humano (WRL-68), la cual se ha caracterizado (Gutiérrez et al 1994a) y se ha utilizado para estudios de toxicidad por diversos agentes (Gutiérrez et al 1991, 1992, 1994b, Bucio et al 1994). Nuestro interés está en estudiar a nivel celular las alteraciones morfológicas y algunas modificaciones funcionales producidas por el metal cadmio para poder elucidar uno de los posibles mecanismos de daño celular.

II-OBJETIVOS

- Identificar las alteraciones que el cadmio produce sobre algunos parámetros considerados como medida de daño celular.

- Identificar el efecto del cadmio sobre el transporte de calcio en las células de origen hepático para poder elucidar uno de los posibles mecanismos de daño celular.

III-MATERIALES Y METODOS

III.1 CULTIVO CELULAR

Las células se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). El medio de cultivo utilizado fue Medio Modificado de Eagle de Dulbecco (DMEM) (Sigma), al cual se le adicionó 8% de suero de ternera suplementado con Fe (Hy-clone), 1% de aminoácidos no esenciales (Microlab) y 100 unidades/ml de penicilina con 100µg/ml de estreptomycin. En adelante, al medio así preparado se le llamará DMEM completo. Las células se sembraron sobre cajas de cultivo de plástico estériles (Nunc) y el medio se les cambió cada tercer día. Las células se levantaron de la botella de cultivo con tripsina-verseno al 0.025% (Microlab) una vez a la semana, resemebrándose nuevamente a una dilución de 1:3 a 1:6. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera de 5-10% de CO₂ y 90% de humedad, a una temperatura de 37 °C. Todos los experimentos se realizaron cuando las células se encontraban en fase de crecimiento logarítmica.

III.2 VIABILIDAD DE LAS CELULAS WRL-68 EXPUESTAS A CADMIO

Se sembraron 30,000 células/pozo en multicámaras de 24 pozos (Nunc) con DMEM completo y se dejaron crecer por 24h. Después de este tiempo se les cambió el medio por uno conteniendo el metal en la concentración indicada (de 0 a 100µM de CdCl₂). 24h después se determinó la viabilidad celular utilizando la prueba de azul de tripano a una concentración final de 0.2 %. Se contaron las células que habían excluido el colorante utilizando un hematocitómetro. Los ensayos se realizaron por triplicado.

III.3 TIPOS DE TRATAMIENTOS DE LAS CELULAS WRL-68 CON EL CADMIO

Las condiciones a las que se expusieron las células al cadmio fueron: 0.5 μ M de CdCl₂ durante 24h (leve), 0.5 μ M de CdCl₂ durante 7d (crónico), y 5.0 μ M de CdCl₂ durante 24h (agudo).

III.4 MICROSCOPIA

III.4.1 MICROSCOPIA OPTICA

Las células se observaron diariamente en un invertoscopio con contraste de fases (Zeiss), con el fin de seguir el crecimiento y desarrollo celular.

III.4.2 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

Se sembraron de 80-100,000 células en una multicámara, sobre cubreobjetos de plástico termanox, bajo los diferentes tratamientos de cadmio elegidos. Posteriormente se les retiró el medio de cultivo y se les agregó una solución de glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfatos pH 7.4 durante 15min a temperatura de 4 °C. Pasado este tiempo se cambió la solución y se dejó en contacto con las células por 105 min. Posteriormente, las muestras se lavaron con amortiguador 0.1M de fosfatos suplementado con sacarosa 0.25M. La postfixación se hizo con OsO₄ al 1% en amortiguador de fosfatos. Las muestras se deshidrataron con una serie gradual de concentraciones de etanol y se embebieron en Epon 812. El procesamiento y observación de las células, se llevó a cabo en la Facultad de Medicina en el Dpto. de Biología Celular y Tisular de la UNAM.

III.5 CINETICA DE PROLIFERACION DE LAS CELULAS WRL-68 TRATADAS CRONICAMENTE CON CADMIO

Se sembraron de 30-40,000cel/pozo en una multicámara de 24 pozos con DMEM completo y se dejaron crecer durante 24h. Pasado ese tiempo, se les cambió el medio por uno conteniendo 0.5µM de CdCl₂, el cual fue cambiado diariamente. Cada 24h se levantaron las células de tres pozos y se contaron en un Coulter Counter (ZM). El proceso se repitió durante siete días, que fue el tiempo del tratamiento crónico. La curva control se hizo igual pero en ausencia del CdCl₂. Los resultados se expresaron en número de células por cm².

III.6 DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Se sembraron las células a una densidad de 15,000 cel/cm² en botellas de cultivo con DMEM completo y se dejaron crecer durante 24h. Pasado ese tiempo, se les cambió el medio por uno conteniendo los diferentes tratamientos con cadmio. Las actividades enzimáticas se cuantificaron en el medio de cultivo que estuvo en contacto con las células durante 24h en los diferentes tratamientos con el metal, para ello este medio fue centrifugado durante 10min a 3000rpm para quitar las células muertas y fue almacenado a -70 °C hasta que se realizó la prueba.

III.6.1 LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

La actividad de la LDH se determinó por el método de Moldeus et al (1978), el cual se basa en la reducción del piruvato en presencia de NADH por acción de la LDH para formar lactato y NAD⁺. La velocidad de desaparición del piruvato se midió espectrofotométricamente en la región del ultravioleta cercano (340nm). Se preparó la solución

reactiva con los siguientes compuestos: amortiguador de fosfatos 50mM pH 7.5, piruvato de sodio 0.6mM, NADH 0.18mM y se incubó a 37 °C. En una microlcelda espectrofotométrica se colocaron 0.750ml de solución reactiva y 0.025ml de medio de cultivo de cada uno de los tratamientos, se mezcló y se leyó a 340nm. Se aplicó la relación: Actividad por volumen (mU/ml) = $\Delta E/\text{min} \times 4921$. Los resultados fueron expresados en mU/10⁶ cel.

III.6.2 ASPARTATO AMINO TRANSFERASA (ASAT)

La actividad de la ASAT, se determinó por el método de Reitman y Frankel (1957), el cual se basa en la hidrólisis de alfa-cetoglutarato en presencia de aspartato por la acción de la ASAT para formar glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido se transforma enzimáticamente en malato en presencia de malato deshidrogenasa por medio de NADH. La velocidad de consumo del NADH puede medirse en la región del ultravioleta cercano (340nm). Se preparó una solución reactiva que contenía amortiguador de fosfatos 80mM pH 7.4, L-aspartato 200mM, alfa-cetoglutarato 12mM, NADH 0.18mM, lactato deshidrogenasa 1.2U/ml, malato deshidrogenasa 0.6U/ml y se incubó a 37 °C. En una microcelda espectrofotométrica se colocaron 0.5ml de solución reactiva y 0.125ml de medio de cultivo de cada uno de los tratamientos, se mezcló y se leyó el cambio de absorbancia a 340nm. Se aplicó la relación: Actividad por volumen (mU/ml) = $\Delta E/\text{min} \times 794$. Los resultados fueron expresados en mU/10⁶ cel.

III.6.3 ALANINA AMINO TRANSFERASA (ALAT)

La actividad de la ALAT, se determinó por el método de Reitman y Frankel (1957), el cual se basa en la hidrólisis de alfa-cetoglutarato en presencia de L-alanina

por acción de la ALAT para formar glutamato y piruvato. El piruvato formado se transforma enzimáticamente en lactato por medio de lactato-deshidrogenasa en presencia de NADH. La velocidad de desaparición de este sustrato se midió espectrofotométricamente en la región del ultravioleta cercano (340nm). Se preparó la solución reactiva con los siguientes compuestos: amortiguador de fosfatos 80mM pH 7.4, L-alanina 800mM, alfa-cetoglutarato 18mM, NADH 0.18mM y LDH 1.2U/ml y se incubó a 37 °C. En una microcelda espectrofotométrica se colocaron 0.5ml de solución reactiva y 0.125ml de medio de cultivo de cada uno de los tratamientos, se mezcló y se leyó el cambio absorbancia a 340nm. Se aplicó la relación: $\text{Actividad por volumen (mU/ml)} = \Delta E/\text{min} \times 794$. Los resultados fueron expresados en mU/10⁶ cel.

III.7 DETERMINACION DEL GRADO DE LIPOPEROXIDACION

El grado de lipoperoxidación se determinó por el método de Buege y Aust (1978), el cual se basa en la formación de malondialdehído (MDA) en presencia del ácido tiobarbitúrico. Se sembraron 27,000cel/cm² en botellas de cultivo (Nunc) con DMEM completo y se dejaron crecer durante 24h. Pasado ese tiempo se les cambió el medio por uno de acuerdo a los diferentes tratamientos con cadmio. 24h después las células se lavaron tres veces con PBS y con ayuda de un gendarme de goma se levantaron de la botella de cultivo. Al momento de hacer la determinación las células se lisaron con nitrógeno líquido y de este lisado se tomaron 0.1ml para determinar la concentración de proteína por el método de Lowry et al (1951) y al volumen restante se le adicionó 2ml de una solución reactiva formada por ácido tricloroacético (TCA) al 15%, ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.5% y ácido clorhídrico (HCl) 0.25N. Se mezcló vigorosamente y las muestras se incubaron en baño de agua a 100 °C por 25 min, se dejaron

enfriar y se centrifugó a 3500rpm por 10min. La absorbancia del sobrenadante fue leída contra un blanco (solución reactiva) a 535nm. La concentración de MDA se midió utilizando el coeficiente de extinción molar en la siguiente relación $C = A/El$ en donde C es la concentración de MDA, A es la absorbancia, E es el coeficiente de extinción molar ($1.56 \times 10^5/cm M$) y l es el grosor de la celda. Los resultados fueron expresados por mg de proteína.

III.8 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE METALOTIONEINA

La cuantificación de metalotioneína (MT) se determinó usando el método de saturación con plata de acuerdo a Scheuhammer y Cherian (1986). Se sembraron 45,000cel/cm² en botellas de cultivo (Nunc) con DMEM completo y se dejaron crecer durante 24h. Pasado ese tiempo se les cambió el medio por uno de acuerdo a los diferentes tratamiento con cadmio. 24h después las células se lavaron tres veces con PBS y con ayuda de un gendarme de goma se levantaron de la botella de cultivo. Al momento de hacer la determinación, las células se rompieron con nitrógeno líquido y de este lisado se tomaron 0.1ml para determinar la concentración de proteína y a 0.4ml se le adicionó 1ml de buffer de glicina 0.5M pH 8.5, 1ml de solución de plata 20 ppm, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente en ausencia de luz. Posteriormente, se le adicionó 0.020ml de un hemolisado de rata, se agitó y se incubó en baño de agua a 100 °C por 2 min. Las muestras se dejaron enfriar y se centrifugó a 3000 rpm/10min. El sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro de absorción atómica. La concentración de MT se determinó en base a una curva estándar de plata y aplicando la siguiente fórmula: $\mu g MT = ppm \text{ de plata} \times 3.55 \times vol.total / vol.muestra$. Los resultados fueron expresados por mg de proteína.

III.9 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE GRUPOS SULFHIDRILLO (SH)

El contenido de los grupos sulfhidrilo (SH), se determinó con base en el método de Sedlak y Lindsay (1968), usando el reactivo 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB) que puede ser cuantificado espectrofotométricamente. Se sembraron 35,000cel/cm² en botellas de cultivo (Nunc) con DMEM completo y se dejaron crecer durante 24h. Pasado ese tiempo se les cambió el medio por uno de acuerdo a los diferentes tratamientos con cadmio. 24h después, las células se lavaron con PBS y con ayuda de un gendarme de goma se levantaron de la botella de cultivo. Al momento de hacer la determinación las células se rompieron con nitrógeno líquido y de este lisado se tomaron 0.1ml para determinar la concentración de proteína. El homogenado celular se dividió en dos fracciones (0.5ml cada uno), en una se determinó los grupos SH proteicos y los SH solubles (glutación) y en la otra los grupos SH totales. De la primera fracción las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 5% y ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA) 5mM, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 6000rpm por 15min. Del botón se cuantificaron los grupos SH proteicos solubilizándolos con buffer TRIS 0.2M-EDTA 0.02M suplementado con dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 1% pH 8.2 y del sobrenadante se cuantificaron los grupos SH solubles (glutación) que se hicieron reaccionar con el DTNB y se leyó la absorbancia a 412nm. De la segunda fracción se determinaron los grupos SH totales, los cuales se solubilizaron con buffer TRIS. La cuantificación de los grupos SH se determinó con base en una curva estándar de cisteína y los resultados fueron expresados por mg de proteína.

III.10 ACUMULACION DE CADMIO EN LAS CELULAS WRL-68

El contenido de cadmio se determinó por absorción atómica. Se sembraron

60,000cel/cm² en botellas de cultivo (Nunc) con DMEM completo y se dejaron crecer por 24h. Pasado ese tiempo, se les cambió el medio por uno de acuerdo a los diferentes tratamientos con cadmio. 24h después las células se lavaron tres veces con PBS y con ayuda de un gendarme de goma se levantaron de la botella de cultivo. Se tomaron 0.1ml de la suspensión celular lisiéndolo en nitrógeno líquido para determinar la concentración de proteína. El homogenado celular se dividió en dos fracciones (cada uno de 1ml), para determinar por un lado el Cd-total y por el otro el Cd-interno aplicándoles un procedimiento de digestión de acuerdo a Krishnamurty et al (1976). Para cuantificar el Cd-interno se le adicionó al homogenado, 1ml de EDTA 2mM, dejándolo incubar por 15min a 37°C, con el fin de quelar el cadmio que se encontraba pegado a la membrana. Posteriormente, se dejó enfriar y se centrifugó a 3,500rpm por 10min, el botón celular (Cd-interno) se resuspendió en 1ml de PBS. La digestión de las muestras se llevaron a cabo en tubos de teflón, a los que se les adicionó ácido nítrico (HNO₃) al 10%, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 1% y se colocaron en un horno de microondas (MDS-81D) por 20min al 70% de presión. Posteriormente, las muestras se dejaron enfriar y se leyeron en un espectrofotómetro de absorción atómica (Zeiss Aasi). La concentración de cadmio se determinó con base en una curva estándar de cadmio (0.2, 0.6 y 1ppm). Los resultados fueron expresados por mg de proteína.

III.11 EFECTO DE LA NIFEDIPINA, VERAPAMIL Y CADMIO EN LA ENTRADA DE CALCIO EN LAS CELULAS WRL-68

Se determinó con base al método de Blaska y Shaikh (1991). Se sembraron 2ml de una suspensión conteniendo 250,000cel/ml sobre cajas de cultivo de 35mm de diámetro (Nunc) con DMEM completo y se dejaron crecer por 24h. Para estudiar el efecto de los bloqueadores

del canal de calcio (nifedipina y verapamil) y de cadmio sobre la entrada de calcio a la célula WRL-68, se les cambió el medio por uno conteniendo nifedipina (100 μ M), verapamil (100 μ M o 250 μ M), cadmio (50 μ M) y $^{45}\text{CaCl}_2$ (actividad específica 1000cpm/nmol) y se dejaron incubar durante 30min a 37 °C. Al término de este tiempo se lavaron las células tres veces con PBS suplementado con EDTA 10mM y las células se dejaron toda la noche con hidróxido de amonio (NH_4OH) 1.5M a temperatura ambiente para digerirlas. De este digerido se tomaron 0.250ml para determinar la concentración de proteína y en el volumen restante se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo. Se determinaron las nmoles de Ca^{+2} y fueron expresadas por mg de proteína.

III.12 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CADMIO EN LA ACUMULACION DE CALCIO

Se determinó con base en el método de Blazka y Shaikh (1992a). Se sembraron 2ml de una suspensión conteniendo 250,000cel/ml sobre cajas de cultivo de 35mm de diámetro (Nunc) con DMEM completo y se dejaron crecer por 24h. Para estudios de competencia en las células, se les cambió el medio por uno conteniendo diferentes concentraciones de CdCl_2 (10, 50 y 100 μ M) y $^{45}\text{CaCl}_2$ (actividad específica 1000cpm/nmol) y se dejaron incubar a diferentes tiempos (1, 3, 5, 10, 20, 30, 45 y 60 min) a 37 °C. Al término de cada tiempo se lavaron las células tres veces con PBS suplementado con EDTA 10mM y se dejaron toda la noche con hidróxido de amonio (NH_4OH) 1.5M a temperatura ambiente para digerirlas. De este digerido se tomaron 0.250ml para determinar la concentración de proteína y en el volumen restante se cuantificó la cantidad de radiactividad en un contador de centelleo. Se determinaron las nmoles de Ca^{+2} y fueron expresadas por mg de proteína.

III.13 DETERMINACION DEL TIPO DE INHIBICION QUE PRESENTA EL CADMIO SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO

Se sembraron 2ml de una suspensión conteniendo 250,000cel/ml sobre cajas de cultivo de 35mm de diámetro (Nunc) con DMEM completo y se dejaron crecer durante 24h. Para estudios de inhibición sobre la entrada de calcio por el cadmio en las células WRL-68, se les cambió el medio por uno conteniendo $1\mu\text{M}$ o $10\mu\text{M}$ de CdCl_2 , y diferentes concentraciones de CaCl_2 (3, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y $100\mu\text{M}$) con $^{45}\text{CaCl}_2$ (actividad específica 1000 cpm/nmol) y se dejaron incubar durante 30min a 37°C . Pasado ese tiempo se lavaron las células tres veces con PBS suplementado con EDTA 10mM y se dejaron toda la noche con NH_4OH 1.5M a temperatura ambiente para digerirlas. De este digerido se tomaron 0.250ml para determinar la concentración de proteína y en el volumen restante se cuantificó la cantidad de radiactividad en un contador de centelleo. Se determinaron las nmoles de Ca^{+2} y fueron expresadas por mg de proteína.

III.14 DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE INHIBICION (Ki) DEL CADMIO SOBRE LA ACUMULACION DE CALCIO

Se sembraron 2ml de una suspensión conteniendo 250,000cel/ml sobre cajas de cultivo de 35mm de diámetro (Nunc) con DMEM completo y se dejaron crecer durante 24h. Para cuantificar el valor de la constante de inhibición (Ki) del cadmio en las células, se les cambió el medio por uno conteniendo diferentes concentraciones de CdCl_2 (1, 2, 5, 10, 50 y $100\mu\text{M}$) y $^{45}\text{CaCl}_2$ (actividad específica 1000cpm/nmol) y se dejaron incubar durante 30min a 37°C . Al término de ese tiempo se lavaron las células tres veces con PBS suplementado con EDTA 10mM y se dejaron toda la noche con NH_4OH 1.5M a temperatura ambiente para digerirlas. De este

digerido se tomaron 0.250ml para determinar la concentración de proteína y en el volumen restante se cuantificó la cantidad de radiactividad en un contador de centelleo. Se determinaron las nmoles de Ca^{+2} y fueron expresadas por mg de proteína.

III.15 PARTICIPACION DE LOS GRUPOS SULFHIDRILLO (SH) EN LA INHIBICION DE LA ENTRADA DE CALCIO POR CADMIO

Se sembraron 2ml de una suspensión conteniendo 250,000cel/ml sobre cajas de cultivo de 35mm de diámetro (Nunc) con DMEM completo y se dejaron crecer durante 24h. Para evaluar el papel que juegan los grupos sulfhidrilo (SH) en la inhibición de la entrada de calcio por el cadmio se les adicionó a las células 100 μM de 1-4 ditioneitol (DTT) con el fin de reducir los grupos SH y 50 μM de CdCl_2 con $^{45}\text{CaCl}_2$ (actividad específica 1000cpm/nmol) y se dejaron incubas a diferentes tiempos (1, 3, 5, 10, 30 y 60 min.) a 37 °C. Al término de cada tiempo se lavaron las células tres veces con PBS suplementado con EDTA 10mM y se dejaron toda la noche con NH_4OH 1.5M a temperatura ambiente para digerirlas. De este digerido se tomaron 0.250ml para determinar la concentración de proteína y en el volumen restante se cuantificó la cantidad de radiactividad en un contador de centelleo. Se determinaron las nmoles de Ca^{+2} y fueron expresadas por mg de proteína.

III.16 CONTENIDO DE PROTEINA

La determinación del contenido de proteína en las células WRL-68 se determinó con base en el método de Lowry et al (1951). Se preparó una solución A compuesta de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2%, hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N y tartrato de sodio-potasio al 0.02%. La solución B, fue preparada con sulfato de cobre (CuSO_4) al 0.5%. Para la solución C, fue

tomado 50ml de la sol.A y 1ml de la sol.B y se mezcló perfectamente. A una alícuota de la muestra se le adicionó 5ml de la solución C, 0.5ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluído 1:1 con agua, se mezcló y se dejó incubar 45min a temperatura ambiente. La concentración de proteína de las muestras problema se determinó con base a una curva estandar de albúmina de bovino (10, 25, 50, 75 y 100µg/ml) cuya absorbancia fue leída a una longitud de onda de 660nm.

III.17 TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

La prueba estadística utilizada fue una ANOVA seguida por una prueba Tukey. El nivel de significancia utilizado fue $p \leq 0.05$. Los experimentos se realizaron tres veces de manera independiente y en cada caso por triplicado.

IV-RESULTADOS

IV.1 VIABILIDAD DE LAS CELULAS WRL-68 EXPUESTAS A CADMIO

La viabilidad de las células WRL-68 expuestas durante 24h a concentración de cadmio entre 0.5 y 100 μ M se evaluó por la exclusión del azul de tripano. Las células vivas se contaron en un hematocitómetro. Los resultados fueron graficados como % de viabilidad considerando el 100% de viabilidad el de las células en ausencia del metal. En la Figura 1, se observa un comportamiento dosis dependiente y se encuentra que la viabilidad disminuye a partir de 1 μ M de CdCl₂, descendiendo rápidamente hasta encontrar un 10% de viabilidad con 50 μ M de CdCl₂. Prácticamente se encontró 0% de viabilidad con 100 μ M de CdCl₂. La LC₅₀ fue de 4.66 μ M. Aún cuando a concentraciones de 50 y 100 μ M se encontró algunas células vivas, al observarlas por microscopía óptica, se aprecia que la morfología celular está alterada debido a la presencia del metal. Dado que el objetivo del presente trabajo es evaluar las alteraciones producidas por el metal a nivel celular, el interés estaba en encontrar las concentraciones del CdCl₂ que estuviesen ocasionando daño celular y no aquellas que produjeran la muerte. Se consideró necesario que las células mantuvieran la capacidad de proliferar al ser resebradas. Para ello, las células se expusieron a diferentes concentraciones de CdCl₂ para evaluar la capacidad proliferativa. De estos resultados se determinó tratar a las células con 0.5 μ M donde las células presentaban una viabilidad del 100% y una capacidad de proliferación alta y 5 μ M donde la viabilidad era cercana al 50%, pero las células mantenían la capacidad de proliferación. Con base en estos resultados se consideraron apropiados los siguientes tratamientos, los cuales fueron arbitrariamente denominados como:

Tratamiento "leve" _____ 0.5 μ M CdCl₂ durante 24h.

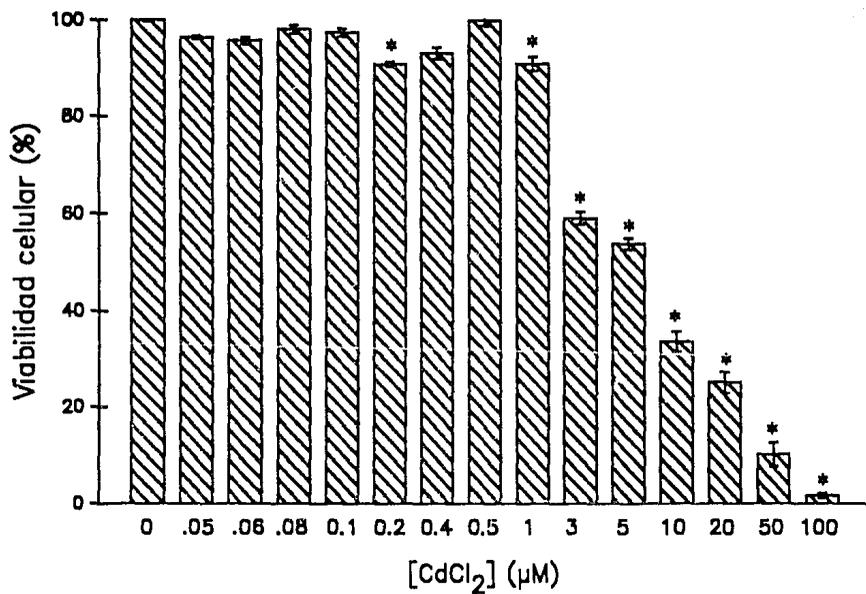


Figura 1. Curva de viabilidad de células WRL-68 después de 24h en presencia de diferentes concentraciones de CdCl₂. Cada punto expresa el valor promedio ± error tipo.

Tratamiento "crónico" _____ 0.5 μ M CdCl₂ durante 7 días y

Tratamiento "agudo" _____ 5 μ M CdCl₂ durante 24h.

IV.2 ALTERACIONES MORFOLOGICAS DE LAS CELULAS WRL-68 EXPUESTAS

A CADMIO

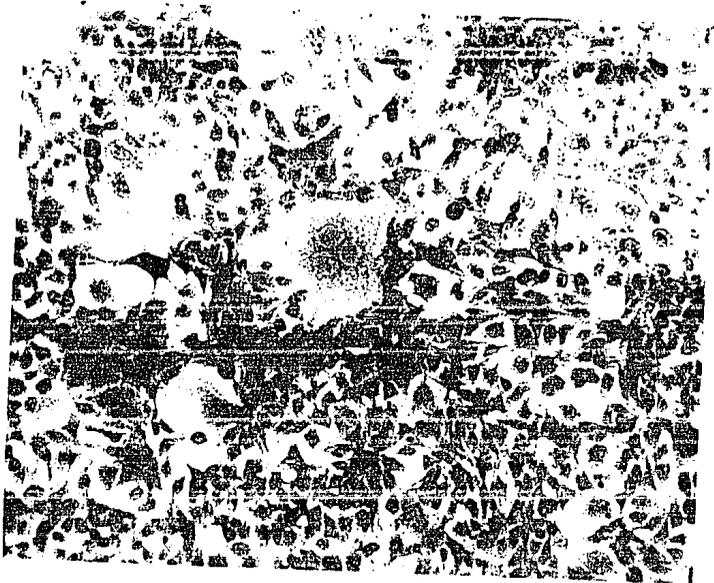
IV.2.1 MICROSCOPIA OPTICA

Los cambios morfológicos observados con microscopía óptica en las células WRL-68 con diferentes tratamientos de CdCl₂ se muestran en la Figura 2. Las células fueron teñidas con azul de Comasie para un mejor contraste. En las células tratadas leve (C,D) y crónicamente (E,F) no se aprecia ninguna alteración. Sin embargo, en las células tratadas agudamente (G,H) se observa alteración en la morfología, siendo de alargada y poligonal que es la característica de la línea celular (control A,B) a una forma mas redondeada.

IV.2.2 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

Los cambios morfológicos observados por microscopía electrónica de transmisión se muestran en la Figura 3. Se aprecia en las células control (A,B) una ultraestructura característica de células en cultivo crecidas sobre un sustrato rígido. El tamaño corresponde al de células epiteliales en cultivo. El tamaño del núcleo y forma son característicos, así como los organelos intracitoplásmicos. Las mitocondrias tienen un tamaño y aspecto normal con crestas bien definidas. Las células con un tratamiento leve de cadmio (C,D) presentaron en el citoplasma la presencia de estructuras aparentemente vacías de forma irregular. El retículo endoplásmico rugoso (RER) está bien preservado y hay pocas mitocondrias. Las uniones intercelulares están presentes y se observan estructuras parecidas a los desmosomas. En las

A



B

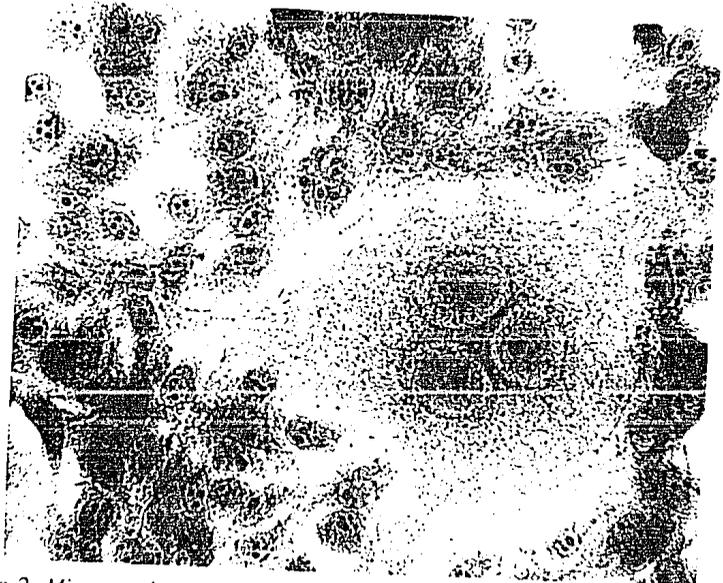
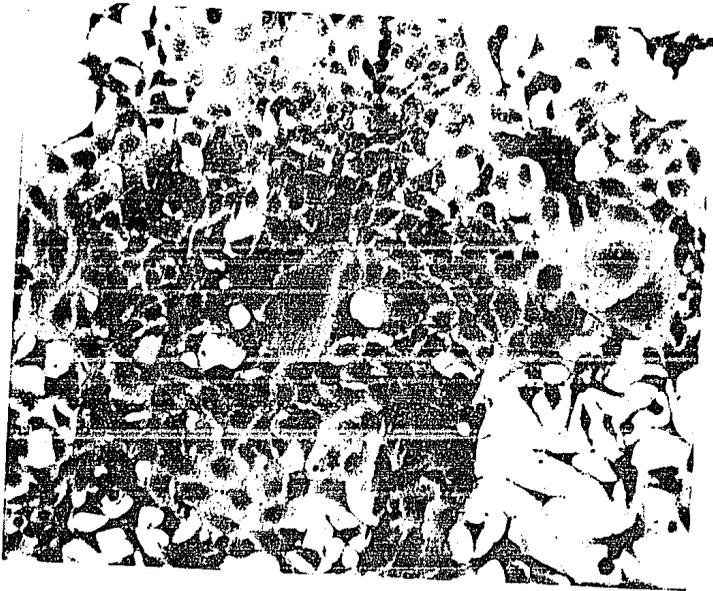
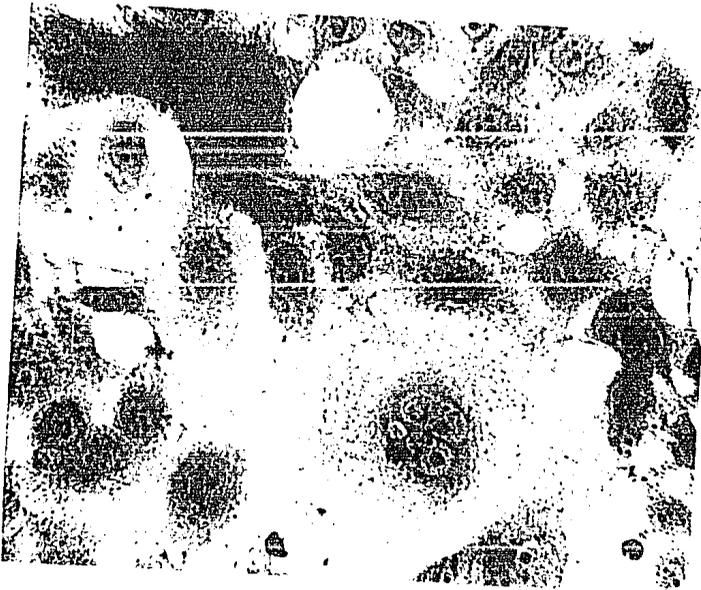


Figura 2. Microscopía óptica de las células WRL-68 expuestas a los diferentes tratamientos con cadmio. Células control: A (160X) y B (512X). Tratamiento leve: C (160X) y D (512X). Tratamiento crónico: E (160X) y F (512X). Tratamiento agudo: G (160X) y H (512X).

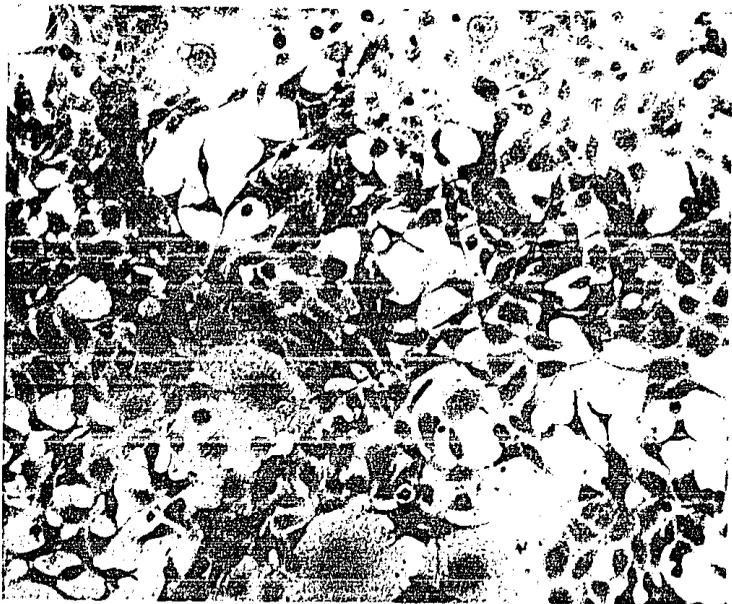
C



D



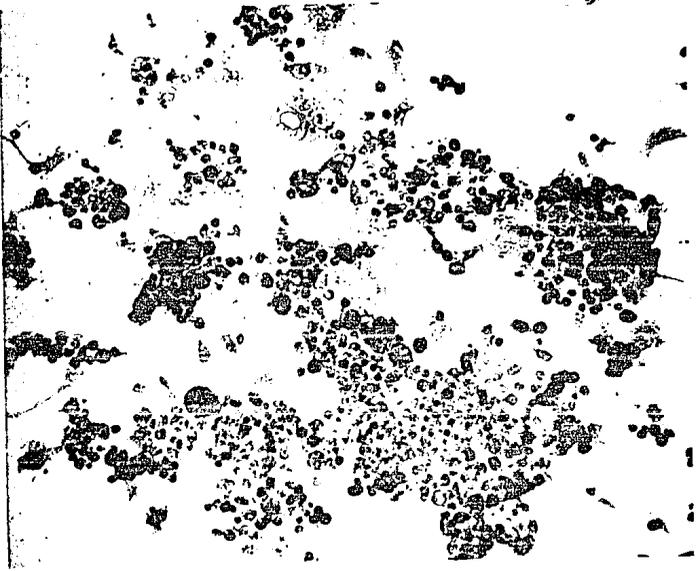
E



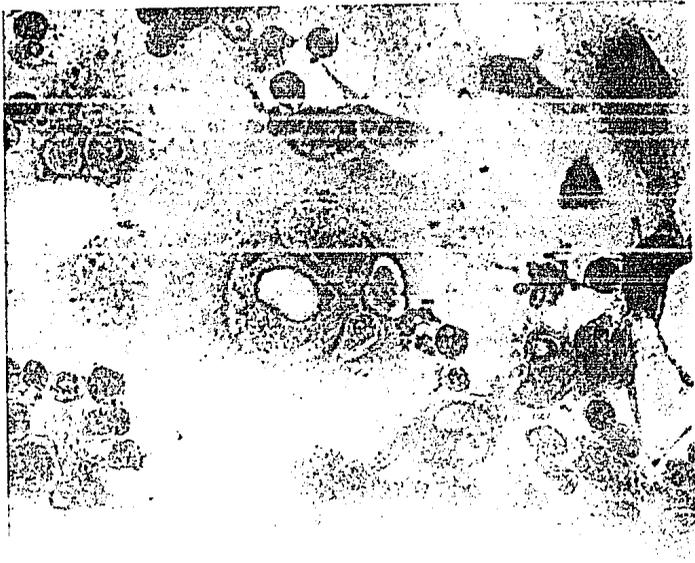
F



G



H



A



B

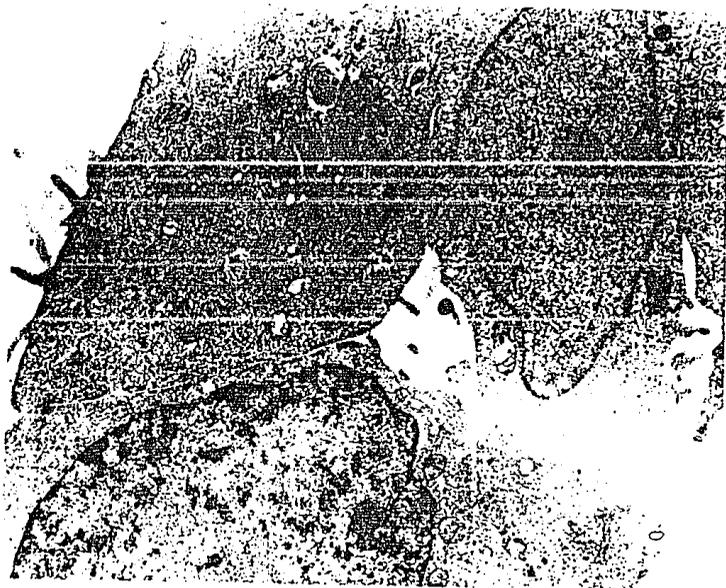
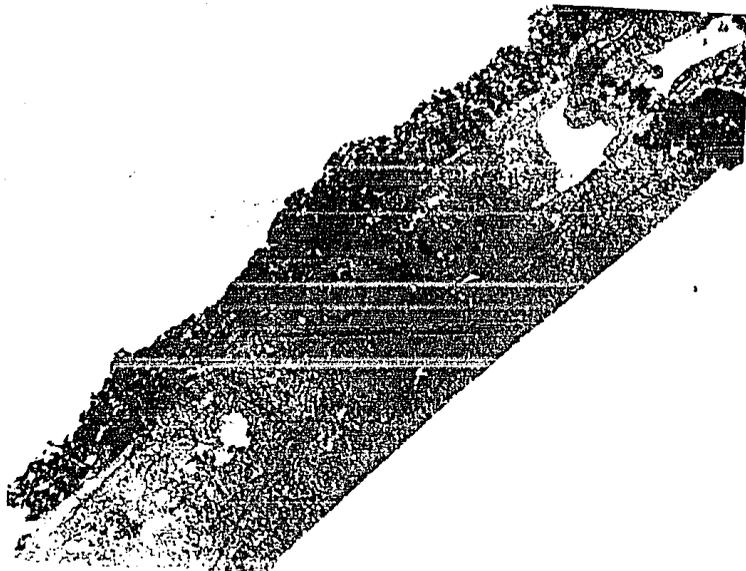
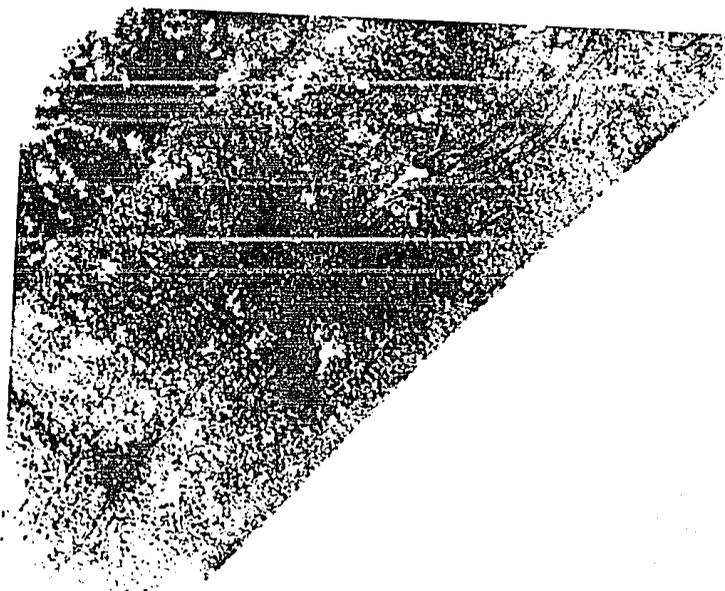


Figura 3. Microscopía electrónica de transmisión de las células WRL-68 expuestas a los diferentes tratamientos con cadmio. Células control: A (5640X) y B (13160X). Tratamiento leve: C (5640X) y D (37600X). Tratamiento crónico: E (13160X) y F (22560X). Tratamiento agudo: G (13160X) y H (20000X).

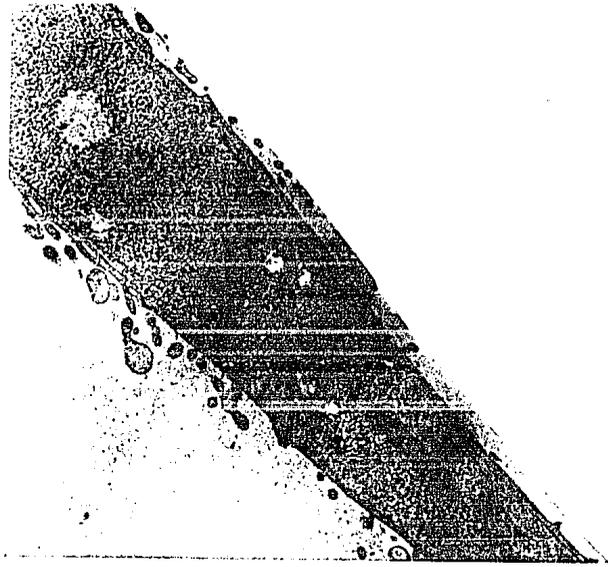
C



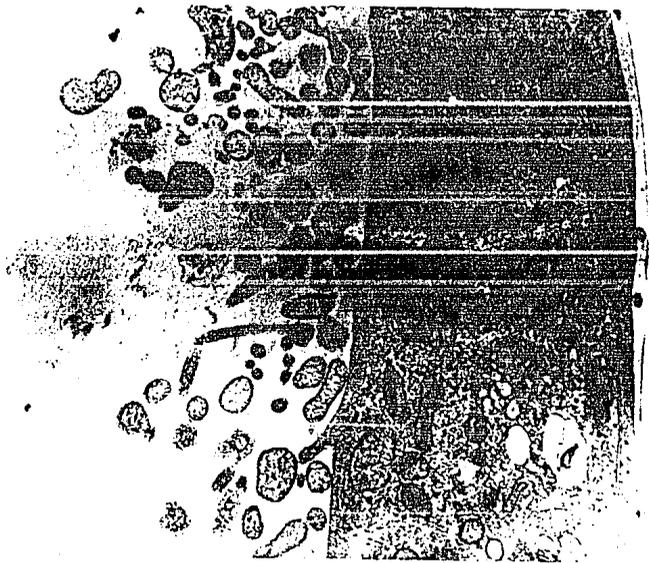
D



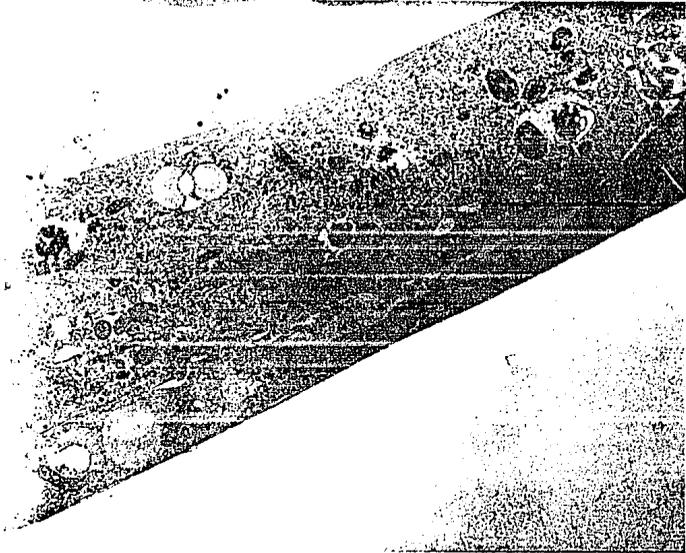
E



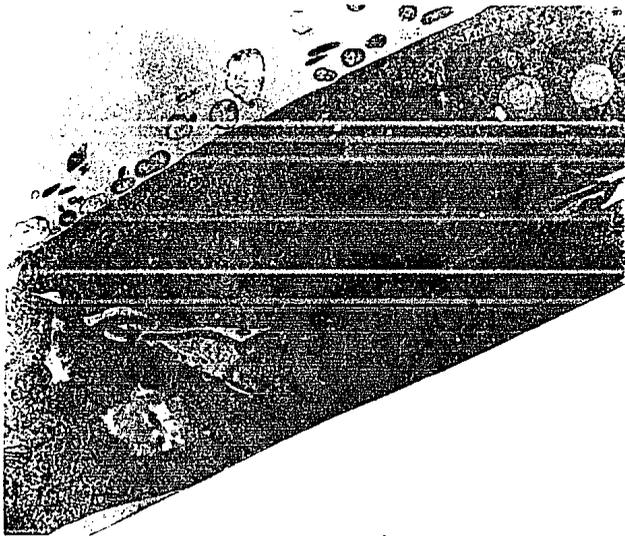
F



G



H



células tratadas crónicamente (E,F), se observan cuerpos residuales compactos, el RER se encuentra desorganizado, las mitocondrias muestran alteraciones en las crestas y en muchos casos únicamente una cresta mitocondrial está presente. En el núcleo se aprecia vacuolización y desorganización de la cromatina con ausencia de cromatina condensada, la envoltura nuclear se observa poco definida. Las células con tratamiento agudo (G,H) muestran esteatosis, representado por abundantes gotas lipídicas en el citoplasma, también se observan tonofilamentos alineados paralelamente a la membrana plasmática. Hay presencia de numerosos polirribosomas en el citosol y cuerpos residuales con un contenido amorfo unidos a la membrana.

IV.3 CINETICA DE PROLIFERACION DE LAS CELULAS WRL-68 TRATADAS "CRONICAMENTE" CON CdCl₂

La proliferación de las células WRL-68 se evaluó en presencia de CdCl₂ 0.5µM, que es la concentración utilizada en el tratamiento crónico y se siguió durante 7 días que es el período de exposición para este caso. Las células WRL-68 fueron sembradas y 24h después se les adicionó el medio con CdCl₂ y éste fue denominado día cero. Paralelamente se hizo la curva de proliferación de las células en ausencia del metal (control). Graficando el número de células por cm² en función de los días sembrado (Figura 4), se encuentra que no hay diferencia significativa entre ambas curvas. A baja densidad, las células requieren de 22.8h para duplicarse, alargándose este período a medida que hay mayor densidad celular. La densidad máxima alcanzada se encontró en aproximadamente 160,000 cel/cm² en el día quinto, empezando a disminuir posteriormente, debido a que las células empiezan a despegarse. En la gráfica ya no se muestra el conteo de células al séptimo día, ya que la mayoría de ellas se habían despegado del sustrato.

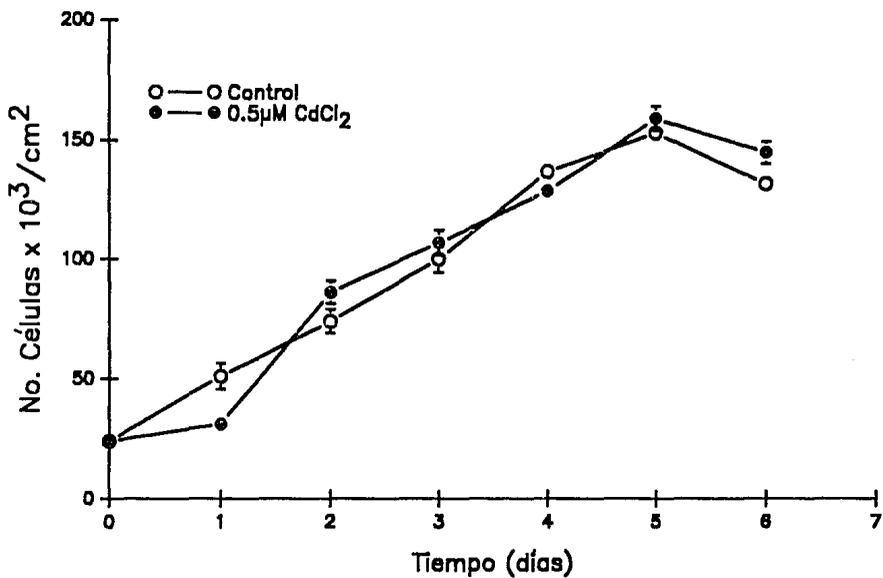


Figura 4. Cinética de proliferación de las células WRL-68 control y tratadas "crónicamente" con 0.5µM de CdCl₂. Cada punto expresa el valor promedio ± error tipo.

IV.4 DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LAS CELULAS WRL-68 EXPUESTAS A CADMIO

IV.4.1 LACTATO DESHIDROGENASA

La citotoxicidad que presentan las células WRL-68 debido a la presencia de cadmio fue evaluada por la determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de cultivo. La actividad específica de la LDH expresada en $\text{mU}/10^6$ células se muestra en la Figura 5, en donde se observa que para las células control el valor determinado de la actividad enzimática fue de $831.8 \pm 37.3 \text{ mU}/10^6 \text{ cel}$. En las células intoxicadas con $5\mu\text{M}$ de CdCl_2 con un período de exposición de 24h, la actividad de esta enzima aumentó significativamente, tres veces más su valor, ($2450.8 \pm 45.3 \text{ mU}/10^6 \text{ cel}$) con respecto al control. Sin embargo, en las células tratadas con $0.5\mu\text{M}$ de CdCl_2 , pero con un período de exposición de 24h y de 7 días no se encontró ningún cambio en la actividad específica de la enzima con respecto al control. Esto muy probablemente se deba a que en presencia de cadmio $0.5\mu\text{M}$ las células presentan un 100% de viabilidad y la LDH no es liberada al medio, sin embargo con concentraciones mayores la viabilidad disminuye y la actividad de LDH se ve incrementada. La LDH tampoco se ve incrementada con períodos largos de exposición.

IV.4.2 ASPARTATO AMINO TRANSFERASA

La hepatotoxicidad producida por el cadmio en las células WRL-68, se evaluó por la determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática de la aspartato amino transferasa (ASAT) liberada al medio de cultivo. Esta enzima se eligió como un marcador bioquímico de daño hepático, ya que es un indicador de necrosis hepatocelular. La actividad específica de la ASAT expresada en $\text{mU}/10^6$ células, se muestra en la Figura 6, en donde se observa que para las células control el valor determinado fue de $222 \pm 9 \text{ mU}/10^6 \text{ cel}$. En las

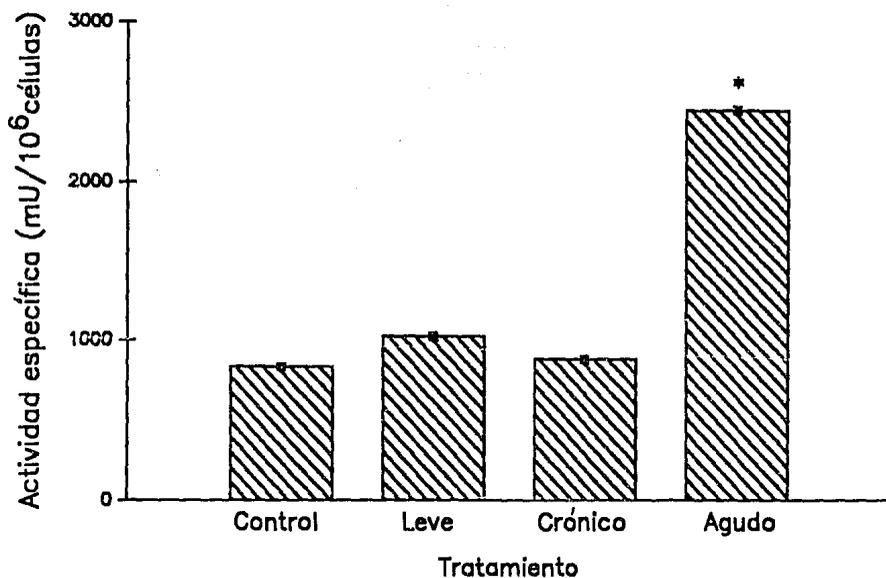


Figura 5. Determinación de la actividad enzimática de la Lactato Deshidrogenasa (LDH) en medios de cultivo de las células WRL-68 expuestas a cadmio. Cada punto expresa el valor promedio \pm error tipo.

células intoxicadas con 5µM de CdCl₂ con un período de exposición de 24h, el valor de la actividad de esta enzima se duplicó (556.1±20.3 mU/10⁶ cel) con respecto al control. Sin embargo, en las células tratadas con 0.5µM de CdCl₂ con un período de exposición de 24h y de 7 días no hubo ningún cambio. Probablemente esto se deba a que en presencia de cadmio 0.5µM las células presentan un 100% de viabilidad, sin embargo, con concentraciones mayores ésta disminuye y la actividad de la ASAT se ve incrementada. La ASAT tampoco se ve incrementada a períodos largos de exposición.

IV.4.3 ALANINA AMINO TRANSFERASA

La hepatotoxicidad producida por el cadmio en las células WRL-68, se evaluó por la determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática de la alanina amino transferasa (ALAT) liberada al medio de cultivo. Esta enzima se eligió ya que es un indicador de necrosis hepatocelular. La actividad específica de la ALAT expresada en mU/10⁶ células, se muestra en la Figura 7, en donde se observa que para las células control el valor determinado fue de 197.1±12.6 mU/10⁶ cel. En las células intoxicadas con 5µM de CdCl₂ por un período de exposición de 24h, la actividad de esta enzima se duplicó (490.2±20 mU/10⁶ cel) con respecto al control. Sin embargo, en las células tratadas con 0.5µM de CdCl₂ por un período de exposición de 24h y de 7 días no se mostró ningún cambio en la actividad específica de la enzima con respecto al control, muy probablemente debido a que en presencia de cadmio 0.5µM las células presentan un 100% de viabilidad, sin embargo, a concentraciones mayores ésta disminuye y la actividad de la ALAT se ve incrementada. La ALAT tampoco se ve incrementada a períodos largos de exposición.

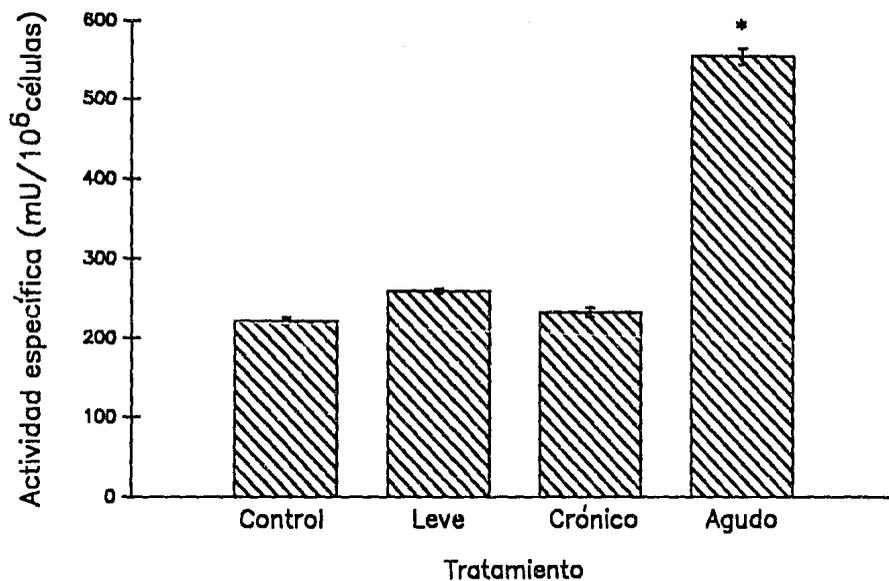


Figura 6. Determinación de la actividad enzimática de la Aspartato Amino Transferasa (ASAT) en medios de cultivo de las células WRL-68 expuestas a cadmio. Cada punto expresa el valor promedio \pm error tipo.

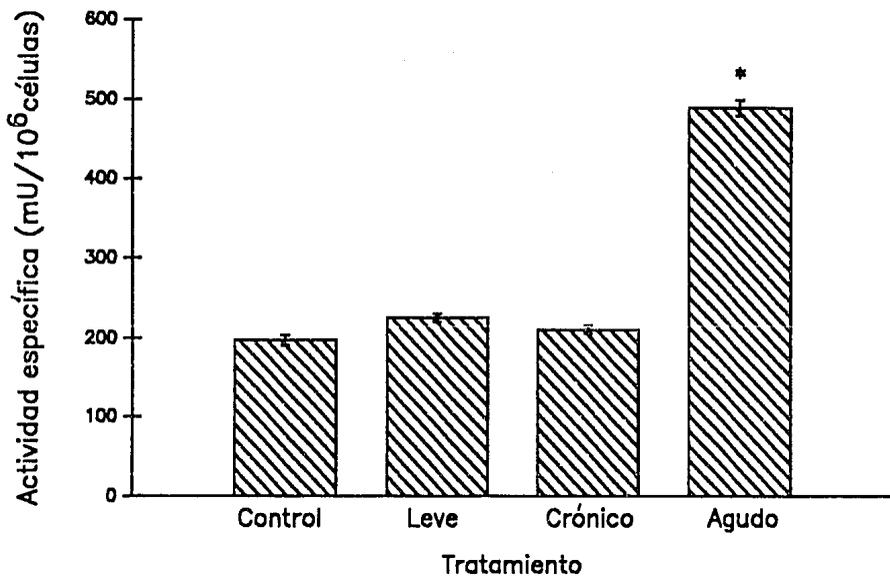


Figura 7. Determinación de la actividad enzimática de la Alanina Amino Transferasa (ALAT) en medios de cultivo de las células WRL-68 expuestas a cadmio. Cada punto expresa el valor promedio \pm error tipo.

IV.5 GRADO DE LIPOPEROXIDACION EN LAS CELULAS WRL-68

INTOXICADAS CON CADMIO

Se considera a la lipoperoxidación (LPO) como uno de los posibles mecanismos para explicar el daño a nivel celular producido en presencia de algunos metales pesados. La LPO inducida por el cadmio se determinó en las células WRL-68 por la producción de malondialdehído (MDA) en presencia de ácido tiobarbitúrico (TBA) expresado en nmol/mg proteína. En la Figura 8, se observa que para las células control el valor determinado de la LPO fue de 0.223 ± 0.022 nmol MDA/mg proteína. En las células tratadas levemente, se encontró que los valores de la LPO son semejantes a los presentados en células control. En las células tratadas crónicamente, el valor de la LPO se duplicó (0.431 ± 0.019 nmol MDA/mg proteína) con respecto al control. En el caso de la células tratadas agudamente, se encontró un aumento significativo aunque menor que el encontrado en células tratadas crónicamente en el grado de LPO (0.365 ± 0.1 nmol MDA/mg proteína). Estos resultados indican que la lipoperoxidación es un parámetro sensible a concentraciones altas del metal o bien en períodos largos de exposición.

IV.6 EFECTO DEL CADMIO EN LA INDUCCION DE METALOTIONEINA

La metalotioneína (MT), es una proteína de bajo peso molecular que entre otras funciones se le ha atribuido el de jugar un papel protector importante contra la toxicidad causada por la presencia del cadmio, es por ello el interés de evaluar la capacidad de inducir a la MT en las células WRL-68 en presencia del metal. En la Figura 9, se muestra el contenido intracelular de la MT expresado en $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína, en donde se encontró que las células control presentaron un valor basal de 0.158 ± 0.046 μg MT/mg proteína. En las células tratadas leve y crónicamente, se observó un incremento considerable de la concentración de la proteína. En el

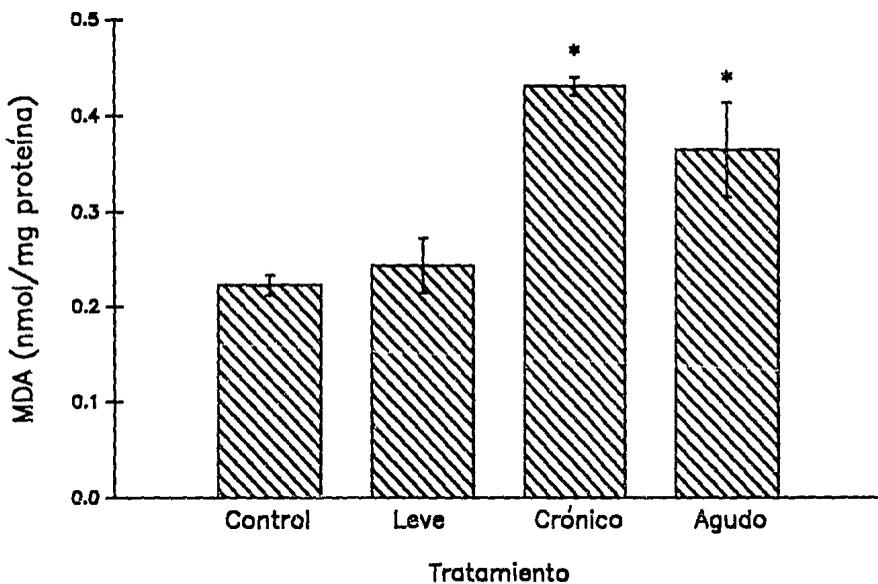


Figura 8. Determinación del grado de lipoperoxidación en las células WRL-68 tratadas con cadmio. Cada punto expresa el valor promedio \pm error tipo.

tratamiento leve el valor de la MT se incrementó 57 veces (9 ± 0.71 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína), así como 104 veces (16.5 ± 1.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) en el caso del tratamiento crónico, con lo cual se observó que la MT es una proteína que se induce con bajas concentraciones del metal y que se ve incrementada con el tiempo de exposición, ya que se acumula en el interior celular. En las células intoxicadas agudamente, el contenido de MT solo aumentó 7 veces con respecto al control. Se observó que la MT no aumentó en función de la concentración del metal por lo que se realizó una curva dosis-respuesta con el fin de evaluar la dependencia de la producción de MT con la concentración de cadmio. En la Figura 10, se muestra los datos de una curva dosis-respuesta. Se observó que con 24h de tratamiento de cadmio el contenido de MT aumenta paulatinamente hasta llegar a un máximo con $1.5\mu\text{M}$ de Cd (14.5 ± 1.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína), siendo este valor 92 veces más que el presente en las células control. A partir de ésta concentración el contenido de MT disminuye hasta obtener un valor de 1.13 ± 0.07 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína con $5\mu\text{M}$ de CdCl_2 .

IV.7 EFECTO DEL CADMIO EN EL CONTENIDO DE GRUPOS SULFHIDRILO

El cadmio se une a los grupos SH debido a la gran afinidad que presenta por ellos. En la Figura 11, se muestra el contenido de grupos SH proteicos y no proteicos en las células expuestas a los diferentes tratamientos con cadmio. Los resultados se expresan en nmol de SH/mg proteína. Se encontró en general, una disminución en el contenido de grupos SH proteicos, siendo de un 17% para los tratamientos leve y crónico, y de un 53% para el tratamiento agudo con respecto al valor del control. Los resultados indican que la cantidad de cadmio unido a los grupos SH proteicos es independiente del período de exposición, ya que los valores presentes en los tratamientos leve y crónico no presentan diferencias significativas,

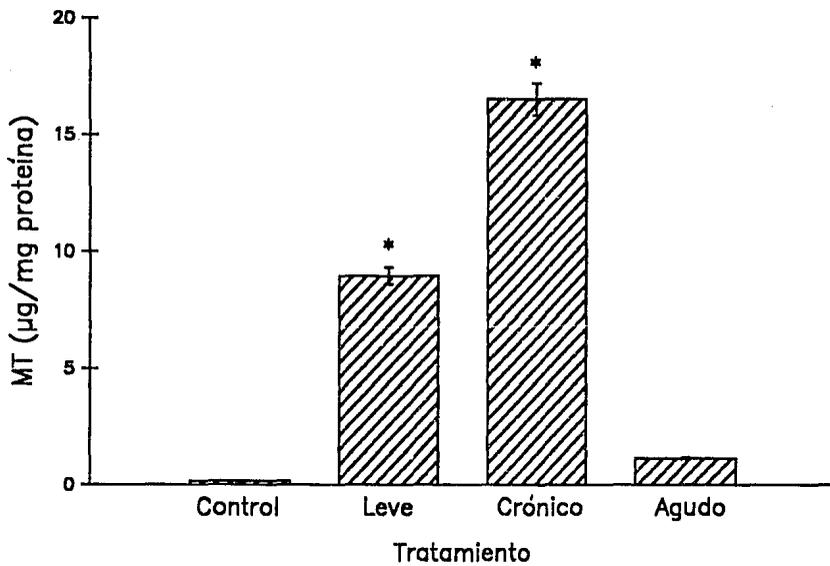


Figura 9. Efecto del cadmio en la inducción de la Metalotioneína en las células WRL-68 tratadas con cadmio. Cada punto expresa el valor promedio \pm error tipo.

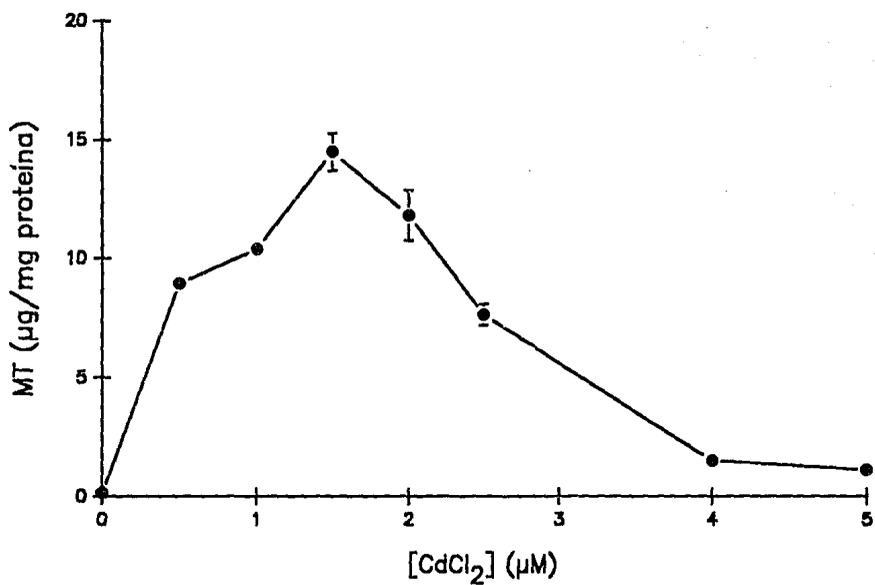


Figura 10. Efecto de diferentes concentraciones de cadmio en la inducción de la Metalotioneína en las células WRL-68. Cada punto expresa el valor promedio \pm error tipo.

mientras que muestran una dependencia con la dosis, a mayor concentración del metal hay una menor cantidad de grupos SH proteicos. Por otro lado, la fracción soluble puede considerarse como una medida de glutatión reducido (SH no proteicos), encontrando una disminución del 42% en los tratamientos leve y crónico y de un 67% para el agudo con respecto al control. De estos resultados podemos concluir que con una mayor concentración de cadmio tenemos una menor disponibilidad de GSH reducido para la protección celular.

IV.8 CONTENIDO DE CADMIO TOTAL, PEGADO E INTERNALIZADO EN LAS CELULAS WRL-68

El contenido de cadmio total, pegado e internalizado en las células expuestas a los diferentes tratamientos fue expresado en ng de Cd/mg proteína y se muestra en la Figura 12. Se observó un comportamiento dosis dependiente. El contenido de cadmio total aumentó 10 veces en las células tratadas agudamente y 5 veces en las células tratadas crónicamente. El contenido de cadmio pegado a membrana aumentó 7 veces en las células tratadas agudamente y 4 veces en las células tratadas crónicamente. El contenido de cadmio en el interior celular aumentó 29 veces en las células tratadas agudamente y 7 veces en las células tratadas crónicamente. En todos los tratamientos se presentó un comportamiento muy similar en la distribución del contenido total de cadmio; la mayor parte permaneció pegado a membrana y una pequeña fracción penetró al interior celular. En las células con un tratamiento leve se muestra que un 87% del cadmio total permanece pegado y únicamente un 13% se internaliza. Al aumentar el período de exposición con la misma concentración de cadmio se muestra que un 73% del cadmio total permanece pegado y un 27% se internaliza, con lo cual encontramos que al aumentar el período de exposición aumenta el contenido de metal en el interior celular. Al analizar el

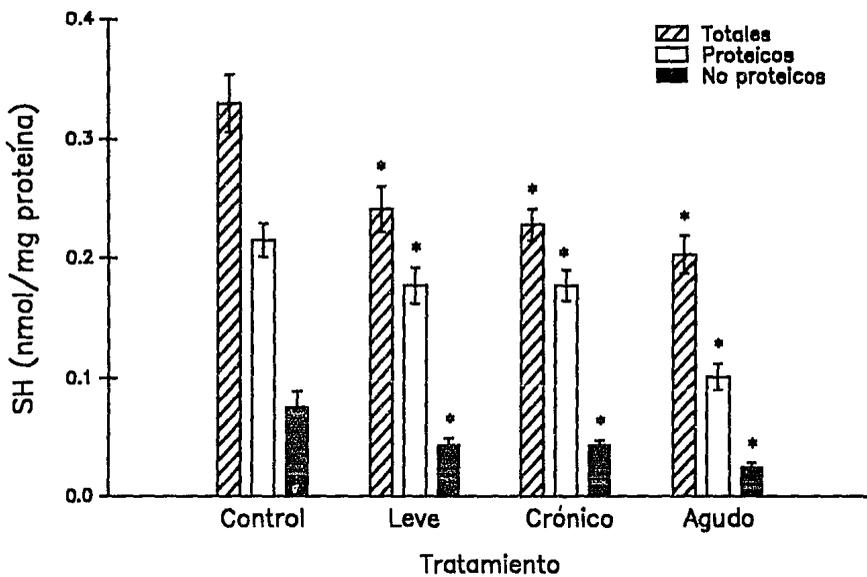


Figura 11. Efecto del cadmio en el contenido de los grupos sulfhidrilo totales, proteicos y no proteicos en las células WRL-68 tratadas con cadmio. Cada punto expresa el valor promedio \pm error tipo.

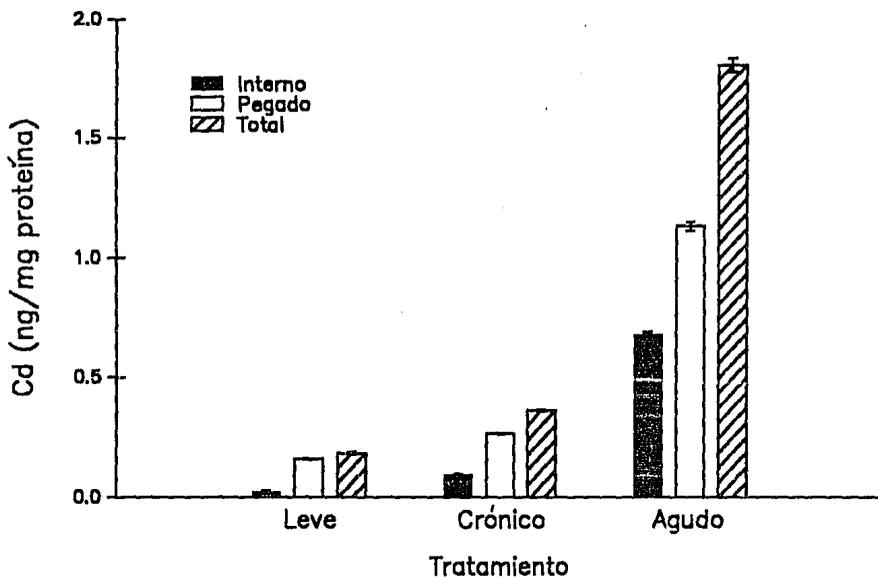


Figura 12. Contenido de cadmio total, pegado e internalizado en las células WRL-68. Cada punto expresa el valor promedio \pm error tipo.

contenido de cadmio en las células tratadas agudamente, se muestra que un 62% del cadmio total permanece pegado y un 37% se internaliza. Estos resultados muestran que el cadmio interacciona con los grupos aniónicos de la membrana celular y que la internalización del metal a la célula es dependiente tanto del tiempo de exposición como de la concentración del metal presente.

IV.9 EFECTO DE LA NIFEDIPINA, VERAPAMIL Y CADMIO SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO EN LAS CELULAS WRL-68

En la figura 13 se puede observar el efecto de los bloqueadores del canal de calcio (nifedipina y verapamil) así como del cadmio sobre la entrada de calcio a la célula. En ella, se muestra el porcentaje de inhibición en la entrada de calcio a los 30 min de incubación. Los dos bloqueadores utilizados fueron insolubles en agua, por lo que se utilizó dimetil sulfoxido (DMSO) al 1.7%. La cantidad de DMSO utilizada no afecta la entrada de calcio a la célula. Por microscopía óptica, las células no presentaron ningún daño aparente en presencia de los bloqueadores. En el caso de la nifedipina a concentraciones mayores de 100 μ M resultó insoluble aún en DMSO. Los resultados indican que la nifedipina disminuye la entrada de calcio a la célula en un 37%. Con verapamil no se encontró una diferencia en la entrada de calcio con concentraciones de 100 μ M o 250 μ M del bloqueador (62.5%). El cadmio presentó un % de inhibición del 40.0 en la entrada de calcio con 50 μ M, siendo su comportamiento muy semejante al encontrado con nifedipina. A mayores concentraciones de cadmio (100 y 500 μ M) se observó que el porcentaje de inhibición en la entrada de calcio fue muy semejante al encontrado con 50 μ M. Con base en estos resultados se tomó ésta última concentración para el estudio.

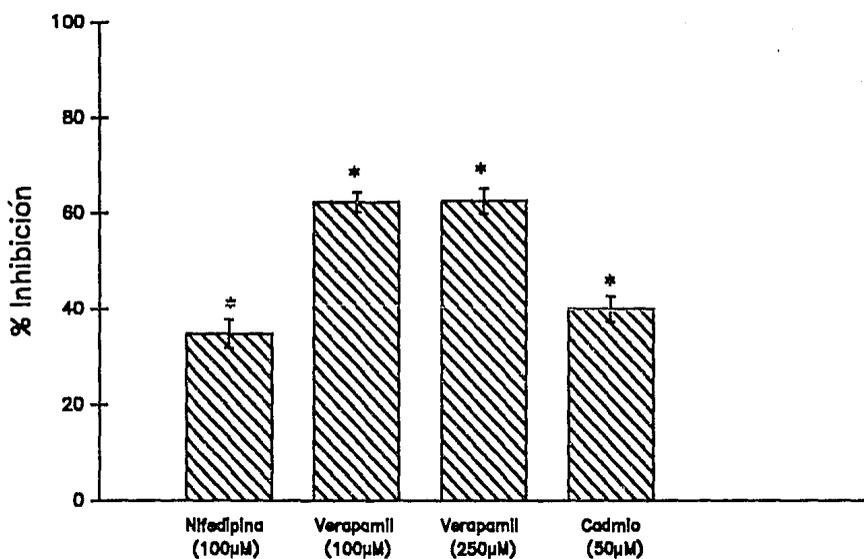


Figura 13. Efecto de la nifedipina, verapamil y cadmio sobre la entrada de calcio, utilizando ^{45}Ca (actividad específica 1000cpm) después de 30min de exposición en las células WRL-68. Cada punto expresa el valor promedio \pm error tipo.

IV.10 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CADMIO SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO EN LAS CELULAS WRL-68

En la Figura 14 se puede observar el efecto que el cadmio tiene sobre la entrada de calcio a la célula. En ella, se graficaron los nmoles Ca^{+2} /mg proteína presentes en la célula a diferentes tiempos de incubación, en presencia de diferentes concentraciones de cadmio. Se aprecia que en ausencia de Cd, se presenta un comportamiento bifásico en la acumulación de calcio en las células, donde se observa primero una fase inicial rápida en los primeros minutos de incubación, seguida de una fase lenta hasta llegar a una saturación, donde el valor máximo en la acumulación de calcio fue de 1.206 ± 0.10 nmoles/mg de proteína. Al analizar el efecto de diferentes concentraciones de cadmio (10-100 μM) sobre la acumulación de calcio, se observó un comportamiento inhibitorio dependiente de la concentración del metal, es decir, a mayor concentración de cadmio mayor el grado de inhibición. No se observa diferencia en la inhibición en presencia de 50 y 100 μM de Cd. La inhibición es evidente en la fase rápida de entrada del Ca en todas las concentraciones de cadmio, sin embargo, en presencia de 10 μM de Cd se alcanza la misma entrada de Ca después de 60min que en el control. Básicamente con 50 μM de Cd se observa una inhibición máxima en la entrada de Ca, ya que con 50 y 100 μM de Cd y aún a concentraciones mayores (500 μM) dato no mostrado se observa una misma inhibición, cercana al 40% en la entrada de Ca a los 60 min de incubación.

IV.11 DETERMINACION DEL TIPO DE INHIBICION Y EL VALOR DE LA CONSTANTE DE INHIBICION (K_i) DEL CADMIO SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO

Para determinar el tipo de inhibición que presenta el cadmio sobre la entrada de

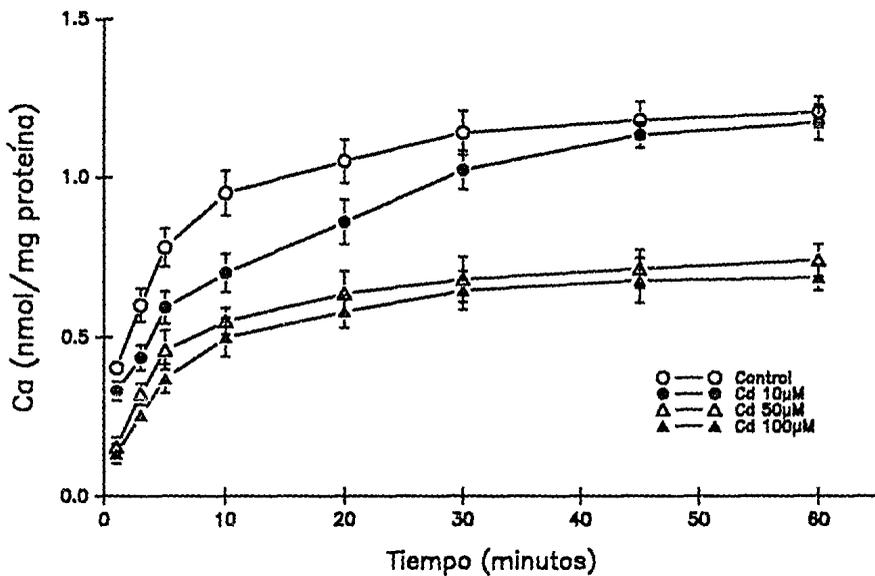


Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones de cadmio sobre la entrada de calcio, utilizando ^{45}Ca (actividad específica 1000cpm) a diferentes tiempos de exposición en las células WRL-68. Cada punto expresa el valor promedio \pm error tipo.

calcio en las células WRL-68, se evaluaron las constantes cinéticas para el calcio en presencia y ausencia del metal. En la Figura 15, se graficaron los nmoles Ca^{+2}/mg de proteína presente en la célula en función de diferentes concentraciones de calcio (μM) a los 30 min de incubación. Estas condiciones se eligieron con base al experimento anterior, en donde se observa que se ha alcanzado el máximo de entrada de Ca a la célula. Las concentraciones de Cd utilizadas fueron 1 y $10\mu\text{M}$ ya que a concentraciones mayores se ve enmascarado el efecto. Se encontró que a mayor concentración de Ca, se incrementa la acumulación del metal en el interior celular. La entrada de Ca se ve disminuída con la presencia de Cd, no encontrando una diferencia significativa con respecto a la concentración utilizada. Al analizar los resultados por una regresión de Lineweaver-Burke, se determinaron los valores de la K_m y V_{max} los cuales se muestran en la Tabla 1. Se observa que el valor de la K_m se incrementa en un 45% para $1\mu\text{M}$ de cadmio ($16 \pm 1.57\mu\text{M}$) y en 130% para $10\mu\text{M}$ de cadmio ($25.53 \pm 4\mu\text{M}$) con respecto al control ($11.07 \pm 3.41\mu\text{M}$). Sin embargo, el valor de la V_{max} no se ve modificado por el metal, siendo de 0.528 ± 0.086 nmoles Ca^2/mg proteína para el control y 0.6 ± 0.038 nmoles Ca^{+2}/mg para $10\mu\text{M}$ de CdCl_2 . De estos datos se puede inferir que la entrada de calcio a la célula es dependiente de la concentración de éste y que el cadmio modifica únicamente la K_m por lo que se comporta como un inhibidor de tipo competitivo en la entrada de Ca. Para evaluar la K_i se determinó el % de inhibición de la entrada de calcio con las siguientes concentraciones de cadmio: 1, 2, 5, 10, 50 y $100\mu\text{M}$ a los 30 min de incubación. En la Figura 16 se graficaron el % de inhibición de entrada de calcio en función de las diferentes concentraciones de Cd. Se observa que el % de inhibición se incrementa a medida que aumenta la concentración de Cd, llegando a ser máxima a $50\mu\text{M}$, por lo que no se observa aumento en el % de inhibición aún a concentraciones más altas. Graficando la inversa del por ciento (%) de inhibición en la entrada

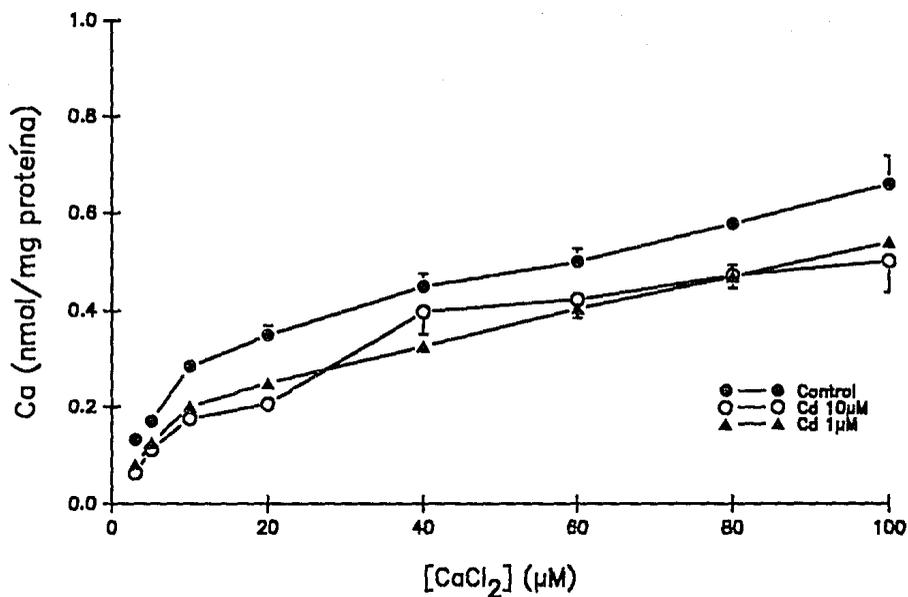


Figura 15. Efecto del cadmio sobre la entrada de diferentes concentraciones de calcio, utilizando ⁴⁵Ca (actividad específica 1000cpm) después de 30min de exposición en las células WRL-68. Cada punto expresa el valor promedio ± error tipo.

| | Km (μM) | Vmax Ca (nmol/mg proteína) |
|---------------------|-------------------------|-------------------------------|
| CONTROL | 11.07 \pm 3.41 | 0.528 \pm 0.086 |
| Cd-1 μM | 16.0 \pm 1.57 | 0.511 \pm 0.010 |
| Cd-10 μM | 25.53 \pm 4.0 | 0.60 \pm 0.038 |

Tabla 1. Efecto del cadmio en la cinética de entrada de calcio, utilizando ^{45}Ca (actividad específica 1000cpm) en las células WRL-68. Los valores fueron obtenidos por una regresión de Lineweaver-Burke. Cada punto expresa el valor promedio \pm desviación estándar.

de calcio en función de la inversa de la concentración de cadmio (Figura 17), se encontró que el valor de la constante de inhibición (K_i) fue de $4.68\mu\text{M}$.

IV.12 PARTICIPACION DE LOS GRUPOS SULFHIDRILLO (SH) EN LA INHIBICION DE LA ENTRADA DE CALCIO POR CADMIO

Para evaluar el papel que juegan los grupos sulfhidrilo en la inhibición de la entrada de calcio, se estudió la reversibilidad de la inhibición de la entrada de calcio por $50\mu\text{M}$ de cadmio en presencia de un agente reductor de los grupos SH, el 1-4 ditiotreitól (DTT). Como control se evaluó que la entrada de Ca no fuese afectada por la presencia de DTT. En la Figura 18, se graficaron los nmoles de Ca^{+2}/mg de proteína en función del tiempo. Se observa que en las células tratadas con $50\mu\text{M}$ de CdCl_2 , la entrada de Ca se encuentra inhibida en un 34% a los 60min de incubación con respecto al control. Al adicionar el DTT en presencia del metal, se observa una recuperación en la entrada de calcio hasta de un 90% (1.16 ± 0.11 nmoles Ca^{2+}/mg de proteína). De estos resultados se ve que los grupos SH de la membrana celular juegan un papel relevante en el mecanismo por el cual el cadmio inhibe la entrada de calcio a las células WRL-68.

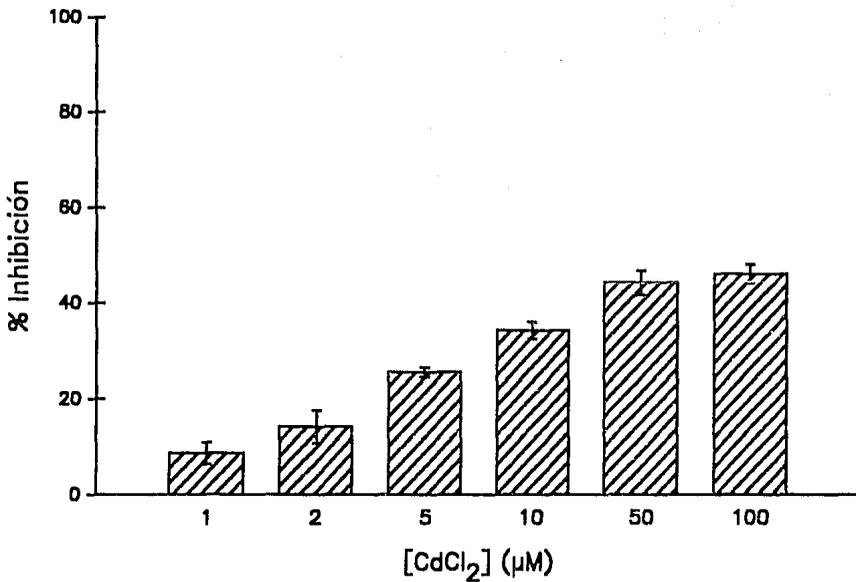


Figura 16. Efecto de diferentes concentraciones de cadmio sobre la entrada de calcio, utilizando ⁴⁵Ca (actividad específica 1000cpm) después de 30min de exposición en las células WRL-68. Cada punto expresa el valor promedio ± error tipo.

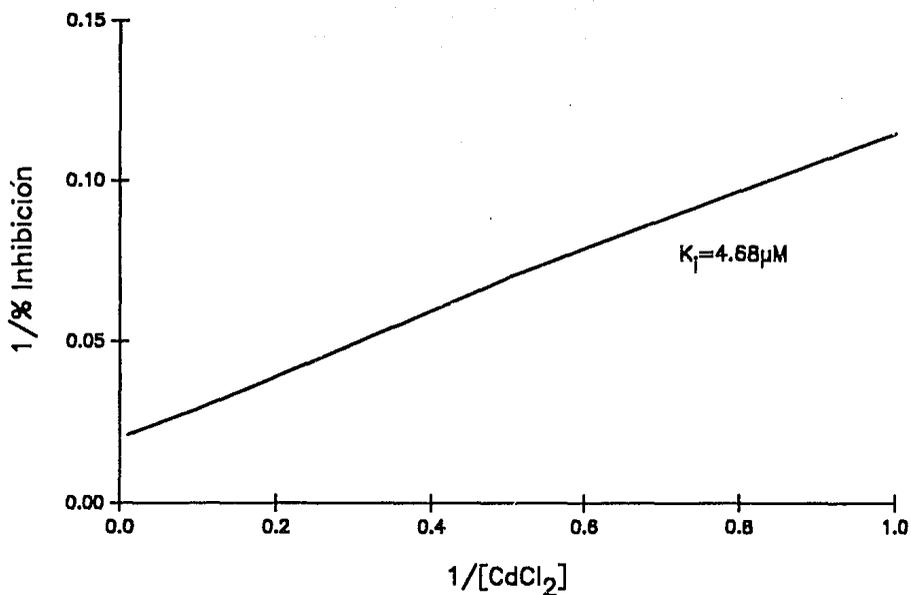


Figura 17. Determinación de la constante de inhibición (K_i) del cadmio sobre la entrada de calcio, utilizando ^{45}Ca (actividad específica 1000cpm) después de 30min de exposición en las células WRL-68. Cada punto expresa el valor promedio \pm error tipo.

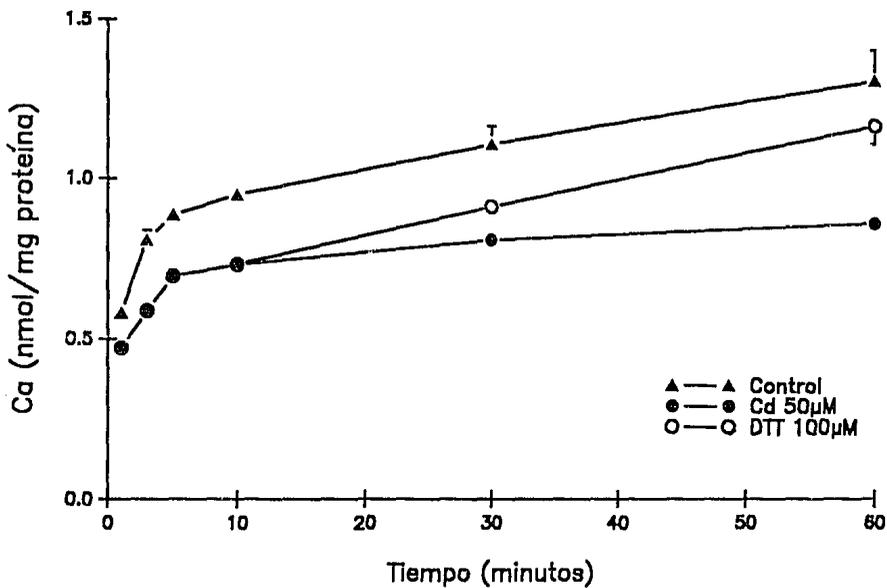


Figura 18. Participación de los grupos sulfhidrilos (SH) en la inhibición de la entrada de calcio, utilizando ^{45}Ca (actividad específica 1000cpm) por el cadmio a diferentes tiempos de exposición en las células WRL-68. Cada punto expresa el valor promedio \pm error tipo.

V-DISCUSSION

V.1 ALTERACIONES FUNCIONALES Y MORFOLOGICAS PRODUCIDAS POR EL CADMIO EN LAS CELULAS WRL-68

La línea celular WRL-68 fue utilizada para determinar las alteraciones de algunos parámetros funcionales que son tradicionalmente considerados como medida de daño celular. Las células presentaron una curva de viabilidad dosis dependiente, donde la DL_{50} fue de $4.66 \mu\text{M}$ de CdCl_2 , concentración semejante a la reportada para la línea celular 3T3 de fibroblastos de ratón, de aproximadamente $4.16 \mu\text{M}$ (Borenfreud y Puerner 1986). Las células WRL-68 mostraron un 50% de viabilidad en presencia de $5 \mu\text{M}$ de CdCl_2 durante 24h, valor un poco más alto que el presentado por las células endoteliales hepáticas, de 32%, después de 24h de exposición al metal (Liu et al 1992a), lo que hace suponer que las células WRL-68 son menos sensibles a la presencia del cadmio. Al comparar la toxicidad del cadmio con respecto a otros metales se encuentra que es más tóxico que Cr, Ni, Mn, Co y Zn, mientras que Ag y Hg son más tóxicos que el cadmio (Liu et al 1991, Borenfreud y Puerner 1986). En el presente trabajo las condiciones elegidas para exponer a las células al cadmio fueron de $0.5 \mu\text{M}$ de CdCl_2 , concentración a la cual se presentaba un 100% de viabilidad con dos períodos de exposición: 24h y 7d, ya que se tenía interés en comparar el daño causado por una concentración que no causaba mortalidad por diferentes periodos de tratamiento y la otra concentración elegida fue de $5.0 \mu\text{M}$ de CdCl_2 por presentar las células una viabilidad cercana al 50% con un período de exposición de 24h únicamente, y así poder evaluar el daño con diferentes dosis del metal. Por tanto, arbitrariamente, como se ha señalado en otra sección de este trabajo, se ha denominado tratamiento leve a una exposición de $0.5 \mu\text{M}$ durante 24h, tratamiento crónico la misma

concentración pero durante 7d y tratamiento agudo a una exposición de 5 μ M durante 24h. Para evaluar si la presencia del metal alteraba la velocidad de proliferación celular, se siguió durante 7d el crecimiento de las células. Se encontró que al menos durante los 7d, tiempo de exposición en el tratamiento crónico, la velocidad con la cual las células proliferaban no se veía afectada por la presencia del metal, así como tampoco la capacidad de adhesión (datos no mostrados); sin embargo, aunque en este trabajo no se siguió la proliferación de las células tratadas agudamente debido a su baja viabilidad en presencia del metal, reportes de células endoteliales expuestas a 2.0 y 5.0 μ M de CdCl₂ durante 24h, muestran que su proliferación se ve disminuida, muy probablemente debido a que el metal inhibe la síntesis de DNA, RNA y proteínas (Kagi et al 1992). Es importante hacer notar que aunque la concentración de CdCl₂ agregado al medio de cultivo es 0.5 y 5.0 μ M, los medios en los cuales las células son crecidas y expuestas al Cd contienen suero de ternera y ya que el Cd se une a proteínas del suero (Nordberg et al 1986), la concentración de Cd libre en el medio es mucho menor que la concentración de Cd agregada; se reporta que el cadmio es de 2 a 5 veces más potente cuando es adicionado a las células LLC-PK en un medio libre de suero o en buffer, pero los efectos bajo estas condiciones son cualitativamente idénticos a los producidos cuando el suero está presente (Prozialeck y Niewenhuis 1991). Sin embargo, la mayoría de los autores reportan la concentración del metal agregado como la concentración de tratamiento, por lo que en este trabajo se manejó de la misma manera.

Los cambios morfológicos presentados en las células WR-68 fueron evaluados en los diferentes tratamientos; no se observaron cambios por microscopía óptica en los tratamientos leve y crónico, sin embargo, en las células tratadas con 5.0 μ M del metal, la morfología se alteró de una forma poligonal a una redondeada, observando una menor fuerza de unión de la célula al

sustrato, efecto similar al encontrado en células endoteliales expuestas a la misma dosis y período (Kagi et al 1992). Con concentraciones mayores de 10.0µM de CdCl₂, las células aún por microscopía óptica, muestran alteraciones a nivel de membrana que podría tener como consecuencia un incremento en la permeabilidad de ella, la cual es seguida de una necrosis. Este incremento en la permeabilidad de la membrana puede deberse muy probablemente, primero a que al cadmio esté alterando las uniones intercelulares, como el caso reportado en las células LLC-PK (Prozialeck y Niewenhuis 1991) y segundo a que el cadmio esté modificando la organización del citoesqueleto, como el observado en las células MDCK, que por inmunofluorescencia, se muestra que la distribución del patrón de actina está alterado dramáticamente (Mills et al 1989), que se explica en función de la interacción del cadmio con los grupos sulfhidrilo de la tubulina.

La observación por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) de las células WRL-68 tratadas con cadmio, revela que los cambios en la morfología celular y en la ultraestructura son dependientes del tiempo de exposición y de la concentración del metal ya que aún en las concentraciones donde las células WRL-68 presentan 100% de viabilidad y que por microscopía óptica no se observan alteraciones, la ultraestructura celular se encontraba ya alterada, siendo mucho más dramáticos estos cambios a concentraciones más altas. En las células WRL-68 tratadas crónicamente se observa por MET que el RER está desorganizado, además de alteraciones en las crestas mitocondriales, no observadas en las células tratadas levemente, de lo que se puede concluir, que a pesar de que las células están tratadas con la misma concentración del metal, a mayor tiempo de exposición el daño es mayor. En el tratamiento agudo las alteraciones fueron más evidentes, se observó la presencia de numerosos polirribosomas en el citosol y cuerpos residuales, alteraciones en las crestas mitocondriales y

retículo endoplásmico fragmentado, resultados que son comparables con lo observado en muestras de hígado de rata intoxicadas agudamente con cadmio (Early et al, 1992).

La citotoxicidad fue evaluada determinando la actividad extracelular de la lactato deshidrogenasa (LDH) y se probó que su actividad no fuera inhibida por las concentraciones del metal utilizadas en este trabajo. La LDH se considera como una medida de daño que puede relacionarse con la muerte celular. Los resultados muestran que en las células WRL-68 tratadas leve y crónicamente la actividad de la LDH no se ve incrementada, sin embargo, en las tratadas agudamente, donde la muerte celular aumenta, la actividad se incrementa en 3 veces su valor con respecto al control, resultados semejantes se reportan en células endoteliales hepáticas crecidas con 5.0µM de CdCl₂ (Liu et al 1992a), y en cultivo primario de hepatocitos en donde encuentran un aumento considerable, de un 117%, en la actividad de LDH con tratamiento 0.2µg/ml de cadmio (Beattie et al 1990).

Las actividades de ASAT y ALAT se eligieron como marcadores bioquímicos de daño hepático ya que pueden considerarse indicadores de necrosis celular. En las células WRL-68 las actividades enzimáticas de ASAT y ALAT se encontraron incrementadas únicamente en las células tratadas con 5.0µM de CdCl₂, siendo los valores de un 150% y 110% respectivamente en comparación al control, lo que indica que las células WRL-68 sufren necrosis como resultado de la exposición aguda al cadmio, esto también se ve apoyado por el hecho de que por MET se encuentran alteraciones a nivel de membrana plasmática. En hígado de rata perfundido, se reporta un incremento en la actividad de la ALAT con una concentración diez veces mayor a la utilizada en el tratamiento agudo (Lupo et al 1986), del tal manera que en las células WRL-68, las actividades enzimáticas de la LDH, ASAT y ALAT únicamente se vieron incrementadas con concentraciones altas del metal.

Se ha relacionado a la lipoperoxidación (LPO) como uno de los posibles mecanismos de daño celular causado por el cadmio "in vivo" e "in vitro" (Stacey et al 1980a, Santone et al 1982, Müller 1986, Andersen y Andersen 1988). Se ha reportado que el cadmio inhibe la actividad de dos enzimas involucradas en la protección de daño debido a los radicales libres, la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD) en hígado de rata (Hussain et al 1987). En las células WRL-68 se encontró un 64% de incremento en el valor del grado de LPO en el tratamiento agudo y un 93% en el valor para el caso del tratamiento crónico a pesar de que no se observó pérdida de la integridad en la estructura de la membrana celular por microscopía óptica, no encontrando diferencia en las células tratadas con la misma dosis del metal pero con un período corto de exposición. Este hecho se podría explicar de dos diferentes formas, primero debido a que la catalasa y la SOD son sensibles al tiempo de exposición y a la concentración del metal inhibiendo su actividad, de tal manera que la desintoxicación de los aniones superóxidos formados disminuye, ocasionando lesiones severas en la célula y segundo porque el sistema de la glutatión peroxidasa también se encuentra bloqueado por el cadmio (Shukla et al 1989). Al aumentar la concentración del metal durante un tiempo corto de exposición (24h) se incrementa ligeramente la lipoperoxidación, resultado similar reportado en hepatocitos de rata expuestas a diferentes concentraciones de cadmio (Müller 1986), por lo que la LPO es evidente con concentraciones elevadas del metal o bien tratamiento prolongado, aunque la actividad de la LDH utilizada como medida de toxicidad celular se vió considerablemente aumentada. En el tratamiento agudo esto sugiere que la lipoperoxidación no es el primer evento en la toxicidad aguda debida al cadmio, pero puede ser una consecuencia del daño membranar inducido por el metal. Mas aún Stacey et al (1980a) han mostrado que la LPO no parece ser un evento crítico, ya que la toxicidad del Cd en hepatocitos de rata aislados no se ve alterada por la presencia de

agentes antioxidantes, donde la formación de malondialdehído y presumiblemente, la LPO están completamente bloqueadas.

La inducción de la MT en las células WRL-68 fue demostrada en este estudio, sugiriendo que el metal incrementa esta proteína por una acción directa sobre la célula, sin embargo, el papel fisiológico de la MT no se conoce con exactitud, pero parece estar involucrada en el control del metabolismo de metales esenciales tales como el Zn y el Cu (Cousins 1985), en la protección en contra de los metales pesados (Webb 1986) y recientemente se le ha dado un papel antioxidante durante el estrés producido por el cadmio (Giralt et al 1993). Se ha reportado "in vitro" que el orden de afinidad de los metales a la metalotioneína es: $Zn < Cd < Cu < Hg$ (Holt et al 1980), de tal manera que el cadmio puede reemplazar al Zn de la MT quedando la estructura como Cd_4 en el dominio A y Zn_2Cd , en el dominio B (Boulanger et al 1982, Funk et al 1987) en hígado de rata. En las células WRL-68 tratadas con $0.5\mu M$ de $CdCl_2$, se incrementó más el contenido de MT cuando el período de exposición se prolongó, por 7d, debido a que esta proteína es inducida y es acumulada en el interior celular. Resultados similares se reportan en cultivos primarios de hepatocitos de rata, donde la cantidad del metal unido a la MT se incrementa proporcionalmente a nivel intracelular con el cadmio presente (Failla et al 1979) y en un tratamiento agudo con $CdCl_2$, el mRNA para la MT intracelular se ve incrementado, por lo que concluyeron que el cadmio induce fuertemente la síntesis de MT (McKim et al 1992, Shiraishi y Waalkes 1994). Sin embargo, en las células WRL-68, tratadas con $5.0\mu M$ de $CdCl_2$, el contenido de MT disminuye con respecto al control, por lo que se realizó una curva dosis-respuesta, encontrando un máximo en la inducción de MT con $1.5\mu M$ de $CdCl_2$ durante 24h de tratamiento, cayendo drásticamente a partir de $2.5\mu M$ del metal, debido muy probablemente a que en general la síntesis de proteínas se ve disminuida (Bracken y Klaassen 1987). Se reporta

que la MT juega un papel muy importante en la protección celular, encontrando que en las células WRL-68, tratadas con una concentración pequeña de cadmio no se observa un incremento en la actividad de la LDH como medida de citotoxicidad; sin embargo, en las células tratadas con una dosis mayor, la actividad de la LDH se incrementa significativamente, de tal manera que la citotoxicidad del cadmio parece ser debido a la cantidad del ion cadmio libre que se encuentra presente en la célula, el cual no es secuestrado por la metalotioneína o glutatión disponible (Suzuki y Cherian 1989) ocasionando daño celular, debido a que disminuye la síntesis de MT y por lo tanto la protección celular disminuye alterando la función celular.

La habilidad del cadmio para unirse a los grupos sulfhidrilo (SH) se ha propuesto como una posible explicación de su citotoxicidad (Christie y Costa 1984), sin embargo, no se ha comprobado una relación directa, aunque se conoce que existe una interacción directa del metal con los componentes de la membrana celular. En las células WRL-68, el contenido de los grupos SH reducidos totales, proteicos y no proteicos disminuyeron en todos los tratamientos con el metal, encontrando el mismo contenido con una concentración de $0.5\mu\text{M}$ de CdCl_2 , aún en un tiempo prolongado de 7d de exposición, indicando que el metal tiene una afinidad alta por los grupos SH, siendo independiente del tiempo de exposición. Al aumentar la concentración del metal, la disminución de los grupos SH es más notoria en las células, debido a que aún existe disponibilidad de algunos grupos SH reducidos en las distintas proteínas que forman parte de las membranas celulares.

Se le ha dado al glutatión (GSH) un papel muy importante en ciertos procesos celulares incluyendo transporte de membrana, vías metabólicas, actividades enzimáticas, mantenimiento de la integridad de la membrana, síntesis de macromoléculas (Ketterer 1982, Kang y Enger 1991) y citoprotección por cadmio (Kang y Enger 1987, 1988, 1990), demostrado este último en

ratas tratadas con CdCl_2 y butionín sulfoximina (BSO) que es un inhibidor de la síntesis de glutatión, de tal manera que al disminuir la concentración de GSH en la célula, se presenta un incremento de la susceptibilidad hepatotóxica por el cadmio (Chan y Cherian 1992). La fracción soluble no proteica puede considerarse como el contenido de GSH reducido intracelular (Ponsoda et al 1991). En las células WRL-68, se encontró una disminución del 42% en el contenido del GSH reducido en los tratamientos leve y crónico, que podemos explicar, con base a que el cadmio se acompleja con GSH reducido intracelular vía grupos SH, de manera que protege a la célula de la toxicidad del cadmio, reflejado también por los valores obtenidos de las actividades enzimáticas de la LDH y las transaminasas, sin embargo, al aumentar la concentración de cadmio, en el tratamiento agudo, se encontró un 67% en la disminución del GSH reducido pero se ve aumentada la citotoxicidad, debido a que a esta concentración, probablemente el cadmio afecta el metabolismo del GSH como ha sido reportado por Wong y Klaassen 1981, que puede resultar en alteraciones de la integridad de las membranas, desprotegiendo a la célula y causando indirectamente efectos tóxicos por un incremento en el estrés oxidativo (Ponsoda et al 1991). Se ha reportado que el glutatión es un factor importante en el control de la lipoperoxidación (Halliwell y Gutteridge 1985), encontrando que el CdCl_2 disminuye los niveles de glutatión testicular (Sugawara y Sugawara 1984) e inhibe la actividad de la glutatión peroxidasa en riñón e hígado (Jamall y Smith 1985), de tal manera que esto podría explicar el aumento de la lipoperoxidación en las células WRL-68 por el cadmio, donde posiblemente aumente la sensibilidad de la glutatión peroxidasa aún con concentraciones pequeñas y en períodos largos de exposición al metal. De estos resultados observamos, que las células WRL-68 sufren alteraciones en algunas funciones bioquímicas semejantes a los reportados "in vitro" e "in vivo" (Friberg et al 1974, Iturry y Peña 1986) por el tratamiento con cadmio,

por lo que se puede considerar que son un modelo adecuado para estudiar los mecanismos de toxicidad producidos por el metal.

La toxicidad de los metales pesados se puede explicar por diferentes mecanismos generales: 1) compitiendo con metales esenciales en sus sitios funcionales, 2) formando complejos con los grupos sulfhidrilo de las proteínas debido, a su gran afinidad por estos grupos, cambiando la conformación de las enzimas o perturbando la unión enzima-sustrato (Goering 1993) y 3) bloqueando el transporte de iones esenciales (Sturrock et al 1990, Harris 1991, Blazka y Shaik 1991, 1992b).

Entre los resultados que apoyan estos mecanismos generales de daño en el caso específico del cadmio están la generación de radicales libres en hígado, riñón y testículo de rata (Sato et al 1983, Klimczak et al 1984, Sugawara y Sugawara 1984) que también se ha observado en hepatocitos aislados "in vitro" (Stacey et al 1980a, Waalkes et al 1985), aunque existen evidencias de que este proceso es independiente de la toxicidad celular (Stacey y Klaassen 1981, Müller y Ohnesorge 1982, Müller 1983). También se ha sugerido que la inhibición de la adenosina trifosfatasa, podría ser un posible mecanismo de daño (Vallee y Ulmer 1972, Christie y Costa 1984), aunque este mecanismo no se ha comprobado, ya que el efecto inhibitorio de los metales sobre la enzima no muestra ninguna asociación con la citotoxicidad (Stacey y Klaassen 1981). Otros de los mecanismos propuestos para explicar la toxicidad son la interferencia con las funciones mitocondriales que ha sido apoyada por algunos autores (Müller y Ohnesorge 1984), así como la habilidad de varios metales incluyendo el cadmio para interactuar con los grupos sulfhidrilo (Vallee y Ulmer 1972, Christie y Costa 1984), pero una participación directa no ha sido documentada, sin embargo, parece ser que existe una interacción directa del cadmio con los grupos SH, ya que existe una relación con el daño celular en hepatocitos aislados (Stacey

1986, Christie y Costa 1984), además hay reportes que indican una interacción directa del cadmio con los componentes del citoesqueleto (Mills y Ferm 1989). También se ha propuesto que el cadmio compite con el calcio (Babitch 1988), altera patrones de fosforilación (Suzuki et al 1985), interfiere con el calcio por los sitios de unión en la calmodulina (Flik et al 1987) e inhibe a la enzima inositol 1-fosfocinasa que pertenece al sistema de fosfato inositol como segundos mensajeros (Smith et al 1989). Así mismo, se encuentra en la literatura que el cadmio altera el metabolismo y función de metales esenciales tales como Cu, Zn, Fe, Mn, Se y Ca al competir por los ligandos en los sistemas biológicos (Petering et al 1979, Whanger 1979, Schafer y Forth 1984, Koziowska et al 1993), bloqueando los canales de calcio en diferentes tipos celulares (Kostrzewska y Sobieszek 1990, Blazka y Shaikh 1991; Chowdhury et al 1993), e inhibiendo la ATPasa de calcio (Verbost et al 1989, Visser et al 1993).

Estos mecanismos generales se explican en función de la interacción de los metales pesados con las diferentes macromoléculas a diferentes niveles: (1) un desplazamiento de un metal esencial de un sitio activo por un metal tóxico, (2) la unión de un metal iónico en un lugar diferente del sitio activo de la macromolécula, (3) a nivel de DNA un entrecruzamiento de bases ocasionando agregaciones no deseadas, (4) error en la síntesis de proteínas, el cual puede ser causado por un desapareamiento de bases y (5) despolimerización de macromoléculas biológicas (Eichhorn 1973). Existe una gran variedad en los mecanismos propuestos para explicar la citotoxicidad inducida por el cadmio, de tal manera que parece ser un proceso multifactorial, en donde existe una relación estrecha entre los diversos eventos señalados.

V.2 EFECTO DEL CADMIO SOBRE EL TRANSPORTE DE CALCIO EN LAS CELULAS WRL-68

El hígado juega un papel importante en la disposición de cadmio, en donde la acumulación de cadmio en hepatocitos de rata es un proceso dependiente de la concentración del metal e involucra grupos sulfhidrilo (SH) de las proteínas de la membrana plasmática (Failla et al 1979). En las células WRL-68 la acumulación de CdCl₂ fue dependiente de su concentración, así como del tiempo de exposición, presentado en las células tratadas con 0.5µM de CdCl₂, donde se incrementó la acumulación del metal cuando el tiempo de exposición fue prolongado, sin embargo, al aumentar la concentración de cadmio, la acumulación fue mucho mayor (29 veces) a pesar del período corto de exposición de 24h, donde parece ser que la interacción del cadmio con los grupos SH de las proteínas de las membranas son un sitio importante de unión. Esto ha sido estudiado por Gerson y Shaikh (1984) y reportan la presencia de un acarreador mediado por grupos SH para la entrada de cadmio en cultivos primarios de hepatocitos, de tal manera que la proporción de cadmio asociado a la membrana celular indica el número relativo de sitios de unión disponibles para el metal (Blazka y Shaikh 1992b). En el presente estudio la mayor parte del cadmio permaneció pegado a la membrana plasmática en todos los tratamientos, pudiéndose cuantificar mediante el uso de un agente quelante (EDTA) que es impermeable a la membrana y que remueve al metal unido a los diferentes grupos aniónicos del exterior celular (Blazka y Shaikh 1991). En las células tratadas leve y crónicamente no se encontró diferencia en el metal pegado a la membrana, sin embargo, en las células tratadas agudamente al aumentar la concentración del metal, se encontró entre 4 y 7 veces más metal pegado respectivamente, debido posiblemente a la presencia de sitios aniónicos disponibles que no habían sido ocupados por el metal a concentraciones menores.

No se conoce el mecanismo específico para la entrada de metales tóxicos no esenciales a la célula como es el caso del cadmio, sin embargo, es lógico pensar que ocurre a través de un

proceso existente para los metales esenciales (Blazka y Shaikh 1992b). Se sugiere que el primer evento en la entrada del metal es la unión a ligandos de la membrana plasmática, seguida de un proceso mediado por acarreador o por vía poros, o bien por un canal de calcio que opera por receptor (Blazka y Shaikh 1991). Se reporta que el cadmio altera el transporte de los metales esenciales como Fe (Sturrock et al 1990), Cu (Harris 1991), Zn (Blazka y Shaikh 1992b), Ca (Blazka y Shaik 1991) y ya que el transporte de calcio es de vital importancia en la célula, el interés de este trabajo fue el estudiar el efecto que tiene el cadmio sobre el transporte de este metal esencial. Entre los numerosos procesos que afecta el cadmio asociados al calcio son, un desensamblaje de los microtubulos (Perrino y Chou 1986), movilización del calcio intracelular e inhibición de la ATPasa de calcio (Smith et al 1989) así como desplazamiento del calcio de la calmodulina (Flik et al 1987). Se propone que uno de los mecanismos por los cuales el cadmio inhibe la entrada de calcio es por su interacción con los canales de calcio en la membrana plasmática (Blazka y Shaikh 1991), de tal manera que para identificar la presencia de canales de calcio en las células WRL-68, se estudió la inhibición de la entrada de calcio en presencia de los bloqueadores mas usuales (nifedipina y verapamil) del canal. Los resultados son muy semejantes a los reportados por Blaska y Shaikh (1991) en cultivos primarios de hepatocitos de rata. Se encontró que con 50 μ M del cloruro del metal, hay un 40% de inhibición en la entrada de calcio a la célula, porcentaje muy similar al obtenido en presencia de nifedipina. Bygrave et al (1989), reportan que la acumulación de calcio en hepatocitos ocurre por un proceso independiente de energía, el cual es sensible a temperatura. La cinética de la entrada de calcio en las células WRL-68, presentó un comportamiento similar al encontrado por otros investigadores en hepatocitos de rata (Blazka y Shaikh 1992b), siendo de caracter bifásico, con una fase inicial rápida en los primeros minutos, seguida de una fase mas lenta con un tiempo

máximo en la acumulación de 30min. Se ha reportado que el cadmio compite con los metales esenciales para su entrada en hepatocitos (Blazka y Shaikh 1991) y su acumulación en el hígado (Shukla et al 1990). En el presente estudio el cadmio disminuyó la acumulación de calcio de manera dosis-dependiente, con un 40% de inhibición como máximo en presencia de $100\mu\text{M}$ de CdCl_2 , valor 20% mas bajo que el reportado para hepatocitos de rata (Blazka y Shaikh 1992b), lo que hace suponer que las células WRL-68 son más sensibles a la presencia del cadmio, esto puede explicarse, con base a que la conformación estructural de las proteínas de membrana, puede ser cambiada por la interacción con el cadmio, dando como resultado alteración en los sitios de unión adicionales o en los canales iónicos o poros que participan en la acumulación de calcio en la célula (Blazka y Shaikh 1992b).

Con base a los datos obtenidos de las constantes cinéticas (K_m y V_{max}) para la entrada de calcio en presencia de cadmio, se encontró que el metal altera la K_m de una manera dependiente de su concentración, pero con dosis de $10.0\mu\text{M}$ de CdCl_2 y mayores, se obtentan valores muy semejantes, por lo que, los experimentos fueron realizados con la concentración máxima de $10.0\mu\text{M}$. El valor de la K_m en en las células WRL-68 aumentó en un 130% ($25.53\mu\text{M}$) con respecto al control, valor un poco más alto que el encontrado en células mesangiales ($19.0\mu\text{M}$) (Templeton 1990), sin embargo el valor de la V_{max} no se vió alterado, resultando un valor de $4.68\mu\text{M}$ para la K_i , lo que sugiere que parte del transporte del calcio a las células WRL-68 es inhibida de manera competitiva por el metal en algún sitio común existente para el calcio.

Se ha reportado que existe una interacción entre el cadmio y otros metales en cultivo de hepatocitos (Gerson y Shaikh 1984), en donde hay una competencia directa entre los metales esenciales y metales divalentes tóxicos por los ligandos que contienen grupos sulfhidrilo (SH) y se ha sugerido como un mecanismo posible para explicar la capacidad citotóxica del cadmio.

Stacey (1986) reporta que en presencia del agente reductor de los grupos SH ditioneitol (DTT) algunos parámetros de daño celular, como son la liberación de transaminasas y la disminución de potasio intracelular mejoran, debido a que tiene la habilidad de mantener a los grupos SH en su estado reducido. Además, se ha reportado que la estructura de la boca o entrada de los canales de calcio presentan sitios que son ricos en grupos SH (Catterall 1988, Koshita et al 1993), por lo que, se estudió la participación de los grupos sulfhidrilo (SH) en la recuperación del transporte de calcio inhibido por cadmio en presencia del DTT. Los resultados indican un reestablecimiento en la entrada de calcio de un 90%, indicando que la interacción del cadmio con los grupos SH juega un papel relevante en la inhibición de la entrada de calcio en las células WRL-68.

De los resultados presentados se puede concluir que el mecanismo de citotoxicidad del cadmio es un proceso multifactorial en el cual juegan un papel relevante la interacción del metal con los grupos SH así como la alteración del transporte de metales esenciales. En este trabajo se ha sugerido que los diferentes procesos para explicar la toxicidad no son eventos independientes, sino complejos y difíciles de evaluar independientemente, que se combinan para dar como resultado el daño a nivel celular. Con los resultados aquí presentados, se contribuye al entendimiento de algunos de los procesos de la citotoxicidad ocasionados por del cadmio, sin embargo, se requiere de una mayor cantidad de estudios para conocer el mecanismo específico de daño producido por este metal.

VI-BIBLIOGRAFIA

Albert L.A. (1990). *Curso básico de toxicología ambiental*. Ed Limusa. México. CPEHS. OPS. OMS. Chap 9, pp 145-169.

Andersen H.R. y Andersen O. (1988). *Effect of cadmium chloride on hepatic lipid peroxidation in mice*. *Pharmacol. Toxicol.* 63: 173-177.

Arrick B.A., Nathan C.F. y Cohn Z.A. (1984). *Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: A review*. *Cancer Res.* 44: 4224-4232.

Babitch J.A. (1988). *Cadmium neurotoxicity*. En: *Metal Neurotoxicity*. CRC Press, Boca Raton, FL. Chap 9, pp 141-166.

Ballatori N. y Boyer J.L. (1986). *Slow biliary elimination of methyl mercury in marine elasmobranchs. Raja erinacea and squalus acanthias*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85: 407-415.

Beattie J.H., Marion M., Schmit J.P. y Denizeau F. (1990). *The cytotoxic effects of cadmium chloride and mercury chloride mixtures in rat primary hepatocytes cultures*. *Toxicology* 62: 161-173.

Blazka M.E., Nola C.V. y Shaikh Z.A. (1988). *Developmental and sex differences in cadmium distribution and metallothionein induction and localization*. *J. Appl. Toxicol.* 8: 217-222.

Blazka M.E. y Shaikh Z.A. (1991). *Differences in cadmium and mercury uptakes by hepatocytes: role of cadmium channels*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110: 355-363.

Blazka M.E. y Shaikh Z.A. (1992a). *Comparison of cadmium, mercury and calcium accumulations by isolated hepatocytes of the small skate (Raja erinacea) and rat*. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C: 631-639.

Blazka M.E. y Shaikh Z.A. (1992b). *Cadmium and mercury accumulation in rat hepatocytes: interactions with other metals ions*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113: 118-125.

Bonner F.W., King L.J. y Parke D.V. (1980). *The effect of dietary cadmium on zinc, copper and iron levels in the bone of rats*. *Toxicol. Lett.* 5: 105-108.

Borenfreund E. y Puerner J.A. (1986). *Citotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed in vitro*. *Toxicology* 39: 121-134.

Boulanger Y., Armitage I.M., Miklossy K.A. y Winge D. (1982). ¹¹³Cd NMR study of a metallothionein fragment. Evidence for a two-domain structure. *J. Biol. Chem.* 257: 13717-12719.

Bracken W.M. y Klaassen C.D. (1987). *Induction of metallothionein in rat primary hepatocyte cultures: evidence for direct and indirect induction*. *J. Toxicol. Environ. Health* 22: 163-174.

Bucio L., Souza V., Albores A., Chávez E. y Gutiérrez R. (1994). *Cadmium and mercury toxicity in the WRL-68 cells*. *J. Toxicol. Environ. Health*. (En prensa).

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

Bus J.S., Vinegar A. y Brooks S.M. (1978). *Biochemical and changes in lungs of rats exposed to a cadmium chloride aerosol*. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 118: 573-580.

Bygrave F.L., Karjalainen A. y Altin J.G. (1989). *Passive calcium influx by plasma membrane vesicles isolated from rat liver*. *Cell Calcium* 10: 235-240.

Cammarota V.A. (1980). *Production and uses of zinc*. *Zinc in the Environmen*. J.O. Nriagu ed. John Wiley & Sons. New York, pp, 1-69.

Catterall W.A. (1988). *Structure and function of voltage-sensitive ion channels*. *Science* 242: 50-60.

Cavallaro N. y McBride M.B. (1978). *Copper and cadmium adsorption characteristics of selected acid and calcareous soil*. *Soils Sci. Soc. Amer. J.* 42: 550-556.

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

Cho C.H. y Fong L.Y.Y. (1990). *The interaction of ethanol and zinc on hepatic glutathione and glutathione transferase activity in mice*. *Agent Action* 29: 382-385.

Chowdhury P., Doi R., Inove K. y Rayford P. (1993). *The effect of intravenous cadmium on exocrine and endocrine pancreatic functions in conscious dogs*. *Biol. Tr. Elem. Res.* 39: 1-12.

Christie N.T. y Costa M. (1984). *In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV. Disposition of metals in cells: Interactions with membranes, glutathione, metallothionein and DNA*. *Biol. Tr. Elem. Res.* 6: 139-158.

Coodley E.L. (1971). *Enzyme diagnosis in hepatic disease*. *Amer. J. Gastroent.* 56: 413-419.

Cousins R.J. (1985). *Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc. Special reference to metallothionein and ceruloplasmin*. *Physiol. Rev.* 65: 238-309.

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

Dudley D.L., Svoboda D.J. y Klaassen C.D. (1984). Time course of cadmium-induced ultrastructural changes in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 76: 150-160.

Dunn M.A., Blalock T.L. y Cousins R.J. (1987). Metallothionein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 185: 107-119.

Early H.J.L., Nonavinakere V.K. y Weaver A. (1992). Effect of cadmium and/or selenium on liver mitochondria and rough endoplasmic reticulum in the rat. *Toxicol. Lett.* 62: 73-83.

Eaton D.L., Stacey N.H., Wong K.L. y Klaassen C.D. (1980). Dose-response effects of various metal ion on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase and cytochrome P-450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55: 393-402.

Eichhorn G.L. (1973). *Inorganic biochemistry*. Ed Eichhorn G.L. Elsevier, Amsterdam, pp 227-448.

Elinder C.G. (1979). Relationship between cadmium concentration in human liver, blood and bile. A comparison with and metabolic model. *Environ. Res.* 17: 236-241.

Elinder C.G. (1987). Cadmium: uses, occurrences and intake. In *cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal* (L. Friberg, T. Kjellstrom and G.F. Nordberg, Ed.), Press, Boca Raton, FL, pp 7-22.

Eitinger M.J., Darwish H.M. y Schmitt R.C. (1986). Mechanism of copper transport from plasma to hepatocytes. *Fed. Proc.* 45: 2800-2804.

Failla M.L., Cousins R.J. y Mascenik M.J. (1979). Cadmium accumulation and metabolism by rat liver parenchymal cells in primary monolayer culture. *Biochim. Biophys. Acta* 583: 63-72.

Farber J.L. (1981). The role of calcium in cell death. *Life Sci.* 29: 1289-1295.

Farris M.W. (1985). Mechanism of chemical-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 79: 296-306.

Feldman S.L. y Cousins R.J. (1973). Influence of cadmium on the metabolism of 25-hydroxy calciferol in chicks. *Nur. Rep. Int.* 8: 251-259.

Flik G., van der Winkiel J.G.J., Part P., Wendwlaar Bonga S.E. y Lock R.A.C. (1987). Calmodulin-mediated cadmium inhibition of phosphodiesterase activity in vitro. *Arch. Toxicol.* 59: 353-359.

Friberg L., Piscator M., Nordberg G.F. y Kjellstrom T. (1974). *Cadmium in the Environment*, 2nd. Ed, CRC Press, Cleveland, pp 93-202.

Fukino H., Hirai M., Hsueh Y. M., Moriyasu S. y Yamane Y. (1986). *Mechanism of protection by zinc against mercuric chloride toxicity in rats: Effect of zinc and mercury on glutathione metabolism*. *J. Toxicol. Environ. Health* 19: 75-89.

Funk A.E., Day F.A. y Brody F.O. (1987). *Displacement of zinc and copper from copper-induced metallothionein by cadmium and by mercury: in vivo and ex vivo studies*. *Comp. Biochem. Physiol.* 86C: 1-6.

Garate A., Ramos I., Manzanares M. y Lucena J.J. (1993). *Cadmium uptake and distribution in three cultivars of *Lactuca sp.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 709-716.

Garattini S. (1986). *Toxic effects of chemicals: difficulties in extrapolating data from animals to man*. *CRC. Crit. Rev. Toxicol.* 16: 1-29.

Garty M., Bracken W.M. y Klaassen C.D. (1986). *Cadmium uptake by rat red blood cells*. *Toxicology* 42: 111-119.

Gerson R.J. y Shaikh Z.A. (1982). *Uptake and binding of cadmium and mercury to metallothionein in rat hepatocyte primary cultures*. *Biochem. J.* 208: 465-472.

Gerson R.J. y Shaikh Z.A. (1984). *Differences in the uptake of cadmium and mercury by rat hepatocyte primary cultures: Role of a sulfhydryl carrier*. *Biochem. Pharmacol.* 33: 199-203.

Giralt M., Hidalgo J. y Armario A. (1993). *Chronic stress reduces serum but not liver metallothionein response to acute stress*. *Chem. Biol. Interact.* 88: 1-5.

Goering P.L. y Klaassen C.D. (1984a). *Tolerance to cadmium-induced hepatotoxicity following cadmium pretreatment*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 74: 308-313.

Goering P.L. y Klaassen C.D. (1984b). *Zinc-induced tolerance to cadmium hepatotoxicity*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 74: 299-307.

Goering P.L. (1993). *Lead protein interactions as a basis for lead toxicity*. *Neurotoxicology* 14: 45-60.

Gutiérrez C., Bucio L., Gómez J.L., Campos C., Souza V., Cárabez A. y Mourelle M. (1991). *Functional and morphological alterations on WRL-68 cell chronically and acutely treated with ethanol*. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34: 39-42.

Gutiérrez M.C., Bucio L., Souza V., Aranda A., Cárabez A. y Chávez E. (1992). *Morphological and functional alterations of WRL-68 treated with heavy metals*. *West. Pharmacol. Soc.* 35: 57-60.

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

Gutiérrez M.C., Bucio L., Souza V. y Cárabez A. (1994b). *The effect of chronic and acute ethanol treatment on morphology, lipid peroxidation, enzyme activities and Na⁺ transport systems on WRL-68 cells. En prensa Hum. Exp. Toxicol.*

Halliwell B. y Gutteridge M.C. (1985). *The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. Mol. Aspects Med.* 8: 89-193.

Harris E.D. (1991). *Copper transport: An overview. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 196: 130-140.

Herrero T.C y Martín L.F. (1993). *Evaluation of cadmium levels in fertilized soils. Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 61-68.

Holth D., Magos L. y Webb M. (1980). *The interaction of cadmium-induced rat renal metallothionein with bivalent mercury in vitro. Chem. Biol. Interact.* 32: 125-136.

Hussain I., Shukla G.S. y Chandra S.V. (1987). *Effects of Cd on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats: In-vivo and in-vitro studies. Pharmacol. Toxicol.* 60: 355-359.

Iturri S.J. y Peña A. (1986). *Heavy metal-induced inhibition of transport in the small intestine in vitro. Interaction with other ions. Comp. Biochem. Physiol.* 84C: 363-368.

Jamall I.S. y Smith J.C. (1985). *Effects of cadmium treatment on selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidase activities and lipid peroxidation in the kidney and liver of rats maintained of various levels of dietary selenium. Arch. Toxicol.* 58: 102-105.

Jordan S.A. y Bhatnagar M.K. (1990). *Hepatic enzyme activity after combined administration of methylmercury, lead and cadmium in the pekin duck. Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 623-628.

Kagi T., Mishima A., Yamamoto C., Sakamoto M. y Koizumi F. (1992). *Effect of cadmium on the monolayer maintenance of vascular endothelial cells in culture. Toxicology* 71: 267-276.

Kang Y.J. y Enger M.D. (1987). *Effect of cellular glutathione depletion on cadmium-induced cytotoxicity in human lung carcinoma cells. Cell. Biol. Toxicol.* 3: 347-360

Kang Y.J. y Enger M.D. (1988). *Glutathione is involved in the early cadmium cytotoxic response in human lung carcinoma cells. Toxicology* 48: 93-101.

Kang Y.J. y Enger M.D. (1990). Cadmium citotoxicity correlates with the changes in glutathione content that occur during the logarithmic growth phase of A549-T27 cells. *Toxicol. Lett.* 51: 23-28.

Kang Y.L. y Enger M.D. (1991). Cadmium inhibits EGF-induced DNA synthesis but increase cellular glutathione levels in NRK-49F cells. *Toxicology* 66: 325-333.

Karin M., Andersen R.D. y Herschman H.R. (1981). Induction of metallothionein mRNA in HeLa cells by dexamethasone and by heavy metals. *Eur. J. Biochem.* 118: 527-531.

Kawase T., Kato S. y Lieber C.S. (1989). Lipid peroxidation and antioxidant defense system in rat liver after ethanol feeding. *Hepatology* 10: 815-821.

Kershaw W.C., Iga T. y Klaassen C.D. (1990). Ethanol decreases cadmium hepatotoxicity in rats: Possible role of hepatic metallothionein induction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 106: 448-455.

Ketterer B. (1982). The role of nonenzymatic reactions of glutathione in xenobiotic metabolism. *Drug Metab. Rev.* 13: 161-187.

Klimczak J., Wisniewska-Knypl J.M. y Kolakowski J. (1984). Stimulation of lipid peroxidation and heme oxygenase activity with inhibition of cytochrome P-450 monooxygenase in the liver of rats repeatedly exposed to cadmium. *Toxicology* 32: 267-276.

Koshita M., Niwa K. y Oba T. (1993). Sulfhydryl oxidation induces calcium release from fragmented sarcoplasmic reticulum even in the presence of glutathione. *Experientia* 49: 282-284.

Kostrzewska A. y Sobieszek A. (1990). Diverse actions of cadmium on the smooth muscle myosin phosphorylation system. *FEBS.* 263: 381-384.

Kostrzewska A. y Laudanski T. (1991). Influence of cadmium ions on the reactivity of isolated human uterine arteries. *J. Toxicol. Environ. Health.* 34: 187-195.

Koziowska K., Brzozowska A., Sulkowska J. y Roszkowski W. (1993). The effect of cadmium on iron metabolism in rats. *Nutr. Res.* 13: 1163-1172.

Krishnamurty K.V., Shipirt E. y Readdy M.M. (1976). Trace metal extraction of soils and sediments by nitric acid-hydrogen peroxide. *Atom. Absorp. Newsllett.* 15: 68-70.

Lauwerys R.R., Buchet J.P., Roels H.A., Brouwers J. y Stanescu D. (1974). Epidemiological survey of workers exposed to cadmium. Effect on lung, kidney and several biological indices. *Arch. Environ. Health.* 28: 145-148.

Lehman L.D. y Klaassen C.D. (1986). Dosage-dependent disposition of cadmium administered orally to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 84: 159-167.

- Li W., Zhao Y. y Chou I.N. (1993). Alterations in cytoskeletal protein sulfhydryls and cellular glutathione in cultured cells exposed to cadmium and nickel ions. *Toxicology* 77: 65-79.
- Liu J., Kershaw W.C. y Klaassen C.D. (1991). The protective effect of metallothionein on the toxicity of various metals in rat primary hepatocyte culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107: 27-34.
- Liu J., Kershaw W.C. y Klaassen C.D. (1992a). Protective effects of zinc on cultured rat primary hepatocytes to metals with low affinity for metallothionein. *J. Toxicol. Environ. Health.* 35: 51-62.
- Liu J., Kershaw W.C., Liu Y.P. y Klaassen C.D. (1992b). Cadmium-induced hepatic endothelial cell injury in inbred strains of mice. *Toxicology* 75: 51-62.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951). Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lupo S., Hewitt W.R. y Rush G.F. (1986). Cadmium toxicity in the isolated perfused rat liver. *Toxicol. Lett.* 34: 5-11.
- Maines M.D. y Kappas A. (1977). Metals as regulators of heme metabolism. *Science* 198: 1215-1221.
- Manca D., Ricard A.C., Trottier B. y Chevalier G. (1991). In vitro and in vivo responses of rat tissues to cadmium-induced lipid peroxidation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46: 929-936.
- McKim J.M., Liu J., Liu Y.P. y Klaassen C.D. (1992). Distribution of cadmium chloride and cadmium-metallothionein to liver parenchymal, kupffer and endothelial cell: their relative ability to express metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 112: 324-330.
- Mills J.W. y Ferm V.H. (1989). Effect of cadmium on F-actin and microtubules of madin-darby canine kidney cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 101: 245-254.
- Moldeus P., Hogberg J. y Orrenius. (1978). Isolation and use of liver cells. En: W.B. Jacob (ed). *Meth. Enzimol.* pp. 60-71.
- Morgan E.H. y Baker E. (1986). Iron uptake and metabolism by hepatocytes. *Fed. Proc.* 45: 2810-2816.
- Müller L. y Ohnesorge F.K. (1982). Different response of liver parenchymal cells from starved and fed rats to cadmium. *Toxicology* 25: 141-150.
- Müller L. (1983). Influence of paracetamol (acetaminophen) on cadmium-induced lipid peroxidation in hepatocytes from starved rats. *Toxicol. Lett.* 15: 159-165.

- Müller L. y Ohnesorge F.K. (1984). Cadmium-induced alteration of the energy level in isolated hepatocytes. *Toxicology* 31: 297-306.
- Müller L. (1986). Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Toxicology* 40: 285-295.
- Müller L. y Stacey N.H. (1988). Subcellular toxicity of low level cadmium in rats: effect on cytochrome c oxidase. *Toxicology* 51: 25-34.
- Nielson K.B., Atkin C.L. y Wingw D.R. (1985). Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J. Biol. Chem.* 260: 5342-5350.
- Nolan C.V. y Shaikh Z.A. (1986). The vascular endothelium as a target tissue in acute cadmium toxicity. *Life Sci.* 39: 1403-1409.
- Nomiyama K., Sugata Y., Yamamoto A. y Nomiyama H. (1975). Effects of dietary cadmium on rabbits. I. Early signs of cadmium intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31: 4-12.
- Nordberg G.F., Kjellström T. y Nordberg M. (1986). Kinetics and metabolism. En: *Cadmium and Health. A Toxicological and Epidemiological Appraisal.* (L. Friberg, G.G. Elinder, T. Kjellstrom and G.F. Nordberg, Eds). CRC Press. Boca Raton. Vol 1, pp 103-178.
- Nriagu J.O. (1980). Production, uses and properties of cadmium. En: J. O. Nriagu ed. *Cadmium in the Environmental. Part 1.* John Willy & Sons. New York. NY, pp. 35-70.
- Nriagu J.O. (1982). Deposition and chemistry of the pollutant metals in lakes around the smelters at Sudbury, Ontario. *Environ. Sci. Technol.* 16: 551-560.
- Ochi Y., Takahashi K. y Ohsawa M. (1987). Indirect evidence for the induction of a prooxidant state by cadmium mechanism for the induction. *Mur. Res.* 180: 257-266.
- Olafsdottir K., Pascoe G.A. y Reed D.J. (1988). Mitochondrial glutathione status during Ca^{2+} ionophoro-induced injury in isolated hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys* 262: 226-235.
- Pattison S.E. y Cousins R.J. (1986). Zinc uptake and metabolism by hepatocytes. *Fed. Proc.* 45: 2805-2809.
- Perrino B.A. y Chou I.N. (1986). Role of calmodulin in cadmium-induced microtubule disassembly. *Cell. Biol. Intl. Rep.* 10: 565-573.
- Petering H.G., Choudhury H. y Stemmer K.L. (1979). Some effects of oral ingestion of cadmium on zinc, copper and iron metabolism. *Environ. Health. Persp.* 28: 97-106.
- Poli G., Albano E. y Dianzani M.U. (1987). The role of lipid peroxidation in liver

damage. *Chem. Phys. Lipid* 45: 117-142.

Ponsoda X., Jover R., Lechón G.J., Fabra R., Trullenque R. y Castell V.J. (1991). Intracellular glutathione in human hepatocytes incubated with S-adenosyl-L-methionine and GSH-depleting drugs. *Toxicology* 70: 293-302.

Prasada Rao P.V.V. y Gardner D.E. (1986). Effects of cadmium inhalation on mitochondrial enzymes in rat tissue. *J. Toxicol. Environ. Health* 17: 191-199.

Prozialeck W.C. y Niewenhuis R.J. (1991). Cadmium (Cd^{2+}) disrupts intercellular junctions and actin filaments in LLC-PK cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107: 81-97.

Prozialeck W.C. y Lamer P.C. (1993). Surface binding and uptake of cadmium (Cd^{2+}) by LLC-PK cells on permeable membrane supports. *Arch. Toxicol.* 67: 113-119.

Rahola T. (1972). Half-time studies of mercury and cadmium by whole-body counting: Assessment of radioactive contaminants in man. *Environ. Res.* 22: 46-60.

Ramel C. y Magnusson J. (1969). Genetic effects of organic mercury compounds. *Heredity* 61: 203-254.

Rehm S. y Waalkes M.P. (1990). Acute cadmium chloride-induced renal toxicity in the syrian hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 104: 94-105.

Reitman S. y Frankel S. (1957). A colorimetric methods for the determination of serum oxaloacetic and glutamic piruvic transaminases. *Amer. J. Clin. Pathol.* 28: 56-63.

Salaspuro M. (1987). Use of enzymes for the diagnosis of alcohol related organ damage. In: *Enzyme*. 37: 87-107.

Santone K.S., Bruckner J.V. y Acosta D. (1982). Cadmium toxicity in primary cultures of rat hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health* 10: 169-177.

Sato M., Yamanobe K. y Nagai Y. (1983). Sex-related differences in cadmium-induced lipid peroxidation in the rat. *Life Sci.* 33: 903-908.

Schafer S.G. y Forth W. (1984). Effect of acute and subchronic exposure to cadmium on the retention of iron in rats. *J. Nutr.* 114: 1989-1996.

Scheuhammer A.M. y Cherian G. (1986). Quantification of metallothionein by silver-saturation method. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 82: 417-425.

Sedlak J. y Lindsay R.H. (1968). Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25: 192-205.

Shiraishi N. y Waalkes M.P. (1994). Enhancement of metallothionein gene expression in male wistar (WF/NCr) rats by treatment with calmodulin inhibitors: Potential role of calcium regulatory pathways in MT induction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 125: 97-103.

Shukla G.S., Hussain T. y Chandra S.V. (1987). Possible role of regional superoxide dismutase activity and lipid peroxide levels in cadmium neurotoxicity: In-vivo and in-vitro studies in growing rats. *Life Sci.* 41: 2215-2222.

Shukla G.S., Hussain T., Srivastava R.S. y Chandra S.V. (1989). Glutathione peroxidase and catalase in liver, kidney, testes and brain of rats following cadmium exposure and subsequent withdrawal. *Ind. Health.* 27: 59-69.

Shukla A., Agarwal K.N. y Shukla G.S. (1990). Effect of latent iron deficiency on the levels of iron, calcium, zinc, copper, manganese, cadmium and lead in liver, kidney and spleen of growing rats. *Experientia.* 46: 751-752.

Sinclair J.F., McCaffrey J., Sinclair P.R., Bement W.J. y Gelboin H.V. (1991). Ethanol increase cytochromes P-450 IIE, IIB 1/2 and IIIA in culture rat hepatocytes. *Arch. Biophys.* 284: 360-365.

Singhal R.K., Anderson M.E. y Meister A. (1987). Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB. J.* 1: 220-223

Smith J.B., Dwyer S.D. y Smith L. (1989). Cadmium evokes inositol polyphosphate formation and calcium mobilization. *J. Biol. Chem.* 264: 7115-7118.

Stacey N.H., Cantilena L.R. y Klaassen C.D. (1980a). Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53: 470-480.

Stacey H.N. y Klaassen C.D. (1980b). Cadmium uptake by isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55: 448-455.

Stacey H.N. y Klaassen C.D. (1981). Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health* 7: 139-147.

Stacey N.H. (1986). Protective effects of dithiothreitol on cadmium-induced injury in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 82: 224-232.

Street J.J. (1978). The influence of pH levels, Cd, sewage and incubation times on the solubility and absorption of Cd by plant. *J. Environ. Qual.* 7: 286-290.

Sturrock A., Alexander J., Lamb J., Craven C.M. y Kaplan J. (1990). Characterization of a transferrin-independent uptake system for iron in Hela cells. *J. Biol. Chem.* 265: 3139-3145.

- Sugawara N. y Sugawara C. (1984). Selenium protection against testicular lipid peroxidation from cadmium. *J. Appl. Biochem.* 6: 199-204.
- Sunderman F.W. Jr. (1986). Metals and lipid peroxidation. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 59, suppl. VII, 248-255.
- Suzuki K., Ikebuchi H. y Terao T. (1985). Mercury and cadmium ions stimulate phosphorylation of band 4.2 protein on human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 260: 4526-4530.
- Suzuki C.A.M. y Cherian M.G. (1989). Renal glutathion depletion and nephrotoxicity of cadmium-metallothionein in rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 98: 544-552.
- Templeton D.M. (1990). Cadmium uptake by cells of renal origin. *J. Biol. Chem.* 265: 21764-21770.
- Thomas J.P., Bachowski G.J. y Girotti A.W. (1986). Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium and zinc metallothioneins. *Biochim. Biophys. Acta.* 884: 448-461.
- Thorstensen K. y Romslo I. (1988). Uptake of iron from transferrin by isolated rat hepatocytes: A redox mediated membrane process?. *J. Biol. Chem.* 263: 8844-8850.
- Vallee B.L. y Ulmer D.D. (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annu. Rev. Biochem.* 41: 91-128.
- Verboost P.M., Flik G., Pang P.K.T., Lock R.A.C. y Bonga S.E.W. (1989). Cadmium inhibition of the erythrocyte Ca^{2+} pump: A molecular interpretation. *J. Biol. Chem.* 264: 5613-5615.
- Visser G.J., Peters P.H.J. y Theuvenet A.P.R. (1993). Cadmium is a non-competitive inhibitor of red cell Ca^{2+} -ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1152:26-34.
- Waalkes M.P., Harvey M.J. y Klaassen C.D. (1984a). Relative in vitro affinity of hepatic metallothionein for metals. *Toxicol. Lett.* 20: 33-39.
- Waalkes M.P., Hjelle J.J. y Klaassen C.D. (1984b). Transient induction of hepatic metallothionein following oral ethanol administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 74: 230-236.
- Waalkes M.P. y Klaassen C.D. (1984c). Postnatal ontogeny of metallothionein in various organs of the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 74: 314-320.
- Waalkes M.P., Wilson M.J. y Poirier L.A. (1985). Reduced cadmium-induced cytotoxicity in cultured liver cells following 5-aza-cytidine pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81: 250-257.

Waldron H.A. (1980). *Metals in the environment*. Ed Academic Press. INC. (London). New York. Toronto. Chap 3, pp. 61-110.

Webb M. (1972). *Binding of cadmium ions by rat liver and kidney*. *Biochem. Pharmacol.* 21: 2751-2765.

Webb M. (1986). *Role of metallothionein in cadmium metabolism*. En: *Handbook of Experimental Pharmacology*. (E.C. Foulkes, Ed). Springer. Verlag. Berlin, pp 281-337.

Whanger P.D. (1979). *Cadmium effects in rats on tissue iron, selenium and blood pressure. Blood and hair cadmium in some Oregon residents*. *Environ. Health. Persp.* 28: 115-121.

Wong K.L. y Klaassen C.D. (1981). *Relationship between liver and kidney levels of glutathione and metallothionein in rats*. *Toxicology* 19: 39-47.

Yamada H. y Koizumi S. (1993). *Induction of a 70-kDa protein human lymphocytes exposed to inorganic heavy metals and toxic organic compounds*. *Toxicology* 131-138.

Yamamoto S. (1991). *Enzymatic lipid peroxidation: reactions of mammalian lipoxygenases*. *Free Radical Biol. Med.* 10: 149-159.

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

Yujinagasaka., Fujii S. y Kaneko T. (1989). *Microsomal glutathione-dependent protection against lipid peroxidation acts through a factor other than glutathione peroxidase and glutathione S-transferase in rat liver*. *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 274. No. 1, pp 82-86.