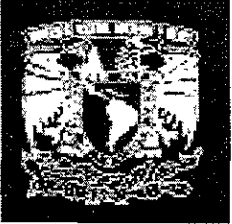
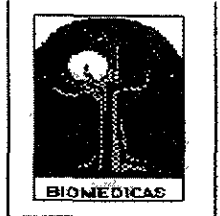


11281



36



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

**“FACTORES INVOLUCRADOS EN LA INDUCCION DE
DAÑO AL DNA POR EXPOSICION VIA INHALATORIA A
PLOMO Y CADMIO.”**

PRESENTA
MIBB MAHARA A. VALVERDE RAMÍREZ

TUTOR
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

México, D.F. Agosto 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

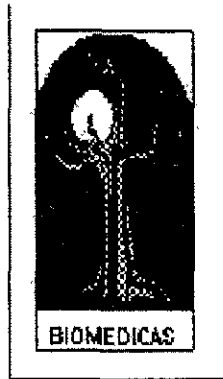


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética y Toxicología Molecular bajo la dirección del Dr. Emilio Rojas y la tutoría de los Drs. Rafael Camacho, Javier Espinosa y Teresa I. Fortoul van Der Goes.

Gracias a las becas otorgadas por DGEP, CONACYT y los apoyos tanto de PAEP No. 201390 y CONACYT 3180P-M

AGRADECIMIENTOS

A los miembros de mi comité tutorial, los Drs. Rafael Camacho, Javier Espinosa, Teresa I. Fortoul y Emilio Rojas por sus valiosas recomendaciones y críticas durante la realización del proyecto.

A los miembros del Jurado examinador, Dra. Victoria Chagoya, Dr. Emilio Rojas, Dr. Javier Espinosa, Dr. Saúl Villatreviño, Dr. Mariano Cebrián, Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt, Dr. Rafael Camacho por su tiempo y valiosos aportes y comentarios en la revisión de este trabajo.

Indudablemente a mis compañeros de laboratorio con quienes compartí trabajo y momentos inolvidables durante estos años. GRACIAS Ma. Carmen, Patty, Daniel, Tzutzuy, Anselmo, Rodrigo, Gaby, Monse, Anita, Adrianita, Sandra, Ernesto, Io, Daniela, Mónica, Carlitos.

Al Departamento de Biología Celular y Tisular por proporcionarnos la cámara de inhalación y el ultranebulizador, gracias a los cuales se pudo realizar la parte medular de este proyecto.

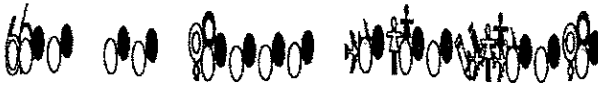
Al apoyo otorgado por los laboratorios que dirigen la Dra. Victoria Chagoya y el Dr. Rolando Hernández para la determinación de la peroxidación de lípidos de membrana.

Agradecimiento es poco para describir la insuperable ayuda y enseñanza recibida de CRISTINA TREJO, la cual se convirtió en un ejemplo a seguir tanto en el aspecto personal como académico.

Este trabajo esta dedicado especialmente a quienes ya no se encuentran conmigo y siguen siendo mis pilares espirituales.



A mi mamá, GINA y ANGEL



**A toda mi familia, tías, tíos, primas, primos, sobrinas, sobrinos,
quñado**



A la familia Rojas del Castillo y del Castillo



A EMILIO

INDICE

ABSTRACT	2
RESUMEN	3
I INTRODUCCIÓN	4
Exposición ambiental a metales pesados	4
Antecedentes de la exposición a plomo (Pb)	5
Toxicidad del plomo	6
Manifestaciones por exposición aguda y crónica a plomo	8
Mutagenicidad genotoxicidad y carcinogenicidad del plomo	9
Antecedentes de la exposición a cadmio (Cd)	11
Toxicidad del cadmio	12
Manifestaciones por la exposición aguda a cadmio	13
Manifestaciones por la exposición crónica a cadmio	13
Mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogenicidad del cadmio	14
Factores involucrados en la inducción de daño por exposición a metales	17
Interacción de metales con el DNA	18
Metales y estrés oxidativo	18
Metales y reparación del DNA	21
Metales y respuesta inflamatoria	24
Planteamiento de la investigación	28
II HIPÓTESIS	29
III OBJETIVOS	30
IV RESULTADOS	31

A) Evaluación del daño al DNA ocasionado por la exposición vía inhalatoria a plomo y cadmio -----	31
Daño al DNA inducido por la inhalación de acetato de plomo -----	31
Daño al DNA inducido por la inhalación de cloruro de cadmio -----	32
B) Efecto genotóxico ocasionado por acción directa del metal sobre el DNA -----	33
C) Presencia de especies reactivas de oxígeno -----	34
I. Niveles de peroxidación en lípidos de membrana -----	34
Fraccionamiento celular -----	36
Resultados -----	38
Lipoperoxidación en pulmón -----	38
Lipoperoxidación en hígado -----	39
Lipoperoxidación en riñón -----	40
II. Modelo celular deficiente en γGCS -----	41
D) Evaluación de la capacidad reparativa del DNA por la exposición a Plomo y Cadmio -----	44
E) Cambios en los niveles de expresión de citocinas de respuesta proinflamatoria, IL-1α y TNFα -----	46
Resultados -----	47
Niveles de citocinas proinflamatorias en pulmón -----	48
Niveles de citocinas proinflamatorias en hígado -----	49
Niveles de citocinas proinflamatorias en riñón -----	49
V DISCUSIÓN -----	50
VI CONCLUSIONES -----	56
VII BIBLIOGRAFÍA -----	57

Indice de tablas, figuras y gráficas

TABLAS

Tabla 1.- Niveles de diferentes metales en pulmones de individuos que murieron en la década de los 50's y 80's.

Tabla 2.- Características químicas del plomo y el cadmio.

Tabla 3.- Esquema de inhalaciones realizado según el tipo de tratamiento para determinar la peroxidación de lípidos de membrana.

Tabla 4.- Diseño experimental para evaluar la inducción de daño al DNA mediante la electroforesis unicelular.

Tabla 5.- Diseño experimental para evaluar la inducción de daño al DNA y cinética de reparación mediante la electroforesis unicelular a pH >13.

FIGURAS

Figura 1.- Producción de radicales libres por efecto de metales y sus consecuencias.

Figura 2.- Respuesta sistémica y cascada de eventos presentes durante la respuesta de fase aguda.

Figura 3.- Radicales libres generados por xenobióticos y los productos de las reacciones entre éstos y diferentes macromoléculas celulares.

Figura 4.- Metodología de la electroforesis unicelular o ensayo cometa.

Figura 5.- Factores involucrados en la inducción de daño al DNA por la exposición a plomo y cadmio.

GRAFICAS

Gráfica 1.- Niveles de radicales libres inducidos por la exposición vía inhalatoria a plomo y cadmio en diferentes fracciones celulares de pulmón.

Gráfica 2.- Niveles de radicales libres inducidos por la exposición vía inhalatoria a plomo y cadmio en diferentes fracciones celulares de hígado.

Gráfica 3.- Niveles de radicales libres inducidos por la exposición vía inhalatoria a plomo y cadmio en diferentes fracciones celulares de riñón.

Gráfica 4a.- Distribución del daño al DNA inducido por plomo y cadmio en células SL-3 (Wt), determinado mediante el ensayo cometa a pH 12.3 (RCS).

Gráfica 4b.- Distribución del daño al DNA inducido por plomo y cadmio en células SL-x creciendo en GSH, determinado mediante el ensayo cometa a pH 12.3 (RCS).

Gráfica 4c.- Distribución del daño al DNA inducido por plomo y cadmio en células SL-x creciendo sin GSH, determinado mediante el ensayo cometa a pH 12.3 (RCS).

Gráfica 5a.- Distribución del daño al DNA inducido por plomo y cadmio en células SL-3 (Wt), determinado mediante el ensayo cometa a pH 13 (RCS y SAL).

Gráfica 5b.- Distribución del daño al DNA inducido por plomo y cadmio en células SL-x creciendo en GSH, determinado mediante el ensayo cometa a pH 13 (RCS y SAL).

Gráfica 5c.- Distribución del daño al DNA inducido por plomo y cadmio en células SL-x creciendo sin GSH, determinado mediante el ensayo cometa a pH 13 (RCS y SAL).

Gráfica 5d.- Porcentaje de inducción de sitios alcali lábiles por efecto de plomo y cadmio en células SL-3 (Wt), SL-x (+GSH) y SL-x (-GSH).

Gráfica 6a.- Distribución del daño al DNA inducido por Pb 50 μ M y su cinética reparativa en células SL-3 (Wt), determinado mediante el ensayo cometa.

Gráfica 6b.- Distribución del daño al DNA inducido por Pb 100 μ M y su cinética reparativa en células SL-3 (Wt), determinado mediante el ensayo cometa.

Gráfica 6c.- Distribución del daño al DNA inducido por Cd 50 μ M y su cinética reparativa en células SL-3 (Wt), determinado mediante el ensayo cometa.

Gráfica 6d.- Distribución del daño al DNA inducido por Cd 100 μ M y su cinética reparativa en células SL-3 (Wt),

Gráfica 7a.- Distribución del daño al DNA inducido por Pb 50 μ M y su cinética reparativa en células SL-x creciendo con GSH, determinado mediante el ensayo cometa.

Gráfica 7b.- Distribución del daño al DNA inducido por Pb 100 μ M y su cinética reparativa en células SL-x creciendo con GSH, determinado mediante el ensayo cometa.

Gráfica 7c.- Distribución del daño al DNA inducido por Cd 50µM y su cinética reparativa en células SL-x creciendo con GSH, determinado mediante el ensayo cometa.

Gráfica 7d.- Distribución del daño al DNA inducido por Cd 100µM y su cinética reparativa en células SL-x creciendo con GSH, determinado mediante el ensayo cometa.

Gráfica 8a.- Distribución del daño al DNA inducido por Pb 50µM y su cinética reparativa en células SL-x creciendo sin GSH, determinado mediante el ensayo cometa.

Gráfica 8b.- Distribución del daño al DNA inducido por Pb 100µM y su cinética reparativa en células SL-x creciendo sin GSH, determinado mediante el ensayo cometa.

Gráfica 8c.- Distribución del daño al DNA inducido por Cd 50µM y su cinética reparativa en células SL-x creciendo sin GSH, determinado mediante el ensayo cometa.

Gráfica 8d.- Distribución del daño al DNA inducido por Cd 100µM y su cinética reparativa en células SL-x creciendo sin GSH, determinado mediante el ensayo cometa.

Gráfica 9. Niveles de citocinas proinflamatorias en diferentes órganos de ratón inducidos por la inhalación de plomo y cadmio.

ABSTRACT

DNA damage induced by lead and cadmium inhalation, evaluated as DNA single strand breaks previously reported (Valverde et al., 2000 and Valverde et al., in press), showed a high induction in several mice organ (leukocytes, nasal epithelial cells, lung, liver, kidney, brain, bone marrow and testicle), both by an acute and subchronical exposition. These results conduct us to propose the present project, trying to understand the factors involved in DNA damage induction by the inhalation of these metals.

First, we studied the capacity of direct interaction between DNA and metals (employing similar concentrations for both metals to the Ambient Air Quality Standard), finding that lead and cadmium do not have this capacity, suggesting that DNA damage observed previously could be due to indirect mechanisms such as the oxidative stress, the trigger of inflammatory response or the inhibition of DNA-repair response.

We used the induction of lipid peroxidation as a marker for oxidative stress generation in different cell fractions from mice lung, liver and kidney. We found variable level of malondialdehyde in different exposition protocols, this could indicate that reactive oxygen species are involved in this processes but they are not the principal factor in the DNA damage generation previously detected. Although, employing two alkaline versions of the comet assay in a cellular model which had a glutathione depletion we observed that these metals can induce oxidative DNA damage and an impairment of DNA repair, suggesting an important role of this antioxidant agent in the induction and removal of DNA damage.

Furthermore we measured the proinflammatory cytokine levels such as $TNF\alpha$ and $IL-1\alpha$, detecting an increase of these cytokines in lung and liver but not in kidney. Our results suggest that the DNA damage could be due to the trigger of the proinflammatory response, increasing the reactive oxygen species levels and depending of the intracellular antioxidant levels (glutathione), these species could reach DNA, producing single strand breaks

RESUMEN

Como consecuencia de la gran actividad industrial y el número de vehículos circulantes, ciudades como la nuestra, padecen de altos índices de contaminación ambiental, siendo los metales un aporte importante. Por ello y debido a la importancia de conocer los efectos biológicos que la exposición a este tipo de agentes ocasionan sobre los organismos fue que abordamos este problema y encontramos que la exposición a plomo y cadmio vía inhalatoria, indujo daño genotóxico expresado como rompimientos de cadena sencilla del DNA, este daño mostró ser sistémico debido a la magnitud alcanzada en diferentes órganos de ratón (células del epitelio nasal, pulmón, hígado, riñón, cerebro, médula, testículo), tanto por una exposición aguda como subcrónica, permaneciendo el efecto hasta por cuatro semanas, aunque hubo casos en los cuales se observó una tendencia a disminuir.

Esto nos condujo a buscar los mecanismos de acción tanto directos como indirectos mediante los cuales el plomo y el cadmio pudieran inducir este tipo de daño sobre el DNA. En principio se exploró la capacidad de estos metales para interactuar directamente con el DNA y causar daño clastogénico, encontrando que a concentraciones similares a la norma permisible en aire para ambos metales, éstos no tienen la capacidad de generar rompimientos en el DNA, sugiriendo que el mecanismo mediante el cual el plomo y el cadmio por una exposición vía inhalatoria inducen daño al DNA es indirecto. Entre los mecanismos de acción indirectos que se abordaron se encuentra la generación de estrés oxidativo, el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria y la capacidad de inhibición de la reparación del DNA. Para evaluar la generación de estrés oxidativo se determinó la inducción de lipoperoxidación en diferentes fracciones celulares de pulmón, hígado y riñón, donde se encontraron niveles de malondialdehído variables entre los diferentes protocolos de exposición. Esto podría indicar que las especies reactivas de oxígeno involucradas en este proceso no son el principal causal de la generación de daño al DNA observado. Sin embargo, al poder evaluar la generación de daño al DNA mediante diferentes condiciones del ensayo cometa en un modelo celular en el cual esta ausente uno de los antioxidantes de mayor importancia como lo es el glutatión (GSH), es que se detectó la importancia de esta molécula tanto en la inducción de rompimientos en la cadena de DNA como su papel en la reparación del daño al DNA inducido por estos metales. Por otro lado, no identificamos la inhibición del proceso reparativo por efecto de estos metales. Pero se observó el establecimiento de una respuesta inflamatoria en el pulmón y el hígado, en donde se encontró un incremento de los niveles de citocinas como el TNF α e IL-1 α , las cuales son inducidas por estrés oxidativo y que a su vez tienen la capacidad de inducir antioxidantes como metalotoneínas y proteínas "heat shock". Estos resultados nos indican que la generación de daño genotóxico por la exposición a plomo y cadmio se establece debido a mecanismos de acción indirectos, donde el estado redox celular juega un papel importante.

I INTRODUCCION

Exposición ambiental a metales pesados.

Los metales pesados son bioacumulados en diversas formas (inorgánicas o como compuestos orgánicos), de cualquier manera, no son degradados ni biológica ni químicamente como ocurre en el caso de la contaminación por compuestos orgánicos, por lo cual permanecen en el organismo por largos periodos, de ahí que sean de los *contaminantes ambientales más peligrosos* (Timbrell, 1995). Metales pesados como el cobre (Cu), plomo (Pb), mercurio (Hg), etc., forman complejos con diferentes iones y moléculas, ejerciendo toxicidad por su alta afinidad con los grupos amonio y sulfidrilo (Martell, 1981). Al reaccionar los metales con estos grupos se forman complejos metálicos y como consecuencia de ello algunas enzimas pierden su efectividad para controlar reacciones metabólicas.

La contaminación ambiental provocada por metales pesados ha ido en aumento debido a la actividad humana. Las actividades industriales y urbanas generan metales pesados en forma de partículas y gases. Actualmente, los niveles de metales en la atmósfera no solo dependen del control y de la eficiencia del uso de combustibles fósiles y de las reservas minerales, sino también de la carga residual de metales en los depósitos globales, esto repercute sobre el ambiente natural y por lo tanto en el hombre. Estos efectos provienen de dos grandes vías de exposición, 1) Transporte de contaminantes en el ambiente por el aire, agua, suelo y comida, generados por la actividad antropogénica y 2) Alteración de las formas químicas o bioquímicas de los elementos (Goyer, 1991; Rojas et al., 2000).

Antecedentes en cuanto a la acumulación de metales en el organismo debido a exposición ambiental fueron reportados en 1996 por Fortoul y colaboradores, quienes utilizando al pulmón como un indicador de exposición, detectaron la presencia de concentraciones elevadas de metales como cadmio (Cd), cobalto (Co), níquel (Ni), Cu y Pb en residentes de la Ciudad de México (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles de diferentes metales en pulmones de individuos que murieron en la década de los 50's y 80's ($\mu\text{g/g}$ peso seco).

Metal	50's	80's
Cadmio (Cd)	1.2\pm0.37	25.6\pm 6.65
Cobalto (Co)	3.0 \pm 0.97	37.2 \pm 8.67
Cobre (Cu)	10.0 \pm 2.97	44.8 \pm 15.7
Níquel (Ni)	3.0 \pm 0.96	57.6 \pm 9.3
Plomo (Pb)	12.0\pm4.97	134.3\pm26.7

Fortouí et al., 1996

Cabe mencionar que de los resultados mostrados en la tabla 1, el plomo y el cadmio fueron de los metales que incrementaron más veces sus concentraciones, de ahí la importancia trabajar con ellos. Las características químicas de ambos metales se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 2. Características químicas del plomo y el cadmio.

Característica	Plomo	Cadmio
Símbolo	Pb	Cd
Familia a la que pertenecen	IV A	II B
Número atómico	82	48
Peso molecular	207.19	112.41
Valencia	+2 y +4	+2
Color	Azul grisáceo	Blanco

Antecedentes de la exposición a plomo (Pb).

El plomo está presente en la atmósfera y se origina por procesos naturales y actividad humana (Browne et al., 1999). En la naturaleza se encuentra incorporado a diversos compuestos que son obtenidos de forma impura y que requieren ser purificados, una vez obtenido se fracciona principalmente en dos compuestos: minio (monóxido de plomo) y litergirio (tetróxido de plomo), que son materia prima en la elaboración de varios productos. Se ha propuesto que cada año los volcanes emiten de 1 a 6,400 toneladas métricas de Pb. La emisión de Pb por actividad humana ha sido estimada en

450,000 toneladas métricas al año. El 90% de emisión antropogénica en E.U se debe a la combustión de gasolinas con Pb y en menor grado por la combustión de carbón y desechos de aceites. El Pb ha sido ampliamente usado como un componente de pinturas, así como de diversos compuestos orgánicos presentes en combustibles (Mendoza, 1996; Mineral Industry Surverys, 1996).

El plomo es un metal conocido por el hombre desde tiempos remotos; su descubrimiento y transformación han permitido la elaboración de algunos utensilios y herramientas desde el siglo XV a la fecha; sin embargo, su uso también ha significado riesgo por exposición directa, lo cual se ha incrementado en la actualidad (Skerfving, 1988; Johnson, 1998).

Es sabido que los egipcios usaban al plomo como material para estatuillas, utensilios de cocina, amuletos y monedas; durante todo el imperio romano se uso en tuberías para agua, adornos, material de cocina y recipientes para vino (Skerfving, 1988; Landrigan, 1990). En esta época ya se conocían algunos síntomas de intoxicación por plomo, pero fue hasta el siglo XII cuando se integró un listado de procesos patológicos asociados al uso del plomo, debido al uso de barro mal vidriado y al uso de plomo en la destilación de ron. A fines del siglo XIX aumentó la intoxicación por este metal cuando aparecieron los motores de combustión interna. En los últimos 50 años, el uso del tetraetilo de plomo como antidetonante en las gasolinas y en la elaboración de acumuladores, generalizo el riesgo de contaminación ambiental (Skerfving, 1988; Tenenbein, 1997; Johnson, 1998; Nriagu y Kim, 2000).

Toxicidad del plomo.

Actualmente se dice que no hay tejido u órgano que no sea afectado por el metal, su similitud con el calcio (ambos son iones divalentes en solución), así como su fuerte afinidad por grupos sulfhidrilos en proteínas y otros ligandos como fosfatos, cadenas cisteinil e histidil, hacen que el organismo no sea capaz de distinguirlos fácilmente y de esta manera el plomo toma el lugar del calcio en varias funciones celulares como la contracción muscular, excitabilidad neuromuscular, desarrollo del hueso, permeabilidad de membranas, coagulación sanguínea, etc. (Mendoza, 1996; Ariza et al., 1999, Silbergeld et al , 2000).

Debido a su presencia en varios órganos, el plomo es uno de los metales más importantes en toxicología. La intoxicación por este elemento puede ser de origen laboral, accidental, alimenticio o por contaminación ambiental; su absorción, distribución y eliminación se llevan a cabo de la siguiente manera. Las dos vías más importantes de intoxicación son el aparato digestivo y los pulmones, el paso por la piel es mínimo y en el aparato digestivo la absorción es baja. La vía respiratoria es la fuente principal de intoxicación (Olaiz et al., 1996). Por otra parte el tamaño de las partículas es fundamental, si el diámetro es de $0.01\mu\text{m}$ todo el metal se absorbe, cuando el tamaño es mayor queda atrapado de diferentes formas en los diversos tejidos, siendo el tejido óseo donde se almacena el 90% de lo absorbido por el cuerpo, le siguen en orden descendente de absorción el hígado, riñón, músculo, arterias y cerebro (Hatch et al., 1985; Goyer, 1991).

Las intoxicaciones por plomo se dan principalmente en personas que están laboralmente expuestas al metal, aunque el saturnismo por ingestión accidental ocurre con cierta frecuencia.

En fetos de ratas se ha encontrado que el cerebro se afecta severamente; el crecimiento cerebral es retardado, se reduce la producción de DNA y se pierde peso cerebral al nacimiento; en humanos se reporta la influencia del plomo en la capacidad intelectual y en el comportamiento de los niños (Mahaffey, 1977; Skerfving, 1988). Otros estudios llevados a cabo en rata hicieron evidente el bajo peso en órganos como el hígado y riñón de fetos, en el riñón se encontraron los túbulos renales dañados por el plomo que condujeron a aminoaciduria y glicosuria en las ratas, así como cambios renales crónicos (Timbrell, 1995).

En el aire de la Ciudad de México el Pb es el único metal que se mide en algunas de las estaciones de la red de monitoreo ambiental de dicha ciudad. Se refiere que en ciertas zonas, la norma Mexicana para este metal que es de $1.5\ \mu\text{g}/\text{m}^3$, es rebasada con regularidad. Estudios en escolares de esta ciudad indican que a pesar de las acciones tomadas para controlar los niveles de Pb en el aire, la concentración de este metal en sangre aún esta por arriba de las $10\ \mu\text{g}/\text{dL}$ y la fuente de ingreso más importante la representa el aire (Romieu et al., 1992 y Olaiz et al., 1996).

En cuanto a la reproducción, en humanos se ha observado disminución en la fertilidad, abortos y mortinatos; los experimentos en rata han mostrado la presencia de adenomas y carcinomas renales asociados a malformaciones congénitas y mutagenicidad, además de una evidente disminución en la fertilidad (Browder, 1973; Landrigan et al., 2000). A nivel enzimático, el plomo ataca principalmente a las metaloenzimas como la deshidratasa o ferroquelatasa y provoca una disminución en la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en eritrocitos, aunque el monóxido de carbono también la inhibe y de este modo pueden actuar de manera sinérgica (Zúñiga, 1981). En la síntesis del grupo hemo se alteran algunos pasos para la unión con hierro, aumentando los niveles de ácido delta aminolevulínico (ALA) y de protoporfirinas eritrocíticas libres (PELs), por inhibición de la deshidratasa del ALA y ferroquelatasa de la protoporfirina III, respectivamente, lo que conduce a anemia hemolítica: por último, el plomo cataliza la hidrólisis no enzimática de trifosfato de adenosina (ATP) e inhibe la incorporación de adenina al RNA (Martin, 1984). Todo esto ilustra la amplia gama de toxicidad que genera este metal en el organismo.

Tanto en adultos como en niños se pueden encontrar valores elevados de plomo en sangre (mayores de $10\mu\text{g/dL}$), PEL (mayores de $30\mu\text{g/dL}$) o de ALA en sangre u orina. El aumento en los niveles de absorción de plomo generalmente se refleja como un aumento en la concentración de este elemento en sangre, pero esta relación no siempre se observa. Los síntomas de la intoxicación por plomo siempre son los mismos y son resultado del daño metabólico que produce el metal en cada órgano o tejido, en algunos de ellos se conoce su acción específica y en otros se continúa investigando (Binder, 1992; Silbergeld et al., 2000).

Manifestaciones por exposición aguda y crónica a plomo.

Los síntomas de intoxicación por el plomo o saturnismo son: constipación severa, anorexia, encefalopatía aguda, dolor abdominal y vómito; en adultos hay hiperirritabilidad, constipación y dolor abdominal agudo; en niños se ha observado vómito intermitente y varios grados de anemia. Se ha reportado que la intoxicación por plomo puede provocar edema cerebral, ataxia, estupor y debilidad generalizada, coma y convulsiones, aún con terapia de quelantes los cambios en el sistema nervioso central

son frecuentemente permanentes, hay hiperactividad y pérdida de la capacidad motora fina, déficit en la inteligencia y las habilidades de asociación y coordinación visual y motora (Browder et al., 1973; Olaiz et al., 1996; Silbergeld et al., 2000). En Estados Unidos la intoxicación aguda por plomo ocurre muy raras veces y la sintomatología que refieren las personas consta de dolor de cabeza, cólico, calambres, debilidad muscular, depresión, coma y muerte 1 o 2 días posteriores al accidente (Johnson, 1998). En otros países la intoxicación ocurre con mayor frecuencia, en Taiwan este tipo de intoxicación representa la tercera causa de intoxicación ocupacional (Liou, 1994). Las principales características de la intoxicación crónica a plomo son el síndrome neuromuscular, involucrando parálisis de sistema nervioso motor y anemia, causada por la inhibición de los ácidos δ -aminolevulínico sintetasa (ALAS), δ -aminolevulínico dehidratasa (ALAD) (enzima necesaria para la biosíntesis del hemo) y la enzima mitocondrial ferroquelatasa, daño renal, esterilidad (tanto en mujeres como en hombres), anomalías en el desarrollo fetal, anomalías en el desarrollo y función neuronal (Johnson, 1998). El plomo produce efectos adversos en el sistema vascular y el corazón. Estos efectos incluyen miocarditis, anomalías electrocardiográficas, disminuye la sístole ventricular, hipertensión y degeneración vascular (Kopp et al., 1988) En el riñón uno de los efectos es el daño a nivel de los tubulos, presentándose un hinchamiento de las células, daño mitocondrial, aminoaciduria, fibrosis y atrofia. La gota Saturnina (una forma de artritis) ocurre en asociación a exposiciones crónicas a plomo como resultado de la disfunción y atrofia de los tubulos renales (Nolan y Shaikh, 1992). La exposición a plomo ha mostrado efectos debilitando la defensa inmune, incrementando la susceptibilidad a infecciones virales y bacterianas, así mismo, reduce la resistencia a endotoxinas y disminuye la síntesis de anticuerpos. Algunos de los efectos sobre el sistema inmune ocurren como el resultado de la interacción con metalotioneína (Borghesi et al , 1996; Johnson, 1998).

Mutagenicidad genotoxicidad y carcinogenicidad del plomo.

Los compuestos de plomo inducen tumores en roedores, pero este potencial carcinogénico no ha mostrado ser contundente en humanos (IARC, 1980). Se ha considerado a este elemento como un posible carcinógeno para humanos con base en

los datos obtenidos en animales. Efectos sinérgicos en cuanto a la tumorigenicidad con algunos carcinógenos para ratones se han reportado desde inicios de la década de los 90's (Magos, 1991). El Pb(II) también puede inducir transformación (DiPaolo et al., 1978), y puede potenciar la transformación viral in vitro (Casto et al., 1979). En los estudios realizados en sistemas bacterianos para evaluar mutagenicidad, este metal ha mostrado resultados negativos (Nishioka, 1975; Kanematsu et al., 1980); excepto para la inducción de fago lambda en *E. Coli* (Rossman et al., 1984; Rossman, 1995).

Compuestos de Pb(II) tanto solubles como insolubles son mutágenos débiles para el locus hprt en células de hámster chino V79 (Zelikoff et al., 1988). Cuando células G12 son expuestas a compuestos de plomo, hay una pequeña pero significativa respuesta mutagénica en el locus transgénico gpt solo a concentraciones tóxicas (20% sobrevivencia) (Roy y Rossman, 1992). El mecanismo de mutagenicidad del Pb(II) a concentraciones altas, no está claro. Por un lado, no se ha detectado la inducción de daño directo al DNA del tipo de rompimientos de cadena, o entrecruzamientos DNA-proteína detectados mediante elusión alcalina (Zelikoff et al., 1988) o mediante sedimentación de nucleótidos (Hartwig et al., 1990). Sin embargo, a través de "nick translation" para detectar rompimientos en la cadena de DNA en células permeabilizadas tratadas con Pb(II) se observó un incremento en la incorporación de nucleótidos por la DNA polimerasa I de *E. Coli* (Roy y Rossman, 1992). El resultado obtenido de la "nick translation" sugiere que altas concentraciones de Pb(II) pueden inducir cortes dentro del DNA cromosomal, inhibir la ligación de cortes preexistentes, o ambos procesos (Hartwig, 1994; Hartwig, 1995). Estos cortes pueden ser ocasionados por radicales hidroxilo ya que cuando las células fueron tratadas simultáneamente con acetato de plomo y yoduro de potasio (atrapador de radicales hidroxilo), la inducción de sitios de corte transducibles fue parcialmente bloqueada (Rossman, 1995). Sin embargo, no está claro porque mediante elusión alcalina o técnicas de sedimentación de nucleótidos no se observaron rompimientos en la cadena de DNA. Sales de plomo a concentraciones extremadamente altas han mostrado disminuir la fidelidad en la replicación del DNA (Zakour et al., 1981; Sirover y Loeb, 1976; Hartwig, 1994). El Pb(II) en presencia de H₂O₂, causa cortes en plásmidos de DNA superenrollados (Roy y Rossman, 1992)

Un aspecto importante por considerar en el estudio de los efectos adversos del plomo, se encuentra en un trabajo realizado por Rossman y colaboradores (1987), en donde se reporta que este metal es capaz de inducir citotoxicidad en células de mamífero a concentraciones en donde se formaban compuestos con precipitados insolubles del Pb, sugiriendo que la fagocitosis puede ser una ruta eficiente para la entrada y transporte del ión. La fagocitosis realizada por leucocitos polimorfonucleares humanos de algunos compuestos metálicos insolubles causa la producción de H_2O_2 (Zhong et al., 1990). También hay algunos indicativos de que el proceso de fagocitosis per se, puede generar H_2O_2 dentro de la célula. Quizás el H_2O_2 generado como resultado del proceso de la fagocitosis, es el responsable de la gran mutagenicidad del acetato de plomo, el cual precipita en medio de cultivo, comparado con el nitrato de plomo que no muestra dicha precipitación. Mientras que altas concentraciones de plomo son requeridas para detectar mutagenicidad o potenciar la mutagenicidad inducida por la luz U.V. (Hartwig et al., 1990; Hartwig, 1994; Roy y Rossman, 1992), dosis bajas no citotóxicas son comutagénicas con la MNNG (Roy y Rossman, 1992). La potenciación de estos efectos probablemente sea debida a la inhibición de la reparación del DNA (Hartwig, 1994). Análisis de sedimentación de nucleótidos muestran que en presencia de Pb(II), los rompimientos de la cadena de DNA generados por luz U.V. persisten (Hartwig et al., 1990; Hartwig, 1994). Esto sugiere que las etapas tanto de ligación como de polimerización en la reparación del DNA están inhibidas (Hartwig, 1994; Hartwig, 1995). Al respecto hay varios trabajos, Popenoe y Schmaeler (1979) reportan que el Pb(II) inhibe la actividad de la DNA polimerasa- β , enzima involucrada en la reparación del DNA, así mismo, se ha reportado que el Pb(II) inhibe la reparación replicativa en células irradiadas con rayos X (Skreb y Habazin-Novak, 1977). Otros estudios han mostrado que el Pb(II) también inhibe la DNA alquiltransferasa, O^6 -alquilguanina (Bhattachatyya et al., 1988). Si estos eventos ocurren in vivo, el Pb(II) podría contribuir a la mutagenicidad y quizás carcinogenicidad de agentes alquilantes (Rossman, 1995).

Antecedentes de la exposición a cadmio (Cd).

Al hablar de fuentes de contaminación en el ambiente ocupacional es importante señalar que en el caso del cadmio estas también son responsables de la contaminación

ambiental general. Las actividades mineras, tanto para cadmio como para otros metales, son la fuente más evidente y las que pueden causar las concentraciones más altas del cadmio, ya que este metal se encuentra frecuentemente incorporado en diversos minerales. La exposición no solo es importante para los mineros, sino también para otros individuos no mineros que trabajen en las mismas instalaciones o cerca de ellas (Sánchez, 1994; <http://www.cadmium.org>).

El cadmio está presente en las actividades industriales ya sea como componente de la materia prima, como es el caso de las industrias de baterías y colorantes, o como parte de los sub-productos del proceso, como es el caso de la obtención del zinc (Nordberg, 1988). En los casos donde está como materia prima, el cadmio puede generar concentraciones ambientales muy elevadas. Las industrias que han representado mayor riesgo, por la presencia del cadmio, según su rama o tipo, son las siguientes: baterías, acumuladores, cables eléctricos, celdas fotoeléctricas, cloruro de polivinilo, colorantes de cadmio, equipos para llantas, equipos nucleares, fusibles, joyería, laminados a vapor, soldadura, tapones de extinguidores (Galvao, 1987; Cook y Morrow, 1995). Otras fuentes importantes de contaminación del medio ambiente son la incineración de materiales de residuos, la combustión de carburantes fósiles y el uso de fertilizantes fosfatados. El cadmio y los compuestos emitidos por las fuentes señalados se presentan y distribuyen de modo diferente según las características de donde se encuentren, ya sea aire, agua, alimentos o suelo (Nordberg, 1988, [http //www cadmium.org](http://www.cadmium.org)).

Toxicidad del cadmio.

La toxicidad del Cd(II) puede deberse a su capacidad para inhibir la actividad biológica de muchas proteínas tanto *in vivo* como *in vitro*, debido a su capacidad de unión con grupos sulfidrilos o por desplazamiento de otros metales, principalmente zinc, en metaloproteínas. El cadmio, también puede ejercer su efecto tóxico en funciones celulares afectando canales iónicos, receptores y receptores de canales iónicos que se encuentran en la superficie celular así como por inducir estrés oxidativo (Ariza et al., 1999).

Las manifestaciones clínicas de intoxicación con este metal pueden ser agudas o crónicas, y generalmente de carácter sistémico. Las intoxicaciones que se pueden presentar en la población general, salvo situaciones accidentales o contaminaciones masivas, por ejemplo de alimentos, suelen en general ser de carácter crónico. En la población ocupacionalmente expuesta, es frecuente encontrar tanto intoxicaciones agudas como crónicas muy características. Las manifestaciones clínicas de las intoxicaciones por cadmio es variable, según la vía de penetración, la cantidad absorbida, el tiempo de exposición y las características propias del individuo expuesto (Nordberg, 1988).

Manifestaciones por la exposición aguda a cadmio.

Mediante una intoxicación aguda el cadmio es un poderoso emético. Los efectos de la ingestión incluyen vómito persistente (que inicia de 15 a 30 minutos posteriores a la intoxicación), aumento de la salivación, dolor abdominal, sensación de encierro y diarrea (Carson, 1986).

La inhalación de altas cantidades de este metal pueden determinar la aparición de síntomas no muy bien definidos al principio, pero luego se presenta fiebre, alteraciones digestivas, dolor torácico, disnea y edema agudo de pulmón, mismo que puede determinar la muerte por insuficiencia respiratoria. También puede aparecer anemia, albuminuria, hepatitis y anuria, todas estas pueden determinar la muerte por necrosis hepática (Galvao, 1987)

Manifestaciones por la exposición crónica a cadmio.

La exposición crónica produce una gran variedad de efectos, los cuales producen daño en órganos como riñón, pulmón, corazón, hueso y gónadas. A nivel renal causa proteinuria, aminoaciduria, glucosuria, anormalidades en el manejo del ácido úrico, calcio y fósforo. También pueden llegar a producirse cálculos renales. No se ha reportado que el daño renal sea reversible si se suspende la exposición (Carson, 1986). La inhalación prolongada de cadmio por trabajadores expuestos puede determinar la aparición de un síndrome que incluye enfisema pulmonar y lesión de los túbulos renales con proteinuria. En estos casos se han observado también otros efectos como anemia,

alteraciones hepáticas y cambios en el metabolismo de minerales (Carson, 1986). También se han reportado efectos óseos, tales como dolor en las extremidades, dificultad para caminar, pseudofracturas y osteomalacia. Otros factores como la desnutrición, bajos niveles de estrógeno, etc. influyen en el grado de la sintomatología, tal es el caso de las mujeres en Japón, que padecen de dolor intenso en las piernas, que puede impedirles el caminar, esta enfermedad se describió como "itai-itai" u "ouch-ouch" (Carson, 1986).

Mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogenicidad del cadmio.

Una de las paradojas en la actividad genotóxica del cadmio es la falta de evidencias en cuanto a la inducción directa de daño en el DNA por parte del Cd(II) (Rossman, 1995; Valverde et al., 2000). Tratamientos con Cd(II) tanto en bacterias como en células de mamífero muestran una aparente inducción de rompimientos en el DNA, evaluados como fragmentos pequeños de DNA mediante elusión alcalina o gradiente de sacarosa (Mitra et al., 1975; Robinson et al., 1982). Tratamientos con CdS (10 µg/ml por 24 horas), el cual es un compuesto insoluble también produce una reducción en el tamaño de DNA; éste mismo efecto se observa en células V79 expuestas a concentraciones bajas de CdCl₂ (20 µM por 2 horas) empleando la elusión alcalina. Sin embargo, este efecto solo fue posible observarlo posterior a una digestión con proteinasa K, lo cual indicaría la formación de entrecruzamientos DNA-proteína (Ochi y Ohsawa, 1983). El Cd(II) puede unirse tanto a bases nitrogenadas como a los grupos fosfatos del DNA, lo cual trae como consecuencia la desestabilización de la hélice de DNA (Jacobson y Turner, 1980; Rossman, 1995). Así mismo, Müller y colaboradores (1991) reportaron que el complejo metalotioneína-cadmio tiene la capacidad de inducir rompimientos en la cadena de DNA. Sin embargo, Rossman (1995) considera que los rompimientos en el DNA de células producidos por el complejo metalotioneína-cadmio son improbables; puesto que se ha determinado que células pretratadas con Zn(II) inducen metalotioneína trayendo como consecuencia una disminución en la toxicidad y en los rompimientos de la cadena del DNA por efecto del Cd(II) (Coogan et al., 1992). Así mismo, observó que la transfección de un plásmido que promueve la sobreproducción de metalotioneína en células G12 revierte la mutagenicidad del Cd(II)

Existen otras evidencias de que el efecto genotóxico del Cd(II) puede estar mediado por el daño oxidativo al DNA, debido a trabajos en los cuales varios atrapadores o secuestradores de especies reactivas de oxígeno (ERO) inhibieron la inducción de aberraciones cromosómicas por efecto del CdCl₂. En éste tipo de trabajos se reportó que no hay protección por parte de la superóxido dismutasa (SOD) o dimetilsulfuran, el cual es un atrapador de oxígeno en singulete, pero la catalasa, D-manitol (atrapador de radicales hidroxilo), y el antioxidante butilato de hidroxitolueno (BHT) si tuvieron efecto protector a la inducción de aberraciones cromosómicas (Ochi et al., 1987). Estos resultados sugieren que el CdCl₂ tiene efecto genotóxico vía el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual puede formar radicales hidroxilo en presencia de iones fierro o cobre endógenos. Apoyando estos hallazgos se encuentran trabajos de Snyder (1988) y Liu y Jan (2000) en donde reporta que los rompimientos a la cadena del DNA inducidos por Cd(II) pueden ser bloqueados por catalasa y manitol pero no por SOD

Tratamientos de CdCl₂ también reducen los niveles intracelulares de glutatión (GSH) (Ochi et al., 1987). El GSH en presencia de otros antioxidantes tales como la vitamina A, C y E ayuda a reducir el daño celular ocasionado por los radicales hidroxilo. Así pues, se esperaría que en ausencia de tal protección antioxidante, se produjera un daño directo al DNA por los radicales libres de oxígeno endógenos, así como una peroxidación lipídica, cuyos productos también pueden causar daño y mutaciones al DNA (Mukai y Goldstein 1976; Stacey et al., 1980). Por otro lado, se han discutido los efectos de algunos compuestos de cadmio insoluble, como es el caso del CdS, éste ha ocasionado daño oxidativo *in vivo* de manera directa, vía inflamación. Cuando el CdS fagocitado por un leucocito polimorfonuclear (PMNs), causa un estallido oxidativo, liberando H₂O₂, el cual puede ocasionar daño al DNA de células vecinas (Zhong et al., 1990). El CdCl₂ ha mostrado ser un fuerte comutágeno en combinación con agentes metilantes como la metil nitrosourea (MNU) y la N-metil-N-nitro-N-nitoguanidina (MNNG) en *S. Typhimutium*, *E. Coli*, sin embargo dicho efecto no cursa con un sinergismo en la toxicidad (Mandel y Ryser, 1984; Takahasi et al., 1988). Estos resultados sugieren que el Cd(II) puede interferir con la reparación del DNA por efecto de un mutágeno o un agente metilante, pero no tóxico. Un candidato de éste tipo de agentes es la O⁶-metilguanina, la cual causa la transversión G:C a A:T durante la replicación del DNA

(Snow et al., 1984). Los residuos en el DNA de O⁶-metilguanina, así como de O⁴-metilimina y metilfosfotriester, son reparados por la O⁶-alquilguanina DNA aquiltransferasa (AGT); la cual es fuertemente inhibida por el Cd(II) tanto en bacterias como en mamíferos (Scicchitano y Pegg, 1987; Bhattacharyya et al., 1988). En *E. Coli*, el Cd(II) inhibe la inducción de la "respuesta adaptativa" a agentes etilantes y metilantes que involucran la inducción de al menos cuatro genes, uno de los cuales, codifica para la AGT.

La capacidad comutagénica del Cd(II) no ha sido observada con la radiación U.V. o con N⁴-aminocitidina (Rossman y Molina, 1986; Takahashi et al., 1991), dichos resultados son consistentes con la propuesta de que el Cd(II) es un inhibidor específico de la actividad de la AGT. El Cd(II) (4mM) bloquea la síntesis de DNA no programada (UDS) inducida por radiación U.V., sin embargo esto puede ser revertido con Zn(II) a alta molaridad. Esta misma concentración de Cd(II), causa la acumulación de rompimientos en la cadena de DNA, siendo revertido el efecto por un exceso de Zn(II) (Nocentini, 1987). En conjunto estos resultados sugieren que el Cd(II) y el Zn(II) compiten por un sitio de unión común a una enzima involucrada en la replicación y reparación del DNA. Al respecto hay reportes de que el Cd(II) inhibe la reparación de los rompimientos inducidos por rayos X a nivel de la DNA ligasa (Snyder et al., 1989; Rossman, 1995). Este metal también ha mostrado inhibir la DNA polimerasa β humana, y dicha inhibición no es bloqueada por el Zn(II) (Propenoe y Schmaeler, 1979; Rossman, 1995). Debido a que el Zn(II) esta presente en otras DNA polimerasas (Sarkar, 1999), así como en enzimas involucradas en el metabolismo del DNA, se esperaría que éstas fueran blanco adicional para el Cd(II) (Jacobson y Turner, 1980; Rossman, 1995). El Cd(II) también ha mostrado actuar como coclastógeno con mitomicina C y 4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO) en células VHO K1, pero no mostró la misma actividad con 4-NQO en una línea celular humana deficiente en reparación por escisión XP2055V (Yamada et al., 1993). Este resultado soporta la hipótesis de que algún paso de la vía de reparación por escisión es un blanco para el Cd(II)

Factores involucrados en la inducción de daño por exposición a metales.

En el pasado, la toxicología de los metales concernía únicamente a los efectos que producían signos y síntomas clínicos. Esta visión de la toxicología de los metales se ha expandido en años recientes, debido principalmente a dos avances. Por un lado, el incremento considerable que ha habido en el conocimiento de los efectos bioquímicos de los metales. Así como el desarrollo de los ahora conocidos biomarcadores de toxicidad, gracias a los cuales es posible identificar toxicidad a nivel de exposición sin llegar a manifestarse efectos clínicos. De tal manera que la nueva toxicología de los metales esta enfocada en eventos no clínicos que reflejen algún efecto adverso sobre la salud. Este nuevo enfoque ha generado retos para poder determinar el menor nivel adverso de exposición, por ello, se han incrementado la sensibilidad analítica y las metodologías que detecten pequeños cambios a nivel molecular (Goyer y Cherian, 1995).

En general, la toxicidad celular varía considerablemente entre compuestos de diferentes metales, pero también entre diferentes especies de un metal, debido a diferencias en su biodisponibilidad. La incorporación de iones metálicos depende en gran medida de factores como el estado oxidativo y su solubilidad; mientras algunas especies son capaces de interactuar con la célula rápidamente Cr(VI), otras lo hacen lentamente, requiriendo largos periodos de incubación (Ni(II), Co(II)) (Hartwig, 1995). Algunos iones metálicos tienen mayor afinidad por aminoácidos que por nucleótidos, lo cual se traduce en la inactivación o inhibición de proteínas involucradas en la replicación, transcripción y reparación del DNA. Cuando éstos aspectos se toman en cuenta y se emplean condiciones apropiadas de incubación, los iones metálicos inducen diversos tipos de daño en los diferentes constituyentes celulares, incluyendo al DNA

En cuanto a los mecanismos por los cuales los metales inducen genotoxicidad, los de mayor aceptación son: la generación de daño oxidativo al DNA y la interferencia en procesos como la replicación y reparación del DNA (Hartwig, 1995).

Interacción de metales con el DNA.

Para determinar si los iones metálicos tienen la capacidad de interactuar directamente con el DNA, es necesario que dichos compuestos lleguen al núcleo celular. Este suceso aparentemente tan sencillo es difícil per se, puesto que tal como se ha mencionado anteriormente, los metales tienen alta afinidad por numerosos componentes celulares. Mientras él o los proceso(s) mediante los cuales los metales alcanzan el núcleo son desconocidos, los iones metálicos que lleguen a acumularse en el núcleo pueden interactuar con el DNA, pero también pueden hacerlo con histonas y proteínas no histónicas. Algunos metales son inespecíficos, ya que se unen a grupos fosfato en la molécula de azúcar y a grupos químicos en las bases nucleares del DNA; mientras otros iones metálicos como el Hg(II), se unen preferentemente a bases nucleares específicas (Sletten y Nerdal, 1997). La unión de iones metálicos a DNA o complejos DNA-histonas puede alterar la estructura del DNA, lo cual impide la unión de proteínas requeridas para la replicación del DNA, transcripción y/o segregación cromosómica durante la mitosis. Alternativamente, la unión de iones metálicos al DNA puede inducir lesiones. Complejos de iones metálicos y residuos de bases en el DNA pueden reaccionar con H_2O_2 en la reacción de Fenton y producir radicales que modifiquen las bases, otros complejos de iones metálicos y residuos de azúcar en el DNA reaccionan con el H_2O_2 para producir radicales, los cuales causan rompimientos en la cadena del DNA (Gutteridge, 1984; Luo et al., 1994; Balasubramanian et al., 1998).

Metales y estrés oxidativo.

Debido a la química redox de los metales de transición y su habilidad de activar especies de oxígeno en el transcurrir de las reacciones redox, un mecanismo discutido frecuentemente en la genotoxicidad inducida por metales es la formación de daño oxidativo al DNA. En este contexto, compuestos de Cr(VI), Fe(II)/Fe(III), Ni(II) y Co(II) han mostrado inducir daño al DNA *in vitro*, en presencia de H_2O_2 . Sin embargo, el daño oxidativo al DNA puede ocurrir vía la inactivación de sistemas de defensa celular, tal como ha sido postulado para el Cd(II) (Klein et al., 1991, Sunderman, 1993, Kasprzak, 1995). La mayoría de las especies reactivas de oxígeno (ERO) como el radical

hidroxilo, tienen un tiempo de vida corto, puesto que en la célula existen sistemas de defensa que detoxifican los radicales de oxígeno libres (Sarkar, 1999).

A concentraciones altas, iones metálicos pueden depletar los antioxidantes celulares como el glutatión (GSH), e inhibir no específicamente las enzimas involucradas con la defensa antioxidante y/o reparación del daño oxidativo. Usualmente hay un alto nivel de citotoxicidad (muerte celular) asociado con la exposición a altas concentraciones de iones metálicos, y esto se debe a la capacidad de estos iones para afectar múltiples procesos celulares, incluyendo el control redox (Ariza et al., 1999). Si la exposición a bajas concentraciones de iones metálicos resulta en una baja o nula citotoxicidad (medida como muerte celular) es improbable que se induzca estrés oxidativo en estas células por depleción de GSH o por la inhibición de enzimas involucradas con la defensa antioxidante. En este caso, es más probable que los iones metálicos induzcan estrés oxidativo por la unión a macromoléculas que permitan la producción de HO• por la reacción de Fenton y/o por la estimulación de actividades enzimáticas que producen radicales, intermediarios reactivos de oxígeno (IROs) o intermediarios reactivos de oxinitrógeno (IRONs). Si se asume que el metal cataliza la producción de HO• por la reacción de Fenton, a través de un mecanismo sitio-específico entonces el HO• puede ser confinado a la producción de su sitio. Aún así, la mayoría de los daños son reparados bajo condiciones de bajo o moderado estrés oxidativo. La activación por iones metálicos de enzimas como la xantina oxidasa, puede resultar en un incremento en la producción de radicales y H₂O₂. El H₂O₂ aparece como una molécula importante en diferentes procesos biológicos. Puede actuar como mensajero molecular para activar genes de transcripción, activando directamente factores de transcripción y activando cascadas de señalización. El H₂O₂ también puede causar daño a macromoléculas celulares participando en la reacción de Fenton catalizada por metales. El origen de los iones metálicos para esta reacción pueden ser esenciales para los complejos de iones metálicos con macromoléculas, por ejemplo, cuando cobre, hierro u otro ion metálico esta presente en la célula como resultado de alguna exposición a contaminantes ambientales. Iones metálicos o de metaloides también pueden alterar la expresión génica activando directamente a factores de transcripción, o bien, por la unión a elementos de respuesta a metales (ERM), así como a elementos de "heat shock"

(EHS). Esto demuestra que los iones metálicos pueden alterar la expresión génica de manera indirecta, a través de la producción de H_2O_2 y en conjunto estas alteraciones pueden repercutir incrementando la proliferación celular. Los humanos reciben múltiples exposiciones a bajas concentraciones (no letales) de metales a lo largo de su vida. Dichas exposiciones resultan en la producción de radicales, IROs, IRONs lo cual contribuye a múltiples procesos patológicos (Ariza et al., 1999) (Figura 1).

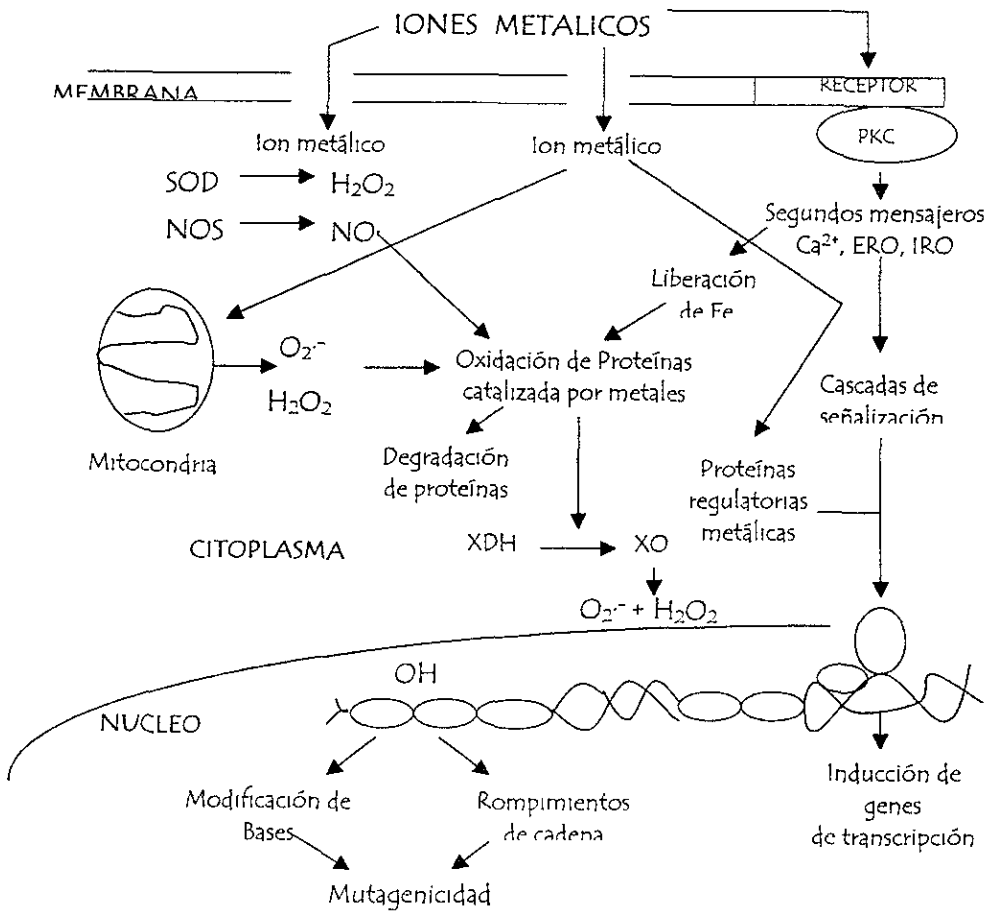


Figura 1. Producción de radicales libres por efecto de metales y sus consecuencias. Tomado de Ariza et al., 1999.

Metales y reparación del DNA.

Mientras hay muchos estudios que demuestran la genotoxicidad de muchos compuestos metálicos, no ha sido posible establecer una correlación entre la actividad genotóxica de los compuestos metálicos y su carcinogenicidad. Así mismo, Beyersman y Hechtenberg (1997) han argumentado que dicha actividad genotóxica solo ocurre a concentraciones altas (citotóxicas) de iones metálicos. Como se ha mencionado anteriormente, la exposición de células o tejidos a concentraciones altas de iones metálicos puede resultar en un alto porcentaje de muerte celular, pero rara vez, mueren todas las células. Si el organismo sobrevive a la exposición, las células sobrevivientes pueden contribuir a la aparición de alguna enfermedad o patología. Algunas células que sobreviven pueden alterar su genotipo, y pueden crecer llevando un fenotipo mutante, estas células son de gran importancia en la carcinogénesis (Loeb, 1997). Por otro lado, también se ha argumentado que dosis bajas (no letales) de compuestos metálicos pueden ser genotóxicos, pero considerando que esto es relevante solo cuando se inhibe el proceso de reparación del DNA (Beyersmann y Hechtenberg, 1997). Un argumento similar ha sido empleado por Rossman (1995), en el cual sugiere que bajas concentraciones (no letales) de compuestos metálicos pueden actuar como comutágenos, inhibiendo el proceso de la reparación del DNA. Se ha reportado que este mismo tipo de concentraciones inhiben o alteran algunos de los procesos de la reparación del DNA. Actualmente, puede ser prematuro concluir que el daño al DNA y la mutagénesis es debido solamente a la inhibición de la reparación del DNA (Miller y Costa, 1988; Salnikow et al., 1994; Kasprzak, 1995; Xu et al., 1996; Kasprzak et al., 1997; Ariza et al., 1999). Considerando que los procesos biológicos son procesos altamente integrados y que los iones metálicos tienen múltiples efectos en estos procesos, es altamente improbable que la actividad carcinogénica de los compuestos metálicos sea debido a solo un efecto biológico, por ejemplo, estimulando cascadas de señalización, inhibiendo la reparación del DNA. Es más probable, que la actividad carcinogénica de estos compuestos es el resultado de su capacidad de alterar múltiples procesos biológicos simultáneamente, lo cual trae como consecuencia una proliferación celular anormal e inestabilidad genómica (Ariza et al., 1999).

La inducción de una lesión premutagénica en el DNA por iones metálicos, puede interferir con procesos de la reparación del DNA, que impidan la reparación de estas lesiones. Los mamíferos tienen básicamente dos rutas de reparación del DNA, la reparación por escisión de nucleótidos (REN) y la *reparación por escisión de bases* (REB).

En la *reparación por escisión de nucleótidos* (REN), están involucradas al menos 30 proteínas y enzimas diferentes en mamíferos, incluyendo las que son defectuosas en pacientes que sufren Xeroderma Pigmentoso (XP), es decir, las pertenecientes a los grupos de complementación A hasta G. Este tipo de reparación puede dividirse en al menos tres pasos importantes, la incisión a ambos lados de la lesión, la polimerización reparadora que corresponde al desplazamiento del oligonucleótido dañado y finalmente la ligación del fragmento reparado. Con respecto a los compuestos metálicos estudiados, el paso de la incisión se afectó más por tratamientos a bajas concentraciones, mostrándose que el Co(II) adicionalmente inhibía el proceso de la polimerización reparadora, así mismo, se mostró que el As(III) y el Ni(II) a concentraciones altas inhiben el proceso de la ligación dentro del proceso de reparación del DNA (Hartwig et al., 1999). En la REB en contraste a la REN, se remueven diferentes tipos de daños gruesos en las bases del DNA. Esta reparación se inicia con la participación coordinada de muchas proteínas, algunas formas de bases dañadas son escindidas por una clase específica de enzimas de reparación llamadas glicosilasas. Estas catalizan la hidrólisis de la unión N-glicosídica uniendo la base dañada al esqueleto de deoxirribosa-fosfato, de tal manera que se libera la base alterada. Este proceso genera la pérdida de bases, denominada generación de sitios apurínicos y apirimidínicos (AP), los cuales son característicos de la REB. Posteriormente las AP endonucleasas producen una incisión por hidrólisis de enlaces fosfodiéster 5' o 3' en cada sitio AP, para después realizarse una escisión exonucleolítica del residuo terminal de deoxirribosa-fosfato y finalmente realizando la polimerización y ligación del fragmento reparado (Friedberg et al., 1995). Las DNA glicosilasas actúan específicamente en uno o pocos sustratos, en este tipo de reparación. La REB es la principal responsable de la remoción de diferentes tipos de daño endógeno del DNA, incluyendo la oxidación de bases y las modificaciones como

consecuencia del consumo de oxígeno. Estudios realizados por Hartwig (1997, 1999) muestran el efecto del Ni(II) y el Cd(II) en la reparación de bases oxidadas en el DNA inducidas por luz visible en células HeLa. Hay evidencias que sugieren que la base oxidada en el DNA, generada por dicho tratamiento de mayor prevalencia es la 8-hidroxiguanina, una modificación de base que es premutagénica, presumiblemente debida a una reacción oxígeno de singulete o una excitación intracelular de moléculas fotosensibilizadoras con el DNA (Schneider et al., 1990; Boiteux et al., 1992). Ambos metales inhiben la REB e inducen daño al DNA a concentraciones bajas, no citotóxicas. Un tercer proceso de reparación es el denominado reparación "mismatch", cuya función es la de corregir errores de replicación y bloquear ciertos eventos recombinantes, también contribuye a la estabilidad genómica y todos ellos son susceptibles de ser afectados por metales. En los últimos años ha habido progreso en dilucidar los componentes de estos procesos y en determinar que componentes interactúan en iniciar la reparación, reparar el daño y la relación entre reparación de DNA y transcripción (Wood y Shivij, 1997). Muchas de las proteínas involucradas en la reparación del DNA son metaloproteínas. El reemplazo de un ion metálico que es esencial para la actividad enzimática con un metal no esencial puede alterar o inhibir la actividad de estas enzimas. Es decir, este tipo de iones metálicos pueden disminuir o inhibir la eficiencia del proceso de reparación por la inducción de cambios conformacionales en el DNA o proteínas, que impiden el reconocimiento y/o escisión de la lesión en el DNA, lo cual repercute a incrementar la infidelidad durante la polimerización y/o por la inhibición de la polimerización y/o ligación (Ariza et al., 1999). Tradicionalmente, los efectos de los metales sobre la reparación han sido determinados indirectamente (Snyder, 1990; Cohen et al., 1990, Rossman, 1995). Este tipo de ensayo consiste en tratar a las células con un mutágeno conocido (luz U.V., radiación ionizante o agentes químicos), y después de un periodo de tiempo, las células son tratadas con un compuesto metálico. Mientras estos trabajos demuestran que los metales tienen la capacidad de inhibir la reparación del DNA, hasta ahora no se ha propuesto el mecanismo involucrado en esta inhibición. Por otro lado, hay que considerar que en este tipo de trabajos la persistencia del daño en el DNA puede no ser

debida a una inhibición de la reparación, sino a la formación de un tipo nuevo de lesiones (Williams et al., 1986).

Estudios recientes, empleando extractos celulares, han demostrado que el As(III), Cd(II), Co(II), Fe(II), Cu(II), Hg(II), Ni(II), Pb(II) y Zn(II) son capaces de inhibir la REN en diferentes pasos de la vía (Hartwig et al., 1996; Calsou et al., 1996; Kasten et al., 1997; Lynn et al., 1997; Dally y Hatwig, 1997; Hartman y Hartwig, 1998). Estos resultados apoyan el concepto de que los metales inhiben el proceso de la reparación del DNA. La reparación por escisión de nucleótidos es importante para remover las lesiones que implican una distorsión en la doble hélice. La inhibición de la REN por metales puede explicar porque estos agentes actúan como comutágenos, puesto que los metales potencian la mutagenicidad de agentes que causan este tipo de distorsiones. Sin embargo, si el daño al DNA inducido por metales se debe solamente a la unión de éstos con el DNA, entonces, la reparación por escisión de nucleótidos puede ser importante en la remoción de la unión. Otra posibilidad es que los metales estén causando daño al DNA indirectamente al inducir la formación de H_2O_2 , el cual reacciona con iones metálicos ocasionando la oxidación o deaminación de bases en el DNA. Este tipo de daño es reparado mediante la vía de REB, y el conocimiento de componentes metálicos en la vía de REB es limitado, de tal forma que el incremento de la formación de H_2O_2 por iones metálicos se puede suprimir el proceso de la reparación (Lynn et al., 1997). Si bien, las dUTPasas y 8-d-oxiGTPasas no son componentes de los sistemas de reparación, la inhibición de ambas enzimas por efecto de iones metálicos puede resultar en el incremento de la incorporación en el DNA de deoxiribonucleósidos trifosfatados (dNTPs) potencialmente mutagénicos, lo cual contribuye a la inestabilidad genómica, cuando se considera la propensión de errores en el proceso de reparación mediante mecanismos diferentes, lo cual puede contribuir a la actividad genotóxica de dichos compuestos.

Metales y respuesta inflamatoria.

Al inicio de la década de los 90's surgieron evidencias en cuanto a que los desordenes inflamatorios están estrechamente relacionados con un incremento en la producción de radicales libres y/o deficiencias de los sistemas de defensa antioxidante, y debido a la

actividad oxidante que muestran algunos metales, podría desencadenarse una respuesta inflamatoria, como un mecanismo alterno por parte de dichos compuestos (Sarkar, 1999).

El proceso inflamatorio comprende una serie de cambios celulares que finalmente conducen a la fagocitosis, a la muerte de microorganismos o a la digestión de detritos celulares. A este proceso le siguen la proliferación de células de tejido conectivo y la reparación o restauración de la matriz intracelular. Ambos eventos requieren de un complejo control de varios tipos celulares a nivel local. El proceso local de la inflamación es facilitado por cambios metabólicos sistémicos donde se metaboliza energía en forma de glucosa y ácidos grasos, impidiendo la producción de aminoácidos. En sí, todos los eventos involucrados en la inflamación son controlados por las citocinas que ejercen un estricto control a nivel local (Evans y Whicher, 1992). La constelación de respuestas sistémicas que acompañan al trauma y la inflamación, sin importar la causa, se conoce como respuesta de fase aguda (Dinarello, 1984) (Figura 2).

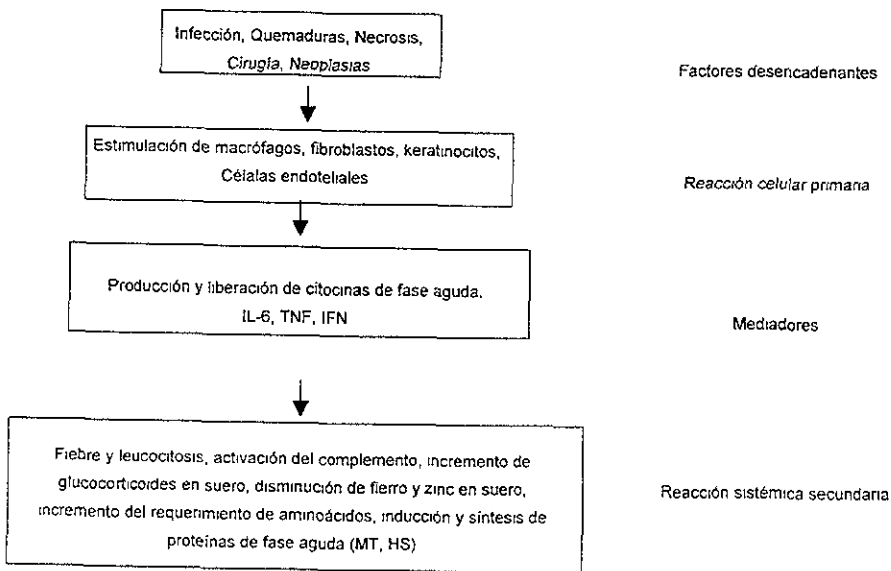


Figura 2 Respuesta sistémica y cascada de eventos presentes en la respuesta de fase aguda (Tomado de Evans y Whicher, 1992).

La inflamación es frecuentemente asociada con un decremento de los niveles de hierro y zinc, así como con un incremento de los niveles de cobre. Los mecanismos de éstos efectos son totalmente diferentes, como es sugerido por sus cinéticas (Myers et al., 1984). Los niveles plasmáticos de hierro, caen durante la primera hora del trauma, paralelamente una rápida caída de transferrina se presenta puesto que es ella a la cual permanece unido el hierro del plasma. Esta respuesta inicial que es padecida por muchas proteínas unidas a sustancias, probablemente es debida a una alteración en la permeabilidad vascular mediada por múltiples factores. Sin embargo, los niveles de hierro y la saturación de transferrina continúan cayendo, alcanzando una reducción del 80%, 12 horas después del trauma agudo. El hierro es rápidamente secuestrado en el tejido dañado, probablemente como resultado de la formación del complejo de lactoferrina, una proteína de unión a hierro liberada por los linfocitos polimorfonucleares (PMNL) (Van Snick et al., 1974). El complejo hierro-lactoferrina es secuestrado en los macrófagos como hemosiderina, el cual es un complejo con ferritina. Este hierro, al estar en un estado dinámico, podrá entrar subsecuentemente al reservorio de unión a transferrina y participar en la hematopoyesis. A este nivel, la exposición a compuestos de plomo puede generar alteraciones adicionales a las ya descritas dentro de la biosíntesis del hemo (Evans y Whicher, 1992).

Posterior al trauma agudo, en humanos se ha observado una caída de los niveles de zinc hasta en un 40% durante las primeras 8 horas. Esta caída inicialmente es paralela a la de albúmina, la cual es la principal proteína de unión a zinc en el plasma, la cual detiene su caída en aproximadamente 2 horas, mientras que el zinc continúa disminuyendo la cantidad de proteína transportada. Como en el caso del hierro, la primera fase es debida a la pérdida de albúmina de los compartimentos vasculares y extravasculares. La segunda fase de reducción de zinc que persiste por la duración de la inflamación puede inducirse *in vivo* por la administración de sobrenadantes de leucocitos. *In vitro*, rH-IL6 (receptor de interleucina 6, humano) pero no rH-IL1 (receptor de interleucina 1, humano) han mostrado la capacidad de incrementar los niveles de metalotioneina hepática (Schroeder y Cousins, 1990). Bajo condiciones normales, la expresión de metalotioneina es regulada transcripcionalmente por el zinc adquirido en la dieta. La inducción de síntesis de metalotioneina por glucocorticoides, catecolaminas,

glucagon e IL-6, resulta en una rápida transferencia de zinc plasmático al hígado. El papel de la respuesta es incierto, sin embargo, la citoprotección de las células hepáticas de los efectos tóxicos del tetracloruro de carbono es potenciado por la acumulación intracelular de zinc (Figura 2).

El incremento de cobre que ha sido observado durante la inflamación es una consecuencia de la inducción de citocinas que promueven la secreción de ceruloplasmina (proteína que contiene cobre) del hígado al plasma.

Los reactantes de fase aguda (RFA), metalotioneinas (MT) y proteínas "heat shock" (HS) son los productos de tres familias de genes que son inducidos por varios estímulos de estrés físico y químico (Nover y Scharf, 1984). Este tipo de genes responden a la inflamación causada por lipopolisacáridos bacterianos y mediadores de respuesta inflamatoria tales como glucocorticoides y citocinas. Las MTs y las HS son estimuladas por metales como el Cd, Pb, Hg y Zn (Nover y Scharf, 1984). La respuesta de genes de MT a estos metales es mediada por la interacción de factores transactivadores con secuencias de DNA cis-activadoras o elementos de respuesta a metales (ERM) en sus regiones promotoras (Imbert et al., 1989). Si bien, hay poca información de los efectos de los metales sobre la expresión de genes RFA en general o de miembros específicos de estas familias de genes, Harrison y Nicholls (1986) han reportado que el metilmercurio induce un incremento en suero de los niveles de α^1 -glucoproteína ácida (AGP). Argawal y Bhattacharya (1989) encontraron que los niveles en suero de la proteína reactiva C (PRC) incrementaron en ratas tratadas con Hg. Se ha reportado que el plomo induce un incremento de la síntesis hepática de un grupo de proteínas ácidas de suero que pertenecen a la familia de los RFA. Análisis de secuencias del gen AGP-1 revelan la presencia de cuatro secuencias consenso del ERM, tres de las cuales se localizan en el extremo 5' y una que está localizada en el intrón 5. Así mismo, estos ERM traslapan con el elemento receptor de glucocorticoides (ERG) en el promotor proximal del gen AGP-1. La presencia de ERMs en la región promotora y dentro del gen de ratón AGP-1 sugiere que este gen y posiblemente otros genes o sus locus AGP-2 y AGP-3 pueden ser inducibles por metales. Yiangou y colaboradores (1990) han reportado un incremento a nivel hepático de RFA, AGP y PRC por efecto de diferentes metales en ratones Balb/c. La mayor inducción fue mediada por Hg, siguiendo en orden

de respuesta descendiente el Cd>Pb>Cu>Ni>Mg. Por otro lado, ninguno de estos metales afectó los niveles de mRNA de albúmina de α^1 -antitripsina y α^1 -antiquimiotripsina. Otro tipo de trabajos muestran que la inhalación de aerosoles de cloruro de cadmio desencadenan una respuesta proinflamatoria mediada por citocinas como $TNF\alpha$ e $IL-1\alpha$, las cuales inducen a la MT (Oberdöster et al., 1994). La expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria pueden ser influenciados por el cadmio. El incremento de la transcripción de genes de citocinas como $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $MIP-1$, $MIP-2$ y $TNF\alpha$ se observó posterior a la administración oral de cloruro de cadmio (2mg/Kg). Por otro lado, concentraciones de $1\mu M$ del mismo compuesto, *in vitro*, inhiben la activación y producción de $IL-1\beta$ en monocitos tratados con lipopolisacáridos (Beyersmann y Hachtenberg, 1997; Koropatnick y Zalups, 1997). Trabajos recientes han mostrado que el Zn a concentraciones 1, 10 y $100\mu M$ inducen la producción de interferón y TNF en células endoteliales de cordón umbilical. Así mismo, se menciona que la concentración de iones activos de Zn en la estimulación de citocinas difiere significativamente entre células sanguíneas y endoteliales. En cuanto a la inducción de TNF, esta citosina se induce tanto por efecto del Zn como del Cd (Cakman et al., 1997; Wellinghausen et al., 1996). Si bien no se conoce el mecanismo por el cual suceden estos fenómenos, si se puede decir que la modulación por cadmio de la expresión de los genes de TNF e interferón puede ser causada por su interferencia con la señalización celular (Szuster-Ciesielska et al., 2000).

Planteamiento de la investigación.

Con base en la genotoxicidad y mutagenicidad de metales como el plomo y el cadmio mostrada en diferentes sistemas de prueba y al grado de interacción ambiental entre los organismos y estos agentes, se plantea explorar los efectos genotóxicos inducidos por la exposición vía inhalatoria (en concentraciones similares a la norma permisible para aire) a estos metales. Así como los mecanismos de acción directos e indirectos mediante los cuales estos agentes podrían producir rompimientos de cadena sencilla en el DNA.

II HIPÓTESIS

Si la exposición vía inhalatoria a plomo y cadmio induce daño genotóxico mediante la interacción directa entre estos agentes y el DNA, no se esperaría encontrar alteraciones en variables como la presencia de especies reactivas de oxígeno, reparación del DNA e inflamación.

Los argumentos que dan sustento al planteamiento de esta hipótesis radican en:

- a) Si bien, se ha determinado una potencialidad genotóxica a metales como el plomo y cadmio, no se sabe si dicho efecto es ocasionado por la acción directa del metal sobre el DNA (Hartmann y Speit, 1994), empleado en concentraciones similares a la norma permisible para el aire.
- b) Las especies reactivas de oxígeno tienen la capacidad de interaccionar con el DNA y causar un daño clastogénico, el cual se expresa a manera de rompimientos en la cadena de DNA (Reid, 1994).
- c) En 1994, Hartwig propone que la genotoxicidad de los metales es debida a una inhibición del proceso de la reparación del DNA.
- d) Metales como el cadmio generan alteraciones morfológicas pulmonares, las cuales se manifiestan como inflamación (Oberdóster, 1994), además, durante el establecimiento de dicho proceso se presenta un incremento en los niveles de IL-1 α y TNF α .

III OBJETIVOS

Objetivo General: Estudiar si el daño al DNA ocasionado por la inhalación de plomo y cadmio es debido a mecanismos de acción directos y conocer los factores involucrados en ello.

Objetivos Particulares:

- *Evaluar el daño al DNA ocasionado por la exposición vía inhalatoria a plomo y cadmio.*
- *Conocer si el efecto genotóxico es ocasionado por la interacción directa del metal sobre el DNA causando clastogenicidad.*
- *Cuantificar la presencia de especies reactivas de oxígeno, las cuales han mostrado tener la capacidad de inducir daño oxidativo en el DNA.*
- *Evaluar si el proceso de la reparación del DNA, es inhibido por la exposición a plomo y cadmio.*
- *Determinar si la exposición vía inhalatoria a plomo y cadmio ocasiona cambios en los niveles de expresión de citocinas de respuesta proinflamatoria, tales como IL-1 α y TNF α .*

IV RESULTADOS

A) Evaluación del daño al DNA ocasionado por la exposición vía inhalatoria a plomo y cadmio.

Daño al DNA inducido por la inhalación de acetato de plomo.

En principio, se realizó la evaluación de la genotoxicidad expresada a manera de rompimientos de cadena sencilla del DNA, inducida por la inhalación de acetato de plomo (0.0068 $\mu\text{g}/\text{cc}$) en diferentes órganos de ratón (células del epitelio nasal, pulmón, hígado, riñón, sangre periférica, médula ósea, cerebro, testículo). Para ello se aplicaron tanto un protocolo de exposición aguda, como subcrónicos en los cuales se hizo un seguimiento semanal de los efectos, durante un periodo de cuatro semanas de exposición. Como resultado de la exposición aguda, se determinó que el acetato de plomo indujo rompimientos de cadena sencilla del DNA estadísticamente significativos solo en órganos como el pulmón y el hígado, mientras que, los efectos de los tratamientos subcrónicos mostraron inducción de daño genotóxico en todos los órganos, excepto en testículo; sin embargo, el comportamiento del daño inducido sobre el DNA a través del tiempo mostró ser diferente en cada uno de los órganos estudiados. Por ello se busco la correlación entre el daño inducido al DNA y el contenido de plomo en los órganos de mayor importancia metabólica: el pulmón, el hígado y el riñón, encontrándose diferentes coeficientes de correlación para cada uno de ellos (pulmón $r = 0.5294$; hígado $r = 0.5660$; riñón $r = 0.5284$). Si bien, el efecto genotóxico de mayor importancia también fue el presentado por estos órganos no es clara su correlación con los niveles intratisulares del xenobiótico; estos resultados se muestran en detalle en el artículo que enseguida se anexa "Induction of genotoxicity by lead acetate in several organs of CD-1 mice", el cual esta aceptado para su publicación en la revista mutagénesis.

**GENOTOXICITY INDUCED IN CD-1 MICE BY INHALED LEAD.
DIFFERENTIAL ORGAN RESPONSE.**

**Mahara Valverde¹, Teresa I.Fortoul², Fernando Díaz-Barriga³, Jesús Mejía³
and Emilio Rojas del Castillo¹.**

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, ²Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F. and ³Facultad de Medicina, UASLP, México.

* Correspondence to: Dr. Emilio Rojas del Castillo. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, PO Box 70228, Ciudad Universitaria, 04510, México; D.F. Tel. (525) 5 622-3366; Fax: (525) 5 622-3365; E-mail: emilior@servidor.unam.mx.

Abstract

Lead is perhaps the longest used and best recognized toxic environmental chemical, and still now it continues to be used recklessly. Lead (Pb) has been tested and it was found that it is capable of eliciting a positive response in an extraordinarily wide range of biological and biochemical tests; among them test for enzyme inhibition, fidelity of DNA synthesis, mutation, chromosomal aberrations, cancer and birth defects. Since inhalation is one of the most important routes of environmental Pb exposure, in the present study a lead inhalation model in mice was implemented in order to detect the induction of genotoxic damage as single-strand breaks and alkali labile sites in several mice organs (nasal epithelial cells, lung, whole blood, liver, kidney, bone marrow, brain and test assessed by single cell gel electrophoresis (SCGE) or Comet assay. We found differences among the organs studied after a single and subsequent inhalations: In the organs analyzed we observed a positive induction of DNA damage after a single inhalation only in the liver and the lung. In subsequent inhalations the response was positive in all organs except the testicle, however the behavior of DNA damage induction through time was different for each organ. A correlation between length of exposure, DNA damage and metal tissue concentration was observed for lung, liver and kidney. Differences in DNA damage occurred in organs when lead acetate was administered acutely or sub-chronically. These results showed that lead acetate inhalation induces systemic DNA damage but some organs are special targets of this metal such as the lung and the liver, depending in part on the exposures length, suggesting alternative organ processes to handle lead intoxication.

Introduction

Lead (Pb) is an abundant ubiquitous, dangerous and important chemical (Mahaffey, 1990), it was used in ancient times and some of its toxic effects have been recognized for several centuries (Landrigan, 1990). Even though many of the toxic effects of lead were known at that time, lead was used as a gasoline additive in the 1920s (Rosner and Markowitz, 1985). Serious lead atmospheric pollution during the last 30 years, was the result, and now even at very low lead exposure levels damage has been identified. Lead is among the top 10 US EPA priority pollutants (EPA, 1986 a,b).

Lead (Pb) occurs in variety of organic and inorganic compounds with a multitude of additional uses in plasters and ointments, in the manufacture of colorless glass, protective paint for iron and steel, coloring rubber, matches, pigments in printing inks and paints, explosives, as a mordant in dyeing, textile printing, process engraving, oxidizer, photographic sensitizer, chemical reagents, rodenticide, for precious metals recovery, from cyanide solutions, as a chemical intermediate, in storage batteries (Wade et al., 1993). Specifically lead acetate is used in dyeing and printing cotton, in varnishes, chrome pigments, manufacture of pesticides, antifouling paints, analytical reagents, hair dyes, and as an astringent and water repellent (Johnson, 1998).

Organic lead compounds include tetramethyl and tetraethyl lead which were used heavily as a gasoline additive, but this use has been drastically reduced in the US beginning in the late 1970s (Wade et al., 1993). In Mexico tetraethyl and tetramethyl lead were added to gasoline until five years ago. Although population exposure to lead by this way has declined; chronic toxicity remains a major public health problems in Mexico (Calderón-Salinas et al., 1996a; 1996b) and world wide affecting millions of children and adults (Todd et al., 1996; Bogden et al., 1997).

There are several articles concerning the genotoxic effect of this metal. Lead is considered as a weak mutagen, some studies shows that this compound is capable of inducing gene and chromosomal mutations, but not all studies have been positive (see revisions of Gebhart, 1984; Hansen and Stern, 1984; Kasprzak, 1985; Johnson, 1998). A number of animal studies have demonstrated that the exposure to lead salts is capable of inducing cancer (Kobayashi and Okamoto, 1974; Azar et al., 1973; Poirier et al., 1984; Koller et al., 1986; Mikalsen, 1990; Walkes et al., 1995). In this way lead acetate and lead phosphate are listed as reasonably anticipated human carcinogens on the basis of rodent tests in the 7th annual report on carcinogens (IARC, 1987) However it is clear that the carcinogenic potential of Pb compounds never has been studied by inhalation exposure. Inhalation route has been poorly

evaluated, for lead exposure and for many other atmospheric pollutants, inhalation is an important route because it is the main way they enter to several organisms.

Since inhalation is one of the main routes for environmental Pb exposure, the aim of this work, is to evaluate the genotoxic effect using the alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) assay in several CD-1 mouse structures (nasal epithelial cells, lung, whole blood, liver, kidney, bone marrow, brain and testis) after inhalation of 0.0068 µg/cc lead acetate (Acet-Pb). The SCGE assay is a sensitive procedure to quantify DNA damage [primarily single-strand breaks (SSB) and alkali-labile sites] in mammalian cells *in vitro* and *in vivo* (Singh et al., 1988; Sasaki et al., 1998). One of the advantages of the simultaneous assessment of DNA damage in many organs from the same animal is, as reported here, the comparison of their responses under identical conditions at the same time and in the same physiological status (Valverde et al., 2000).

Materials and methods

Chemical reagents

Normal agarose, low melting point agarose (LMP), ethidium bromide, Tris, Na₂EDTA, dimethyl sulfoxide (DMSO), Triton X-100 and RPMI-1640 medium were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo), NaOH, lead acetate, absolute ethanol and NaCl from Baker.

Animals.

CD-1 male mice (from the Medical School Vivarium, UNAM, Mexico), 45 days old and weighing 30-35g, were housed in hanging plastic cages under controlled lighting conditions (12 h light/12 h dark regime) relative humidity (50 ± 5%) and temperature (17 ± 2°C), and fed with Purina rat Chow and water *ad libitum*.

Groups.

Twenty four males were allotted randomly in four exposition groups of six animals each (four exposed and two controls). Group 1: single inhalation (acute treatment). Group 2: two weeks of exposure, three inhalations. Group 3. Three weeks of exposure, five inhalations. Group 4: four weeks of treatment, seven inhalations.

Exposures.

Inhalations were performed in an acrylic box (50x30x20.98 cm), connected to an ultra-nebulizer (Ultra-Neb 99 DeVilbis) with flux of 10 l/minute, which produce particles lesser than 1 µm. The exposure protocol and lead acetate were according to Fortoul et al., (1999). Briefly, sixteen animals, four in each group, were placed in an acrylic box and the lead acetate (0.0068 µg/cc) inhalations were performed for 60 minutes, twice a week (Monday and Wednesday) The control animals (eight) inhaled deionized water during the same period of time. After each inhalation the animals were returned to their respective cages.

Sampling.

Groups of six animals (four exposed and two controls) were killed by cervical dislocation every week, 24 h after last inhalation. Immediately, whole blood by intra-cardiac puncture was obtained with a preheparinized syringe, and the brain, lung, nasal septum, liver, kidney, femur and testicle were removed. The organs were placed in cold saline solution (0.9% NaCl), until cell suspensions were prepared.

Cell suspensions.

All organs, other than the nasal septum and femur, were washed twice with cold saline solution and placed in cold RPMI-1640 medium and minced with help of cold scissors into 1 mm³ pieces. Then the cell suspensions were kept at 4°C until sediment was observed. The nasal septum was placed in 1 ml of cold saline solution, soaked in the solution with tweezers and then discarded. For bone marrow cells, 1 ml of cold saline solution was used to gently wash the femur medullar cavity to detach the cells and resuspend them. The viability of the cell suspension was determined using the trypan blue exclusion technique.

Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) assay.

An appropriate number of cells was obtained in 30 µl of cell suspension and mixed with 75 µl of 0.5% LMPA. Cells and LMPA at 0.36% final concentration were loaded onto microscope slide prelayered with 200 µl of 0.5% normal-melting point agarose. The SCGE assay was performed as described by Tice et al., (1992). Briefly, after lysis at 4°C for at least one hour [2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH10 (10% DMSO, 1% Triton X-100 fresh)], slides were placed in a horizontal electrophoresis chamber with running buffer solution (300mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH>13). The slides remained 10 minutes in the electrophoresis buffer to allow the DNA to unwind. Electrophoresis was performed for 10 minutes at 300 mA and 25 V, approximately 0.8 V/cm, and all technical steps were conducted using very dim indirect light. After electrophoresis, the slides were gently removed and rinsed with neutralization buffer (0.4 M Tris pH 7.5) at room temperature (15 minutes). The slides were dehydrated with absolute ethanol (15 minutes), after which they were air-dried. Ethidium bromide (75 µl of a 20 µg/ml solution) was added to each slide and a coverslip was placed on the gel. Individual cells were visualized at 20X magnification on a Olympus BX-60 microscope with fluorescence attachments (excitation filter of 515-560 nm and a barrier filter of 590 nm), and the extent of migration (tail length value) was measured with a scaled eyepiece. For identifying tail image, the head of the comet was defined as the most brilliant circular region in the image. To evaluate DNA migration 100 cells/tissue/animal were scored for each condition

Measurement of Lead.

As an exposure marker, lead concentration was measured in three different organs (lung, liver and kidney) by atomic absorption spectrophotometry after each treatment. Lead analyses were performed using a Perkin-Elmer 2380 atomic absorption spectrophotometer. Tissue samples of lung, kidney and liver were placed in acid-washed glass test tubes and solubilized with a mixture of nitric and perchloric acids for at least 5 h in a hot plate. Lead was quantified by the graphite furnace method. As an internal quality control, we analyzed blind random reference samples (SRM 1577b bovine liver) obtained from the National Institute of Standards and Technology. For lead, recoveries were 92%.

Statistical Analysis.

All the statistical analysis was performed with GraphPAD InStat software v.1.14. The Mann Whitney U test, which considered medians for analysis was used to determine statistical differences between groups of animals for each organ. The unit of the exposure and analysis used for statistical purposes was the animal not the cells. Significance was considered at $p < 0.05$ (Kirk, 1999).

RESULTS

The viability using the classical trypan blue exclusion stain of the cell suspensions was greater than 80 % in all organs immediately after sacrifice. DNA damage as single strand breaks (SSB) and alkali labile sites by lead acetate inhalation was analyzed in several mice organs with respect to times of exposure.

Organs displayed different sensitivities after a single exposure. The distribution of damage from high to low susceptibility was: lung > bone marrow > liver > brain > kidney > testicle > nasal cells > leukocytes (Figure 1); but only the lung and the liver had differences statistically significant with respect to its corresponding controls, probably due to the different cell populations within integrate built each organ.

An analysis of genotoxicity throughout the time of exposure showed a weak effect in the majority of the organs studied.

Testicle

This organ did not show statistical significance on its induction of damage through time exposure (Figure 2A).

Lung

This organ showed an increase in DNA migration after the first exposure and the damage remained in the same magnitude through all the time exposure. However statistical differences were observed only at the first and third week of exposure,

due to showed high variability during the second and fourth week of treatment (Figure 2B).

Kidney and Liver

These organs showed a slight increase in DNA migration after the first exposure; in the kidney a statistically significant difference in DNA damage was observed in week two and remained in the same value until the end of the treatment, while in liver the difference for DNA damage was observed through all the exposure time (Figure 3A and 3B, respectively).

Brain and bone marrow

After the first two weeks of treatment, these organs showed the highest damage induced, which decreased drastically on the third week of treatment and returned again to the highest induction of DNA migration seen in the last week (Figure 4A and 4B). Both organs showed statistical differences in second and fourth weeks of exposure.

Nasal epithelial cells and leukocytes

Although nasal epithelial cells are the first cells to become in contact with lead acetate, and through whole blood including leukocyte, macrophages and plasmatic proteins, when the compound is distributed, nasal cells and leukocytes did not show an induction of damage after the first inhalation, however during the second week of treatment the highest DNA migration values were observed, but they decreased slowly during the following weeks of exposure (Figure 5A and 5B).

Lead concentration in tissues

After each inhalation the metal concentration was determined in lung, liver and kidney throughout the exposure time, employing atomic absorption spectrophotometry. Figure 6 shows the correlation between lead concentration and the time of exposure in three different organs. In all organs a good correlation between time and metal concentration was found; in liver $r = 0.95$ and for kidney $r = 0.98$ in these cases we apply a linear correlations where the p value was < 0.05 . Meanwhile in lung we observed a perfect correlation applying a polynomial in fourth degree regression ($r=1$), also the p value was < 0.05

The correlation between DNA damage, measured as tail length, induced by lead inhalation and the accumulation of metal in lung, liver and kidney is shown in Figure 7, when applying the equation: $y = mx + b$, where m is the slope of the curve (biological effect), x is the lead concentration and b is the basal value of DNA migration (μm). It is possible to calculate that $1.0 \mu\text{g}$ of Pb induced an increase in DNA migration in $5.21\mu\text{m}$. The proposed formula for lung is:

$$y = 5.21x + 32.99$$

In the case of liver, with $10 \mu\text{g}$ of Pb the migration increased by $13.23\mu\text{m}$. The

proposed formula is:

$$y = 13.23x + 31.64$$

And for the kidney, with 1.0 μg of Pb the migration increased by 2.23 μm . The proposed formula is:

$$y = 2.23x + 32.29$$

These data give the relationship between time of exposure and biological effect evaluated as SSB and alkali-labile sites under our experimental conditions.

Discussion

The uptake and toxic effects of lead in mammals have been extensively investigated by the use of chemical forms easily accumulated by the organisms (Regoli and Orlando, 1994). However, the bioavailability of lead due to an environmental exposure depends on several factors. Factors influencing susceptibility may act at the site of exposure (usually by increasing or decreasing uptake), may effect the toxicodynamics of a metal (usually by complexing or covalent binding), may influence the transport to a target organ or (theoretically at least) may influence some immunologic, biochemical, or cytologic functional response at the target organ (Gochfeld, 1997). Susceptibility to any agent results from the interactions between genetic enzyme polymorphisms and the environment; some toxicologic studies designs in animals can address susceptibility since in some degree different strains, species and genders can be incorporated into the bioassays. Information about inhalation exposure is poorly studied in this sense. For this reason we explored the possible role of lead-acetate inhalation in the distribution and induction of DNA damage measured as single strand breaks considering these factors and other as the detoxification mechanisms.

Different DNA migration measured as tail length in target organs were observed; for a single inhalation lung was the most susceptible organ (Figure 1), while after four weeks of inhalation exposure the brain showed the highest DNA damage. Several modulating effects were present when genotoxicity induced by the treatment in each organ was analyzed and these modulators could be influencing the variability observed in each organ.

Nasal epithelial cells are the first epithelial tissue in contact with the metal, however the genotoxic effect was not statistically significant until the third week of treatment (Figure 5a). This could be as a consequence of the pattern of deposition of inhaled lead in the respiratory tract, which is affected by the particle size, (in this study the particles generated were smaller than 1 μm), which modifies its deposition pattern which is about 20 percent (Chamberline, 1985). The second organ in contact is the lung, and the size of the metal particles had the capacity to reach the alveoli (Skerfving, 1988; Wanner, 1993), however the

induction of DNA damage in this organ showed alternately a bimodal damage pattern (Figure 2b). This could be due to lead deposition in the alveoli, place at which the metal easily reaches the blood stream. Probably after the induction of DNA damage (first and third week), the cells triggered natural defense process, and as induces metallothioneins synthesis (Klassen and Liu, 1998), mechanisms by which cells and tissues are protected against further damage and by which restorative processes are initiated (Kushner, 1982). In addition we did not observe an extensive damage in lung probably because the rate of absorption of lead from the particles deposited in the lung depends on the solubility of the chemical species of lead, and our lead compound is highly soluble (Brune et al., 1980).

After absorption via the pulmonary or gastrointestinal routes, lead is absorbed into the blood plasma and the lymph. More slowly, but still within minutes, lead is transferred from plasma into blood cells. Once in the blood, 99 percent of the lead content is in the red cells, and only about 1 percent in the plasma proteins (Skerfving, 1988), this is the principal reason why lead acetate inhalation could be not inducing a significant DNA damage evaluated by the comet assay, because this technique only detects damage in nucleated cells (leukocytes). In the red blood cells, the lead is bound to hemoglobin, and other components where the δ -aminolevulinatase (ALAD), the second enzyme in the biosynthetic pathway for hemo group is inhibited as a result of lead replacing zinc (Jhonson, 1998), probably when lead exerts this effect it could be generating oxidative stress and inducing DNA damage by an indirect path, this process could be explained by behavior observed in the second week of exposure (Figure 5b). From the plasma, the absorbed lead is distributed to different organs. The liver and the kidney attain the highest concentration (Skerfving et al., 1988). Nevertheless it is important to note that, unlike Onalaja and Claudio (2000) who's employed an animal models of variants in the ALAD gene and where determined that ALAD plays an important role in the bioaccumulation of lead in tissues (blood, liver, kidney and brain) and therefore may play a pivotal role in lead's toxicokinetics, our study was in a strain of mice which did not had this feature, and probably is the reason by we do not observe a great lead accumulation and DNA damage. Liver was the organ where we found statistical differences from the first to forth week of treatment maybe as a consequence of its function and its blood supply (Figure 3b). However, through the exposure time the magnitude of DNA damage was not the highest, probably as a consequence of the lead induce metallothionein gene expression in the liver (Yiangou et al., 1991; Waalkes and Klaassen, 1985; Maitani et al, 1986, Jhonson, 1998), as soon as the synthesis of a group of acid serum proteins increase which may belong to the acute-phase reactants family (Yiangou et al.,

1991), as a whole, these factors could be modulating lead genotoxicity.

Kidney is a target organ for lead exposure (Pereza et al, 1998), however unlike the studies of Pereza and collaborators, in our work, employing an inhalation exposure, we observed a high lead accumulation though exposure time but we did not find considerable induction of DNA damage, on this respect in according with Gochfeld (1997) we suggest that endogenous antioxidant levels may influence susceptibility to some of the toxic effects of lead and therefore we did not detect high induction of DNA damage. In addition, there are indications that metallothioneins and heat-shock proteins are stimulated by lead (Yiangou et al., 1991), these proteins have been considered as antioxidants and probably are involved in the detoxification or modulating damage processes.

One of the organs where we found more DNA damage was bone marrow, however statistically significant differences only were observed on the second week of exposure (Figure 4b). Some authors reported that lead causes many adverse health effects, including toxicity in the hematopoietic system (Moore and Goldberg, 1985; Pereza et al., 1998). Also it has been reported that this metal interferes with mitochondrial energy metabolisms, which is necessary to reduce ferric to ferrous iron before insertion of this metal into the porphyrin ring; when iron deficiency is present, ferrochelatase is more sensitive to these effects of lead and results in depression of hematopoiesis. Therefore, iron supplementation may prevent this toxic effect of lead on hematopoiesis. Considering these findings our results did not represent the expected effect probably because the distribution of lead changes by the inhalation exposure route.

The brain is the organ more studied in lead toxicity (Johnson, 1998, Fortoul et al., 1999) because lead, to some extent, pass the blood-brain barrier (Skerfving et al., 1988). Judging from animal experiments, the degree of passage of lead into the nervous system is higher in young organisms than in adults. In our study it was the organ with more DNA damage after four weeks of exposure (Figure 4a), this result was expected due to neurotoxicity of lead. Lead is similar enough calcium mimic in some circumstances. *In vitro* studies have revealed the capacity of lead to compete with calcium for its entry into the synaptosomes, and picomolar concentrations of lead can activate protein kinase C (Cooper et al., 1984; Markovac and Goldstein, 1988; Jadhav et al., 2000) Lead also has inhibited and enhanced effects on various receptor-activated and voltage activated ion channels in the cell. These properties could be related to the neurological and behavioral effects reported (Johnson, 1998; Jadhav et al., 2000).

Unlike the previously described organs, in testicle, we did not observe induction of DNA damage thorough the treatment (Figure 1a) Lead has been pointed as a

reprotoxic substance (decreased fertility, increased perinatal death), in experimental oral exposure of animals to high levels of lead (WHO, 1980). Sperm abnormalities have been noted in lead workers (Lancranjan et al., 1975). The changes observed by the comet assay are not related with the alterations mentioned before, since comet only evaluate the induction of DNA single strand breaks and not the function of the organ.

A good correlation between time of exposure and metal concentrations was found in the organs where lead was measured, except for the lung that showed a polynomial non linear regression. In this organ, we observed a great accumulation of Pb in the first inhalation and this concentration remain elevated after four weeks, this could be due to the turn on of the detoxification response (Klaassen and Liu, 1998). Meanwhile for liver the r value was 0.95 and for kidney $r = 0.98$ with a linear response, in all cases the correlation was significant ($p < 0.05$) (Figure 6). The results observed in liver and kidney suggest that the time of exposure is an important factor in the bioaccumulation of lead as it was reported by others. Each organ displayed different lead bioaccumulation, and the distribution from high to low was: kidney > lung > liver. These results are in agreement with Onalaja and Claudio (2000), despite of they employed strains of mice differing in their expression of the ALAD gene, the relationship between kidney and liver was the same. On the other hand, the lead levels observed in the organs studied were lowest in our study than in Onalaja and Claudio's; probably due to ALAD genotype. Compared with our previous cadmium study (Valverde et al., 2000) we found a weak correlation between DNA damage, measured as tail length, induced by lead acetate inhalation (0.0068 $\mu\text{g}/\text{cc}$) and the accumulation of metal in lung, liver and kidney (Figure 7). The r value for lung was 0.49, for liver $r = 0.48$ meanwhile kidney had $r = 0.22$. These suggests that the induction of DNA damage is independent of bioaccumulation of lead and probably is the reflection of the relationship between lead and additional factors such as natural defense processes; mainly the induction of acute-phase reactants, metallothioneins, heat-shock proteins, calcium-dependent signaling and levels of antioxidants, such as glutathione (Viangou, et al., 1991, Jadghav et al., 2000).

As a whole, DNA damage in several CD-1 mice organs was observed, however the magnitude of damage was smaller than the observed by cadmium inhalation, results which support the claim of those who classified lead as a weak genotoxic agent. Nevertheless the concentrations used in this work, were similar to those mentioned in the air quality standard level for this metal (WHO, 1980), and were lower than the ones employed by other authors (Gebhat and Rossman, 1991; Johnson 1998), indicating that even at low levels of exposure by inhalation, this metal could exert

DNA damage and should be considered as a risk for living organisms. It is important to explore if the inhibition of DNA repair processes described for this metal (Hartwig, 1994) could play any role in the accumulation and stability of DNA damage allowing the cell to initiate the carcinogenic process related with this metal.

Acknowledgements

Our tanks to M.C. López, I. Sánchez and I. López for their technical support. This study was partially supported by CONACyT project 3180P-M. M.V. was the recipient of a fellowship from DGEP and CONACyT.

References

- Azar, A., Trochimowicz, H.J., Maxfield, M.E. (1973) Review of lead studies in animal carried out at Haskell Laboratory-Two year feeding study and response to hemorrhage study. In Barth, D., Berlin, A., Engle, R., Recht, P., Smeets, J. (eds), Environmental Health Aspects of lead. Proceedings International Symposium, October 1972, Amsterdam, The Netherlands.
- Bogden, J.D., Oleske, J.M., Louria, D.B. (1997) Lead Poisoning-One Approach to a Problem that Won't Go Away. *Environ. Health Perspect.*, **105**, 1284-1287.
- Brune, D., Nordberg, G.F. and Webster, P.O. (1980) Distribution off 23 elements in the kidney, liver and lung of workers from a smelter and refinery in North Sweden exposed to a number of elements and of a control group. *Sci. Tot. Environ.*, **16**, 13-35.
- Calderón-Salinas, J.V (1996b) Lead: intestinal absorption and bone mobilization during lactation *Hum. Exp. Toxicol.*, **15**, 872-877.
- Calderón-Salinas, J.V., Valdéz-Anaya, B., Zúñiga-Charles, Ma., Albores-Medina, A. (1996a) Lead exposure in a population of Mexican children. *Hum. Exp. Toxicol.*, **15**, 305-311.
- Cooper, G.P., Suszkin, J.B. and Manalis, R.S. (1984) Heavy metals: Effects on synaptic transmission. *Neurotoxicology*, **5**, 246-277.
- Chamberlain, A.C. (1985) Prediction of response of blood lead to airborne and dietary lead from volunteer experiments with lead isotopes. *Proc. Roy. Soc. London*, **B 224**, 149-182
- EPA (1986a) Air Quality Criteria Document for lead. Volumes III, IV. Prepared by the Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, research Triangle Park, N.C., for the Office of Air Quality Planning and Standards. EPA-600/8-83/028dF.

- EPA (1986b) Quality criteria for water. US Environmental Protection Agency, Office of Water Regulation and Standards. Publication 440/5-86-001.
- Fortoul, T.I., Salgado, R.C., Moncada S.G., Sánchez, I.G., López, I.E., Espejel, G., Calderon, N.L., Saldívar, L. (1999) Ultra structural findings in the nonciliated bronchiolar cells (NCBC) after sub acute inhalation of lead acetate. *Acta Vet. Brno.*, **68**, 51-55.
- Gebhart, E. (1984) Chromosome damage in individuals exposed to heavy metals. *Toxicol. Environ. Chem.*, **8**, 253-265.
- Gebhart, E. and Rossman, T. (1991) *Mutagenicity, Carcinogenicity, Teratogenicity*. VCH Verlagsgesellschaft Aft mbt, Weinheim, Germany, pp. 17-640.
- Gochfeld, M. (1997) Factors influencing susceptibility to metals. *Environ. Health Perspect.*, **105** (suppl. 4), 817-22.
- Hansen, K. and Stern, R.M. (1984) A survey of metal-induced mutagenicity in vitro and in vivo. *J. Am. College Toxicol.*, **3**, 381-
- Hartwig, A. (1994) Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ. Health Perspect.*, **102**(suppl.3), 45-90.
- IARC (1987) IARC Monographs on the Lead [7439-92-1] and Lead Compounds, Inorganic. Vol 23 (Suppl. 7). IARC, Lyon.
- Jadhav, A.L., Ramesh, G.T. and Gunasekar, P.G. (2000) Contribution of protein kinase C and glutamate in Pb²⁺-induced cytotoxicity. *Toxicol. Lett.*, **115**, 89-98.
- Johanson, F.M. (1998) The genetic effect of environmental lead. *Mutat. Res.*, **410**, 123-140.
- Kabayashi, N. and Okamoto, T. (1974) Effects of lead oxide on the induction of lung tumors in Syrian hamster. *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**, 1605-1610.
- Kanekal, S., Plopper, G.C.H., Morind, D. and Buckpitt, A. (1990) Metabolisms and citotoxicity of naphthalene oxide in the isolated perfused mouse lung. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*, **256**, 391-401.
- Kasprzak, K.S., Hoover, K.L., Poirier, L.A. (1985) Effects of dietary calcium acetate on lead subacetate carcinogenicity in kidneys of male Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis*, **6**, 279-282.
- Kirk R.E. (1999) *Statistics. An Introduction*, 4th edn. Harcourt Brace College Publishers, Orlando, FL.
- Klaassen, C.D. and Liu, J. (1998) Induction of metallothionein as an adaptative mechanism affecting the magnitude and progression of toxicological injury. *Environ. Health Perspect.*, **106**, 297-300.
- Koller, L.D., Kerkvliet, N.I., Exon, J.H. (1986) Neoplasia induced in male rats fed

- lead acetate, ethyl urea and sodium nitrate. *Toxicol. Pathol.*, **13**, 50-57.
- Lancranjaan, I., Popescu, H.I., Gavanescu, O., Klepsch, I. and Serbanescu, M. (1975) Reproductive ability of workmen occupational exposed to lead. *Arch. Environ. Health.*, **30**, 396-401.
- Landrigan, P.J. (1990) Current issues in the epidemiology and toxicology of occupational exposure to lead. *Environ. Health Perspect.*, **89**, 61-66.
- Mahaffey, K.R. (1990) Introduction: Advances in lead research: Implications for environmental health. *Environ. Health Perspect.*, **89**, 3
- Maitani, T., Watahiki, A. and Susuki, K. (1986) Induction of metallothionein after lead administration by three injection routes in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **83**, 211-217.
- Markovac, J. and Goldstein, G.W. (1988) Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature*, **334**, 71-73.
- Mikalsen, S.-O. (1990) Effects of heavy metal ions on intercellular communication in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, **11**, 1621-1626.
- Moore, M.R. and Golberg, A. (1985) Health implications of the hematopoietic effects of lead. In *Dietary and Environmental Lead: Human Health Effects*. Mahaffey, K.R. (ed), Amsterdam: Elsevier Science, pp. 260-314.
- Onalaja, A.O. and Claudio, L. (2000) Genetic Susceptibility to Lead Poisoning. *Environ. Health Perspect.*, **18** (suppl. 1), 23-28.
- Pereza, M.A., Ayala-Fierro, F., Barber, D.S., Casarez, E. and Rael, L.T. (1998) Effects of micronutrients on metal toxicity. *Environ. Health Perspect.*, **106** (Suppl. 1), 203-216.
- Regoli, F. and Orlando, E. (1994) Bioavailability of Biologically Detoxified Lead: Risks Arising from Consumption of Polluted Mussels *Environ. Health Perspect.*, **102** (suppl. 3), 335-338.
- Rosner, D. and Markowitz, G.A. (1985) A "gift of God". The public health controversy over lead gasoline during the 1920s. *Am J. Public Health*, **75**, 344-352.
- Sasaki, Y.F., Izumiyama, F., Nishidate, E., Otha, T., Ono, T., Matsusaka, N. and Tsuda, S. (1997) Simple detection of in vivo genotoxicity of pyrimethamine in rodents by the modified alkaline single-cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res*, **392**, 251-259.
- Singh, P.N., McCoy, M.T. and Tice, R.R. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp. Cell Res.*, **175**, 184-191.
- Skerfving, S. (1988) Biological monitoring of exposure to inorganic lead. In Clakson, T.W., Friberg, L., Nordberg, G.F. and Sager, P.R. (eds), *Biological monitoring of toxic metals*. Plenum Press, New York, USA pp 169-197.

- Tice, R.R., Strauss, G.H.S. and Petres, W.P. (1992) High-dose combination breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.*, **271**, 101-103.
- Todd, A.C., Wetmur, J.G., Moline, J.M., Godbold, J.H., Levin, S.M., Landrigan, P.J. (1996) Unraveling the chronic toxicity of lead: an essential priority for environmental health. *Environ. Health Perspect.*, **104**(suppl.1), 141-146.
- Valverde, M., Fortoul, T.I., Díaz-Barriga, F., Mejía, J., Rojas, E. (2000) Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice. *Mutagenesis*, **15**, 109-114.
- Waalkes, M.P. and Klaassen, C.D. (1985) Concentrations of metallothionein in major organs of rat after administration of various metals. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **5**, 473-477.
- Waalkes, M.P., Diwan, B.A., Ward, J.M., Devor, D.E., Goyer, R.A. (1995) Renal tubular tumors and atypical hyperplasias in B6C3F1 mice exposed to lead acetate during gestation and lactation occur with minimal chronic nephropathy. *Cancer Res.*, **55**, 5265-5271
- Wade, M.J., Davis, B.K., Carlisle, J.S., Klein, A.K., Valoppi, L.M. (1993) Environmental transformation of toxic metals. *Occup. Med. State-of-the-Art Rev.*, **8**, 575-601.
- Wanner, H.U. (1993) Effects of atmospheric pollution on human health. *Experimentia*, **49**, 754-758.
- WHO (1980) Recommended Health-Based limits in Occupational Exposure to Heavy Metals, Techn. Rep. Ser. No **647**, World Health Organization, Geneva.
- Yiangou, M., Ge, X., Carter, K.C. and Papaconstantinou, J. (1991) Induction of several Acute-Phase Protein Genes by Heavy Metals: A New Class of Metal-Responsive Genes. *Biochemistry*, **30**, 3798-3806.

Figure legends

Fig1. Induction of DNA migration in several mouse organs after a single exposure. *statistical significance determined by Mann-Whitney U test ($p < 0.05$).

Fig2. Mean of DNA migration (tail length) evaluated by SCGE assay in testicle (A) and lung (B) cells of four CD-1 male mice per week. Statistical significance determined by Mann-Whitney U test (* $p < 0.05$).

Fig3. Mean of DNA migration (tail length) evaluated by SCGE assay in kidney (A) and liver (B) cells of four CD-1 male mice per week. Statistical significance determined by Man-Whitney U test (* $p < 0.05$).

Fig4. Mean of DNA migration (tail length) evaluated by SCGE assay in brain (A) and bone marrow (B) cells of four CD-1 male mice per week. Statistical significance determined by Man-Whitney U test (* $p < 0.05$).

Fig5. Mean of DNA migration (tail length) evaluated by SCGE assay in nasal cells (A) and leukocytes (B) cells of four CD-1 male mice per week. Statistical significance determined by Man-Whitney U test (* $p < 0.05$).

Fig6. Correlation between [Pb $\mu\text{g/g}$] in several mouse organs and weeks of treatment. For liver and Kidney the r value was determined by linear regression. A polynomial of forth degree regression was used for the lung

Fig7. Correlation between DNA migration and [Pb $\mu\text{g/g}$] in several mouse organs. r value was determined by linear regression.

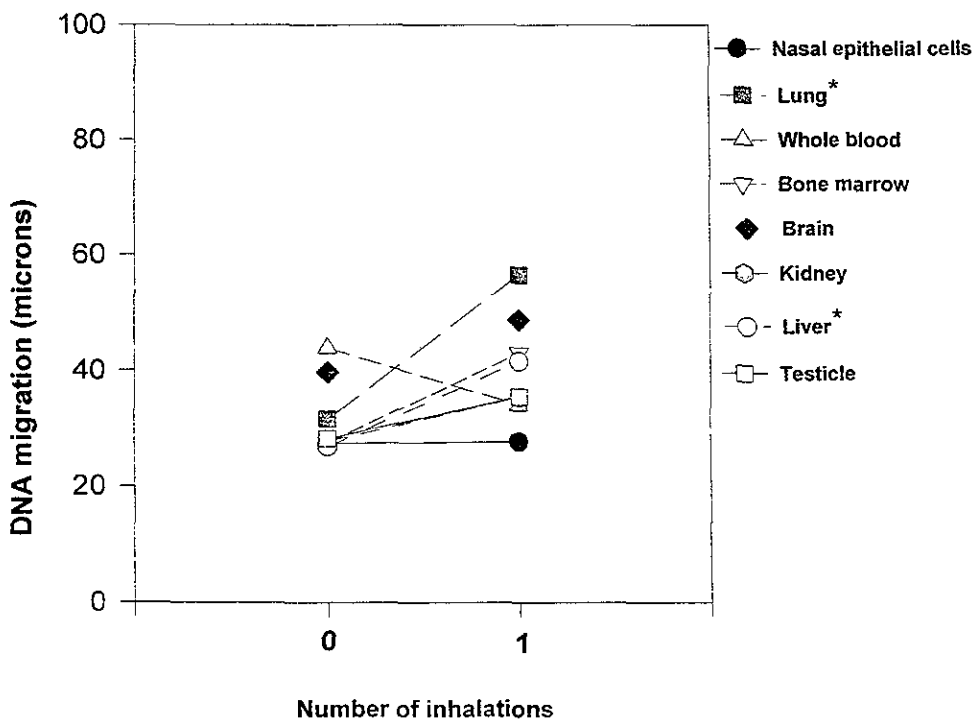


Figure 1

Figure 2A
Testicle

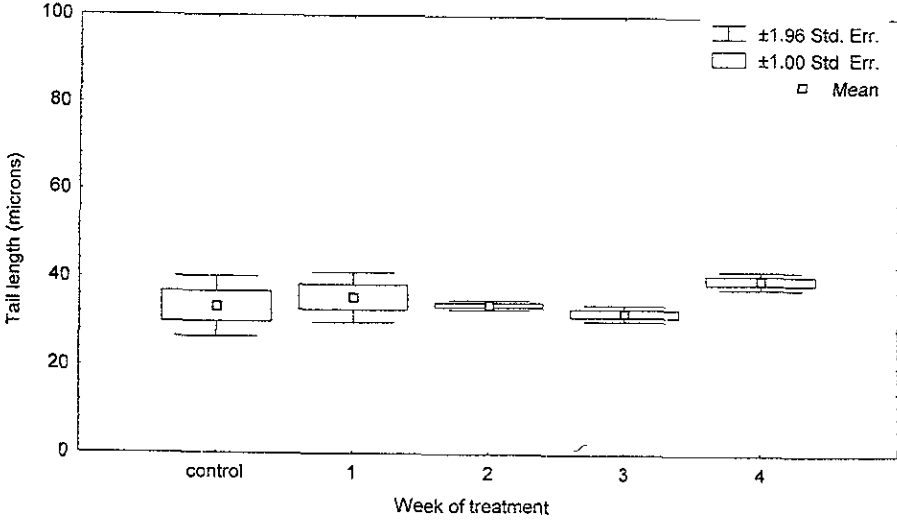


Figure 2B
Lung

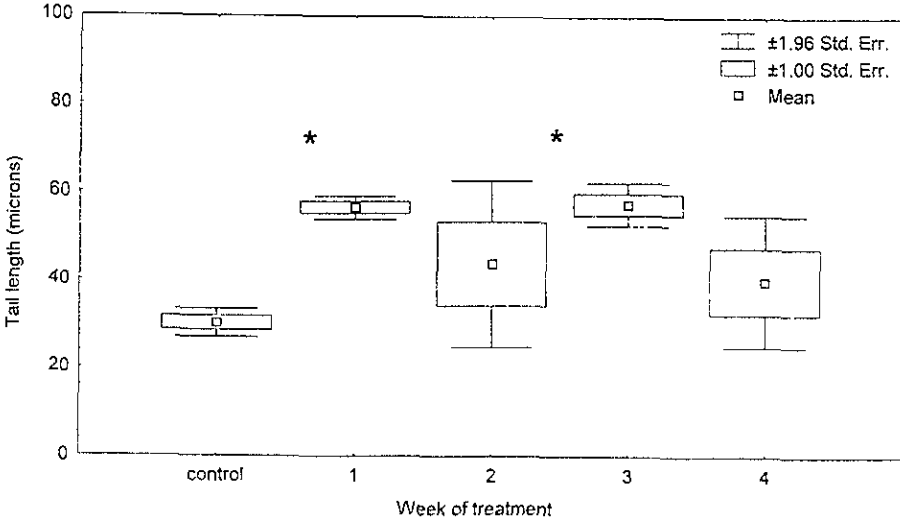


Figure 3A
Kidney

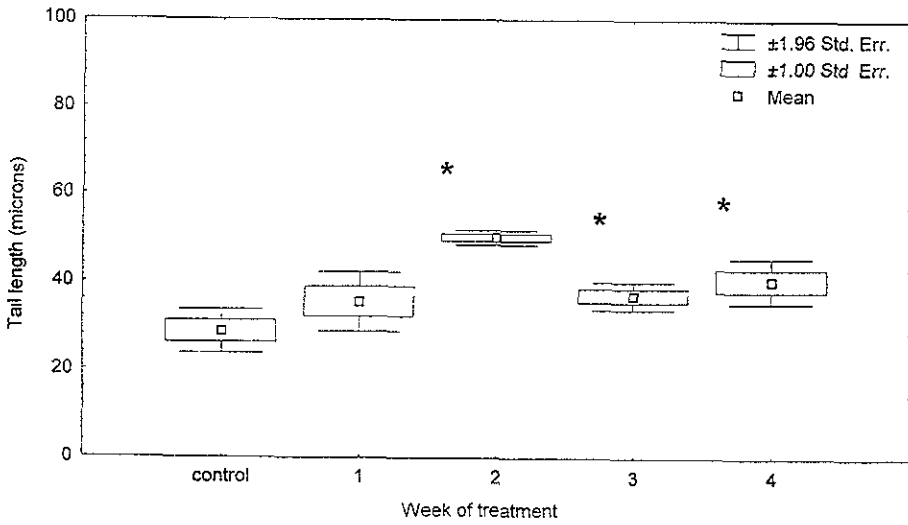


Figure 3B
Liver

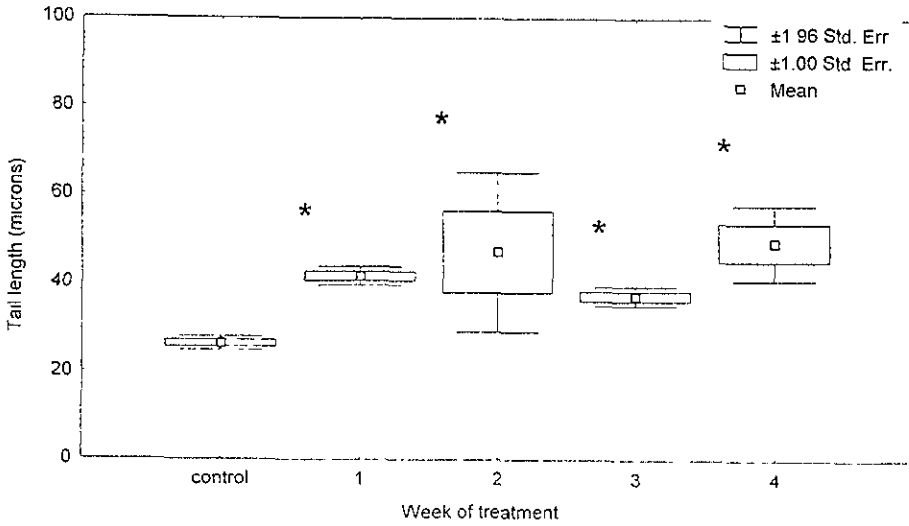


Figure 4A

Brain

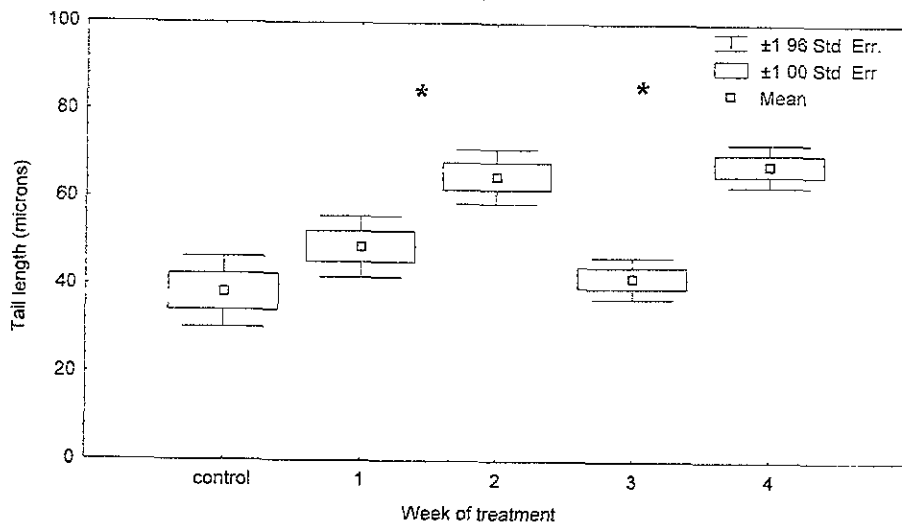


Figure 4B

Bone marrow

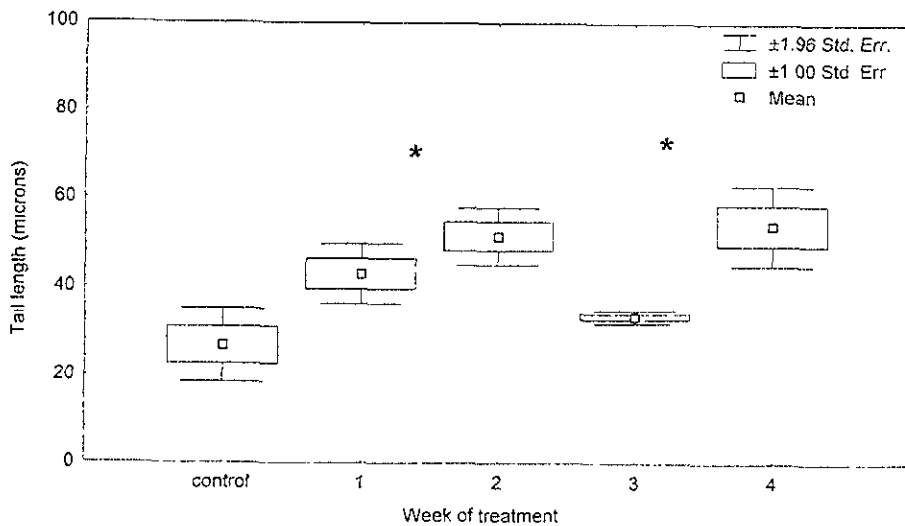


Figure 5A
Nasal cells

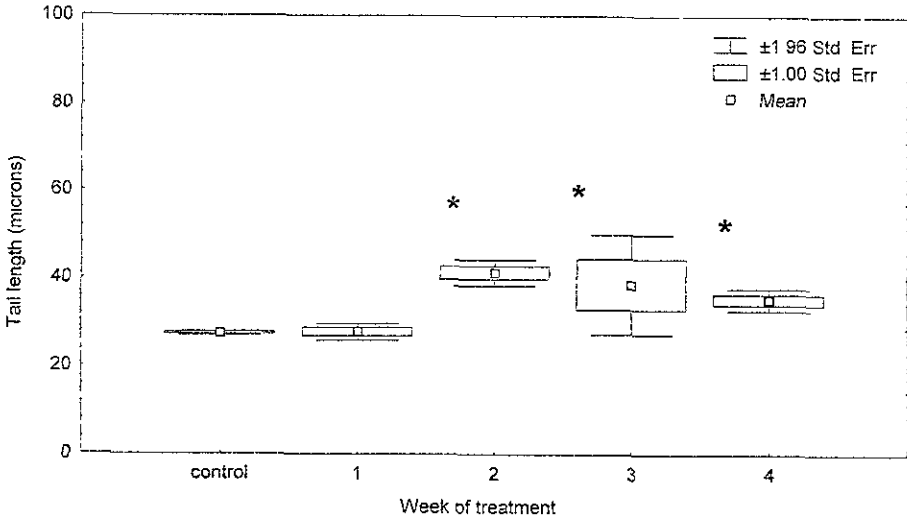
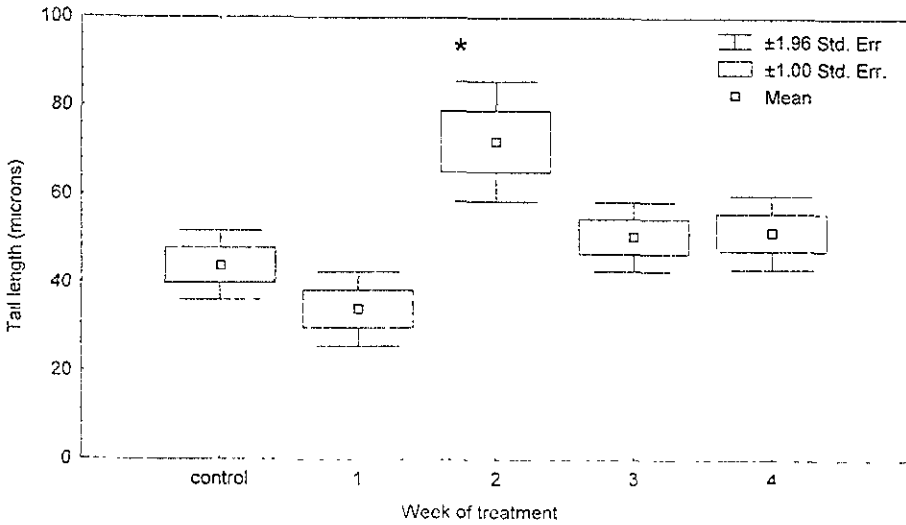


Figure 5B
Leukocytes



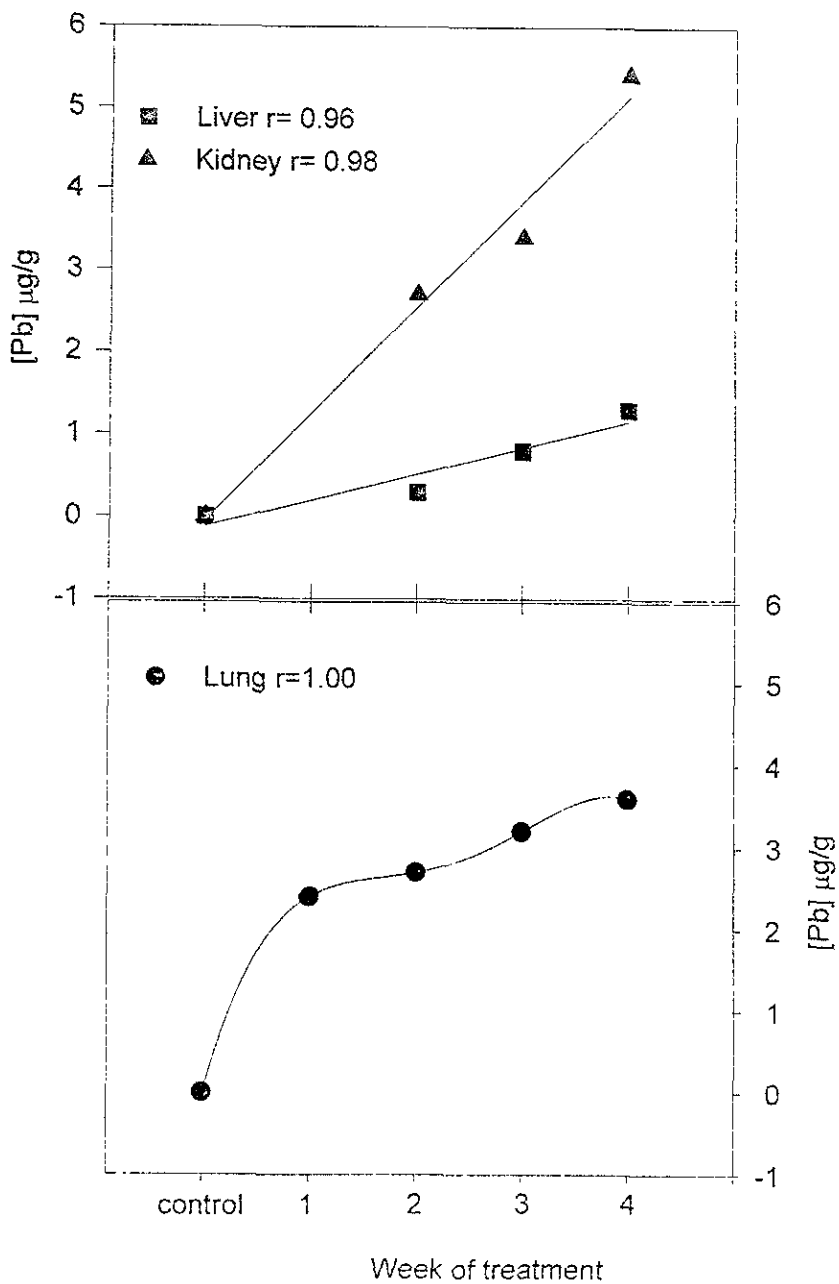


Figure 6

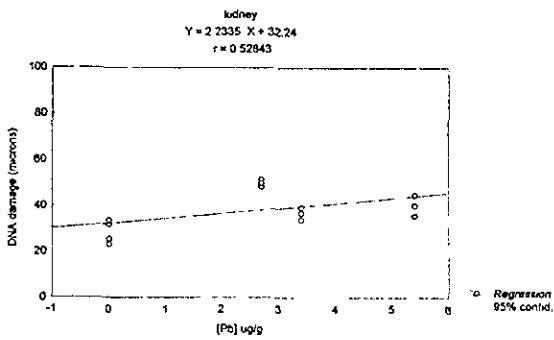
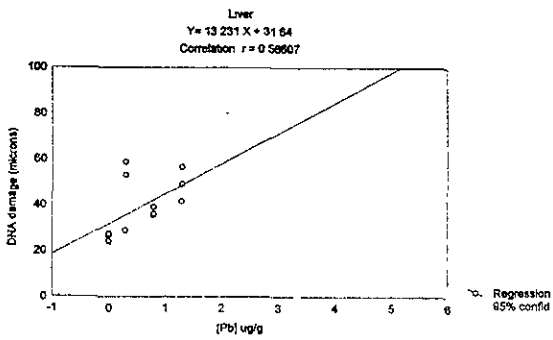
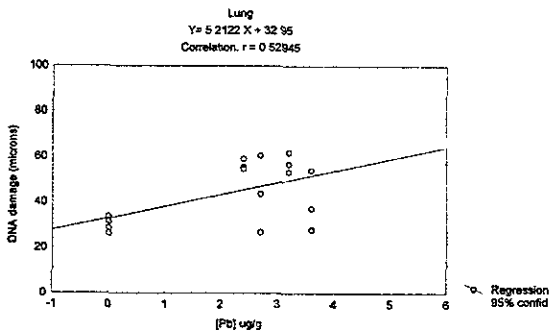


Figure 7

Daño al DNA inducido por la inhalación de cloruro de cadmio.

Para el estudio de la genotoxicidad inducida por la inhalación de cloruro de cadmio (0.08 mg/cc) en diferentes órganos de ratón (células del epitelio nasal, pulmón, hígado, riñón, sangre periférica, médula ósea, cerebro, testículo), se realizó el mismo protocolo de exposición que para el acetato de plomo, consistiendo tanto en un protocolo de exposición aguda, como subcrónicos en los cuales se hizo un seguimiento semanal de los efectos, durante un periodo de cuatro semanas de exposición. La genotoxicidad fue determinada mediante la electroforesis unicelular alcalina, en la cual se cuantifican los rompimientos de cadena sencilla del DNA. Los resultados de la exposición aguda a cloruro de cadmio mostraron una inducción estadísticamente significativa de rompimientos de cadena sencilla en todos los órganos excepto en riñón; mientras que para el seguimiento semanal del daño generado al DNA en los diferentes órganos fue significativo en todos los órganos a través de las cuatro semanas de exposición. En general, se aprecia una tendencia a mantener la misma magnitud de daño en el DNA que el alcanzado a partir de la segunda semana de exposición, aunque cada órgano muestra comportamientos diferentes. Se encontró correlación tanto entre el tiempo de exposición y los niveles de cadmio en órganos como el pulmón, hígado y riñón, como entre la magnitud del daño al DNA y los niveles del metal en estos mismos órganos. A partir de la ecuación de la recta obtenida de la correlación entre la cantidad de cadmio en pulmón y el daño al DNA evaluado a través del tiempo de exposición fue posible determinar que $1\mu\text{g}$ de cadmio induce un incremento de $0.69\mu\text{m}$ la migración de los fragmentos de DNA en éste órgano. De la misma manera se determinó que $1\mu\text{g}$ de cadmio induce un incremento de $4.02\mu\text{m}$ la migración de los fragmentos de DNA en el hígado; mientras que en el riñón, $1\mu\text{g}$ de cadmio induce un incremento de $2.99\mu\text{m}$ la migración de los fragmentos de DNA .

Los detalles de estos resultados se muestran en el artículo que se anexa enseguida: "Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice".

Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice

Mahara Valverde, Teresa I.Fortoul¹, Fernando Díaz-Barriga², Jesús Mejía² and Emilio Rojas del Castillo³

Departamento de Genética y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas and ¹Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM, AP 70228 Ciudad Universitaria 04510 México DF and ²Facultad de Medicina, UASLP México

In recent years, the concentration of metals in the environment has increased significantly. Metal compounds, as a group, are among the best-documented human carcinogens, but the mechanisms by which they act are not completely understood. In the present study a cadmium inhalation model in mice was implemented in order to detect the induction of genotoxic damage as single-strand breaks and alkali-labile sites in several organs (nasal epithelial cells, lung, whole blood, liver, kidney, bone marrow, brain and testicle) using the single cell gel electrophoresis (SCGE) or Comet assay. We found differences among the studied organs after a single and subsequent inhalations: in the organs analyzed we observed that major DNA damage was induced after a single inhalation; in subsequent inhalations there was a tendency to maintain the same magnitude of damage or in some cases it decreased. A correlation between length of exposure, DNA damage and metal tissue concentration was found. These results suggest that cadmium chloride inhalation induces systemic DNA damage; some organs showed less damage than others (liver, brain, etc.) and this finding could be as a consequence of the capacity to remove the damage induced by long periods of exposure, possibly because of the induction of detoxifying mechanisms such as induction of metallothionein.

Introduction

The mechanism by which metals induce carcinogenesis is still unknown, but one possible pathway may involve their interaction with DNA, either directly or indirectly (Hartman and Spcitt, 1994). From the results of several hundred short-term tests performed to assess the carcinogenic properties of metal salts on the basis of their mutagenicity, it can be concluded that there is a clear relationship between the carcinogenic potential of a metal compound and its genotoxicity. These assays have also demonstrated that the response obtained depends on the ability of the metal to penetrate the cell and interact with DNA, the chemical species, the physical properties (oxidative state, charge, solubility, crystal form, properties of ligands and complex stereochemistry) and possible interactions with other xenobiotics (Goyer, 1991). However, the relation observed between the carcinogenicity of some metal compounds and their genotoxic potential does not exclude the possibility of additional mechanisms such as the induction of metallothioneins (MT) (Leonard and Bernard 1993). MT are a family of low molecular weight, inducible proteins rich in sulfhydryl groups, some of which are believed

to have evolved to modulate the effects of zinc (Gochfeld, 1997). The induction of MT protects against the toxicity of some metals (such as cadmium), they act as a free radical scavenger protecting against oxidative damage, and they also protect against the toxicity of alkylating anticancer drugs and other electrophiles (Klaasen and Liu, 1998). The MT multigene family is composed of at least four isoforms MT-I and MT-II exist in all tissues, they are regulated in a coordinate fashion, and appear functionally equivalent. Other members of the MT gene family, however, show different patterns of expression. MT-III is found mainly in the brain and MT-IV in stratified squamous epithelium. MT-III and MT-IV are regulated very differently to MT-I and MT-II and their significance is not yet understood (Klaasen and Liu, 1998). MT-I and MT-II can be easily induced by heavy metals, hormones, inflammation, acute stress and many other chemicals.

Cadmium is a modern environmental contaminant that is toxic and carcinogenic (Sunderman, 1978, Leonard *et al.*, 1984; Goyer, 1991). Industrial exposure, food and cigarette smoking are the major sources of the body burden of cadmium (Leonard *et al.*, 1984). Cadmium avidly binds to polythiol groups in proteins such as metallothionein as well as zinc sites in metalloenzymes and transcriptional factors (Vallee and Ulmer, 1972, Vallee and Galde, 1984; Freedman *et al.*, 1988; Makowski *et al.*, 1991). Cadmium compounds are inactive or weakly active in gene mutation (Costa *et al.*, 1981, Leonard *et al.*, 1984, Klein *et al.*, 1991) and other genotoxicity assays (Beyersmann *et al.*, 1994, Rojas *et al.*, 1999). Therefore, epigenetic mechanisms probably play a significant role in the carcinogenicity of cadmium, although the mechanisms are not well understood. Cadmium has been considered carcinogenic in laboratory animals (Sunderman, 1978, Leonard *et al.*, 1984; Goyer, 1991, IARC, 1993). Rats exposed to aerosols containing CdCl₂ produced an increase of 50% in the incidence of lung tumors (Takenaka *et al.*, 1983). A single s.c. injection of 40 µmol/kg CdCl₂ in rats produced a high incidence of Leydig cell adenomas in the testicle, prostatic neoplasia and sarcomas at the site of injection (Waalke *et al.*, 1988). Oral administration of CdCl₂ to rats also potentially induced tumors in the prostate, testicle and hematopoietic system (Waalke and Rehm, 1992).

Long-term exposure to low levels of Cd²⁺ produced transformed muntac cells with normal karyotypes. Chronic exposure studies in rats with several different Cd compounds (i.e. CdSO₄, CdO dust, CdO fumes, CdS and CdCl₂) showed induction of a carcinogenic pulmonary response to these inhaled Cd compounds (Glaser *et al.*, 1990, Oberdoster *et al.*, 1994).

In contrast to these unequivocal findings in rats, Hennrich *et al.* (1989) did not observe a significant pulmonary carcinogenic response in chronic inhalation studies in mice and hamster, using the same Cd compounds and exposure concentrations. The evidence that Cd is a pulmonary carcinogen in

¹To whom correspondence should be addressed. Tel: +52 5 622 3360 Fax: +52 5 622 3369. E-mail: emiliorojas@ciqa.izt.uam.mx

humans has been termed limited by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 1987) based on a number of epidemiological studies that did not uniformly show a significant correlation between Cd inhalation exposure and lung cancer; this issue is still controversial (Thun *et al.*, 1985; Doll, 1992). The results of experimental animal and epidemiological studies suggest that the pulmonary tumorigenic potency of inhaled Cd compounds is quite different in different mammalian species. An important question arises about the best appropriate animal model for extrapolation to humans. A basic knowledge of the mechanisms involved in various species for the different responses would also contribute greatly to our understanding of the human carcinogenic process. Since inhalation is one of the main routes of environmental Cd exposure, this route is evaluated, along with induction of genotoxic effects in several CD-1 mouse organs (nasal epithelial cells, lung, whole blood, liver, kidney, bone marrow, brain and testis) after inhalation of 0.08 µg/cc cadmium chloride (CdCl₂), using the alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) assay. The SCGE assay is a sensitive procedure to quantify DNA damage [primarily single-strand breaks (SSB) and alkali-labile sites] in mammalian cells *in vitro* and *in vivo* (Singh *et al.*, 1988). One of the advantages of the simultaneous assessment of DNA damage in many organs from the same animal is, as reported here, the comparison of their responses under identical treatment conditions at the same time and with the same physiological status.

Materials and methods

Chemical reagents

Normal agarose, low melting point agarose (LMPA), ethidium bromide, Tris, Na₂EDTA, dimethyl sulfoxide, Triton X-100 and RPMI-1640 medium were obtained from Sigma Chemical Co (St Louis, Mo). NaOH from Merck and NaCl from Baxter.

Animals

CD-1 male mice (from the Medical School Vivarium, UNAM, Mexico), 45 days old and weighing 30–35 g, were housed in hanging plastic cages under controlled lighting conditions (12 h light/12 h dark regime) relative humidity (50 ± 5%) and temperature (17 ± 2°C) and fed Purina Rat Chow and water *ad libitum*.

Groups

Twenty-four males were allotted randomly to four exposure groups of six animals each (four exposed and two controls). Group 1, single inhalation (acute treatment); group 2, two weeks of exposure, three inhalations; group 3, three weeks of exposure, five inhalations; group 4, four weeks of treatment, seven inhalations.

Treatments

Inhalations were performed in an acrylic box (50×30×20.98 cm), connected to an ultra-nebulizer (Ultra Neb 99, DeVilbiss) with a flow of 10 l/min. The exposure protocol and cadmium chloride concentrations were according to Fortoul *et al.* (1999). Briefly, 16 animals, four from each group, were placed in an acrylic box and the cadmium chloride (0.08 µg/cc) inhalations were performed for 60 min, twice a week (Monday and Wednesday). The control animals (eight) inhaled deionized water for the same time. After inhalation the animals were returned to their respective cages.

Sampling

Groups of six animals (four exposed and two controls) were killed by cervical dislocation every week, 24 h after the last inhalation. Immediately, whole blood was obtained by intracardiac puncture with a preheparinized syringe and the brain, lung, nasal septum, liver, kidney, femur and testicle were removed. The organs were placed in cold saline solution (0.9% NaCl) until cell suspensions were prepared.

Cell suspensions

All organs, other than the nasal septum and femur, were washed twice with cold saline solution and placed in cold RPMI 1640 medium and minced with the help of cold scissors into 1 mm³ pieces. Then the cell suspensions were kept at 4°C until needed. For nasal septum, the nasal septum was placed in

1 ml of cold saline solution, shaken in the solution with tweezers and then discarded. For bone marrow cells, 1 ml of cold saline solution was used to gently wash the femur medullary cavity to detach the cells and resuspend them. The viability of the cell suspension was determined using the trypan blue exclusion technique.

SCGE assay

An appropriate number of cells was obtained in 30 µl of cell suspension and mixed with 75 µl of 0.5% LMPA. Cells and LMPA at 0.36% final concentration were loaded onto a microscope slide prelayered with 200 µl of 0.5% normal melting point agarose. The SCGE assay was performed as described by Tice *et al.* (1992). Briefly, after lysis at 4°C for at least 1 h (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10, 10% DMSO, 1% fresh Triton X-100), slides were placed in a horizontal electrophoresis chamber with running buffer solution (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH 13). The slides remained for 10 min in the electrophoresis buffer to allow the DNA to unwind. Electrophoresis was performed for 10 min at 0.8 V/cm, and all technical steps were conducted using very dim indirect light. After electrophoresis, the slides were gently removed and rinsed with neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) at room temperature (15 min). The slides were dehydrated with absolute ethanol (15 min), after which they were air dried. Ethidium bromide (75 µl of a 20 µg/ml solution) was added to each slide and a coverslip was placed on the gel. Individual cells were visualized at 200× magnification on an Olympus BX-60 microscope with fluorescence attachments (excitation filter 515–560 nm and barrier filter 590 nm) and the extent of migration (tail length value) was measured with a scaled eyepiece. To evaluate DNA migration 100 cells/tissue/animal were scored for each condition.

Measurement of cadmium

As an exposure marker, cadmium concentration was measured in three different organs (lung, liver and kidney) after each treatment by atomic absorption spectrophotometry. Cadmium analyses were performed using a Perkin-Elmer 2380 atomic absorption spectrophotometer. Tissue samples of lung, kidney and liver were placed in acid-washed glass test tubes and solubilized with a mixture of nitric and perchloric acids for at least 5 h. Cadmium was quantified by the graphite furnace method. As an internal quality control, we analyzed blind random samples of reference material (SRM 1577b bovine liver) obtained from the National Institute of Standards and Technology. For cadmium, recoveries were 104%.

Statistical analysis

All the statistical analysis were performed with GraphPAD InStat software v.1.14. The Mann-Whitney *U* test was used to determine statistical differences between groups of animals for each organ (Kirk, 1999).

Results

The viability, using the classical trypan blue exclusion technique, of the cell suspensions was >80% in all organs immediately after death. DNA damage as SSB and alkali-labile sites induced by cadmium chloride inhalation was analyzed in several mouse organs with respect to times of exposure.

Different organs displayed different sensitivities after one exposure. The distribution of damage from high to low susceptibility was brain > bone marrow > nasal cells > lung > leukocytes > testicle > liver > kidney (Figure 1). An analysis of genotoxicity throughout the treatment showed accumulation of DNA damage in the majority of the organs studied.

Testicle and nasal epithelial cells

There was an increase in DNA migration after the first exposure and the damage remained at the same value through the exposure time. A dose-damage response was not evident in the testicle (Figure 2A). However, in nasal cells (Figure 2B) a tendency for increased induction of DNA damage with time of exposure could be observed. However, there were no statistical differences at the end of the treatment with respect to controls, possibly due to the high standard deviation observed and the heterogeneous response.

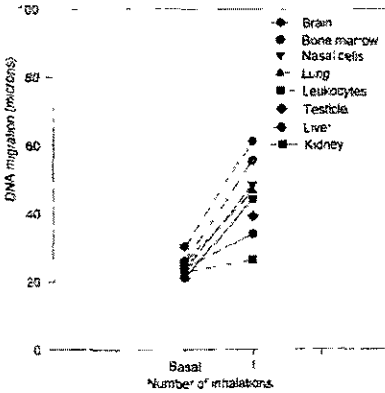


Fig. 1. Induction of DNA migration in several mouse organs after a single exposure.

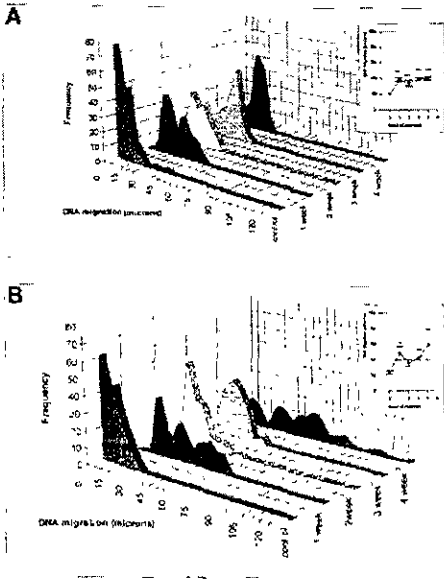


Fig. 2. Frequency of cells as a function of DNA size (tail length), evaluated by SCGE assay in testicle (A) and nasal (B) cells of four CD-1 male mice per week. Means \pm SD of DNA migration and statistical significance determined by Mann-Whitney U test (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) are inset into both panels.

Lung and bone marrow

After nasal epithelial cells, the lung is the second organ in contact with cadmium chloride. The sensitivity of the lung (Figure 3A) and bone marrow (Figure 3B) is higher than other organs, such as liver, kidney, nasal cells, testis and leukocytes. The greatest induction of DNA damage was observed after

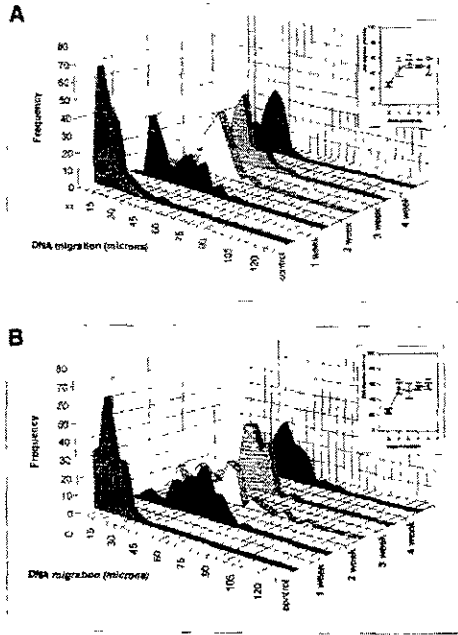


Fig. 3. Frequency of cells as a function of DNA size (tail length), evaluated by SCGE assay in lung (A) and bone marrow (B) cells of four CD-1 male mice per week. Means \pm SD of DNA migration and statistical significance determined by Mann-Whitney U test (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) are inset into both panels.

the first exposure and remained constant until the last inhalation, after 4 weeks.

Liver and kidney

These organs showed a slight increase in DNA damage after the first exposure, which increased a little until week 3 of treatment, while a remarkable increase in DNA damage in the last week was apparent for both organs (Figure 4A and B, respectively).

Leukocytes and brain

After the first exposure both organs showed an increase in DNA damage. Brain (Figure 5B) showed the greatest susceptibility to cadmium chloride exposure. DNA migration remained constant until week 3 of treatment, although in the last week of exposure in leukocytes, but not in brain, a remarkable increase in induction of DNA damage was evident (Figure 5A).

After each inhalation the metal concentration was determined in lung, liver and kidney throughout the exposure time (Table I), employing atomic absorption spectrophotometry. Figure 6 shows the correlation between cadmium concentration in the three different organs and the time of exposure. In all organs a good correlation between time and metal concentration was found, in lung the r value was 0.98, for liver, 0.98 and for kidney $r = 0.97$.

The correlation between DNA damage, measured as tail

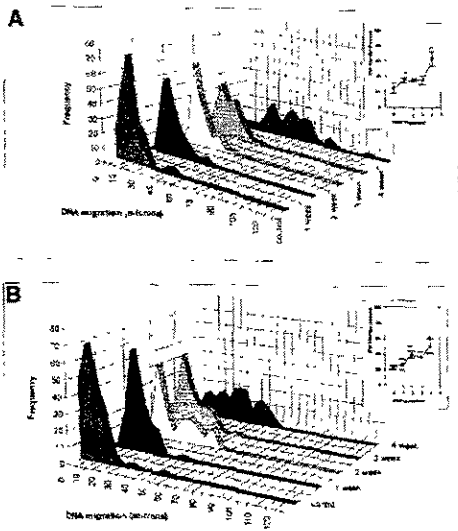


Fig. 4. Frequency of cells as a function of DNA size (tail length), evaluated by SCGE assay in liver (A) and kidney (B) cells of four CD-1 male mice per week. Means \pm SD of DNA migration and statistical significance determined by Mann-Whitney *U* test (***P* < 0.05, ****P* < 0.01, *****P* < 0.001); are inset into both panels.

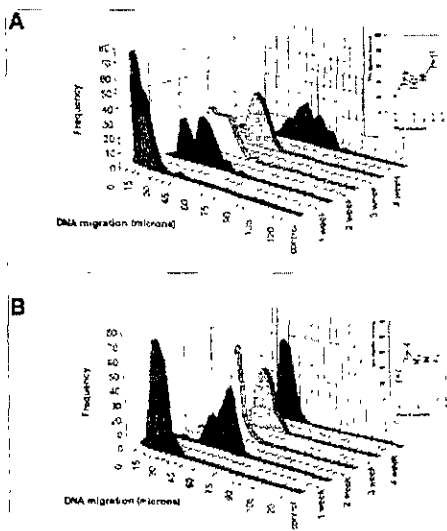


Fig. 5. Frequency of cells as a function of DNA size (tail length), evaluated by SCGE assay in leukocytes (A) and brain cells (B) of four CD-1 male mice per week. Means \pm SD of DNA migration and statistical significance determined by Mann-Whitney *U* test (***P* < 0.05, ****P* < 0.001); are inset into both panels.

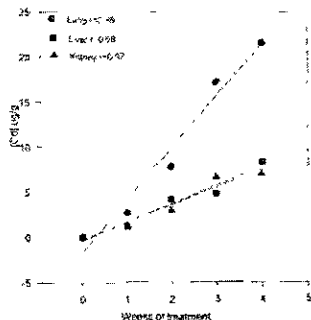


Fig. 6. Correlation between [Cd] in several mouse organs and weeks of treatment. *r* value was determined by linear regression.

Table I. Cadmium concentration ($\mu\text{g/g}$) in several mouse organs, determined by atomic absorption spectrophotometry

Organ	Cadmium concentration ($\mu\text{g/g}$ dry wt)				
	Control	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Lung	0.007	2.7	7.8	17.2	21.6
Liver	0.007	1.2	4.2	4.8	8.3
Kidney	0.05	1.3	3.0	6.6	7.0

length, induced by cadmium inhalation and the accumulation of metal in lung, liver and kidney is shown in Figure 7, when applying the equation: $y = mx + b$, where *m* is the slope of the curve (biological effect), *x* is the cadmium concentration and *b* is the basal value of DNA migration (μm). It is possible to calculate that 1.0 μg of Cd induced an increase in DNA migration of 0.69 μm . The proposed formula for lung is:

$$y = 0.69x + 37.72$$

In the case of liver, with 1.0 μg of Cd the migration increased by 4.02 μm . The formula is:

$$y = 4.02x + 23.42$$

For the kidney, with 1.0 μg of Cd the migration increased by 2.99 μm . The formula is:

$$y = 2.99x + 24.50$$

These data give the relationship between time of exposure and biological effect evaluated as SSB and alkali-labile sites under our experimental conditions.

Discussion

The potential of metals to cause toxicity has traditionally been regarded as a function of dose and potency of the metal itself. Over the last 10 years it has become clear that several metals undergo biotransformation in mammalian tissues and that metabolism may have important implications in their toxicity and on its health impact (Manzo et al., 1992). Since the effects of metals are related to their concentration at specific target sites, metabolic data are also important in interpreting toxicological findings. The aim of this work was to determine the different susceptibilities of several mouse organs to cadmium chloride inhalation (0.08 $\mu\text{g}/\text{cc}$). Different DNA migration

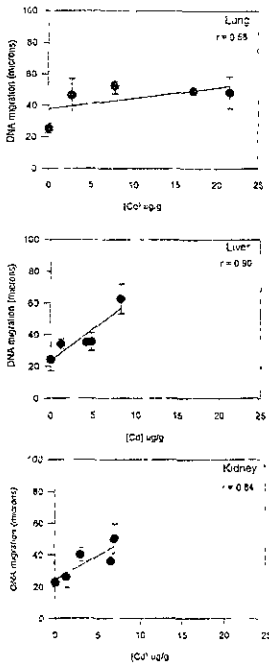


Fig. 7 Correlation between DNA migration and $[Cd^{2+}]$ in several mouse organs. r value was determined by linear regression.

distances in target organs were observed. For a single inhalation, the brain was the most susceptible organ, while after 4 weeks exposure the liver showed the highest DNA damage. Several modulating effects were present when genotoxicity induced by the treatment in each organ was analyzed.

Nasal epithelial cells are the first epithelial tissue in contact with the metal, however, a significant genotoxic effect was not evident until the last week of treatment (Figure 2b), this could be due to the size of the particles, which was less than $0.5 \mu m$, or another explanation could be the high metallothionein concentration observed in several epithelia (Foulkes, 1991).

The second organ in contact is the lung, the size of the metal particle having the capacity to reach the alveoli (Wanner, 1993). This could be reflected in the induction of DNA damage (Figure 3a). In this respect, Oberdoster *et al.* (1994) reported a high susceptibility to cadmium inhalation in mouse lung. Likewise, mice exhibited a marked and sustained pulmonary inflammatory and proliferative response after Cd exposure in his model. Furthermore, as a consequence of the inflammatory response there was an increase in free radicals, which have the capacity to induce DNA strand breaks. However, considering the magnitude of DNA damage in our results it is possible that the lung has the capacity to prevent some of the damage by induction of metallothionein. Oberdoster *et al.* (1994) showed that pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1, induce MT synthesis. This could explain the induction of DNA migration of median magnitude.

After absorption via the pulmonary or gastrointestinal routes Cd is transported in the plasma, initially bound to albumin and other large proteins (Foulkes, 1994). This reflects high levels of metal-tissue interaction and could explain the high levels of damage found in leukocytes after the first exposure and accumulation of damage throughout the treatment (Figure 5a). In kidney induction of DNA damage was observed at week 2. This is in agreement with Foulkes (1991), who reported that the nephrotoxic action of some heavy metals becomes apparent only after a significant delay following their administration.

Cadmium as the chloride salt is immediately bound to plasma proteins and subsequently accumulates, primarily in liver and in other tissues; these processes do not exclude the possibility that cadmium accumulation after some time was a factor in the induction of DNA damage observed in kidney (Foulkes, 1994).

In liver a slight dose-response curve during the first three weeks was observed (Figure 4a), maybe because metallothionein was induced after the first inhalation (Foulkes, 1994), but subsequent exposure to cadmium saturated the capacity for detoxification by this mechanism (Klaassen and Liu, 1998); this could explain the increase in DNA damage observed in the last week.

In the testicle the induction of damage observed was not severe but was statistically significant. There are several reports of reprotoxic effects of cadmium administered by the i.p. route (Gebhart and Rossman, 1991), the response observed in this study could be due to the route of exposure, since inhalation implicates metal absorption by the lung.

The bone marrow was the organ with the highest susceptibility to cadmium, as it showed one of the highest inductions of DNA damage through all the weeks of exposure. Bone marrow tissue could be more sensitive to cadmium chloride due to the high level of proliferation, as this metal interferes with a number of enzymes involved in DNA repair and replication (Hartwig, 1994, 1995). On the other hand, although induction of metallothionein in bone marrow had been reported (Tamura and Ohya, 1995; Klaassen and Liu, 1998), in our work, after the first exposure an equilibrium between the cadmium and metallothionein concentrations seems to be reached. This could explain why we did not observe a dose-related response in this tissue.

Brain cells also showed a high response to cadmium, similar to bone marrow, but in the case of the brain the probable mechanism could be an interaction with calcium and not direct, as in other tissues (Nordberg and Nordberg 1988; Smith *et al.*, 1994).

In general we could detect different susceptibilities to cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice, measured as SSB, alkali-labile sites and delayed repair sites.

The SCGE assay was a sensitive method to detect DNA damage in several mouse organs (Sasaki *et al.*, 1997). Results obtained in this study using this assay correlated with the cadmium concentration in the lung, liver and kidney, which could be related to the levels of metallothionein.

Based on the fact that in this study the lung was the organ with the highest cadmium concentration throughout the treatment, the correlation between DNA damage and cadmium concentration was lower ($r = 0.59$), because the level of DNA migration was low, probably due to induction of MT, principally MT-I and MT-II which can be easily induced by heavy metals (Cd) hormones, inflammation, acute stress and chemicals.

(Klaassen and Liu, 1998), and protects against metal toxicity. In these functions, MTs act as free radical scavengers, protecting against oxidative damage (Hartwig, 1995). On the other hand, our liver and kidney data with respect to the correlation between DNA damage and cadmium concentration agree with Klaassen and Liu (1998), who reported that tolerance to Cd toxicity is apparently attributable to MT protection against Cd-induced acute toxicity. However, due to the fact that the induction of MT is saturable, its inhibition is possible. In this context it is important to consider that MTs are expressed in an inducible manner in essentially every tissue, providing evidence that MTs play a role in both the extracellular (homeostatic) and intracellular control of zinc and copper metabolism (Karin et al., 1985). The induction of genotoxicity by environmental agents is a very important aspect of modern environmental research since the most recent molecular cancer genetics and cytogenetics data have provided strong evidence that genotoxic events can be the initial step of the malignant process, and metals could be the first step.

Acknowledgements

Thanks are due to M.C. López, M. Sordo, I. Sánchez and I. López for their technical support. This study was partially supported by CONACYT project 3180P-M. M.V. was the recipient of a fellowship from DGEF and CONACYT.

References

- Beysmann, D., Block, C. and Malins, A. N. (1994) Effects of cadmium on nuclear protein kinase C. *Environ Health Perspect.* 102 (suppl 3), 177-180.
- Costa, M., Simmons-Hansen, J., Bedrossian, C. W. M., Bonura, J. and Caprioli, R. M. (1981) Phagocytosis, cellular distribution and carcinogenic activity of particulate nickel compounds in tissue culture. *Cancer Res.* 41, 2868-2876.
- Doll, R. (1992) Is cadmium a human carcinogen? *Ann Epidemiol.* 2, 335-337.
- Fontana, T. I., Salgado, R. C., Monedero, S. G., Sanchez, J. G., Lopez, I. E., Espejel, G., Calderon, N. L. and Saldivar, L. (1999) Ultrastructural findings in the nonciliated bronchiolar cells (NCBC) after subacute inhalation of lead acetate. *Acta Histochem.* 68, 51-55.
- Foullkes, E. C. (1991) Nature of Cd and Hg effects on epithelial amino acid transport *in vivo* and role of chelators. *Toxicology*, 69, 177-185.
- Foullkes, E. C. (1994) Epithelial transport of heavy metals. *Adv Comp Environ Physiol*, 20, 55-84.
- Freedman, L. P., Lush, B. F., Korzun, Z. R., Basavappa, R., Sigler, P. B. and Yamamoto, K. R. (1988) The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature*, 334, 543-546.
- Gebhart, E. and Rossman, T. (1991) *Mutagenicity, Carcinogenicity, Teratogenicity*. VCH Verlagsgesellschaft AG mit, Weinheim, Germany, pp 617-640.
- Glaver, U., Hochreiner, D., Otto, F. J. and Oldiges, H. (1990) Carcinogenicity and toxicity of four cadmium compounds inhaled by rats. *Toxicol Environ Chem.* 27, 153-162.
- Gochfeld, M. (1997) Factors influencing susceptibility to metals. *Environ Health Perspect.* 105 (suppl 4), 817-822.
- Goyer, R. A. (1991) Toxic effects of metals. In: *Amdur, M. O., Doull, J. and Klaassen, C. D. (eds) Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Macmillan, New York, NY, pp 623-680.
- Hartman, A. and Speit, G. (1994) Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environ Mol Mutagen.* 23, 299-305.
- Hartwig, A. (1994) Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ Health Perspect.* 102 (suppl 3), 15-90.
- Hartwig, A. (1995) Current aspects in metal genotoxicity. *Biometales* 8, 3-11.
- Hennrich, H., Peters, L., Fritsch, J., Rittgen-Pausen, S., Dassenbrock, C. and König, H. (1989) Investigation of the carcinogenic effects of various cadmium compounds after inhalation in hamsters and mice. *J Sp Pathol.* 37, 253-256.
- IARC (1987) *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Humans*, Supplement 7. IARC, Lyon.
- IARC (1993) *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Humans*, Vol. 58, Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures to the Gas Phase. Lyon.
- Karin, M., Imbra, R. J., Heguy, A. and Wong, G. (1985) Interleukin 1 regulates human metallothionein gene expression. *Mol Cell Biol.* 5, 2866-2869.
- Kirk, R. E. (1999) *Statuses: An Introduction*, 4th edn. Harcourt Brace College Publishers, Orlando, FL.
- Klaassen, C. D. and Liu, J. (1998) Induction of metallothionein as an adaptive mechanism affecting the magnitude and progression of toxicological injury. *Environ Health Perspect.* 106, 297-300.
- Klein, C. B., Conway, K., Wang, X. W., Bhattacharya, R. K., Lin, X., Cohen, M. D., Annab, L., Barrett, J. C. and Costa, M. (1991) Sessence of nickel-transformed cells by an X chromosome: possible epigenetic control. *Science*, 251, 796-799.
- Leonard, A. and Bernard, A. (1993) Biomonitoring exposure to metal compounds with carcinogenic properties. *Environ Health Perspect.* 101 (suppl 3), 127-133.
- Leonard, A., Gerber, G. B., Jacquet, P. and Lauwerys, R. R. (1984) Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of industrially used metals. In: *Kirsch-Volders, M. (ed.) Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of Industrial Pollutants*. Plenum Press, New York, NY, pp 59-125.
- Makowski, G. S., Lin, S. M., Brennan, S. M., Smilowitz, H. M., Hopfer, S. M. and Sunderman, F. W. Jr (1991) Detection of two Zn-finger proteins of *Xenopus laevis*, TFIIIA and p43, by western blots of ovary cytosol with $^{65}\text{Zn}^{2+}$, $^{63}\text{Ni}^{2+}$, or $^{109}\text{Cd}^{2+}$. *Biol Trace Element Res.* 29, 93-109.
- Manzo, L., Costa, L. G., Tonini, M., Minoia, C. and Sabbioni, E. (1992) Metabolic studies as a basis for the interpretation of metal toxicity. *Toxicol Lett.* 64-65, 677-686.
- Nordberg, G. F. and Nordberg, M. (1988) Biological monitoring of cadmium. In: *Clarkson, T. W., Friberg, L., Nordberg, G. F. and Sager, P. (eds.)* Plenum Press, New York, NY, pp 169-197.
- Oberdörster, G., Cheran, M. G. and Bagg, R. B. (1994) Correlation between cadmium-induced pulmonary carcinogenicity, metallothionein expression and inflammatory processes: a species comparison. *Environ Health Perspect.* 102 (suppl 3), 257-263.
- Rojas, E., Herrera, L. A., Pomer, L. A. and Ostrosky-Wegman, P. (1999) Are metals dietary carcinogens? *Mutat Res.* 443, 157-181.
- Sasaki, Y. F., Yuzumaya, F., Nishidate, E., Ohta, T., Ono, T., Matsuzaka, N. and Tsuda, S. (1997) Simple detection of *in vivo* genotoxicity of pyrimethamine in rodents by the modified alkaline single-cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res.* 392, 251-259.
- Singh, N. P., McCoy, M. T. and Tice, R. R. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175, 184-191.
- Smith, J. B., Smith, L., Pujan, V., Zhuang, Y. and Chen, Y.-Ch. (1994) Transmembrane signals and protooncogene induction evoked by carcinogenic metals and prevented by zinc. *Environ Health Perspect.* 102 (suppl 3), 181-189.
- Sunderman, F. W. Jr (1978) Carcinogenic effects of metals. *Fed Proc.* 37, 40-46.
- Takenaka, S., Oldiges, H., König, H., Hochreiner, D. and Oberdörster, G. (1983) Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in wistar rats. *J Natl Cancer Inst.* 70, 367-373.
- Tamura, Y. and Ohya, K. (1995) Study on cadmium metallothionein-like-protein in bone marrow of rabbit. *Kokuhu Gakka Zasshi*, 62, 404-409.
- Thun, M. T., Schmitt, T. M., Smith, A. B., Halpern, W. E. and Lemma, R. (1985) Mortality among a cohort of US cadmium production workers: an update. *J Natl Cancer Inst.* 74, 325-333.
- Tice, R. R., Strauss, G. H. S. and Peters, W. P. (1992) High-dose combination alkylating agents with autologous bone marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res.* 271, 101-115.
- Vallee, B. L. and Golds, A. (1984) The metallochemistry of zinc enzymes. In: Meister, A. (ed.) *Advances in Enzymology*. John Wiley & Sons, New York, NY, pp 283-430.
- Vallee, B. L. and Ulmer, D. D. (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annu Rev Biochem.* 41, 91-128.
- Wardles, M. P. and Rehm, S. (1992) Carcinogenicity of oral cadmium in the male Wistar (Wistar-Kyoto) rat: effect of chronic dietary zinc deficiency. *Lundom Appl Toxicol.* 19, 512-520.
- Wardles, M. P., Rehm, S., Riggs, C. W., Bare, R. M., Devor, D. E., Poirier, L. A., Wenk, M. L., Henneman, J. R. and Balachak, M. S. (1988) Cadmium carcinogenesis in male Wistar (C1)(W1)BR rats: dose response analysis of tumour induction in the prostate and testicle and at the injection site. *Cancer Res.* 48, 4656-4663.
- Wanner, H. U. (1993) Effects of atmospheric pollution on human health. *Experientia*, 49, 751-758.

Received on June 24, 1999; accepted on October 31, 1999.

B) Efecto genotóxico ocasionado por acción directa del metal sobre el DNA.

Explorando la capacidad del plomo, el cadmio y la mezcla de ambos, de interactuar directamente con el DNA de pulmón, hígado y riñón de ratón, se empleo una variante de la electroforesis unicelular, denominado ensayo acelular del cual surgen resultados que muestran que concentraciones no citotóxicas de estos metales (0.01, 0.1 y 1 μM), inducen daño al DNA en los tres órganos estudiados, además de mostrar daño basal diferente en cada órgano. Al enriquecer el protocolo estándar por la adición de proteinasa K (PK) para trabajar con DNA totalmente desnudo se encontró que a las mismas concentraciones, estos metales no inducen daño al DNA, manifestado como rompimientos de cadena sencilla. Para dar soporte a estos resultados se evaluó la capacidad del acetato de plomo y el cloruro de cadmio (0.1 μM) de inducir fragmentación de DNA genómico obtenido a partir de células de pulmón, hígado y riñón de ratones CD-1, obteniendo resultados negativos. Este mismo resultado se obtuvo al realizar ensayos de fragmentación de DNA plasmídico expuesto a las mismas concentraciones de estos metales. Lo cual sugiere que tanto el plomo como el cadmio inducen daño al DNA mediante un mecanismo de acción indirecto; para explorar esta posibilidad se expusieron animales vía inhalatoria a acetato de plomo (0.0068 $\mu\text{g}/\text{cc}$) y cloruro de cadmio (0.08 $\mu\text{g}/\text{cc}$) encontrando una inducción de peroxidación de lípidos de membrana, así como un incremento de los niveles de radicales libres

Los detalles y los resultados obtenidos para este objetivo particular están incluidos en el artículo "Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction?", el cual se anexa enseguida.

Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction?

Mahara Valverde, Cristina Trejo¹ and Emilio Rojas²

Departamento de Genética y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas and ¹Instituto de Fisiología Celular, UNAM Ciudad Universitaria, CP 04510, México D.F., México

Even though the toxic effects of lead and cadmium compounds have been studied over many years, inconsistent results have been obtained about their mutagenic, clastogenic and carcinogenic properties. However, these metals are considered to be potential human carcinogens. The mechanism of metal-induced carcinogenesis is still unknown, but one possible pathway may involve the interaction of metals with DNA, either directly or indirectly. In this work we explore the capacity of lead, cadmium or a mixture of both metals to interact with acellular DNA, by employing a variant of the comet assay. Our results, using low non-cytotoxic metal concentrations (0.01, 0.1 and 1.0 μM) with the standard protocol for the acellular assay, showed an induction of DNA damage in cells of all organs studied; however, basal DNA damage was different in each organ. To confirm that we were working with pure DNA, proteinase K was added to the lysis solution. With this enriched-lysis solution we found a negative response in the induction of DNA damage in cells derived from the liver, kidney and lung of CD-1 male mice. To support the results obtained by the enriched-acellular assay, we studied the capacity of lead and cadmium (0.1 μM) to induce breaks in pooled genomic DNA in cells of the same organs, with negative results. Consistent with these findings, these metals do not induce DNA breaks in the plasmid pUSE amp⁺. On the whole, we did not detect direct induction of DNA strand breaks by lead acetate, cadmium chloride or a mixture of both metals, all at low non-cytotoxic concentrations. However, we found an induction of lipid peroxidation and an increase in free radical levels in the different organs of CD-1 male mice after inhalation of lead acetate (0.0068 $\mu\text{g}/\text{cc}$) or cadmium chloride (0.08 $\mu\text{g}/\text{cc}$) for 1 h, suggesting the induction of genotoxicity and carcinogenicity by indirect interactions, such as oxidative stress.

Introduction

There is clear evidence that some metals represent a carcinogenic hazard to man. Cancer epidemiology has identified several metal compounds as human carcinogens (Frisberg *et al.*, 1986, IARC, 1987, IARC, 1993). However, the epidemiological evidence for carcinogenicity caused by lead compounds in humans is still inconsistent, and for cadmium compounds is complicated by confounders (Hartwig, 1994).

Regarding their genotoxicity in bacterial and mammalian cells, the results are conflicting, as neither lead (Pb) nor cadmium (Cd) are mutagenic in bacteria, whereas in mammalian cells they produce weak mutagenic effects (Rossman *et al.*, 1992).

In this context, there are some studies that evaluated the direct and indirect genotoxic effects induced by lead and cadmium compounds in several tests. Lead is clearly not a powerful mutagen, nor is it consistently mutagenic among various test systems (Rossman and Molina, 1986, Zelikoff *et al.*, 1988; Hartwig, 1994). Leonard (1988), after reviewing the literature, concluded that Pb compounds are devoid of clastogenic properties. On the other hand, Pb has been tested and found to be capable of eliciting a positive response in an extraordinarily wide range of biological and biochemical tests, including measures of DNA synthesis, mutation and chromosomal aberrations. However, Pb is considered to be a co-mutagen or a weak genotoxic agent (Rojas *et al.*, 1999).

Cadmium scores negative in most bacterial short-term genotoxicity assays, but induces deletions in *Saccharomyces cerevisiae* (Brennan and Schiestl, 1996). Cadmium also induces DNA strand breaks, sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in plant, mammalian and human cells (Gebhart and Rossman, 1991, Form, 1994; Hartwig, 1994; Misra *et al.*, 1998; Sapiakoglu and Iscan, 1998). This metal exerts pronounced indirect genotoxic effects: it enhances the mutagenicity of UV light in several cell types. Furthermore, at low non-cytotoxic concentrations, Cd inhibits unscheduled DNA synthesis after UV irradiation and partially inhibits the removal of UV-induced DNA lesions, suggesting an interference with DNA repair processes at relevant biological concentrations (Rojas *et al.*, 1999).

Previous results from our group have shown an induction of genotoxicity in several organs of mice after chronic inhalation of both metals (Anderson *et al.*, 1998; Valverde *et al.*, 2000). Recent evidence suggests that the genotoxic effects could be the result of several mechanisms, such as the induction of cellular immunity and oxidative stress, the inhibition of DNA metabolism and repair, and the formation of DNA and/or protein cross-links (Snow, 1992).

Even though many metals are ubiquitous in our environment and some of these are designated as mutagens and carcinogens, little is known about their interactions with cellular macromolecules. Consequently, the mechanism of metal-induced carcinogenesis is still unknown, but one possible pathway may involve the interaction of metals with DNA, either directly or indirectly (Hartmann and Speit, 1994). The association of metal ions with DNA usually involves bonding by non-covalent interactions and these have been quantitated by a variety of physical techniques (Schaaper *et al.*, 1987). Lead interacts with the phosphate backbone (Tajmir-Riahi *et al.*, 1993), whereas cadmium preferentially forms interactions with nucleic acid bases over DNA phosphates (Jacobson and Turner, 1980; Kozum and Waalkes, 1990). To discriminate the mechanism by which lead and cadmium are genotoxic, the aims of this work are to evaluate the capacity of these metals to interact with acellular DNA and to induce single strand breaks. For this purpose, we employed a version of the comet assay based

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: emilio@cecyav.unam.mx

on the treatment of the liberated DNA present in the agarose gels after lysis (Kasamatsu *et al.*, 1996; Tice *et al.*, 2000). Considering that DNA and not cells are exposed, an alteration in DNA migration under these conditions indicates the ability of the test substances, in this case Pb and Cd, to induce DNA damage independent of cytotoxicity.

Materials and methods

Chemical reagents

Normal agarose, low melting point agarose (LMPA), ethidium bromide, Tris, Na₂EDTA, dimethyl sulfoxide (DMSO), Triton X-100, proteinase K and albumin were obtained from Sigma (St Louis, MO), NaOH, lead acetate and cadmium chloride from Merck (Germany); NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂HP0₄, absolute ethanol and acetic acid from Baker (Mex), loading buffer from BioRad (KA); Trpan blue, DNazol, 1 kb DNA extension ladder from Gibco-BRL, NY and pUSE amp+ plasmid, containing the gene for IκB (7.3 kb), from Upstate Technology, NY.

Animals

Fifteen CD-1 male mice (from the Biomedical Research Institute Vivarium, UNAM, México), 45–63 days old and weighing 30–35 g, were housed in hanging plastic cages under controlled lighting conditions (12 h light/dark regime), relative humidity 50 ± 5% and temperature 17 ± 2°C and fed purine rat chow and water *ad libitum*.

Treatments

Inhalations were performed in an acrylic box (50×30×20.98 cm) connected to an ultra-nebulizer (Ultra-Neb 99; De Vilbiss) with a flux of 10 l/min. For the exposure protocol, lead acetate and cadmium chloride concentrations were according to Fortoul *et al.* (1999). Briefly, nine animals, three from each group (Pb, Cd and Pb/Cd) were placed in an acrylic box and lead acetate (0.0068 µg/cc) and cadmium chloride (0.08 µg/cc) inhalations were performed for 60 min. The control animals inhaled deionized water at separate time. After inhalation, the animals were killed by cervical dislocation. The organs obtained (lung, liver and kidney) were homogenized in buffer containing 250 mM sucrose and 10 mM Tris-HCl (pH 7.4). Homogenates were used to determine lipid peroxidation and production of free radicals, procedures for which are described below.

Cell suspensions

Animals were killed by cervical dislocation, followed immediately by removal of liver, kidney and lungs into cold saline solution (0.9% NaCl). The tissues were then washed twice with cold saline solution and placed in cold PBS pH 7.4 and minced with the help of cold scissors into 1 mm³ pieces. Cell suspensions were then kept at 4°C until a sediment was observed.

The viability of the cell suspensions was determined using the trypan blue exclusion technique.

Acellular assay

An appropriate number of cells were obtained in 30 µl of cell suspension and mixed with 75 µl 0.5% LMPA. Cells and LMPA at 0.36% final concentration were loaded onto a microscope slide prelayered with 200 µl 0.5% normal agarose and allowed to gel at 4°C for 5 min. Then the slides were immersed in lysis solution at 4°C for 1 h [2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, fresh 1% Triton X 100 and 10% DMSO (pH 7)]. On these occasions when proteinase K

(PK) was added, warm freshly made lysis solution (as before, pH 7) was prepared, when the lysis solution reached 37°C, 50 µl 20 mg/ml PK solution was added to a final concentration of 0.02 mg/ml. Slides were then incubated in this lysis solution for a further 1 h. In both cases, slides were washed twice in PBS pH 7.4 for 5 min each time in order to eliminate detergent.

For the treatment, the slides were immersed in 50 ml PBS pH 7.4 with or without test compounds (0.1 µM lead acetate, 0.1 µM cadmium chloride, or a mixture of both at the same concentration) for 10 min, a time sufficient for an interaction between the metals and acellular DNA. At the end of the treatment, slides were washed twice with PBS pH 7.4 and immediately placed in a horizontal electrophoresis chamber with running buffer (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH >13). The slides remained for 10 min in the electrophoresis buffer at 4°C to allow the DNA to unwind. Electrophoresis was performed for 10 min at 0.8 V/cm, and all technical steps were conducted using very dim indirect light. We previously determined that 10 min was the optimal electrophoresis time to obtain similar basal damage in all mouse organs employed (Valverde *et al.*, 2000). After electrophoresis, the slides were gently removed and rinsed with neutralization buffer (0.4 M Tris-base, pH 7.5) at room temperature (15 min). The slides were dehydrated with absolute ethanol (15 min), after which they were air-dried. Ethidium bromide (75 µl of a 20 µg/ml solution) was added to each slide and a coverslip was placed on the gel. Individual cells were visualized at 200× magnification on an Olympus BX-60 microscope with fluorescence attachments (excitation filter 515–560 nm and barrier filter 590 nm) and the extent of migration (tail length value) was measured with a scaled ocular. For identifying tail image, the head of the comet was defined as the circular region more brilliant in the image. To evaluate DNA migration, 100 cells/tissue/animal were scored for each condition. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney *U*-test, which considered medians for analysis and the unit of the exposure and analysis used is the animal not the cells. Significance was at *P* < 0.05 (Kuk, 1999). All experiments were conducted in triplicate.

DNA isolation of tissues and DNA fragmentation analysis

During isolation, a small amount (5 mg) of soft tissue (lung, kidney and liver of CD-1 mice) was lysed or homogenized in DNazol reagent and the genomic DNA was precipitated from the lysate with ethanol. Following an ethanol wash, DNA was solubilized in water. All experiments were performed in the dark. The standard reaction mixture contained 3 µg genomic DNA, 0.1 µM lead acetate or 0.1 µM cadmium chloride in TAE buffer (40 mM Tris, 1.14 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8, containing 2 µl 10 mg/ml ethidium bromide). The reaction mixture, final volume 20 µl, was incubated for up to 10 min at room temperature in polystyrene tubes. Aliquots of 18 µl were taken to analyse for DNA strand breaks, the aliquots were mixed with 2 µl loading buffer and loaded onto a 1% agarose TAE gel (pH 8). Electrophoresis was performed at 10 V/cm in TAE buffer pH 8, for the neutral conditions, whereas alkaline conditions consisted of TAE buffer at pH 12 for the gel and electrophoresis buffer. The DNA was visualized on 312 UV-transilluminator and photographed using a Polaroid camera.

pDNA fragmentation

The assay for pDNA strand breaks was performed by exposing supercoiled plasmid DNA to a combination of lead acetate,

cadmium chloride, or a mixture of both. The experiments were performed in the dark. The standard reaction mixture contained 1 µg/µl of the plasmid pUSE amp+, which contains the IκB gene (7.3 kb), 0.1 µM lead acetate, or 0.1 µM cadmium chloride, or a mixture of both (0.1 µM each) in TAE buffer, pH 8.0. Reactions, with a final volume of 15 µl, were incubated for up to 10 and 30 min at room temperature in polystyrene tubes. Aliquots of 10 µl were taken to analyse the plasmid for the presence of DNA strand breaks. The aliquots were mixed with 2 µl loading buffer and loaded onto a 1.5% TAE agarose gel (pH 8, containing 2 µl 10 mg/ml ethidium bromide). Electrophoresis was performed at 10 V/cm in TAE buffer. The DNA was visualized on 312 UV-transilluminator and photographed using a Polaroid camera.

Lipid peroxidation and free radical measurement

We employed the method of Buege and Aust (1978). Malondialdehyde, formed from the breakdown of polyunsaturated fatty acids, serves as a convenient index for determining the extent of the peroxidation reaction. Malondialdehyde has been identified as the product of lipid peroxidation that reacts with thiobarbituric acid to give a red species absorbing at 532 nm.

Production of reactive oxygen species (ROS)

ROS induction was determined according to Cadenas and Sies (1984) using luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione). Luminol is employed to amplify chemiluminescence signals, this compound is oxidized by several oxygen intermediates to an electronically excited aminophthalate anion, that upon relaxation to the singlet ground state, emits photons. Emission was measured using a liquid scintillation counter at 450 nm.

Statistical analysis

All statistical analysis was performed with GraphPAD InStat software ver. 1.14, USA. The Mann-Whitney *U*-test was used to determine statistical differences between treatments for each organ in the acellular assay. For production of free radicals and lipid peroxidation, ANOVA *t*-test was used to determine statistical differences between treatments for each organ, values of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

Cell suspension viability, using the classical trypan blue exclusion technique, was greater than 80% in all organs immediately after killing.

DNA damage induced by lead acetate (0.01, 0.1 and 1 µM), cadmium chloride (0.01, 0.1 and 1 µM) or a mixture of both (0.1 µM lead acetate plus 0.1 µM cadmium chloride), using the acellular assay showed a heterogeneous response between lung, liver and kidney (Figure 1). We observed induction of DNA damage in cells of all organs but without an apparent dose-response. DNA damage induced by the lead acetate/cadmium chloride mixture showed a synergistic effect in lung and kidney, but not in liver (Figure 1).

When we employed the acellular assay, adding PK, we did not find induction of DNA single-strand breaks between treatments in the same organs (Figure 2). Likewise, we observed a lack of synergistic effect under this condition.

In light of the conflicting results, we decided to treat genomic DNA, obtained from cells of each organ (Figure 3), with the same metal concentration (0.1 µM) for 10 min. We did not detect an increase on DNA fragmentation either with Pb or Cd using either neutral or alkaline conditions (Figure 4).

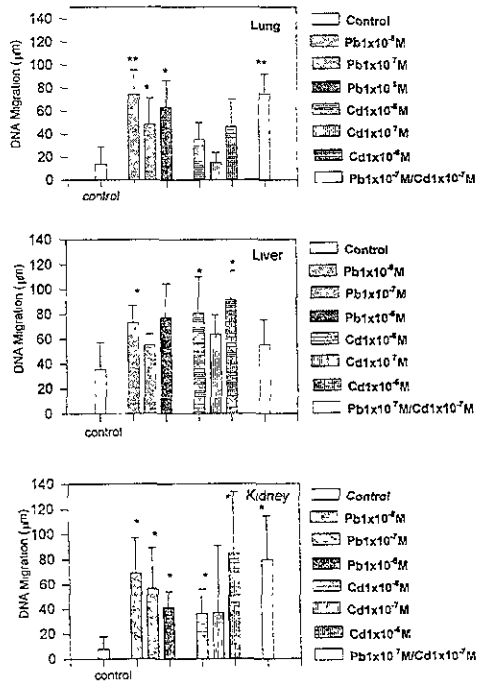


Fig. 1. Effect of lead acetate, cadmium chloride (0.01, 0.1, 1.0 µM) or a mixture of both (0.1 µM) on DNA damage measured using the acellular assay in cells of the lung, liver and kidney from CD-1 male mice. Each bar represents the median \pm SD of three experiments, each done in duplicate. Statistical significance was determined by Mann-Whitney *U*-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

To corroborate this finding, a smaller fragment of DNA was employed corresponding to the plasmid pUSE amp+, which contains the IκB gene (7.3 kb). Using this plasmid as a target of metal treatments, we did not find any induction of pDNA fragmentation, even if the time of treatment was increased up to 30 min (Figures 5 and 6).

With respect to the evaluation of indirect effects of metals, we determined the production of free radicals by luminol-dependent chemiluminescence. These data (Table I) showed that inhalation of lead acetate (0.0068 µg/cc) produced higher levels of free radicals than cadmium chloride inhalation (0.08 µg/cc) in different organs of CD-1 male mice. The greatest effect was in liver, whereas kidney showed a negative response.

Likewise, we found that inhalation of lead acetate (0.0068 µg/cc) induced higher lipid peroxidation levels than cadmium chloride inhalation (0.08 µg/cc) only in cells of the lung, however, in liver cells we detected the same induction of lipid peroxidation levels for both metals (Table II). In contrast, data in Table I show levels of lipid peroxidation were higher in the lung, whereas in kidney induction was smaller (Table II).

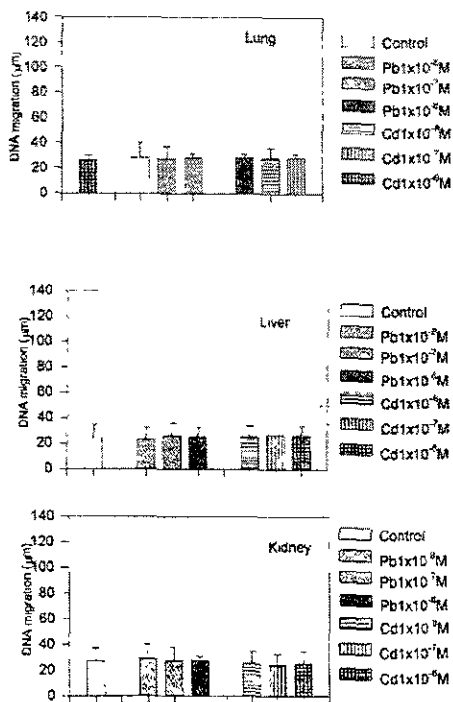


Fig. 2. Effect of lead acetate (0.1 µM), cadmium chloride (0.1 µM) or a mixture of both (0.1 µM) on DNA damage measured using the acellular assay with PK in cells of the lung, liver and kidney from CD-1 male mice. Each bar represents the median ± SD of three experiments, each done in duplicate. Statistical significance was determined by Mann-Whitney *u*-test.

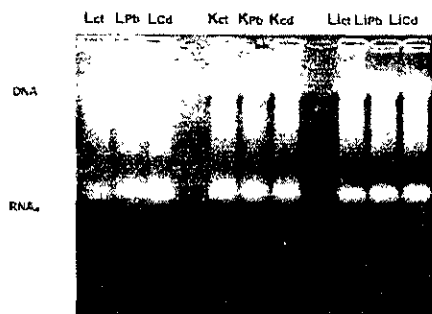


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of genomic DNAs from cells of the lung, kidney and liver (CD-1 male mice) treated with metals under neutral conditions. Lanes Lct, LPb and LCd correspond to lung non-treated (control), treated with 0.1 µM lead acetate and 0.1 µM cadmium chloride respectively. Lanes Ket, KPb and KCd correspond to kidney non-treated (control), treated with 0.1 µM lead acetate and 0.1 µM cadmium chloride, respectively. Lanes Lct, LPb and LCd correspond to liver non-treated (control), treated with 0.1 µM lead acetate and 0.1 µM cadmium chloride respectively. RNA_g, degraded RNA.

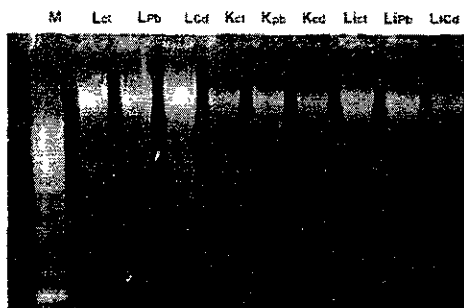


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of genomic DNAs from cells of the lung, kidney and liver (CD-1 male mice) treated with metals under alkaline conditions. Lane M corresponds to molecular weight marker of 1 kb ladder, lanes Lct, LPb and LCd corresponds to lung non-treated (control), treated with 0.1 µM lead acetate and 0.1 µM cadmium chloride, respectively. Lanes Ket, KPb and KCd correspond to kidney non-treated (control), treated with 0.1 µM lead acetate and 0.1 µM cadmium chloride, respectively. Lanes Lct, LPb and LCd correspond to liver non-treated (control), treated with 0.1 µM lead acetate and 0.1 µM cadmium chloride, respectively.

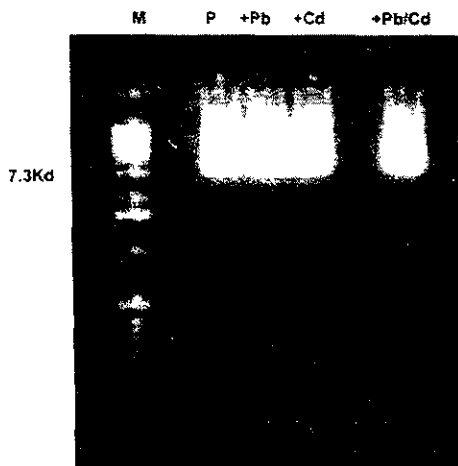


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA (pUSE amp⁺) containing the IxB gene (7.3 kb) treated with metals for 10 min. Lane M corresponds to molecular weight marker of 1 kb ladder, lane P corresponds to supercoiling plasmid pUSE amp⁺ (containing the gene IxB) (7.3 kb) non-treated (control), lane +Pb corresponds to the plasmid treated with 0.1 µM lead acetate, lane +Cd corresponds to plasmid treated with 0.1 µM cadmium chloride and lane +PbCd is the same plasmid treated with both 0.1 µM cadmium chloride plus 0.1 µM lead acetate.

Discussion

Even though the toxic effects of lead and cadmium compounds have been studied over many years, inconsistent results have been published about their mutagenic, clastogenic and carcinogenic properties. Leonard and Bernard (1993) proposed that the response obtained was dependent on the ability of the metal to penetrate the cell and to interact with DNA. Others suggest that the mechanism of metal-induced carcinogenesis

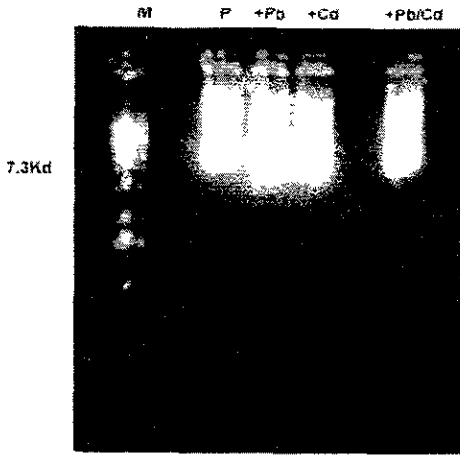


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA (pUSE amp) containing the *lacZ* gene (7.3 kb) treated with metals for 30 min. Lane M corresponds to molecular weight marker of 1 kb ladder, lane P corresponds to supercoiled plasmid pUSE amp⁺ (containing the gene *lacZ*) (7.3 kb) non-treated (control), lane +Pb corresponds to the plasmid treated with 0.1 μ M lead acetate, lane +Cd corresponds to plasmid treated with 0.1 μ M cadmium chloride, and lane +Pb/Cd is the same plasmid treated with both 0.1 μ M cadmium chloride plus 0.1 μ M lead acetate.

Table I. Rate of chemiluminescence in different organs from CD-1 male mice inhaled with lead acetate (0.0068 μ g/L) and cadmium chloride (0.08 μ g/L).

Organ	Chemiluminescence (cpm $\times 10^3$ /mg protein)		
	Control	Lead acetate	Cadmium chloride
Lung	1.60 \pm 0.1	3.20 \pm 0.2**	2.20 \pm 0.1**
Liver	0.16 \pm 0.3	14.6 \pm 0.1***	6.50 \pm 0.3***
Kidney	2.80 \pm 0.2	5.32 \pm 0.1	3.16 \pm 0.1

Values are expressed as mean \pm SE of three individual determinations per group and organ. ** P < 0.01, *** P < 0.001.

Table II. Comparison of lipid peroxidation in different organs from CD-1 male mice inhaled with lead acetate (0.0068 μ g/L) and cadmium chloride (0.08 μ g/L).

Organ	nmol MDA/mg protein		
	Control	Lead acetate	Cadmium chloride
Lung	5.52 \pm 0.14	46.72 \pm 0.24***	22.89 \pm 0.15***
Liver	5.30 \pm 0.20	10.70 \pm 0.18*	11.11 \pm 0.19*
Kidney	10.04 \pm 0.14	11.65 \pm 0.15	10.25 \pm 2.14

Values are expressed as mean \pm SE of three individual determinations. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

is still unknown, but one possible pathway may involve the interaction of metals with DNA, either directly or indirectly (Hartmann and Speit, 1994; Hwua and Yang, 1998). The aim of this work was to explore the ability of lead and cadmium to interact directly with DNA, and to induce DNA single-strand breaks as a possible mechanism for the induction of

genotoxicity observed previously (Valverde *et al.*, 2000). For this purpose, we employed the acellular assay previously described by Kasamatsu (1996) to detect the induction of DNA damage obtained after lysing cells from several organs of the mouse.

Under these conditions, we observed a heterogeneous response to different concentrations of metals (0.01, 0.1, 1 μ M) between DNA from cells of the lung, liver and kidney (Figure 1). These results were surprising because we expected the same level of DNA damage among different organs using acellular DNA. These results suggest the possible presence of proteins associated with DNA that could be modulating the metal genotoxic response, as reported by others (Scicchitano and Pegg, 1987; Tajmou-Riahi *et al.*, 1993; Ovelonne *et al.*, 1995; Dally and Hartwig, 1997). Thus, we modified the lysis conditions by preparing a new lysis solution containing proteinase K under optimal conditions (pH 7, 37°C for 1 h). Proteinase K has been reported as a powerful protease (Merk and Speit, 1998; Singh *et al.*, 1989; Tice *et al.*, 2000).

Using this protocol, we decided to test lead acetate and cadmium chloride at concentrations of 0.01, 0.1 and 1.0 μ M, because in this range has been included the dose proposed as the permissible exposure limit (OSHA, 1981). These experiments did not show an induction of DNA damage by either metal in acellular DNA from cells of the lung, liver and kidney of CD-1 mice. This supports our assumption that the lysis solution is unable to obtain pure DNA, because when we added PK in the lysis solution, it was possible to observe a homogeneous response. In spite of this, we did not find induction of DNA damage. Our results show that lead acetate, cadmium chloride or a mixture of the two did not have the capacity to interact directly with DNA and produce single strand breaks.

These results are supported by our assays of DNA fragmentation of genomic DNA from cells of the lung, liver and kidney, performed in both neutral and alkaline conditions, because in both cases we did not detect fragmentation induced by Pb and Cd at low non-cytotoxic concentrations (0.1 μ M). Likewise, pDNA fragmentation assays showed a negative response by the same treatments and the mixture.

These results disagree with the report of Yang *et al.* (1999), who found an induction of DNA strand breaks by lead acetate using a plasmid relaxation assay. The differences between this study and our own results could be explained by the concentration employed. Yang and co-workers used 10 mM lead acetate whereas our tested concentration was 0.1 μ M [our concentration is equimolar equivalent to the permissible exposure limit approved by the OSHA (1981)]. This is in agreement with Hartwig (1998), who proposed that direct genotoxic effects induced by metals are rather weak and/or restricted to high concentrations.

Our results suggest that these metals did not interact directly with DNA. These results led us to two different possible explanations of the genotoxicity observed by inhalation of these metals, (i) the possibility of DNA-associated protein-metal interactions, or (ii) the induction of an indirect mechanism, such as oxidative stress.

To help resolve these possibilities we explored the induction of ROS and lipid peroxidation levels after inhalation of these metals (Tables I and II). We observed an induction of this kind of indirect effect after a single inhalation of lead acetate and cadmium chloride only in cells of the liver and lung. The absence of a response in kidney cells could be explained by a

possible induction of pro-inflammatory cytokines, such as TNF α or interleukin 1 ($IL-1$), modulating the induction of oxidative stress (Oberdöster *et al.*, 1994). However, another explanation is that a single inhalation of these metals did not have the capacity to induce an oxidative response. Our results are in agreement with Snyder (1988), Roy and Rossman (1992), Snow (1992), Kawanishi *et al.* (1994), Sarkar *et al.* (1998) and Yang *et al.* (1999), suggesting the implication of an oxidative response. In addition, other indirect mechanisms could be considered as Dally and Hartwig (1997) reported that cadmium at a concentration of 10 μM induced DNA strand breaks but without oxidative DNA base modification. Further studies are needed to define the role and pathway of this ROS to exert the genotoxic effects observed by the inhalation of these metals at low concentrations.

Acknowledgements

This study was partially supported by CONACYT project 3180P-M M V was the recipient of a fellowship from CONACYT and DGEF.

References

Anderson,D. and Pleva,M.J (1998) The International Comet Assay Workshop *Mutagenesis*, **13**, 67-73.
 Brennan,R.J and Schiestl,R.H (1996) Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast *Mutat Res*, **356**, 171-178
 Buege,J.A. and Aust,S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation *Methods Enzymol*, **52**, 302-310.
 Cadenas,E. and Sies,H (1984) Low-level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems *Methods Enzymol*, **105**, 221-231
 Dally,H and Hartwig,A (1997) Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells *Carcinogenesis*, **18**, 1021-1026
 Forn,A (1994) Comparison of chromosome aberrations and micronuclei in testing genotoxicity in humans *Toxicol Lett*, **72**, 185-190
 Fortoul,T.I., Salgado,R.C., Moncada,S.G., Sanchez,I.G., Lopez,I.E., Espigol,G., Calderon,N.L. and Saldívar,L. (1999) Ultrastructural findings in the nonciliated broncholar cells (NCBC) after subacute inhalation of lead acetate. *Acta Vet. Brno*, **68**, 51-55
 Friberg,L., Kjellström,T. and Nordberg,G.F (1986) Cadmium in Friberg,L., Nordberg,G.F and Vouk,V (eds) *Handbook on the Toxicology of Metals*, 2nd Edn Elsevier Science, Amsterdam, pp 130-184
 Gebhart,E. and Rossman,T.G (1991) *Mutagenicity, Carcinogenicity, Teratogenicity* VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp 617-640
 Harman,A. and Speit,G (1994) Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test *Environ Mol Mutagen*, **23**, 299-305.
 Hartwig,A (1994) Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ Health Perspect*, **102** (suppl 3) 45-50.
 Hartwig,A (1998) Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition *Toxicol Lett*, **102-103**, 235-239
 Hwua,Y.-S and Yang,J.-L (1995) Effect of 3-aminotriazole on anchorage independence and mutagenicity in cadmium- and lead-treated diploid human fibroblasts *Carcinogenesis*, **19**, 881-888
 IARC (1987) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7. IARC, Lyon
 IARC (1993) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry IARC Scientific Publications, No 58, IARC, Lyon
 Jacobson,X.B. and Turner,J.E (1980) The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids *Toxicology*, **16**, 1-37
 Kasamatsu,T., Kohda,K. and Kawazoe,Y (1996) Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and subcellular systems using the comet assay *Mutat Res*, **369**, 1-6
 Kawanishi,S., Inoue,S. and Yamamoto,K (1994) Active oxygen species in DNA damage induced by carcinogenic metal compounds *Environ Health Perspect*, **102** (suppl 3), 17-20
 Kirk,R.T (1999) *Statistics: An Introduction*, 4th Edn Harcourt Brace College Publishers, Orlando, FL

Kozumi,T and Waalkes,M.P (1990) Effects of zinc on the binding of cadmium to DNA: assessment with testicular interstitial cell and calf thymus DNAs *Toxicol. In Vitro*, **4**, 51-55
 Leonard,A (1988) Mechanisms in metal genotoxicity: the significance of *in vitro* approaches. *Mutat. Res*, **198**, 321-326
 Leonard,A. and Bernard,A (1993) Biomonitoring exposure to metal compounds with carcinogenic properties *Environ. Health Perspect.* **101** (suppl 3), 127-133
 Merk,O and Speit,G (1998) Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis *Environ. Mol Mutagen*, **32**, 260-268
 Misra,R.R., Smith,G.T and Waalkes,M.P (1998) Evolution of the direct genotoxic potential of cadmium in four different rodent cell lines *Toxicology*, **126**, 103-114
 OSHA (1981) OSHA Occupational Safety and Health Standards Subpart 2, Code of Federal Regulations 29 (Part 1910.1000), Washington, DC. pp 673-679
 Oberdöster,G., Cherian,M.G. and Baggs,R.B (1994) Correlation between cadmium-induced pulmonary carcinogenicity, metallothionein expression and inflammatory processes: a species comparison *Environ Health Perspect.* **102** (suppl 3), 257-263
 Ovelgonne,J.H., Souren,J.E.M., Wiegant,F.A.C. and Van Wijk,R (1995) Relationship between cadmium-induced expression of heat shock genes, inhibition of protein synthesis and cell death *Toxicology*, **99**, 19-30
 Rojas,E., Herrera,L.A., Pomier,L.A. and Ostrosky-Wegman,P (1999) Are metals dietary carcinogens? *Mutat Res.*, **443**, 157-181
 Rossman,T.G. and Molina,M. (1986) The genetic toxicology of metal compounds II Enhancement of ultraviolet light-induced mutagenesis in *E. coli* WP2 *Environ. Mutagen.*, **8**, 263-271
 Rossman,T.G., Roy,N.K. and Lin,W. (1992) Is cadmium genotoxic? In Nordberg,G.F., Alessio,L. and Herber,R.F.M (eds) *Cadmium in the Human Environment: Toxicity and Carcinogenesis*. IARC, Lyon
 Roy,N.K. and Rossman,T.G. (1992) Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds *Mutat Res*, **298**, 97-103
 Sarkar,S., Yadav,P. and Bhatnagar,D. (1998) Lipid peroxidative damage on cadmium exposure and alterations in antioxidant system in rat erythrocytes: A study with relation to time *BioMetals*, **11**, 155-157
 Secciantino,D.A. and Pegg,A.E (1987) Inhibition of O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase by metals *Mutat Res*, **192**, 207-210
 Singh,N.P., Danner,D.B., Tice,R.R., McCoy,M.T., Collins,G.D. and Schneider,E.L (1989) Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm *Exp Cell Res*, **184**, 461-470.
 Snow,E.T. (1992) Metal carcinogenic mechanisms implications *Pharmacol Ther*, **53**, 31-65
 Snyder,R.D. (1988) Role of active oxygen species in metal-induced DNA strand breakage in human diploid fibroblasts *Mutat Res*, **193**, 237-246
 Splakoglu,U. and Iscan,M (1998) Sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated *in vitro* with cadmium in G and S phase of their cell cycle *Mutat Res*, **412**, 109-114
 Tahir-Rishi,H.A., Naoum,M. and Ahmad,R (1993) The effects of Cu²⁺ and Pb²⁺ on the solution structure of calf thymus DNA: DNA condensation and denaturation studied by Fourier Transform IR difference spectroscopy. *Biopolymers*, **33**, 1819-1827
 Tice,R.R., Agurell,L., Anderson,D., Burlinson,B., Hartmann,A., Kobayashi,H., Miyamae,Y., Rojas,L., Ryu,J.-C. and Sasaku,Y.I (2000) Single cell gel/comet assay guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing *Environ Mol Mutagen*, **35**, 206-221
 Valverde,M., Fortoul,T.I., Diaz-Barriga,F., Mejia,J. and Rojas,L (2000) Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice *Mutagenesis*, **15**, 109-114.
 Yang,J.-L., Wang,L.-Ch., Chang,Ch.-Y. and Liu,T.-Y (1999) Singlet oxygen is the major species participating in the induction of DNA strand breakage and 8-hydroxydeoxyguanosine adduct by lead acetate *Environ Mol Mutagen*, **33**, 194-201
 Zelikoff,J.T., Li,J.H., Hartwig,A., Wang,W.W., Costa,M. and Rossman,T.G (1988) Genotoxic toxicology of lead compounds *Carcinogenesis*, **9**, 1727-1732

Received on July 28, 2000, revised on December 22, 2000 accepted on April 1, 2001

C) Presencia de especies reactivas de oxígeno.

I. Niveles de peroxidación en lípidos de membrana.

Para la evaluación de éste parámetro se realizó el protocolo de exposición mostrado en la tabla 3, el cual consistió en emplear 42 ratones machos CD-1 de 30-35g (adultos de 9 semanas) los cuales se sometieron a la inhalación de acetato de plomo o cloruro de cadmio por 60 minutos, 2 veces por semana durante 4 semanas. Los animales inhalaron una solución de acetato de plomo 0.001 M o cloruro de cadmio 0.006 M. Un grupo de 10 ratones se empleó como control, inhalando únicamente el vehículo que se empleó para hacer ambas soluciones (agua bidestilada y desionizada).

La inhalación se realizó en una caja transparente de 314.7 cm³ a la cual se conectó un ultranebulizador (Ultra Neb 99 DeVilbis), con un flujo de 10l/minuto, el cual genera partículas de 0.5 µm de diámetro. La concentración de acetato de plomo inhalada por los animales en el microambiente experimental fue de 0.0068µg/cc, mientras que la correspondiente para el cloruro de cadmio fue de 0.08µg/cc. Después de cada inhalación los animales se colocaron en sus respectivas cajas, dándoles libre acceso al agua y alimento.

Los sacrificios se realizaron mediante dislocación cervical inmediatamente después de una inhalación única para el tratamiento denominado Agudo (1) y al paso de cuatro semanas de inhalaciones para el tratamiento Subcrónico (2). Mientras que para el tratamiento Subcrónico (3), los sacrificios se realizarón 24 horas después de la última inhalación (Tabla 3). Se disecaron tres órganos en todos los casos: pulmón, hígado y riñón, los cuales inmediatamente después se colocaron dentro de bolsas individuales, rotulándose por tipo de exposición y órgano para ser sumergidas en nitrógeno líquido y almacenándose a -70°C.

Tabla 3. Esquema de Inhalaciones realizado según el tipo de tratamiento para determinar la peroxidación de lípidos de membrana.

Tratamiento	Agudo(1)	Subcrónico (2)	Subcrónico (3)
# de inhalaciones por semana	1	2 (durante 4 semanas)	2 (durante 4 semanas)
# de animales control	4	2	4
# de animales tratados con acetato de plomo	6	4	6
# de animales tratados con cloruro de cadmio	6	4	6
Sacrificio	Inmediatamente	Inmediatamente	24 horas después

Una vez obtenidos los órganos de interés (pulmón, hígado y riñón), se realizó un fraccionamiento celular, para determinar los niveles de peroxidación de lípidos de membrana en homogenado total, citosol y núcleo de cada órgano según el siguiente protocolo: Los órganos de interés (pulmón, hígado y riñón) previamente congelados se colocaron en solución A (Sacarosa 225mM; Tris 10mM; EGTA 0.3mM, Albúmina 0.2%, pH 7.4 enriquecido con mezcla de inhibidores de proteasas), donde fueron cortados en trocitos con la ayuda de un bisturí para posteriormente homogenizarlos a 1000 rpm, el tiempo necesario para obtener una suspensión celular homogénea. Los pasos subsiguientes se muestran esquemáticamente.

FRACCIONAMIENTO CELULAR



Una vez obtenidas las fracciones celulares se cuantificó la proteína total mediante el método de Lowry (1951) y se procedió a evaluar la presencia de especies reactivas de oxígeno.

En este trabajo empleamos los niveles de malondialdehído (MDA) como indicador indirecto de la presencia de radicales libres, ya que el MDA es un producto de la peroxidación de lípidos de membrana (Figura 3).

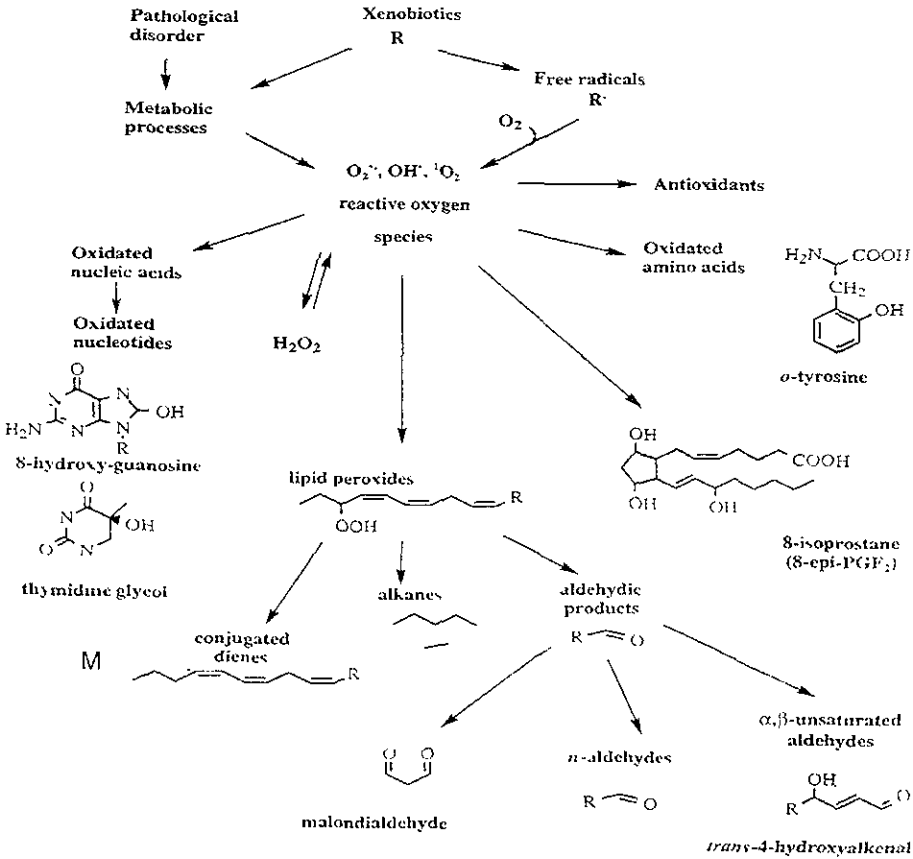


Figura 3.- Radicales libres generados por xenobióticos y los productos de las reacciones entre éstos y diferentes macromoléculas celulares como DNA, membranas celulares o proteínas (Tomado de Zwart et al., 1999)

El protocolo empleado para determinar los niveles de MDA fue el propuesto por Buege y Aust en 1978, el cual brevemente consiste en:

- 1.- Incubar los tubos a emplear por cada muestra con 500 μ l de buffer Tris (150mM, pH 7.4) durante 5 minutos a 37°C.
- 2.- A partir de la fracción celular de interés (homogenado, citosol, núcleo), tomar el volumen equivalente a 1mg de proteína total.
- 3.- Incubar las muestras en el buffer Tris (150mM, pH 7.4) durante 30 minutos a 37°C.
- 4.- Tomar 400 μ l de la mezcla de incubación y añadir: 1.5 ml de ácido acético al 20% (pH3.5), 1.5 ml de TBA (0.8%) y 1 ml de agua.
- 5.- Calentar a ebullición durante 45 minutos, tapando los tubos con canicas para evitar la evaporación de las muestras.
- 6.- Enfriar los tubos y añadir 1 ml de cloruro de potasio (1.2%).
- 7.- Añadir 5 ml de solución piridina-butanol (1:15) y agitar.
- 8.- Tomar de la fracción superior 3.5 ml y centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos.
- 9.- Leer en espectrofotómetro a 532 nm por duplicado.

Resultados

Lipoperoxidación en Pulmón

Los resultados obtenidos para éste órgano, el cual tiene el primer contacto con los metales, muestran que los niveles de peroxidación lipídica fueron diferentes en cada una de las fracciones celulares (Gráfica 1a, b, c). En cuanto al comportamiento que presentó el núcleo en el tratamiento agudo con ambos metales es posible apreciar que los niveles de MDA no tuvieron cambios significativos, no obstante, el tratamiento subcrónico (2) mostró un decremento de los niveles de MDA, estadísticamente significativo con acetato de plomo. El tratamiento subcrónico (3) solamente mostró

resultados significativos estadísticamente con cloruro de cadmio, manifestándose como un incremento de dichos niveles (Gráfica 1a).

En cuanto a los homogenados, el único tratamiento que mostró efecto fue el tratamiento agudo con ambos metales, sin embargo, es importante aclarar que el cadmio produjo un incremento y el plomo un decremento de los niveles de MDA (Gráfica 1b).

En la fracción celular correspondiente al citosol es posible apreciar que en el tratamiento agudo con ambos metales indujo un incremento estadísticamente significativo en los niveles de MDA. En el tratamiento subcrónico (2), el plomo no indujo ningún tipo de cambio, mientras que el cadmio produjo un incremento de la cantidad de MDA y el tratamiento subcrónico (3) por parte del plomo tampoco muestra cambios, mientras que el tratamiento con Cd mostró un decremento de los niveles de radicales libres (Gráfica 1c).

Lipoperoxidación en Hígado

De igual manera que en el pulmón, el análisis de la inducción de peroxidación de lípidos de membrana se realizó por fracción celular.

Núcleo: en esta fracción no hay efecto alguno por el tratamiento agudo, mientras que el tratamiento subcrónico(2) de manera contraria a lo observado en pulmón, se aprecia un incremento de los niveles de MDA que son estadísticamente significativos por el tratamiento con acetato de plomo, no habiendo cambios por efecto del cadmio tanto en el tratamiento subcrónico (2) como en el (3), sin embargo, el plomo en el tratamiento subcrónico (3) mostró un decremento significativo en los niveles de peroxidación de lípidos de membrana (Gráfica 2a)

Homogenado: en esta fracción celular fue en la cual el cloruro cadmio, en todos los protocolos experimentales empleados (agudo (1), subcrónico (2) y subcrónico (3)), mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de los niveles de MDA. El tratamiento con acetato de plomo indujo una reducción en los niveles de MDA, que fue estadísticamente significativa para el tratamiento agudo y en el subcrónico (2); mientras que para el tratamiento subcrónico (3) no se observó cambio alguno con respecto al control (Gráfica 2b) Con respecto a los tratamientos con cloruro

de cadmio, es posible apreciar que en todos los casos se observó un incremento estadísticamente significativo (Gráfica 2b).

Citosol: el tratamiento agudo en esta fracción celular muestra un incremento de los niveles de radicales libres por efecto del cloruro de cadmio, mientras que el tratamiento con el acetato de plomo permaneció igual al del control. El tratamiento subcrónico (2) no muestra cambios por el tratamiento con cadmio, pero sí una ligera disminución estadísticamente significativa de los niveles de MDA por efecto del acetato de plomo. El tratamiento subcrónico (3), muestra un incremento de los niveles de MDA por efecto del cadmio, sin embargo el acetato de plomo no muestra inducción alguna (Gráfica 2c).

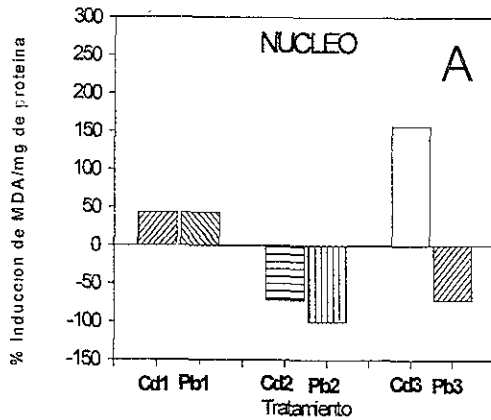
Lipoperoxidación en Riñón

En la fracción nuclear el tratamiento agudo no produjo efectos estadísticamente significativos por parte de ambos metales. El tratamiento subcrónico (2) con ambos metales fue el único que presentó incrementos significativos en los niveles de peroxidación de lípidos de membrana, puesto que en el tratamiento subcrónico (3) los niveles de MDA no presentaron diferencias estadísticas significativas (Gráfica 3a).

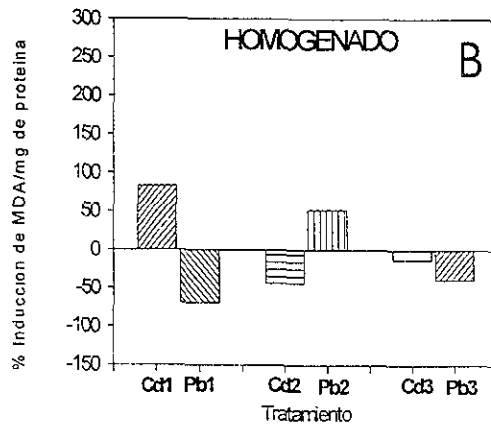
Homogenado: En esta fracción es posible apreciar que únicamente el tratamiento subcrónico (2) con acetato de plomo, indujo un incremento en los niveles de MDA que fue estadísticamente significativo; todos los demás tratamientos mostraron niveles de peroxidación de lípidos de membrana estadísticamente iguales a los del control, es decir, no hubo efecto (Gráfica 3b).

Citosol: Esta fracción celular fue la que mostró más efecto en el riñón, el tratamiento agudo con cloruro de cadmio no tuvo efecto significativo estadísticamente, mientras que el acetato de plomo produjo un incremento significativo en los niveles de MDA; con respecto a los tratamientos subcrónico (2) y (3) tanto el cloruro de cadmio como el acetato de plomo indujeron un aumento estadísticamente significativo de la peroxidación de lípidos de membrana (Gráfica 3c)

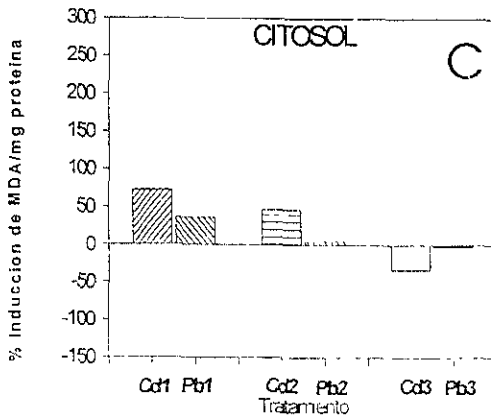
Gráfica 1. Niveles de radicales libres (nmoIMDA/mg prot) inducidos por la exposición vía inhalatoria a plomo y cadmio en diferentes fracciones celulares de pulmón.



NUCLEO	nmolesMDA/mg prot± DE
Control	0.337 ± 0.068
Cadmio1	0.481 ± 0.135
Plomo1	0.481 ± 0.135
Cadmio2	0.096 ± 0.135
Plomo2	0.000 ± 0.0001 *
Cadmio3	0.865 ± 0.135 *
Plomo3	0.096 ± 0.135

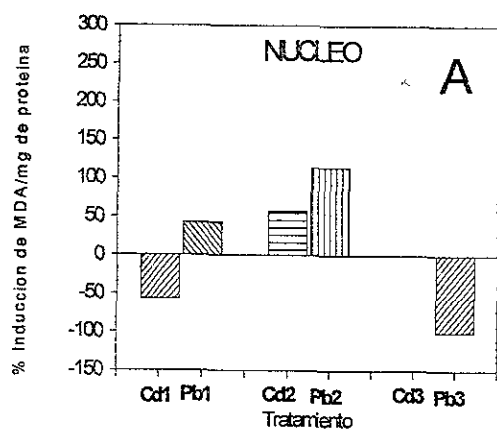


HOMOGENADO	nmolesMDA/mg prot± DE
Control	2.210 ± 0.356
Cadmio1	4.038 ± 0.0001 *
Plomo1	0.673 ± 0.135 *
Cadmio2	1.250 ± 0.577
Plomo2	3.365 ± 0.577
Cadmio3	1.923 ± 0.192
Plomo3	1.346 ± 0.192

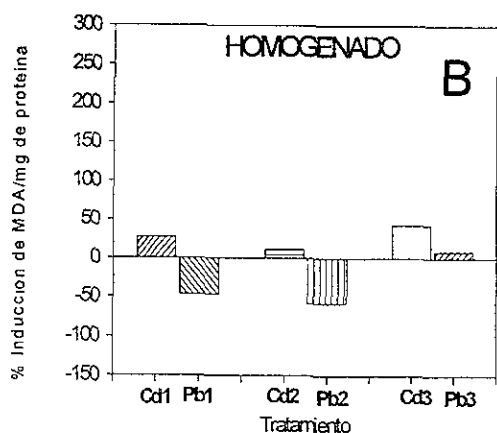


CITOSOL	nmolesMDA/mg prot± DE
Control	2.793 ± 0.045
Cadmio1	4.810 ± 0.192 *
Plomo1	3.800 ± 0.067 *
Cadmio2	4.090 ± 0.164 *
Plomo2	2.930 ± 0.164
Cadmio3	1.880 ± 0.007 *
Plomo3	2.740 ± 0.288

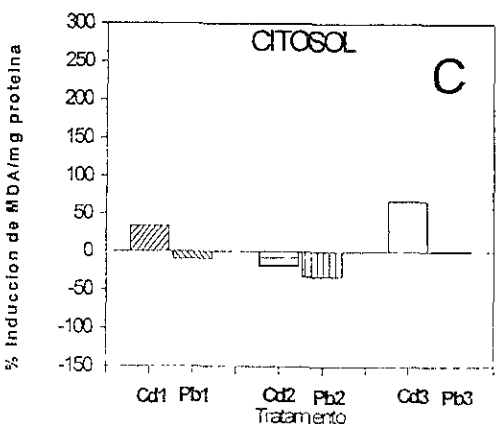
Gráfica 2. Niveles de radicales libres (nmoIMDA/mg prot) inducidos por la exposición vía inhalatoria a plomo y cadmio en diferentes fracciones celulares de hígado.



NUCLEO	nmolesMDA/mgprot± DE
Control	0.673 ± 0.135
Cadmio1	0.288 ± 0.135
Plomo1	0.961 ± 0.00001
Cadmio2	1.058 ± 0.135
Plomo2	1.442 ± 0.135 *
Cadmio3	0.673 ± 0.135
Plomo3	0.000 ± 0.000

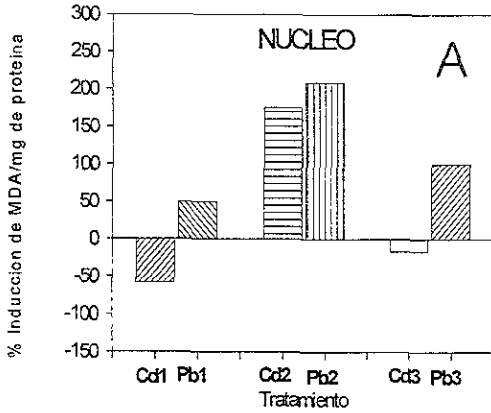


HOMOGENADO	nmolesMDA/mgprot± DE
Control	4.167 ± 0.154
Cadmio1	5.288 ± 0.135 *
Plomo1	2.211 ± 0.135 *
Cadmio2	4.615 ± 0.00001 *
Plomo2	1.731 ± 0.192 *
Cadmio3	5.962 ± 0.00001 *
Plomo3	4.519 ± 0.135 *

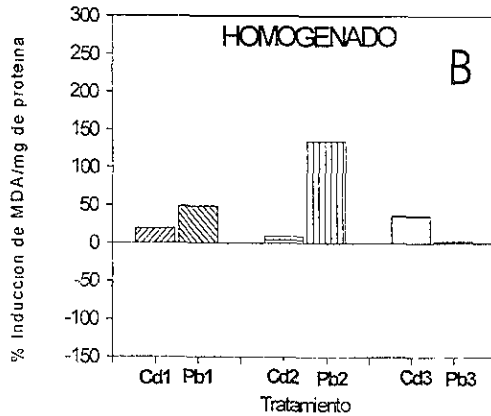


CITOSOL	nmolesMDA/mgprot± DE
Control	3.735 ± 0.192
Cadmio1	5.000 ± 0.288 *
Plomo1	3.370 ± 0.096
Cadmio2	3.030 ± 0.164
Plomo2	2.510 ± 0.260 *
Cadmio3	6.250 ± 0.096 *
Plomo3	3.800 ± 0.192

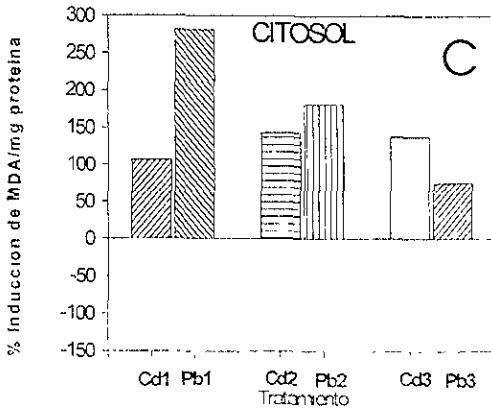
Gráfica 3.- Niveles de radicales libres (nmolMDA/mg prot) inducidos por la exposición vía inhalatoria a plomo y cadmio en diferentes fracciones celulares de riñón.



NUCLEO	nmolMDA/mgprot± DE
Control	1.154 ± 0.544
Cadmio1	0.481 ± 0.135
Plomo1	1.731 ± 0.00001
Cadmio2	3.173 ± 0.135 *
Plomo2	3.558 ± 0.135 *
Cadmio3	0.961 ± 0.192
Plomo3	2.308 ± 0.00001



HOMOGENADO	nmolMDA/mgprot± DE
Control	2.910 ± 0.366
Cadmio1	3.461 ± 0.00001
Plomo1	4.327 ± 0.385
Cadmio2	3.173 ± 0.385
Plomo2	6.827 ± 0.135 *
Cadmio3	3.942 ± 0.135
Plomo3	2.981 ± 0.135



CITOSOL	nmolMDA/mgprot± DE
Control	0.769 ± 0.001
Cadmio1	1.586 ± 0.577
Plomo1	2.933 ± 0.345 *
Cadmio2	1.875 ± 0.345 *
Plomo2	2.163 ± 0.345 *
Cadmio3	1.830 ± 0.135 *
Plomo3	1.346 ± 0.00001*

II. Modelo celular deficiente en γ GCS

Uno de los efectos de las especies reactivas de oxígeno, es generar daño oxidativo en el DNA, el cual puede ser detectado mediante la electroforesis unicelular realizada bajo diferentes condiciones de pH. A pH >13 detecta tanto rompimientos de cadena sencilla como sitios álcali lábiles, siendo estos últimos producto de daño oxidativo; mientras que a pH 12.3 detecta rompimientos de cadena sencilla de DNA. Además, considerando que el glutatión es una importante defensa antioxidante ante algunas especies reactivas de oxígeno, al trabajar con un modelo celular en el cual los niveles de glutatión (GSH) intracelular están abatidos debido a que carecen del gen que codifica para la γ -glutamil-cistein-sintasa (γ GCS), se podría explorar la capacidad tanto del plomo como del cadmio de inducir rompimientos en el DNA generados por daño oxidativo y a la vez conocer cual es el papel del GSH en la generación de éste tipo de daño al DNA, al mantener a las células en medios de cultivo con diferentes niveles de GSH. Para ello se emplearon las células antes mencionadas, las cuales se denominan SL-x y células de la misma estirpe pero con genotipo silvestre (wt) conocidas como SL-3, las cuales fueron tratadas durante dos horas con acetato de plomo y cloruro de cadmio a concentraciones de 50 y 100 μ M, según el diseño experimental mostrado en la tabla 4.

Tabla 4. Diseño experimental para evaluar la inducción de daño al DNA mediante la electroforesis unicelular.

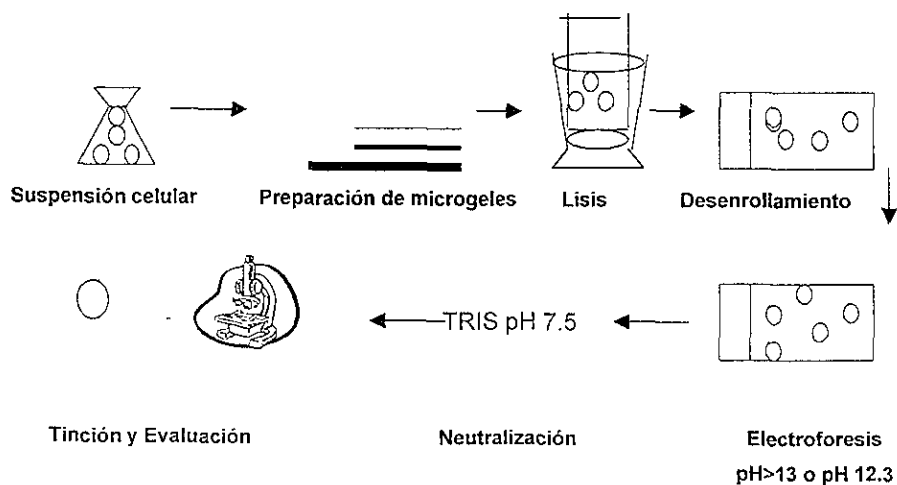
Metales: Acetato de plomo (50 y 100 μ M) , Cloruro de cadmio (50 y 100 μ M)

Tiempo de tratamiento: 2 Horas

Tipo celular	-48 Hrs	0 Hrs	24 Hrs	26 Hrs
Wt (SL-3)	Sembrado	-	Tratamiento con metales en medio sin GSH	Cosecha (inducción de daño), lavado de metales/PBS
SLx (+GSH)	Sembrado	-	Tratamiento con metales en medio sin GSH	Cosecha (inducción de daño), lavado de metales/PBS
SLx (-GSH)	Sembrado	Extracción de GSH del medio de cultivo	Tratamiento con metales en medio sin GSH	Cosecha (inducción de daño), lavado de metales/PBS

Una vez finalizado el tratamiento las células fueron cosechadas para procesarse mediante la electroforesis unicelular en condiciones de pH >13 y pH 12.3, según Rojas et al., (2000). Es importante mencionar que si el pH de las soluciones de éstos últimos dos pasos es alcalino, se detectan rompimientos de una sola cadena de DNA, sitios álcali labiles y sitios retardados de reparación; sin embargo, si se trabaja en condiciones de pH 12.3 se detectan rompimientos de cadena sencilla en el DNA y sitios retardados de reparación. El parámetro evaluado fue la distancia que migró el DNA expresada en μm , que dicho de otra forma es equivalente a la longitud de las colas de los cometas. Esto se realizó con la ayuda de un ocular graduado (figura 4).

Figura 4.- Metodología de la electroforesis unicelular o "ENSAYO COMETA".



El análisis de los resultados obtenidos a partir de la electroforesis unicelular realizada a pH 12.3 indica que hay una respuesta diferente entre cada una de las líneas celulares empleadas, es decir, las células SL-3 (wt) fueron menos sensibles que las células SL-x

(γ GCS^{-/-}), dentro de las cuales, las que crecieron en medio de cultivo sin GSH mostraron mayor sensibilidad (Gráfica 4a, 4b, 4c).

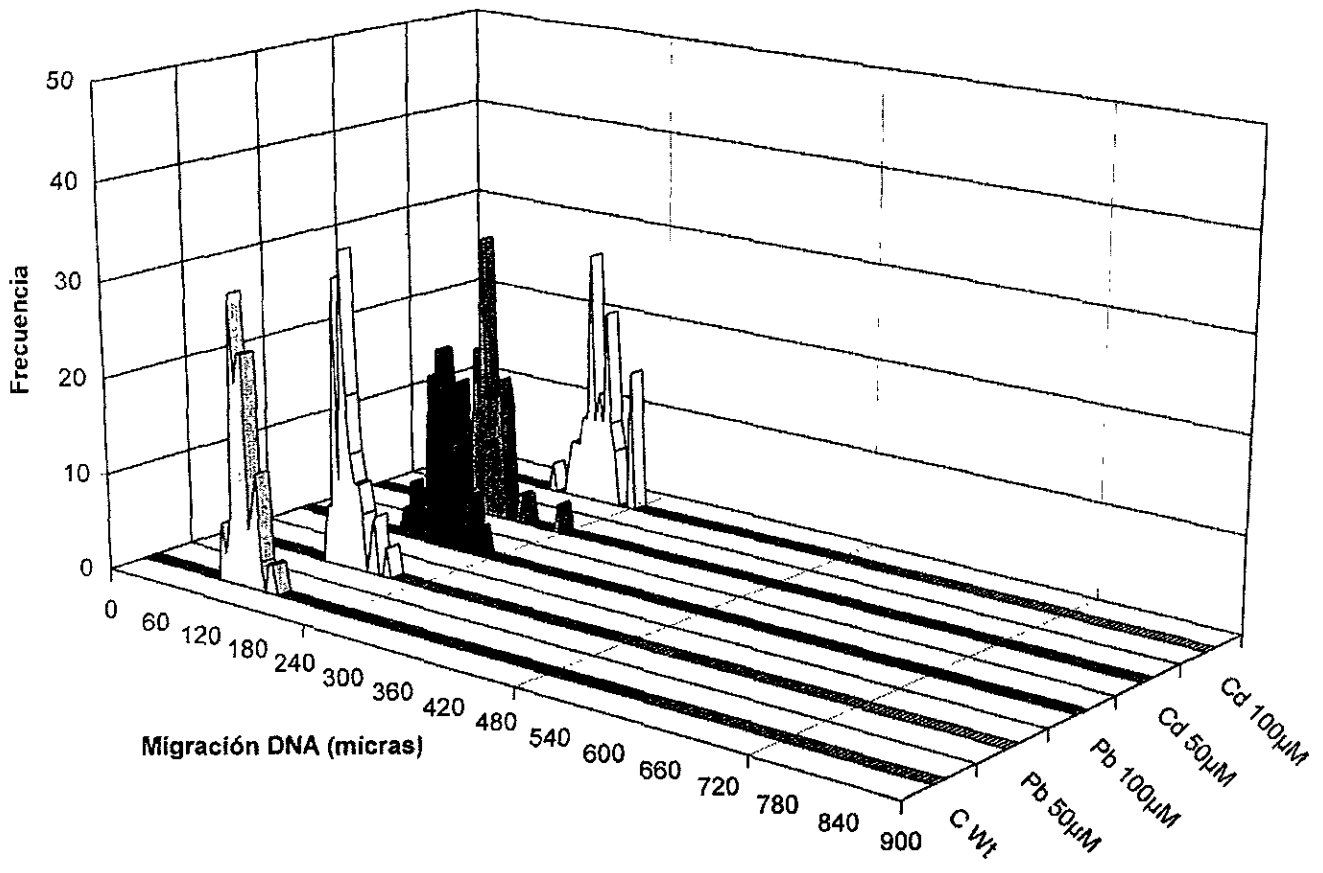
Con respecto al comportamiento de cada uno de los tratamientos se puede decir que, en las células wt ambos metales indujeron daño al DNA en la misma magnitud, detectado mediante el ensayo de electroforesis unicelular a pH 12.3 expresado como rompimientos de cadena sencilla, aunque se encontró un daño ligeramente mayor a la concentración de 100 μ M (Gráfica 4a). En las células deficientes en γ GCS que crecieron en medio de cultivo suplementado con GSH, fue posible apreciar una disminución en el daño, ocasionado por el cadmio a ambas concentraciones, mientras que los tratamientos con plomo muestran que a 50 μ M hay una mayor inducción de daño que a 100 μ M, donde se aprecia una disminución en la longitud de las colas de los cometas, detectadas por el ensayo cometa a pH 12.3 (Gráfica 4b).

Por otro lado, las células SL-x crecidas en medio sin GSH presentaron un patrón de disminución del daño en los tratamientos con cadmio, mientras que las tratadas con plomo muestran un efecto dosis respuesta en la inducción de rompimientos de cadena sencilla en el DNA, bajo condiciones de pH 12.3 (Gráfica 4c).

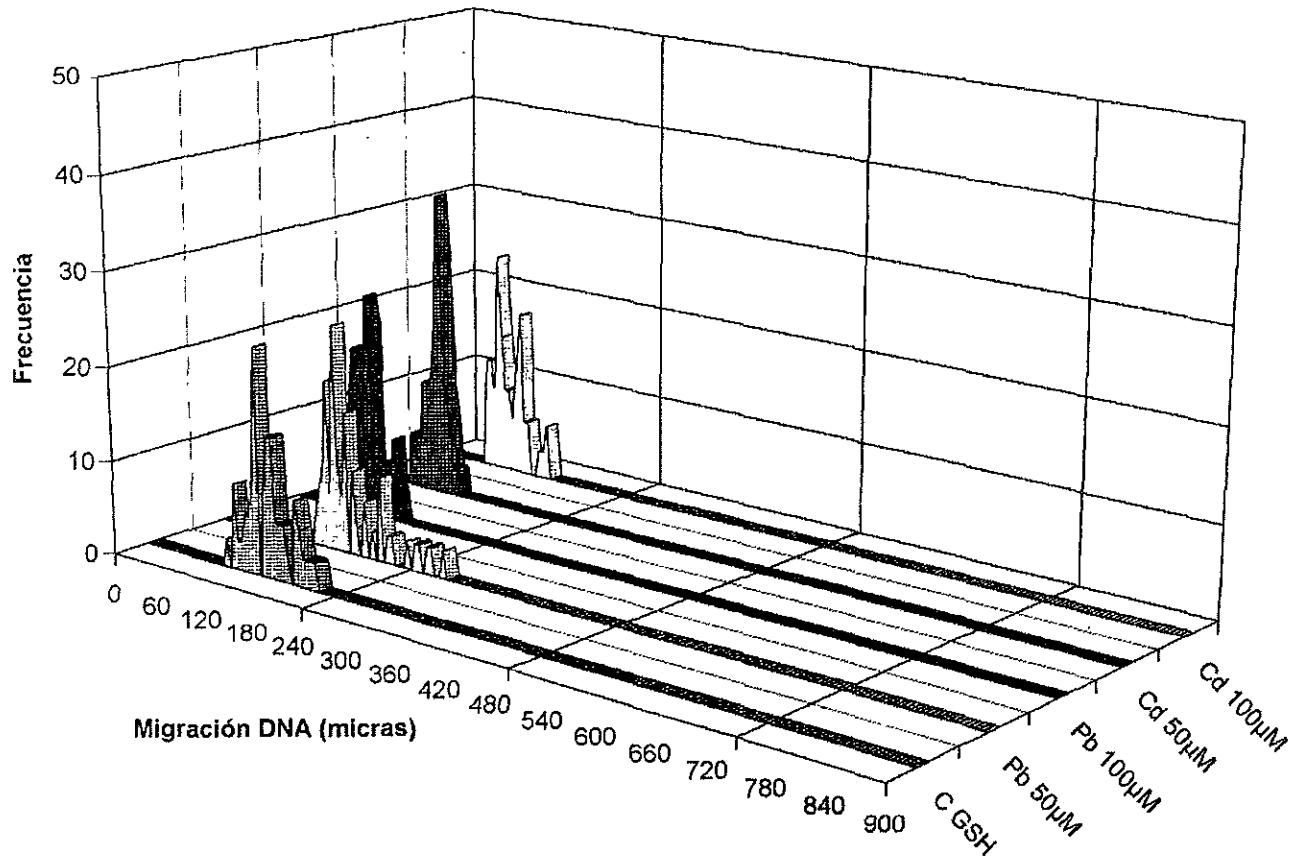
Los resultados obtenidos del ensayo cometa en condiciones de alcalinidad (pH >13), donde se puede evaluar tanto rompimientos de una cadena de DNA y sitios AP (probable producto de daño oxidativo), indican que ambos metales inducen daño, siendo las células wt las menos sensibles al tratamiento y las células SL-x crecidas con y sin GSH las que mostraron mayor daño en el DNA (Gráfica 5a, 5b y 5c). Sin embargo, bajo estas condiciones del ensayo no se observan diferencias en la respuesta a ambos metales, donde además la diferencia en la respuesta entre dosis es marginal.

La capacidad de inducción de daño al DNA vía estrés oxidativo, por parte del plomo y el cadmio, se aprecia más fácil cuando se comparan los porcentajes de inducción de daño en el DNA, obtenidos mediante las dos condiciones empleadas del ensayo cometa, puesto que la sustracción del daño detectado a pH 12.3 del evaluado a pH 13, representa la cantidad de sitios AP producto de la exposición a plomo y cadmio (Gráfica 5d)

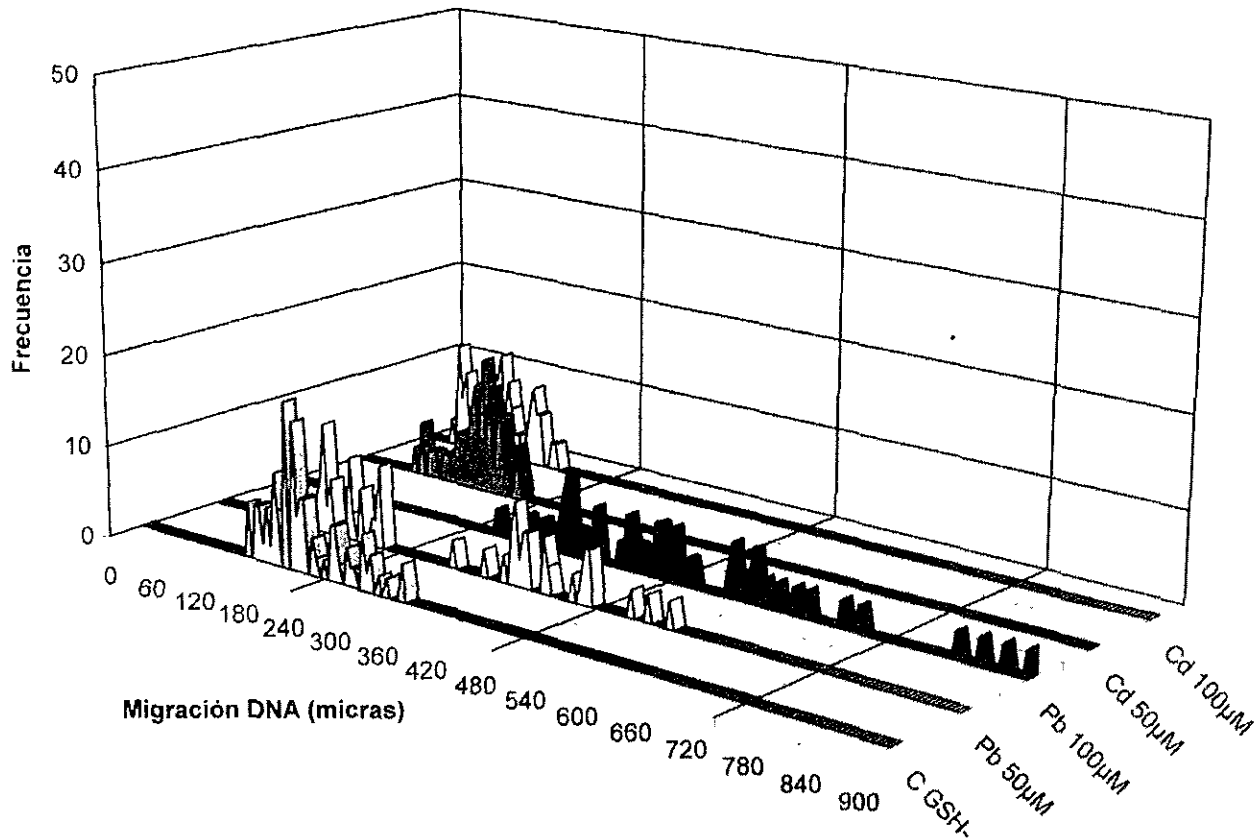
Gráfica 4a. Distribución del daño al DNA inducido por Plomo y Cadmio en células SL-3 (vvt), detectado mediante el ensayo cometa a pH 12.3 (RCS)



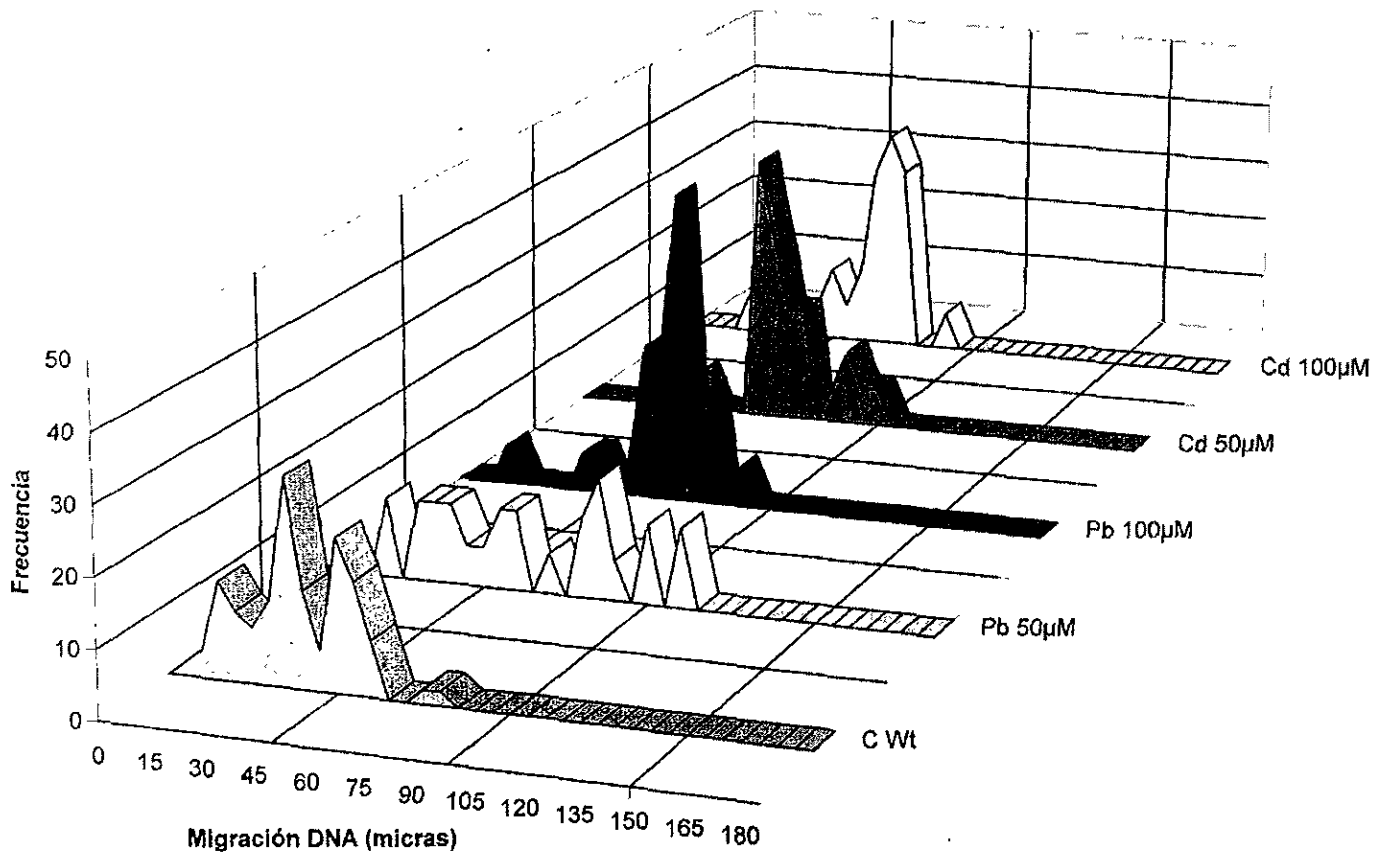
Gráfica 4b. Distribución del daño al DNA inducido por Plomo y Cadmio en células SL-x creciendo en GSH, detectado mediante el ensayo cometa a pH 12.3 (RCS)



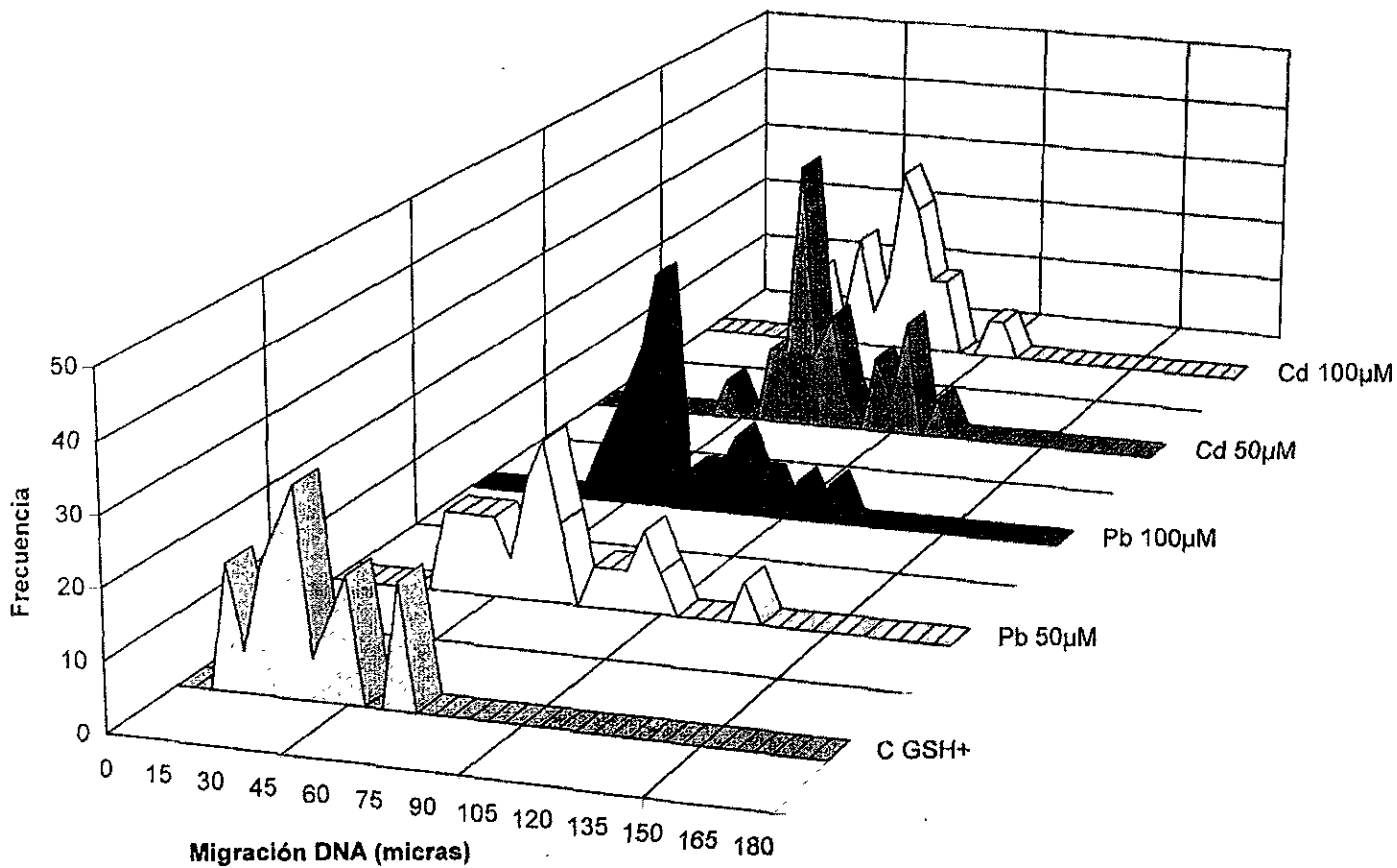
Gráfica 4c. Distribución del daño al DNA inducido por Plomo y Cadmio en células SL-x creciendo sin GSH, detectado mediante en ensayo cometa a pH 12.3 (RCS)



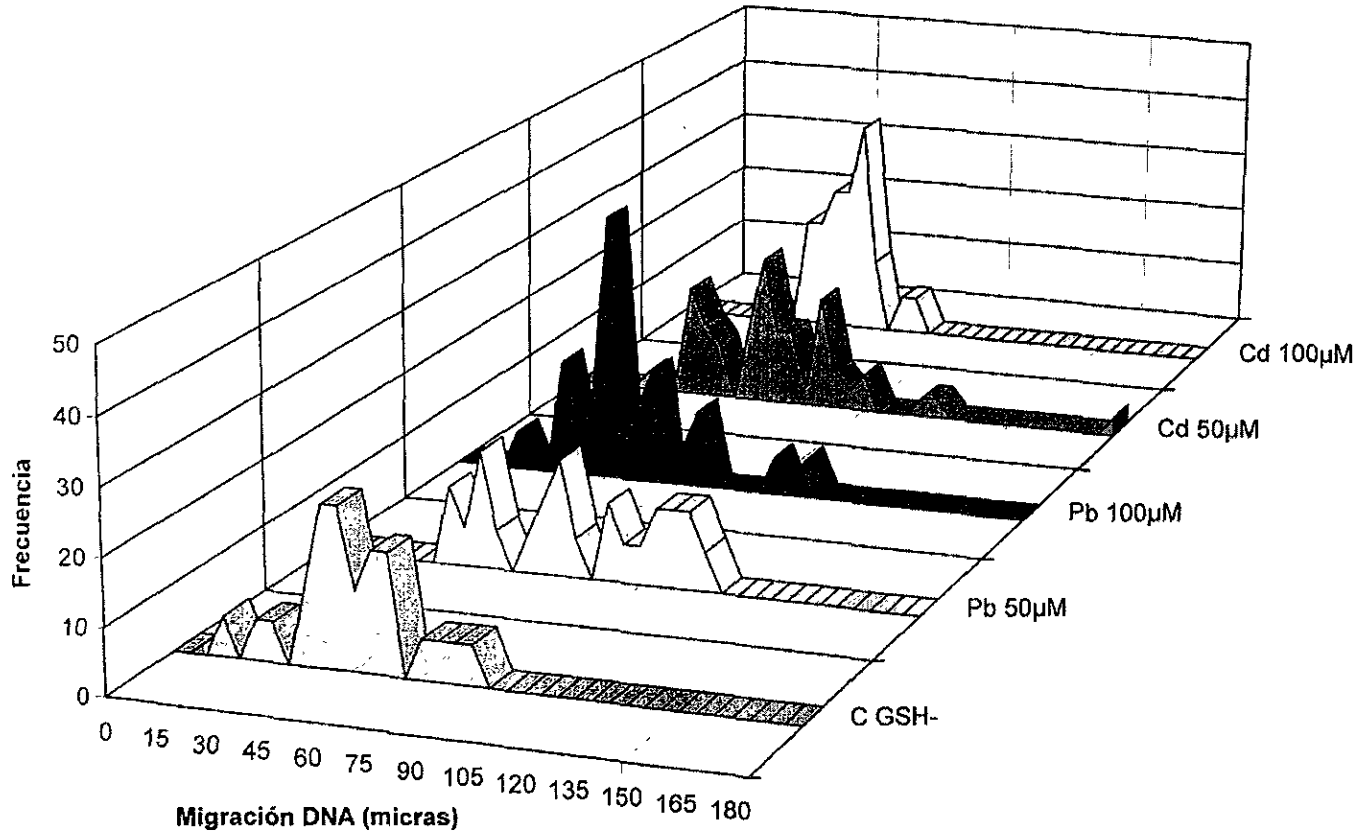
Gráfica 5a. Distribución del daño al DNA inducido por Plomo y Cadmio en células SL-3 (Wt), detectado mediante el ensayo cometa a pH 13 (RCS y SAL)



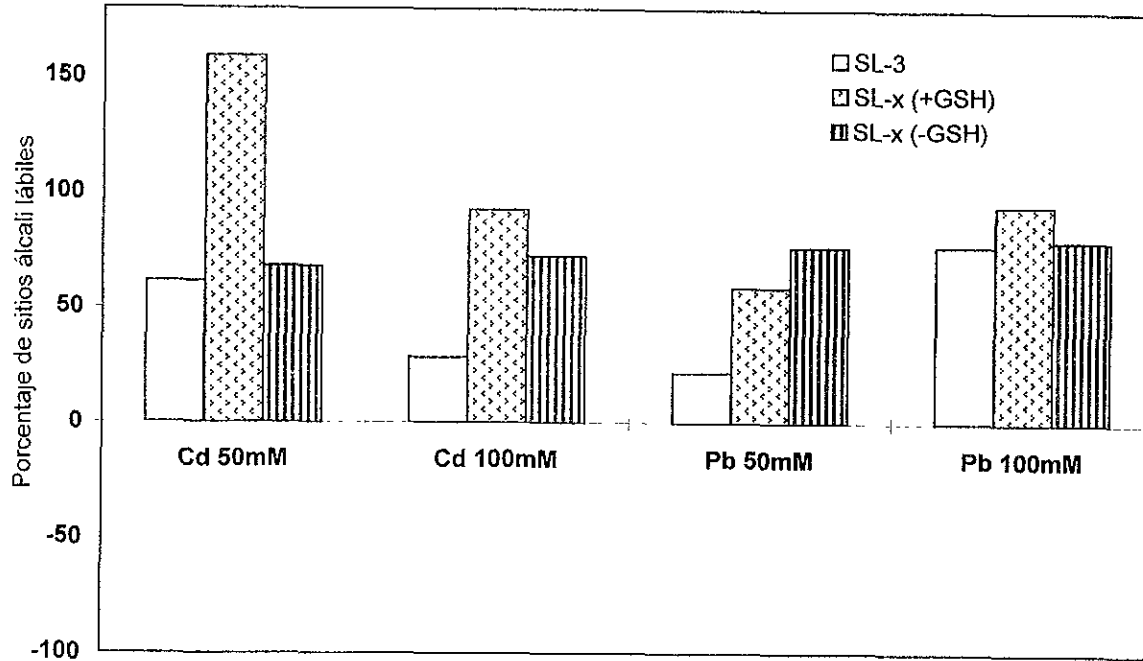
Gráfica 5b. Distribución del daño al DNA inducido por Plomo y Cadmio en células SL-x creciendo en GSH, dectado mediante el ensayo cometa a pH13 (RCS y SAL)



Gráfica 5c. Distribución del daño al DNA inducido por Plomo y Cadmio en células SL-x creciendo sin GSH, detectado mediante el ensayo cometa a pH 13 (RCS y SAL)



Gráfica 5d. % Inducción de sitios alcali lábiles por efecto de plomo y cadmio en células SL-3 (Wt), SL-x (+GSH) y SL-x (-GSH),



D) Evaluación de la capacidad reparativa del DNA por la exposición a plomo y cadmio.

Para conocer si el proceso de la reparación del DNA es inhibido por la exposición a plomo y cadmio, se emplearon las mismas líneas celulares [SL-3 (wt), SL-x (+GSH) y SL-x (-GSH)], éstas fueron tratadas durante dos horas con plomo y cadmio a concentraciones de 50 y 100 μM . Posteriormente, el tratamiento fue lavado y las células permanecieron en PBS durante dos periodos de recuperación, uno de 30 minutos y otro de 45 minutos (tiempo suficiente para que los mecanismos de reparación (REN y REB) se llevaran a cabo), transcurrido este periodo, las células fueron cosechadas y procesadas mediante el protocolo de pH >13 de la electroforesis unicelular, como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Diseño experimental para la evaluación de inducción de daño al DNA y cinética de reparación mediante la electroforesis unicelular a pH >13.

Metales: Acetato de plomo (50 y 100 μM) , Cloruro de cadmio (50 y 100 μM)

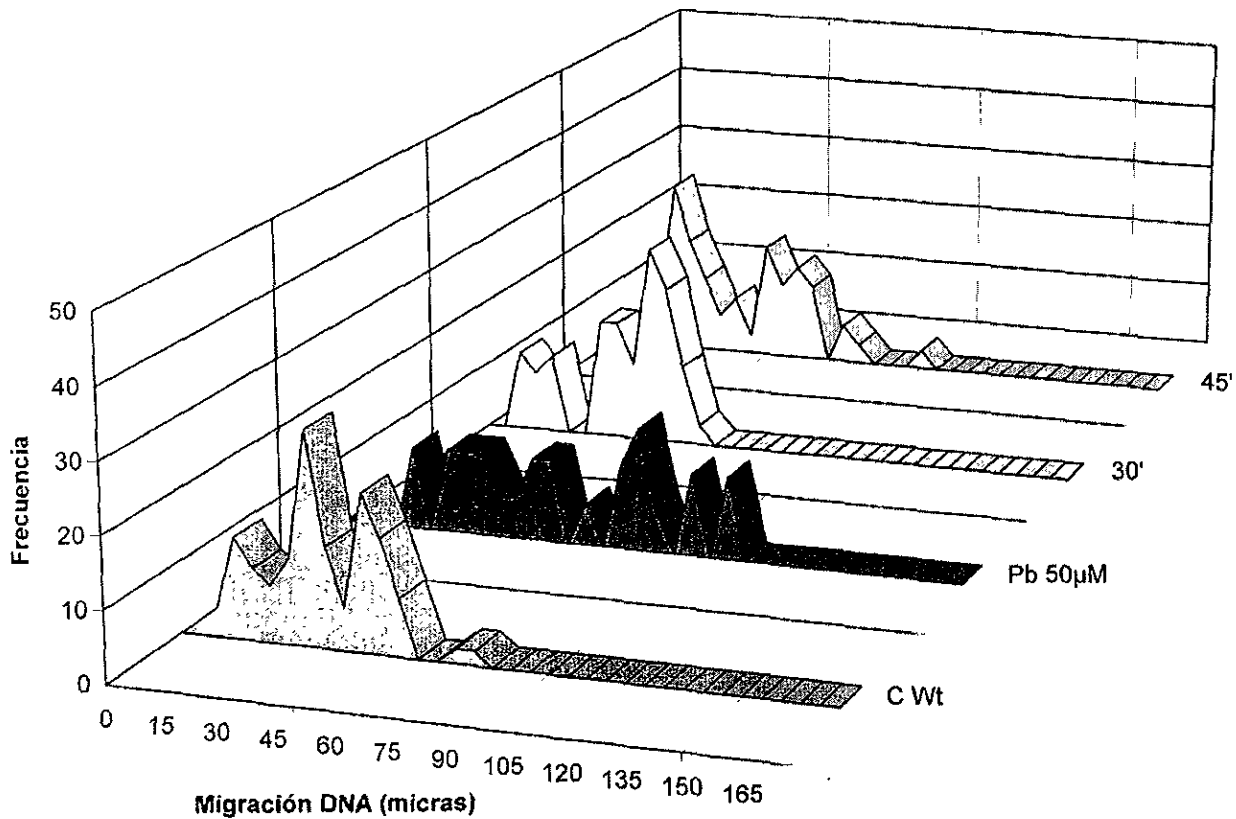
Tiempo de tratamiento: 2 Horas

Tipo celular	-48 Hrs	0 Hrs	24 Hrs	26 Hrs	26.5 Hrs 30' recuperación	26.75 Hrs 45' recuperación
Wt (SL-3)	Sembrado	-	Tratamiento con metales en medio sin GSH	Cosecha (inducción de daño), lavado de metales/PBS	Cosecha posterior al lavado con PBS	Cosecha posterior al lavado con PBS
SLx(+GSH)	Sembrado	-	Tratamiento con metales en medio sin GSH	Cosecha (inducción de daño), lavado de metales/PBS	Cosecha posterior al lavado con PBS	Cosecha posterior al lavado con PBS
SLx(-GSH)	Sembrado	Extracción de GSH del medio de cultivo	Tratamiento con metales en medio sin GSH	Cosecha (inducción de daño), lavado de metales/PBS	Cosecha posterior al lavado con PBS	Cosecha posterior al lavado con PBS

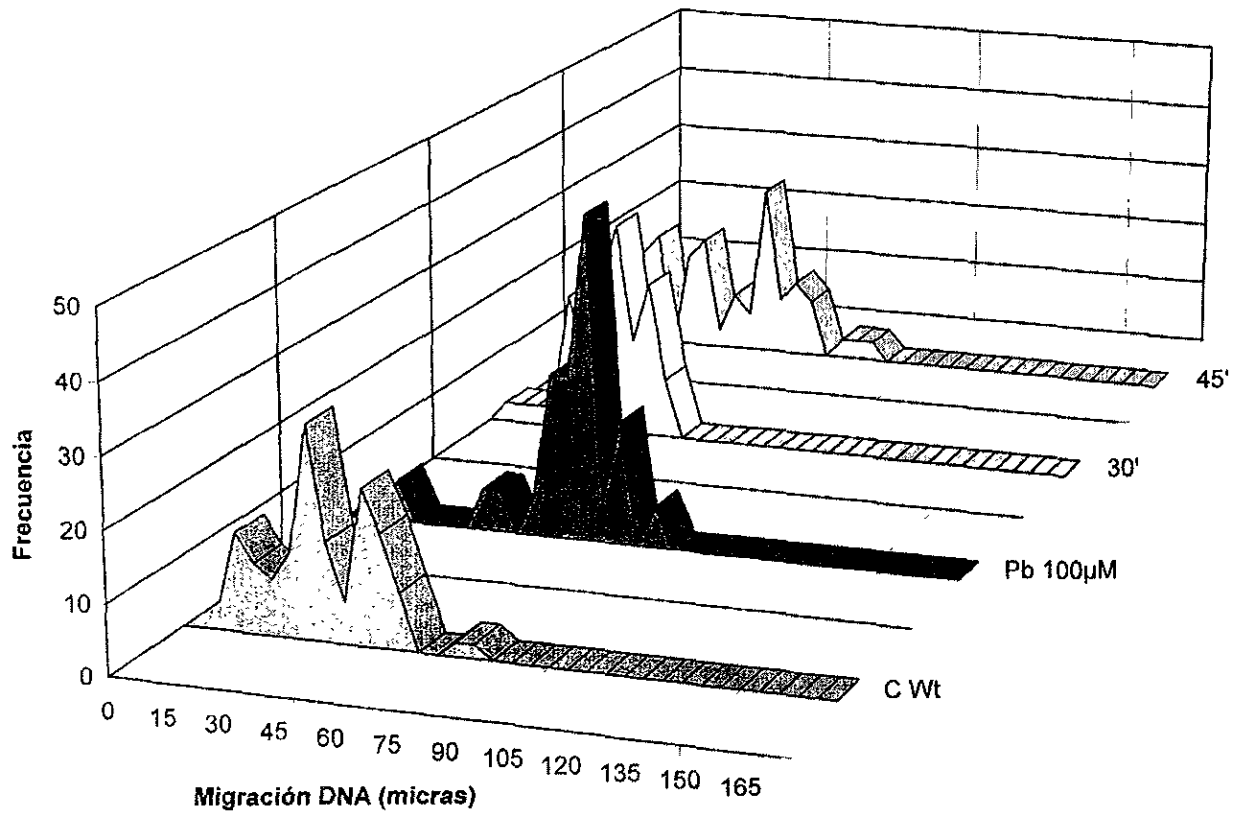
Los resultados de estos experimentos se analizaron a manera de cinética, para poder visualizar si bajo cada condición de tratamiento (Cd 50 μ M, Cd 100 μ M, Pb 50 μ M, Pb 100 μ M), las diferentes líneas celulares (wt, SL-x GSH+, SL-x GSH-) mostraban la capacidad de reparar el daño en el DNA (Gráfica 6, 7 y 8 a, b, c y d). En este contexto, se pudo observar que las células wt, en todos los tratamientos tuvieron la capacidad de reparar eficientemente el daño al DNA inducido por ambos metales desde los 30 minutos de recuperación (Gráfica 6a, 6b, 6c y 6d). En contraste a éstas, las células SL-x crecidas tanto en medio con y sin GSH mostraron una lenta o retardada capacidad de reparar el daño tanto a 30 como a 45 minutos de recuperación (Gráfica 7a, b, c y d, gráfica 8a, b, c y d).

Visto desde otro enfoque, al analizar los resultados donde se emplearon células wt, es posible apreciar que los tratamientos con metales no produjeron la inhibición del proceso de reparación del DNA, sin embargo, al emplear un sistema sensible, en el cual se carece de una defensa antioxidante importante, como lo es el GSH, únicamente es posible apreciar que tanto el plomo como el cadmio alteran el proceso de la reparación del DNA, pero no lo inhiben a las concentraciones de 50 y 100 μ M.

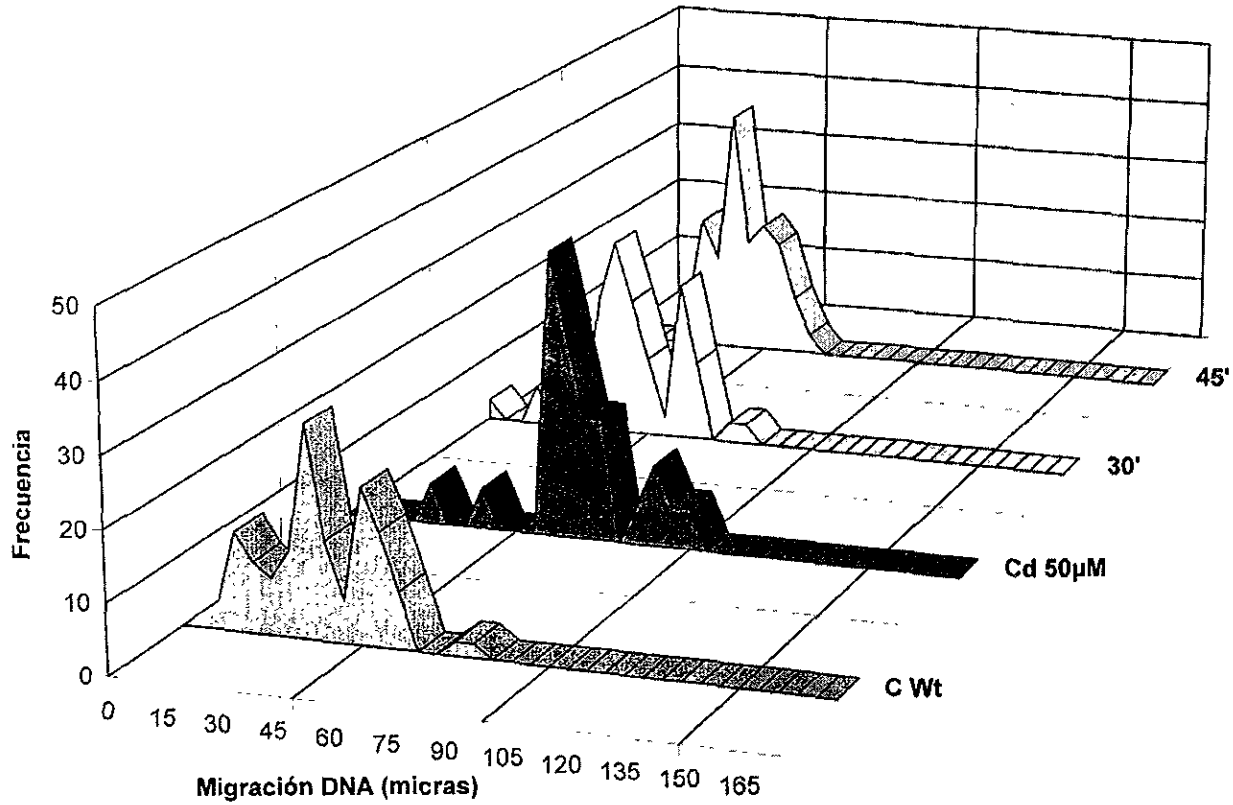
Gráfica 6a. Distribución del Daño al DNA inducido por Pb 50 μ M y su cinética reparativa en células SL-3 (Wt)



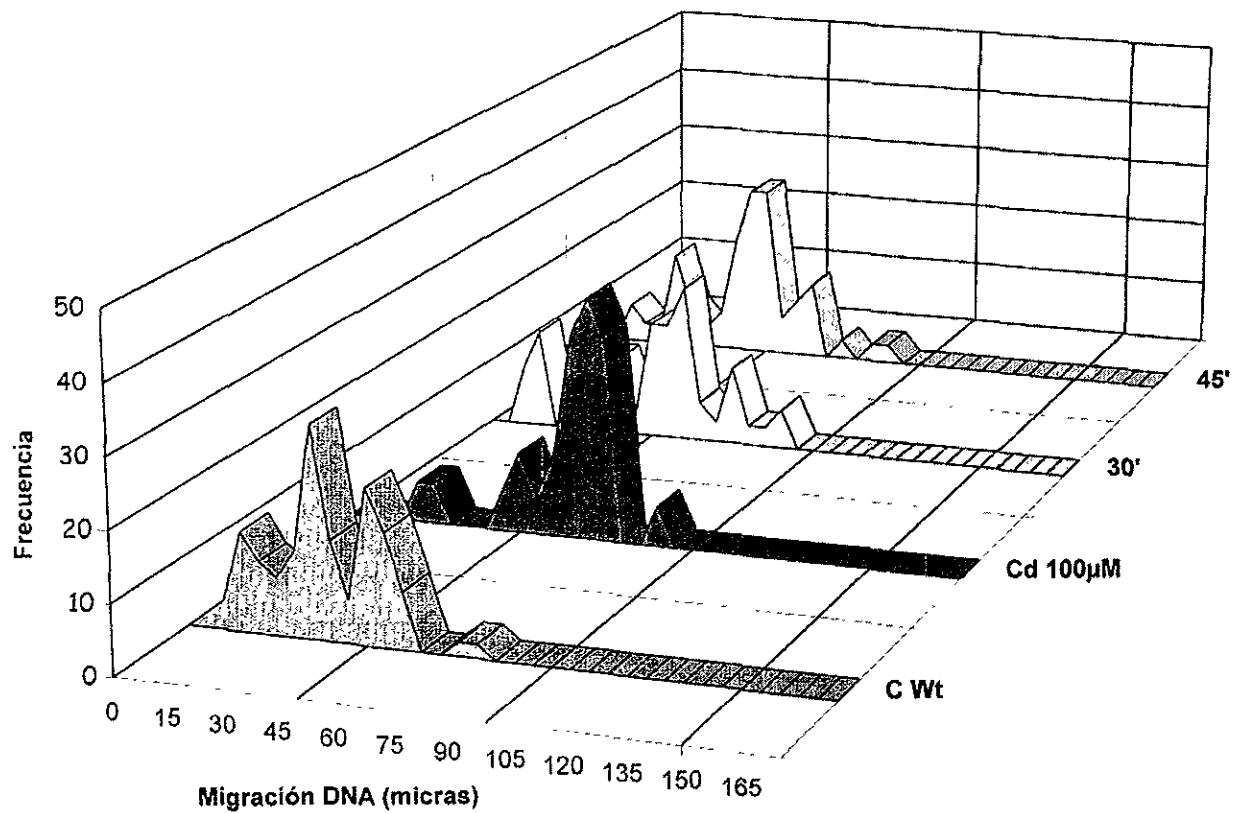
Gráfica 6b. Distribución del Daño al DNA inducido por Pb 100µM y su cinética reparativa en células SL-3 (Wt)



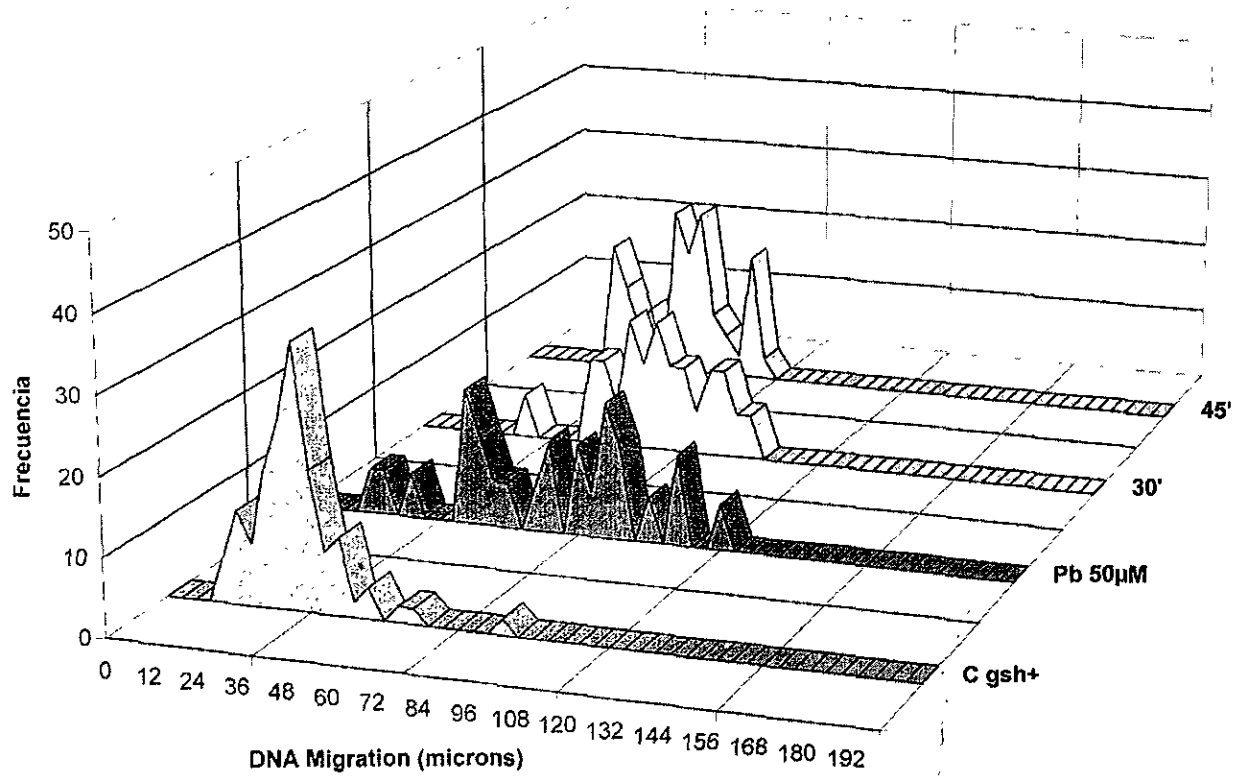
Gráfica 6c. Distribución del Daño al DNA inducido por Cd 50 μ M y su cinética reparativa en células SL-3 (Wt)



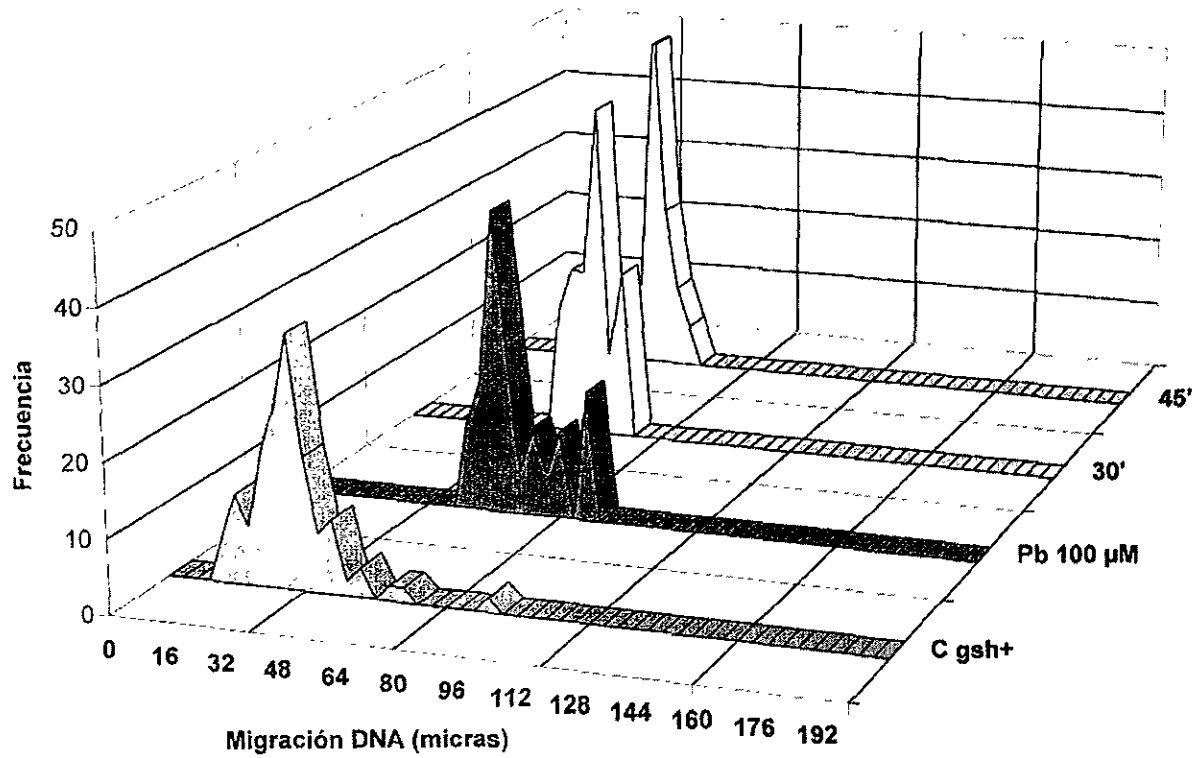
Gráfica 6d. Distribución del Daño al DNA inducido por Cd 100 μ M y su cinética reparativa en células SL-3 (Wt)



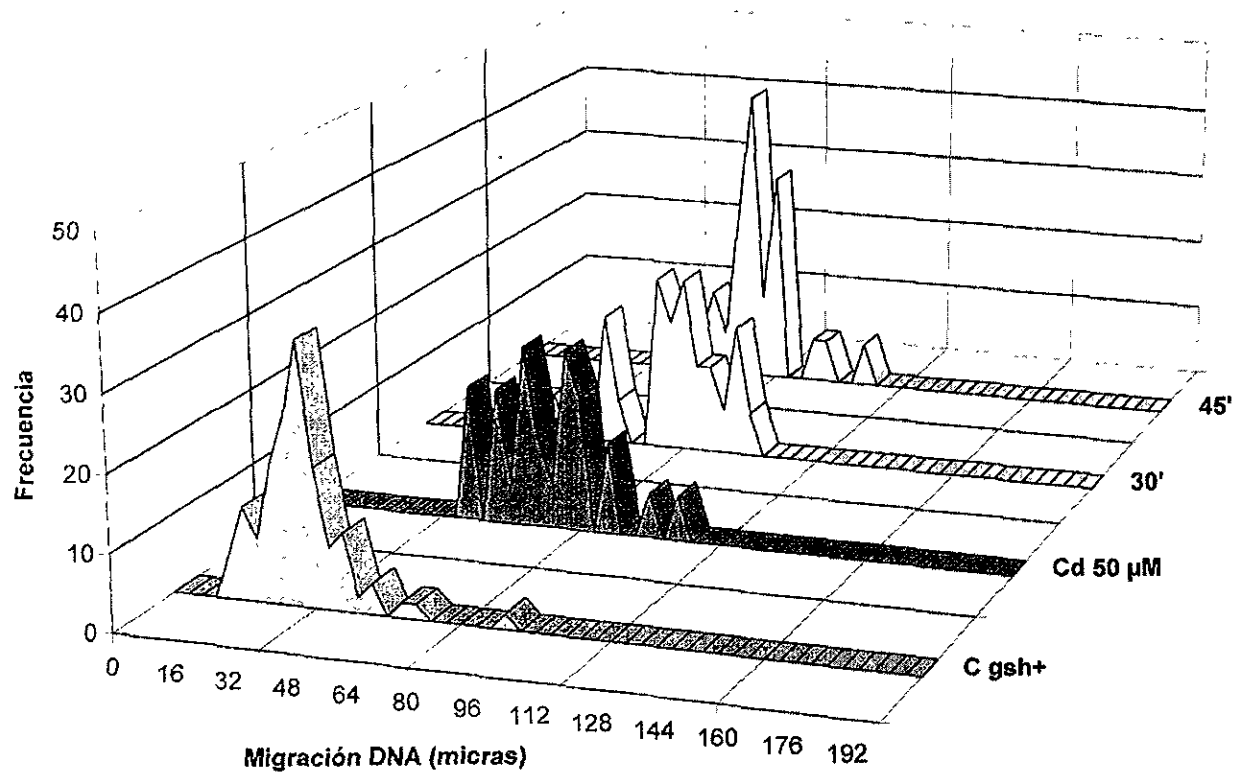
Gráfica 7a: Distribución del Daño al DNA inducido por Pb 50 μ M y su cinética reparativa en células SL-x creciendo en GSH, determinado mediante el ensayo cometa



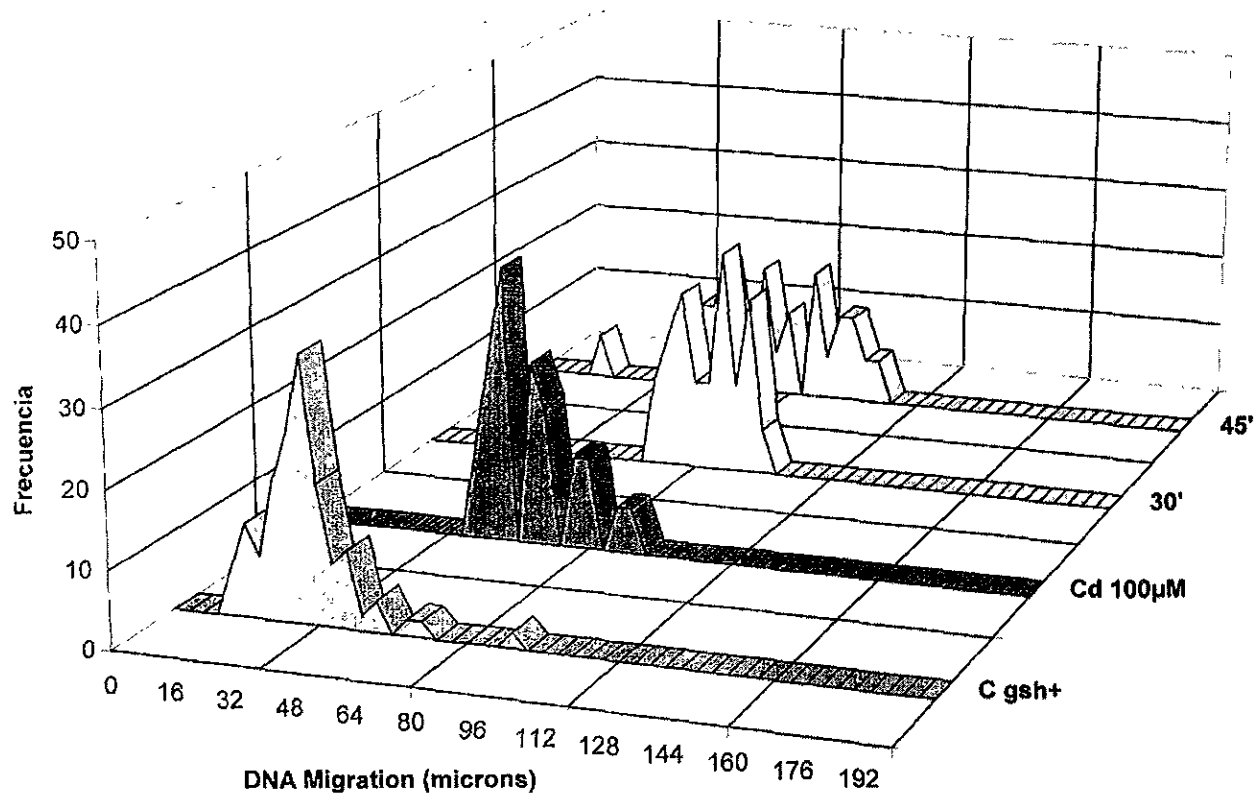
Gráfica 7b. Distribución del Daño al DNA inducido por Pb 100 μ M y su cinética reparativa en células SL-x creciendo en GSH, determinado mediante el ensayo cometa



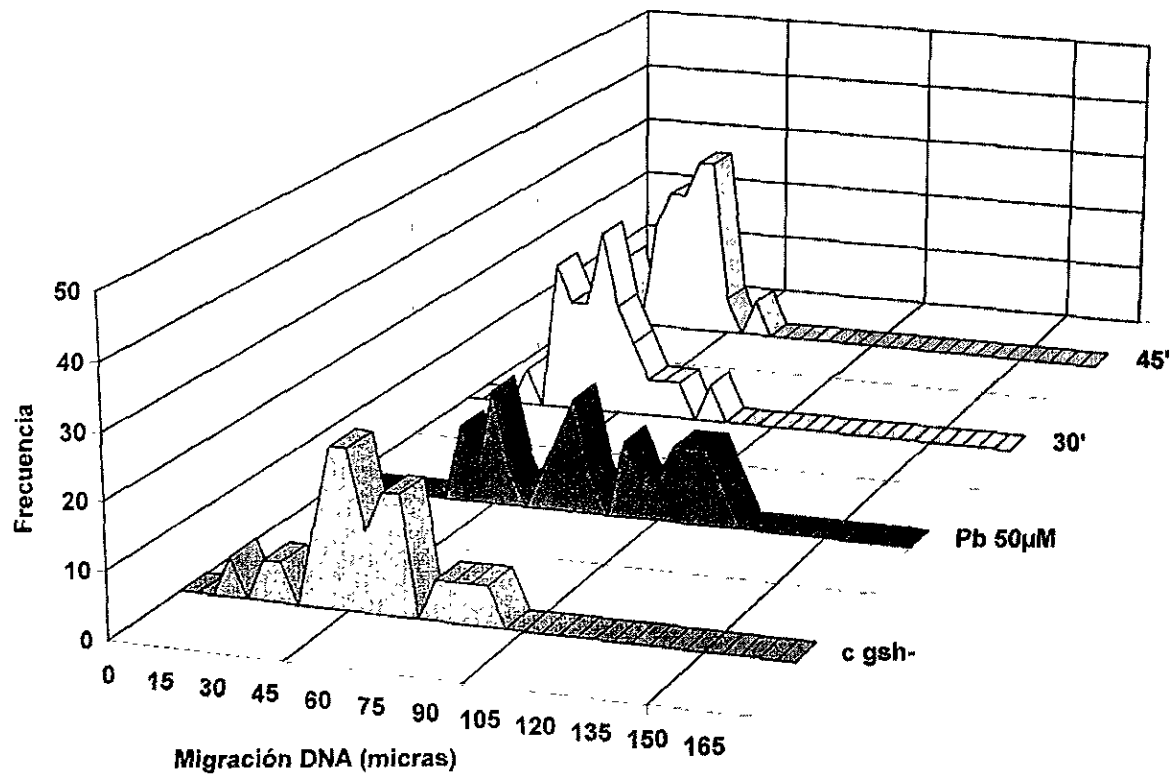
Gráfica 7c. Distribución del Daño al DNA inducido por Cd 50 μ M y su cinética reparativa en células SL-x creciendo en GSH, determinado mediante el ensayo cometa



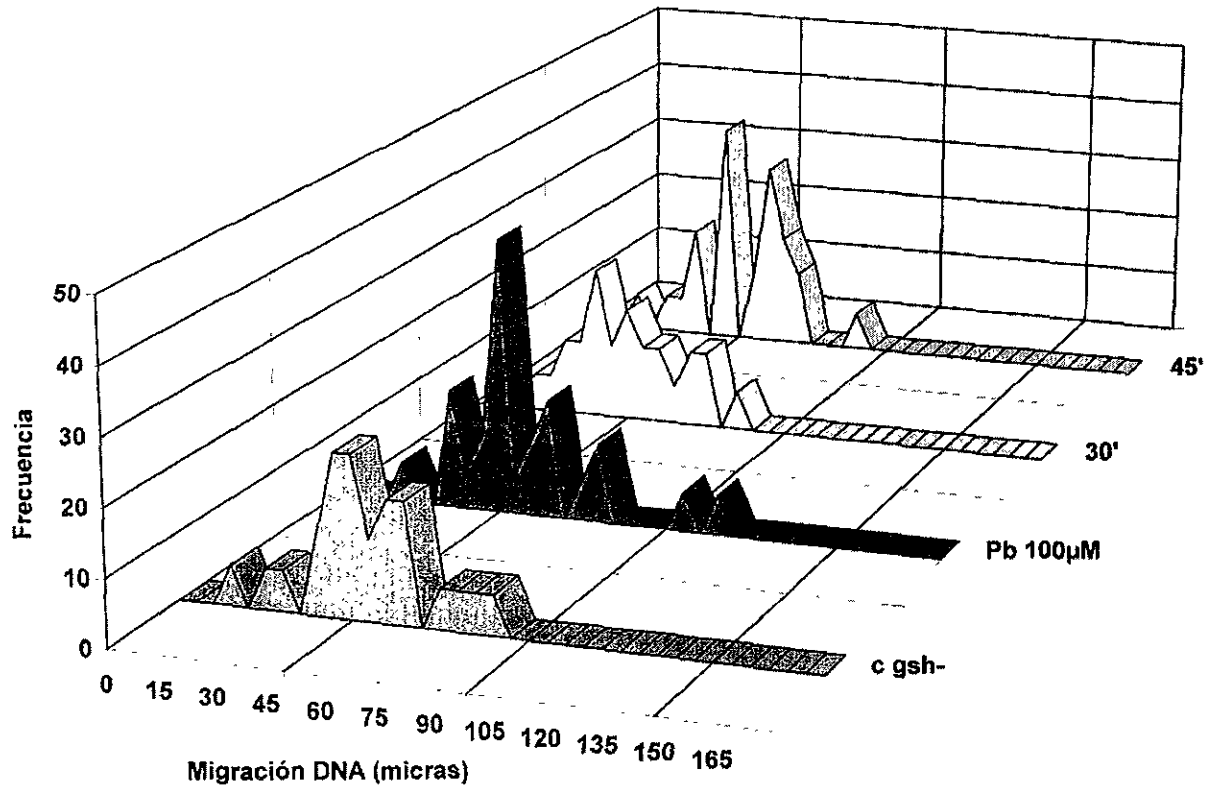
Gráfica 7d. Distribución de Daño al DNA inducido por Cd 100 μ M y su cinética reparativa en células SL-x creciendo en GSH, determinado mediante el ensayo cometa



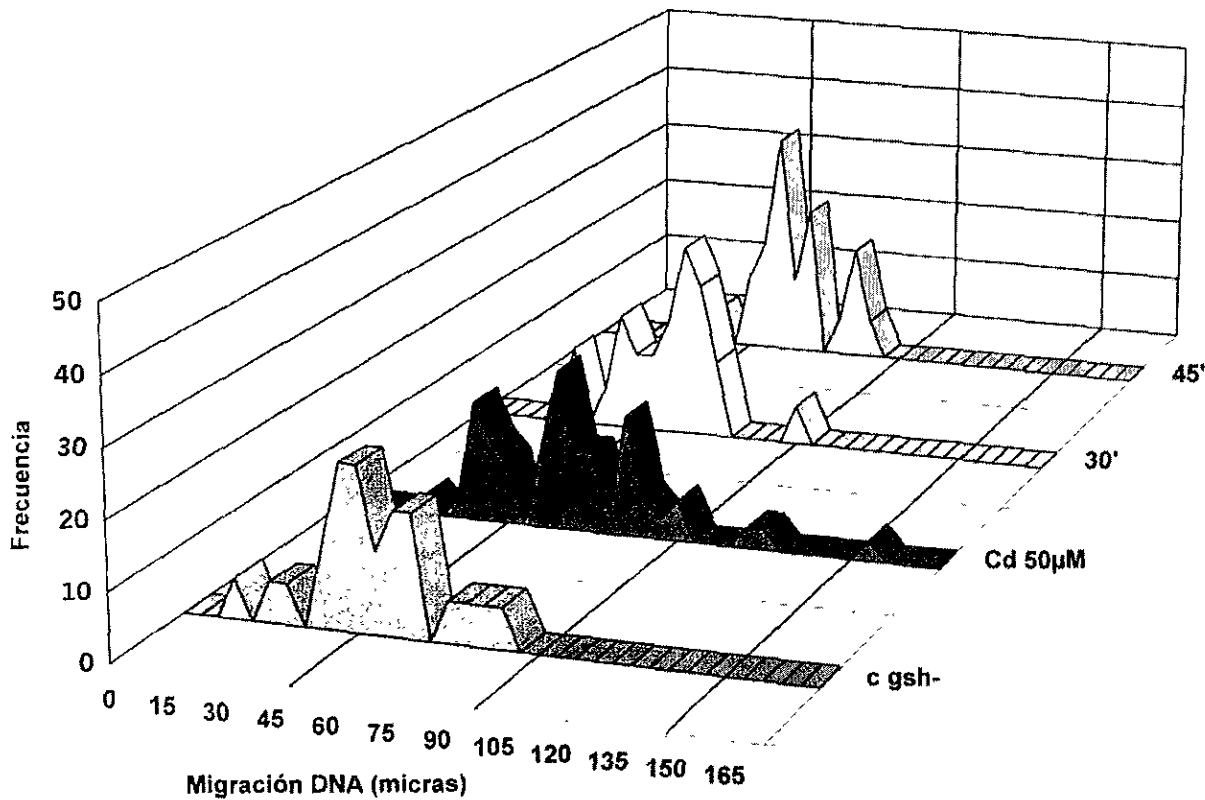
Gráfica 8a. Distribución del Daño al DNA inducido por Pb 50 μ M y su cinética reparativa en células SLx creciendo sin GSH, determinado mediante el ensayo cometa



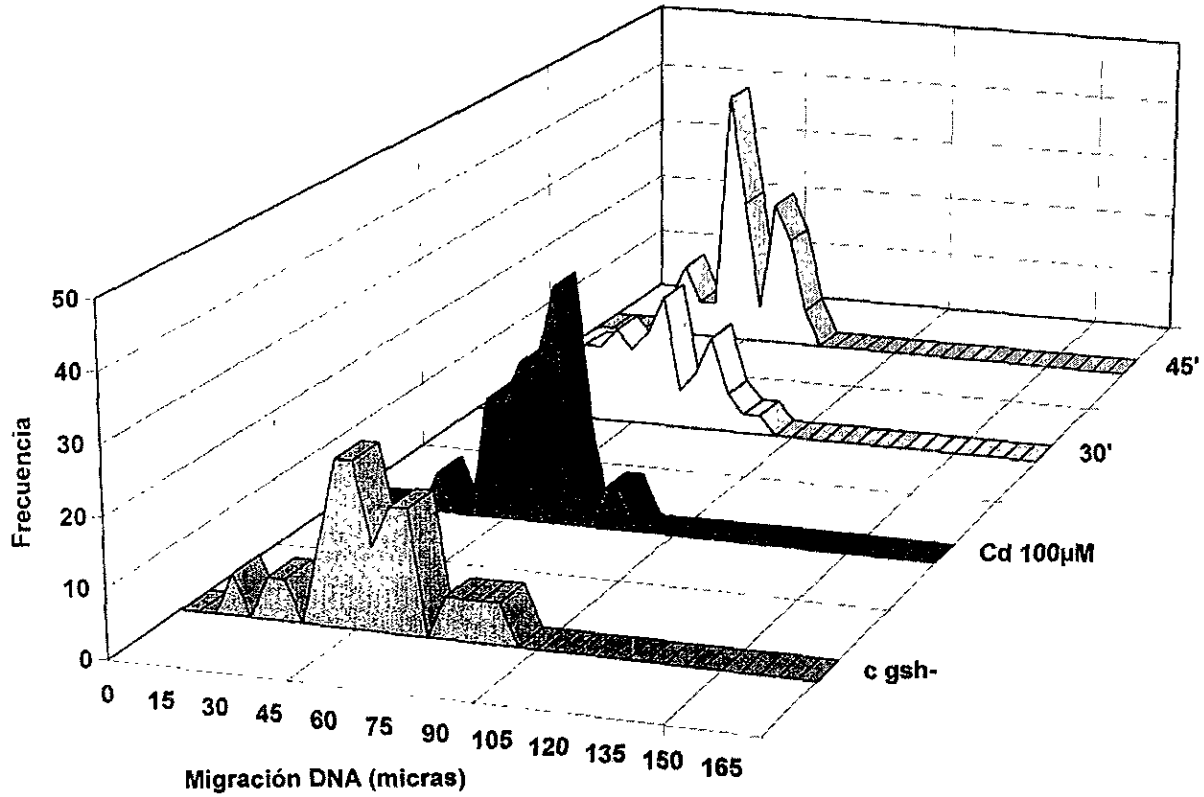
Gráfica 8b. Distribución del Daño al DNA inducido por Pb 100 μ M y su cinética reparativa en células SLx creciendo sin GSH, determinado mediante el ensayo cometa



Gráfica 8c. Distribución del Daño al DNA inducido por Cd 50µM y su cinética reparativa en células SLx creciendo sin GSH, determinado mediante el ensayo cometa



Gráfica 8d. Distribución del Daño al DNA inducido por Cd 100µM y su cinética reparativa en células SLx creciendo sin GSH, determinado mediante el ensayo cometa



E) Cambios en los niveles de expresión de citocinas de respuesta proinflamatoria, IL-1 α y TNF α .

El desencadenamiento de una respuesta inflamatoria ha consecuencia de la exposición via inhalatoria a plomo y cadmio se determino a través de la evaluación de los niveles de citocinas proinflamatorias como la IL-1 α y el TNF α en animales sujetos a diferentes protocolos de exposición, los cuales se esquematizan en la tabla 3. Las determinaciones se hicieron mediante inmudetecciones (Western blots) a partir de homogenados celulares de los órganos de interés (pulmón, hígado, riñón). La metodología realizada consistió en:

- 1.- Preparar geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) del porcentaje adecuado, dependiendo del peso de la proteína de interés.
- 2.- Cargar el gel previa desnaturalización de la muestra a 65°C en presencia de laemil buffer 2X.
- 3.- Correr el gel a 100-200 V, 60-30 mA durante el tiempo necesario para dejar migrar la muestra y permitir la separación entre la actina (control de cargado) y la proteína de interés. Aproximadamente 1-1.5 horas. Para ello se emplea una cámara de electroforesis vertical.
- 4.- Transferencia de las proteínas separadas en el gel a una membrana de nitrocelulosa, empleando una unidad de transferencia, en la cual tanto el gel como la membrana quedan flanqueadas por un papel filtro y una esponja, de tal manera que se permita el flujo de iones presentes en el buffer correspondiente. La transferencia se realiza a 4°C durante 1.5 horas con agitación del buffer a 100V y 300mA
- 5.- Se sumerge la membrana en buffer de bloqueo (3% gelatina-TBS), a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 6.- Se lava la membrana, realizando tres incubaciones de 5 minutos cada una, en buffer TTBS a temperatura ambiente.

- 7.- Se incuba durante 2 horas o bien, durante toda la noche con el primer anticuerpo (anticuerpo que reconoce la proteína de interés) disuelto en buffer de anticuerpo: 1% gelatina-TTBS. Se emplearon diluciones 1:1000 de los anticuerpos.
- 8.- Se lava la membrana, realizando tres incubaciones de 5 minutos en buffer TTBS a temperatura ambiente.
- 9.- Incubación con el segundo anticuerpo, el anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina es disuelto en buffer de anticuerpo empleando una dilución 1:1000.
- 10.- Se lava la membrana, realizando tres incubaciones de 5 minutos cada una, en buffer TTBS a temperatura ambiente.
- 11.- Revelado de la membrana por la adición de solución reveladora (NBT y BCIP) y agitación hasta que aparezcan las bandas.
- 12.- La reacción se detiene por la adición de agua.
- 13.- La membrana húmeda es fotografiada, posteriormente se seca y protege de la luz

Resultados

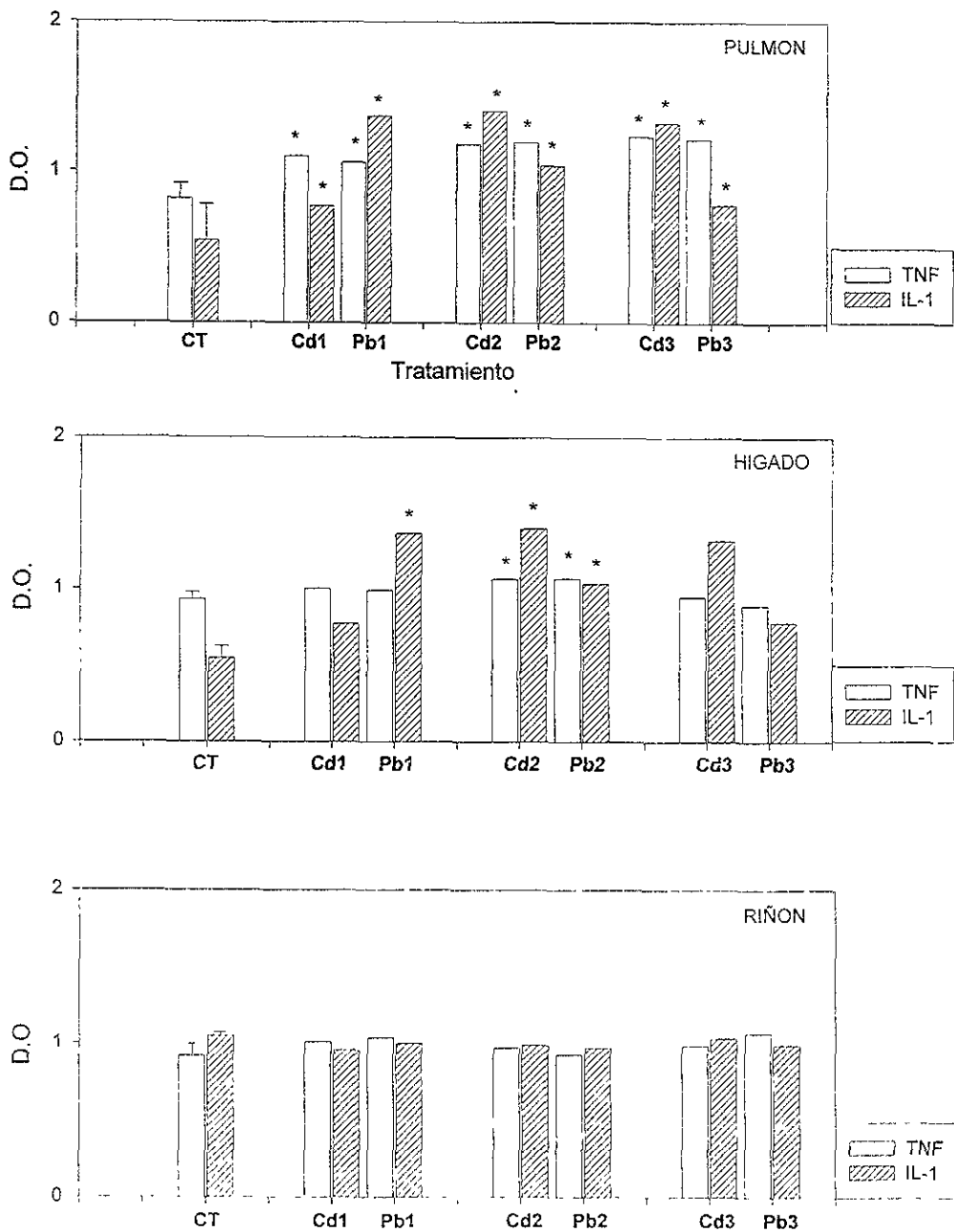
Niveles de citosina proinflamatorias en Pulmón. En este órgano, los niveles de $TNF\alpha$ muestran un incremento estadísticamente significativo (t de Student, $p < 0.05$) entre el control y los tratamientos agudo (1), subcrónico (2) y subcrónico (3), por efecto de la inhalación tanto de plomo como de cadmio (Gráfica 9).

Los niveles de $IL-1\alpha$ se incrementan en todos los protocolos de exposición a plomo, mientras que el efecto de la inhalación de cadmio muestra una inducción ligera, en el tratamiento agudo (1). El efecto por la exposición subcrónica (2) muestra la mayor inducción de los niveles de $IL-1\alpha$, mientras que en el tratamiento subcrónico (3) se observa una disminución de dichos niveles, los cuales son similares a los detectados por efecto de la exposición aguda (1); cabe mencionar que en todos los tratamientos hubo diferencias significativas determinadas mediante la prueba t de Student (Gráfica 9).

Niveles de citosina proinflamatorias en Hígado. Los niveles de $TNF\alpha$ no muestran cambios con respecto al control tanto por la inhalación de plomo como de cadmio. En este órgano, los niveles de $IL-1\alpha$ muestran el mismo comportamiento que el presentado en el pulmón, pero sin presentar diferencias estadísticamente significativas debido a que la diferencia entre las magnitudes del control con respecto a la de los tratamientos es menor (Gráfica 9).

Niveles de citosina proinflamatorias en Riñón. En este órgano no se observaron diferencias en los niveles de ambas citocinas ($TNF\alpha$ e $IL-1\alpha$) por efecto de la inhalación tanto de plomo como de cadmio en todos los protocolos de exposición [agudo (1), subcrónico (2) y subcrónico (3)], tal como se muestra en la gráfica 9.

Gráfica 9.- Niveles de citocinas proinflamatorias en diferentes órganos de ratón inducidos por la inhalación de plomo y cadmio



V DISCUSION

Los efectos genotóxicos de metales como el plomo y el cadmio, ha sido tema de controversia durante muchos años, debido a la inconsistencia de resultados en cuanto a su mutagenicidad, clastogenicidad y carcinogenicidad. Esto puede deberse a la gran variedad de trabajos que hay al respecto, empleado tanto sistemas *in vitro* como *in vivo*, en los cuales se han evaluado estos parámetros en diferentes tipos celulares, siguiendo protocolos de exposición en su mayoría agudos, aunque los hay subcrónicos y crónicos en los que además se ha explorado los efectos producidos por una amplia gama de concentraciones.

Con base en esto, nuestro interés se centró en evaluar la genotoxicidad de metales como el plomo y el cadmio empleando concentraciones similares a la norma permitida para aire propuesta por la OECD (1994), empleando un sistema *in vivo*, en el cual pudiéramos explorar los efectos de la exposición vía inhalatoria. Obtuvimos resultados positivos de la inducción de daño genotóxico evaluado a manera de rompimientos de cadena sencilla de DNA en diferentes órganos de ratón tanto por la exposición aguda como subcrónica a plomo y cadmio, llamando nuestra atención el que después de cuatro semanas de exposición el daño en el DNA mantuviera la misma magnitud que la alcanzada por el tratamiento agudo y solo en algunos casos mostrara una ligera disminución. Este tipo de comportamiento podría deberse a lo propuesto por Klaasen y Liu (1998), quienes argumentan una tolerancia a los efectos tóxicos y genotóxicos de metales por la inducción de metalotioneinas, básicamente la MT-I y MT-II, que responden tanto a metales pesados como a hormonas, inflamación, estrés agudo.

A partir de estos resultados nos surgieron incógnitas como ¿cuáles son los factores involucrados en la inducción de este tipo de daño? y si ¿el plomo y el cadmio interactúan directamente con el DNA para generar rompimientos?. Con respecto a la posibilidad de interacción directa entre los metales y el DNA para causar daño, Leonard y Bernard (1993) proponen que la respuesta a metales depende de su habilidad para penetrar a la célula e interactuar con el DNA, por otro lado, se ha reportado que estos metales pueden interaccionar directamente con el DNA, principalmente con los grupos fosfatos (Sequaris y

Siatek, 1991; Wedrychowski et al., 1985; Jacobson y Turner, 1980), sin embargo en nuestro trabajo utilizando sistemas donde se tiene al DNA desnudo, se obtuvieron resultados negativos, es decir, no se detectó la inducción de rompimientos en el DNA por parte del plomo y el cadmio abordado mediante diferentes estrategias, estas diferencias pueden ser debidas a que la interacción propuesta entre los metales y el DNA es a través de la formación de entrecruzamientos DNA-proteína, por lo cual este tipo de interacción no puede evidenciarse como rompimientos de la cadena del DNA.

Estos resultados nos llevaron a estudiar otras alternativas de mecanismos de acción indirectos que nos permitieran explicar como se genera el daño al DNA observado. Dentro de estas alternativas están la generación de especies reactivas de oxígeno, el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria y la inhibición de la reparación del DNA. Uno de los mecanismos generales propuestos en la genotoxicidad de metales es el daño oxidativo, dado mediante la generación de radicales libres, ya sea por la producción de ERO o mediante la depleción o inhibición de antioxidantes celulares (Silbergeld et al., 2000). La producción de ERO considerada como indicador de estrés oxidativo, el cual esta dado por la disrupción de procesos celulares que controlan el balance antioxidante-oxidante (Halliwell y Cross, 1994) fue evaluado mediante la cuantificación de los niveles de peroxidación de lípidos de membrana en pulmón, hígado y riñón de ratón mostrando resultados positivos, si bien, la inducción de peroxidación lipídica por parte del plomo y el cadmio ha sido reportada en estudios *in vitro*, no había indicaciones de daño oxidativo inducido por parte de estos metales *in vivo* (Bondy y Guo, 1996; Adonayalo y Oteiza, 1999; Ariza et al., 1998, Sarkar et al., 1998; Yiin et al., 1999; Silbergeld et al., 2000). Es importante hacer notar que el balance redox no es fácil de alcanzar puesto que se ha observado que la exposición aguda a metales como el Cd induce la lipoperoxidación y a la vez reduce rápidamente los niveles de antioxidantes como la catalasa (Hodgson y Fridovich, 1975; Kono y Fridovich, 1982; Sunderman, 1986), sin embargo Sarkar y colaboradores en 1998 reportan que conforme el tratamiento involucra más días, se disparan mecanismos de desintoxicación o de defensa antioxidante ya que los niveles de antioxidantes se inducen a valores más altos que los normales (Sarkar, 1999), lo cual podría explicarnos la presencia de estrés oxidativo detectado

Como se mencionó anteriormente, otro mecanismo involucrado en la generación de radicales libres es mediante la depleción de antioxidantes celulares, por esto se empleó el modelo celular en el cual los niveles intracelulares de GSH eran diferentes, encontrando que ambos metales tienen la capacidad de inducir daño oxidativo al DNA, el cual incrementa si los niveles intracelulares de GSH son bajos o nulos, esto indica que el GSH juega un papel importante en el mantenimiento del equilibrio redox celular y es por ello que cuando sus niveles son bajos debido a la exposición se produce mayor genotoxicidad. Es decir, proponemos que el mecanismo mediante el cual el plomo y el cadmio inducen rompimientos en el DNA, depende en gran medida del balance redox celular presente durante el tratamiento, el cual se da tanto por las especies reactivas de oxígeno generadas y la respuesta antioxidante no solo del GSH, sino también por la catalasa y la superóxido dismutasa (Liu y Jan, 2000).

Otro mecanismo de acción indirecto que mostró estar presente por la exposición a Pb y Cd fue la respuesta proinflamatoria, esto se reflejó en el incremento de citocinas como el TNF α y la IL-1 α , pudiendo observar una mayor respuesta de ello en el órgano de primer contacto (pulmón), mientras que en el hígado tuvo menor magnitud y el riñón no la presentó, este fenómeno observado en riñón puede ser debido a que por la gran actividad metabólica del órgano, éste posee niveles elevados de antioxidantes que van a regular la producción de ERO (Waz y Feld, 1994), por lo cual no se desencadena la respuesta inflamatoria tan fácilmente. El Pb indujo esta respuesta de manera directa, mientras que por la exposición a Cd se encontró una relación inversa entre la respuesta inflamatoria y los niveles de radicales libres, puesto que cuando se detectó una disminución en los niveles de peroxidación lipídica hubo una inducción de las citocinas, estos resultados coinciden con Oberdöster et al., (1994), Dong et al., (1998) y Hart et al., (2001) quienes reportan que las citocinas pueden inducir antioxidantes, metalotioneina y proteínas de respuesta a estrés, las cuales producen una disminución de los niveles de radicales libres. Por otro lado, la inhibición de la reparación del DNA por efecto de estos metales ha sido ampliamente reportada (Hartwig, 1994; Hartwig, 1995; Sarkar, 1999) y es considerada como un mecanismo de acción indirecto, importante para la generación de daño al DNA. A este respecto, nuestros resultados utilizando un modelo celular murino de origen transgénico, mostraron que estos metales no causan la inhibición de la reparación cuando

el GSH tiene niveles normales, estas diferencias se podrían explicar por la diferente sensibilidad de las líneas celulares utilizadas, ya que si bien, Hartwig (1994) reporta que la reparación es inhibida por el Pb y el Cd en células HeLa a concentraciones más elevadas que las empleadas en este trabajo, también reporta esta inhibición en células V79 a concentraciones bajas. Recientemente la misma Hartwig y colaboradores, (1999) reportan que cada compuesto metálico ejerce un mecanismo de inhibición de la reparación único, el cual va a depender de la concentración y el tipo celular.

Por otro lado, retomando nuestros resultados a este respecto, se pudo apreciar que dependiendo del estatus intracelular del GSH el proceso se ve alterado, mostrando que cuando los niveles de GSH son bajos se genera un retraso en la cinética reparativa. Si bien hay pocos trabajos que relacionen los niveles de GSH intracelular y los procesos de reparación, esta relación es inferida por algunos autores (Prise et al., 1992; Huang et al., 1993; Hirano et al., 1997).

Esto podría indicar que si por efecto del Pb y el Cd se establece una respuesta inflamatoria como lo mostramos anteriormente, esto repercutiría en el incremento de los niveles de GSH intracelular como lo propone Hart et al., (2001); por ende no esperaríamos que en los animales se inhibiera el proceso de la reparación del DNA. Esto no exime la posibilidad de detectar daño oxidativo como el detectado en este trabajo, por lo cual, no sería un requisito tener inhibición de la reparación para observar el daño genotóxico.

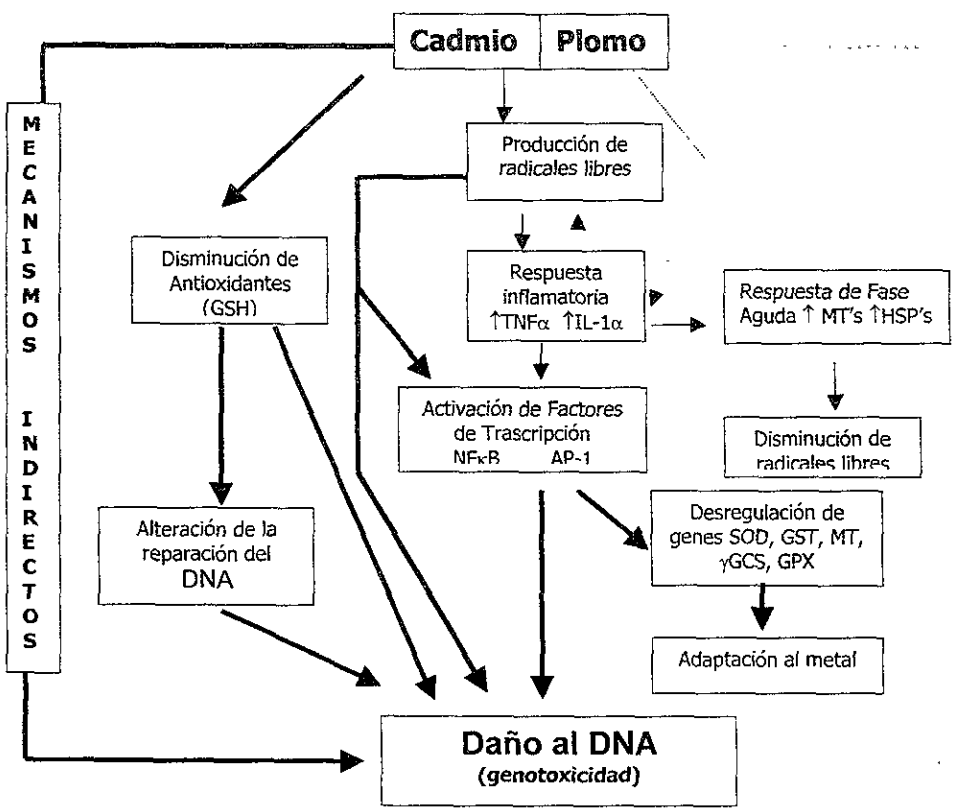
Como es posible apreciar, los factores involucrados en la inducción de daño al DNA por la inhalación de Pb y Cd son varios, lo cual complica la predicción cronológica de los eventos que suceden desde la exposición a estos agentes hasta la aparición del daño y aún más, si se desea explicar la carcinogenicidad de estos metales. A pesar de estas complicaciones, es posible decir que a concentraciones equivalentes a la norma permitida para ambos metales en aire, estos no tienen la capacidad de interactuar directamente con el DNA, por lo cual, su capacidad genotóxica es producto de mecanismos de acción indirectos, como el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria reflejada en los niveles de $TNF\alpha$ e $IL-1\alpha$, los cuales repercuten tanto en la generación de ERO y de estrés oxidativo atribuyendo en gran medida éstos últimos efectos a los niveles intracelulares de GSH. Así mismo, los niveles de este antioxidante mostraron tener un papel importante en el proceso de la reparación del DNA. La inhibición de este proceso que ha sido manejado

como un mecanismo de acción por parte de los metales solo mostró ser afectado cuando los niveles intracelulares de GSH estaban abatidos o era nulos. Esto nos indica que la inhibición de la reparación del DNA puede ser un efecto tardío a la exposición a estos metales y depende en gran medida del estado redox celular, o bien, de la concentración del(os) tratamiento(s).

Si bien con los resultados obtenidos en este proyecto, no logramos entender en su totalidad la secuencia de eventos entre la exposición vía inhalatoria a metales y la inducción de daño al DNA, sabemos que la respuesta esta en entender la interacción existente entre las especies reactivas de oxígeno que generan estrés oxidativo y el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria, en la cual se inducen tanto al $TNF\alpha$ como a la $IL-1\alpha$, citocinas que son inductores potenciales del factor nuclear $NF\kappa B$, el cual ha mostrado ser inducido por estrés oxidativo (Janseen et al., 1997) y además tienen inferencia sobre procesos celulares tan importantes como lo es el rescate celular de la muerte apoptótica (Ariza et al., 1999; Sarkar 1999), la representación esquemática de estos procesos involucrados en la inducción de daño al DNA por efecto del plomo y el cadmio se muestran en la figura 5.

Con esto es posible plantear perspectivas en cuanto a describir las vías de señalización intracelular involucradas con todos estos procesos, de forma independiente y dependiente de la generación de especies reactivas de oxígeno

Figura 5.- Factores involucrados en la inducción de daño al DNA por la exposición a Plomo y Cadmio.



VI CONCLUSIONES

- La exposición vía inhalatoria a acetato de plomo y cloruro de cadmio induce daño genotóxico expresado como rompimientos de cadena sencilla del DNA.
- El acetato de plomo y el cloruro de cadmio (1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} M) no tienen la capacidad de generar rompimientos en el DNA, al interaccionar directamente con el material genético
- El acetato de plomo y cloruro de cadmio (1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} M) son genotóxicos cuando interaccionan con proteínas asociadas a DNA.
- La inhalación de acetato de plomo y cloruro de cadmio generan estrés oxidativo, evaluado por los niveles de peroxidación de lípidos de membrana, tanto por tratamientos agudos como por subcrónicos en diferentes fracciones celulares.
- La exposición a concentraciones de 50 y 100 μ M de acetato de plomo y cloruro de cadmio no tienen la capacidad de inhibir el proceso de reparación del DNA.
- La capacidad reparativa del daño inducido por plomo y cadmio, se ve alterada cuando los niveles de GSH intracelular son bajos o nulos.
- La exposición vía inhalatoria a plomo y cadmio desencadena una respuesta inflamatoria que cursa con incremento en los niveles de citocinas como la IL-1 α y el TNF α en el órgano de primer contacto (pulmón) y en el hígado.
- La exposición vía inhalatoria a plomo y cadmio no induce incremento de los niveles de citocinas inflamatorias como el TNF α e IL-1 α en el riñón.
- La generación de daño al DNA por la exposición vía inhalatoria a plomo y cadmio es debida a mecanismos de acción indirectos que dependen del estado redox celular

VII BIBLIOGRAFIA

1. Adonayalo V.N. y Oteiza P.L. Pb^{2+} promotes lipid oxidation and alterations in membrane physical properties. *Toxicology* 132(1):19-32 (1999).
2. Agrawal A. y Bhattacharya S. Binding property of rat and Limulus C-reactive proteins (CRP) to mercury. *Experientia*. 45:567-570 (1989).
3. Ariza M.E., Bijur G.N., Williams M.V. Lead and mercury mutagenesis: role of H_2O_2 , superoxide dismutase and xanthine oxidase. *Environ Mol. Mutagen.* 31:352-361 (1998).
4. Ariza M.E., Bijur G.N., Williams M.V. Environmental metal pollutants, reactive oxygen intermediaries and genotoxicity. *Molecular Approaches to Determine Mechanisms of Toxicity*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Mass. pp 189 (1999).
5. Balasubramanian B., Pogozelski W.K., Tullius T.D. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:9738-9743 (1998).
6. Beyersmann D. Y Hechtenberg S. Cadmium, gene regulation and cellular signaling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144:247-261 (1997).
7. Bhattacharyya D., Boulden A.M., Foote R.S., Mitra S. Effect of polyvalent metal ions on the reactivity of human O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase. *Carcinogenesis*. 9:683-685 (1988).
8. Binder S. Hazards of low level lead exposure recognized. *Am J. Public Health*. 82:1043-1044 (1992).
9. Boiteux S., Gajewski E., Laval J., Dizdaroglu M. Substrate specificity of the *Escherichia coli* FPG protein (Formamidopyrimidine-DNA glycosylase): Excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry*. 31:106-110 (1992).
10. Bondy S.C. y Guo S.X. Lead potentiates iron-induced formation of reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* 87(2-3):109-112 (1996)
11. Borghesi L.A., Youn J., Olson E.A., Lynes M.A. Interactions of metallothionein with murine lymphocytes: plasma membrane binding and proliferation. *Toxicology*. 108:129-140 (1996).

12. Browder A., Joselow M., Louria D. The problem of lead poisoning. *Medicine*. 52:121-139 (1973).
13. Browne D.R., Husni A., Risk M.J. Airborne lead particulate levels in Semarang, Indonesia and potential health impacts. *Sci. Total Environ.* 227(2-3) 145-154 (1999).
14. Buege J.A. y Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-310 (1978).
15. Cakman I., Kirchner H., Rink L. Zinc supplementation reconstitutes the production of interferon- α by leukocytes of elderly persons. *J. Interferon Cytokine Res.* 17:469-472 (1997).
16. Calsou P., Frit P., Bozzato C., Salles B. Negative interference of metal (II) ions with nucleotide excision repair in human cell-free extracts. *Carcinogenesis*. 17:2779-2782 (1996).
17. Carson D.A., Seto S., Wasson D.B., Carrera C.J. DNA strand breaks, NAD metabolism, and programmed cell death. *Exp. Cell Res* 164:273-281 (1986)
18. Casto B.C., Meyers J., DiPaolo J.A. Enhancement of viral transformation for evaluation of the carcinogenic or mutagenic potential of inorganic metal salts. *Cancer Res.* 39:193-198 (1979).
19. Cohen M., Latta D., Coogan T., Costa M. Metal Carcinogenesis. En: *Biological effects of heavy metals. Vol II.* Foulkes E C CRC Press. Boca Raton, FL. Pp 19-75 (1990),
20. Coogan T.P., Bare R.M., Waalkes M.P. Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113:227-233 (1992)
21. Cook M.E. y Morrow H. Anthropogenic Sources of cadmium in Canada National Workshop on Cadmium Transport Into Plants, Canadian Network of Toxicology Centres. Ottawa, Ontario, Canada June 20-21 (1995).
22. Dally H. y Hatwig A. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells *Carcinogenesis*. 18:1021-1026 (1997).
23. Dinarello C A. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response. *N Eng J. Med.* 311:1413-1418 (1984).
24. DiPaolo J A., Nelson R.L., Casto B.C. In vitro neoplastic transformation of Syrian hamster cells by lead acetate and its relevance to environmental carcinogenesis. *Br. J Cancer.* 38:452-455 (1978).

25. Dong W., Simeonova P.P., Gallucci R., Matheson J., Flood L., Wang S., Hubbs A., Luster M.I., Toxic Metals stimulate Inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151:359-366 (1998).
26. Evans S.W. y Whicher J.T. An overview of the inflammatory response. En: Whicher J.T. y Evans S.W. *Biochemistry of Inflammation.* (Immunology and medicine; 18). Kluwer Academic Publishers. USA. pp 1-15 (1992).
27. Fortoul T.I., Saldívar O.L., Tovar T.A., Salazar D., Castilla M.E., Olaiz-Fernández, G. Metals in lung tissue from autopsy cases in Mexico city residents: comparison of cases from the 1950s and the 1980s. *Environ. Health Perspect.* 104:630-632 (1996).
28. Galvao L. Y Corey G. Cadmio. Serie vigilancia IV. Centro Panam. De Ecol. Hum. y Salud. México. pp 1-69 (1984).
29. Goyer R.A. Cap 19 En: Amdur O.M.; J. Doull; C.D. Klaasen. Casarett and Doull's *Toxicology The Basic Science of Poisons.* Pergmont Press. USA. pp 623-680 (1991).
30. Goyer R.A. y Cherian M.G. Preface. En: *Toxicology of Metals. Biochemical Aspects.* Goyer R.A. y Cherian M.G. Springer Verlag. Berlin Alemania. pp 467 (1995).
31. Gutteridge J.M.C. Reactive of hydroxy and hydroxy-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. *Biochem. J.* 224:761-767 (1984).
32. Halliwell B. y Cross C.E. Oxygen-derived species: their reñation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.* 102(10):5-12 (1994).
33. Harrison R.E. y Nicholls D.M. The induction of *alpha1-acid glycoprotein* by methylmercury. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 85(1) 11-15 (1986).
34. Hart B.A., Potts R.J., Watkin R.D. Cadmium adaptation in the lung - a doble-edge sword?. *Toxicology.* 160:65-70 (2001).
35. Hartman A. y Speit G. Comparative investigation of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test *Environ. Mol Mutagen.* 23:299-305 (1994).
36. Hartmann M. y Hartwig A. Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. *Carcinogenesis.* 19:617-621 (1998).

37. Hartwig A. Current aspects in metal genotoxicity. *BioMetals*. 8:3-11 (1995).
38. Hartwig A. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium- induced genotoxicity: A review. *Environ. Health Perspect.* 102(3):45-50 (1994).
39. Hartwig A., Dally H., Schlepegrell R. Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: Use of the bacteria Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicology Letters*. 88:85-90 (1996).
40. Hartwig A., Gröblichhoff U.D., Beyersmann D., Natarajan A.T., Filon R., Mullenders L.H.F. Interaction of arsenic (III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis*. 18:399-405 (1997).
41. Hartwig A., Mullenders L.H.F., Asmuß M., Benters M., Krüger I. Effect of metal compounds on the function of zinc finger proteins involved in DNA repair. En. *Metals and Genetics*. Sarkar B. Kluwer Academic Plenum Publishers, New York. p 159-169 (1999).
42. Hartwig A., Schlepegrell R., Beyersmann D. Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 241:75-82 (1990).
43. Hatch G.E., Boykin E., Graham J.A., Lewtas J., Pott F., Luod K., Mumford J.L. Inhalable particles and pulmonary host defense: In vivo and in vitro effects of ambient air and combustible particles. *Environ. Res.* 36:67-80 (1985).
44. Hirano T., Yamaguchi Y., Kasai H. Inhibition of 8-hydroxyguanine repair in testes after administration of cadmium chloride to GSH-depleted rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 147:9-14 (1997).
45. [http:// www. cadmium.org/](http://www.cadmium.org/)
46. Huang H., Huang C.F., Wu D.R., Jinn C.M., Jan K.Y. Glutathione as a cellular defence against arsenite toxicity in cultured Chinese hamster ovary cells. *Toxicology*. 79:195-204 (1993).
47. Hodgson E.K y Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzymes. *Biochemistry*. 14:5294-5299 (1975).
48. IARC. Some metals and metallic compound IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum 23 (1980).
49. Imbert J., Zafarullah M., Culotta V.C., Gedamu L , Hamer D Transcription factor MBF-1 interacts with metal regulatory elements of higher eucaryotic metallothionein genes. *Mol Cell Biol* 9:5315-5323 (1989)

50. Jacobson K.B. y Turner J.E. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology*. 16:1-37 (1980).
51. Janssen Y.M.W., Timblin C.R., Zanella C.L., Jimenez L.A., Mossman B.T. Induction of Gene Expression by Environmental Oxidants Associated with Inflammation, Fibrogenesis, and Carcinogenesis. En: Forman H.J. y Cadenas E. *Oxidative Stress and Signal Transduction*. Chapman & Hall. New York, USA. Pp 387-414 (1997).
52. Johnson F.M. The genetic effects of environmental lead. *Mutat. Res.* 410:123-140 (1998).
53. Kanematsu N., Hara M., Kada T. Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutat. Res.* 77:109-116 (1980).
54. Kasprzak K.S. Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Invest.* 13:411-430 (1995)
55. Kasprzak K.S., Jaruga P., Zastawny T.H., North S.L., Riggs C.W., Olinski R., Dizdaroglu M. Oxidative DNA base damage and its repair in kidneys and livers of nickel(II)-treated male F344 rats. *Carcinogenesis*. 18:271-277 (1997).
56. Kasten U., Mullenders L.H.F., Harwig A. Cobalt (II) inhibits the incision and the polymerization step of nucleotide excision repair in human fibroblasts. *Mutat. Res.* 383:81-89 (1997).
57. Klaassen C.D. y Liu J. Induction of metallothionein as an adaptive mechanisms affecting the magnitude and progression of toxicological injury. *Environ. Health Perspect.* 106:297-300 (1998).
58. Klein C.B., Frenkel K., Costa M. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis *Chem. Res. Toxicol.* 4:592-604 (1991).
59. Kono Y. y Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257:5751-5754 (1982).
60. Koop S.J., Barron J.T., Tow J.P. Cardiovascular actions of lead and relationship to hypertension: a review. *Environ. Health Perspect.* 78:91-99 (1988)
61. Koropatnick J. y Zalupus R.K. Effect of non-toxic mercury, zinc or cadmium pretreatment on the capacity of human monocytes to undergo lipopolysaccharide-induced activation. *Br. J. Pharmacol.* 120:797-806 (1997)
62. Landrigan P.J. Current issues in the epideemiology and toxicology of occupational exposure to lead *Environ. Health Perspect* 89:61-66 (1990)

63. Landrigan P.J., Boffetta P., Apostoli P. The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: A critica review. *Am. J. Ind. Med.* 38(3):231-243 (2000).
64. Leonard A. y Bernard A. Biomonitoring exposure to metal compounds with carcinogenic properties. *Environ. Health Perspect.* 101(3):127-133 (1993).
65. Liou S.H. Occupational disease profilee in Taiwan, Republic of China. *Ind. Health.* 32:107-118 (1994).
66. Liu F. y Jan K.Y. DNA damage in arsenite and cadmium-teatment bovine aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 28(1):55-63 (2000).
67. Loeb L.A. Cancer cells exhibit a mutator phenotype *Adv. Cancer Res.* 72:26-56 (1997).
68. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L , Randall R.J. Protein mesurement with the Folin Phenol Reagent *J. Biol. Chem.* 193:265-275 (1951).
69. Luo Y., Han Z., Chin S.M., Linn S. Three chemically distinct types of oxidants formed by iron-mediated Fenton reaction in the presence of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 91:12438-12442 (1994)
70. Lynn S , Yew F.H., Chen K.S., Jan K.Y. Reactive oxygen species in nickel inhibition of DNA repair *Environ Mol. Mutagen* 29 208-216 (1997).
71. Magos L. Epidemiological and experimental aspects of metal carcinogenesis: physicochemical properties, kinetics, and the active species. *Environ. Health Perspect.* 95.157-189 (1991).
72. Mahaffey K.R Quantities of lead producing health effeects in humans: sources and bioavailability *Environ. Health Perpect* 19:285-295 (1977).
73. Martell E.A. Chemistry and metabolism of metals. Relevant to their carcinogenicity. *Environ. Health Perspect.* 40:27-34 (1981)
- 74 Martin D.W. Capítulo 24. Porfirinas y pigmentos biliares. En Martin D W., P. Mayes y V. Rodwell. Manual moderno "Bioquímica de Harper", México pp 318-333 (1984).
75. Mendel R , Ryser H.J.P. Mutagenicity of cadmium in *Salmonella typhimurium* and its synergism with two nitrosamines *Mutat. Res.* 18:9-16 (1984).
- 76 Mendoza O.S Analisis de la relación entre los niveles de plomo en sangre, protoporfirinas eritrocitarias libres y aberraciones cromosómicas en mujeres puerperas y sus productos Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias, UNAM (1996)

77. Miller C.A. III, y Costa M. Characterization of DNA-protein complex induced in intact cells by the carcinogen chromate. *Mol. Carcinogen.* 1:125-133 (1988)
78. Mineral Industry Surveys. Lead, Monthly. US Department of the Interior. US Geological Survey. Minerals Information, Reston, Virginia. April (1996).
79. Mitra R.S., Gray R.H., Chin B., Bernstein I.A. Molecular mechanisms of accomodation in *Escherichia coli* to toxic levels of Cd^{2+} . *J. Bacteriol.* 121:1180-1188 (1975).
80. Mukai F.H. y Goldstein B.D. Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acid *Science.* 191:868-869 (1976).
81. Müller T., Schuckelt R., Jaenicke L. Cadmium/zinc metallothionein induces DNA strand breasks in vitro. *Arch. Toxicol.* 65:20-26 (1991).
82. Myers M.A., Fleck A., Sampson B., Colley C M., Bent J., Hall G. Early plasma protein and mineral changes after surgery: a two stage process. *J. Clin. Pathol.* 37:862-866 (1984).
83. Nishioka H. Mutagenic activities of metal compounds in bacteria *Mutat. Res.* 31:185-189 (1975).
84. Nocentini S. Inhibition of DNA replication and repair by cadmium in mammalian cells. Protective interaction by zinc. *Nucleic Acids Res.* 15:4211-4225 (1987).
85. Nolan C.V. y Shaikh Z.A. Lead nephrotoxicity and associated disordeers:biomedical mechanisms. *Toxicology.* 73:127-147 (1992).
86. Nordberg G F. y Nordbeg M. Biological monitoring of cadmium. En. Clarkson T.W , Frieberg G.F., Nordberg G.F., Sager P.R. Biological Monitoring of Toxic metals. Plenum Press, New York, USA pp 169-197 (1988)
87. Nover L. y Scharf K.D. Synthesis, modification and structural binding of heat-shock proteins in tomato cell cultures. *Eur J. Biochem.* 139(2) 303-313 (1984)
88. Nriagu J.O y Kim M.J. Emmisions of lead and zinc from candles with metal-core wicks *Sci Total Environ* 250(1-3):37-41 (2000).
89. Oberdöster G , Cherian M.G., Baggs R.B. Correlation between cadmium-induced pulmonary carcinogenicty, metallothionein expression and inflammatory processes: a species comparison. *Environ. Health Perspect.* 102(3):257-263 (1994).
90. Ochi T. y Ohsawa M Induction of 6-thioguanine-resistant mutants and single-strand scission of DNA by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells *Mutat. Res.* 111 69-78 (1983).

91. Ochi T., Takahasi K., Ohsawa M. Indirect evidence for the induction of a prooxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction. *Mutat. Res.* 180:257-266 (1987).
92. OECD. Risk Reduction Monograph N° 5: Cadmium OECD Environmental Directorate, Paris, France. (1994).
93. Olaiz G., Fortoul T.I., Rojas R., Doyer M., Palazuelos E., Tapia C.R. Risk factors for high levels of lead in blood of schoolchildren in Mexico city. *Arch. Environ. Health.* 51(2):122-126 (1996).
94. Prise K.M., Davies S., Stratford M.R., Michael B.D. The role of non-protein sulphhydryls in determining the chemical repair rates of free radical precursor of DNA damage and cell killing in Chinese hamster V79 cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 62:297-306 (1992).
95. Propenoe E.A. y Schmaeler M.A. Interaction of human DNA polymerasa β with ions of cooper, lead and cadmium. *Arch. Biochem. Biophys.* 196:109-120 (1979).
96. Reid T.M., Feig D.I., Loeb L.A. Mutagenesis by metal-induced oxygen radicals. *Environ. Health Perspect.* 102(3):57-61 (1994)
97. Robinson S.H., Cantoni O., Costa M. Strand breakage and decreased molecular weight of DNA induced by specific metal compounds. *Carcinogenesis.* 3:657-662 (1982).
98. Rojas E., Valverde M., Kala S.V., Kala G., Lieberman M W. Accumulation of DNA damage in the organs of mice deficient in γ -glutamyltranspeptidase. *Mutat. Res.* 447:305-316 (2000).
99. Romieu I., Palazuelos E., Meneses F. Vehicular traffic as a determinant of children's blood lead levels: a pilot study in Mexico City. *Arch. Environ. Health.* 47:246-249 (1992)
100. Rossman T.G. Metal Mutagenesis. En: Goyer R.A. y Cherian G. *Toxicology of Metals. Biochemical Aspects.* Springer-Verlag, Berlin Alemania. pp 373-405 (1995)
101. Rossman T.G. y Molina M. The genetic toxicology of metal compounds. II Enhancement of ultraviolet light-induced mutagenesis in E Coli WP2. *Environ. Mutagen.* 8:263-271 (1986).
102. Rossman T.G., Molina M., Meyer L.W. The genetic toxicology of metal compounds: I. Indroduction of λ prophage in E Coli WP2s (λ). *Environ. Mutagen.* 6:59-69 (1984).

103. Rossman T.G., Zelikoff J.T., Agarwal S., Kneip T.J. Genetic toxicology of metal compounds: an examination of appropriate cellular models. *Toxicol. Environ. Chem.* 14:251-262 (1987).
104. Roy N.K. y Rossman T.G. Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutat. Res.* 298:97-103 (1992).
105. Sainikow K., Gao M., Voitekum V., Huang X., Costa M. Altered oxidative stress responses a nickel-resistant mammalian cells. *Cancer Res.* 54:6407-6412 (1994).
106. Sánchez I. Cloruro de cadmio inhalado y daño bronquiolar. Estudio experimental agudo con diferentes dosis en ratón. Tesis para obtener el grado de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM (1994).
107. Sarkar B. *Metals and Genetics*. Kluwer Academic Plenum Publishers, New York. pp 396. (1999).
108. Sarkar S., Yadav P., Bhatnagar D. Lipid peroxidative damage on cadmium exposure and alterations in antioxidant system in rat erythrocytes: A study with relation to time. *BioMetals.* 11:15157 (1998).
109. Scicchitano D.A. y Pegg A.E. Inhibition of O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase by metals. *Mutat. Res.* 192:207-210 (1987).
110. Schneider J.E., Price S., Maidt M.L., Gutteridge J.M.C., Floyd M.A. Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakages. *Nucleic Acids Res.* 18:631-635 (1990).
111. Schroeder J.J. y Cousins R.J. Interleukin 6 regulates metallothioneine gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 87:3137-3141 (1990).
112. Séquans J-M Y Siatek J. Interaction of DNA with Pb²⁺ voltametric and spectroscopic studies. *Bioelectrochem Bioenergetics.* 26:15-28 (1991).
113. Silbergeld E.K., Waalkes M., Rice J.M. Lead as a carcinogen: Experimental Evidence and Mechanisms of Action. *Am.J. Ind. Med.* 38:316-323 (2000).
114. Sirover M.A. y Loeb L.A. Infidelity of DNA synthesis in vitro: screening for potential metal mutagens or carcinogens. *Science.* 194:1434-1436 (1976)
115. Skerfving S. Biological monitoring of exposure to inorganic lead. *En Clarkson T.W., L. Friberg, G F Nordberg y P.R. Sager. Biological monitoring to toxic metals.* Plenum Press, New York, USA. pp 169-197 (1988)
- 116 Skreb Y., Habazin-Novak V Lead induced modification of the response to X-rays in human cells in culture *Stud Biophys* 63:97-103 (1977).

117. Sletten E. Y Nerd I W. In *Metals in Biological Systems. Mercury and Its Effects on Environment and Biology*. Vol 34. Ed: Sigel A. y Sigel H. Marcel Dekker. Inc. New York, USA. pp 479-501 (1997).
118. Snow E.T., Foote R.S., Mitra S. Base-pairing properties of O⁶-methylguanine in template DNA during in vitro DNA replication. *J. Biol. Chem.* 259:8095-8100 (1984).
119. Snyder R.D. Ed: *Biological Effects of Heavy Metals*. Vol II. Metal Carcinogenesis. Foulkes E.C. CRC Press. Boca Raton FL pp 77-93 (1990).
120. Snyder R.D. Role of reactive oxygen species in metal-induced DNA strand breakage in human diploid fibroblasts. *Mutat. Res.* 193:237-246 (1988).
121. Snyder R.D., Davis G.F., Lichmann P. Inhibition by metals of x-ray and ultraviolet-induced DNA repair in human cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 21:389-398 (1989).
122. Stecyk N.H., Cantilen L.R., Klisen C.D. Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53:4700-4780 (1980).
123. Sunderman F.W. Jr. Metals and lipid peroxidation. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 59(7):248-255 (1986).
124. Sunderman F.W. Jr. Search for molecular mechanisms in the genotoxicity of nickel. *Scand. J. Work Environ. Health.* 19(1):75-80 (1993).
125. Szuster-Ciesielska A., Lokaj I., Kondefer-Szerszen M. The influence of cadmium and zinc ions on the interferon and tumor necrosis factor production in bovine aortic endothelial cells. *Toxicology.* 145:135-145 (2000)
126. Takahashi K., Imeda T., Kawazoe Y. Effect of metal ions on the oxidative response induced by N-methyl-N-nitrosourea in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157:1124-1130 (1988).
127. Takahashi K., Imeda T., Kawazoe Y. Inhibitory effect of cadmium and mercury ions on the induction of the oxidative response in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 254:45-53 (1991).
128. Teneinbein M. Lead-glycoline base: the role of tetraethyl lead. *Hum. Exp. Toxicol.* 16(4):217-222 (1997).
129. Timbrell J.A. *Introduction to toxicology* Taylor & Francis Ltd. London. p167 (1995).
130. Viverde M., Fortoul T I, Díez-Briig F, Mejía J., Rojas E. Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhibition in several organs of CD-1 mice. *Mutagenesis.* 15(2):109-114 (2000)

131. Valverde M., Fortoul T.I., Díaz-Barriga F., Mejia J., Rojas E. Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. *Mutagenesis* En prensa (2001).
132. Van Snick J.L., Masson P.L., Heremans J.F. Involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation. *J. Exp. Med.* 140:1068-1084 (1974).
133. Waz W.R. y Feld L G. Reactive oxygen molecules in the kidney. En. *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. Armstrong D. Plenum Press, New York. p 171-183 (1994).
134. Wedrychowski A., Schmidt W.N., Hnilica L.S. The in vivo cross-linking of proteins and DNA by heavy metals. *J. Bio. Chem.* 261:3370-3376 (1985).
135. Wellinghausen N., Driessen C., Rink L. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by zinc and related cations. *Citokine.* 8:767-771 (1996).
136. Williams M.V., Winters T., Waddell K.S. In vivo effects of mercury (II) on deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* 31:200-207 (1986).
137. Wood R.D. y Shivji M.K.K. Which DNA polymerases are used for DNA-repair in eukaryotes?. *Carcinogenesis.* 18:605-610 (1997).
138. Yamada H., Miyahara T., Sasaki Y.F. *Inorganic cadmium increases the frequency of chemically induced chromosome aberrations in cultured mammalian cells.* *Mutat. Res.* 302:137-145 (1993).
139. Yangou M., Ge X., Carter K.C., Papaconstantinou J. Induction of several acute-phase protein genes by heavy metals. A new class of Metal-responsive Genes. *Biochemistry.* 30:3798-3806 (1990).
140. Yin S J., Chern Ch.L., Sheu J.Y., Lin T.H. Cadmium induced lipid peroxidation in rat testes and protection by selenium. *BioMetals.* 12:353-359 (1999)
141. Zakour R.A., Kunkel T.A., Loeb L.A. *Metal-induced infidelity of DNA synthesis.* *Environ. Health Perspect.* 40:197-205 (1981).
142. Zelikoff T.J., Li J.H., Hartwig A., Wang X.W., Costa M., Rossman T.G. Genetic toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis.* 9:1727-1732 (1988).
143. Zhong Z., Troll W, Koenig K.L., Frenkel K. Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H₂O₂ formation by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Res.* 50: 7564-7570 (1990).
144. Zuñiga M.A, González D, Molina G. Erythrocyte protoporphyrin IX as a diagnostic and therapy evaluating tool in lead poisoning. *Arch. Environ Health.* 36:40-43 (1981)

145. Zwart . . ., Meermann J.H., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E Biomarkers of free radical damage applicaLions in experimenLal animals and in humans. Free Rad. Biol. Med. 26:202-226 (1999).