



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

¿SON LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO LA CAUSA DEL DAÑO CITO Y
GENOTÓXICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS EMBRIONARIAS HUMANAS (WRL 68)
Y FIBROBLASTOS MURINOS (3T3) EXPUESTAS A CADMIO?

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
PAULINA ADRIANA RAMOS ESPINOSA



EXAMENES PROFESIONALES^S
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F.,

2005



m. 343904



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente Prof. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
Vocal Prof. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ
Secretario Prof. MAHARA ANGÉLICA VALVERDE RAMÍREZ
1er Suplente Prof. MARIA DE LOURDES MAYET CRUZ
2º Suplente Prof. DAVID GUILLERMO MENDOZA COZATL

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM



Dra. Mahara Valverde Ramirez.

Asesor



Paulina Adriana Ramos Espinosa.

Sustentante

Dedico este trabajo a las tres personas que han sido el apoyo y el impulso de mis sueños: mis padres Celso y Rafaela y a mi hermano Octavio.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	6
1.1	Generalidades.....	6
1.2	Toxicología del cadmio.....	7
1.3	Evidencias de carcinogenicidad.....	8
1.4	Mecanismos involucrados en la cito y genotoxicidad.....	13
a)	Estrés oxidativo.....	13
b)	Radicales libres y Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).....	14
c)	Lipoperoxidación.....	17
II.	JUSTIFICACIÓN.....	21
III.	HIPÓTESIS.....	22
IV.	OBJETIVO GENERAL.....	23
V.	MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	25
5.1	Cultivos celulares.....	25
5.2	Tratamientos.....	25
5.3	Evaluación de la citotoxicidad (cFDA-BrEt).....	27
5.4	Extracción y Cuantificación de Proteína.....	27
5.5	Medición de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).....	28
5.6	Medición de la Lipoperoxidación (MDA).....	29

5.7 Evaluación de la Genototoxicidad mediante Electroforesis Unicelular (Ensayo Cometa).....	30
5.8 Análisis Estadístico.....	33
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	34
VII. RESULTADOS.....	35
7.1 Citotoxicidad.....	35
7.2 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).....	38
7.3 Lipoperoxidación.....	40
7.4 Genotoxicidad.....	42
7.5 Papel de las ERO y la lipoperoxidación en la citotoxicidad.....	48
7.6 Papel de las ERO y la lipoperoxidación en la genotoxicidad.....	52
VIII. DISCUSIÓN.....	57
IX. CONCLUSIONES.....	64
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA.....	65

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

El cadmio es un metal pesado, miembro del grupo II de la tabla periódica, es un elemento traza no esencial que está presente en la naturaleza en lugares como el suelo, sedimentos, aire, agua y rocas, así como en plantas, vegetales, granos y cereales (**Peraza, 1998**). El suelo y las rocas contienen concentraciones variadas de este metal y lo liberan cuando éstos se encuentran en contacto con el mar, ríos o lagos, estimándose una contribución de cadmio al ambiente de entre 25 y 30 mil toneladas, además de otras fuentes como lo son los incendios forestales y los volcanes (**www.cadmium.org**). Otras fuentes en las que podemos encontrar el cadmio son las debidas a las actividades humanas, es decir las fuentes antropogénicas. Éstas se estima que oscilan entre 4 y 13 mil toneladas por año, siendo las más importantes las realizadas por la industria minera, la combustión de carburantes fósiles (**www.cadmium.org**) y el cigarrillo (**Yiin et al 1999; Wahba et al. 1993; Kadrabova et al. 1993**). Específicamente en México la producción total de cadmio durante 2002 – 2003 fue de 1,389 toneladas (**coremisgm.gob.mx**). En ambos casos, la naturaleza y las fuentes antropogénicas, el viento es un factor importante para la dispersión de las partículas de éste metal, para que posteriormente pueda llegar de nuevo al suelo o al agua y ser tomado por peces, plantas y vegetales o por el mismo hombre.

Debido a la gran actividad industrial y al creciente número de vehículos que contribuyen a la combustión de gasolina, ciudades como la nuestra (México, D.F.) tienen altos índices de contaminación ambiental, siendo los metales pesados, como el cadmio un aporte importante (**www.cadmium.org**).

La extensa gama de utilidades que se le da al cadmio se enfoca en la industria de aleaciones, pigmentos (15%), estabilizadores plásticos (10%), en la producción de baterías recargables (35%) y otros (10%) **(Peraza, 1998; Waisberg, 2003)**, lo que ocasiona que exista un alto riesgo de exposición a este metal por los trabajadores de estas industrias **(www.cadmium.org)**. Se calcula que en Estados Unidos al menos 512 000 empleados están expuestos a cadmio al año **(Patrick 2003)**.

1.2 Toxicología del Cadmio

Debido a que el cadmio es un metal con el cual el hombre está en constante contacto es importante el estudio de las repercusiones que pueda tener este metal sobre la salud.

De primera instancia es fundamental conocer las formas en que el cadmio puede llegar al organismo. En la población en general el cadmio entra al cuerpo por la dieta, el agua, las partículas dispersas en el ambiente y el humo del cigarro. La mayor parte del cadmio se transporta al riñón, hígado y pulmón **(Carson et al. 1987; Yiin et al. 1999; Kim et al. 2003)**, donde se almacena por largo tiempo (17 a 30 años) y la parte que no se acumula el cuerpo lo excreta en las heces y orina **(Peraza, 1998)**. Debido a lo anterior, se puede inferir que el principal daño que ocasione el cadmio, será en los órganos en donde se deposita mayoritariamente (hígado y riñones). Las principales manifestaciones y padecimientos que ocasiona el cadmio debido a una exposición aguda son: fiebre, náusea, vómito, dolor de cabeza, tos, disnea e irritación nasofaríngea, aumento de la salivación, sensación de encierro, diarrea, anemia, albuminuria, hepatitis,

anuria, daño tubular irreversible, edema agudo de pulmón y muerte por insuficiencia respiratoria, mientras que una exposición crónica puede llevar al desarrollo de cáncer de próstata, de pulmón y de riñón; osteoporosis, desnutrición, enfisema pulmonar, daño a las gónadas, proteinuria y cálculos renales (**Carson et al, 1987; Nordberg y Nordberg, 1988; Peraza, 1998; Patrick, 2003**).

Dado que los mayores daños a la salud ocasionados por el cadmio se presentan en personas ocupacionalmente expuestas (POE), hay un gran interés por conocer los mecanismos mediante los cuales el cadmio es considerado un poderoso carcinógeno.

1.3 Evidencias de la Carcinogenicidad

El cadmio está clasificado por la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) como carcinógeno humano, categoría I (**Nordberg y Nordberg, 1988; Bal et al., 2002; Kawanishi et al., 2002; Satoh et al. 2002**), y se encuentra entre las sustancias más peligrosas (séptima) en la lista del Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos (**E.P.A., 2002**). Dentro de los antecedentes que apoyan su potencial carcinogénico se encuentran el que ha mostrado ser predominantemente no mutagénico en pruebas con bacterias y débilmente mutagénico en células de mamíferos *in vitro*. Los compuestos de cadmio han probado ser comutagénicos en experimentos con células animales cuando se combinan con otros agentes mutagénicos. Este metal también induce la formación de rompimientos de cadena sencilla en el DNA, la formación de entrecruzamientos DNA-proteína, aberraciones cromosómicas e inhibe los

procesos de reparación del DNA (**Hartwig, 1994; Valverde et al., 2000; Waisberg, 2003; Clarck y Kunkel, 2004**).

Hasta ahora se han descrito diversos mecanismos de acción por los cuales el cadmio podría desencadenar un proceso degenerativo como el cáncer, dentro de éstos se encuentran los siguientes:

1. **Efecto sobre la regulación génica.** Específicamente en aquellos genes que son inducidos por el metal y que su desequilibrio podría inducir carcinogénesis. En este caso se ven involucrados proto-oncogenes que participan en la activación transcripcional tardía cuando las células están expuestas a sustancias mutagénicas como el cadmio. Estos genes, *c-fos*, *c-jun* y *c-myc*, controlan el crecimiento y la división celular, al igual que se ven involucrados en la proliferación y diferenciación celular (**Waisberg, 2003**).
2. **Efecto en la muerte celular por apoptosis.** El cadmio induce apoptosis en ratas expuestas *in vivo e in vitro*, al igual que en otros modelos celulares de mamífero. El mecanismo por el cual induce apoptosis es vía mitocondrial por la activación de la caspasa-9 aunque contradictoriamente también se ha demostrado que existe una protección a esta respuesta dada por incremento en los niveles de proteína Bcl-2. La inducción de la apoptosis inducida por cadmio se correlaciona negativamente con la expresión de p53 -a mayor apoptosis menor expresión de p53-, éste es un gen supresor de tumores, por lo que este comportamiento se interpreta como un riesgo a tumorigenesis desencadenado por la exposición a cadmio (**Waisberg, 2003**).

3. **Inhibición de la reparación del DNA.** La fidelidad y la integridad de la información genética en los organismos se mantiene debido a la intervención de diversos mecanismos de reparación de daño al DNA. Se ha observado que bajas concentraciones de cadmio inhiben la DNA polimerasa β , proteína necesaria para la remoción de daño en el DNA, participante en al menos dos mecanismos de reparación (reparación por escisión de bases y de nucleótidos) al igual que se ha observado que el metal inhibe el proceso de ligación en ambos mecanismos de reparación del DNA (**Hartwig, 1994; Brusick, 2001**). Recientemente se ha propuesto que el papel inhibitorio de la reparación por efecto del cadmio se lleva a cabo en la reparación de *Mismatch*, específicamente por la inhibición de los complejos proteicos Msh2-Msh3 y Msh2-Msh6 (**Clarck y Kunkel, 2004**).

4. **Depleción del glutatión.** Las especies iónicas de cadmio pueden ser secuestradas por el glutatión para prevenir la interacción de este metal con lugares blancos estratégicos. La exposición a cadmio induce la expresión de los genes: gama-glutamylcisteina sintetasa (GCS), glutation-S-transferasa (GST) y con ello la síntesis de GSH, este proceso tiene como consecuencia una detoxificación eficiente de las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por la exposición a cadmio. Sin embargo, debido a la alta afinidad del cadmio por los grupos sulfhidrilos, la acción de este metal también ha mostrado disminuir los niveles intracelulares de GSH (**Hartwig, 1994; Waisberg, 2003; Kim et al., 2003**).

5. **Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (Estrés oxidativo).**

El cadmio induce la producción intracelular de radicales hidroxilo, aniones superóxido, óxido nítrico y peróxido de hidrógeno, lo cual se traduce en incrementos de la peroxidación lipídica (**Waisberg, 2003**). Por otro lado, también se ha planteado que debido a que el cadmio no es un metal de Fenton, su mecanismo de acción en la generación de estas especies reactivas es a través de otros sistemas. Sin embargo se ha propuesto que las ERO generadas por la exposición a cadmio son un mecanismo indirecto mediante el cual, el metal genera daño al DNA (**Ariza et al, 1999; Valverde et al, 2001; Waisberg, 2003; Kawanishi et al, 2002**).

Son varios los trabajos realizados en modelos *in vitro* que apoyan como mecanismo de genotoxicidad indirecto del cadmio y la generación de estrés oxidativo a través del incremento en los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno; estos trabajos se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Antecedentes de la inducción de especies reactivas de oxígeno en diversos modelos celulares desencadenados por la exposición a cadmio.

Concentraciones de Cadmio	Línea Celular	Efecto	Referencia
2 –10 μ M	A ₁ Células híbridas de humano y hámster	Producción de Especies Reactivas de Oxígeno.	Filipč y Hei, 2003.
6 μ M	BALB/c-3T3	Producción de Especies Reactivas de Oxígeno.	Qu et al., 2004.
35 μ M	Fibroblastos pulmonares embrionarios humanos (MRC-5)	Producción de Especies Reactivas de Oxígeno.	Yang et al., 1997.
50 –100 μ M	Células gliales C6	Producción de Especies Reactivas de Oxígeno.	Watjen y Beyersman, 2004.
50 – 100 μ M	E. gracilis	Producción de Especies Reactivas de Oxígeno.	Watanabe et al., 2003.

Tal como se muestra en la tabla 1, los trabajos realizados *in vitro* para determinar si el cadmio induce estrés oxidativo mediante el incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno han sido realizados emplea en modelos celulares

tanto humanos como animales y los niveles de exposición que han sido superiores a los determinados en personas ocupacionalmente expuestas (POE) a cadmio (**Palus et al., 2003**), los cuales no son suficientes para evidenciar los procesos celulares que padecen los individuos expuestos al metal y con ello aportar información que explique los mecanismos de acción involucrados en la carcinogenicidad del cadmio.

1.4 Mecanismos involucrados en la cito y genotoxicidad:

a) Estrés Oxidativo

El estado redox refleja un balance entre antioxidantes de la célula o de los obtenidos de la dieta y oxidantes producidos durante el metabolismo normal celular o la debida a la exposición del organismos a agentes ambientales. Este equilibrio regula varios procesos celulares entre ellos: la transducción de señales, la expresión génica, la proliferación celular y la muerte celular, entre otros. Cuando se pierde este equilibrio, también se pierde el control de los procesos celulares anteriormente mencionados y como consecuencia se genera estrés oxidativo. En estado severo este estrés oxidativo provoca daño celular, el cual puede mediar o llevar a un estado apoptótico o a la muerte del organismo. Por lo que, el estrés oxidativo es la pérdida del equilibrio presente en las células por los agentes oxidantes y antioxidantes, es decir cuando hay un exceso de especies reactivas y la célula es incapaz de removerlas (**Ariza et al., 1999**).

La pérdida del control en el balance oxidativo está relacionada al uso de oxígeno molecular por la célula y éste puede contribuir en menor o mayor grado a la toxicidad celular (**Hengstler, 2003**). Aunque es inevitable la generación de especies reactivas debido a que tienen funciones fisiológicas en la célula y en

diferentes niveles del organismo, es importante contar con suficientes antioxidantes y enzimas para prevenir o limitar el daño que estas especies pueden generar.

La sobreproducción de especies oxidantes y radicales libres, la descompartimentalización de los complejos iónicos presentes en algunas macromoléculas de importancia biológica y la modificación de las defensas contra radicales libres son algunos de los efectos del estrés oxidativo generado en la célula **(Hengstler, 2003)**.

b) Radicales Libres y Especies Reactivas de Oxígeno

Un radical libre es cualquier especie capaz de existir de manera independiente con uno o más electrones desapareados, debido a esto son altamente reactivos, tiene un tiempo de vida media corto y pueden comportarse como donador y aceptor de electrones. Puede estar cargado positiva o negativamente o estar eléctricamente neutros. Los radicales generados tienen la capacidad de reaccionar con un no radical para dar lugar a un nuevo radical. Son producidos por procesos fisiológicos celulares y también por exposiciones a algún agente ambiental. Se forman en compartimentos como los lisosomas, mitocondrias, peroxisomas, membrana celular, retículo endoplásmico y cloroplastos, éste último en las plantas. En el caso de la mitocondria, la eliminación de electrones del oxígeno genera radicales libres **(Ariza et al., 1999)**.

Diversos estudios implican a las especies reactivas en diferentes procesos patológicos como: enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, aterosclerosis y carcinogénesis **(Ariza et al., 1999, Slupphaug et al, 2003)**.

Las especies reactivas de oxígeno son ejemplo de radicales libres y aunque existen también especies reactivas de nitrógeno, son las de oxígeno las que tienen mayor efecto en las moléculas biológicas, ver tabla 2.

El oxígeno está unido por dos electrones formando un enlace covalente pero también tiene dos electrones desapareados, esto hace que el oxígeno tenga la habilidad de oxidar otra molécula mediante la aceptación de un par de electrones. El oxígeno transfiere un electrón en sus reacciones lo que produce radicales de oxígeno. La actividad molecular puede aumentar moviendo electrones pero esto requiere energía y genera oxígeno en singulete (**Ariza et al., 1999**).

Las principales especies reactivas de oxígeno son:

Oxígeno en singulete. Las propiedades de esta molécula es que no es un radical, puede reaccionar con moléculas biológicas como lípidos de membrana y DNA, produciendo en este último mediante el rompimiento de una de sus hebras, puede ser generado por el peróxido de hidrógeno –otro radical-, la reducción del oxígeno en singulete produce el anión superóxido y tiene un tiempo de vida de microsegundos (**Ariza et al., 1999**).

Anión superóxido. Este radical es producido por la reducción molecular del oxígeno en singulete. Se forma del 2% del oxígeno reducido por las mitocondrias. Tiene reactividad química limitada comparada con otras ERO, no es capaz de cruzar las membranas biológicas, su protonación produce el radical hidropéroxilo, tiene un tiempo de vida de microsegundos (**Ariza et al., 1999**).

La desaparición del superóxido en soluciones acuosas se relaciona con su capacidad de dismutar, esto quiere decir que la misma especie es oxidada y

reducida a la vez en una misma reacción. Esta característica es más rápida en soluciones acuosas ácidas.

Peróxido de hidrógeno. Esta molécula no es un radical, se forma por la dismutación del anión superóxido y por las oxidasas celulares. Se ve involucrado en diferentes procesos biológicos como la proliferación celular, expresión genética y la transducción de señales. Puede penetrar membranas biológicas por difusión, convirtiéndose en el radical hidroxilo u otro oxidante univalente, es decir, es capaz de generar radicales libres por la interacción de un metal de transición (**Ariza et al., 1999**).

Radical hidroxilo. El radical hidroxilo se puede generar en sistemas biológicos por diversas reacciones, por ejemplo Fenton o Haber-Weiss (**Kehner, 2000**). Una de las fuentes de generación del radical hidroxilo es la radiación ionizantes, dado que el constituyente más abundante de las células es el agua, la exposición a radiaciones de alta energía (rayos γ) resulta en la producción de radicales hidroxilos. Estos son responsables del daño al DNA, proteínas y lípidos. En el DNA, el daño es debido a que se elimina un átomo de hidrógeno de la desoxirribosa lo que genera una azúcar fragmentada, ocasionando sitios sensibles al álcali, en el caso de las membranas, también se ven afectadas ya que el contacto con el hidroxilo les produce lipoperoxidación (**Ariza et al., 1999**).

Es un radical altamente reactivo, que al reaccionar con otras moléculas puede generar otro radical que al difundirse producen daño. Es considerada la especie más reactiva para atacar moléculas biológicas aunque tiene un tiempo de vida media de nanosegundos, debido a su corto tiempo de vida, generalmente actúa en

los sitios cercanos a donde se produce y esto se ve favorecido por la presencia de metales de transición (**Halliwell y Gutteridge, 1999**).

Otras Especies Reactivas de Oxígeno. Otras especies de oxígeno no meos importantes son los **hidroperóxidos orgánicos** los cuales se caracterizan por ser radicales que se forman durante la lipoperoxidación y por tener un tiempo de vida de minutos. El **ácido hipocloroso** se produce durante el estallido respiratorio y tiene un tiempo de vida media de minutos. Los radicales **peroxilo** y **óxido nítrico** tienen un tiempo de vida de segundos, mientras que el radical **peroxinitrito** la tiene de milisegundos (**Ariza et al., 1999**).

Tabla 2. Especies Reactivas de Oxígeno

Radicales	No-Radicales
Superóxido, $O_2^{\cdot -}$	Péroxido de Hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, OH^{\cdot}	Ácido Hipocloroso, $HOCl$
Peroxilo, RO_2^{\cdot}	Ozono, O_3
Alcoxilo, RO^{\cdot}	Oxígeno en singulete
Hidroperoxilo, HO_2^{\cdot}	Peroxinitrito, $ONOO^{\cdot}$

c) **Lipoperoxidación**

Entre los muchos daños que ocasionan las ERO a las macromoléculas está el generado a las membranas biológicas, a este daño se le conoce como lipoperoxidación, y consiste en la abstracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado, resultando en la formación de dienos conjugados. La lipoperoxidación genera una gran variedad de productos muchos de los cuales son

electrófilos reactivos los cuales pueden reaccionar con proteínas y DNA produciendo así toxicidad **(Manca et al. 1991; Marnett, 1999; Yiin et al. 1999)**.

Las membranas están formadas de ácidos grasos polinsaturados que contienen uno o mas grupos metilenos, éstos son altamente reactivos a agentes oxidantes, los hidrógenos son removidos para formar un radical centro-carbono, estos centros de carbono (radical) reaccionan con el oxígeno para formar otros radicales, siendo los primeros en formarse los radicales peroxilos. Si el peroxilo está a uno o dos de los dobles enlaces finales entonces se reduce a hidroperóxido. Estos son relativamente estables en ausencia de metales. Aunque las metaloproteínas son abundantes en la célula, reducen a los hidroperóxidos a radicales alcoxilo que generan mediante una reacción en cadena otros muchos productos: epóxidos, hidroperóxidos y compuestos carbonilos **(Marnett, 1999)**.

En las membranas con fosfolípidos las reducciones (radicales peroxilo a hidroperóxidos) se llevan a cabo por la vitamina E o tocoferol.

Dentro de la membrana celular, si el radical peroxilo se encuentra en una posición interna en la cadena de ácidos grasos, entonces se cicla a un doble enlace (peróxido cíclico) al radical carbono; entonces pueden suceder dos cosas: una de ellas es que interactúe con el oxígeno para formar el radical peroxilo que se reduce a hidroperóxido, y la otra, es que vuelva a ciclar y después se una al oxígeno, éste se reducirá a un intermediario para la producción de malondialdehído (MDA) e isoprostanos. Por ello el MDA es utilizado como biomarcador de la liperoxidación aunque éste no es el único producto que se forma de la liperoxidación, pero si es el mutagénico y tóxico ya que se une al DNA para formar aductos **(Marnett, 1999)**.

Estos antecedentes se plantean como mecanismos de acción indirectos mediante los cuales se puede explicar los efectos genotóxicos del cadmio, tal como lo mostramos en la figura 1. Con base en lo anterior el presente proyecto pretende generar información para explicar los eventos celulares que padecen los individuos expuestos laboralmente al cadmio y corroborar si estos procesos son similares a los descritos en modelos celulares como los presentados en la tabla 1. Por otro lado, es de interés fundamental el comparar si los efectos genotóxicos ocasionados por el cadmio son dependientes de la estirpe celular y su origen, es por ellos que planteamos comparar el comportamiento que presentan células hepáticas embionarias humanas con el desencadenado en fibroblastos murinos transformados.

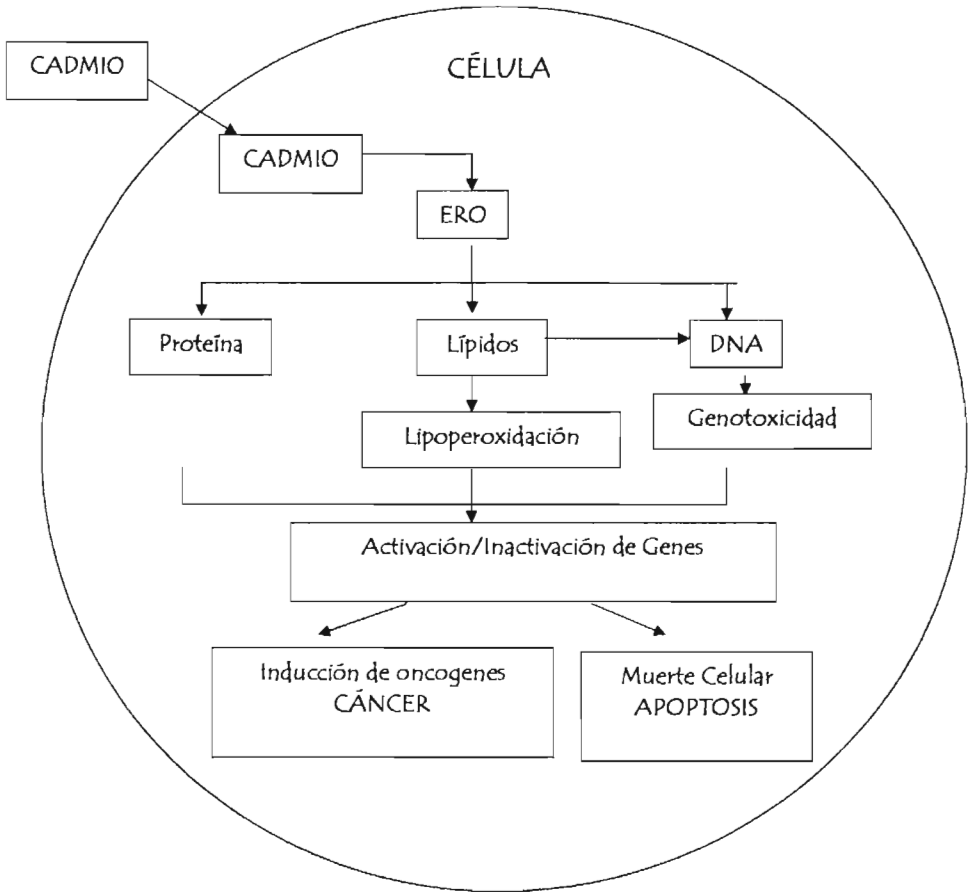


Figura 1. Resumen de los efectos celulares desencadenados por la exposición a Cadmio descritos en los antecedentes.

II. JUSTIFICACIÓN

Los estudios realizados para determinar la genotoxicidad y carcinogenicidad del cadmio se han realizado empleando concentraciones elevadas del metal, debido a esto es nuestro interés conocer lo eventos celulares que ocurren por la exposición a cadmio en concentraciones similares a las presentes en Personas Ocupacionalmente Expuestas (0.05 – 0.2 μM) (Palus et al., 2003). Así mismo, se pretende comparar el efecto ocasionado a estas concentraciones en células hepáticas humanas: WRL68 – donde sabemos que se metabolizan la mayor parte de los xenobióticos- y otras células que son comúnmente utilizada para este tipo de estudios, pero que su origen es diferente además de ser un modelo celular transformado (3T3).

III. HIPÓTESIS

Debido a que el cadmio es un xenobiótico que ha mostrado capacidad de generar estrés oxidativo se espera que la producción de radicales libres provoque daño a macromoléculas tales como lípidos y DNA al tratar células empleando concentraciones de cadmio semejantes a las presentes en personas que laboran en una planta de reciclaje de baterías.

IV. OBJETIVO GENERAL

Conocer si la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y el estrés oxidativo son los responsables del daño citotóxico y genotóxico en células hepáticas embrionarias humanas (WRL68) y en fibroblastos murinos (3T3) expuestos a concentraciones de cadmio equivalentes a las presentes en Personas Ocupacionalmente Expuestas (POE).

Objetivos Particulares

- a) Determinar la citotoxicidad producida en células previamente expuestas a concentraciones de cadmio equivalentes a las presentadas en POE a cadmio mediante la determinación de actividad metabólica.
- b) Determinar la cantidad de Especies Reactivas de Oxígeno presentes en las células expuestas a concentraciones de cadmio reportadas en POE.
- c) Cuantificar el daño oxidativo presente en las membranas lipídicas en células previamente expuestas a concentraciones de cadmio reportadas en POE.
- d) Determinar la genotoxicidad, expresada como rompimientos de cadena sencilla en el DNA, producida en células previamente expuestas a concentraciones de cadmio equivalentes a las determinadas en POE a cadmio, mediante la técnica de Electroforesis Unicelular.
- e) Correlacionar la cantidad de Especies reactivas de Oxígeno y los niveles de lípoperoxidación con la citotoxicidad y genotoxicidad inducidas por la exposición a cadmio.

V. MATERIALES Y METODOLOGÍA

5.1 Cultivos Celulares

Se trabajó con los siguientes cultivos celulares: células hepáticas embrionarias humanas (WRL68) y fibroblastos murinos transformados (3T3). Las células fueron cultivadas en medio D-MEM suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de penicilina-estreptomicina (Invitrogen). Todos los cultivos fueron incubados a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Los cambios de medio de cultivo se realizaron cada tercer día.

5.2 Tratamientos

Se prepararon soluciones acuosas de cloruro de cadmio para dar tratamientos equivalentes a las concentraciones reportadas por personas expuestas ocupacionalmente (**Palus et al., 2003**) y superiores: 0, 0.05, 0.5, 1.0, 2.5 µM.

Se cultivaron las células en cajas de cultivo de 10mm² durante 24 hrs con 10 ml de medio, una vez que se alcanzaba una densidad de 1 x 10⁶ de células, se iniciaba el tratamiento con las diferentes concentraciones de cloruro de cadmio. Los tratamientos tuvieron diferentes duraciones, se inició con tratamiento agudo de 2 horas, otra serie fue tratada por 24 horas y finalmente otras por 72 horas cada una con su respectivo control (sin tratamiento). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el tratamiento fue eliminado con solución de fosfatos pH 7.4 (PBS) y finalmente las células se cosecharon en PBS enriquecido con inhibidores de proteasas

en microtubos debidamente rotulados, respetando cada concentración con su tiempo de incubación respectivo. Es preciso mencionar que se realizaron tres experimentos independientes con su respectivo duplicado para todas las condiciones experimentales. Estas condiciones experimentales se muestran esquemáticamente en la figura 2.

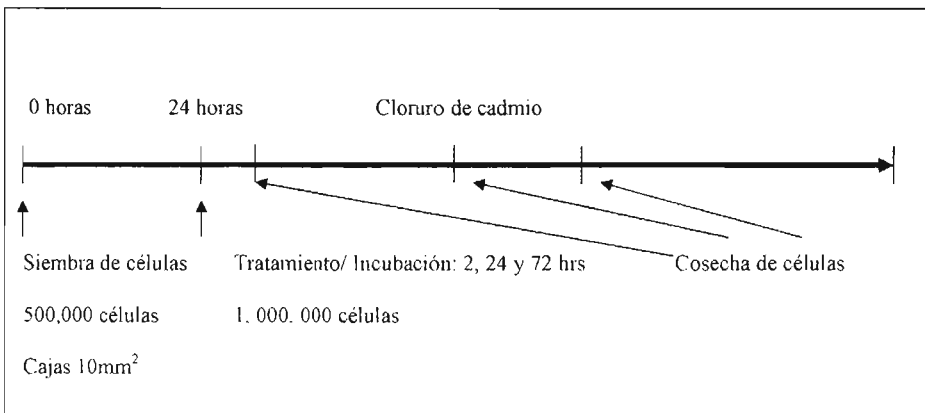


Figura 2. Esquema del diseño experimental para tratar a las células WRL-68 y 3T3 por 2, 24 y 72 horas con diferentes concentraciones de cloruro de cadmio. La flecha esquematiza el transcurso del tiempo.

Para realizar la siembra de los cultivos de manera homogénea entre cajas y experimentos se cuantificó el número de células empleando una hematocitómetro o cámara de Neubauer y una tinción de exclusión con azul tripano. La tinción de exclusión con azul tripano se basa en la integridad de la membrana de una célula viable que no permite que el colorante penetre, observándose células refringentes vivas y células muertas en tonalidades azuladas, esto con la finalidad de considerar solo las células vivas para la siembra de los cultivos. Este mismo procedimiento se empleó para determinar si el cultivo había alcanzado una densidad de 1×10^6 células.

5.3 Evaluación de la Citotoxicidad (cFDA-BrEt)

Se determinó la citotoxicidad del tratamiento recibido con cloruro de cadmio después de los respectivos tiempos de incubación (2, 24 y 72 hrs) mediante la técnica de tinción dual con fluorocromos.

La tinción dual con fluorocromos: bromuro de etidio (BrEt) y carboxi-diacetato de fluoresceína (cFDA), se basa en una reacción de óxido-reducción donde se evidencia la actividad metabólica del lisosoma, misma que refleja la viabilidad de la célula **(Strauss, 1991; Hartmann y Speit, 1995)**.

Se colocaron 5 µl de la suspensión celular después del tratamiento con cloruro de cadmio en un portaobjetos limpio, a éste se le añadieron 5 µl del reactivo fluorescente (cFDA en acetona, PBS y bromuro de etidio en PBS), esta mezcla se distribuyó homogéneamente en la laminilla y se colocó un cubreobjetos. Se observó al microscopio de fluorescencia donde las células viables presentaban un color verde y las muertas color rojo-anaranjado, utilizando un filtro dual (U-M61002/410). Los resultados se expresaron en porcentajes después de la evaluación de aproximadamente 10 campos o al menos 100 células.

Finalmente se realizaron los cálculos para determinar la citotoxicidad de cada muestra y tratamiento en todas las condiciones experimentales.

5.4 Extracción y Cuantificación de Proteína

Las células fueron cosechadas previo lavado con solución de fosfatos (PBS) pH 7.2-7.4 en una solución enriquecida con un mezcla de inhibidores de proteasas, posteriormente se tomaron alícuotas de estas muestras para realizar la extracción de

proteína. Se sometieron a lisis mediante ondas sonoras con un sonicador (Ultrasonic Homogenizer 4710) aplicando 10 pulsos de 10 segundos a una amplitud de 50mA por cada muestra manteniendo los tubos inmersos en hielo.

Para la cuantificación de proteínas se utilizó un método colorimétrico del BCA (ácido bicinconínico), preparando una curva patrón con albúmina para posteriores cálculos. Este método se basa en la detección colorimétrica del BCA para la detección y cuantificación de proteína total. Este método combina la reducción del (cobre) Cu^{+2} a Cu^{+1} por la presencia de proteína en un medio alcalino, teniendo una alta sensibilidad y selectividad a la detección de catión cuproso mediante la utilización del ácido bicinconínico. Se obtiene una reacción colorida (morada) debido a la quelación de dos moléculas de BCA con un anión de cobre que absorbe a 562 nm. La estructura de las proteínas, los enlaces peptídicos y la presencia de algunos aminoácidos son los puntos responsables para la coloración morada de la reacción **(Pierce, 1984)**.

Se tomaron alícuotas de 10 μl de cada muestra y se colocaron en una caja inmunológica de 96 pozos y se llevaron a un volumen final 200 μl con una solución de bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico, tartrato de sodio en 0.1M hidróxido de sodio y sulfato de cobre al 4%, se cubrió la placa y se dejó incubando a 37°C por 30 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de 562 nm empleando un lector de ELISA, Brorad.

5.5 Medición de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

El principio del método está basado en la oxidación de la dihidrorodamina-123 dependiente de la cantidad de ERO, para formar el compuesto fluorescente de rodamina-123 que se detectará con un lector de placas de ELISA a 505 nm **(Bueb et al., 1995; Lee et al., 2003)**. Las células fueron contadas con una cámara de

Neubauer para tomar una alícuota con 1×10^6 células por condición suspendidas en PBS enriquecido con inhibidores de proteasas. Posteriormente esta alícuota se centrifugó en frío a 1,200rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se desechó. Al botón celular se le agregaron 180 μ l de amortiguador A (140mM NaCl, 5mM KCl, 0.8mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.8 mM $CaCl_2$, 5 mM glucosa, 15 mM HEPES) y 20 μ l de solución madre de dihidrorodamina-123 (calbiochem cat # 309825 concentración final 1 μ M), las muestras se resuspendieron y se evaluaron las absorbancias en el lector de ELISA a 505 nm.

5.6 Medición de la Lipoperoxidación (MDA)

El principio del método se basa en la detección de malondialdehído (MDA), producto de la lipoperoxidación, dando como sustrato al ácido tiobarbitúrico (TBA). Se incubaron tubos limpios por cada muestra con 500 μ l de amortiguador Tris (150mM, pH 7.4) durante 5 minutos a 37°C, a estos tubos se le agregaron alícuotas de la muestra previamente lisadas y se incubaron por 30 minutos a la misma temperatura. Se tomaron 400 μ l de la mezcla de incubación y se añadió 4 ml de la solución de trabajo (1.5 ml de ácido acético 20% pH 3.5, 1.5 ml de TBA 0.8% y 1 ml de agua). Se calentó a ebullición durante 45 minutos tapando los tubos de vidrio con canicas para evitar la evaporación de las muestras. Se enfriaron los tubos y se añadió 1 ml de cloruro de potasio (1.2%), posteriormente se añadieron 5 ml de solución de piridina-butanol (1:15) y se agitaron. Finalmente se tomaron 3 ml de la fracción superior, se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos y se tomaron 2 ml del sobrenadante para poder leer la absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro. Aplicando el coeficiente de extinción de 0.0156 cm^{-1} se calculó la concentración de

MDA y se ajustaron los resultados al contenido de proteína total, expresando los resultados en nmol MDA/ ug de proteína (Buege y Aust, 1978).

5.7 Evaluación de la Genototoxicidad mediante Electroforesis

Unicelular (Ensayo Cometa)

Esta se basa en evidenciar el DNA fragmentado mediante una electroforesis de células individuales en condiciones alcalinas, donde los fragmentos migran hacia el ánodo evidenciándose bajo el microscopio de fluorescencia, al ser teñidos con un cromóforo como el bromuro de etidio, imágenes semejantes a un cometa cuya cola es proporcional al grado de daño.

Se tomó una alícuota de 100 μ l de la suspensión de células previo a la lisis con ondas sonoras para el ensayo de electroforesis unicelular (Ensayo Cometa). Para realizar este ensayo se prepararon previamente laminillas o portaobjetos limpios con 175 μ l de agarosa regular al 0.5% extendidos sobre éste para posteriormente ser deshidratadas por calor. Una vez seca la primera capa de agarosa, se realizó una mezcla de la suspensión celular y 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%, posteriormente se añadió esta mezcla sobre la primera capa de agarosa, colocándose un cubreobjetos y se guardó a una temperatura de 4°C por un intervalo de 2 a 5 minutos hasta que solidificó la capa. Una vez sólida se deslizó con cuidado el cubreobjetos de la laminilla hacia uno de los lados, cuidando de no maltratar las capas anteriores. Se tomaron otros 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% y se colocó nuevamente el cubreobjetos y se dejó solidificar. Al terminar la preparación de la laminillas se deslizaban el cubreobjetos y se introducían a un vaso Köppling con solución de lisis [40 ml de solución madre de lisis pH 10 (2.5 μ M NaCl, 100mM EDTA, 100 Mm Tris), 10% de DMSO y 1% de Triton X-100], cuidando de colocar espalda

con espalda cada laminilla evitando que las capas de agarosa tuvieran contacto entre sí, el procedimiento de preparación de las laminillas se muestra en la figura 3.

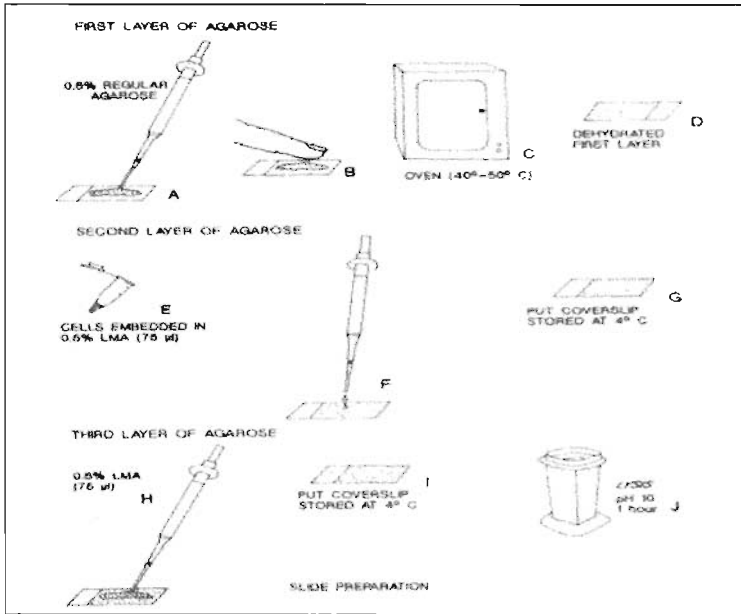


Figura 3. Preparación de laminillas o portaobjetos para realizar el ensayo cometa. (Tomado de Rojas et al., 1999.)

Se preparó un amortiguador alcalino pH > 13 (NaOH 10N, 200mM EDTA, agua destilada) para el desenrollamiento del DNA y electroforesis de las laminillas. Se montó una cámara de electroforesis horizontal sobre una cama de hielo previamente nivelada. Posteriormente se colocaron las laminillas orientadas en la misma posición, colocando siempre un control interno en la posición más cercana al ánodo de la cámara de electroforesis. Una vez colocadas todas las laminillas se vertió el amortiguador hasta cubrir las laminillas. A partir de este momento se contabilizó el

tiempo de desenrollamiento del DNA (10 minutos). Cuando se acabó el tiempo de incubación se inició el corrimiento de la electroforesis, conectando los electrodos a la fuente de poder, verificando que el voltaje fuera constante de 25 V, y que la corriente requerida hubiese alcanzado 300mA, es decir que se tuviese una corriente de 0.8V/cm. Una vez que se ajustaron éstos parámetros la electroforesis se llevó a cabo por 10 minutos.

Al término de la electroforesis las laminillas fueron transferidas a una charola con el gel hacia arriba y se les agregó cuidadosamente buffer de neutralización (Tris pH 7.5) y se incubaron por 5 minutos, este procedimiento se repitió dos veces. Posteriormente se escurrió la mayor cantidad de amortiguador de neutralización y se deshidrató con alcohol absoluto incubándose con éste por unos minutos, para finalmente secar las laminillas con aire **(Rojas et al., 1999)**.

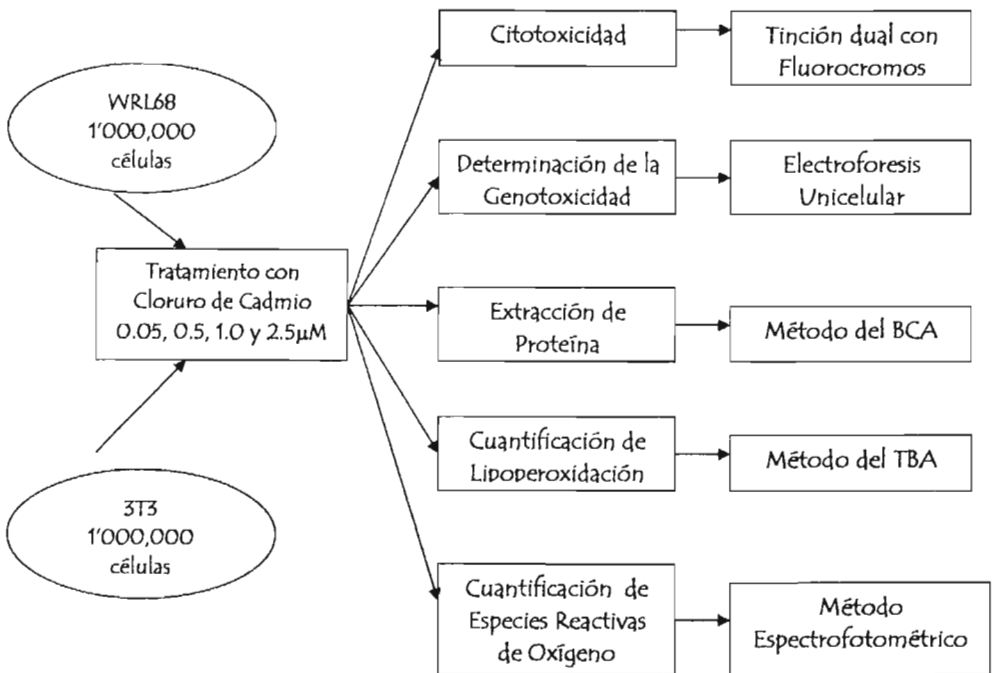
Una vez secas las laminillas se tiñeron con 20 µl de solución de bromuro de etidio (20 µg/ ml), para su posterior evaluación en un microscopio de fluorescencia (filtro de excitación de 515-560 nm y filtro de barrera de 590 nm) acoplado a un digitalizador de imágenes. Se evaluaron 50 células (cometas) por cada laminilla y por duplicado, es decir, se evaluaron 100 núcleos por cada punto experimental. El análisis del daño al DNA se realizó empleando un objetivo de 20x y el programa KOMET v. 3.1 de Kinetic Imaging Ltd. **(Rojas et al., 1999)**.

5.8 Análisis Estadístico

Para determinar las diferencias estadísticas entre las células tratadas con cadmio y los controles, para cada uno de los parámetros determinados (citotoxicidad, ERO, lipoperoxidación y genotoxicidad) se aplicó un análisis de varianza (ANOVA vs control) tomando una $p < 0.05$. Se utilizó el programa *GraphPAD In Stat*, versión 1.14 (1990).

Mientras que para las correlaciones realizadas entre los mismos parámetros medidos se utilizó un análisis de correlación simple de Pearson con una $p < 0.05$, utilizando el programa *Statistica*, versión 6.0 (1998).

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL



VII RESULTADOS

7.1 Citotoxicidad

Los efectos citotóxicos inducidos por el cadmio a concentraciones equivalentes a las presentes en personas laboralmente expuestas en líneas celulares con diferente origen y actividad metabólica se muestran a continuación:

Tabla 3. Citotoxicidad de las células WRL68 tratadas con CdCl₂

Concentraciones [μM]	%Citotoxicidad 2 hrs	%Citotoxicidad 24 hrs	%Citotoxicidad 72 hrs
0.05	21.7 +/- 5.6542	14.2+/-6.353	7.5+/-0.8409
0.5	12.7+/- 1.3543	2.6+/-2.5075	25.6+/-8.9491
1.0	15.3+/- 6.1208	20.9+/-7.4788	16.2+/-2.0375
2.5	23.6+/-10.7688	20.2+/-8.0555	31.6+/-1.9504*

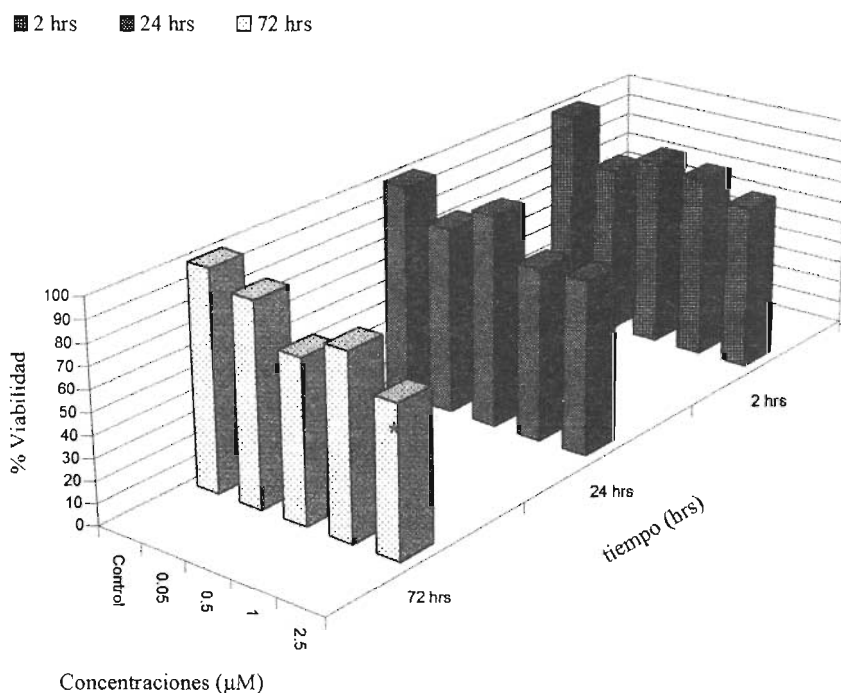
La citotoxicidad está expresada en porcentajes con respecto al control (0%) +/- el error estándar de tres experimentos independientes.

Tabla 4. Citotoxicidad de las células 3T3 tratadas con CdCl₂

Concentraciones [μM]	%Citotoxicidad 2 hrs	%Citotoxicidad 24 hrs	%Citotoxicidad 72 hrs
0.05	0 +/- 1.3235	11.2+/-7.4281	13.1+/-4.7377
0.5	0 +/- 0.0041	8.2+/-10.281	14.2+/-2.9023
1.0	0 +/- 1.1428	0+/-7.9688	22.2+/-4.5151
2.5	0 +/- 2.8874	0+/-1.2533	31.1+/-4.2534

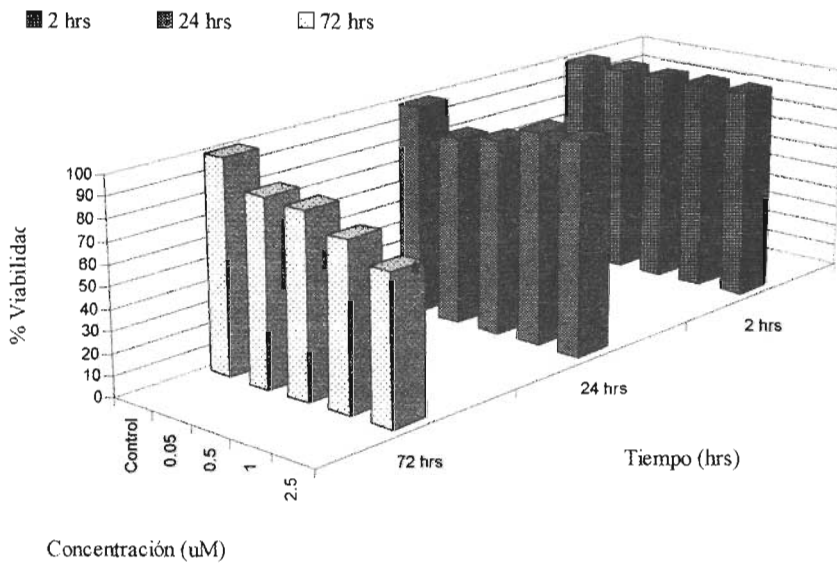
La citotoxicidad está expresada en porcentajes con respecto al control (0%) +/- el error estándar de tres experimentos independientes.

El análisis de los efectos tóxicos ocasionados por la exposición a cadmio a bajas concentraciones se realizó, determinando tanto la citotoxicidad como su inverso, la viabilidad. La representación gráfica de la viabilidad, es decir el porcentaje de células que sobreviven al tratamiento con cloruro de cadmio en ambas líneas celulares y bajo las diferentes condiciones de exposición se muestra en las siguientes gráficas.



Gráfica 1A. Viabilidad determinada mediante la prueba metabólica de fluorocromos presente en células WRL68 tratadas con cloruro de cadmio por diferentes periodos de tiempo.

* diferencias significativas ($p < 0.05$), ** diferencias muy significativas ($p < 0.001$), *** diferencias extremadamente significativas ($p < 0.0001$).



Gráfica 1B. Viabilidad determinada mediante la prueba metabólica de fluorocromos presente en células 3T3 tratadas con cloruro de cadmio por diferentes periodos de tiempo.

* diferencias significativas ($p < 0.05$), ** diferencias muy significativas ($p < 0.001$), *** diferencias extremadamente significativas ($p < 0.0001$).

7.2 Especies Reactivas de Oxígeno

La cuantificación de las Especies Reactivas de Oxígeno en células tratadas con cloruro de cadmio a concentraciones equivalentes a las presentes en POE se muestra en las tablas 5 y 6 y gráfica 2.

Tabla 5. Especies Reactivas de Oxígeno presentes en células WRL68 tratadas con CdCl₂.

Concentración [μM]	2 hrs %ERO	24 hrs %ERO	72 hrs %ERO
0.05	114.1+/-0.1022***	89.2+/-0.2676***	97.7+/-0.0361
0.5	91.6+/-0.0949***	59.3+/-0.0425***	113.3+/-0.0630
1.0	85.7+/-0.1030***	70.5+/-0.0321***	74.1+/-0.0567
2.5	88.8+/-0.0749***	99.0+/-0.2549***	71.9+/-0.0778

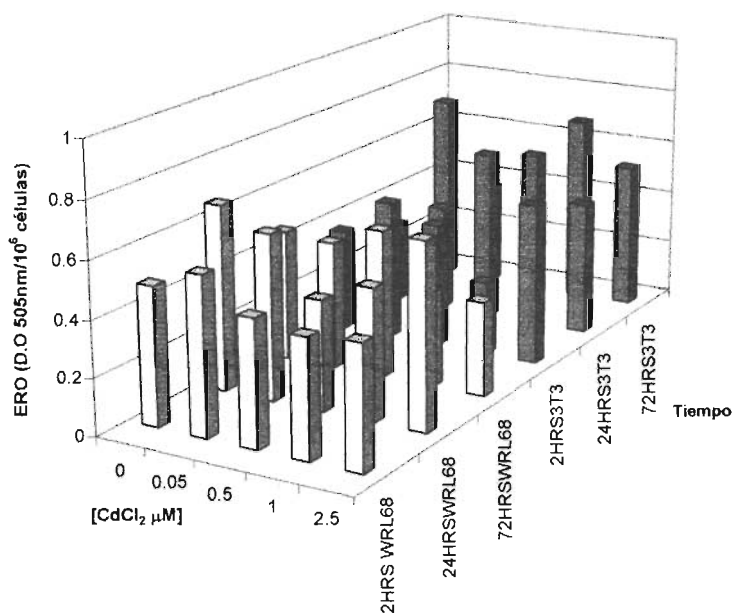
Los resultados están expresados en porcentajes con respecto al control (100%) +/- el error estándar de tres experimentos independientes. * diferencias significativas (p< 0.05), ** diferencias muy significativas (p< 0.001). *** diferencias extremadamente significativas (p< 0.0001).

Tabla 6. Especies Reactivas de Oxígeno presentes en células 3T3 tratadas con CdCl₂.

Concentración [μM]	2 hrs % ERO	24 hrs % ERO	72 hrs % ERO
0.05	137.0+/-0.1766***	131.3+/-0.0348***	54.4+/-0.0515***
0.5	121.8+/-0.0535***	209.9+/-0.2195***	44.5+/-0.0607***
1.0	71.7+/-0.0373***	218.1+/-0.1478***	99.2+/-0.4030
2.5	157.9+/-0.1434***	164.6+/-0.0964***	76.8+/-0.1098***

Los resultados están expresados en porcentajes con respecto al control (100%) +/- el error estándar de tres experimentos independientes. * diferencias significativas (p< 0.05), ** diferencias muy significativas (p< 0.001), *** diferencias extremadamente significativas (p< 0.0001).

Las tablas anteriores muestran el efecto representado como porcentaje con respecto al control mientras que en las siguientes gráficas mostramos los valores de ERO determinadas en ambas líneas celulares por la exposición a CdCl₂ (0, 0.05, 0.5, 1.0 y 2.5 μM) por diferentes periodos de tiempo.



Gráfica 2. Determinación de las ERO (D.O. a 505 nm/10⁶ células) en células WRL-68 y 3T3 tratadas con cloruro de cadmio.

WRL68 2hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1(ns), 2.5(ns); WRL68 24 hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1.0(ns), 2.5(ns); WRL68 72 hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1.0(ns), 2.5 (ns).

3T3 2hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1(ns), 2.5(ns); 3T3 24 hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1.0(ns), 2.5(ns); 3T3 72 hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1.0(ns), 2.5 (ns).

En la gráfica 2 es posible apreciar que hay menos ERO en las células WRL68 en comparación con las células 3T3. Además el comportamiento general mostrado por las células WRL es el mismo a 2 y 24 horas de tratamiento, mientras que a las 72 horas las ERO tienden a disminuir. En cuanto a las células 3T3 el comportamiento muestra una tendencia a incrementar los niveles de ERO a través del tiempo.

7.3 Lipoperoxidación.

Los efectos producidos por las ERO sobre lípidos de membrana se determinaron como la formación de MDA a partir de ácido tiobarbitúrico. Los resultados se analizaron en ambas líneas celulares y se muestran los datos como los porcentajes con respecto al control y los niveles de MDA (nmoles MDA/ μ g de proteína).

Tabla 7. Niveles de MDA producidos en las células WRL68 tratadas con cloruro de cadmio.

Concentración [μ M]	2 hrs % MDA	24 hrs % MDA	72 hrs % MDA
0.05	173.1 \pm 0.0006***	137.4 \pm 0.0013***	44 \pm 0.0021***
0.5	259.1 \pm 0.0193***	128.4 \pm 0.0011***	91.6 \pm 0.0003***
1.0	304.6 \pm 0.0007***	107.4 \pm 0.0021***	58.7 \pm 0.0020***
2.5	170.5 \pm 0.0003***	70.5 \pm 0.0007***	42.2 \pm 0.00***

Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control (100%) de tres experimentos independientes.
 * diferencias significativas ($p < 0.05$), ** diferencias muy significativas ($p < 0.001$), *** diferencias extremadamente significativas ($p < 0.0001$).

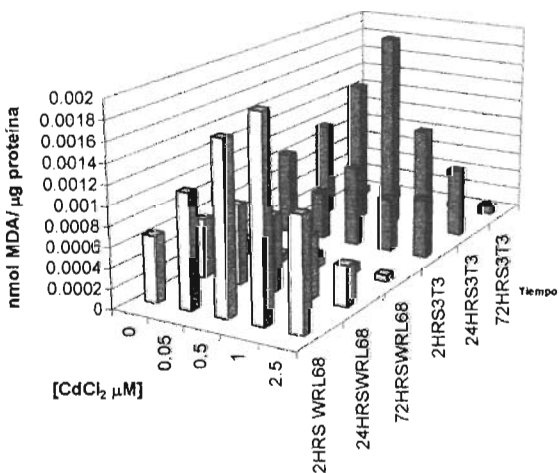
a

Tabla 8. Niveles de MDA producidos en las células 3T3 tratadas con cadmio.

Concentración [μM]	2 hrs % MDA	24 hrs % MDA	72 hrs % MDA
0.05	58.3 \pm 0.0009***	150 \pm 0.0007***	152.6 \pm 0.0017***
0.5	96.1 \pm 0.0007***	212.4 \pm 0.0008***	103.9 \pm 0.0021***
1.0	64.8 \pm 0.0015***	110.8 \pm 0.0009***	112.4 \pm 0.0034***
2.5	70.9 \pm 0.0003***	72.8 \pm 0.0007***	146.8 \pm 0.0018***

Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control (100%) de tres experimentos independientes.

* diferencias significativas ($p < 0.05$), ** diferencias muy significativas ($p < 0.001$), *** diferencias extremadamente significativas ($p < 0.0001$).



Gráfica 3 Determinación de MDA en células WRL68 y 3T3 tratadas con cloruro de cadmio.

WRL68 2hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1(ns), 2.5(ns); WRL68 24 hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1.0(ns), 2.5(ns); WRL68 72 hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1.0(ns), 2.5(ns).

3T3 2hrs: 0.05(ns), 0.5(*), 1(ns), 2.5(ns); 3T3 24 hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1.0(ns), 2.5(ns); 3T3 72 hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1.0(ns), 2.5(ns).

En la gráfica 3 es posible apreciar que en las células WRL68, los niveles de peroxidación de lípidos de membrana son menores a través del tiempo del tratamiento, mientras que para las células 3T3 el comportamiento es diferente, en éstas se observan niveles medios de lipoperoxidación a las 2 horas de tratamiento que incrementan drásticamente a las 24 horas y prácticamente desaparecen a las 72 horas de tratamiento.

7.4 Genotoxicidad.

Los rompimientos de cadena sencilla en el DNA inducidos por la exposición a cloruro de cadmio en ambas líneas celulares determinados mediante el ensayo cometa se expresan como el momento de la cola. Este parámetro determinado por el programa Komet 3.1 (Kinetic imaging Ltd.), engloba tanto el porcentaje e intensidad de los fragmentos de DNA y la migración de éstos con respecto a la cabeza del cometa (DNA súper enrollado). Por lo cual es el parámetro idóneo para expresar la genotoxicidad.

Los resultados se reportan tanto en porcentajes con respecto al control como en unidades arbitrarias del momento de la cola de los cometas, en las siguientes tablas y gráficas.

Tabla 9. Genotoxicidad inducida por la exposición a cloruro de cadmio en células WRL68 con respecto al control (100%).

Concentración [μM]	%Genotoxicidad 2 hrs	%Genotoxicidad 24 hrs	%Genotoxicidad 72 hrs
0.05	100.9+/-0.1838	87.8+/-0.2702***	119.7+/-0.4125***
0.5	106.9+/-0.2101***	96.9+/-0.2412***	103.3+/-0.3788***
1.0	95.6+/-0.1435***	111.8+/-0.3816***	107.6+/-0.4171***
2.5	97.5+/-0.1845***	105.1+/-0.3024***	97.5+/-0.3830**

Los datos representan el porcentaje de genotoxicidad +/- el error estándar de tres experimentos independientes.

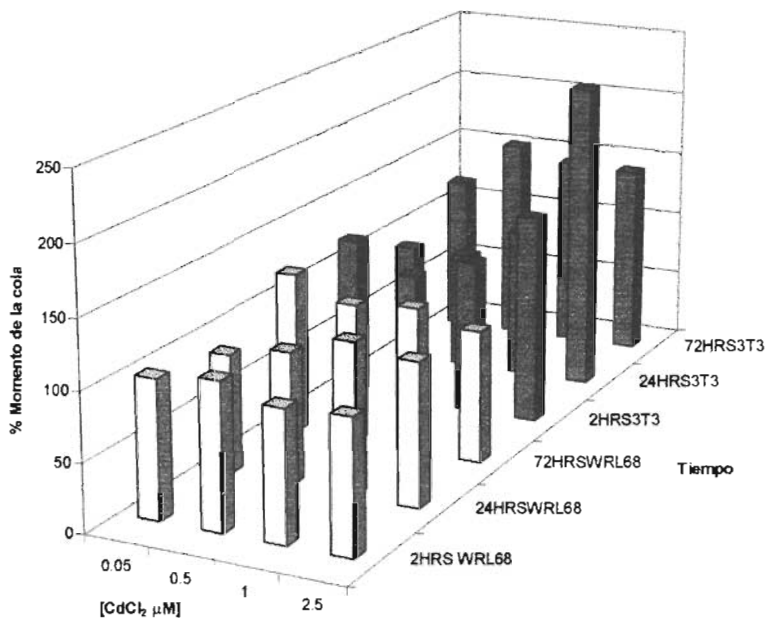
* diferencias significativas ($p < 0.05$), ** diferencias muy significativas ($p < 0.001$), *** diferencias extremadamente significativas ($p < 0.0001$).

Tabla 10. Genotoxicidad inducida por la exposición a cloruro de cadmio en células 3T3 con respecto al control (100%).

Concentración [μM]	2 hrs	24 hrs	72 hrs
0.05	119.3+/-0.5534***	88.6+/-0.2383***	119.3+/-0.2771***
0.5	97.7+/-0.4728*	88.0+/-0.2948***	155.0+/-0.4687***
1.0	115.2+/-0.5196***	112.9+/-0.3428***	146.1+/-0.3909***
2.5	155.3+/-0.6538***	231.4+/-0.5887***	144.6+/-0.3821***

Los datos representan el porcentaje de genotoxicidad +/- el error estándar de tres experimentos independientes.

* diferencias significativas ($p < 0.05$), ** diferencias muy significativas ($p < 0.001$), *** diferencias extremadamente significativas ($p < 0.0001$).



Gráfica 4. Porcentaje de genotoxicidad inducida por el tratamiento con cloruro de cadmio en células WRL68 y 3T3 con respecto a los controles.

WRL68 2hrs: 0.05(ns), 0.5(***), 1(***), 2.5(***); WRL68 24 hrs: 0.05(***), 0.5(***), 1.0(***), 2.5(***); WRL68 72 hrs: 0.05(***), 0.5(***), 1.0(***), 2.5 (**). 3T3 2hrs: 0.05(***), 0.5(*), 1(***), 2.5(***); 3T3 24 hrs: 0.05(***), 0.5(***), 1.0(***), 2.5(***); 3T3 72 hrs: 0.05(***), 0.5(***), 1.0(***), 2.5(***).

En la gráfica 4 donde se analizan los resultados como porcentaje de inducción con respecto al control, se observa que el cloruro de cadmio no induce genotoxicidad en las células WRL68, mientras que en las células 3T3 existe una tendencia a incrementar la genotoxicidad dependiendo de la concentración de CdCl₂ y el tiempo del tratamiento.

Tabla 11. Genotoxicidad expresada como el momento de la cola de los cometas en células WRL68 tratadas con cloruro de cadmio.

Concentración [μM]	2 hrs	24 hrs	72 hrs
0	2.03+/-0.1777	2.96+/-0.2461	3.66+/-0.3611
0.05	2.05+/-0.1838	2.60+/-0.2702	4.38+/-0.4125
0.5	2.17+/-0.2101	2.87+/-0.2412	3.78+/-0.3788
1.0	1.94+/-0.1435	3.31+/-0.3816	3.94+/-0.4171
2.5	1.98+/-0.1846	3.11+/-0.3024	3.57+/-0.3830

Los resultados se expresan como el promedio +/- el error estándar de tres experimentos independientes.

* diferencias significativas ($p < 0.05$), ** diferencias muy significativas ($p < 0.001$), *** diferencias extremadamente significativas ($p < 0.0001$).

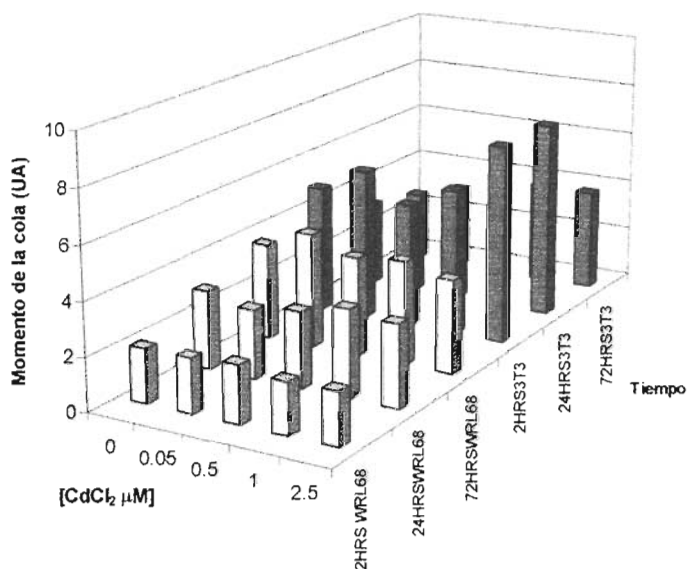
Tabla 12. Genotoxicidad expresada como el Momento de la cola en células 3T3 tratadas con cloruro de cadmio.

Concentración [μM]	2 hrs	24 hrs	72 hrs
0	4.88+/-0.4847	3.25+/-0.2966	2.69+/-0.2755
0.05	5.82+/-0.5534	2.88+/-0.2383	3.21+/-0.2771
0.5	4.77+/-0.4728	2.86+/-0.2948	4.17+/-0.4687
1.0	5.62+/-0.5196	3.67+/-0.3428	3.93+/-0.3909
2.5	7.58+/-0.6538*	7.52+/-0.5887***	3.89+/-0.3821

Los resultados se expresan como el promedio +/- el error estándar de tres experimentos independientes.

* diferencias significativas ($p < 0.05$), ** diferencias muy significativas ($p < 0.001$), *** diferencias extremadamente significativas ($p < 0.0001$).

Los datos presentados en estas tablas se muestran gráficamente en las gráficas 5, en ésta se presenta la magnitud de los rompimientos de cadena sencilla en el DNA inducidos por la exposición a cadmio en concentraciones semejantes a las presentes en POE.



Gráfica 5. Genotoxicidad inducida en células WRL68 y 3T3 por el tratamiento con cloruro de cadmio.

WRL68 2hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1(ns), 2.5(ns); WRL68 24 hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1.0(ns), 2.5(ns); WRL68 72 hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1.0(ns), 2.5 (ns). 3T3 2hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1(ns), 2.5(*); 3T3 24 hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1.0(ns), 2.5(**); 3T3 72 hrs: 0.05(ns), 0.5(ns), 1.0(ns), 2.5 (ns).

Si bien los resultados del análisis de genotoxicidad en unidades de momento de la cola son semejantes en respuesta a los mostrados en la gráfica 4, en la gráfica 5 si es

posible apreciar un ligero incremento en la genotoxicidad a 72 horas de tratamiento en las células WRL68, sin que éste sea estadísticamente significativo, mientras que en general, para las células 3T3 se aprecia un mayor efecto genotóxico por efecto del cloruro de cadmio.

El resumen de los análisis estadísticos realizados se muestra en las tablas 13 y 14. En ellas se hace la comparación de los efectos a través del tiempo para cada una de las líneas celulares utilizadas. Los resultados obtenidos de cada uno de los parámetros evaluados fueron los porcentajes con respecto al control, interpretando que este análisis refleja el comportamiento general de los procesos evaluados, que en este caso fueron, la citotoxicidad, ERO, lipoperoxidación y genotoxicidad.

Tabla 13 Resumen estadístico de las células WRL68 tratadas con cloruro de cadmio.

Efecto	2 hrs	24 hrs	72 hrs
Citotoxicidad	ns	Ns	*
Especies Reactivas de Oxígeno	***	**	ns
Lipoperoxidación	***	***	***
Genotoxicidad	**	***	***

ns: No diferencias significativas ($p > 0.05$). * hay diferencias significativas ($p < 0.05$), ** hay diferencias muy significativas ($p < 0.001$), *** hay diferencias extremadamente significativas ($p < 0.0001$).

Tabla 14 Resumen estadístico de las células 3T3 tratadas con cloruro de cadmio.

Tiempo	2 hrs	24 hrs	72 hrs
Citotoxicidad	ns	Ns	*
Especies Reactivas de Oxígeno	***	***	**
Lipoperoxidación	***	***	***
Genotoxicidad	**	***	***

NS: No diferencias significativas ($p > 0.05$), * hay diferencias significativas ($p < 0.05$), ** hay diferencias muy significativas ($p < 0.001$), *** hay diferencias extremadamente significativas ($p < 0.0001$).

7.5 Papel de las ERO y la liperoxidación en la citotoxicidad

Se realizaron correlaciones de los diferentes parámetros evaluados relacionando los valores con respecto al control. Las correlaciones simples fueron sometidas a un análisis de correlación simple de "Pearson" para determinar la significancia estadística con una $p < 0.05$.

a) **Porcentaje de Citotoxicidad vs el porcentaje de Especies Reactivas de Oxígeno**

Tabla 15. Correlación de los porcentajes de la citotoxicidad de las células WRL68 tratadas con cloruro de cadmio y los porcentajes de Especies Reactivas de Oxígeno.

Tiempo de tratamiento (horas)	"R"	"p"	Significancia estadística
2	0.3953	0.6047	ns
24	0.6383	0.3617	ns
72	0.2195	0.7804	ns

Los coeficientes de correlación se presentan con "R" y los valores de "p" para cada uno de los tiempos de tratamientos. NS: No diferencias significativas ($p > 0.05$)

Tabla 16. Correlación de los porcentajes de la citotoxicidad de las células 3T3 tratadas con cloruro de cadmio y los porcentajes de Especies Reactivas de Oxígeno.

Tiempo de tratamiento (horas)	"R"	"p"	Significancia estadística
2	0.5223	0.4737	ns
24	0.4573	0.5426	ns
72	0.6486	0.3514	ns

Los coeficientes de correlación se presentan con "R" y los valores de "p" para cada uno de los tiempos de tratamientos. NS: No diferencias significativas ($p > 0.05$)

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

b) **Porcentaje de Citotoxicidad vs el porcentaje de Lipoperoxidación**

Tabla 17 Correlación de los porcentajes de la citotoxicidad de las células WRL68 tratadas con cloruro de cadmio y los porcentajes de MDA.

Tiempo de tratamiento (horas)	"R"	"p"	Significancia estadística
2	0.8728	0.1272	ns
24	0.6206	0.3794	ns
72	0.2424	0.7575	ns

Los coeficientes de correlación se presentan con "R" y los valores de "p" para cada uno de los tiempos de tratamientos.
NS: No diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla 18. Correlación de los porcentajes de la citotoxicidad de las células 3T3 tratadas con cloruro de cadmio y los porcentajes de MDA.

Tiempo de tratamiento (horas)	"R"	"p"	Significancia estadística
2	0.8104	0.1896	ns
24	0.7545	0.2454	ns
72	0.2358	0.7642	ns

Los coeficientes de correlación se presentan con "R" y los valores de "p" para cada uno de los tiempos de tratamientos.
NS: No diferencias significativas ($p > 0.05$).

c) **Porcentaje de Citotoxicidad vs el porcentaje de Genotoxicidad inducido**

Tabla 19. Correlación de los porcentajes de la citotoxicidad de las células WRL68 tratadas con cloruro de cadmio y los porcentajes de genotoxicidad inducida.

Tiempo de tratamiento (horas)	"R"	"p"	Significancia estadística
2	0.4555	0.5445	ns
24	0.5488	0.4512	ns
72	0.9774	0.0225	*

Los coeficientes de correlación se presentan con "R" y los valores de "p" para cada uno de los tiempos de tratamientos. NS: No diferencias significativas ($p > 0.05$), * hay diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 20. Correlación de los porcentajes de la citotoxicidad de las células 3T3 tratadas con cloruro de cadmio y los porcentajes de genotoxicidad inducida.

Tiempo de tratamiento (horas)	"R"	"p"	Significancia estadística
2	0.1499	0.8501	ns
24	0.6903	0.3097	ns
72	0.3108	0.6892	ns

Los coeficientes de correlación se presentan con "R" y los valores de "p" para cada uno de los tiempos de tratamientos. NS: No diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tal como se puede apreciar en las tablas 17-20, no fue posible establecer correlaciones entre las ERO, la lipoperoxidación y la genotoxicidad con respecto a la citotoxicidad. Solo se presentó un resultado estadísticamente significativo al correlacionar la citotoxicidad y la genotoxicidad en células WRL68 a 72 horas de tratamiento (tabla 19).

7. 6 Papel de las ERO y la lipoperoxidación en la generación de Genotoxicidad

Los resultados obtenidos de los diferentes parámetros evaluados se relacionaron con respecto a su respectivo control, de igual manera se trataron estadísticamente. En las tablas 21 y 22 se muestran los resultados de este análisis.

a) Porcentaje de Genotoxicidad (*Olive Tail Moment*) vs Porcentaje de Especies Reactivas de Oxígeno

Para determinar si la genotoxicidad detectada en las células tratadas con cloruro de cadmio esta inducida indirectamente por la presencia de ERO, realizamos correlaciones lineales simples entre estos parámetros. Las correlaciones lineales fueron sometidas a un análisis de correlación simple de "Pearson" para determinar la significancia estadística con una $p < 0.05$.

Tabla 21. Correlación de las células WRL68 tratadas con cloruro de cadmio comparando los porcentajes de genotoxicidad (*Olive Tail Moment*) y los de las Especies Reactivas de Oxígeno.

Tiempo de tratamiento (horas)	"R"	"p"	Significancia estadística
2	0.2688	0.7311	ns
24	0.1152	0.8848	ns
72	0.0398	0.9602	ns

Se presentan los coeficientes de correlación "r" y los valores "p" para cada uno de los tiempos de tratamiento.
NS: No diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla 22. Correlación de las células 3T3 tratadas con cloruro de cadmio comparando los porcentajes de genotoxicidad (*Olive Tail Moment*) y los de las Especies Reactivas de Oxígeno.

Tiempo de tratamiento (horas)	"R"	"p"	Significancia estadística
2	0.5649	0.4351	ns
24	0.1737	0.8263	ns
72	0.1376	0.8624	ns

Se presentan los coeficientes de correlación "r" y los valores "p" para cada uno de los tiempos de tratamiento.
NS: No diferencias significativas ($p > 0.05$).

b) Porcentaje de Genotoxicidad (*Olive Tail Moment*) vs Porcentaje de Lipoperoxidación (MDA).

Para determinar si los niveles de oxidación de membranas celulares inducidos por los tratamientos con cloruro de cadmio son un mecanismo de genotoxicidad indirecta se correlacionaron con el daño inducido al DNA en ambas líneas celulares.

Tabla 23. Correlación de las células WRL68 tratadas con cloruro de cadmio comparando los porcentajes de genotoxicidad (*Olive Tail Moment*) y los de la lipoperoxidación.

Tiempo de tratamiento (horas)	"R"	"p"	Significancia estadística
2	0.0369	0.9631	ns
24	0.6727	0.3273	ns
72	0.2370	0.7629	ns

Se presentan los coeficientes de correlación "r" y los valores "p" para cada uno de los tiempos de tratamiento.
NS: No diferencias significativas ($p > 0.05$)

Tabla 24. Correlación de las células 3T3 tratadas con cloruro de cadmio comparando los porcentajes de genotoxicidad (*Olive Tail Moment*) y los de la lipoperoxidación.

Tiempo de tratamiento (horas)	"R"	"p"	Significancia estadística
2	0.4454	0.5546	ns
24	0.7980	0.2020	ns
72	0.7889	0.2110	ns

Se presentan los coeficientes de correlación "r" y los valores "p" para cada uno de los tiempos de tratamiento.
NS: No diferencias significativas ($p > 0.05$)

c) Especies Reactivas de Oxígeno vs Lipoperoxidación (MDA)

Con el propósito de identificar si los niveles de ERO presentes en las líneas celulares tratadas con cloruro de cadmio, ejercían efectos biológicos a nivel de los lípidos de membrana, se realizaron correlaciones lineales entre estos parámetros. Las correlaciones lineales fueron sometidas a un análisis de correlación simple de "Pearson" para determinar la significancia estadística con una $p < 0.05$.

Tabla 25. Correlación de las células WRL68 tratadas con cloruro de cadmio comparando los porcentajes de Especies Reactivas de Oxígeno y los de la lipoperoxidación.

Tiempo de tratamiento (horas)	"R"	"p"	Significancia estadística
2	0.5889	0.4111	ns
24	0.6727	0.4657	ns
72	0.2370	0.4461	ns

Se presentan los coeficientes de correlación "r" y los valores "p" para cada uno de los tiempos de tratamiento.
NS: No diferencias significativas ($p > 0.05$)

Tabla 26. Correlación de las células 3T3 tratadas con cloruro de cadmio comparando los porcentajes de Especies Reactivas de Oxígeno y los de la lipoperoxidación.

Tiempo de tratamiento (horas)	"R"	"p"	Significancia estadística
2	0.0609	0.9391	ns
24	0.2216	0.7784	ns
72	0.0503	0.9497	ns

Se presentan los coeficientes de correlación "r" y los valores "p" para cada uno de los tiempos de tratamiento.
NS: No diferencias significativas ($p > 0.05$)

Al analizar las correlaciones entre la genotoxicidad y parámetros como las ERO, lipoperoxidación, así como la correlación entre la lipoperoxidación y las ERO, no fue posible establecer correlaciones estadísticamente significativas, tal como se muestra en las tablas 21-26.

VIII. DISCUSIÓN

Los principales mecanismos de genotoxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad del cadmio, propuestos por Hengstler (2003), son: a) la generación de especies reactivas, b) inhibición de la reparación del DNA, c) depleción de los niveles de GSH y d) posiblemente también la supresión de apoptosis. Además de éstos mecanismos Waisbger y colaboradores (2003), proponen la regulación génica y la disrupción de cadherinas. Aunado a esto, en la tabla 1, mostramos antecedentes de trabajos realizados en diferentes modelos celulares (*in vitro*), en los cuales la exposición a cadmio (2 – 100 μM) genera la presencia de ERO. Si bien estos resultados son fundamentales para considerar al cadmio un carcinógeno para humanos, en el presente trabajo se planteó determinar si las Especies Reactivas de Oxígeno son responsables de la citotoxicidad y genotoxicidad del cadmio en dos líneas celulares, una de ellas hepática humana embrionaria (WRL68) y otra fibroblastos transformados de origen murino (3T3). Sin embargo, nuestro interés no solo fue comparar el comportamiento dependiendo del origen celular, sino también emplear tratamientos de cadmio en concentraciones semejantes a los niveles del metal circulantes en sangre de Personas Ocupacionalmente Expuestas, en la industria del reciclamiento de baterías cuyas concentraciones equimolares oscilan entre 0.05 – 0.2 μM (Palus et al., 2003). Así mismo, al trabajar *in vitro*, se tienen algunas limitantes cuando se desea realizar exposiciones crónicas, fue por ello que en el presente trabajo se decidió establecer condiciones estándares de trabajo que pudieran ser empleadas en el mayor tiempo posible de exposición, de donde pudimos establecer el diseño experimental mostrado en la metodología (Figura 2). Cabe

mencionar que este tipo de condiciones nos permitió determinar la mayor parte de las variables a considerar de una misma muestra, lo cual fue otro de los objetivos, puesto que con ello disminuye la variabilidad de la respuesta entre replicas. Una vez desarrollado el trabajo, los resultados fueron analizados de acuerdo a los objetivos particulares establecidos, de ahí que la discusión de los resultados se desarrollará apoyándonos en las tablas 13 y 14, donde hacemos alusión a la respuesta de los procesos celulares evaluados desde una perspectiva de porcentajes de inducción con respecto a las condiciones control.

Para conocer el estado en el que se encontraban las células una vez que el tiempo de tratamiento había transcurrido, fue necesario determinar la citotoxicidad o la viabilidad de éstas. De esta manera podemos observar que las células presentan una viabilidad mayor al 70% a lo largo del tiempo en ambas líneas celulares, lo cual quiere decir que los demás parámetros evaluados, no son debidos a que las células estuvieran en un estado de muerte ya fuera por necrosis o apoptosis. Las células humanas embrionarias mostraron mayor efecto citotóxico que los fibroblastos murinos. A partir de los resultados mostrados en las tablas 3 y 4 se puede establecer que las concentraciones equimolares a las presentes en POE a cadmio no tienen efecto sobre ambas líneas celulares, WRL68 y 3T3, a ninguno de los tiempos de exposición estudiados, sin embargo, los resultados positivos se presentan solo a la concentración mayor ($2.5 \mu\text{M}$), la cual es aproximadamente 100 veces mayor, y solo cuando se trabaja con el periodo de exposición más largo (72 h), lo cual sitúa el presente trabajo, dentro de los que emplea concentraciones bajas o no citotóxicas.

Debido a que el cadmio es un metal que puede generar especies reactivas de oxígeno como mecanismo que favorece la genotoxicidad y carcinogenicidad a

concentraciones citotóxicas (**Hartwig, 1994; Ariza et al., 1999**) se esperaba que la generación de éstas no fuera evidente ya que en el presente trabajo se trabajó en condiciones no citotóxicas. En las tablas 5 y 6 se puede observar la cantidad de especies reactivas de oxígeno generadas por los tratamientos con respecto a los controles (100%). En las células WRL68 las diferencias estadísticas se presentan a las primeras horas de tratamiento con el metal y son debidas a una disminución de los niveles de ERO con respecto al control, mientras que en periodos largos (72 hrs) la generación de ERO no es significativa. Esto estaría de acuerdo con lo descrito por Watjen y Beyersman (**2004**) quienes no observó generación de ERO en su modelo de estudio (células C6 gliales) por la exposición a cadmio por periodos cortos (2 horas), cabe mencionar que aunque esta línea celular es diferente de las empleadas en el presente trabajo, el efecto observado es similar para el caso de las células WRL68. Por otro lado, **Patrick (2003)** menciona que los daños celulares ocasionados por la exposición a cadmio, generalmente son a causa de exposiciones crónicas, es decir periodos largos. Aunque es difícil extrapolar estas perspectivas, puesto que él se refiere a exposiciones in vivo, sin embargo para nuestras condiciones experimentales in vitro, el periodo largo de exposición es equivalente a tratamientos de 72 horas. Con respecto a las células 3T3 se observa un efecto significativo en todos los experimentos sin importar la duración de la exposición, aunque en este caso las diferencias son debidas a incrementos en los niveles de ERO con respecto a los controles. Por lo que retomando los resultados de ambas líneas celulares podemos decir que la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno por la exposición a cadmio es dependiente del tipo celular. Lo anterior nos indica que por la pérdida del equilibrio en los niveles circulantes de ERO se esperaría tanto para las células WRL68 como para las 3T3 efectos producidos a nivel de lípidos, puesto que son uno

de los blancos moleculares de estos radicales así como otras macromoléculas del tipo de proteínas y ácidos nucleicos.

De ahí que otro de los parámetros evaluados fue la peroxidación de lípidos, cuyos porcentajes de malondialdehído producido con respecto al control (100%) por efecto del cadmio se muestran en las tablas 7 y 8. Las células WRL68 presentan la mayor inducción de lipoperoxidación por la exposición aguda a cadmio (2 horas), a las 24 horas de tratamiento los niveles se mantienen altos pero en menor magnitud, sin embargo, a las 72 horas los niveles de lipoperoxidación son mucho menores tal como se observa en la tabla 7. La representación gráfica de este efecto es más clara y se observa en la gráfica 3. Las células 3T3 muestran un comportamiento diferente, el cual consiste en presentar porcentajes de lipoperoxidación menores al de los controles por la exposición aguda a cadmio, sin embargo cuando las células se trataron por 24 horas mostraron los mayores niveles de peroxidación de lípidos de membrana los cuales tienden a disminuir en los tratamientos largos (72 horas). De estos resultados podemos destacar que la exposición a cloruro de cadmio en concentraciones equimolares y 100 veces mayores a las circulantes en individuos expuestos laboralmente no generan cambios en la inducción de especies reactivas de oxígeno en la misma magnitud que los reportados por otros grupos (**Yang 1997; Watanabe et al., 2003; Filipč y Hei 2004, Watjen y Beyersman 2004; Qu et al., 2005**), si bien este comportamiento ha sido propuesto como propio del cadmio a concentraciones no citotóxicas (**Dally y Hartwig, 1997**), es claro que la disminución de las especies reactivas genera estrés oxidativo, el cual se observa en las células WRL68 a las pocas horas de tratamiento al igual que tiende a reestablecer el equilibrio rápidamente, puesto la magnitud del daño oxidativo es mucho menor a través del tiempo, mientras que en las células 3T3 la respuesta es mucho más lenta,

en ellas la presencia de ERO requiere más tiempo para desencadenar efectos a nivel de los lípidos de membranas. De aquí que los efectos sobre el DNA de las células tratadas con cloruro de cadmio se espera sean muy débiles.

Debido a que se ha reportado que el cadmio es un metal con efectos genotóxicos en diferentes modelos celulares (**Hartwig, 1994; Waisberg et al., , 2003; Clark y Kunkel, 2004**) y también hay quienes lo identifican como un carcinógeno no genotóxico (**Waisberg et al., 2003**) se evaluó el posible daño que ocasionan las ERO al DNA (genotoxicidad) como mecanismo de acción indirecto mediante el empleo de la electroforesis unicelular o ensayo cometa. Esta metodología evalúa la presencia de rompimientos de cadena sencilla en el DNA, los cuales son daños que pueden ser producidos por radicales libres (**Rojas et al., 1999**), este tipo de alteraciones se reportan como un parámetro conocido como Momento de la cola, el cual nos relaciona la migración de los fragmentos de DNA rotos que responden al campo eléctrico aplicado durante la electroforesis y el contenido de DNA distribuido tridimensionalmente. De esta manera englobamos en un solo parámetro todos los factores que influyen para ocasionar el daño genotóxico.

Los resultados de genotoxicidad determinados como el porcentaje de inducción con respecto al control fueron significativos estadísticamente (tablas 9 y 10), sin embargo al igual que en las otras variables analizadas, el comportamiento fue diferente entre las líneas celulares. En primera instancia, las células WRL68 mostraron menos efecto genotóxico que las células 3T3, lo cual puede deberse a que las células hepáticas embrionarias humanas responden rápidamente ante los estímulos oxidantes debido a sus defensas de estrés, tal como lo observamos en la gráfica 3, donde el daño a nivel de lípidos solo fue dramático en las células tratadas 2

horas. Con respecto a los efectos genotóxicos identificados en las células 3T3, en magnitud fueron mayores que en células WRL68, pero el comportamiento muestra una tendencia a incrementar a través del tiempo de la misma manera que se comportan los efectos a nivel de lípidos de membrana, lo cual puede interpretarse como una respuesta más lenta pero dependiente de los niveles de estrés oxidante de la célula.

Para determinar si la citotoxicidad y la genotoxicidad detectada en las células tratadas con cloruro de cadmio esta inducida indirectamente por la presencia de ERO y a su vez por la peroxidación lipídica se realizaron correlaciones lineales simples entre estos parámetros. Siguiendo como posible mecanismo de acción indirecto del cadmio el sugerido en la Figura 1, en el cual se plantea que el cadmio produjera especies reactivas y que estas desencadenaran tanto un efecto citotóxico a las concentraciones equivalentes equimolares a las presentes en POE, así como peroxidación lipídica y genotoxicidad. Es importante hacer mención que los resultados entre las diferentes variables exploradas no mostraron ser muy sólidos estadísticamente, lo cual dificulta el poder establecer con certeza una secuencia de eventos que nos lleven de la exposición a la genotoxicidad. Lo que si es claro es la diferente respuesta celular que establece cada una de las líneas celulares y que quizá refleja su estado endógeno, es decir que las células WRL68 que son embrionarias humanas inmortalizadas pero no transformadas, responden más rápido ante el insulto de la exposición a cadmio, y por lo tanto detoxifican tanto las especies reactivas de oxígeno y por ende los efectos genotóxicos son mucho menores que los presentes en las células 3T3, las cuales son una línea transformada y por ende, responden lentamente al insulto del cadmio.

Estas interpretaciones se basan en las tendencias de los resultados y como se ha mencionado anteriormente no fue posible establecer efectos directos entre las variables al aplicar el análisis de regresión simple, muy probablemente los cambios observados bajo nuestras condiciones experimentales son débiles puesto que la cronicidad de los tratamientos es el punto clave cuando se trabaja con niveles de exposición subtóxicas. Sin embargo, actualmente se requiere de trabajos en los cuales se contemple que los niveles de exposición tiendan a ser reales, puesto que de otra manera se estarán describiendo los procesos moleculares implicados en la carcinogenicidad de manera errónea, puesto que los niveles de exposición empleados *in vitro*, son excesivamente altos a los que realmente constituyen la carga corporal del metal en individuos de bajo riesgo laboral.

XI. CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados:

- El cadmio en concentraciones semejantes a las presentes en individuos expuestos laboralmente no indujo la producción de Especies Reactivas de Oxígeno en células WRL68 y 3T3.
- Los niveles de ERO generados por tratamientos de cadmio a bajas concentraciones (0.05, 0.5, 1 y 2.5 μM) no produjeron peroxidación en los lípidos de membrana de las células WRL68 y 3T3.
- El cadmio a bajas concentraciones no indujo citotoxicidad y genotoxicidad en células empleadas.
- Los efectos mostrados por ambas líneas celulares en la generación de ERO, lipoperoxidación y genotoxicidad fueron diferentes en comportamiento, siendo más sensibles a los tratamientos con cadmio las células de origen murino, 3T3.
- Los tratamientos con cadmio por periodos largos (72 horas) son los que mostraron mayor efecto en los parámetros evaluados, sin embargo, no fueron de la magnitud reportada por otros grupos en los que se emplearon otros modelos celulares.
- La citotoxicidad y genotoxicidad inducida por tratamientos con cadmio a concentraciones de 0.05, 0.5, 1 y 2.5 μM por periodos de 2, 24 y 72 horas en células WRL68 y 3T3 no fueron dependientes de las especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica generadas por el metal.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ariza M., Bijur GN., Williams M., Enviromental Metal Pollutants Reactive Oxygen Intermediaries and Genotoxicity: Molecular Approaches to Determine Mechanisms of Toxicity. Ed. Kluwer Academic Publishers. EE.UU.A 1999.

Bal W., Kasimierz S., Kasprzak. Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. *Toxicol Lett.* 2002;127:55-62.

Barzilai A., Yamamoto KI. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2003;3:1109-1115.

Battle T., Stacey G. Cell Culture Models for Hepatotxicology. *Cell Biol Toxicol* 2001;17:287-299.

Brusick D. Principles and Methods of Toxicology 4^a Edicion. Ed. A. Wallace Hayes. Capitulo 17 pp 819-850, USA 2001.

Bueb JL., Gallois A., Schneider JC., Parini JP., Tschirhart E. A double labelling fluorescent assay for concomitant measurements of $[Ca^{2+}]_i$ and O_2 Production in Human Macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1244:79-84.

Buege JA., Strauss A. Microsomal lipid peroxidations. *Methods Enzymol.* 1978; 52:302-310.

Carson BL., HV. Ellis III., JL McCanN. Toxicology and Biological Monitoring of metals in humans. Including feasibility ans need. Lewis Publishers, INC. USA p.328, 1987.

Clark AB., Kundel TA. Cadmium inhibits the functions of eukaryotic MutS complexes. *J Biom Chem.* 2004;279(52):53903-53906.

Dally H., Hartwig A. Induction and repair inhibiton of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. *Carcinogenesis.* 1997; 18:1021-1026.

Enviromental Protections Agency(E.P.A.). Nacional Priorities List U.S. Diciembre 24, 2002.
<http://www.epa.gov/superfund/sites/query/queryhtm/npltotal.htm>

Filipič M. y Hei TK. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 2004;546:81-91.

Halliwell B., Aruoma OI. DNA damage by oxigen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS* 1991;281:9-19.

Halliwell B., Gutteridge M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3ª Edición. Ed. Oxford Science Publications. USA 1999.

Hartmann A., Speit G. 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* 1994; 23:299-305.

Hartmann A., Speit G. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutat Res* 1995; 346:49-56.

Hartwig A. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: A review. *Environ Health Perspect* 1994;102(Suppl 3):45-50.

Hartwig A. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett.* 2002; 127:47-54.

Hengstler J.G., Bolm-Audorff U., Faldum A., Janssen K., Reifenrath M., Götte W., Jung D., Mayer-Popken O., Fuchs J., Gebhard S., Bienfait H.G., Schlink K., Dietrich C., Faust D., Epe B. y Oesch F. Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than inherited expected. *Carcinogenesis* 2003; 24:63-73.

Hodgson E., Smart RC. *Introduction to Biochemical Toxicology*. Third Edition. Ed. John Wiley Interscience. USA 2001.

<http://www.cadmium.org> (Febrero 2005)

<http://www.coremisgm.gob.mx> (Febrero 2005)

Kadabova J., Madaric A., Ginter E. Zinc and copper in the tissues and serum of cadmium intoxicated guinea-pigs: influence of vitamin C. *Physiol Res* 1993;42:261-266.

Kawanishi S., Hiraku Y., Murata M. y Oikawa S. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 2002;32:822-832.

Kehner J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanism of toxicity. *Toxicology* 2000;149:43-50.

Kim SC., Cho MK., Kim SG. Cadmium-induced non-apoptotic cell death mediated by oxidative stress under the condition of sulfhydryl deficiency. *Toxicol Lett* 2003; 144:325-336.

Lee VM., Quinn PA., Jennings SC., Ng LL. NADH Oxidase Activity in Preeclampsia With Immortalized Lymphoblast Used As Models. *Hypertension* 2003;41:925-931

Manca D., Ricard AC., Trottier B., Chevalier G. Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology* 1991;67:303-323.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999; 424:83-95.

Nordberg G.F. y M. Nordberg. Biological monitoring of cadmium, en Clarkson T.W., L.Friberg, G.F. Nordberg and P.R. Sager. Biological monitoring of toxic metals. Plenum Press, New York, USA pp 169-197, 1988.

Palus J., Rydzynski K., Dziubaltowska E., Wyszynska K., Natarajan A.T. y Nilsson R. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat Res* 2003; 540:19-28.

Patrick, ND., Toxic Metals and Antioxidant: Part II. The Role of Antioxidants in Arsenic and Cadmium Toxicity. *Altern Med Rev* 2003;8:106-128.

Peraza M.A., Ayala-Fierro F., Barber D.S., Casarez E. y Rael L.T. Effects of micronutrients on metal toxicity. *Environ Health Perspect* 1998; 106 (Suppl 1): 213-216.

Pierce Chemical Company. BCA Protein Assay Reagent, Technical Bulletin 23225, Rockfors, I11. 1984.

Qu W., Diwan BA., Reece JM., Bortner CD., Pi J., Lui J., Waalkes MP. Cadmium-induced malignant transformation in rat liver cells: Role of aberrant oncogene expression and minimal role of oxidative stress. *Int J. Cancer* 2005;114:346-355.

Rojas E., López M.C., Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B* 1999;722:225-254.

Satoh M. Koyama H., Kaji T., Kito H., Tohyama C. Perspectives on cadmium toxicity research. *Tohoku J Exp Med.* 2002;196:23-32.

Slupphaug G., Kavli B., Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 2003;531:231-251.

Strauss GH. Non Random Cell Killing in Cryopreservation, Implications for Performance of the Battery of Leucocyte Test (BLT)1. Toxic and Immunotoxic Effect. *Mutat Res* 1991;252, 1-15.

Valverde M., Fortoul T., Díaz-Barriga F., Mejia J., Rojas E. Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice. *Mutagenesis* 2000;15:109-114.

Valverde M., Trejo C., Rojas E. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis* 2001;16:265-270.

Wahba ZZ., Coogan TP., Rhodes SW., Waalkes MP. Protective effects of selenium on cadmium toxicity in rats: role of altered toxicokinetics and metallothionein. *J Toxicol Env Health*. 1993;38:171-182.

Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D. Molecular and cellular mechanism of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003;192:95-117.

Watanabe. M., Henmi K., Ogawa K., Suzuki T. Cadmium-dependent generation of reactive oxygen species and mitochondrial DNA breaks in photosynthetic and non-photosynthetic strains of *Euglena gracilis*. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol*. 2003; 134:227-234.

Watjen W., Beyersmann D., Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *J. Biometals Mol Toxicol*. 2004;18:133-42.

Yiin SJ., Creen CL., Sep JY., Lin TH. Cadmium lipid peroxidation in rat testes and protection by selenium. *Biometals* 1999;12:353-359.