



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR CADMIO EN
TROFOBLASTO HUMANO PARA LA INDUCCIÓN DE INTERLEUCINA 6 COMO
MARCADOR DE PREECLAMPSIA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. PANIAGUA GARCÍA MARÍA LUCERO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FABIÁN JESÚS ARECHAVALETA VELASCO
UIM EN MEDICINA REPRODUCTIVA, IMSS

COMITÉ TUTOR: DRA. GUADALUPE DEL CARMEN ESTRADA GUTIÉRREZ
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA

DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

CD. MX., FEBRERO, 2020.



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1328/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **07 de octubre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **PANIAGUA GARCÍA MARÍA LUCERO** con número de cuenta **406024963** con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR CADMIO EN TROFOBLASTO HUMANO PARA LA INDUCCIÓN DE INTERLEUCINA 6 COMO MARCADOR DE PREECLAMPSIA"**, realizada bajo la dirección del **DR. FABIÁN JESÚS ARECHAVALTA VELASCO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. OSCAR FLORES HERRERA
Vocal: DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA
Secretario: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
Suplente: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA
Suplente: DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de diciembre de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno(a)

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por el gran apoyo otorgado durante todo el doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado para la realización de la Tesis de Doctorado (No. de registro de becario 413084).

Al Dr. Fabián Jesús Arechavaleta Velasco por su dirección y tutoría para el desarrollo de este proyecto dentro del programa de Doctorado en el Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al comité tutorial integrado por la Dra. Guadalupe del Carmen Estrada Gutiérrez y al Dr. Rafael Camacho Carranza por todo su apoyo, consejos y orientación.

Agradecimientos personales

Después de casi 15 años que tomé la determinación de obtener el grado de Doctor, por fin la aventura que comenzó en el CIMAT culmina en la UNAM y tal vez no haya espacio suficiente para agradecer a todas las personas que me han apoyado durante esta todo este tiempo.

Primeramente quiero agradecerle a la UNAM por los amigos, el trabajo y las oportunidades de desarrollo que me ha ofrecido desde que comencé a ser parte de esta comunidad.

Al Dr. Arechavaleta por darme un espacio en su laboratorio, la orientación, apoyo, tiempo y toda su paciencia para resolver los problemas un día a la vez.

A la Dra. Laura por sus recomendaciones y todo el apoyo para que este proyecto sobreviviera. Y también a Lalo, por esa buena coordinación con los tramites y las platicas durante la comida.

A mis padres que me han acompañado e inspirado toda la vida, y que me han apoyado sin importar la circunstancia. A mis hermanos por los buenos momentos. George y Lili gracias por su apoyo en todos sentidos, en especial por escucharme y prestarme a sus hijos que hacen más feliz la vida. Jon, gracias por los abrazos. Pi, gracias por cumplir tu principal objetivo de ser feliz, eres el mejor ejemplo de que siempre se puede realizar los sueños. Rodrigo y Mariana, gracias por su confianza y traer a mi vida un pedacito de cielo.

Quiero agradecer a mis vaquer@s favoritos, es maravilloso tener amigos como ustedes, cuya amistad ha perdurado por tantos años. En especial gracias a Auri, Helena, Hec, Ilse y Dulce por su tiempo para esas buenas reuniones.

Choco, Kissy y Artur, gracias por toda su amistad sin importar lo que suceda ni el tiempo que pase.

A todas aquellas personas que se han quedado en mi vida a pesar de la distancia o del laboratorio. Jannet, Jade, Perla, Miri, Liz, Monse, Vero, Adri, Ari, Lucy, Marisa, Horacio, Jorge, Octavio, Mauricio.

Sin duda un agradecimiento muy especial para mis compañeros y amigos de la FES-C, Sandra, Rosalba, Natahliel, Silvia, Martín, Llas, Angeles y Ana que siempre me han apoyado para sobrevivir a cruzar la ciudad y hacer que valga la pena.

Finalmente a todos mis alumnos de los que siempre aprendo algo.

...No debemos tener miedo de cuestionarnos,
de hecho hasta los planetas chocan,
y del caos suelen nacer la mayoría de las estrellas.

Charles Chaplin

Índice

Índice de figuras

Abreviaturas

<i>Resumen</i>	1
<i>Abstract</i>	2
<i>Introducción</i>	3
Preeclampsia	4
Interleucina 6	19
Cadmio.....	27
<i>Hipótesis</i>	41
<i>Objetivos</i>	42
General	42
Particulares	42
<i>Metodología</i>	43
Línea celular	44
Viabilidad celular.....	44
Exposición a Cloruro de Cadmio.....	46
Extracción de proteínas	46
Western Blot (WB)	47
ELISA de IL-6	48
Análisis estadístico	49
<i>Resultados</i>	50
Efecto del Cadmio, inhibidores de vías de señalización y NAC en la viabilidad celular	50
El cadmio induce la expresión de IL-6 en células JEG-3 mediante la generación de EROs	52
La exposición de células JEG-3 al Cd activa las vías de señalización de ERK1/2, JNK y al factor de transcripción c-Jun pero no a AKT ni PI3K.....	54
La secreción de IL-6 en células JEG-3 expuestas al cadmio depende de la activación de ERK1/2 pero es independiente de la vía de JNK.....	57
<i>Discusión</i>	59
<i>Conclusiones</i>	66
<i>Literatura citada</i>	67

Artículo requisito para la obtención del grado 78

Índice de figuras

Figura 1. Etapas del desarrollo de la PE. _____	8
Figura 2. Remodelación de las arterias espirales uterinas. _____	12
Figura 3 Efecto de IL-6 que contribuyen al desarrollo de la PE. _____	24
Figura 4 Estrategia experimental. _____	44
Figura 5. Viabilidad Celular. Viabilidad de las células JEG-3 durante 24 (a) y 48 horas (b) incubadas con diferentes concentraciones de CdCl ₂ . _____	51
Figura 6 Viabilidad de las células JEG-3 durante 24 horas incubadas con CdCl ₂ (2.5 µM) y los inhibidores SP600125 y PD98059 a diversas concentraciones. _____	51
Figura 7 Viabilidad de las células JEG-3 durante 24 horas incubadas con CdCl ₂ (2.5 µM) y NAC a diversas concentraciones. _____	52
Figura 8 Secreción de IL-6 por las células JEG-3 incubadas con diferentes concentraciones de cadmio durante 24 horas. _____	53
Figura 9 Secreción de IL-6 por las células JEG-3 incubadas con cadmio (2.5 µM) en presencia o ausencia de NAC durante 24 horas. _____	54
Figura 10 Activación de las vías de señalización en células JEG-3 incubadas con CdCl ₂ durante 24 horas. _____	55
Figura 11 Inducción de la fosforilación de ERK1/2 y JNK en células JEG-3. _____	56
Figura 12 Activación de c-Jun en células JEG-3 incubadas con CdCl ₂ durante diferentes tiempos. _____	56
Figura 13 Activación de c-Jun en células JEG-3 incubadas con cadmio e inhibidores durante 6 horas. _____	57
Figura 14 Secreción de IL-6 por las células JEG-3 incubadas con cadmio (2.5 µM) en presencia o ausencia de los inhibidores SP600125 y PD98059 durante 24 horas. _____	58
Figura 15 Modelo de inducción de IL-6 por Cd en trofoblasto. _____	65

Abreviaturas

AA-AT1	Autoanticuerpos contra el receptor tipo 1 de angiotensina	LDH	Lactato deshidrogenasa
ACOG	Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia	MAPK	Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos
ADN	Ácido desoxirribunucleico	miARN	Micro ARN
AEU	Arterias Espirales Uterinas	mmHg	Milímetros de mercurio
AKT	Serin/Treonina Cinasa	MMP	Metaloproteasas
ALT	Alanina aminotransferasa	MT	Metalotioneinas
AP1	Proteína Activadora 1	NAC	N-acetil cisteína
APE/Ref-1	Factor 1 apurínico endonucleasa/redox	NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Oxidasa
ARN	Ácido Ribonucleico	NF- κ B	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
ARNsas	Enzimas degradadoras de ARN	NO	Oxido Nítrico
AST	Aspartato aminotransferasa	NOS	Óxido Nítrico Sintetasa
ATF2	Factor activador de la transcripción 2	ONOO ⁻	Peroxinitrito
c-Jun	Factor de transcripción de la familia de Jun	PAF	Factor activador de plaquetas
Ca ²⁺	Calcio	PAI	Inhibidor del activador de plasminógeno
Cd	Cadmio	PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
CdCl ₂	Cloruro de Cadmio	PE	Preeclampsia
CEPP	Células epiteliales pequeñas derivadas de pulmón	pg	Picogramos
CREB	Elemento de unión de respuesta a cAMP	PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño	PIGF	Factor de crecimiento placentario
DMT1	Transportador 1 para metales divalentes	Ras	Oncogen Ras
ELISA	Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas	sFlt	Factor soluble tirosina cinasa 1 tipo Fms
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares	sIL-6R	Fracción soluble del receptor de IL-6
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno	sVEGFR-1	Receptor soluble tipo 1 de VEGF
gp130	Glicoproteína de 130 KDa	SP1	Proteína Específica 1
GTPasa	Cinasas de GTP	STAT	Transductores de señal y activadores de la transcripción
HELLP	Hemolisis, enzimas hepáticas,	TGF	Factor de Crecimiento Transformante
HLA	Complejo principal de histocompatibilidad	Th17	Linfocito cooperador secretor de Il-17
IL	Interleucina, trombocitopenia	TNF	Factor de Necrosis Tumoral
IL-6R	Receptor de IL-6	UI	Unidades Internacionales
IFN	Interferon	uNK	Células Asesinas Naturales uterinas
IRF1	Factor Regulador 1 de Interferon	UPA	Activador del plasminógeno urocinasa
JAK	Cinasas asociadas a Janus	VCAM	Proteína de adhesión celular vascular
JEG-3	Células de coriocarcinoma	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
JNK	Cinasa del Amino terminal de c-Jun	ZIP8	Proteína transportadora de zinc 8

Resumen

El Cadmio (Cd) es un metal contaminante que ha sido asociado con el desarrollo de diversas enfermedades entre las que se encuentran hipertensión, cáncer, insuficiencia renal y preeclampsia (PE). La preeclampsia es un desorden multisistémico caracterizado por elevación de la presión arterial de aparición reciente, daño endotelial y multiorgánico en mujeres embarazadas. Asimismo, la PE se ha asociado con inflamación crónica caracterizada por un incremento en la síntesis de interleucina (IL)-6 a partir del trofoblasto placentario. Cabe mencionar que la IL-6 es una citocina que contribuye al daño endotelial materno y a la aparición de diversos signos y síntomas relacionados con la PE. Por otra parte, se ha demostrado que el Cd induce la producción de IL-6 en distintos tipos celulares mediante la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la activación de diferentes vías de señalización. Por esta razón, el presente estudio se enfocó en investigar el efecto del Cd en la producción de IL-6 así como los mecanismos de señalización involucrados en cultivos de trofoblastos. Para esto se utilizó la línea celular de coriocarcinoma JEG-3, la cual fue expuesta a cloruro de cadmio (CdCl_2) en presencia o ausencia de inhibidores de proteín-quinas activadas por mitógenos (MAPKs) o N-acetilcisteína (NAC) durante 24 horas. La producción de IL-6 se cuantificó mediante ELISA, mientras la activación de ERK1/2, JNK y c-Jun fue determinada por Western blot. Los resultados mostraron que la exposición de células JEG-3 a Cd induce la producción de IL-6 e incrementa la fosforilación de ERK1/2, JNK y c-Jun. Por otra parte, la co-exposición con inhibidores o NAC demostró que únicamente existe una disminución de IL-6 en presencia del inhibidor de ERK1/2 y NAC. Por esta razón, podemos concluir que la producción de IL-6 inducida por cadmio depende de la formación de EROs y de la activación de la vía de ERK1/2.

Abstract

Exposure to cadmium, which is a ubiquitous environmental pollutant, has been associated to hypertension, renal disease, cancer, and preeclampsia (PE). PE is a multisystemic disorder characterized by new-onset hypertension, endothelial dysfunction and end-organ dysfunction. Elevated interleukin (IL)-6 expression in pregnant woman is linked to PE and has been suggested to contribute to maternal endothelial dysfunction. Cadmium induces IL-6 production in various cell types through oxygen reactive species (ROS) and different signaling pathways activation. Thus, this study was to investigate the effect of cadmium on IL-6 production and the underlying mechanisms in a trophoblast-derived cell line. Cultured JEG-3 trophoblast cells were exposed to non-toxic concentrations of CdCl₂ in the presence or absence of various mitogen-activated protein kinases (MAPKs) inhibitors or *N*-Acetyl-L-cysteine (NAC) for 24h. IL-6 production was measured by ELISA. Phosphorylated and total ERK1/2, JNK, and c-Jun were assessed by Western blotting. Cadmium exposure induced IL-6 production and increased ERK1/2, JNK and c-Jun phosphorylation in JEG-3 cells. NAC and inhibition of ERK1/2 significantly reduced Cd-induced IL-6 production. These data indicate that cadmium induces IL-6 production in trophoblast cells through a ROS-dependent activation of ERK1/2.

Introducción

La preeclampsia es una enfermedad hipertensiva específica del embarazo que tiene una afectación multisistémica. Por lo general ocurre después de la semana 20 de gestación y es la forma más común de presión elevada que complica el embarazo. Este síndrome obstétrico se caracteriza por la aparición reciente de hipertensión y proteinuria o bien hipertensión y disfunción orgánica. Tradicionalmente se ha considerado que esta patología se desarrolla en dos etapas. La primera consiste en la remodelación defectuosa de las arterias espirales por parte del trofoblasto provocando una isquemia placentaria, que a su vez ocasiona el desarrollo de la segunda etapa que incluye producción de especies reactivas de oxígeno, citocinas proinflamatorias y factores anti-angiogénicos, que en conjunto, conducen a las manifestaciones clínicas y complicaciones de la preeclampsia. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que la preeclampsia pudiera ser consecuencia de la pérdida en el control de los mecanismos endógenos encargados de regular el estrés oxidativo, la inflamación y la activación endotelial; o bien la sobreactivación de estos procesos. El proceso inflamatorio inducido por la liberación de citocinas como interleucina (IL-) 1 β , TNF- α e IL-6 a partir del trofoblasto y células inmunológicas, participa de manera importante en el desarrollo de este síndrome obstétrico. En este sentido, factores ambientales como infecciones o exposición a compuestos tóxicos son inductores potenciales de esta patología. A este respecto, estudios epidemiológicos y toxicológicos han establecido la asociación entre preeclampsia y exposición al cadmio. Los mecanismos moleculares de acción tóxica de este metal pesado que pudieran inducir esta complicación obstétrica aún permanecen poco entendidos. Por lo tanto, en la presente tesis doctoral se estudia la regulación de la expresión de interleucina 6 por el cadmio en una línea celular derivada de placenta.

Preeclampsia

La preeclampsia (PE) es un desorden sistémico hipertensivo de progresión rápida que aparece después de la semana 20 de gestación en mujeres previamente normotensas. Ésta es la complicación más común durante el embarazo y que sin tratamiento puede evolucionar a eclampsia¹.

La PE se considera la principal causa de mortalidad materna, así como de morbilidad^{2,3} en el feto con complicaciones como nacimiento pre-término, muerte perinatal, hipoxia/lesión neurológica, restricción del crecimiento intrauterino y a largo plazo morbilidad cardiovascular asociada a bajo peso al nacimiento; en la madre se asocia con desprendimiento placentario, edema pulmonar y a largo plazo con enfermedades cardiovasculares⁴. La incidencia de PE a nivel mundial es de entre 3 al 7% de los embarazos³. Esta incidencia es un promedio mundial por lo que puede variar en las diversas poblaciones; por ejemplo, en México el Observatorio de Muerte Materna reporta que la incidencia es de hasta un 10% y es la segunda causa de muerte materna^{5,6}. Por otra parte, se debe considerar que la morbilidad y la mortalidad se incrementa cuando la PE se presenta antes de la semana 34 de gestación (inicio temprano), ya que es más severa que cuando se manifiesta después de esta semana (inicio tardío)⁷.

Cuadro clínico

La PE se caracteriza por la aparición reciente de una presión sistólica elevada a más de 140 mmHg o una presión diastólica superior a 90 mmHg, al menos en dos ocasiones durante un período de 4 horas, en mujeres, previamente normotensas, después de la semana 20 de gestación^{7,8}. Este incremento en la presión, generalmente se acompaña de proteinuria superior a 300 mg/24 horas, aunque en 2013 este signo fue removido por el Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia (ACOG) como un criterio de diagnóstico, ya que considera que la aparición de hipertensión y algún signo relacionado con una

disfunción orgánica tales como dolor de cabeza persistente o severo, anormalidades visuales, alteración del estatus mental o disnea son suficientes para el diagnóstico de PE⁷.

Con respecto a la gravedad de los signos y síntomas que presenta la paciente, la PE se clasifica como moderada si la presión arterial es mayor de 140/90 mmHg y la proteinuria mayor de 300 mg/día; y se considera PE severa cuando la hipertensión supera los 160/110 mmHg y la proteinuria se encuentra por encima de los 5 g de proteína en orina por día^{7,9}. En caso de que exista ausencia de proteinuria, la PE severa se diagnóstica cuando además de hipertensión se presentan síntomas neurológicos como convulsiones^{4,10}. Otros signos y síntomas que pueden estar asociados a la PE severa son problemas visuales (fotopsia y/o escotoma), dolor de cabeza incapacitante, edema pulmonar, cianosis, dolor epigástrico, trombocitopenia, insuficiencia renal progresiva (creatinina sérica menor a 1.1 mg/dL) y disfunción hepática^{7,11}. Si además de estos signos y síntomas se presentan alteraciones hematológicas y disfunción hepática, a esta nueva entidad clínica se le conoce como síndrome de HELLP (H hemólisis; EL enzimas hepáticas elevadas; LP bajo recuento plaquetario), la cual se caracteriza por trombocitopenia moderada a severa con un número plaquetario de 100,000 células/ μ L o menos, disfunción hepática con AST mayor de 70 UI/L y hemólisis con LDH superior a 600 UI/L o bilirrubinas con valores mayores a 1.2 mg/dL. Este síndrome se divide en 3 clases que dependen del conteo plaquetario¹²; la clase I se caracteriza por un conteo plaquetario menor o igual a 50,000 células/ μ L, AST o ALT mayor a 70 UI/L y LDH superior a 600 UI/L; la clase II tiene un conteo plaquetario entre 50,000 y 100,000 células/ μ L, AST o ALT superior a 70 UI/L y LDH mayor a 600 UI/L y la tercera clase presenta un conteo plaquetario de 100,000 a 150,000 células/ μ L, AST o ALT superior a 40 UI/L y LDH mayor a 600 UI/L¹².

La eclampsia es considerada como el estado más grave de la enfermedad hipertensiva durante el embarazo, ya que presenta como principal signo la presencia de

convulsiones durante la gestación o bien en el postparto y cuya aparición no pueda ser atribuida a otra causa^{13,14}.

Factores de riesgo

Aunque se desconoce la causa que podría originar alguna de las enfermedades hipertensivas, en especial la PE, se han descrito algunos factores de riesgo que predisponen a una mujer a desarrollarla. Estos factores de riesgo incluyen:

- Historia personal previa de PE, con un riesgo relativo de 5.5 a 8.8, en vista de que ya existe cierto daño sistémico que predispone a su desarrollo.
- Antecedente familiar de enfermedades cardiovasculares, el cual presenta un riesgo relativo de 1.4 a 7.7, sobre todo debido a la probabilidad de desarrollar hipertensión debido a las condiciones de estrés durante el embarazo.
- Historia familiar de preeclampsia, la cual tienen un riesgo relativo de 1.8 a 3.6, debido a que representa el factor genético implicado en el desarrollo de esta patología.
- Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, es el factor de riesgo con uno de los mayores riesgos relativos que varían de 4.3 a 21.7 a causa de que este síndrome ocasiona daño endotelial y presenta frecuentes trombosis. También se considera que la PE es un reflejo del padecimiento del síndrome por lo que en algunos casos se utiliza a la PE como criterio de sospecha.
- Enfermedad renal, presenta un riesgo relativo de 2.2 a 28.2 como factor de riesgo para desarrollar PE, ya que implica una desregulación en el sistema de homeostasis del volumen sanguíneo.
- Lupus eritematoso sistémico, es una enfermedad autoinmune que incrementa el riesgo relativo entre 2 y 16.2, principalmente debido a que las pacientes con lupus presentan daño renal lo que predispone al desarrollo de hipertensión y otros signos de PE.

- Nuliparidad, representa un riesgo relativo de entre 2.8 y 10.3, además este factor se presenta en aproximadamente el 30% de las mujeres con preeclampsia.
- Hipertensión crónica, este padecimiento incrementa el riesgo relativo de 3.4 a 4.3, ya que a priori existe una disfunción endotelial.
- Diabetes mellitus, representa un riesgo relativo de 2.5 a 5 ya que es un desorden metabólico que provoca un daño sistémico e incrementa el estrés oxidativo corporal que predispone al desarrollo de PE.
- Obesidad, es un factor de riesgo para el desarrollo de diversas patologías y en el caso específico de la PE representa un riesgo relativo de 1.8 a 3.6 cuando se considera un índice de masa corporal superior a 30.
- Edad materna avanzada (mayor de 40 años), presenta un riesgo relativo de 1.23 a 2.29 en mujeres nulíparas y de 1.34 a 2.87 en mujeres multíparas^{3,15}.

A pesar de que estos factores de riesgo han sido determinados mediante análisis sistemáticos realizados por diferentes grupos de investigación que coinciden en los valores de riesgo relativo, es importante aclarar que es posible que varíen dependiendo del origen de las pacientes, como se ha observado en mujeres africanas que el simple hecho del lugar de nacimiento tienen un riesgo relativo aumentado^{3,15,16}.

Asimismo, existen otros factores de riesgo que se han asociado con la severidad de esta complicación obstétrica; por ejemplo la PE de inicio temprano se relaciona con preeclampsia en gestación previa, primera gestación, raza negra y el uso de inductores de la ovulación; mientras que la PE de inicio tardío se asocia con historia familiar de preeclampsia, edad materna menor de 20 años o mayor de 40 años, obesidad, infecciones maternas, mayor ganancia de peso durante la gestación, anemia materna, diabetes gestacional, y tabaquismo^{4,17,18}.

Etiología

Desafortunadamente hoy en día aún se desconoce el origen de la PE; sin embargo, existe un consenso de que su origen es placentario, ya que después del alumbramiento, la sintomatología y los signos de esta patología desaparecen¹⁹. Asimismo, se ha demostrado de que esta complicación obstétrica se asocia con una implantación inadecuada y una falta de remodelación de las arterias espirales uterinas (AEU), que posteriormente se manifiestan con los signos y síntomas característicos tales como hipertensión, proteinuria y daño multiorgánico. Estas observaciones han permitido proponer un modelo de dos etapas para tratar de explicar el desarrollo de la PE²⁰ (Figura 1).

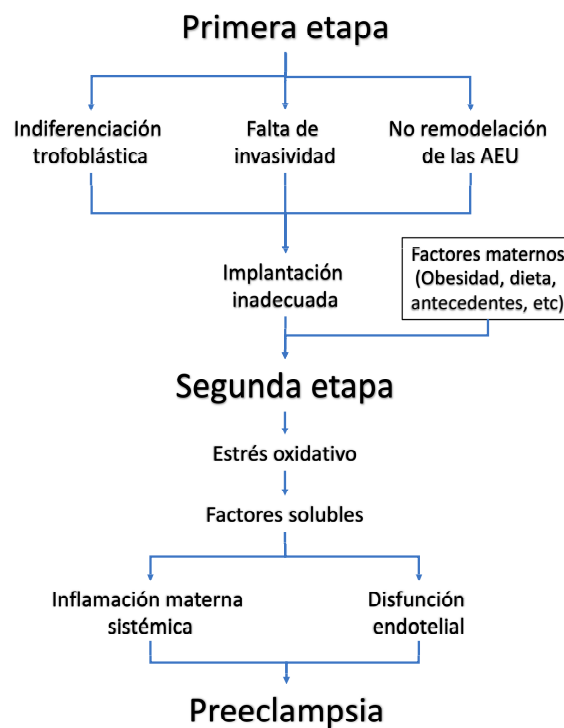


Figura 1. Etapas del desarrollo de la PE. Existen diferentes factores que pueden contribuir al desarrollo de ambas etapas. Recientemente se ha propuesto que la segunda etapa puede ocurrir como consecuencia de la falta de regulación de los mecanismos de la primera etapa independientemente de la implantación inadecuada o la falta de remodelación de las arterias uterinas.

Primera etapa

Esta primera etapa ocurre durante las primeras 20 semanas de gestación y se caracteriza por una invasión trofoblástica deficiente y una remodelación inadecuada de las AEU, lo que ocasiona que el sistema vascular placentario permanezca con alta resistencia en lugar de transformarse a uno de baja resistencia para el flujo sanguíneo. Finalmente, estos eventos se traducen en isquemia placentaria que a su vez desencadena hipoxia y daño placentario^{8,20}.

Para comprender los cambios patológicos que ocurren durante esta etapa de la PE, es necesario entender como suceden los procesos fisiológicos normales que a continuación se abordarán.

Implantación normal

La placenta es un órgano transitorio sumamente complejo que realiza diversas funciones tales como producción de hormonas relacionadas con el embarazo, protección, síntesis de factores de crecimiento, intercambio de gases, nutrientes y desechos, entre muchas otras actividades²¹. La placenta está formada por diversos tipos celulares de los cuales el trofoblasto es el principal debido a que conforma su estructura y cumple con las diversas funciones a lo largo del desarrollo fetal. Del trofoblasto se conocen al menos 5 tipos celulares: el citotrofoblasto, el sinciciotrofoblasto, el trofoblasto gigante, trofoblasto invasivo y el trofoblasto endovascular²¹.

Durante la placentación, el citotrofoblasto invade el endometrio deciduado, donde se fusiona para formar el sinciciotrofoblasto que se encarga de cubrir a las vellosidades flotantes que finalmente son rodeadas por la sangre materna. Posteriormente, el citotrofoblasto prolifera para formar las vellosidades anclantes, de las cuales se desprende el trofoblasto invasivo que continúa migrando hasta llegar el tercio interno del miometrio donde se encuentran las AEU. Durante este proceso existe una gran cantidad de

infiltrado leucocitario, principalmente formado por células asesinas naturales uterinas (uNK) y neutrófilos que se acumulan densamente alrededor del trofoblasto invasivo para estimular la invasión, mediante la secreción de metaloproteasas (MMPs) y reducción de la apoptosis^{4,22}. Para controlar la respuesta inmune debido a este contacto con las células maternas, el sinciciotrofoblasto no produce ni exhibe en su membrana moléculas del HLA, mientras que el trofoblasto invasivo presenta variantes no clásicas como el HLA-G y HLA-E que protegen al trofoblasto del efecto citotóxico de las uNK, pero al mismo tiempo activa a las uNKs para mediar los principales cambios vasculares^{22,23}.

Una vez que el trofoblasto invasivo llega hasta las AEU en el miometrio, secreta citocinas que en las células musculares que recubren las AEU, inducen la secreción de MMPs y activan apoptosis²⁴. Estas células musculares que recubren las AEU son reemplazadas por una matriz fibroide, que junto con las MMPs ocasionan una pérdida gradual de la estructura músculo-elástica de las arterias, y el desprendimiento de las células endoteliales que finalmente entran en proceso de apoptosis, lo que permite que el trofoblasto endovascular las reemplace y remodela las AEU²⁴⁻²⁶. Esta remodelación origina que los vasos sanguíneos de bajo calibre y alta resistencia se transformen en vasos de mayor calibre y con una mayor capacidad para proveer el flujo sanguíneo adecuado para la perfusión de nutrientes según los requerimientos de la placenta y del feto²⁷ (Figura 2).

Invasión y remodelación deficiente

La placentación inadecuada, específicamente durante la invasión trofoblástica y remodelación de las AEU, ocasiona que se establezcan las condiciones necesarias para favorecer el desarrollo de la PE^{21,27}, ya que se ha observado en mujeres con esta patología, que no existe una diferenciación adecuada del citotrofoblasto hacia trofoblasto invasivo, evidenciada por una disminución de la expresión de los marcadores como integrinas $\alpha_v\beta_3$, cadherina-VE y la proteína 1 de adhesión celular vascular (VCAM-1). Además, disminuye

la secreción de MMPs, lo que impide la correcta degradación de la matriz extracelular, la motilidad y la adhesión del trofoblasto^{21,28}. Esta invasión deficiente ocasiona que los trofoblastos invasivos se alojen en la decidua sin poder llegar hasta las AEU, por lo que es necesaria su eliminación principalmente mediante procesos apoptóticos; sin embargo, en algunos casos ocurre necrosis trofoblástica que incrementa factores inflamatorios en la decidua²¹. Lo anterior ocasiona que las AEU no puedan ser remodeladas debido a que la cantidad de células que exhiben los marcadores correspondientes al trofoblasto endovascular como integrina $\alpha_v\beta_3$, integrina $\alpha_1\beta_1$ o VCAM-1, no sean suficientes para rodear totalmente a estos vasos sanguíneos. Además, la deficiencia en la expresión de MMPs no permite la desorganización del endotelio materno por lo que las AEU mantienen su recubrimiento muscular y pared endotelial, por lo que también conservan su función con un bajo flujo y alta resistencia^{21,28} (Figura 2). Esta implantación inadecuada ocasiona una disminución en la presión parcial de oxígeno que llega a la placenta, provocando tanto hipoxia como isquemia placentaria, por lo que en respuesta el trofoblasto secreta factores angiogénicos y proinflamatorios que dan inicio a la segunda etapa.

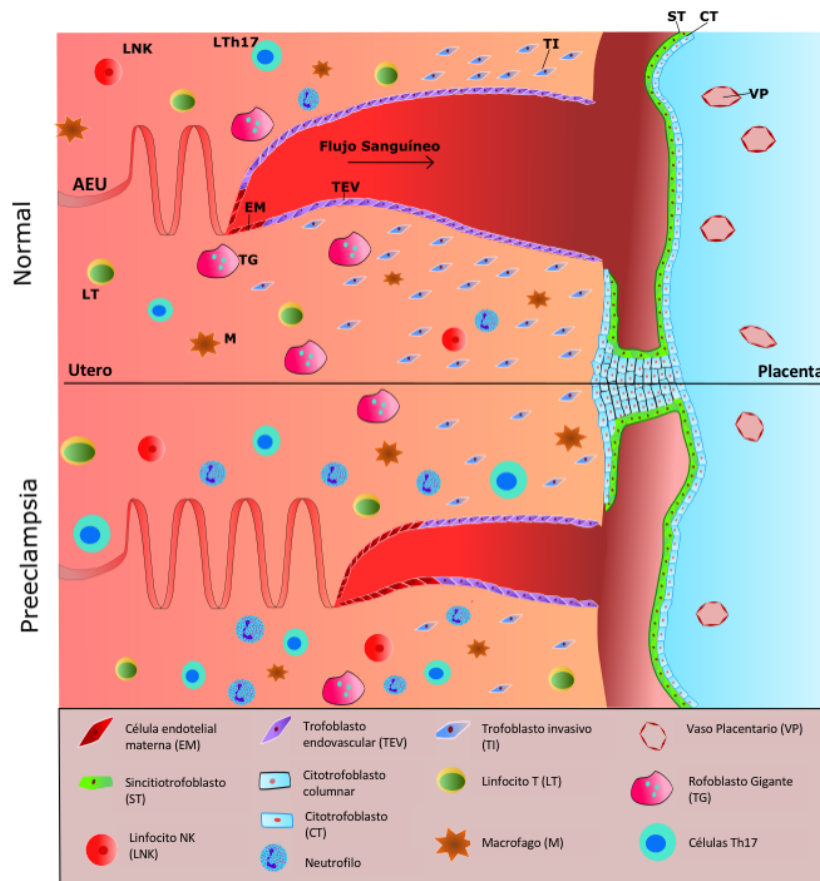


Figura 2. Remodelación de las arterias espirales uterinas. En la parte superior se observa el esquema de remodelación las arterias espirales uterinas durante un embarazo normal. En la parte inferior se esquematiza la falta de remodelación de las arterias espirales uterinas durante la PE y todos los cambios en los tipos celulares presentes.

Segunda etapa

El hecho de que exista una placentación anormal no garantiza el desarrollo de PE ya que se ha observado que casi la mitad de las mujeres que presentan deficiencia en la remodelación de las AEU no desarrollan la enfermedad. Por lo que se ha propuesto que existen otros factores, principalmente maternos como obesidad, diabetes, genética, dieta, etc., que predisponen a ciertas mujeres a evolucionar a la segunda etapa caracterizada por la aparición de los signos y síntomas propios de la PE^{20,29,30}.

La segunda etapa de la PE inicia como respuesta del trofoblasto a la placentación inadecuada y por lo tanto a la hipoxia e isquemia que se desarrolla en la placenta. Los primeros eventos incluyen estrés oxidativo y la producción de factores proinflamatorios y angiogénicos, lo que ocasiona disfunción endotelial e inflamación sistémica que culminan con la aparición de los signos y síntomas característicos de esta patología.

Estrés oxidativo

Durante la placentación se producen cantidades adecuadas de especies reactivas de oxígeno (EROs) para la replicación, proliferación y mantenimiento de la placenta durante todo el embarazo³¹. Sin embargo, el flujo intermitente de la sangre arterial que ocasiona episodios repetidos de hipoxia y reperfusión placentaria durante la PE, favorece un desequilibrio entre la producción de estas sustancias y los mecanismos antioxidantes de las diversas células placentarias, lo que ocasiona un estado de estrés oxidativo⁸.

Los mecanismos por los cuales la reducción de la perfusión estimula la secreción de EROs son diversos e incluyen la activación de monocitos y neutrófilos que circulan por el espacio intervelloso²⁰, o bien la respuesta del trofoblasto a la hipoxia intermitente⁸. Existen varias vías por las cuales el trofoblasto produce una cantidad mayor de EROs, en primer lugar debemos considerar que los períodos de hipoxia seguidos por reperfusión incrementan la producción del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) mediante la activación de tres complejos enzimáticos como son la xantina oxidasa, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH) y la cadena respiratoria de la mitocondria. Asimismo, la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) aumenta, generando óxido nítrico (NO), el cual reacciona con el anión superóxido para producir peroxinitrito ($ONOO^-$)^{8,31}. En segundo lugar, la hipoxia e isquemia placentaria ocasionan la disminución de la actividad antioxidante en el trofoblasto, reduciendo la actividad de la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. Esta disminución ocasiona que el exceso de $O_2^{\cdot-}$ no

pueda ser convertido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2), ocasionando que los niveles de EROs permanezcan elevados^{28,31}.

Niveles elevados de EROs en el trofoblasto inducen la lipoperoxidación, daño al ADN, modificación de proteínas, activación de metaloproteasas y liberación de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-10, entre otras), factores antiangiogénicos (sFlt-1, Endotelina-1, AA-AT1, etc) y otras moléculas que ocasionan el daño endotelial materno²⁰.

Disfunción endotelial

Durante la PE uno de los principales mecanismos involucrados en la disfunción endotelial es el incremento de la liberación del factor soluble tirosina cinasa 1 tipo Fms (sFlt-1) y la disminución de los factores de crecimiento placentario (PIGF) y de crecimiento endotelial vascular (VEGF) debido a la hipoxia placentaria³². El sFlt-1, también conocido como el receptor soluble tipo 1 de VEGF (sVEGFR-1), es un factor antiangiogénico endógeno que se une al VEGF disponible, evitando que se una al VEGFR-1 en las células y active la formación de nuevos vasos sanguíneos y el mantenimiento adecuado del endotelio. De manera interesante, experimentos en cultivos celulares de trofoblasto demostraron que la sobreexpresión de s-Flt-1 también provoca una reducción en la síntesis de VEGF y PIGF^{28,31}, lo que ha sido corroborado en trofoblastos provenientes de mujeres con preeclampsia²⁸. Además, el sFlt-1 es capaz de unirse al PIGF que es un factor de crecimiento de la familia de VEGF identificado principalmente en la placenta, lo que ocasiona que no solamente afecte su síntesis sino que además lo secuestra e impide su actividad biológica³³.

Los efectos descritos del sFlt-1 explican, al menos en parte, los signos y síntomas observados durante la preeclampsia, ya que la disminución e inhibición del VEGF y del PIGF a nivel sistémico provoca un aumento en la permeabilidad del endotelio que ocasiona edemas y proteinuria³⁴. Por otra parte, el secuestro del VEGF y PIGF por el sFlt-1 evita que

se unan a los receptores endoteliales de superficie, y de esta manera provoca vasoconstricción y aumento en la liberación de factores procoagulantes³⁴. Finalmente, la deficiencia de VEGF o su acción en el riñón ocasiona edema de las células endoteliales, colapso capilar, filtración glomerular alterada y proteinuria³⁴.

Otros factores antiangiogénicos relevantes durante la PE son los autoanticuerpos contra el receptor tipo 1 de angiotensina (AT1-AA), debido a que sus altas concentraciones en mujeres con preeclampsia se asocian con el aumento de la secreción y activación de endotelina³⁵ y la generación de EROS en las células endoteliales³⁶. Asimismo, estos autoanticuerpos inducen el incremento de la secreción de sFlt-1 mediada por TNF- α en placenta⁸. Otro efecto importante de estos anticuerpos es inducir vasoconstricción por efecto directo sobre los receptores AT1 de las células de músculo liso vascular, ya que actúa como agonista de la angiotensina II. También se ha observado que son capaces de estimular la secreción del PAI-1, el cual se asocia a la invasión deficiente del trofoblasto y por lo tanto a la disminución de la función placentaria³⁷. La estimulación de los receptores AT1 por los AT1-AA no es el único mecanismo por el cual la angiotensina II se ha relacionado con la preeclampsia, ya que se ha observado que estos receptores pueden dimerizarse con el receptor de bradicinina B2 y activarse de manera constitutiva durante esta complicación obstétrica³⁸.

Finalmente, podría pensarse que la producción incrementada de NO, que es un vasodilatador, sería benéfica para el endotelio ya que promueve el mantenimiento del tono y en consecuencia la dilatación de las AEU; sin embargo, esto no ocurre así debido a que la mayor parte es utilizado para la generación de EROs³¹. Entre las especies oxidantes derivadas del NO, la más importante es el ONOO⁻, el cual reacciona preferentemente con los residuos de tirosina de las proteínas, produce un daño al ADN y alteraciones estructurales en lípidos lo que ocasiona en parte el daño endotelial detectado en pacientes con PE. Además, uno de los principales blancos del ONOO⁻ es la vía de señalización de

proteína cinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK) que al activarse promueve la liberación de citocinas proinflamatorias³¹.

Inflamación sistémica

Otra de las manifestaciones que se observan durante la segunda etapa del desarrollo de la PE es una inflamación sistémica, ocasionada por la desregulación en la expresión de citocinas proinflamatorias inducida por el estrés oxidativo, tanto de las células inmunes como del trofoblasto³⁹. Las citocinas que se elevan durante esta complicación obstétrica incluyen entre otras a la interleucina (IL)-6, IL-8, factor de crecimiento transformante (TGF)- α y factor de necrosis tumoral (TNF)- α ⁴⁰, que son producidos tanto por células maternas como los macrófagos deciduales, células NK y células estromales de la decidua, así como de manera importante, por el mismo trofoblasto⁴¹. El incremento de estas moléculas, así como de endotelinas, tromboxanos, quimiosinas, decorinas y factores de crecimiento producidas por estas mismas células, contribuye tanto a la invasión deficiente del trofoblasto como a la disfunción endotelial observada durante la PE^{34,42}.

De todas estas moléculas que se encuentran elevadas durante la PE, resaltan de manera importante la IL-8, TNF- α , IL-1 β e IL-6 debido a que han sido utilizadas como biomarcadores. Por ejemplo, las concentraciones de IL-8 en sangre de pacientes con PE severa son significativamente mayores al compararse con los niveles en sangre de pacientes con PE moderada o mujeres embarazadas normotensas^{43,44}. El incremento de esta citocina se asocia con aumento de la activación de neutrófilos y disminución de prostaciclina, lo que a su vez incrementa el estrés oxidativo en las células endoteliales⁴⁵.

Por su parte, el TNF- α ha sido ampliamente estudiado en PE, ya que a pesar de no encontrarse diferencia en su concentración en la placenta de pacientes con PE al compararse con aquellas normotensas, si se ha demostrado una diferencia significativa en los niveles séricos⁴⁶. Los efectos producidos por esta citocina son diversos y dependen del

tipo celular, por ejemplo en el trofoblasto se ha observado que inhibe la proliferación, movilidad e invasividad, mientras que aumenta la muerte celular por necrosis⁴⁵ o apoptosis⁴⁷. Los mecanismos utilizados por el TNF- α en estas células incluyen aumento de la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno (PAI)-1, la MMP-9 y el activador del plasminógeno urocinasa (UPA)⁴⁸. En el endotelio, el TNF- α favorece la coagulación, fuga microvascular e induce la producción de endotelinas^{49,50}.

Por otra parte, la IL-1 β es una citocina proinflamatoria que regula la expresión de otras citocinas y quimiocinas⁵¹, y puede ser inducida por la activación de NF- κ B⁵². De manera similar a las otras citocinas, la IL-1 β se ha encontrado aumentada en sangre periférica de pacientes con PE⁵³ y los efectos que produce en el endotelio son semejantes a los observados con el TNF- α , ya que también promueve la coagulación y la respuesta inflamatoria⁵⁰. En conjunto, el TNF- α y la IL-1 β incrementan la producción de trombina, del factor activador de plaquetas (PAF) e incrementa la permeabilidad celular^{54,55}. Asimismo, se han descrito cambios estructurales y funcionales en las células endoteliales cuando existe una coexpresión de TNF- α e IL-1 β ⁵⁶.

Finalmente, la IL-6 es una citocina pleiotropica con efectos importantes en el proceso inflamatorio, la respuesta inmune y la hematopoiesis⁵⁷. Durante la PE, cantidades significativas de esta citocina son sintetizadas en la placenta en respuesta a la presencia de trofoblastos necróticos⁵⁸ producidos por la perfusión intermitente. Lo anterior favorece el incremento de IL-6 en sangre periférica de pacientes con PE, los cuales incluso dependen de la severidad de la enfermedad^{44,59-61}. Por otra parte, modelos animales en los que se induce una baja perfusión placentaria han demostrado incremento de IL-6 que se asocia con hipertensión y proteinuria⁶²⁻⁶⁵. Más aún, los modelos murinos ha demostrado que la perfusión de IL-6 ocasiona signos similares a los de PE^{35,62,66}. Asimismo, experimentos *ex vivo* utilizando un sistema placentario de perfusión dual como modelo de preeclampsia,

mostró que condiciones hipóxicas incrementa la secreción de IL-6 a través de la inducción de estrés oxidativo⁶⁷. Por su parte, estudios *in vitro* con trofoblastos aislados de placentas provenientes de pacientes preeclámpicas demostraron que condiciones hipóxicas también inducen la expresión de IL-6⁶⁸. Los efectos sistémicos producidos por esta citocina en mujeres embarazadas incluyen incremento de moléculas de adhesión y permeabilidad endotelial, reclutamiento de células inmunológicas que favorecen el estrés oxidativo endotelial, producción de factores anti-angiogénicos y la estimulación de células B para producir AA-AT1, que en conjunto contribuyen con la disfunción endotelial e hipertensión durante la PE^{69,70}.

De entre todas estas citocinas, destaca de manera sustancial la IL-6 debido a que es producida por el trofoblasto y ejerce múltiples efectos sistémicos que explican en parte la fisiopatología y sintomatología de la PE, principalmente aquellos relacionados con la disfunción endotelial.

Interleucina 6

La IL-6 fue inicialmente identificada como el factor 2 estimulante de células B; sin embargo, cuando su gen fue clonado en 1986 se describió totalmente idéntico al factor estimulante de hepatocitos, al factor de crecimiento de hibridomas y al interferón (IFN)- β 2, por lo que finalmente fue llamado interleucina 6⁵⁷ y a partir de este momento se describió como una interleucina que si bien se produce prácticamente de la misma manera en todas las células, sus efectos son realmente variados.

Síntesis y estructura

El gen que codifica para la IL-6 se encuentra en el cromosoma 7p21 y contiene cuatro intrones y cinco exones⁷¹. Su expresión se regula por elementos directos como factores de transcripción, pero también existen ciertos elementos regulatorios indirectos como son los miARNs, ARNsas o proteínas unidoras de ARN⁵⁷.

Este gen codifica una proteína glicosilada monomérica de 212 aminoácidos (28 corresponden al péptido señal) cuyo peso molecular varía dependiendo de las modificaciones postraduccionales a las que es sometida en cada tipo celular que la produce, siendo entre 21 a 28 kDa^{57,71}. Tiene una estructura de 6 α -hélices unidas, dos sitios potenciales de N-glicosilación, aunque de igual manera hay variantes con O-glicosilación, puede ser fosforilada en diversos residuos de serina y se ha visto que también tiene sitios de sulfonación.

Una vez sintetizada, la IL-6 se secreta de manera constitutiva utilizando un sistema de empaquetamiento y transporte tubulovesicular, el cual consiste en la formación de vesículas secretoras o gránulos terciarios que son transportados a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi vía endosomas hasta la membrana plasmática. Este proceso normalmente se lleva a cabo en minutos u horas después de su síntesis⁷². La

concentración de esta proteína en circulación sanguínea de manera normal es baja, siendo entre 1 a 5 pg/mL^{57,71,73,74}. En algunos casos, sobretodo en fibroblasto, la IL-6 secretada puede formar complejos oligoméricos que presentan un peso de entre 45 a 85 kDa; sin embargo, este complejo no puede ejercer efecto alguno ya que existe un impedimento estérico para unirse tanto a su receptor como a la proteína gp130 que también funciona como receptor de esta interleucina⁷¹.

Por otra parte, en neuronas se ha demostrado que la síntesis de la IL-6 se lleva a cabo después de un estímulo con IL-1 β ; sin embargo, en estas células no se libera inmediatamente ya que se acumula de manera perinuclear hasta que existe un segundo estímulo de despolarización neuronal, entonces es transportada y liberada a través del aparato de Golgi⁷⁵, por lo que se puede deducir que si bien la IL-6 se sintetiza en todos los tipos celulares, su secreción no es regulada de igual manera en todas ellas^{71,76}.

Regulación de su síntesis

Debido a que la IL-6 es una molécula pleiotrópica con múltiples funciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias y es producida por distintos tipos celulares incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, células de la glía, adipocitos, células epiteliales intestinales y trofoblastos entre otras⁷⁴, los estímulos para su síntesis y secreción son variados.

El principal estímulo para las células inmunológicas durante un proceso infeccioso son los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que incluyen al lipopolisacárido, ácido lipoteicoico y péptidoglicanos entre otros, que en primera instancia son reconocidos por los monocitos o macrófagos que casi de manera inmediata comienzan la secreción de esta citocina. Por otra parte, durante un proceso inflamatorio no infeccioso, son los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) como el ADN mitocondrial y las proteínas S100, los que favorecen la secreción de IL-6⁷⁴. Otros factores capaces de inducir

la secreción de IL-6 en células como las mesenquimales, las endoteliales y los fibroblastos incluyen a la IL-1 β , el TNF- α , el estrés oxidativo, las prostaglandinas, las adipocinas y otras citocinas⁷⁶.

Las vías de señalización que se activan para inducir la síntesis y secreción de IL-6 son diversas; sin embargo, se ha observado que principalmente son las que involucran a JNK, ERK1/2 y NF- κ B^{57,77}, así como en algunos tipos celulares a AKT, PI3K y a la vía de APE/Ref-1^{74,78,79}. La estimulación de estas vías de señalización activan diversos factores de transcripción que regulan la expresión de la IL-6, entre ellos se encuentran la proteína activadora 1 (AP1), el mismo NF- κ B, la proteína específica 1 (SP1), el factor nuclear IL-6 (NF-IL-6) y el factor regulador 1 de interferón (IRF1)⁵⁷.

Mecanismo de acción

Los efectos de la IL-6 dependen del tipo celular en el cual actúe, pero el mecanismo por el cual activa a las células es básicamente el mismo en todas. Comienza cuando la IL-6 se une a su receptor IL-6R, una glicoproteína transmembranal de 80 KDa, y a dos unidades transmembranales de la proteína transductora de señales tipo G de 130 KDa (gp130). Estudios estructurales han demostrado que este complejo de activación es hexamérico y está formado por dos moléculas de IL-6, dos de IL-6R y dos de gp130⁸⁰, aunque bien en ocasiones puede formarse un complejo tetramérico (IL-6/IL-6R/2gp130) de manera dependiente de la concentración de IL-6⁸¹. Existen algunas células que únicamente expresan la gp130 y sin embargo son capaces de responder al estímulo de la IL-6 debido a que existe una vía de transactivación que no requiere del IL-6R. Esta vía se activa gracias a que el IL-6R puede encontrarse de manera soluble (sIL-6R) por acción de MMPs o por empalme alternativo que eliminan el dominio transmembranal y es capaz de unir a la IL-6 en el torrente sanguíneo. Una vez que este complejo es formado, puede unirse a los

dímeros transmembranales de gp130 y activar de manera “normal” las vías de señalización correspondientes⁷³.

La señalización que se inducen por la estimulación del dímero de gp130 debido a la interacción de la IL-6 con su receptor o bien con el complejo sIL-6R-IL-6, involucra dos vías. La primera consiste en la activación de la familia de tirosin-cinasas JAK (quinasas asociadas a Janus) que conduce a la fosforilación y activación de dos factores de transcripción de la familia STAT (transductores de señal y activadores de la transcripción), que al dimerizarse se translocan al núcleo y en conjunto con el factor nuclear (NF)-IL-6 inducen la expresión de genes que contiene los elementos de respuesta tipo 2 para la IL-6. La segunda vía consiste en activar las vías de ERK1/2 y PI3K a través de la GTPasa Ras⁷³.

La señalización inducida por la IL-6 puede regularse a diferentes niveles, en primer lugar, ocurre por la expresión de los llamados supresores de la señalización de citocinas (SOCS) inmediatamente después de la activación de JAK-STAT, los cuales se unen al dominio citoplasmático de la gp130 regulando así la fosforilación JAK. El segundo nivel de regulación incluye la formación de una fracción soluble de la proteína gp130 capaz de secuestrar el complejo sIL-6R-IL-6 antes de activar las células⁷⁶.

Actividad biológica

La IL-6 es una citocina que representa perfectamente bien a las citocinas pleiotrópicas ya que tiene múltiples efectos en diferentes circunstancias y tipos celulares. Está involucrada en la activación de la fase aguda de la inflamación, ya que en caso de traumas o quemaduras es rápidamente secretada^{74,76}; además incrementa la producción de linfocitos B e induce la activación de éstos para diferenciarse a células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas^{57,73}, actúa como factor de crecimiento en hibridomas y células de mieloma⁷⁴. Asimismo, tiene la propiedad de reclutar linfocitos T y favorecer su diferenciación que dependerá de las condiciones del microambiente presente en ese

momento. Por ejemplo, linfocitos T naive en presencia de IL-6 pueden diferenciarse a células Th17 siempre que sean coestimuladas con TGF- β , mientras que su diferenciación será a Th2 productoras de IL-4 al coestimularse con IFN- γ ^{57,73}. Además, regula la transición entre la inmunidad innata y la adquirida mediante la activación de neutrófilos⁷⁶. Cabe mencionar que una sobreproducción de IL-6 contribuye a enfermedades autoinmunes tales como el lupus y a la formación de mielomas⁷¹.

Por otra parte, entre los efectos que no involucran células del sistema inmune, la IL-6 promueve la maduración de megacariocitos por lo que aumenta la cantidad de plaquetas en torrente sanguíneo, y además estimula la hematopoyesis en médula ósea. De igual manera, induce la producción de proteínas de fase aguda tales como proteína C reactiva, amiloidina A sérica, fibrinógeno, hepcidina y antiqumiotripsina- α 1 a partir de los hepatocitos⁷⁴. Asimismo, se ha encontrado que la sobre-secreción de IL-6 ayuda a la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial⁸². En lo que respecta al torrente sanguíneo, regula la concentración sérica de hierro y zinc a través de sus transportadores, mientras que en otros tejidos ayuda a la absorción de lípidos, induce la diferenciación de las células del sistema nervioso, regula la homeostasis ósea, ajusta la sensibilidad al dolor, regula la tolerancia a la glucosa y tiene actividad tipo hormonal en enfermedades vasculares^{71,73,74,76}. Estas sólo son algunas de funciones ya que se ha demostrado que afecta otros órganos y sistemas que incluyen el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, el sistema neuropsicológico y el sistema vascular.

Actividad biológica de la IL-6 durante la PE

Los efectos biológicos inducidos por el incremento de IL-6 en mujeres embarazadas favorecen, en parte, la aparición de los signos y síntomas de la PE, debido a que se relacionan principalmente con la disfunción endotelial sistémica materna⁸³ (Figura 3). Entre las acciones más relevantes de esta interleucina con relación a esta disfunción podemos

mencionar al menos tres, cuyos mecanismos de acción durante esta patología han sido descritos previamente de manera detallada. El primero consiste en el incremento de endotelina que es un péptido producido por las células endoteliales y cuyo efecto principal es la vasoconstricción^{35,59}. La segunda acción involucra el aumento del sFlt-1 que como se mencionó, es capaz de secuestrar al VEGF e inducir un efecto antiangiogénico y aumento de la permeabilidad vascular³⁵. Finalmente, el tercer efecto se relaciona con la estimulación de la producción de AT1-AA^{35,59,76,83}, lo que provoca incremento de estrés oxidativo y aumento de la sensibilidad a angiotensina II.

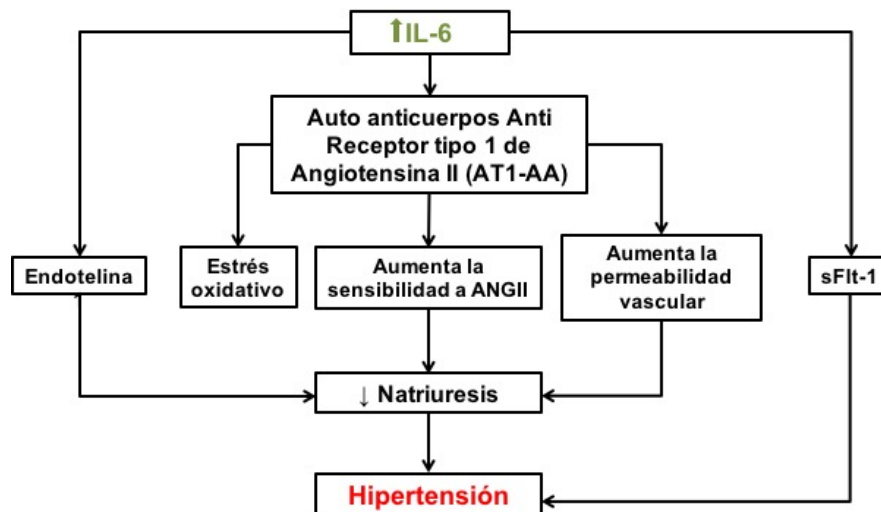


Figura 3. Efectos de IL-6 que contribuyen al desarrollo de la PE.

Factores asociados al desarrollo de la PE capaces de inducir IL-6

La IL-6 participa de manera importante en el desarrollo y manifestaciones clínicas de la PE, por lo que es necesario conocer y/o caracterizar las condiciones fisiopatológicas y los factores que pudieran modificar su síntesis durante esta complicación obstétrica. A este respecto podemos hipotetizar que factores genéticos, infecciosos, obesidad y

contaminantes ambientales pudieran ser responsables de la inducción de IL-6 durante la gestación y esto provocar el desarrollo de la PE.

En lo que respecta a los factores genéticos, diversos grupos de investigación han abordado el estudio de polimorfismos en el promotor de la IL-6 durante la PE. Los resultados obtenidos hasta el momento no son concluyentes debido a que existen reportes contradictorios. Por ejemplo, el polimorfismo -174 G/C del promotor de la IL-6 se asocia a preeclampsia en población de India⁸⁴ y Brasil⁸⁵, mientras que no existe en mujeres preeclámplicas de Austria⁸⁶, Turquía⁸⁷, China⁸⁸, Arabia Saudita⁸⁹ y México⁹⁰.

La respuesta inflamatoria contra infecciones durante el embarazo tiene un papel importante en el desarrollo de la PE debido a que induce un cambio en el perfil de citocinas inmunológicas de Th2 a Th1, incrementándose las citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α e IL-6. Los agentes infecciosos que más se asocian a la PE son bacterias involucradas en la enfermedad periodontal, infecciones del tracto urinario, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, agentes virales como citomegalovirus, virus del herpes simple tipo 2, virus de la inmunodeficiencia humana y algunos parásitos especialmente *Plasmodium spp.* y *Toxoplasma gondii*⁹¹.

La obesidad se ha descrito como uno de los principales factores de riesgo para la aparición de PE, sin importar que se haya presentado antes o durante el embarazo¹⁶. Para justificar esta asociación, se han propuesto diversos mecanismos entre los que principalmente se encuentran la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia e inflamación sistémica materna⁹². Se ha sugerido que los dos primeros mecanismos afectan la implantación placentaria mediante la alteración de la síntesis de óxido nítrico a partir del trofoblasto, así como el aumento de la secreción de citocinas pro-inflamatorias por parte del tejido adiposo. Por otra parte, el tercer mecanismo se relaciona de igual manera con la secreción de citocinas pro-inflamatorias a partir del tejido adiposo, pero a diferencia del

anterior, éste es favorecido por la gran cantidad de leptina presente. Las citocinas que se secretan principalmente son la IL-6 y el TNF- α , que como ya se ha discutido, se asocian con el desarrollo de la PE⁹.

En cuanto a los factores ambientales, al día de hoy se sabe que la contaminación en el aire está asociada al desarrollo de PE, sin embargo, el mecanismo por el cual se asocian aún no está del todo esclarecido. Se ha propuesto con base en estudios poblacionales y modelos animales que la inflamación desempeña un papel importante, en especial el material particulado de 2.5 μm , 10 μm y cadmio presente en el aire, ya que son capaces de inducir la expresión de IL-6⁹³⁻⁹⁶.

Cadmio

El Cadmio (Cd) es un metal pesado de color blanco con ligero tono azulado que se encuentra en la naturaleza en cantidades bajas, principalmente en forma de sulfuros, aunque también se puede encontrar como carbonato, óxido, cloruro e hidróxido, junto con otros metales más abundantes como el zinc, el plomo y el cobre^{79,97}. México es el 6° productor de Cd a nivel mundial⁹⁸, y éste se comercializa en forma de óxidos, polvillo, liga 3 "D", afinado y en concentrados de zinc. Se emplea en diversos procesos, principalmente en la fabricación de tubos fluorescentes para televisores a color, como catalizador en la producción primaria de alcoholes y controles de reactores nucleares⁹⁹. Además es un componente de baterías, plásticos, algunos pigmentos y paneles solares¹⁰⁰.

El Cd es considerado tóxico y peligroso para la salud por el Registro Internacional de Químicos Potencialmente Tóxicos del Programa Ambiental de las Naciones Unidas^{100,101} y además, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha clasificado a este elemento como carcinógeno humano tipo I, por lo que recomiendan minimizar la exposición a este metal^{101,102}.

Desafortunadamente, al contrario de la sugerencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la IARC de minimizar la exposición a este metal, la cantidad de Cd a la que estamos expuestos aumenta a diario y se ha convertido en uno de los principales metales pesados contaminantes¹⁰³. Esto es debido a que si bien existen vías naturales de liberación de cadmio como las erupciones volcánicas, la erosión y los incendios; la actividad humana incrementa considerablemente la presencia de este metal en el medio ambiente^{79,100,101}. Entre las actividades que generan la mayor liberación de Cd al medio ambiente se encuentran la extracción y refinamiento de otros metales con los que se asocia de manera natural, en especial con el zinc^{97,99}, así como el inadecuado manejo de los desechos de las industrias que lo utiliza como materia prima y de componentes de los cuales forma

parte^{103,104}. Por ejemplo, en México, se calcula que se podrían recuperar al menos 139 toneladas de Cd para el año 2043, a partir sólo de celdas fotovoltaicas desechadas¹⁰⁴. Por otra parte, un estudio realizado en alimentos irrigados con agua de desecho en El Valle del Mezquital (Estado de México) demostró que la contaminación por Cd permanece e incluso aumenta en correlación directa con el número de años de irrigación, especialmente este aumento se observa en las semillas de trigo, que es lo que finalmente consumimos¹⁰⁵. De manera preocupante, el incremento de Cd en los alimentos se ha mantenido y un reporte publicado en 2017 indica que, en mujeres embarazadas de México, monitoreadas entre 1999 y 2004, el aumento de Cd en orina está directamente asociado con el consumo de frutas y vegetales, mientras que el aumento en sus hijos está relacionado a la ingesta de papas¹⁰⁶. También, recientemente se ha reportado que en los Bitzales (Reserva ecológica en Tabasco) los niveles de cadmio encontrado en el agua son de 13.95¹⁰⁷ mg/L aún cuando la Norma Oficial Mexicana para la salud ambiental indica que el límite máximo permitido es de 0.005 mg/L¹⁰⁸. Basados en los datos anteriores se comprueba que la exposición de la población mexicana a este metal va en aumento a través del agua, el aire, el suelo y los alimentos.

En 1997 se encontró que la concentración de Cd en saliva (25 µg/dl) es superior en población abierta de la Ciudad de México al compararse con otros países como Estados Unidos, Canadá o Reino Unido¹⁰⁹. Más recientemente, un estudio reportó que hombres mayores de 40 años en la Ciudad de México tienen una cantidad mayor o igual de Cd en sangre a la encontrada en población altamente expuesta en el sur de Tailandia¹¹⁰. Tradicionalmente pensamos que la exposición a este metal debe ser mayor en las grandes ciudades como la Ciudad de México, Monterrey o Guadalajara por asociarlas con población expuesta a contaminación. Sin embargo, en un estudio realizado con niños de distintas ciudades del país, se encontró que las concentraciones de Cd en orina van desde 0.5 hasta 15 µg/dL¹¹¹, siendo las regiones mineras de Zacatecas y las cercanas a las refinerías en

Veracruz las que presentan los niveles más elevados. Por otra parte, estos datos sugieren que deben realizarse estudios más minuciosos, principalmente en población susceptible como niños y mujeres embarazadas, para conocer con certeza los niveles de cadmio en la población de las diferentes regiones de México.

Toxicocinética

Actualmente existe una gran cantidad de datos acerca de la absorción, distribución y acumulación del Cd; sin embargo, aún permanecen algunas incógnitas, sobre todo en su excreción, que no permiten la evaluación exacta de sus efectos, por lo que es importante entender la toxicocinética de este metal.

Absorción

Las principales vías de absorción para el Cd son la gastrointestinal y la respiratoria, aunque también la vía dérmica podría aportar una cantidad limitada. Por vía gastrointestinal se absorbe entre el 5 al 7% del cadmio ingerido en alimentos o agua contaminada, porcentaje que aumenta cuando existe una deficiencia de hierro o bien si se ingieren menores cantidades de éste^{100,112}. Esta absorción aumentada en ausencia de hierro se debe a la pérdida de la inhibición competitiva que ocurre por compartir el transportador de metales divalentes 1 (DMT1) entre el hierro y el Cd. Por otra parte, el Cd también puede ser absorbido en el intestino de manera independiente del DMT1, mediante el transportador de Zn (hZTL1) y los canales de Ca, por lo que las concentraciones de estos iones u otros micronutrientes también pueden modificar la absorción intestinal del Cd¹¹³. Otro factor importante a considerar son las dietas con alto contenido de grasa y proteínas, ya que éstas incrementan el tiempo de tránsito intestinal y por lo tanto favorecen una mayor absorción de Cd¹¹⁴. Finalmente, la edad también modifica este proceso, ya que se ha observado un correlación inversa, es decir, a mayor edad menor la capacidad de absorción intestinal para el Cd^{115,116}.

La absorción pulmonar es la vía principal de exposición ocupacional o bien para personas fumadoras, debido a la inhalación de humos, vapores o aerosoles. Cabe mencionar que la cantidad absorbida de Cd depende de la composición química, tamaño de partículas y retención en el pulmón^{100,117}. Por ejemplo, el Cd inhalado en partículas grandes mayores a 10 μm permanecerá depositado en las vías aéreas superiores, mientras que las partículas pequeñas aproximadamente de 0.1 μm llegarán a los alveolos, donde el Cd será rápidamente absorbido. Se calcula que la absorción de Cd en los alveolos es de entre el 7 al 40% de las partículas depositadas; sin embargo, este porcentaje aumenta a 25 o 50% cuando el cadmio es inhalado en el humo de cigarro^{112,118}.

Distribución

Una vez que el Cd es absorbido se transporta por torrente el sanguíneo a otros tejidos, principalmente dentro de los eritrocitos unido a un grupo de proteínas de bajo peso molecular denominadas metalotioneninas (MTs), aunque también pueden ser transportado por estas proteínas libres en el plasma. Otros mecanismos de transporte incluyen la conjugación con el glutatión o aminoácidos como la cisteína, así como la unión a proteínas de alto peso molecular como la albumina¹¹⁹. En el caso específico de la albumina, cabe mencionar que, debido a su tamaño, la distribución será únicamente al hígado.

El aclaramiento de este metal es rápido y se distribuye principalmente en hígado, hueso, pulmón y riñón^{100,120,121}, siendo este último donde más se acumula a lo largo del tiempo, ya que es el encargado de su eliminación. Otros órganos capaces de acumular Cd incluyen a la placenta, ovarios, testículos y próstata¹²², en donde la presencia de este metal induce el incremento significativo de la síntesis de MTs de manera rápida, ya que además de transportarlo en el torrente sanguíneo tienen la capacidad de inhibir sus efectos tóxicos en la célula¹²¹.

Excreción

La excreción del Cd es muy baja y solo entre el 0.01 al 0.02% del Cd total acumulado es eliminado diariamente mediante heces y orina. La excreción urinaria se incrementa con la edad y es proporcional con su carga corporal, a diferencia de la eliminación por heces que no se relaciona con la edad, debido a que entre el 90 y 95% del Cd ingerido no es absorbido. Esta baja tasa de excreción del cadmio explica su alta retención en el organismo así como que su vida media biológica sea de entre 15 a 30 años¹⁰⁰.

Toxicodinamia

Los mecanismos moleculares por los cuales el Cd es absorbido a las células incluyen al menos dos proteínas, el DMT1 y la proteína transportadora 8 de zinc (ZIP8), las cuales han sido identificadas como los transportadores responsables en la mayoría de los tejidos incluyendo pulmón, intestino, hígado, riñón y testículos^{123,124}. Una vez dentro de la célula, el Cd no es metabolizado o al menos no se conoce que sea sometido a alguna conversión directa como alquilación, oxidación o reducción. Sin embargo, este metal si se une a grupos aniónicos, preferencialmente a grupos sulfhídrico de las proteínas metalotioneinas y albumina, las cuales lo retienen en el interior de la célula y evitan que pueda alterar otros componentes celulares¹¹².

A pesar de este mecanismo de protección celular, existe la posibilidad de que una proporción de Cd quede libre en el interior de la célula, ocasionando alteraciones celulares que conllevan a procesos tales como apoptosis, disrupción de la adhesión celular, afectación de la proliferación celular, mutagénesis y modificación del patrón de citocinas, entre otras¹¹². En conjunto, todos estos cambios pueden inducir una disfunción celular propia de cada tejido, desencadenando condiciones patológicas en diferentes órganos y sistemas como en riñón, pulmones y hueso. Los mecanismos principales mediante los cual el Cd induce estas alteraciones es la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs)

debido a la disminución en el potencial antioxidante, así como la activación de diversas vías de señalización que modifican la expresión de diversos genes¹²⁵.

Especies Reactivas de Oxígeno

La generación de EROs por Cd se realiza de manera indirecta ya que no es un metal oxido-reductor¹²⁵; pero tiene la capacidad de disminuir de manera significativa el potencial antioxidante de la célula, lo que permite que las EROs producidas principalmente por la mitocondria, se acumulen¹²⁶. Por ejemplo, estudios *in vitro* han demostrado que la exposición a Cd (5 μ M) disminuye en un 50% el contenido total de glutatión ocasionando un incremento de la producción de EROS¹²⁷. Por otra parte, utilizando células derivadas de hígado de rata, se ha observado que la exposición a Cd (150 μ M) provoca la disminución de la catalasa a niveles indetectables, mientras que los niveles de la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa disminuyen en un 21.7% y 43.9%, respectivamente. En conjunto, estos cambios inducen un aumento de las EROs, así como la reducción de la viabilidad celular en un 40%. De manera interesante, todos estos efectos son revertidos cuando las células son tratadas con N-acetilcisteína (NAC), un potente anti-oxidante, antes, durante o después de la exposición al Cd¹²⁸.

Por otra parte, utilizando un modelo experimental de ratas en donde recibieron agua *ad libitum* conteniendo 40 mg/L de CdCl₂, se encontró que los marcadores de estrés oxidativo en plasma aumentaron significativamente ya que a las 6 semanas de exposición se observó incremento del malondialdehído de 23.4 nM a 69.4 nM, mientras que la actividad de la catalasa, la superóxido dismutasa, el glutatión y la capacidad antioxidante total en plasma disminuyeron de 20.5 a 10.9 U/mL, 7.9 a 1.7 U/mL, 5.9 a 4.6 mg/L y 1.6 a 0.5 mM, respectivamente. La co-administración del antioxidante curcumina en este modelo experimental revirtió los efectos observados, alcanzándose valores similares a los del grupo

de ratas control, demostrando así que el Cd es un inductor potente de la generación de EROs.

El estrés oxidativo o incremento de la generación de EROs en la célula inducido por el Cd ocasiona cambios importantes en diversos componentes celulares. Por ejemplo, en el núcleo, la presencia de estas moléculas causa daño en el ADN produciendo mutaciones¹²⁹. En lo que respecta a las proteínas y lípidos, induce tanto oxidación como peroxidación, causando modificaciones importantes en la membrana celular y sus funciones. Además, los productos derivados de la peroxidación lipídica pueden reaccionar a su vez con el ADN, ocasionando un mayor índice de mutaciones^{130,131}. Las mitocondrias desempeña un papel importante no solo por generar las EROs, sino porque además éstas mismas dañan tanto la membrana externa como interna de este organelo provocando un déficit en la producción de ATP y desencadenando así la muerte celular por apoptosis¹³².

Activación de vías de señalización y desregulación de la expresión génica

Otro de los mecanismos principales por el cual el Cd puede inducir procesos patológicos es mediante la desregulación de la expresión de diversos genes a través de la activación de vías de señalización. En general, se ha demostrado que el Cd no altera la función del receptor, sino que en realidad modifica los niveles o actividad de segundos mensajeros afectando la expresión de genes relacionados principalmente con el ciclo celular, la respuesta inmune, el metabolismo, la muerte celular y la carcinogénesis.

El Cd es capaz de activar diversas vías de señalización intracelular como son la vía de ERK1/2, JNK, p38-MAPK, PI3K, AKT, entre otras. Los mecanismos moleculares responsables de la activación de estas vías son dos principalmente: 1) incremento de Ca intracelular y 2) aumento en la generación de EROs¹³³.

Con respecto al incremento de Ca intracelular, se ha demostrado que el Cd inactiva la ATPasa de calcio localizada en el retículo endoplásmico mediante su unión a grupos SH,

provocando un incremento en la concentración de calcio intracelular, que tiene como consecuencia la activación sostenida de cinasas dependientes de calcio como la PKC, CDPK, CaMKII, entre otras^{134,135}.

Las EROs generadas por los mecanismos previamente descritos, también tienen la capacidad de activar diversas vías como son JNK, ERK1/2, NFκB, entre otras¹³⁶. En este caso, el mecanismo molecular aún no ha sido descrito completamente; sin embargo, se ha propuesto que las EROs activan directamente proteínas sensoras para radicales libres, las cuales a su vez activan otras proteínas propias de las cascadas de señalización o bien factores de transcripción¹³⁷. Otro mecanismo propuesto involucra la inactivación de proteínas inhibitoras de las cascadas de señalización mediante la oxidación de cisteínas o formación de puentes disulfuro por la presencia de EROs, permitiendo la activación de las vías de señalización¹³⁷.

La activación de las vías de señalización intracelular por el Cd en la mayoría de los casos culmina con la activación de factores de transcripción como AP-1 y NFκB, lo que se traduce en la expresión de genes relacionados con apoptosis, proliferación celular e inflamación^{125,138-140}. En lo que respecta a la presente tesis, es de interés los genes relacionados con el proceso inflamatorio.

Inflamación

La exposición al Cd tanto ocupacional como ambiental, induce un proceso inflamatorio, el cual involucra la producción y liberación de citocinas tales como TNF-α, IL-1β, IL-8 e IL-6. En lo referente a la síntesis de TNF-α e IL-1β, se ha observado un efecto diferencial que depende del tejido o célula expuesta. Por ejemplo, la exposición de las líneas celulares HepG2, Raw 264.7, THP1, A549, así como macrófagos alveolares obtenidos de ratas induce un incremento tanto de TNF-α como de IL-1β, mientras que al utilizar la línea celular Calu-3 y células epiteliales pequeñas derivadas de pulmón (CEPP) no se demostró

cambio alguno¹⁴⁰⁻¹⁴⁴. De manera contraria, cuando se emplearon cultivos enriquecidos de neumocitos tipo-2, la exposición a Cd disminuyó la síntesis de TNF- α e IL-1 β ¹⁴². Utilizando modelos *in vivo*, también se ha demostrado un efecto diferencial ya que la exposición a Cd por vía oral no tiene efecto en la síntesis de estas citocinas a partir de los enterocitos, pero si estimula al menos la expresión hepática de TNF- α ^{145,146}. En lo que respecta a la producción de IL-8, se ha demostrado que el Cd es un inductor potente para esta citocina, ya que tanto en líneas celulares como HepG2, Calu-3 y THP1, así como en cultivos primarios de CEPP y células del epitelio bronquial, la exposición a este metal incrementa su liberación^{141-144,147}. Los modelos *in vivo* también mostraron que la exposición oral al Cd induce la expresión de IL-8 en el duodeno y yeyuno proximal¹⁴⁵. Finalmente, en relación con la expresión de IL-6 se ha observado que la exposición de las líneas celulares HepG2, Calu-3 y A549 así como cultivos primarios de células derivadas de pulmón de rata y CEPP, induce la expresión tanto del mRNA como de la proteína^{142-144,147,148}. Asimismo, utilizando modelos murinos también se demostró que el Cd incrementa los niveles de IL-6 en hígado, pulmón y plasma^{146,149,150}.

Toxicidad del Cadmio

La exposición aguda y crónica al Cd produce efectos adversos a nivel sistémico en la salud humana, siendo los órganos y sistemas más susceptibles a daño por este metal los pulmones, el sistema nervioso, el hueso, los riñones, el sistema cardiovascular y el sistema reproductivo¹⁰⁰.

En lo que se refiere a las vías aéreas superiores, se ha observado que el Cd induce inflamación principalmente en nariz, faringe y laringe. En cuanto a las vías aéreas inferiores se han reportado el desarrollo de enfermedad pulmonar crónica obstructiva¹⁰⁰, pero sin duda el daño más reconocido es el cáncer pulmonar que ha sido reportado en población expuesta de diversos países¹⁵¹. Asimismo, estos mismo hallazgos con respecto al cáncer

pulmonar han sido confirmados utilizando modelos experimentales en animales expuestos por vía respiratoria al Cd¹⁰¹. Los mecanismos por los cuales este metal induce la carcinogénesis pulmonar es mediante aberraciones cromosómicas, rompimiento de la cadena de ADN, inducción de estrés oxidativo, inhibición de la reparación del ADN, pérdida de la regulación del ciclo celular, alteración de las funciones de los genes supresores de tumor e inflamación^{101,151}.

Por otra parte, el Cd depositado en las fosas nasales puede ser transportado directamente al sistema nervioso (SN) central y periférico^{100,152}. La presencia de éste en el SN se asocia con un incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, retardo mental, dificultad de aprendizaje y dislexia, entre otras¹⁵². Los mecanismos toxicológicos por los cuales este metal provoca la afectaciones neurológicas aún no han sido esclarecidos; sin embargo, se ha propuesto que la producción de EROs, la alteración de neurotransmisores, la interacción con otros iones y la disrupción endocrina, desempeñan un papel importante^{100,152}.

En hueso, el Cd ocasiona desmineralización, inhibe las proteinasas-C pro-colágeno y la producción de colágeno, que en conjunto disminuye la masa ósea, ocasionando osteoporosis principalmente en mujeres post-menopáusicas. La enfermedad Itai-itai es otra patología ósea asociada a la intoxicación severa por Cd, que se caracteriza por la desaparición de las trabéculas y el acortamiento del cartílago epifiseal¹¹⁸. Además, en esta enfermedad se han comprobado osteomalacia y osteoporosis por lo que pequeños traumatismos pueden producir múltiples fracturas. El mecanismo molecular que ocasiona la descalcificación ósea aún no se ha esclarecido completamente, sin embargo, se ha observado en estos pacientes una disminución de los niveles plasmáticos de la hormona paratiroidea, del metabolismo de la vitamina D₃ y del colágeno así como incremento de la liberación de Ca desde el hueso^{100,118}.

El riñón es uno de los órganos con mayor afectación debido a que es donde se acumula en mayor proporción, ya que existe una reabsorción preferencial en el túbulo proximal a través de endocitosis mediada por receptores¹⁵³. El daño renal ocasionado por el Cd produce un aumento en la filtración de minerales y proteínas que aunado a la disminución de la capacidad de reabsorción se manifiestan como proteinuria, pérdida de calcio y lesión tubular¹¹⁸. La exposición crónica a Cd puede progresar a un síndrome renal de Fanconi o bien a una falla renal, sobre todo si existen otros factores que contribuyan al daño renal, como pueden ser diabetes o hipertensión¹⁵³. Estas manifestaciones clínicas se deben principalmente a que el Cd puede ocasionar un daño celular que disminuye la capacidad reabsortiva de los túbulos proximales¹¹⁸; en los casos más severos también se observa una depresión de la función glomerular, ya que el exceso de Cd no puede ser contenido por la metalotioneínas¹⁰⁰.

El sistema cardiovascular también es uno de los que más se ve afectado debido a que el Cd induce la formación de placas arterioescleróticas, disfunción endotelial, pérdida de la estructura endotelial y eventos trombogénicos^{100,118}, que aunados al daño renal, ocasionado por el Cd, tienen una gran influencia en la aparición de hipertensión. En población abierta, la concentración de Cd en sangre, pero no en orina, correlacionan con un incremento de la presión arterial sistólica y diastólica así como con un incremento en la prevalencia de hipertensión, sobre todo entre la población no fumadora^{154,155}.

A nivel reproductivo, el Cd es considerado como un disruptor endocrino ya que es capaz de mimetizar los efectos de los estrógenos tales como la activación de genes regulados por esta hormona, inicio temprano de la pubertad, alteración de la fisiología ovárica, promoción de la maduración de ovocitos, incremento del peso uterino y estimulación del desarrollo mamario^{156,157}. Este efecto es corroborado por el hecho de que, al administrar antagonistas estrogénicos, los efectos desaparecen. También se ha demostrado que este efecto es específico del Cd, y que no es debido a su carácter metálico,

ya que en presencia de Zn, el receptor α de estrógenos es activado de manera no competitiva por el Cd¹⁵⁷.

En lo que respecta al embarazo, se ha descrito que este metal es capaz de alterar la esteroidogénesis placentaria, el desarrollo y progresión del embrión pre-implantatorio y el proceso de implantación¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Además su presencia en sangre o placenta se ha asociado al desarrollo de aborto recurrente, bajo peso al nacer, restricción en el crecimiento intrauterino, parto prematuro y preeclampsia^{158,161,162}.

Por ejemplo, estudios realizados con mujeres de Polonia¹⁶³, Egipto¹⁶⁴ y Nigeria¹⁶⁵ que han padecido de abortos recurrentes mostraron una concentración elevada de Cd tanto en sangre como en placenta comparativamente con mujeres que tuvieron un embarazo a término. Los mecanismos moleculares que desencadenan abortos recurrentes aún permanecen poco estudiados, sin embargo, se ha propuesto que este metal puede inhibir la expresión del receptor de LDL, lo que conduce a una disminución de colesterol y por ende de la producción de progesterona¹⁶⁶. Además, se ha propuesto que el Cd puede interferir con la síntesis propia de estrógenos, o bien funcionar como antagonista de esteroides endógenos. Finalmente, otro mecanismo incluye al estrés oxidativo ya que en el estudio de Nigeria, se reporta que las mujeres más susceptibles a padecer abortos son aquellas con altos niveles de Cd y bajos niveles de micronutrientes tales como zinc, cobre y vitamina E¹⁶⁵.

El retardo de crecimiento intrauterino también se ha asociado con el Cd, ya que se han encontrado niveles elevados de este metal en mujeres de Chile¹⁶⁷ y EUA¹⁶⁸ que presentaron esta complicación obstétrica comparadas con los controles correspondientes. Por otra parte, los recién nacidos cuyas madres han sido expuestas a altas concentraciones de Cd principalmente en China^{169,170}, Myanmar¹⁷¹ y EUA¹²⁰, presentaron bajo peso al nacer. De manera interesante, el estudio realizado en China mostró que la exposición a Cd durante el embarazo, sobre todo en el primer trimestre se asocia con bajo peso al nacer

principalmente en neonatos femeninos comparativamente con los neonatos masculinos^{169,170}.

Con respecto al parto pretérmino, existe información contradictoria del papel que desempeña el Cd como un factor riesgo. Por ejemplo, estudios realizados en China, Polonia y Suecia reportan una mayor concentración sanguínea y urinaria de Cd en mujeres con parto pretérmino comparadas con sus contrapartes cuyo parto fue a término^{172,173,174}. De hecho, el estudio realizado en China también demostró que los neonatos presentaron bajo peso al nacer con un incremento en su mortalidad. En contraste, un estudio en Turquía no logro encontrar relación entre los niveles de Cd en sangre con el parto pretérmino¹⁷⁵.

En relación con la PE, existen diversos reportes que permiten asociar esta complicación obstétrica con la exposición al Cd a pesar de las limitaciones que presentan. Por ejemplo, un estudio realizado en Yugoslavia encontró que los niveles sanguíneos de Cd en mujeres embarazadas hipertensas no fumadoras eran dos veces más elevados que en mujeres embarazadas normotensas no fumadoras¹⁷⁶. Otro estudio llevado a cabo en Turquía, demostró de igual manera un incremento significativo en la concentración de Cd sanguíneo en mujeres preeclámpticas al compararse con mujeres embarazadas normotensas. Desafortunadamente, estos estudios no analizaron confusores potenciales por lo que es una limitante importante.

Esta asociación ha sido confirmada utilizando otras muestras biológicas. Por ejemplo, en 1999, utilizando líquido amniótico obtenido de pacientes preeclámpticas y normotensas entre las semanas 37-40 de gestación, se demostró diferencia significativa en los niveles de Cd¹⁷⁷. Más recientemente, estudios realizados con muestras de orina, sangre de cordón umbilical o placenta, confirmaron la asociación entre niveles elevados de Cd con la PE¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. El uso de diversas muestras biológicas demuestra que tanto la exposición crónica como la aguda son capaces de incrementar el riesgo para desarrollar esta complicación obstétrica.

Mecanismos moleculares por los cuales el cadmio puede inducir PE

La evidencia clínica asocia la exposición al Cd con el desarrollo de preeclampsia, sin embargo, los mecanismos moleculares de esta asociación aún no han sido estudiados. Por otra parte, el Cd también es capaz de inducir la expresión y secreción de IL-6 en diferentes sistemas. Esta interleucina ha sido ampliamente relacionada con el desarrollo de preeclampsia o bien la aparición de signos y síntomas similares a la preeclampsia en modelos animales. Por lo tanto, proponemos que un posible mecanismo por el cual el Cd induce la preeclampsia en mujeres embarazadas es a través del aumento de los niveles sanguíneos de IL-6. La placenta es una de las principales fuentes de hormonas y citocinas proinflamatorias durante el embarazo, por lo que pensamos que el trofoblasto podría ser una de las principales células afectadas por la exposición al Cd. Finalmente, la evidencia experimental ha mostrado que el Cd es capaz de activar diversas vías de señalización relacionadas con la expresión de IL-6. No obstante, aún se desconoce si la exposición de trofoblastos al Cd induce la expresión de IL-6 así como los posibles mecanismos moleculares. Por lo tanto, la presente tesis se enfocó en determinar el efecto del Cd en la producción de IL-6 así como los mecanismos moleculares involucrados en cultivos de trofoblasto.

Hipótesis

La exposición *in vitro* de células de carcinosarcoma (JEG-3) a cloruro de cadmio, inducirá un incremento de la secreción de IL-6 al activar las vías de MAPK a través del incremento en las especies reactivas de oxígeno intracelulares.

Objetivos

General

Establecer el efecto del cadmio en la expresión de IL-6, así como las vías de señalización que activan esta respuesta en la línea celular JEG-3, como modelo celular del trofoblasto.

Particulares

1. Evaluar el efecto del CdCl_2 en la síntesis de IL-6 a partir de la línea celular JEG-3 obtenida de un coriocarcinoma humano.
2. Determinar si la exposición de células JEG-3 al CdCl_2 activa las vías de señalización AKT, PI3K, ERK1/2 y JNK, así como a la proteína c-Jun.
3. Caracterizar si la activación de AKT, PI3K, ERK1/2, JNK y c-Jun es responsable de la síntesis de IL-6 en células JEG-3 expuestas al CdCl_2 .
4. Establecer si la generación de EROs es indispensable para la activación de AKT, PI3K, ERK1/2, JNK y c-Jun, así como para la síntesis de IL-6 en la línea celular JEG-3 expuesta al CdCl_2 .

Metodología

En el presente proyecto se utilizó la línea celular JEG-3 (adquirida en la ATCC, EU) como modelo del trofoblasto humano debido a que proviene de un coriocarcinoma humano y posee características bioquímicas y biológicas del sinciotrofoblasto, tales como la producción de progesterona, gonadotropina coriónica humana, diversos esteroides, hormonas proteicas placentarias y citocinas proinflamatorias. Para el objetivo 1, estas células fueron expuestas a diferentes concentraciones no tóxicas de CdCl₂ durante 24 horas y al término del periodo se cuantificó la IL-6 en el medio de cultivo con la técnica de ELISA. El segundo objetivo se determinó incubando las células JEG-3 con 2.5 µM de Cd durante diferentes tiempos. Al término de cada incubación se obtuvieron proteínas intracelulares para evaluar la fosforilación de ERK1/2, JNK y c-Jun mediante la técnica de Western blot.

En lo que respecta a los objetivos 3 y 4, las células JEG-3 se incubaron con 2.5 µM de Cd en presencia o ausencia de inhibidores para las vías de JNK y ERK1/2, así como de NAC durante 6 y 24 horas. El primer periodo de incubación se utilizó para evaluar la activación de las vías de señalización ERK1/2, JNK y c-Jun empleando la técnica de Western blot, mientras que en el segundo tiempo se cuantificó la IL-6 en el medio de cultivo mediante la técnica de ELISA (Fig. 5).

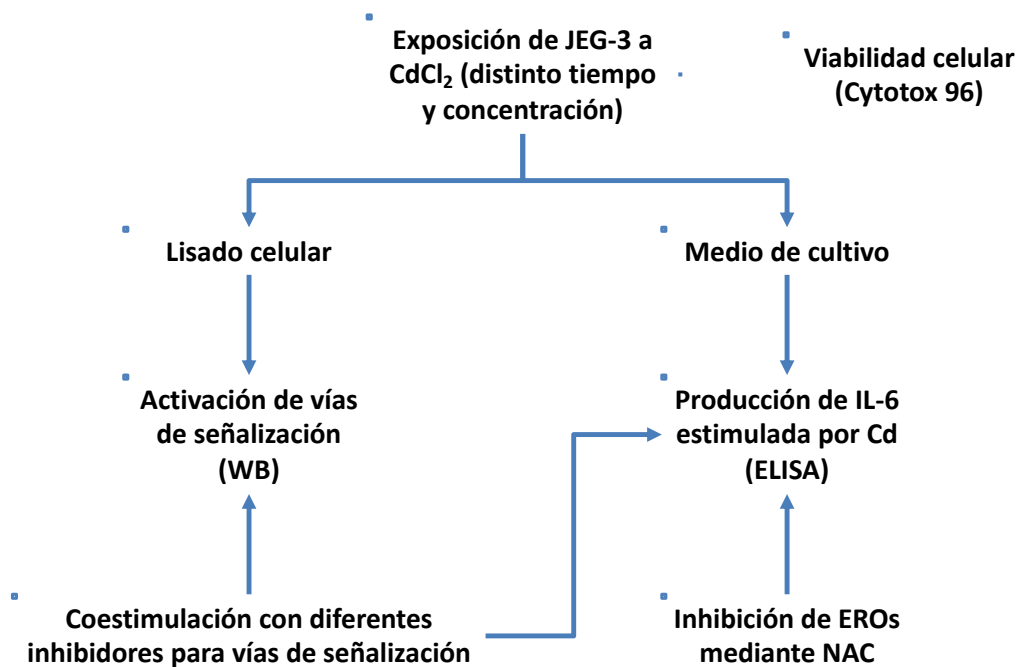


Figura 4. Estrategia experimental.

Línea celular

La línea celular JEG-3 (ATCC® HTB-36™, EUA), establecida a partir de las células de coriocarcinoma, se mantuvo en cultivo utilizando botellas de poliestireno de 75 cm² (Corning Inc., EUA) con medio de cultivo Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO, EUA) con rojo de fenol (RF) y suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB; HyClone™, USA), 1 mM de piruvato de sodio (GIBCO, EUA) y una mezcla de penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL y anfotericina B 0.25 µg/mL (HyClone™, EUA). Las células se incubaron a 37°C en ambiente con 5% de CO₂.

Viabilidad celular

La viabilidad de las células JEG-3 expuestas al Cd se evaluó mediante la detección de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de cultivo por las células que

pierden la integridad de la membrana plasmática, empleando el estuche comercial CytoTox 96® non-radioactive cytotoxicity assay (Promega Corp., EUA) según las instrucciones del fabricante. Este método se realizó en placas de 96 pozos, en los cuales se sembraron 15,000 células/pozo por triplicado en 0.1 mL de DMEM al 5% de SFB, y se permitió que las células se adhirieran durante toda la noche. Al término de este periodo, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM al 0.5% de SFB conteniendo distintas concentraciones de CdCl₂, PD98059 (Millipore Sigma, EUA) y SP600125 (Cell Signaling, EUA). Debido a que los inhibidores fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), se adicionó 1% de este compuesto a los controles negativos. Después de 24 horas de exposición se cuantificó la actividad de la LDH a 490 nm utilizando un lector de placas (Bio-Rad, EUA). La liberación máxima se obtuvo incubando las células en medio de cultivo con Tritón X-100 al 1%. Finalmente, se calculó el porcentaje de viabilidad con respecto al control con la siguiente formula.

$$\% Viabilidad = 100 \times \left[1 - \left(\frac{\text{Liberación espontánea de LDH}}{\text{Máxima liberación de LDH}} \right) \right]$$

En el caso del NAC (Millipore, EUA), se decidió evaluar la viabilidad celular mediante la tinción de cristal violeta debido a que este compuesto reacciona con los reactivos para determinar la actividad de LDH en el medio de cultivo, dando resultados falso-positivos. Por lo tanto, después de transcurrido el tiempo de exposición, se agregaron 100 µl de ácido tricloro-acético (TCA; Merk, USA) al cultivo celular y se incubó durante 1 hora a 4° C. Posteriormente, se retiró el medio con TCA, para que los pozos pudieran ser lavados con PBS y teñir las células con cristal violeta (Millipore, EUA) al 0.2% durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavaron 4 veces con agua, para que finalmente a cada pozo se le agregaran 100 µl de ácido acético (J. T. Baker, México) en una concentración de 10%. La densidad óptica del sobrenadante se midió a una absorbancia de 570 nm utilizando el mismo lector de placas. Los cálculos de la viabilidad se realizaron con respecto al control.

Exposición a Cloruro de Cadmio

La exposición de la línea celular JEG-3 a CdCl_2 se realizó con diversas concentraciones en un intervalo entre 0.1 y 2.5 μM durante diferentes tiempos según fuera requerido. Brevemente, se sembraron 300,000 células/pozo en placas de 12 pozos empleando DMEM con 5% de SFB y se incubaron a 37°C en atmosfera de 5% de CO_2 toda la noche para permitir su adherencia. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo fue reemplazado por DMEM con 0.5% de SFB, sin RF conteniendo las distintas concentraciones de CdCl_2 . Las células se incubaron según el protocolo antes descrito durante 6 o 24 horas. Los controles únicamente contenían medio de cultivo. Después del tiempo correspondiente, se recolectaron los sobrenadantes y se obtuvieron lisados celulares, los cuales fueron guardados a -80° C.

En el caso de la evaluación de las vías de señalización, las células se preincubaron durante dos horas en DMEM con 0.5% de SFB conteniendo NAC, SP600125 y PD98059. Posteriormente se agregó 2.5 μM de Cd en presencia o ausencia de estos compuestos y se continuo con el protocolo anterior. Las concentraciones del NAC y los inhibidores fueron seleccionadas con base en la viabilidad celular. El control negativo fueron células incubadas en presencia de 1% de DMSO.

Extracción de proteínas

Las células estimuladas se lavaron con PBS y después fueron lisadas con 70 μL de buffer de lisis (Cell Signaling, EUA) complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail; Sigma Aldrich, EUA) durante 5 minutos a 4°C. Los lisados fueron centrifugados en una centrifuga 5415R (Eppendorf) a 10,000 g durante 10 minutos a 4°C, y la concentración total de proteínas se cuantificó mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA).

Western Blot (WB)

Para evaluar la activación de las diferentes vías de señalización, una fracción de la proteína total obtenida del lisado celular (10 μ g para c-Jun y 20 μ g para ERK1/2 y JNK) se desnaturalizó en buffer de Laemmli que contenía 400 mM de ditioneitol (DTT) a 90°C durante 10 minutos. A continuación, las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de policacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS, durante 2.5 horas a 80V. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 25 mA durante 16 h a 4°C.

Después de la transferencia, las membranas se bloquearon 1 hora a temperatura ambiente con buffer salino-Tris conteniendo 0.1% de tween-20 (TBS-T) y 5% de albumina sérica bovina (BSA; Boheringer, Alemania). Posteriormente, las membranas se incubaron en presencia de los anticuerpos primarios específicos diluidos en TBS-T (Ver Tabla 1) a 4°C en agitación durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron con TBS-T (3 veces por 15 minutos) e incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados conjugados con peroxidasa a una dilución de 1:10,000 en TBS-T a temperatura ambiente en agitación durante 1.5 horas. Para los anticuerpos primarios anti-phospho-JNK, anti-phospho-ERK1/2 y anti-actina se utilizó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, mientras el anticuerpo anti-IgG de conejo se utilizó para el resto de los anticuerpos primarios (Jackson ImmunoResearch, EUA). Las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-T y las proteínas fueron detectadas utilizando el reactivo de quimioluminiscencia Super Signal West Femto Substrate (Thermo Fisher Scientific, EUA), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El revelando de las membranas se realizó con el equipo *C-Digit® Blot Scanner* (LI-COR, Inc., EUA) y la intensidad de las bandas fue analizada con el programa "Image Studio Lite". Los niveles de p-ERK1/2 y p-JNK se normalizaron contra ERK1/2/ β -actina y JNK/ β -actina, mientras que los niveles de p-c-Jun y c-Jun fueron normalizados únicamente

contra β -actina, debido a que tanto la proteína fosforilada como no fosforilada se incrementaron durante el estímulo de las células JEG-3 con Cd.

Tabla 1. Dilución de anticuerpos. Todos los anticuerpos se diluyeron en T-TBS según lo indicado por esta tabla.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	MARCA Y NO. CATALOGO
Phospho-SAPK/JNK	1:1000	Cell Signaling #9255
JNK2	1:1000	Cell Signaling #9258
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	1:1000	Cell Signaling #9106
P44/42 MAPK (ERK1/2)	1:1000	Cell Signaling #9102
PI3 KINASE P85	1:1000	Cell Signaling #4292
PHOSPHO-PI3 KINASE	1:1000	Cell Signaling #4228
AKT	1:1000	Cell Signaling #9272
PHOSPHO-AKT	1:1000	Cell Signaling #9271
Phospho-c-Jun	1:1000	Cell Signaling #3270
c-Jun	1:1000	Cell Signaling #9165
β-Actin	1:3000	Abcam Ab3280

ELISA de IL-6

La concentración de IL-6 en el medio de cultivo de las células expuestas a CdCl_2 se cuantificó utilizando el estuche comercial IL-6 (human) ELISA kit (Enzo Life Sciences, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, 100 μL de los medios de cultivo y de las respectivas diluciones de la curva estándar, fueron añadidos por duplicado a los pozos de la placa de ELISA y se incubaron en un agitador orbital a 250 rpm durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, cada pozo fue lavado 3 veces

con 400 μL de buffer de lavado. Posteriormente, se agregaron 100 μL del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa a cada pozo y la placa se incubó nuevamente en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Al final de ese tiempo, los pozos fueron lavados tres veces mas y el desarrollo del color se realizó incubando la placa con 100 μl de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) por pozo durante 15 min en agitación. Finalmente, la reacción se detuvo al adicionar 100 μl de ácido sulfúrico al 0.16 M y la absorbancia de cada pozo se leyó a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 595 nm.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de las variables experimentales se realizó usando el programa estadístico GraphPad Prism versión 6 para Mac (GraphPad Software, USA, www.graphpad.com), en el cual se realizó un análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido por una prueba de comparación de Turkey entre todos los grupos tratados. El nivel máximo para α fue establecido en 0.05 y el valor expresado como p es la significancia existente en cada caso. Los datos se presentan como el promedio \pm SEM de la concentración y proporción de cambio con respecto al control.

Resultados

Efecto del Cadmio, inhibidores de vías de señalización y NAC en la viabilidad celular

Para determinar la concentración óptima no tóxica de cloruro de cadmio para las células JEG-3, se determinó la viabilidad celular mediante la liberación de la LDH al medio de cultivo.

Los resultados de los ensayos a 24 horas mostraron que las células mantienen una viabilidad superior al 90% cuando son expuestas a concentraciones menores de 2.5 μM de Cd. Por su parte, las concentraciones de 5 y 10 μM de Cd inducen muerte celular significativa con respecto al control, superando únicamente el 80% de la viabilidad (Figura 5A). A diferencia de los resultados anteriores, los ensayos durante 48 horas mostraron que concentraciones superiores a 0.625 μM inducen muerte celular de manera significativa, reduciendo la viabilidad celular por debajo del 80% y alcanzando un 45% con las concentraciones de 5 μM y 10 μM (Figura 5B).

De manera similar se determinó la viabilidad de las células JEG-3 expuestas a diferentes concentraciones de los inhibidores SP600125 y PD98059. Los resultados demostraron una viabilidad superior al 90% para todas las concentraciones evaluadas de ambos inhibidores, aún cuando las células son co-expuestas a la máxima concentración del inhibidor y 2.5 μM de Cd (Figura 6).

Con respecto a la estimulación con NAC, la viabilidad celular no presentó cambio significativo, manteniéndose por arriba del 90% con las concentraciones de 5 y 10 μM . Asimismo, la co-exposición de las células JEG-3 con 2.5 μM de Cd y las diferentes concentraciones de NAC, tampoco modificaron la viabilidad celular (Figura 7).

Basados en estos resultados, se decidió trabajar con concentraciones menores a 2.5 μM de Cd, 20 μM de SP600125, 50 μM de PD98059 y 5 μM de NAC durante 24 horas ya que no resultaron tóxicas para las células.

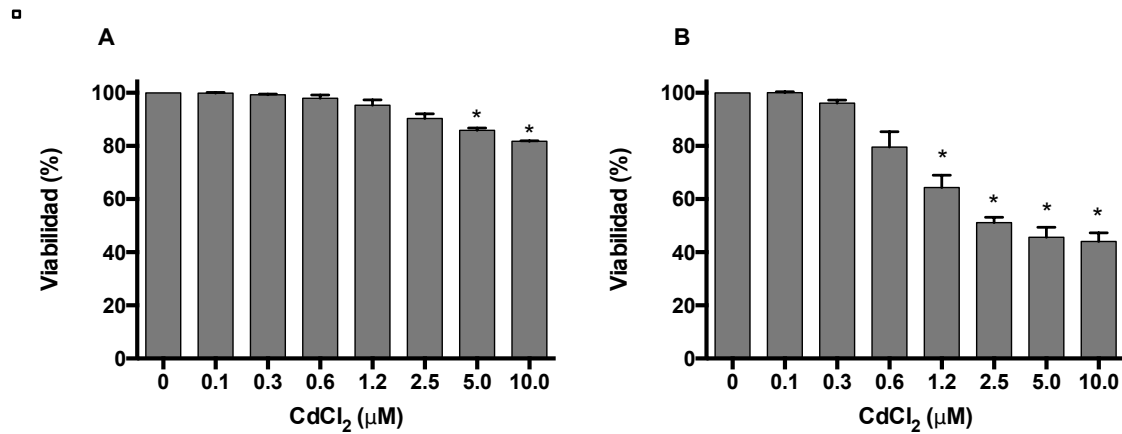


Figura 5. Viabilidad Celular. Viabilidad de las células JEG-3 durante 24 (A) y 48 horas (B) incubadas con diferentes concentraciones de CdCl₂. La viabilidad fue determinada mediante la liberación de LDH al medio de cultivo. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos realizados por triplicado. La prueba de ANOVA seguida por la prueba de Dunnett mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$, *indica diferencia significativa con respecto al control). A partir de la concentración de 5 μM la viabilidad disminuye a menos del 90% después de 24 horas. A las 48 horas la viabilidad disminuye por debajo del 90% después de la concentración de 0.625 μM .

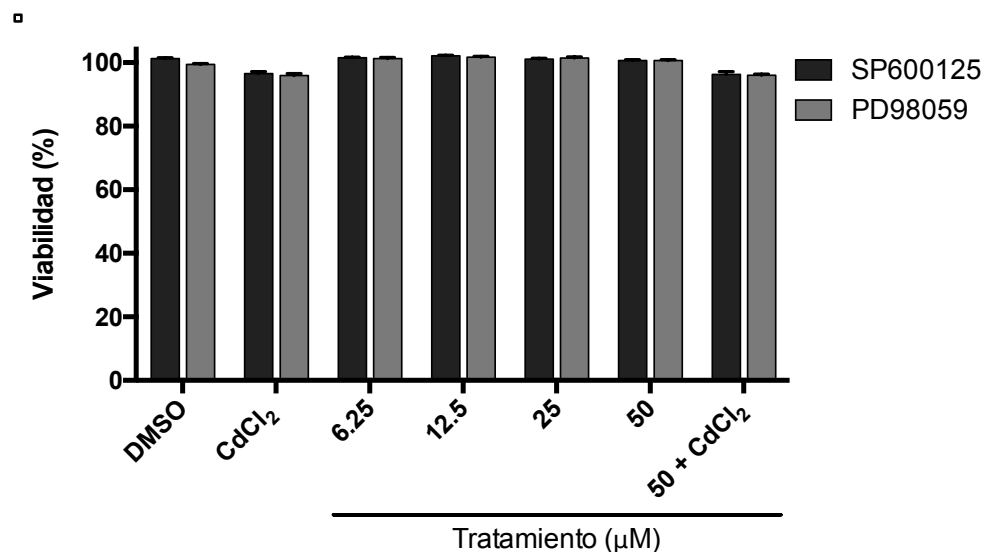


Figura 6. Viabilidad de las células JEG-3 durante 24 horas incubadas con CdCl₂ (2.5 μM) y los inhibidores SP600125 y PD98059 a diversas concentraciones. La viabilidad se determinó mediante la liberación de LDH al medio de cultivo. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos por triplicado. No hay diferencia estadísticamente significativa entre ninguna de las condiciones estudiadas, de acuerdo al análisis de los datos realizado mediante la prueba de ANOVA.

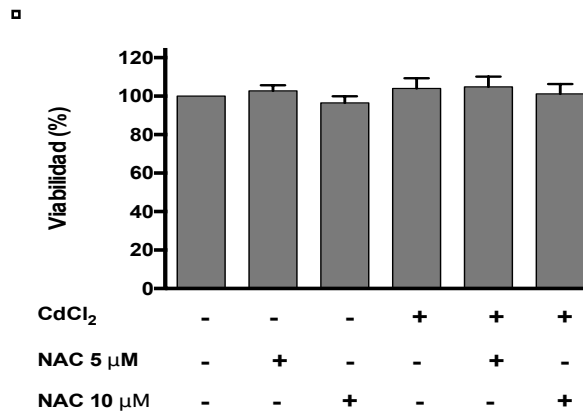


Figura 7. Viabilidad de las células JEG-3 durante 24 horas incubadas con CdCl₂ (2.5 μM) y NAC a diversas concentraciones. La viabilidad se determinó mediante la técnica de cristal violeta. Cada barra representa la media ± EE de 3 experimentos por triplicado. No hay diferencia estadísticamente significativa, sin embargo si existe un menor viabilidad cuando se incuban las células JEG-3 con cadmio y NAC.

El cadmio induce la expresión de IL-6 en células JEG-3 mediante la generación de EROs

Una vez establecidas las concentraciones no tóxicas, se evaluó la capacidad del Cd para inducir la secreción de IL-6 en las células JEG-3. La cuantificación de IL-6 se realizó en el medio de cultivo mediante la técnica de ELISA. Los resultados de la incubación de células JEG-3 con diferentes concentraciones de Cd mostraron un incremento significativo dosis dependiente de la secreción de IL-6 a partir de 1.2 μM (Figura 8).

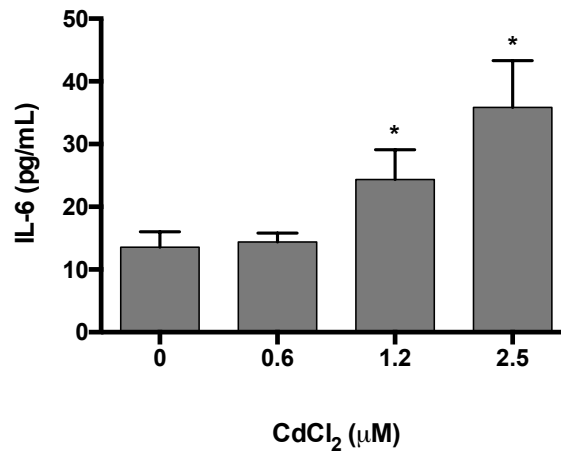


Figura 8. Secreción de IL-6 por las células JEG-3 incubadas con diferentes concentraciones de Cd durante 24 horas. La concentración de IL-6 se determinó en el medio de cultivo mediante ELISA. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos por duplicado. La prueba de ANOVA seguida por la prueba de Dunnett mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$, *indica diferencia significativa con respecto al control).

La determinación de IL-6 liberada al medio cuando las células JEG-3 son co-expuestas a Cd y NAC durante 24 horas igualmente se realizó mediante la técnica de ELISA. Los resultados mostraron que cuando las células JEG-3 son expuestas a NAC, la concentración de IL-6 presente en el medio disminuye, aunque no de manera significativa con respecto al control. Por otra parte, cuando se co-exponen las células JEG-3 a Cd y NAC, se encontró una disminución significativa de IL-6 en el medio de cultivo con respecto a las células que fueron expuestas únicamente a Cd (Figura 9), lo que indica que el aumento en la expresión de IL-6 en células JEG-3 expuestas a Cd es mediado por EROs.

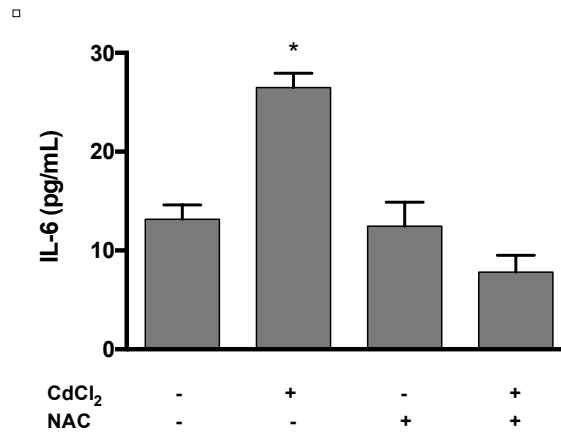


Figura 9. Secreción de IL-6 por las células JEG-3 incubadas con cadmio ($2.5 \mu\text{M}$) en presencia o ausencia de NAC ($5 \mu\text{M}$) durante 24 horas. La concentración de IL-6 en el medio se determinó mediante ELISA. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos por duplicado. La prueba de ANOVA seguida por la prueba de Dunnett mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$, *indica diferencia significativa con respecto al control).

La exposición de células JEG-3 al Cd activa las vías de señalización de ERK1/2,

JNK y al factor de transcripción c-Jun pero no a AKT ni PI3K

Con el objeto de establecer las vías de señalización activadas por el Cd, las células JEG-3 se expusieron a $2.5 \mu\text{M}$ de este metal durante diferentes periodos de tiempo y se evaluó la fosforilación de AKT, PI3K, ERK1/2 y JNK, así como el factor de transcripción c-Jun, mediante WB. Los resultados obtenidos muestran que la exposición a Cd durante 24 horas no induce la activación de las vías de señalización de AKT y PI3K (Figura 10). En contraste, las vías de señalización de ERK1/2 y JNK si mostraron un incremento de proteína fosforilada a la hora y a las 3 horas, respectivamente (Figura 10).

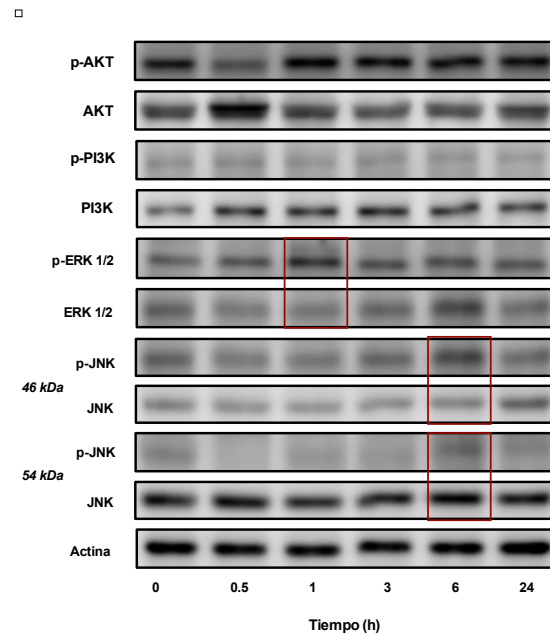


Figura 10. Activación de las vías de señalización en células JEG-3 incubadas con CdCl_2 durante 24 horas. La expresión y fosforilación de las proteínas se determinó mediante la técnica de Western blot. Se utilizó β -actina como control interno. Los pesos moleculares son JNK 46 kDa, 54 kDa; ERK1/2 42, 44 kDa; PI3K 85 kDa; AKT 60 kDa y β -actina 42 kDa.

En virtud de que solamente hubo cambio en la fosforilación de ERK1/2 y JNK, se decidió realizar el análisis densitométrico únicamente para estas proteínas. Los resultados de la cinética de tiempo mostraron que la exposición de las células JEG-3 a Cd incrementa la fosforilación de ERK1/2 de manera significativa a la hora de exposición y conforme avanza el tiempo los niveles disminuyen a valores que no muestran un aumento significativo, hasta alcanzar el estado basal a las 24 horas (Figura 11A). Respecto a la activación de JNK, se observó que existe una fosforilación de manera tiempo-dependiente, que es estadísticamente significativa a las 6 y 24 horas de exposición y que presenta un máximo de fosforilación en ambas isoformas a las 6 horas después del inicio de la exposición (Figura 11B).

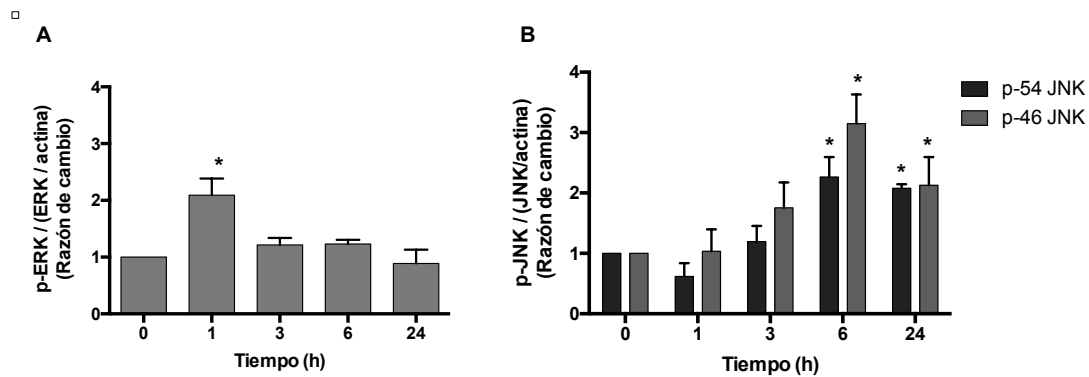


Figura 11. Inducción de la fosforilación de ERK1/2 y JNK en células JEG-3. Una vez que las células JEG-3 fueron incubadas con cadmio durante diferentes tiempos, la expresión y fosforilación de ERK1/2 (A) y JNK (B) se determinó mediante Western blot. Se utilizó β -actina como control interno. La cuantificación se realizó por densitometría, y sus valores se normalizaron contra los niveles del control interno, expresándose como unidades relativas de densitometría con respecto a los valores del control. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos por triplicado. La prueba de ANOVA seguida por la prueba de Dunnett mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$, * indica diferencia significativa con respecto al vehículo).

En relación con la activación del factor de transcripción c-Jun, los resultados mostraron que tanto su expresión, así como su fosforilación aumentan con respecto al tiempo, alcanzando un incremento máximo estadísticamente significativo a las 6 horas (Figura 12).

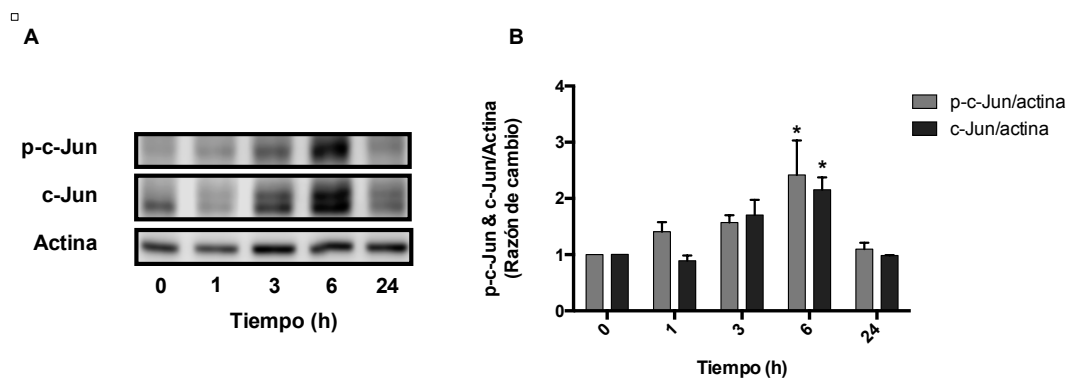


Figura 12. Activación de c-Jun en células JEG-3 incubadas con CdCl₂ durante diferentes tiempos. La expresión de la proteína y su activación se determinó mediante Western blot (A) en el cual se utilizó β -actina como control interno. Los pesos moleculares determinados son c-Jun 43, 48 kDa y β -actina 42 kDa. La cuantificación se realizó por densitometría, y sus valores se normalizaron contra los niveles del control interno, expresándose como unidades relativas de densitometría con respecto a los valores del control (B). Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos por triplicado. La prueba de ANOVA seguida por la prueba de Dunnett mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$, * indica diferencia significativa con respecto al vehículo).

La secreción de IL-6 en células JEG-3 expuestas al cadmio depende de la activación de ERK1/2 pero es independiente de la vía de JNK

Para determinar cuál de las vías activadas por Cd induce la fosforilación de c-Jun y la secreción de IL-6, las células JEG-3 fueron incubadas con 2.5 μM de Cd en presencia o ausencia de los inhibidores de las vías de JNK y ERK1/2. Los resultados mostraron que la exposición de las células al Cd en presencia del inhibidor de JNK, SP600125, disminuye la expresión y activación de c-Jun casi por completo. En contraste, con inhibidor de ERK1/2, PD98059, se observó una disminución de la expresión y activación moderada, la cual fue estadísticamente significativa con respecto a las células que fueron estimuladas solamente con Cd (Figura 13A y B).

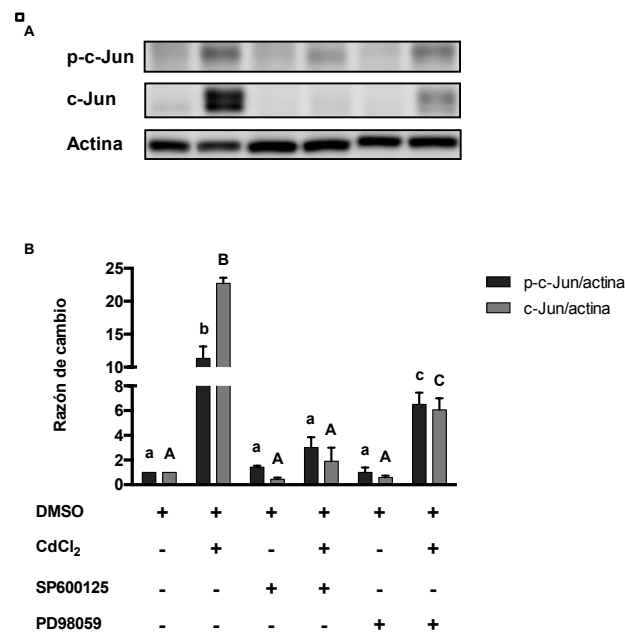


Figura 13. Activación de c-Jun en células JEG-3 incubadas con cadmio e inhibidores durante 6 horas. La expresión y activación de las proteínas se determinó mediante Western blot (A). Se utilizó β -actina como control interno. Los pesos moleculares determinados son c-Jun 43, 48 kDa y β -actina 42 kDa. La cuantificación se realizó por densitometría, y sus valores se normalizaron contra los niveles del control interno, expresándose como unidades relativas de densitometría con respecto a los valores del control (B). Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos por triplicado. La prueba de ANOVA seguida por la prueba de Dunnett mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) (Diferentes letras representa una diferencia significativa).

Finalmente, se evaluó la concentración de IL-6 presente en el medio de cultivo después de 24 horas de co-exposición con Cd y los inhibidores. En los resultados se observó que cuando las células son co-expuestas con el inhibidor de JNK, SP600125, la concentración de IL-6 aumenta de manera significativa, aún a niveles superiores a los encontrados en células expuestas únicamente a Cd. Por el contrario, cuando las células se exponen al inhibidor para ERK1/2, PD98059, la concentración de IL-6 disminuyó significativa con respecto a las células expuestas únicamente a cadmio, alcanzando valores similares al control (Figura 14).

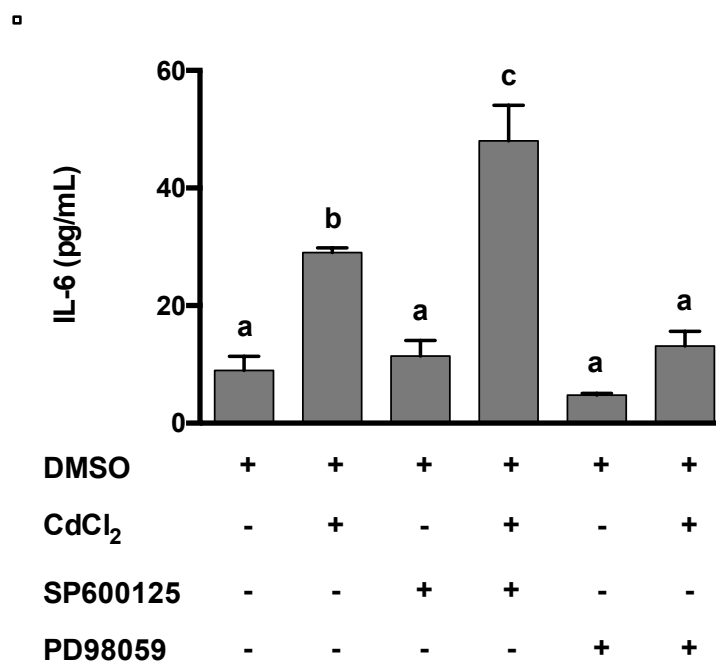


Figura 14. Secreción de IL-6 por las células JEG-3 incubadas con cadmio ($2.5 \mu\text{M}$) en presencia o ausencia de los inhibidores SP600125 y PD98059 durante 24 horas. La concentración de IL-6 en el medio se determinó mediante ELISA. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos por duplicado. La prueba de ANOVA seguida por la prueba de Dunnett mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) (Diferentes letras representa una diferencia significativa).

Discusión

La PE es una complicación obstétrica que se presenta hasta en un 10% de todos los embarazos a nivel mundial y es un síndrome que se considera especialmente preocupante debido a que es la primera causa de morbi-mortalidad materna¹⁸¹. Desafortunadamente y aún con todos los estudios que se han realizado hasta hoy, su etiología no se ha definido completamente.

Por otra parte, la asociación entre el aumento de contaminantes y el incremento de este padecimiento obstétrico ha interesado de sobremanera por la posible influencia que éstos puedan tener en su desarrollo. Con respecto a esto, se ha logrado asociar el incremento en el riesgo de padecer PE con factores ambientales tales como bajo consumo de calcio¹⁸², contaminación del aire¹⁸³ o exposición a metales pesados¹⁷⁹.

En relación con los metales pesados se ha encontrado una particular asociación entre las elevadas concentraciones corporales de cadmio y el riesgo de padecer preeclampsia^{178,184,185}. Asimismo, hay evidencia de que la exposición al cadmio induce en animales la aparición de preeclampsia^{186,187}, aunque los mecanismos específicos por los cuales este metal podría inducir la PE en humanos no han sido esclarecidos. Esta asociación es de particular interés debido a que la cantidad de cadmio a la que la población está expuesta actualmente se ha incrementado mediante los alimentos y el aire¹⁷⁸. Conocer la manera por la cual el Cd podría influir en la aparición de la PE puede contribuir al desarrollo de fármacos o estrategias de suplementación dietética para prevenir los efectos tóxicos de este metal durante el embarazo.

Se considera que la capacidad del Cd para iniciar una respuesta inflamatoria podría ser un factor que favorezca la aparición de la PE, debido a que este metal induce la secreción de citocinas proinflamatorias tales como IL-6 en astrocitos, células U-87 MG, células THP1 y células epiteliales de vías aéreas^{77,143,188}, y además es una molécula soluble

frecuentemente encontrado en cantidades elevadas en el torrente sanguíneo en mujeres con PE. A su vez, se ha reportado que la IL-6 puede ser secretada por el trofoblasto en respuesta a diversos agentes como la IL-1 β ¹⁸⁹, virus¹⁹⁰, lipopolisacárido¹⁹¹ o hipoxia¹⁹².

En la presente tesis doctoral se utilizó la línea celular JEG-3, la cual es derivada de un coriocarcinoma, que, aunque proviene de un tumor, mantiene características del tipo celular que le da origen, principalmente la de un citotrofoblasto, que es la célula de la que se diferencian el resto de los subtipos del trofoblasto¹⁹³; además tiene la capacidad de producir hormonas como la gonadotropina coriónica humana y citocinas proinflamatorias como la IL-6^{193,194}. Por lo anterior y considerando que el citotrofoblasto se mantiene muy activo durante todo el embarazo²¹, concluimos que el modelo celular JEG-3 es apropiado para determinar si el cadmio es capaz de inducir la secreción de IL-6 y estudiar los mecanismos moleculares que se activan durante esta respuesta incluidas las vías de señalización.

En primera instancia, nuestros resultados demostraron que el efecto del Cd en las células JEG-3 depende de la concentración y del tiempo de exposición, como se puede observar en las gráficas de viabilidad. De hecho, estudios previos concuerdan con nuestros resultados, ya que Hu y colaboradores demostraron reducción del 80% de la viabilidad al exponer esta misma línea celular a concentraciones mayores a 10 μ M de Cd⁷⁸. Es importante mencionar que se ha demostrado que el Cd se acumula en la placenta y puede alcanzar niveles entre 10 a 20 veces mayor de lo que se ha encontrado en sangre materna¹⁹⁵. Debido a esto y al hecho de que las concentraciones séricas reportadas de Cd en mujeres con PE se encuentran entre 6.76 y 334.96 nM^{180,187}, podemos decir que la concentración de 2.5 μ M utilizada en este estudio se encuentran en el rango observado en placentas de mujeres con PE. Sin embargo, es necesario considerar que el microambiente no es idéntico por lo que la respuesta *in vivo* puede ser diferente, por lo que es necesario realizar experimentos utilizando modelos animales.

Por otra parte, los resultados de nuestro estudio también demostraron que las células JEG-3 secretan constitutivamente IL-6 y que al ser expuestas al Cd se induce una secreción dosis dependiente de esta citocina. Ahora bien, estudios previos demostraron que la incubación de células JEG-3 en presencia de Cd incrementa la expresión del mRNA de IL-6⁷⁸. Considerando en conjunto estos resultados podemos concluir que el incremento de IL-6 en trofoblastos expuestos a Cd es a nivel de transcripción que correlaciona con un aumento de la traducción. Durante la preeclampsia, la IL-6 también es secretada por células de la decidua¹⁹⁶, por lo que es necesario estudiar si el Cd también induce la secreción de IL-6 en estas células.

El Cd no es capaz de generar directamente radicales libres, sin embargo aumenta la cantidad de superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo debido a que contribuye a la depleción de glutatión y grupos sulfhídrido¹⁹⁷, disminuye la actividad de los complejos II y III en la mitocondria y dispara el aumento de proteínas mal plegadas¹⁹⁸, lo que ocasiona un incremento de EROs en la célula, aún en periodos cortos de exposición¹⁹⁹. Asimismo, se ha demostrado que el incremento del estrés oxidativo provocado por el Cd induce la secreción de citocinas proinflamatorias, en particular de IL-6⁵¹. Por otra parte, se ha comprobado en neuronas, células renales y de pulmón, que disminuir estos efectos oxidativos del Cd, reduce la activación de vías de señalización y la secreción de citocinas proinflamatorias⁵¹. Por esta razón evaluamos si en el caso de las células del trofoblasto, la producción de IL-6 depende de la generación de EROs a partir de la exposición a Cd. Para ello co-incubamos a las células JEG-3 con NAC, que es un compuesto capaz de eliminar las especies reactivas de oxígeno²⁰⁰ mediante el aumento de la capacidad reductora intracelular²⁰¹. Los efectos del NAC se ven reflejados en una disminución de las especies oxidantes como el ácido hipocloroso, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno, aunados a una inhibición de la oxidación del óxido nítrico, peroxinitrito y ácidos hipohalosos²⁰⁰. Nuestros datos mostraron que la secreción de IL-6 inducida por el Cd disminuye

significativamente al coincubarse con NAC. De manera interesante, la incubación únicamente con NAC también disminuye la producción basal de IL-6, posiblemente por una reducción del estado oxidativo normal causado por la respiración u otros procesos celulares. Con base en estos resultados podemos concluir que el Cd induce la expresión de IL-6 mediante la generación de especies reactivas de oxígeno.

Reportes previos han indicado que el Cd es capaz de activar diversas vías de señalización entre las que se encuentran principalmente PI3K²⁰², AKT⁷⁸ y MAPK (ERK 1/2 y JNK²⁰³), por lo que se decidió evaluar, utilizando Western Blot, el efecto del Cd en la activación de estas vías en las células JEG-3. Los resultados obtenidos demostraron que la exposición de células JEG-3 a Cd (2.5 μ M) no induce la activación de las vías de PI3K y AKT, por lo que dichas vías no están involucradas la secreción de IL-6 dependiente de Cd en células JEG-3. Este resultado no concuerda con lo reportado previamente por Hu y colaboradores, ya que ellos encontraron que el Cd es capaz de activar la vía de AKT. Probablemente esta discrepancia es debida a las concentraciones empleadas en ambos estudios ya que en el trabajo de Hu y colaboradores se utilizaron concentraciones de Cd hasta 10 veces mayor (25 μ M) a lo que nosotros utilizamos. Es posible que la activación de la vía de AKT a concentraciones elevadas se deba a la activación de la vía de mTOR y señalización mitocondrial que conduce a la muerte celular por apoptosis²⁰⁴, ya que la viabilidad en este estudio es menor al 80%⁷⁸, además de haberse demostrado previamente que concentraciones de Cd mayores a 10 μ M inducen apoptosis²⁰⁴.

Por otra parte, se observó una activación de las vías señalización JNK y ERK1/2, como se ha demostrado en estudios previos con distintos tipos celulares como neuronas²⁰³, células renales²⁰⁵, células de pulmón²⁰⁶ e incluso en trofoblasto de rata⁹⁵. Tanto JNK como ERK1/2 son MAPKs capaces de activar al factor de transcripción AP-1, cuya activación por Cd ha sido reportada anteriormente¹⁴⁰. Este factor de transcripción heterodimérico está formado por c-Fos y c-Jun, de los cuales c-Jun es activado tanto por ERK1/2 como por JNK.

Asimismo, AP-1 activa la expresión de IL-6, por lo que se decidió estudiar la activación de c-Jun cuando las células JEG-3 son expuestas al Cd. La activación de c-Jun tiene una cinética similar a lo observado con JNK, sin embargo, en este caso no sólo se incrementó la fosforilación, sino que además se indujo un aumento en la expresión de la proteína no fosforilada. Ambas, tanto la expresión como la fosforilación tienen un máximo a las 6 horas, disminuyendo a niveles similares al control a las 24 horas. Estos resultados concuerdan con reportes previos en los que la exposición a Cd induce tanto la expresión como la activación de c-Jun en mioblastos²⁰⁷ y epitelio de próstata²⁰⁸.

El efecto de la activación de la JNK y ERK1/2 en la fosforilación y expresión de c-Jun y la secreción de IL-6 a partir de células JEG-3, fue estudiado utilizando los inhibidores específicos para estas vías. La inhibición de JNK mediante SP600125, el cual bloquea directamente la activación de esta molécula, mostró de manera contraria a lo esperado, que la secreción de IL-6 aumenta mientras que la fosforilación y expresión de c-Jun disminuye a niveles basales. En relación con la inhibición de la vía de ERK1/2 empleando PD98059, el cual bloquea la actividad de MEK que es la cinasa encargada de activar a ERK1/2, se encontró que a pesar de que la fosforilación y expresión de c-Jun disminuyen significativamente, estas no logran alcanzar lo niveles basales y sólo es en un 50% con respecto a la expresión y fosforilación inducida por la estimulación con Cd en ausencia del inhibidor. Por su parte, PD98059 inhibe significativamente la producción de IL-6 a partir de células JEG-3 estimuladas con Cd.

Considerando en conjunto estos datos, se puede observar que estas vías tienen efectos opuesto en la inducción de IL-6, ya que la activación de JNK desempeña un papel inhibitorio, mientras que ERK1/2 estimula la secreción de esta citocina proinflamatoria, siendo el efecto final el incremento de la producción de IL-6. Asimismo, el efecto observado en la expresión y fosforilación de c-Jun demuestra que la secreción de IL-6 ocurre de manera independiente a la activación de esta molécula.

De manera interesante, nuestros resultados mostraron que la activación de JNK puede inducir un efecto supresor en la producción de IL-6 a partir de células trofoblásticas. Este efecto inhibitorio ha sido descrito previamente en osteoblastos estimulados con IL-1²⁰⁹, sin embargo, el mecanismo molecular no ha sido descrito completamente. Se ha propuesto que una intercomunicación entre JNK y un punto entre las vías de I κ B/NF κ B y AMPK es responsable de la inhibición de IL-6, por lo tanto, es necesario realizar experimentos adicionales para confirmar si este mecanismo también ocurre en trofoblastos expuestos a Cd.

Los resultados obtenidos en este proyecto demuestran que la inducción de IL-6 en células JEG-3 expuestas a Cd depende de la generación de EROs y la activación de ERK1/2. Asimismo, se sabe que la fosforilación y translocación al núcleo de ERK1/2 activa diversos factores de transcripción como son la proteína específica 1 (SP1), el factor activador de la transcripción 2 (ATF2), el factor regulador 1 del interferón (IRF1), el elemento de respuesta a AMPc (CREB) y NF- κ B, los cuales son capaces de inducir la producción de IL-6 en diversos tipos celulares²¹⁰⁻²¹³, por lo tanto proponemos que ERK1/2 puede inducir la producción de IL-6 activando alguna de estos factores de transcripción. No obstante, es necesario realizar otros estudios para confirmar nuestra hipótesis.

Finalmente, con la información obtenida de este proyecto se propone un modelo para explicar el efecto del Cd en la inducción de IL-6 durante la preeclampsia. En este modelo, la exposición del trofoblasto al Cd ocasiona un incremento del estrés oxidativo dando como resultado la generación de EROs, las cuales activan al menos dos vías de señalización, la de JNK y la de ERK1/2. La activación de JNK de igual manera activa la expresión y activación del factor de transcripción c-Jun. Ambas vías de señalización tienen el potencial de inducir la secreción de IL-6, sin embargo, sólo la activación de ERK1/2 incrementa la expresión de IL-6 a través de factores de transcripción diferentes a c-Jun (Fig.13).

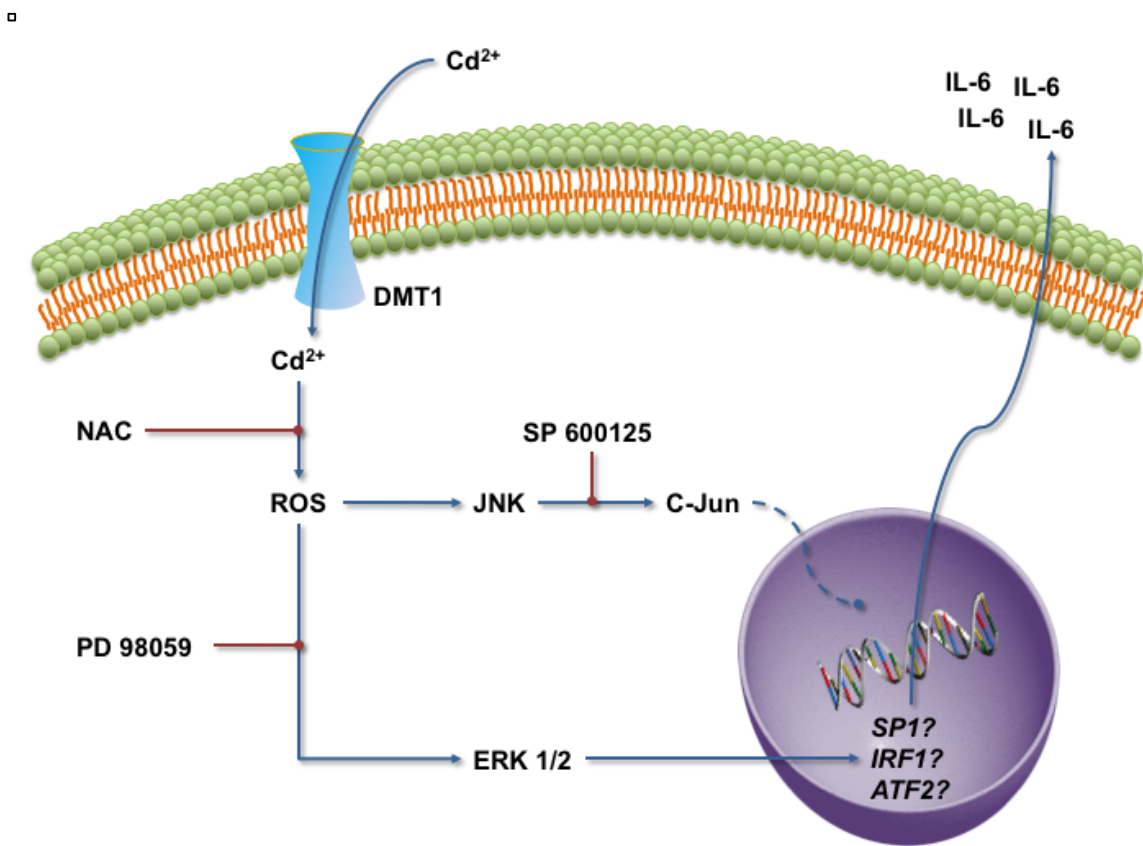


Figura 15. Modelo de inducción de IL-6 por Cd en trofoblasto.

Conclusiones

La exposición al cadmio de las células JEG-3 incrementa la síntesis de IL-6 a través de la activación de la vía de señalización de ERK1/2, mediada por la generación de especies reactivas. Que, si bien estas especies reactivas de oxígeno activan también la vía de JNK, ésta no ejerce un efecto estimulante sobre la expresión de IL-6 en el trofoblasto. Asimismo, c-Jun es activado cuando las células JEG-3 son expuestas a cadmio, no obstante, este factor de transcripción no regula la expresión de IL-6 inducida por Cd.

Literatura citada

1. Osungbade, K. O. & Ige, O. K. Public Health Perspectives of Preeclampsia in Developing Countries: Implication for Health System Strengthening. *J. Pregnancy* **2011**, (2011).
2. Bilano, V. L., Ota, E., Ganchimeg, T., Mori, R. & Souza, J. P. Risk Factors of Pre-Eclampsia/Eclampsia and Its Adverse Outcomes in Low- and Middle-Income Countries: A WHO Secondary Analysis. *PLoS ONE* **9**, e91198 (2014).
3. Uzan, J., Carbonnel, M., Piconne, O., Asmar, R. & Ayoubi, J.-M. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc. Health Risk Manag.* **7**, 467–474 (2011).
4. Sibai, B., Dekker, G. & Kupferminc, M. Pre-eclampsia. *The Lancet* **365**, 785–799 (2005).
5. Freyermuth, G., Luna, M. & José A. Muños. *Indicadores 2014. Mortalidad Materna en México*. (Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social).
6. 2017 | Observatorio de Mortalidad Materna. Available at: <http://www.omm.org.mx/index.php/indicadores-nacionales/boletines-de-mortalidad-materna/2017>. (Accessed: 5th January 2018)
7. ACOG Committee on Obstetric Practice. Bulletin No. 202: Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* **133**, e1–e25 (2019).
8. Phipps, E., Prasanna, D., Brima, W. & Jim, B. Preeclampsia: Updates in Pathogenesis, Definitions, and Guidelines. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 1102–1113 (2016).
9. Spradley, F. T., Palei, A. C. & Granger, J. P. Immune Mechanisms Linking Obesity and Preeclampsia. *Biomolecules* **5**, 3142–3176 (2015).
10. Sibai, B. M. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* **102**, 181–192 (2003).
11. Pennington, K. A., Schlitt, J. M., Jackson, D. L., Schulz, L. C. & Schust, D. J. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis. Model. Mech.* **5**, 9–18 (2012).
12. Martin, J. N., Rose, C. H. & Briery, C. M. Understanding and managing HELLP syndrome: The integral role of aggressive glucocorticoids for mother and child. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **195**, 914–934 (2006).
13. Lindheimer, M. D., Taler, S. J. & Cunningham, F. G. Hypertension in pregnancy. *J. Am. Soc. Hypertens.* **4**, 68–78 (2010).
14. Chaiworapongsa, T., Chaemsaitong, P., Yeo, L. & Romero, R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat. Rev. Nephrol.* **10**, 466–480 (2014).
15. Bartsch, E., Medcalf, K. E., Park, A. L. & Ray, J. G. Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: systematic review and meta-analysis of large cohort studies. *BMJ* i1753 (2016). doi:10.1136/bmj.i1753
16. Duckitt, K. & Harrington, D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* **330**, 565 (2005).
17. Morgan-Ortiz, F., Calderón-Lara, S. A., Martínez-Félix, J. I., González-Beltrán, A. & Quevedo-Castro, E. [Risk factors associated with preeclampsia: case-control study]. *Ginecol. Obstet. México* **78**, 153–159 (2010).
18. Duarte-Mote, J. *et al.* [Relationship between dyslipidemia and severity in preeclampsia]. *Rev. Médica Inst. Mex. Seguro Soc.* **52**, 516–520 (2014).
19. Anton, L., Brown, A. G., Bartolomei, M. S. & Elovitz, M. A. Differential methylation of genes associated with cell adhesion in preeclamptic placentas. *PLoS One* **9**, e100148 (2014).

20. Roberts, J. M. & Hubel, C. A. The Two Stage Model of Preeclampsia: Variations on the Theme. *Placenta* **30**, 32–37 (2009).
21. Ji, L. *et al.* Placental trophoblast cell differentiation: Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol. Aspects Med.* **34**, 981–1023 (2013).
22. Lash, G. E. *et al.* Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine natural killer cells is dependent on gestational age. *Hum. Reprod.* **25**, 1137–1145 (2010).
23. Redman, C. W. G. & Sargent, I. L. Immunology of pre-eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 **63**, 534–543 (2010).
24. Whitley, G. S. J. & Cartwright, J. E. Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta* **31**, 465–474 (2010).
25. Lyall, F. *et al.* Human Trophoblast Invasion and Spiral Artery Transformation. *Am. J. Pathol.* **158**, 1713–1721 (2001).
26. Lyall, F. Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy—a review. *Placenta* **26 Suppl A**, S31–36 (2005).
27. Lam, C., Lim, K.-H. & Karumanchi, S. A. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension* **46**, 1077–1085 (2005).
28. Noris, M., Perico, N. & Remuzzi, G. Mechanisms of Disease: pre-eclampsia. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* **1**, 98–114 (2005).
29. Chappell, L. C. *et al.* A longitudinal study of biochemical variables in women at risk of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **187**, 127–136 (2002).
30. Aardema, M. W., Oosterhof, H., Timmer, A., van Rooy, I. & Aarnoudse, J. G. Uterine Artery Doppler Flow and Uteroplacental Vascular Pathology in Normal Pregnancies and Pregnancies Complicated by Pre-eclampsia and Small for Gestational Age Fetuses. *Placenta* **22**, 405–411 (2001).
31. Sánchez-Aranguren, L. C., Prada, C. E., Riaño-Medina, C. E. & Lopez, M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Front. Physiol.* **5**, (2014).
32. O'Brien, M., Baczyk, D. & Kingdom, J. C. Endothelial Dysfunction in Severe Preeclampsia is Mediated by Soluble Factors, Rather than Extracellular Vesicles. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
33. Chau, K., Hennessy, A. & Makris, A. Placental growth factor and pre-eclampsia. *J. Hum. Hypertens.* **31**, 782–786 (2017).
34. Hod, T., Cerdeira, A. S. & Karumanchi, S. A. Molecular Mechanisms of Preeclampsia. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, a023473 (2015).
35. Zhou, C. C. *et al.* Autoantibody-Mediated IL-6-Dependent Endothelin-1 Elevation Underlies Pathogenesis in a Mouse Model of Preeclampsia. *J. Immunol.* **186**, 6024–6034 (2011).
36. Possomato-Vieira, J. S. & Khalil, R. A. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* **77**, 361–431 (2016).
37. Verdonk, K., Visser, W., Van Den Meiracker, A. H. & Danser, A. H. J. The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia: the delicate balance between good and bad. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 **126**, 537–544 (2014).
38. AbdAlla, S., Lothar, H., el Massiery, A. & Quitterer, U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat. Med.* **7**, 1003–1009 (2001).
39. Bounds, K. R., Newell-Rogers, M. K. & Mitchell, B. M. Four Pathways Involving Innate Immunity in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Front. Cardiovasc. Med.* **2**, (2015).
40. Leik, C. E. & Walsh, S. W. Neutrophils Infiltrate Resistance-Sized Vessels of Subcutaneous Fat in Women With Preeclampsia. *Hypertension* **44**, 72–77 (2004).
41. Moffett, A. & Hiby, S. E. How Does the Maternal Immune System Contribute to the Development of Pre-eclampsia? *Placenta* **28**, S51–S56 (2007).

42. Nandi, P., Siddiqui, M. F. & Lala, P. K. Restraint of Trophoblast Invasion of the Uterus by Decorin: Role in Pre-eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 (2015). doi:10.1111/aji.12449
43. Cemgil Arıkan, D., Aral, M., Coskun, A. & Ozer, A. Plasma IL-4, IL-8, IL-12, interferon- γ and CRP levels in pregnant women with preeclampsia, and their relation with severity of disease and fetal birth weight. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **25**, 1569–1573 (2012).
44. Reyna, E. *et al.* Concentraciones de interleucina-6 en preeclámpticas y embarazadas normotensas sanas. *Clínica E Investig. En Ginecol. Obstet.* **39**, 159–163 (2012).
45. Raghupathy, R. Cytokines as Key Players in the Pathophysiology of Preeclampsia. *Med. Princ. Pract.* **22**, 8–19 (2013).
46. Hayashi, M. *et al.* Tumor Necrosis Factor- α in the Placenta is not Elevated in Preeclamptic Patients Despite its Elevation in Peripheral Blood. *Am. J. Reprod. Immunol.* **53**, 113–119 (2005).
47. Seki, H., Matuoka, K., Inooku, H. & Takeda, S. TNF- α from monocyte of patients with pre-eclampsia-induced apoptosis in human trophoblast cell line. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **33**, 408–416 (2007).
48. Otun, H. A. *et al.* Effect of tumour necrosis factor- α in combination with interferon- γ on first trimester extravillous trophoblast invasion. *J. Reprod. Immunol.* **88**, 1–11 (2011).
49. Naldini, A. & Carraro, F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **4**, 3–8 (2005).
50. Keelan, J. A. & Mitchell, M. D. Placental cytokines and preeclampsia. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **12**, 2706–2727 (2007).
51. Olszowski, T., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I. & Chlubek, D. Pro-inflammatory properties of cadmium. *Acta Biochim. Pol.* **59**, 475–482 (2012).
52. Ko, S.-C. *et al.* Epidermal Growth Factor Protects Squamous Cell Carcinoma against Cisplatin-Induced Cytotoxicity through Increased Interleukin-1 β Expression. *PLoS ONE* **8**, e55795 (2013).
53. Amash, A., Holcberg, G., Sapir, O. & Huleihel, M. Placental secretion of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in preeclampsia: effect of magnesium sulfate. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **32**, 432–441 (2012).
54. Granger, J. P. Inflammatory cytokines, vascular function, and hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **286**, R989-990 (2004).
55. Kaplanski, G. *et al.* Thrombin induces endothelial type II activation in vitro: IL-1 and TNF- α -independent IL-8 secretion and E-selectin expression. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **158**, 5435–5441 (1997).
56. Meisser, A., Chardonens, D., Campana, A. & Bischof, P. Effects of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 α , macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol. Hum. Reprod.* **5**, 252–260 (1999).
57. Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a016295–a016295 (2014).
58. Chen, Q., Stone, P., Ching, L.-M. & Chamley, L. A role for interleukin-6 in spreading endothelial cell activation after phagocytosis of necrotic trophoblastic material: implications for the pathogenesis of pre-eclampsia. *J. Pathol.* **217**, 122–130 (2009).
59. LaMarca, B. IL-6-induced pathophysiology during pre-eclampsia: potential therapeutic role for magnesium sulfate? *Int. J. Interferon Cytokine Mediat. Res.* **59** (2011). doi:10.2147/IJICMR.S16320
60. Conrad, K. P., Miles, T. M. & Benyo, D. F. Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 **40**, 102–111 (1998).
61. Xiao, J. P. *et al.* The increased maternal serum levels of IL-6 are associated with the

- severity and onset of preeclampsia. *Cytokine* **60**, 856–860 (2012).
62. Gadonski, G. *et al.* Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of interleukin 6. *Hypertens. Dallas Tex* **1979** **48**, 711–716 (2006).
 63. LaMarca, B. B. D., Cockrell, K., Sullivan, E., Bennett, W. & Granger, J. P. Role of endothelin in mediating tumor necrosis factor-induced hypertension in pregnant rats. *Hypertens. Dallas Tex* **1979** **46**, 82–86 (2005).
 64. Sibai, B. M. Imitators of severe pre-eclampsia. *Semin. Perinatol.* **33**, 196–205 (2009).
 65. LaMarca, B. D., Ryan, M. J., Gilbert, J. S., Murphy, S. R. & Granger, J. P. Inflammatory cytokines in the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. *Curr. Hypertens. Rep.* **9**, 480–485 (2007).
 66. LaMarca, B. Hypertension in response to IL-6 during pregnancy: role of AT1-receptor activation. *Int. J. Interferon Cytokine Mediat. Res.* **65** (2011). doi:10.2147/IJICMR.S22329
 67. Jain, A. *et al.* Hypoxic treatment of human dual placental perfusion induces a preeclampsia-like inflammatory response. *Lab. Invest.* **94**, 873–880 (2014).
 68. Bowen, R. S., Gu, Y., Zhang, Y., Lewis, D. F. & Wang, Y. Hypoxia promotes interleukin-6 and -8 but reduces interleukin-10 production by placental trophoblast cells from preeclamptic pregnancies. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **12**, 428–432 (2005).
 69. Bellos, I., Karageorgiou, V., Kapnias, D., Karamanli, K.-E. & Siristatidis, C. The role of interleukins in preeclampsia: A comprehensive review. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* **1989** **80**, e13055 (2018).
 70. Harmon, A. C. *et al.* The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **1979** **130**, 409–419 (2016).
 71. Simpson, R. J., Hammacher, A., Smith, D. K., Matthews, J. M. & Ward, L. D. Interleukin-6: Structure-function relationships. *Protein Sci.* **6**, 929–955 (1997).
 72. Stanley, A. C. & Lacy, P. Pathways for Cytokine Secretion. *Physiology* **25**, 218–229 (2010).
 73. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1813**, 878–888 (2011).
 74. Tanaka, T. & Kishimoto, T. The Biology and Medical Implications of Interleukin-6. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 288–294 (2014).
 75. Tsakiri, N., Kimber, I., Rothwell, N. J. & Pinteaux, E. Mechanisms of interleukin-6 synthesis and release induced by interleukin-1 and cell depolarisation in neurones. *Mol. Cell. Neurosci.* **37**, 110–118 (2008).
 76. Hunter, C. A. & Jones, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.* **16**, 448–457 (2015).
 77. Phuagkhaopong, S. *et al.* Cadmium-induced IL-6 and IL-8 expression and release from astrocytes are mediated by MAPK and NF- κ B pathways. *NeuroToxicology* **60**, 82–91 (2017).
 78. Hu, J. *et al.* Cadmium induces inflammatory cytokines through activating Akt signaling in mouse placenta and human trophoblast cells. *Placenta* **65**, 7–14 (2018).
 79. Frossi, B., De Carli, M., Daniel, K. C., Rivera, J. & Pucillo, C. Oxidative stress stimulates IL-4 and IL-6 production in mast cells by an APE/Ref-1-dependent pathway. *Eur. J. Immunol.* **33**, 2168–2177 (2003).
 80. Boulanger, M. J. Hexameric Structure and Assembly of the Interleukin-6/IL-6 - Receptor/gp130 Complex. *Science* **300**, 2101–2104 (2003).
 81. Kallen, K. J. *et al.* Receptor recognition sites of cytokines are organized as exchangeable modules. Transfer of the leukemia inhibitory factor receptor-binding site from ciliary neurotrophic factor to interleukin-6. *J. Biol. Chem.* **274**, 11859–11867 (1999).

82. Trautwein, C., Rakemann, T., Niehof, M., Rose-John, S. & Manns, M. P. Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterology* **110**, 1854–1862 (1996).
83. Irani, R. A. & Xia, Y. Renin Angiotensin Signaling in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Semin. Nephrol.* **31**, 47–58 (2011).
84. Sowmya, S., Ramaiah, A., Nallari, P., Jyothy, A. & Venkateshwari, A. Role of IL-6 -174(G/C) promoter polymorphism in the etiology of early-onset preeclampsia. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI* **64**, 433–439 (2015).
85. Pinheiro, M. B. *et al.* Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. *Cytokine* **62**, 165–173 (2013).
86. Stonek, F., Metzenbauer, M., Hafner, E., Philipp, K. & Tempfer, C. Interleukin 6-174 G/C promoter polymorphism and pregnancy complications: results of a prospective cohort study in 1626 pregnant women. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* **1989** **59**, 347–351 (2008).
87. Vural, P. *et al.* Tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and interleukin-10 polymorphisms in preeclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **36**, 64–71 (2010).
88. Fan, D. M., Wang, Y., Liu, X. L., Zhang, A. & Xu, Q. Polymorphisms in interleukin-6 and interleukin-10 may be associated with risk of preeclampsia. *Genet. Mol. Res. GMR* **16**, (2017).
89. Bayoumy, N. M., Al-Sharaidh, A. S., Babay, Z. H. & Abdulgader, A. M. The role of interleukin-6 promoter polymorphism -174G/C in Saudi women with hypertensive disorders of pregnancy. *Saudi Med. J.* **34**, 689–694 (2013).
90. Valencia Villalvazo, E. Y. *et al.* Analysis of Polymorphisms in Interleukin-10, Interleukin-6, and Interleukin-1 Receptor Antagonist in Mexican-Mestizo Women with Preeclampsia. *Genet. Test. Mol. Biomark.* **16**, 1263–1269 (2012).
91. Nourollahpour Shiadeh, M. *et al.* Human infectious diseases and risk of preeclampsia: an updated review of the literature. *Infection* **45**, 589–600 (2017).
92. Lopez-Jaramillo, P., Barajas, J., Rueda-Quijano, S. M., Lopez-Lopez, C. & Felix, C. Obesity and Preeclampsia: Common Pathophysiological Mechanisms. *Front. Physiol.* **9**, (2018).
93. Kleeberger, S. R. Genetic aspects of susceptibility to air pollution. *Eur. Respir. J. Suppl.* **40**, 52s–56s (2003).
94. Rodríguez-Cotto, R. I. *et al.* Particle pollution in Rio de Janeiro, Brazil: Increase and decrease of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 in human lung cells. *Environ. Pollut.* **194**, 112–120 (2014).
95. Zhang, K., Hu, M., Zhang, L., Zhang, Q. & Huang, Y. The Effect of BML-111 in Preeclampsia Rat Model Induced by the Low Dose of Cadmium Chloride. *Am. J. Perinatol. Rep.* **09**, e201–e208 (2019).
96. Davvand, P. *et al.* Ambient Air Pollution and Preeclampsia: A Spatiotemporal Analysis. *Environ. Health Perspect.* **121**, 1365 (2013).
97. All the information on Cadmium - Introduction. Available at: <http://www.cadmium.org/introduction>. (Accessed: 26th February 2018)
98. Minería. Economía. Available at: <http://cuentame.inegi.org.mx/economia/secundario/mineria/default.aspx?tema=E>. (Accessed: 26th February 2018)
99. INEGI. Síntesis metodológica de la industria minerometalúrgica. (2015).
100. Nordberg, G. F., Nogawa, K. & Nordberg, M. Cadmium. in *Handbook on the Toxicology of Metals* 667–716 (Elsevier, 2015).
101. Waalkes, M. P. Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res.* **533**, 107–120 (2003).
102. Sanders, A. P. *et al.* Cadmium exposure and the epigenome. *Epigenetics* **9**, 212–221 (2014).

103. Vacchi-Suzzi, C., Kruse, D., Harrington, J., Levine, K. & Meliker, J. R. Is Urinary Cadmium a Biomarker of Long-term Exposure in Humans? A Review. *Curr. Environ. Health Rep.* **3**, 450–458 (2016).
104. Domínguez, A. & Geyer, R. Photovoltaic waste assessment in Mexico. *Resour. Conserv. Recycl.* **127**, 29–41 (2017).
105. Cajuste, L. J., Vazquez-A., A. & Miranda-C., E. Long-term changes in the extractability of lead, cadmium, and nickel in soils under wastewater irrigation. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **33**, 3325–3333 (2002).
106. Moynihan, M. *et al.* Dietary predictors of urinary cadmium among pregnant women and children. *Sci. Total Environ.* **575**, 1255–1262 (2017).
107. Hallan altos niveles de cadmio, plomo y aluminio en aguas de Los Bitzales, donde mueren manatíes - Proceso. Available at: <https://www.proceso.com.mx/545878/hallan-altos-niveles-de-cadmio-plomo-y-aluminio-en-aguas-de-los-bitzales-donde-mueren-manatíes>. (Accessed: 17th February 2019)
108. NOM-127-SSA1-1994. Available at: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html>. (Accessed: 17th February 2019)
109. Gonzalez, M., Banderas, J. A., Baez, A. & Belmont, R. Salivary lead and cadmium in a young population residing in Mexico city. *Toxicol. Lett.* **93**, 55–64 (1997).
110. Torres-Sánchez, L. *et al.* Blood cadmium determinants among males over forty living in Mexico City. *Sci. Total Environ.* **637–638**, 686–694 (2018).
111. Trejo-Acevedo, A. *et al.* Exposure assessment of persistent organic pollutants and metals in Mexican children. *Chemosphere* **74**, 974–980 (2009).
112. Faroon, O. *et al.* *Toxicological Profile for Cadmium*. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US), 2012).
113. Bridges, C. C. & Zalups, R. K. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **204**, 274–308 (2005).
114. Schäfer, L., Andersen, O. & Nielsen, J. B. Effects of dietary factors on g.i. Cd absorption in mice. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)* **59 Suppl 7**, 549–552 (1986).
115. Sasser, L. B. & Jarboe, G. E. Intestinal absorption and retention of cadmium in neonatal rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **41**, 423–431 (1977).
116. Sasser, L. B. & Jarboe, G. E. Intestinal absorption and retention of cadmium in neonatal pigs compared to rats and guinea pigs. *J. Nutr.* **110**, 1641–1647 (1980).
117. World Health Organization. Evaluation of certain food additives and contaminants. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 1–75, back cover (2013).
118. Rafati-Rahimzadeh, M., Rafati-Rahimzadeh, M., Kazemi, S. & Moghadamnia, A. Cadmium toxicity and treatment: An update. *Casp. J. Intern. Med.* (2017). doi:10.22088/cjim.8.3.135
119. Yang, H. & Shu, Y. Cadmium Transporters in the Kidney and Cadmium-Induced Nephrotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 1484–1494 (2015).
120. Johnston, J. E., Valentiner, E., Maxson, P., Miranda, M. L. & Fry, R. C. Maternal Cadmium Levels during Pregnancy Associated with Lower Birth Weight in Infants in a North Carolina Cohort. *PLoS ONE* **9**, (2014).
121. Boadi, W. Y., Yannai, S., Urbach, J., Brandes, J. M. & Summer, K. H. Transfer and accumulation of cadmium, and the level of metallothionein in perfused human placentae. *Arch. Toxicol.* **65**, 318–323 (1991).
122. Henson, M. C. & Chedrese, P. J. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **229**, 383–392 (2004).
123. Himeno, S., Yanagiya, T. & Fujishiro, H. The role of zinc transporters in cadmium and manganese transport in mammalian cells. *Biochimie* **91**, 1218–1222 (2009).

124. Park, J. D., Cherrington, N. J. & Klaassen, C. D. Intestinal absorption of cadmium is associated with divalent metal transporter 1 in rats. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **68**, 288–294 (2002).
125. Bertin, G. & Averbeck, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88**, 1549–1559 (2006).
126. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. & Beyersmann, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* **192**, 95–117 (2003).
127. L'hoste, S. *et al.* CFTR mediates cadmium-induced apoptosis through modulation of ROS level in mouse proximal tubule cells. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 1017–1031 (2009).
128. Odewumi. Protective effects of N-acetylcysteine against cadmium-induced damage in cultured rat normal liver cells. *Int. J. Mol. Med.* **27**, (2011).
129. Filipic, M., Fatur, T. & Vudrag, M. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Hum. Exp. Toxicol.* **25**, 67–77 (2006).
130. Bertin, G. & Averbeck, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88**, 1549–1559 (2006).
131. Stohs, S. J. & Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 321–336 (1995).
132. López, E., Arce, C., Oset-Gasque, M. J., Cañadas, S. & González, M. P. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 940–951 (2006).
133. Xu, B. *et al.* Calcium Signaling Is Involved in Cadmium-Induced Neuronal Apoptosis via Induction of Reactive Oxygen Species and Activation of MAPK/mTOR Network. *PLoS ONE* **6**, (2011).
134. Chen, S. *et al.* CaMKII is involved in cadmium activation of MAPK and mTOR pathways leading to neuronal cell death. *J. Neurochem.* **119**, 1108–1118 (2011).
135. Thévenod, F. Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238**, 221–239 (2009).
136. Lee, J.-C., Son, Y.-O., Pratheeshkumar, P. & Shi, X. Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 742–757 (2012).
137. Thévenod, F. & Lee, W.-K. Cadmium and cellular signaling cascades: interactions between cell death and survival pathways. *Arch. Toxicol.* **87**, 1743–1786 (2013).
138. Hart, B. A. *et al.* Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology* **133**, 43–58 (1999).
139. Yang, Z. *et al.* Cadmium-induced toxicity in rat primary mid-brain neuroglia cultures: role of oxidative stress from microglia. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **98**, 488–494 (2007).
140. Souza, V. *et al.* Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology* **197**, 213–228 (2004).
141. Dong, W. *et al.* Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **151**, 359–366 (1998).
142. Låg, M. *et al.* Cadmium-induced inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity: Expression and release of cytokines in fibroblasts, epithelial cells and macrophages. *Toxicol. Lett.* **193**, 252–260 (2010).
143. Cormet-Boyaka, E. *et al.* An NF-κB-independent and Erk1/2-dependent mechanism controls CXCL8/IL-8 responses of airway epithelial cells to cadmium. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **125**, 418–429 (2012).
144. Rennolds, J. *et al.* Curcumin regulates airway epithelial cell cytokine responses to the pollutant cadmium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 256–261 (2012).
145. Zhao, Z., Hyun, J. S., Satsu, H., Kakuta, S. & Shimizu, M. Oral exposure to cadmium

- chloride triggers an acute inflammatory response in the intestines of mice, initiated by the over-expression of tissue macrophage inflammatory protein-2 mRNA. *Toxicol. Lett.* **164**, 144–154 (2006).
146. Lee, J. & Lim, K.-T. Preventive effect of phyto glycoprotein (27 kDa) on inflammatory factors at liver injury in cadmium chloride-exposed ICR mice. *J. Cell. Biochem.* **112**, 694–703 (2011).
 147. Souza, V. *et al.* Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology* **197**, 213–228 (2004).
 148. Kataranovski, M. *et al.* Lungs: remote inflammatory target of systemic cadmium administration in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **28**, 225–231 (2009).
 149. Afolabi, O. K., Oyewo, E. B., Adekunle, A. S., Adedosu, O. T. & Adedeji, A. L. Impaired lipid levels and inflammatory response in rats exposed to cadmium. *EXCLI J.* **11**, 677–687 (2012).
 150. Stosic, J. *et al.* Gender differences in pulmonary inflammation following systemic cadmium administration in rats. *Biomed. Environ. Sci. BES* **23**, 293–299 (2010).
 151. IARC Monographs Volume 100C Cadmium and Cadmium Compounds – IARC.
 152. Wang, B. & Du, Y. Cadmium and Its Neurotoxic Effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 1–12 (2013).
 153. Johri, N., Jacquillet, G. & Unwin, R. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *BioMetals* **23**, 783–792 (2010).
 154. Tellez-Plaza, M., Navas-Acien, A., Crainiceanu, C. M. & Guallar, E. Cadmium Exposure and Hypertension in the 1999–2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Environ. Health Perspect.* **116**, 51–56 (2008).
 155. Caciari, T. *et al.* Cadmium and hypertension in exposed workers: A meta-analysis. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* **26**, (2013).
 156. Thompson, J. & Bannigan, J. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **25**, 304–315 (2008).
 157. Dyer, C. A. Heavy Metals as Endocrine-Disrupting Chemicals. in *Endocrine-Disrupting Chemicals* (ed. Phd, A. C. G.) 111–133 (Humana Press, 2007). doi:10.1007/1-59745-107-X_5
 158. Saad, A. A. *et al.* The Role of Cadmium as a Causative Agent of Recurrent Abortion in Egyptian Women. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* **17**, 906–914 (2011).
 159. Menai, M. *et al.* Association between maternal blood cadmium during pregnancy and birth weight and the risk of fetal growth restriction: The EDEN mother–child cohort study. *Reprod. Toxicol.* **34**, 622–627 (2012).
 160. Thompson, J. & Bannigan, J. Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod. Toxicol.* **25**, 304–315 (2008).
 161. Kippler, M. *et al.* Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus. *Toxicol. Lett.* **192**, 162–168 (2010).
 162. Kippler, M. *et al.* Early-life cadmium exposure and child development in 5-year-old girls and boys: a cohort study in rural Bangladesh. *Environ. Health Perspect.* **120**, 1462–1468 (2012).
 163. Omeljaniuk, W. J. *et al.* Cadmium and Lead in Women Who Miscarried. *Clin. Lab.* **64**, 59–67 (2018).
 164. Ahmed, H., El-Desouky, A. & Rashed, A. Role of antioxidants, environmental exposure to lead and cadmium in spontaneous abortion. *Egypt. J. Occup. Med.* **31**, 217–236 (2007).
 165. Ajayi, O., Charles-Davies, M. & Arinola, O. Progesterone, selected heavy metals and micronutrients in pregnant Nigerian women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Afr. Health Sci.* **12**, 153–159 (2012).

166. Amadi, C. N., Igweze, Z. N. & Orisakwe, O. E. Heavy metals in miscarriages and stillbirths in developing nations. *Middle East Fertil. Soc. J.* **22**, 91–100 (2017).
167. Llanos, M. N. & Ronco, A. M. Fetal growth restriction is related to placental levels of cadmium, lead and arsenic but not with antioxidant activities. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **27**, 88–92 (2009).
168. Everson, T. M. *et al.* Maternal exposure to selenium and cadmium, fetal growth, and placental expression of steroidogenic and apoptotic genes. *Environ. Res.* **158**, 233–244 (2017).
169. Huang, K. *et al.* Prenatal cadmium exposure and preterm low birth weight in China. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **27**, 491–496 (2017).
170. Cheng, L. *et al.* Critical Windows of Prenatal Exposure to Cadmium and Size at Birth. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **14**, (2017).
171. Wai, K. M., Mar, O., Kosaka, S., Umemura, M. & Watanabe, C. Prenatal Heavy Metal Exposure and Adverse Birth Outcomes in Myanmar: A Birth-Cohort Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **14**, (2017).
172. Yang, J. *et al.* Maternal urinary cadmium concentrations in relation to preterm birth in the Healthy Baby Cohort Study in China. *Environ. Int.* **94**, 300–306 (2016).
173. Turker, G., Ozsoy, G., Ozdemir, S., Barutçu, B. & Gökalp, A. S. Effect of heavy metals in the meconium on preterm mortality: preliminary study. *Pediatr. Int. Off. J. Jpn. Pediatr. Soc.* **55**, 30–34 (2013).
174. Fagher, U., Laudanski, T., Schütz, A., Sipowicz, M. & Akerlund, M. The relationship between cadmium and lead burdens and preterm labor. *Int. J. Gynaecol. Obstet. Off. Organ Int. Fed. Gynaecol. Obstet.* **40**, 109–114 (1993).
175. Yıldırım, E. *et al.* Is the Concentration of Cadmium, Lead, Mercury, and Selenium Related to Preterm Birth? *Biol. Trace Elem. Res.* (2019). doi:10.1007/s12011-018-1625-2
176. Kosanovic, M., Jokanovic, M., Jevremovic, M., Dobric, S. & Bokonjic, D. Maternal and fetal cadmium and selenium status in normotensive and hypertensive pregnancy. *Biol. Trace Elem. Res.* **89**, 97–103 (2002).
177. Dawson, E. B., Evans, D. R. & Nosovitch, J. Third-trimester amniotic fluid metal levels associated with preeclampsia. *Arch. Environ. Health* **54**, 412–415 (1999).
178. Laine, J. E. *et al.* Placental Cadmium Levels Are Associated with Increased Preeclampsia Risk. *PLoS One* **10**, e0139341 (2015).
179. Elongi Moyene, J.-P. *et al.* Preeclampsia and toxic metals: a case-control study in Kinshasa, DR Congo. *Environ. Health* **15**, (2016).
180. Wang, F. *et al.* Maternal Cadmium Levels During Pregnancy and the Relationship with Preeclampsia and Fetal Biometric Parameters. *Biol. Trace Elem. Res.* **186**, 322–329 (2018).
181. Preeclampsia Foundation. Preeclampsia: A Decade of Perspective, Building a Global Call to Action. in (2010).
182. Villar, J., Belizan, J. M. & Fischer, P. J. Epidemiologic observations on the relationship between calcium intake and eclampsia. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **21**, 271–278 (1983).
183. Wu, J. *et al.* Association between Local Traffic-Generated Air Pollution and Preeclampsia and Preterm Delivery in the South Coast Air Basin of California. *Environ. Health Perspect.* **117**, 1773–1779 (2009).
184. Alaa Ismail, Safa George, Asmaa Mohamed & Ahmed Abbas. Environmental exposure to lead and cadmium in patients with preeclampsia; A case-control study. *Asian J. Pharmacol. Toxicol.* **03**, 27–33 (2015).
185. Ebrahim, karim & Ashtarinezhad, A. The Association of Amniotic Fluid Cadmium Levels with the Risk of Preeclampsia, Prematurity and Low Birth Weight. *Iran. J. Neonatol. IJN* (2015). doi:10.22038/ijn.2015.4482

186. Wang, F. *et al.* Preeclampsia induced by cadmium in rats is related to abnormal local glucocorticoid synthesis in placenta. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **12**, 77 (2014).
187. Zhang, Q. *et al.* Cadmium-induced immune abnormality is a key pathogenic event in human and rat models of preeclampsia. *Environ. Pollut.* **218**, 770–782 (2016).
188. Freitas, M. & Fernandes, E. Zinc, cadmium and nickel increase the activation of NF- κ B and the release of cytokines from THP-1 monocytic cells. *Met. Integr. Biometal Sci.* **3**, 1238–1243 (2011).
189. Tsukihara, S. *et al.* Interleukin-1 β -induced Expression of IL-6 and Production of Human Chorionic Gonadotropin in Human Trophoblast Cells via Nuclear Factor- κ B Activation. *Am. J. Reprod. Immunol.* **52**, 218–223 (2004).
190. Potter, J. A., Garg, M., Girard, S. & Abrahams, V. M. Viral Single Stranded RNA Induces a Trophoblast Pro-Inflammatory and Antiviral Response in a TLR8-Dependent and -Independent Manner¹. *Biol. Reprod.* **92**, (2015).
191. Anton, L., Brown, A. G., Parry, S. & Elovitz, M. A. Lipopolysaccharide induces cytokine production and decreases extravillous trophoblast invasion through a mitogen-activated protein kinase-mediated pathway: possible mechanisms of first trimester placental dysfunction. *Hum. Reprod.* **27**, 61–72 (2012).
192. Shirasuna, K. *et al.* Moderate Hypoxia Down-Regulates Interleukin-6 Secretion and TLR4 Expression in Human Sw.71 Placental Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **36**, 2149–2160 (2015).
193. Koh, Y. Q. *et al.* Differential response to lipopolysaccharide by JEG-3 and BeWo human choriocarcinoma cell lines. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **175**, 129–133 (2014).
194. Blanchon, L. *et al.* Human choriocarcinoma cell line JEG-3 produces and secretes active retinoids from retinol. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* **8**, 485–493 (2002).
195. Piasek, M., Mikolić, A., Sekovanić, A., Sulimanec Grgec, A. & Jurasović, J. Cadmium in Placenta—A Valuable Biomarker of Exposure During Pregnancy in Biomedical Research. *J. Toxicol. Environ. Health A* **77**, 1071–1074 (2014).
196. Lockwood, C. J. *et al.* Preeclampsia-Related Inflammatory Cytokines Regulate Interleukin-6 Expression in Human Decidual Cells. *Am. J. Pathol.* **172**, 1571–1579 (2008).
197. Liu, J., Qu, W. & Kadiiska, M. B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238**, 209–214 (2009).
198. Gobe, G. & Crane, D. Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. *Toxicol. Lett.* **198**, 49–55 (2010).
199. Cuypers, A. *et al.* Cadmium stress: an oxidative challenge. *BioMetals* **23**, 927–940 (2010).
200. Aldini, G. *et al.* N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radic. Res.* **52**, 751–762 (2018).
201. Sun, S.-Y. N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. *Cancer Biol. Ther.* **9**, 109–110 (2010).
202. Fujiki, K., Inamura, H. & Matsuoka, M. PI3K signaling mediates diverse regulation of ATF4 expression for the survival of HK-2 cells exposed to cadmium. *Arch. Toxicol.* **88**, 403–414 (2014).
203. Liu, C. *et al.* Resveratrol prevents cadmium activation of Erk1/2 and JNK pathways from neuronal cell death via protein phosphatases 2A and 5. *J. Neurochem.* **135**, 466–478 (2015).
204. Yuan, Y. *et al.* Cadmium Activates Reactive Oxygen Species-dependent AKT/mTOR and Mitochondrial Apoptotic Pathways in Neuronal Cells. *Biomed. Environ. Sci. BES* **29**, 117–126 (2016).
205. Kayama, F., Yoshida, T., Elwell, M. R. & Luster, M. I. Cadmium-induced renal damage and proinflammatory cytokines: possible role of IL-6 in tubular epithelial cell

- regeneration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **134**, 26–34 (1995).
206. Jing, Y. *et al.* Cadmium Increases HIF-1 and VEGF Expression through ROS, ERK, and AKT Signaling Pathways and Induces Malignant Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells. *Toxicol. Sci.* **125**, 10–19 (2012).
207. Jin, P. & Ringertz, N. R. Cadmium induces transcription of proto-oncogenes c-jun and c-myc in rat L6 myoblasts. *J. Biol. Chem.* **265**, 14061–14064 (1990).
208. Achanzar, W. E., Achanzar, K. B., Lewis, J. G., Webber, M. M. & Waalkes, M. P. Cadmium induces c-myc, p53, and c-jun expression in normal human prostate epithelial cells as a prelude to apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **164**, 291–300 (2000).
209. Kondo, A. *et al.* Inhibition of SAPK/JNK leads to enhanced IL-1-induced IL-6 synthesis in osteoblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **535**, 227–233 (2013).
210. Tanaka, T., Narazaki, M., Masuda, K. & Kishimoto, T. Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **941**, 79–88 (2016).
211. Chan, Y. C. & Leung, P. S. Involvement of redox-sensitive extracellular-regulated kinases in angiotensin II-induced interleukin-6 expression in pancreatic acinar cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **329**, 450–458 (2009).
212. Reimold, A. M., Kim, J., Finberg, R. & Glimcher, L. H. Decreased immediate inflammatory gene induction in activating transcription factor-2 mutant mice. *Int. Immunol.* **13**, 241–248 (2001).
213. Tuyt, L. M. *et al.* Extracellular-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and c-Jun are involved in NF-kappa B-dependent IL-6 expression in human monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 4893–4902 (1999).

Artículo requisito para la obtención del grado



Cadmium exposure induces interleukin-6 production via ROS-dependent activation of the ERK1/2 but independent of JNK signaling pathway in human placental JEG-3 trophoblast cells

Lucero Paniagua^{a,b}, Laura Diaz-Cueto^a, Maira Huerta-Reyes^c, Fabian Arechavaleta-Velasco^{a,*}

^a Unidad de Investigacion Medica en Medicina Reproductiva, UMAE Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Dr. Luis Castelazo Ayala”, IMSS, CDMX, Mexico

^b Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, Mexico

^c Unidad de Investigacion Medica en Enfermedades Nefrológicas, Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, Centro Medico Nacional Siglo XXI, IMSS, CDMX, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Cadmium
Preeclampsia
Trophoblast
IL-6
MAPK signaling pathways
Reactive oxygen species

ABSTRACT

Maternal exposure to cadmium (Cd) has been associated with preeclampsia (PE), which is a multisystemic disorder characterized by endothelial dysfunction. Elevated interleukin (IL)-6 expression is linked to PE and has been suggested to contribute to maternal endothelial dysfunction. Cd induces IL-6 production in various cell types through different signaling pathways. Thus, this study was designed to investigate the effect of Cd on IL-6 production and the underlying mechanisms in a trophoblast-derived cell line. Cultured JEG-3 trophoblast cells were exposed to non-toxic concentrations of CdCl₂ in the presence or absence of various MAPK inhibitors or N-Acetyl-L-cysteine (NAC). IL-6 was measured by ELISA. Phosphorylation of ERK1/2, JNK, and c-Jun was assessed by Western blotting. Cd exposure induced IL-6 production and increased ERK1/2, JNK, and c-Jun phosphorylation. NAC and the inhibition of ERK1/2 significantly reduced Cd-induced IL-6 production. These data indicate that Cd induces IL-6 production in trophoblast cells through a ROS-dependent activation of ERK1/2.

1. Introduction

Cadmium (Cd) is a toxic metal that is released to the environment through industrial activities such as smelting, mineral mining, phosphate fertilizers production, and fossil-fuel combustion [1]. It also accumulates in the environment due to the improper disposal of products such as nickel-cadmium batteries, pigments, and plastics. Another source of Cd exposure is tobacco smoke [2,3]. Once absorbed, Cd has a long half-life in the human body and accumulates in various organs such as kidney, liver, bone, and placenta [4]. Epidemiological data have associated Cd with several pathological conditions including hypertension, renal disease, cancer, and neurological damage [5–8]. During pregnancy, Cd can cross the placental barrier; therefore, it can adversely affect both the mother and the fetus. Exposure to this metal in utero is associated with low birth weight, malformations, decreased neonatal length, and poor childhood neurobehavioral and psychosocial development [9–11]; while maternal exposure to Cd has been

associated with preterm delivery and preeclampsia (PE) [12–15].

PE is a multisystemic disorder characterized mainly by new-onset hypertension and proteinuria, or new-onset hypertension and organs dysfunction occurring after 20 weeks of gestation. PE affects about 3–8% of all pregnancies and is the leading cause of maternal and perinatal morbidity and mortality worldwide [16,17]. Although its etiology remains unclear, a two-stage model has been proposed to explain its pathophysiology. Stage 1 consists of placental ischemia resulted from incomplete uterine spiral artery remodeling due to a shallow invasion of the trophoblast into the uterine muscle layers; while stage 2 includes the clinical manifestations of the maternal syndrome of PE characterized by systemic inflammation and endothelial dysfunction [18,19]. It has been proposed that shedding of syncytiotrophoblast basement membranes or an increased synthesis and release of placental soluble factors are the linkage between placental ischemia and maternal vascular dysfunction [20,21].

PE is associated with chronic inflammation characterized by

Abbreviations: Cd, cadmium; PE, preeclampsia; IL-, interleukin-; NAC, N-acetyl-L-cysteine; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; ERK, extracellular signal-regulated kinases; JNK, c-Jun N-terminal kinases; DMEM, Dulbecco's modified eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; LDH, lactate dehydrogenase; ROS, reactive oxygen species; NF-κB, nuclear factor-κB; CREB, cAMP response element-binding

* Corresponding author at: Unidad de Investigacion Medica en Medicina Reproductiva, IMSS, Av. Rio Magdalena No. 289, Sexto piso, Tizapán, San Angel, CP 01090, CDMX, Mexico.

E-mail address: fabian.arechavaleta@gmail.com (F. Arechavaleta-Velasco).

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.06.008>

Received 1 February 2019; Received in revised form 20 June 2019; Accepted 21 June 2019

Available online 25 June 2019

0890-6238/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

increased interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor α levels in both placenta and maternal serum of preeclamptic women [22,23]. Additionally, chronic placental hypoperfusion in pregnant rats is associated with increased IL-6 production, while a chronic infusion of IL-6 into normal pregnant rats significantly increases arterial pressure [24]. Furthermore, IL-6 contributes to endothelial dysfunction and hypertension during PE by increasing adhesion molecules and endothelial cell permeability, recruiting immune cells that release oxidative stress molecules, production of anti-angiogenic factors, and stimulating B cell production of agonistic autoantibodies against angiotensin II type I receptor [17,25].

During PE, the placenta is one of the major sources of IL-6 secretion. Ex vivo experiments using a placental dual perfusion system as a model of PE demonstrated that hypoxia conditions increase the secretion of IL-6 through the induction of oxidative stress [26]. Furthermore, in vitro studies with trophoblasts isolated from placentas of preeclamptic patients showed that hypoxic conditions induce the expression of IL-6 [27].

A number of different cell types produce IL-6 in response to multiple signal transduction pathways triggered by various stimuli [28]. Specifically, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), which are a family of Ser/Thr kinases, have been implicated in the induction of IL-6 in HaCaT cells, astrocytes, and cardiac and lung fibroblasts [29–32]. There are at least three subfamilies of MAPKs, including the extracellular signal-regulated kinases (ERK), c-Jun N-terminal kinases (JNK) and p38, which can be activated by different stimuli such as infectious agents and environmental factors [33,34].

Cd exposure activates MAPK signaling in different cell culture models via the induction of reactive oxygen species [35–38]. Also, Cd stimulates IL-6 expression in astrocytes, endothelial cells, THP-1 monocytic cells, and HepG2 cells [31,39,40]. However, whether Cd is capable of inducing IL-6 expression in trophoblast cells as well as its intracellular mechanisms have not yet been studied. Thus, this study was conducted to determine if exposure to Cd induces the expression of IL-6 in human placental JEG-3 trophoblast cells, as well as the mechanism and signaling pathways that are activated.

2. Material and methods

2.1. Reagents and antibodies

Cadmium chloride, DMSO, *N*-Acetyl-L-cysteine (NAC), PD 98059-Calbiochem (MAP Kinase Kinase inhibitor), and Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets were purchased from MilliporeSigma (St. Louis, MO, USA). SP600125 (JNK-1, -2, and -3 inhibitor), Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) Mouse mAb, p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody, Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (G9) Mouse mAb, JNK2 (56G8) Rabbit mAb, Phospho-c-Jun (Ser73) (D47G9) XP[®] Rabbit mAb, c-Jun (60A8) Rabbit mAb, and Cell Lysis Buffer (10X) were purchased from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA). The Anti-beta actin monoclonal antibody was purchased from Abcam Inc. (Cambridge, MA, USA). Goat anti-rabbit IgG and goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase-conjugates (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) were used as secondary antibodies. HyClone[™] Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), Gibco[™] sodium pyruvate, HyClone[™] antibiotic-antimycotic solution, HyClone[™] fetal bovine serum (FBS), Pierce[™] BCA Protein Assay Kit and SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Amersham[™] Hybond-P PVDF membrane was purchased from GE Healthcare Bio-Sciences (Pittsburgh, PA, USA). Human IL-6 ELISA kit was purchased from Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, NY, USA). CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay was purchased from Promega Corp. (Madison, WI, USA).

2.2. Cell culture

The human choriocarcinoma cell line JEG-3 (ATCC[®] HTB-36[™]) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were grown in DMEM supplemented with 1 mM sodium pyruvate, antibiotic-antimycotic solution and 5% FBS at 37 °C in 5% CO₂.

2.3. Cell viability assay

The cytotoxic effect of CdCl₂, PD 98059 (Erk inhibitor), and SP600125 (JNK inhibitor) were analyzed by measuring lactate dehydrogenase (LDH) leakage into the medium using the CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, following the manufacturer's instructions. Briefly, 1.5×10^4 cells were plated in a 96-well tissue culture plate in triplicate and incubated in culture media with 5% FBS overnight to allow attachment. Then, cells were exposed to different doses of CdCl₂, PD 98059, or SP600125 in phenol red-free DMEM with 0.5% FBS for 24 h. When incubation was finished, LDH activity in cell supernatants was measured by spectrophotometry at 490 nm. Maximal LDH release was determined from cells lysed with 1% Triton X-100. Cytotoxicity of DMSO used for the dilution of the different inhibitors was also evaluated (data not shown). Cells cultured in DMEM alone were used as controls for the spontaneous release of LDH. The percentage of viability was calculated as %viability = 100 x (1 - (spontaneous release of LDH/maximum release of LDH)).

2.4. Cell treatments

JEG-3 cells were seeded in 12-well tissue culture plates at a density of 3×10^5 cells per well and exposed to different conditions at 37 °C in phenol red-free DMEM containing 0.5% FBS. To investigate the effect of Cd exposure on IL-6 production, cells were incubated for 24 h with different concentrations of CdCl₂ (0.6, 1.2, 2.5 μ M). To determine the signaling pathways activated by Cd, cells were exposed for different time periods (0, 1, 3, 6, and 24 h) to 2.5 μ M of CdCl₂. To identify which signaling pathway is responsible for Cd-induced IL-6 production, cells were starved in 0.5% FBS/DMEM for 2 h and pretreated for 2 h with SP600125 (20 μ M) or PD98059 (50 μ M). Afterward, cells were exposed to 2.5 μ M of CdCl₂ in the presence or absence of both inhibitors for 6 and 24 h. Finally, to study whether intracellular reactive oxygen species (ROS) generation is required for Cd-induced IL-6 production, cells were starved in 0.5% FBS/DMEM for 2 h and pretreated for 2 h with 5 mM of the ROS scavenger, NAC. Then, cells were incubated for 6 and 24 h with 2.5 μ M of CdCl₂ in the presence or absence of NAC. After the incubation periods, supernatants were harvested for IL-6 determination and total proteins were extracted for Western blotting. The optimal concentration of CdCl₂, PD 98059, and SP600125 were selected based on cell viability experiments. DMSO was added at a final concentration no greater than 0.1% as solvent control for SP600125 and PD98059 treatments.

2.5. Protein extraction

Protein extracts were prepared by resuspending the cells in 1X lysis buffer containing complete-mini[™] (EDTA-free) protease inhibitor cocktail and incubated on ice for 5 min. Lysates were centrifuged for 10 min at 10,000 rpm, and the supernatants were analyzed for total and phosphorylated JNK, ERK1/2, and c-Jun by Western blotting. Total protein concentration of whole cell lysates was measured by the Pierce BCA Assay, following the manufacturer's instructions.

2.6. Western blot analysis

Protein extracts (10 μ g for c-Jun or 20 μ g for ERK1/2 and JNK) were separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

electrophoresis and transferred to Hybond-P PVDF membranes. Non-specific binding was minimized by blocking the membrane for 1 h at room temperature with blocking buffer (5% bovine serum albumin in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20, pH 7.5). Primary monoclonal antibodies against p-JNK, JNK, p-ERK1/2, ERK1/2, p-c-Jun, and c-Jun were used at 1:1000 dilution overnight at 4 °C. For β -actin detection, the monoclonal antibody was used at 1:3000 dilution overnight at 4 °C. Primary antibodies were detected using goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase-conjugates at 1:10,000 dilution, and the blots were developed using the SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate. The intensity of the resulting bands was measured by densitometry using the ImageJ software. Levels of p-ERK1/2 and p-JNK were normalized against ERK1/2/ β -actin and JNK/ β -actin ratio, respectively; while c-Jun and p-c-Jun levels were normalized against β -actin.

2.7. IL-6 ELISA

IL-6 protein level in culture media was determined using a commercial ELISA kit based on a two-step sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, according to the manufacturer's protocol. All samples were used without dilution and assayed in duplicate.

2.8. Statistical analysis

All statistical analyzes were performed using GraphPad Prism version 6.00 for Mac (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, www.graphpad.com). Results are presented as mean \pm SEM of IL-6 concentration values or fold changed relative to control. The Shapiro-Wilk test was used to confirm that all data were normally distributed. Data were analyzed by using the one-way analysis of variance test followed by Tukey's test for means comparison between all treatment groups. A P-value of < 0.05 was considered as statistically significant. All experiments were repeated at least three times.

3. Results

3.1. Effect of cadmium exposure on cell viability

Non-toxic doses were selected based on cell viability after 24 h incubation with different concentrations of CdCl₂. Non-cytotoxic doses were defined as the maximum concentration allowing cell viability greater than 90%. Viability of the JEG-3 cells decreased in a dose-dependent manner. No cytotoxicity was detected after incubation with 2.5, 1.2, and 0.6 μ M of CdCl₂ (Fig. 1); therefore, a maximum

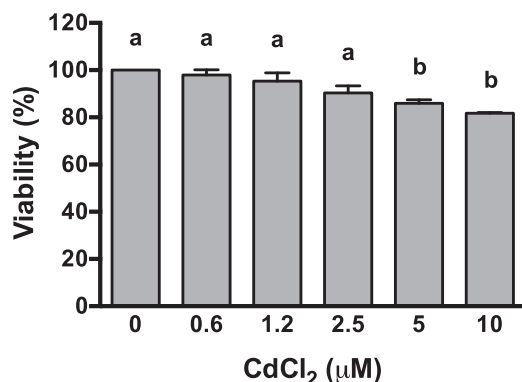


Fig. 1. Effect of Cd on JEG-3 trophoblast cells viability. Cells were exposed to different concentrations of Cd for 24 h. Viability was determined by measuring LDH leakage into the medium. The results represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$), as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

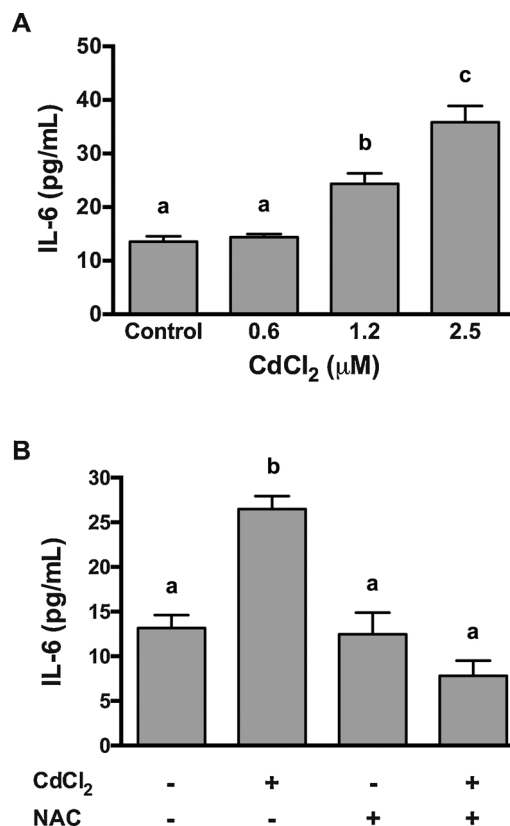


Fig. 2. Cd induces IL-6 production in JEG-3 trophoblast cells through ROS generation. JEG-3 cells were incubated with different concentrations of CdCl₂ (A) or 2.5 μ M CdCl₂ in the presence of 5 mM NAC (B) for 24 h. IL-6 levels were quantified by ELISA in culture media. The results represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$), as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

concentration of 2.5 μ M was selected for further experiments.

3.2. Cadmium induces IL-6 production through ROS generation in JEG-3 cells

Low levels of IL-6 were released by JEG-3 cells into the culture medium under basal conditions. There was a dose-dependent increase in IL-6 production after CdCl₂ exposure for 24 h. Incubation of JEG-3 cells with 1.2 and 2.5 μ M of CdCl₂ resulted in a significantly increased IL-6 synthesis of 1.8- and 2.6-fold, respectively (Fig. 2A). Co-incubation of JEG-3 cells with CdCl₂ (2.5 μ M) in the presence of NAC (5 mM) for 24 h resulted in a significant reduction of IL-6 secretion compared with JEG-3 cells incubated with Cd alone (Fig. 2B).

3.3. Effect of cadmium exposure on ERK1/2, JNK and c-Jun phosphorylation in JEG-3 cells

Incubation of JEG-3 cells in the presence of CdCl₂ at 2.5 μ M significantly increased ERK1/2 phosphorylation at 1 h (Fig. 3A and D); while a time-dependent phosphorylation of JNK and c-Jun was observed with a significant increase at 6 h after Cd exposure (Fig. 3B, C, E and F). Interestingly, levels of total c-Jun were also significantly increased in a time-dependent manner with a maximum at 6 h (Fig. 3C and F).

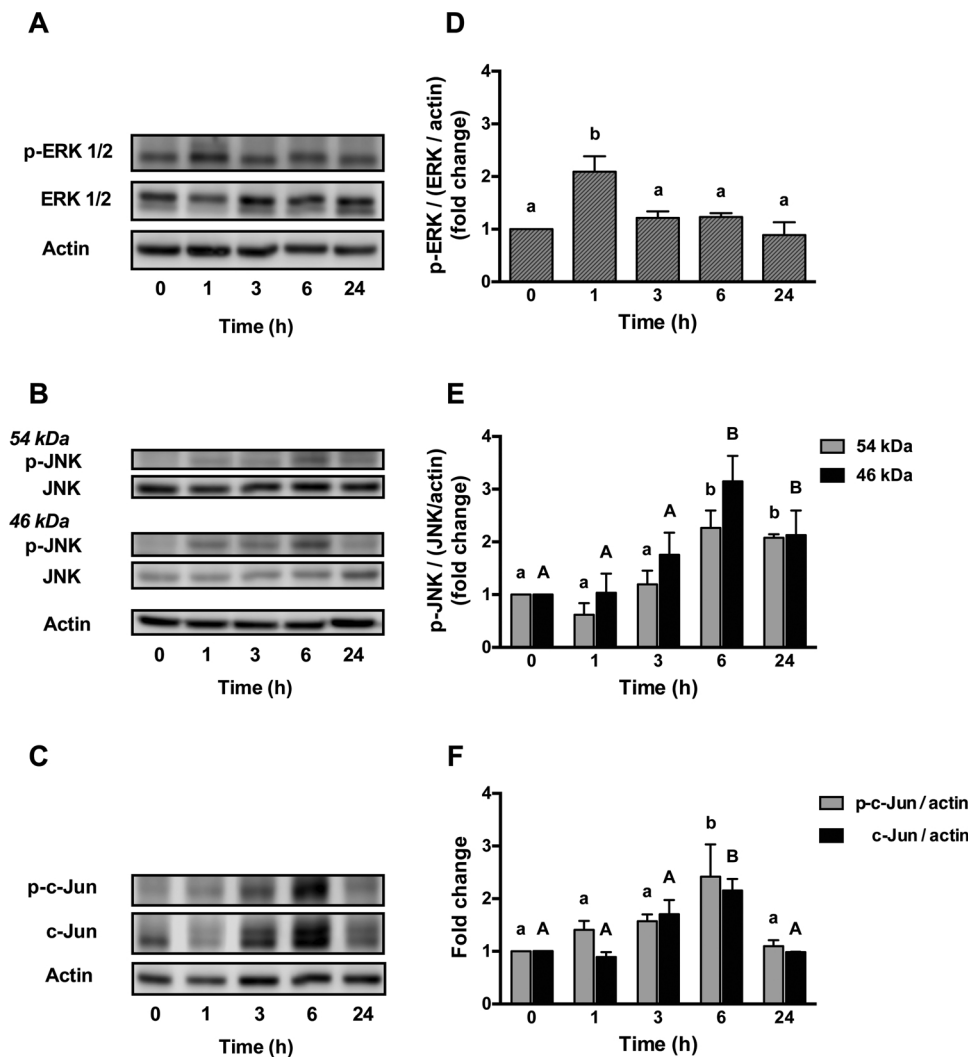


Fig. 3. Cd-induced activation of ERK1/2, JNK and c-Jun pathways in JEG-3 trophoblast cells. JEG-3 cells were incubated with 2.5 μM CdCl₂ for different times. Total and phosphorylated ERK1/2 (A), JNK (B), and c-Jun (C) levels were detected by Western blotting. β -actin was used as protein loading control. Quantitation of total and phosphorylated protein was performed by densitometry (D, E, and F). The values are expressed as relative densitometric units with respect to control. The results represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$), as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test. Lowercase letters are used for comparisons among 54 kDa (E) or p-c-Jun (F) while uppercase letters are used to compare means among 46 kDa (E) or c-Jun (F).

3.4. IL-6 production induced by cadmium is independent of JNK activation in JEG-3 cells

To determine whether Cd-induced c-Jun phosphorylation, total c-Jun expression, and IL-6 production are mediated by JNK activation, JEG-3 cells were incubated with 2.5 μM of CdCl₂ in the presence or absence of SP600125 (20 μM). SP600125 alone had no significant effect on basal c-Jun phosphorylation (Fig. 4A and B) as well as IL-6 production (Fig. 4C) after 6 and 24 h incubation, respectively. Basal total c-Jun expression was slightly but not significantly reduced after 6 h incubation with SP600125 (Fig. 4A and B).

Incubation of JEG-3 cells with CdCl₂ in the presence of SP600125 resulted in a significant decrease in c-Jun phosphorylation and total c-Jun expression to slightly above basal levels (Fig. 4A and B). In contrast, IL-6 production was significantly enhanced above the level observed in cells exposed to CdCl₂ alone (Fig. 4C).

3.5. Cadmium-induced IL-6 production requires ERK1/2 activation in JEG-3 cells

PD 98059 was used to investigate whether ERK1/2 pathway is involved in Cd-induced IL-6 production as well as c-Jun expression and phosphorylation. Incubation of JEG-3 cells with ERK1/2 inhibitor alone slightly but not significantly reduced basal total c-Jun expression (Fig. 4A and B) and IL-6 production (Fig. 4C) after 6 and 24 h, respectively. No effect was observed on basal c-Jun phosphorylation after

6 h exposure (Fig. 4A and B).

Inhibition of ERK1/2 in the presence of 2.5 μM of CdCl₂ significantly decreased IL-6 production (Fig. 4C) to basal levels after 24 h incubation. In contrast, c-Jun expression and phosphorylation were significantly reduced but did not return to basal levels (Fig. 4A and B); therefore, a significant difference was also observed when compared to untreated or PD89059-alone treated cells.

4. Discussion

Epidemiological studies have shown that Cd exposure of pregnant women is associated with PE [12,13,15]. However, the underlying molecular mechanisms have not been completely elucidated. Understanding these mechanisms could eventually lead to the development of pharmacological or diet supplementation strategies to prevent the adverse effects of Cd in this syndrome.

It has been proposed that soluble factors such as IL-6 released from ischemic placenta into the circulation contribute to the endothelial dysfunction observed in PE [20]. IL-6 is secreted by trophoblast cells in response to IL-1 β , lipopolysaccharide, virus infection, heat-inactivated bacteria, and hypoxia, indicating that different stimuli can control the expression of IL-6 in the placenta [26,41–43]. Additionally, several studies have shown that Cd exposure induces IL-6 secretion in various cell types [44]. In this study, we demonstrated that non-toxic concentrations of Cd induce IL-6 production in human placental JEG-3 choriocarcinoma cell line.

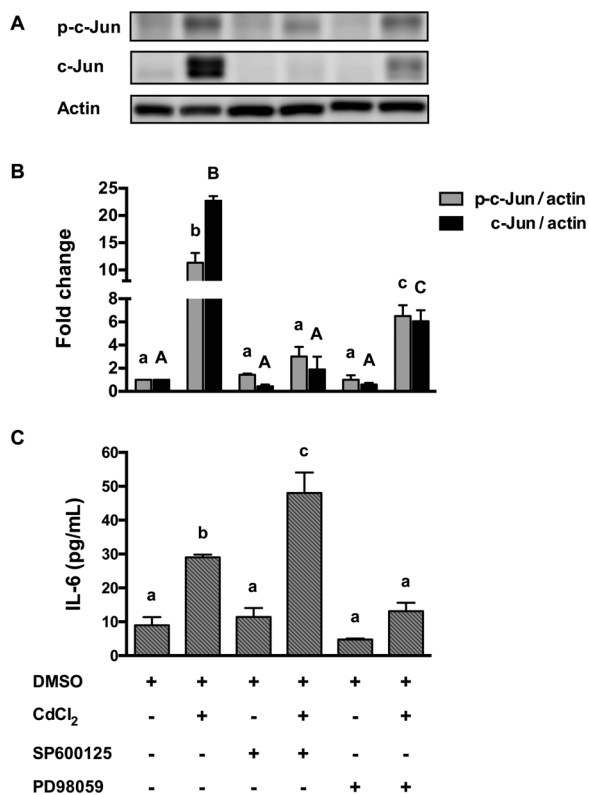


Fig. 4. Inhibition of ERK1/2 but not JNK suppressed Cd-induced IL-6 production in JEG-3 cells. JEG-3 cells were incubated with 2.5 μ M CdCl₂ in the absence or presence of signaling pathways inhibitors for 6 (A, B) and 24 (C) h. Total and phosphorylated c-Jun (A) levels were detected by Western blotting. β -actin was used as protein loading control. Quantitation of total and phosphorylated protein was performed by densitometry (B). The values are expressed as relative densitometric units with respect to control. IL-6 levels were quantified in culture media by ELISA. The results represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$), as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test. Lowercase letters are used for comparisons among p-c-Jun while uppercase letters are used to compare means among c-Jun (B).

In vivo studies in rat and mouse models have identified that Cd induces PE and PE-like symptoms through different mechanisms, including increased proinflammatory cytokines and angiotensin II type 1 receptor-agonistic autoantibodies production [13,45], as well as an enhanced oxidative DNA damage in the placenta [46]. Conversely, in vitro studies have shown that Cd up-regulates TGF- β and IL-8 in trophoblast cells [45,47]. Thus, our data contribute to identifying IL-6 as another molecule that possibly links Cd exposure with PE.

A previous report has shown that Cd up-regulates the expression of IL-6 mRNA in JEG-3 trophoblast cells [45]. Interestingly, our results demonstrate that this increased IL-6 mRNA expression is translated into increased secretion of IL-6 in these cells, although different Cd concentrations were used.

The primary sources of Cd exposure for the general population include food and tobacco smoke. Other minor sources are ambient air, drinking water, and contaminated soil or dust mainly in urban and industrial areas [1]. Cd accumulates in the liver and kidney; however, during gestation, it also accumulates in the placenta. Cd levels in human placenta tissue are 10- to 20-fold higher than in maternal blood [48]. In preeclamptic women, blood Cd levels range between 6.76 and 334.96 nM [13,15]. Thus, the concentrations used in this study are similar to those observed in preeclamptic women.

Although Cd is unable to generate free radicals directly, several studies have demonstrated that ROS production is increased after Cd exposure [35]. Indeed, incubation of JEG-3 trophoblast cells with Cd

resulted in enhanced, dose-dependent ROS production [47]. Reactive oxygen species generation has been linked to IL-6 secretion in several cells [49–51]; therefore, the role of ROS in Cd-induced IL-6 expression was investigated by using the ROS scavenger NAC. Our data demonstrated that Cd-induced IL-6 production was blocked by the pre-incubation of JEG-3 trophoblast cells with NAC. One possible mechanism by which Cd-induced ROS generation increases IL-6 secretion is by activating MAPKs [32,52,53]; therefore, ERK1/2 and JNK activation was studied by immunoblotting. Also, specific inhibitors for these signaling pathways were used to determine whether ERK1/2 and JNK play a role in Cd-induced IL-6 production in JEG-3 trophoblast cells. Our results showed increased phosphorylation of ERK1/2 and JNK after the exposure to Cd. Interestingly, inhibition of ERK1/2 pathway suppressed IL-6 production, while JNK inhibition enhanced IL-6 secretion. These data suggest opposite effects of these two signaling pathways in Cd-induced IL-6 production. It seems likely that JNK pathway activation plays an inhibitory role, whereas activation of ERK1/2 by Cd induces IL-6 production. The overall effect is an increased secretion of IL-6 in JEG-3 trophoblast cells stimulated by Cd.

Our data suggest that JNK activation could be an intracellular suppressor for Cd-induced IL-6 expression in trophoblast cells. This inhibitory effect of JNK on IL-6 production has been described previously in osteoblasts stimulated with IL-1 [54]. The underlying molecular mechanism has not been fully elucidated; however, it has been proposed that a cross-talk between JNK and a point between I κ B/NF κ B and AMPK signaling pathways is responsible for the suppression of IL-6 [54]. Further experiments are warranted to verify this hypothesis in trophoblast cells.

Additionally, c-Jun expression and phosphorylation were increased in JEG-3 trophoblast cells exposed to Cd. Since both total and phosphorylated protein levels were increased, western blot bands were normalized only against β -actin. These findings are congruent with previous reports that demonstrated that Cd induces c-Jun expression and activation in different cell types [55,56].

Pre-incubation of JEG-3 trophoblast cells with the ERK1/2 inhibitor partially reduced both c-Jun and p-c-Jun. In contrast, JNK inhibition completely blocks Cd-induced c-Jun expression and phosphorylation. These results support the idea that Cd-induced IL-6 occurs independently of c-Jun activation. Phosphorylation and nuclear translocation of ERK1/2 activate many downstream signaling molecules including specificity protein 1 (SP1), interferon regulatory factor 1 (IRF1), activating transcription factor-2 (ATF2), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and cAMP response element-binding (CREB), which are capable of inducing IL-6 production in various cells [57–60]. Therefore, we hypothesize that ERK1/2 might induce IL-6 expression by activating these signaling pathways. However, further studies are needed to confirm this hypothesis.

A limitation of the present study is that a human trophoblast-derived cell line was used to perform the experiments, so the data herein should be interpreted with reasonable caution and be further corroborated in primary trophoblast cultures or placental explants.

5. Conclusions

Cd-induced IL-6 production in JEG-3 trophoblast cells is mediated through the ERK1/2 pathway independent of c-Jun activation. NAC, which has antioxidant properties, was able to inhibit IL-6 secretion stimulated by Cd; therefore, we propose that dietary intake of antioxidants including resveratrol or vitamin C may be useful in the prevention of PE in pregnant women exposed to occupational or environmental Cd. Finally, although more studies are needed, we propose that IL-6 could be considered as another possible link between Cd exposure and PE.

Acknowledgements

Maria Lucero Paniagua Garcia was a graduate student in the Posgrado en Ciencias Biológicas at the Universidad Nacional Autónoma de México and was supported by a scholarship from the CONACYT, México (Num. 413084). This article is a partial fulfillment of the requirements for her PhD degree. We thank Dr. Miguel Arechavala-Velasco for his comments and critical review of this manuscript. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- [1] G.F. Nordberg, K. Nogawa, M. Nordberg, Cadmium, in: G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*, Elsevier, London, 2015, pp. 667–716.
- [2] F. Pinot, S.E. Kreps, M. Bachelet, P. Hainaut, M. Bakonyi, B.S. Polla, Cadmium in the environment: sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers, *Rev. Environ. Health* 15 (2000) 299–323.
- [3] L. Järup, A. Akesson, Current status of cadmium as an environmental health problem, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238 (2009) 201–208.
- [4] F. Thévenod, W.K. Lee, Toxicology of cadmium and its damage to mammalian organs, *Met. Ions Life Sci.* 11 (2013) 415–490.
- [5] S. Satarug, S.H. Garrett, M.A. Sens, D.A. Sens, Cadmium, environmental exposure, and health outcomes, *Environ. Health Perspect.* 118 (2010) 182–190.
- [6] B. Wang, Y. Du, Cadmium and its neurotoxic effects, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013 (2013) 898034.
- [7] A. Hartwig, Cadmium and cancer, *Met. Ions Life Sci.* 11 (2013) 491–507.
- [8] H. Wu, Q. Liao, S.N. Chillrud, Q. Yang, L. Huang, J. Bi, B. Yan, Environmental exposure to cadmium: health risk assessment and its associations with hypertension and impaired kidney function, *Sci. Rep.* 6 (2016) 29989.
- [9] M. Menai, B. Heude, R. Slama, A. Forhan, J. Sahuquillo, M.A. Charles, C. Yazbeck, Association between maternal blood cadmium during pregnancy and birth weight and the risk of fetal growth restriction: the EDEN mother-child cohort study, *Reprod. Toxicol.* 34 (2012) 622–627.
- [10] Z. Wang, H. Wang, Z.M. Xu, Y.L. Ji, Y.H. Chen, Z.H. Zhang, C. Zhang, X.H. Meng, M. Zhao, D.X. Xu, Cadmium-induced teratogenicity: association with ROS-mediated endoplasmic reticulum stress in placenta, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259 (2012) 236–247.
- [11] A.P. Sanders, B. Claus Henn, R.O. Wright, Perinatal and childhood exposure to cadmium, manganese, and metal mixtures and effects on cognition and behavior: a review of recent literature, *Curr. Environ. Health Rep.* 2 (2015) 284–294.
- [12] J.E. Laine, P. Ray, W. Bodnar, P.H. Cable, K. Boggess, S. Offenbacher, R.C. Fry, Placental cadmium levels are associated with increased preeclampsia risk, *PLoS One* 10 (2015) e0139341.
- [13] Q. Zhang, Y. Huang, K. Zhang, Y. Huang, Y. Yan, F. Wang, J. Wu, X. Wang, Z. Xu, Y. Chen, X. Cheng, Y. Li, J. Jiao, D. Ye, Cadmium-induced immune abnormality is a key pathogenic event in human and rat models of preeclampsia, *Environ. Pollut.* 218 (2016) 770–782.
- [14] H. Wang, L. Liu, Y.F. Hu, J.H. Hao, Y.H. Chen, P.Y. Su, Z. Yu, L. Fu, F.B. Tao, D.X. Xu, Association of maternal serum cadmium level during pregnancy with risk of preterm birth in a Chinese population, *Environ. Pollut.* 216 (2016) 851–857.
- [15] F. Wang, F. Fan, L. Wang, W. Ye, Q. Zhang, S. Xie, Maternal cadmium levels during pregnancy and the relationship with preeclampsia and fetal biometric parameters, *Biol. Trace Elem. Res.* 186 (2018) 322–329.
- [16] C. Antza, R. Cifkova, V. Kotsis, Hypertensive complications of pregnancy: a clinical overview, *Metabolism.* 86 (2018) 102–111.
- [17] I. Bellós, V. Karageorgiou, D. Kapnias, K.E. Karamanli, C. Siristatidis, The role of interleukins in preeclampsia: a comprehensive review, *Am. J. Reprod. Immunol.* 80 (2018) e13055.
- [18] J.M. Roberts, C.A. Hubel, The two stage model of preeclampsia: variations on the theme, *Placenta* 30 (Suppl. A) (2009) S32–7.
- [19] J.M. Roberts, The perplexing pregnancy disorder preeclampsia: What next? *Physiol. Genomics* 50 (2018) 459–467.
- [20] J.S. Gilbert, M.J. Ryan, B.B. LaMarca, M. Sedeek, S.R. Murphy, J.P. Granger, Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294 (2008) H541–50.
- [21] C.W. Redman, D.S. Tannetta, R.A. Dragovic, C. Gardiner, J.H. Southcombe, G.P. Collett, I.L. Sargent, Review: Does size matter? Placental debris and the pathophysiology of pre-eclampsia, *Placenta* 33 (Suppl) (2012) S48–54.
- [22] C. Xie, M.Z. Yao, J.B. Liu, L.K. Xiong, A meta-analysis of tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and interleukin-10 in preeclampsia, *Cytokine* 56 (2011) 550–559.
- [23] S.Y. Lau, S.J. Guild, C.J. Barrett, Q. Chen, L. McCowan, V. Jordan, L.W. Chamley, Tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and interleukin-10 levels are altered in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis, *Am. J. Reprod. Immunol.* 70 (2013) 412–427.
- [24] G. Gadonski, B.B. LaMarca, E. Sullivan, W. Bennett, D. Chandler, J.P. Granger, Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of interleukin 6, *Hypertension* 48 (2006) 711–716.
- [25] A.C. Harmon, D.C. Cornelius, L.M. Amaral, J.L. Faulkner, M.W. Cunningham, K. Wallace, B. LaMarca, The role of inflammation in the pathology of preeclampsia, *Clin. Sci. (Lond.)* 130 (2016) 409–419.
- [26] A. Jain, H. Schneider, E. Aliyev, F. Soydemir, M. Baumann, D. Surbek, M. Hediger, P. Brownbill, C. Albrecht, Hypoxic treatment of human dual placental perfusion induces a preeclampsia-like inflammatory response, *Lab. Invest.* 94 (2014) 873–880.
- [27] R.S. Bowen, Y. Gu, Y. Zhang, D.F. Lewis, Y. Wang, Hypoxia promotes interleukin-6 and -8 but reduces interleukin-10 production by placental trophoblast cells from preeclamptic pregnancies, *J. Soc. Gynecol. Investig.* 12 (2005) 428–432.
- [28] T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto, IL-6 in inflammation, immunity, and disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6 (2014) a016295.
- [29] J.W. Cho, K.S. Lee, C.W. Kim, Curcumin attenuates the expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α as well as cyclin E in TNF- α -treated HaCaT cells; NF- κ B and MAPKs as potential upstream targets, *Int. J. Mol. Med.* 19 (2007) 469–474.
- [30] R. Hayashi, N. Yamashita, S. Matsui, T. Fujita, J. Araya, K. Sassa, N. Arai, Y. Yoshida, T. Kashii, M. Maruyama, E. Sugiyama, M. Kobayashi, Bradykinin stimulates IL-6 and IL-8 production by human lung fibroblasts through ERK- and p38 MAPK-dependent mechanisms, *Eur. Respir. J.* 16 (2000) 452–458.
- [31] S. Phuagkhaopong, D. Ospondant, T. Kasemsuk, N. Sibmooch, S. Soodvilai, C. Power, P. Vivithanaporn, Cadmium-induced IL-6 and IL-8 expression and release from astrocytes are mediated by MAPK and NF- κ B pathways, *Neurotoxicology* 60 (2017) 82–91.
- [32] M. Sano, K. Fukuda, T. Sato, H. Kawaguchi, M. Suematsu, S. Matsuda, S. Koyasu, H. Matsui, K. Yamauchi-Takahara, M. Harada, Y. Saito, S. Ogawa, ERK and p38 MAPK, but not NF- κ B, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts, *Circ. Res.* 89 (2001) 661–669.
- [33] Y.D. Shaul, R. Seger, The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions, *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (2007) 1213–1226.
- [34] J.S. Arthur, S.C. Ley, Mitogen-activated protein kinases in innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 679–692.
- [35] A. Cuypers, M. Plusquin, T. Remans, M. Jozefczak, E. Keunen, H. Gielen, K. Opendakker, A.R. Nair, E. Munters, T.J. Artois, T. Nawrot, J. Vangronsveld, K. Smeets, Cadmium stress: an oxidative challenge, *Biomaterials* 23 (2010) 927–940.
- [36] Y. Son, S. Kim, H.T. Chung, H.O. Pae, Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases, *Methods Enzymol.* 528 (2013) 27–48.
- [37] I. Ali, P. Damdimopoulou, U. Stenius, K. Halldin, Cadmium at nanomolar concentrations activates Raf-MEK-ERK1/2 MAPKs signaling via EGFR in human cancer cell lines, *Chem. Biol. Interact.* 231 (2015) 44–52.
- [38] C. Xu, X. Wang, Y. Zhu, X. Dong, C. Liu, H. Zhang, L. Liu, S. Huang, L. Chen, Rapamycin ameliorates cadmium-induced activation of MAPK pathway and neuronal apoptosis by preventing mitochondrial ROS inactivation of PP2A, *Neuropharmacology* 105 (2016) 270–284.
- [39] M. Freitas, E. Fernandes, Zinc, cadmium and nickel increase the activation of NF- κ B and the release of cytokines from THP-1 monocytic cells, *Metallomics* 3 (2011) 1238–1243.
- [40] V. Souza, M.C. Escobar Md, L. Gómez-Quiroz, L. Bucio, E. Hernández, E.C. Cossio, M.C. Gutiérrez-Ruiz, Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells, *Toxicology* 197 (2004) 213–228.
- [41] G. Griesinger, L. Saleh, S. Bauer, P. Husslein, M. Knöfler, Production of pro- and anti-inflammatory cytokines of human placental trophoblasts in response to pathogenic bacteria, *J. Soc. Gynecol. Investig.* 8 (2001) 334–340.
- [42] D. Chou, Y. Ma, J. Zhang, C. McGrath, S. Parry, Cytomegalovirus infection of trophoblast cells elicits an inflammatory response: a possible mechanism of placental dysfunction, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194 (2006) 535–541.
- [43] Y.Q. Koh, H.W. Chan, M.D. Nitert, K. Vaswani, M.D. Mitchell, G.E. Rice, Differential response to lipopolysaccharide by JEG-3 and BeWo human chorionic carcinoma cell lines, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 175 (2014) 129–133.
- [44] T. Olszowski, I. Baranowska-Bosiacka, I. Gutowska, D. Chlubek, Pro-inflammatory properties of cadmium, *Acta Biochim. Pol.* 59 (2012) 475–482.
- [45] J. Hu, H. Wang, Y.F. Hu, X.F. Xu, Y.H. Chen, M.Z. Xia, C. Zhang, D.X. Xu, Cadmium induces inflammatory cytokines through activating Akt signaling in mouse placenta and human trophoblast cells, *Placenta* 65 (2018) 7–14.
- [46] X. Zhang, Z. Xu, F. Lin, F. Wang, D. Ye, Y. Huang, Increased oxidative DNA damage in placenta contributes to cadmium-induced preeclamptic conditions in rat, *Biol. Trace Elem. Res.* 170 (2016) 119–127.
- [47] O.A. Adebambo, D. Shea, R.C. Fry, Cadmium disrupts signaling of the hypoxia-inducible (HIF) and transforming growth factor (TGF- β) pathways in placental JEG-3 trophoblast cells via reactive oxygen species, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 342 (2018) 108–115.
- [48] M.D. Esteban-Vasallo, N. Aragonés, M. Pollan, G. López-Abente, B. Perez-Gomez, Mercury, cadmium, and lead levels in human placenta: a systematic review, *Environ. Health Perspect.* 120 (2012) 1369–1377.
- [49] Y. Zhao, P.V. Usatyuk, I.A. Gorshkova, D. He, T. Wang, L. Moreno-Vinasco, A.S. Geyh, P.N. Breyse, J.M. Samet, E.W. Spannake, J.G. Garcia, V. Natarajan, Regulation of COX-2 expression and IL-6 release by particulate matter in airway epithelial cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40 (2009) 19–30.
- [50] Y.V. Gowrisankar, M.A. Clark, Angiotensin II induces interleukin-6 expression in astrocytes: role of reactive oxygen species and NF- κ B, *Mol. Cell. Endocrinol.* 437 (2016) 130–141.
- [51] Y.S. Ryu, K.A. Kang, M.J. Piao, M.J. Ahn, J.M. Yi, Y.M. Hyun, S.H. Kim, M.K. Ko, C.O. Park, J.W. Hyun, Particulate matter induces inflammatory cytokine production via activation of NF κ B by TLR5-NOX4-ROS signaling in human skin keratinocyte and mouse skin, *Redox Biol.* 21 (2018) 101080.
- [52] Y. Son, Y.K. Cheong, N.H. Kim, H.T. Chung, D.G. Kang, H.O. Pae, Mitogen-activated

- protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways, *J. Signal Transduct.* 2011 (2011) 792639.
- [53] G.S. Youn, K.W. Lee, S.Y. Choi, J. Park, Overexpression of HDAC6 induces pro-inflammatory responses by regulating ROS-MAPK-NF- κ B/AP-1 signaling pathways in macrophages, *Free Radic. Biol. Med.* 97 (2016) 14–23.
- [54] A. Kondo, T. Otsuka, R. Matsushima-Nishiwaki, G. Kuroyanagi, J. Mizutani, I. Wada, O. Kozawa, H. Tokuda, Inhibition of SAPK/JNK leads to enhanced IL-1-induced IL-6 synthesis in osteoblasts, *Arch. Biochem. Biophys.* 535 (2013) 227–233.
- [55] P. Jin, N.R. Ringertz, Cadmium induces transcription of proto-oncogenes c-jun and c-myc in rat L6 myoblasts, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 14061–14064.
- [56] W.E. Achanzar, K.B. Achanzar, J.G. Lewis, M.M. Webber, M.P. Waalkes, Cadmium induces c-myc, p53, and c-jun expression in normal human prostate epithelial cells as a prelude to apoptosis, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164 (2000) 291–300.
- [57] L.M. Tuyt, W.H. Dokter, K. Birkenkamp, S.B. Koopmans, C. Lummen, W. Kruijer, E. Vellenga, Extracellular-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and c-Jun are involved in NF-kappa B-dependent IL-6 expression in human monocytes, *J. Immunol.* 162 (1999) 4893–4902.
- [58] A.M. Reimold, J. Kim, R. Finberg, L.H. Glimcher, Decreased immediate inflammatory gene induction in activating transcription factor-2 mutant mice, *Int. Immunol.* 13 (2001) 241–248.
- [59] Y.C. Chan, P.S. Leung, Involvement of redox-sensitive extracellular-regulated kinases in angiotensin II-induced interleukin-6 expression in pancreatic acinar cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 329 (2009) 450–458.
- [60] T. Tanaka, M. Narazaki, K. Masuda, T. Kishimoto, Regulation of IL-6 in immunity and diseases, in: X. Ma (Ed.), *Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases*, Advances in Experimental Medicine and Biology, 941 Dordrecht, 2016, pp. 79–88.