DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

LA EXPOSICIÓN A CADMIO EXACERBA LA HIPERLIPIDEMIA EN
HEPATOCITOS CON SOBRECARGA DE COLESTEROL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
DIANA PATRICIA ROSALES CRUZ

Comité Tutorial:

DIRECTORA DE TESIS: DRA. VERÓNICA SOUZA ARROYO

ASESORA: DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUÍZ

ASESOR: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Durante el transcurso del Doctorado en Biología Experimental, en la UAM-Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONACYT, con un número de becario/CVU 283740/405050, en el periodo 2014-2018.

El trabajo de investigación fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por medio del proyecto con clave Conacyt-Sep. CB-2008-10619 y Fronteras de la Ciencia 1320.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis titulada:

"La exposición a cadmio exacerba la hiperlipidemia en hepatocitos con sobrecarga de colesterol", que presentó

Maestra en Biología Experimental Diana Patricia Rosales Cruz

El día 07 de Septiembre del año 2018

SINODALES

PRESIDENTA

Dra. Leticia Bucio Ortiz.
Departamento de Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana.
Ciudad de México.

SECRETARIO

Dr. Emilio Rojas del Castillo
Departamento de Medicina
Genómica y Toxicología
Ambiental.
Universidad Nacional Autónoma
de México.
Ciudad de México.

VOCAL

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano
Departamento de Toxicología
Reproductiva.
Universidad Nacional Autónoma
de México.
Ciudad de México.

VOCAL

Dra. Mayra Domínguez Pérez
Laboratorio de Genómica de
Enfermedades Cardiovasculares.
Instituto Nacional de Medicina
Genómica.
Ciudad de México.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA DE TESIS:

Doctora Verónica Souza Arroyo
Profesor Titular C, Tiempo Completo
Laboratorio de Fisiología Celular
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
veso@xanum.uam.mx

ASESORA:

Doctora María Concepción Gutiérrez Ruíz
Profesor Titular C, Tiempo Completo
Laboratorio de Fisiología Celular
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mcgr@xanum.uam.mx

ASESOR:

Doctor Emilio Rojas Del Castillo
Investigador Titular C, Tiempo Completo
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
emilior@servidor.unam.mx

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma Metropolitana, mi alma máter, mi casa abierta al tiempo, que me cobijó durante el desarrollo de un posgrado con excelente nivel educativo. Gracias por todo mi querida UAM-I, sigue inspirándonos a ser mejores personas, y mejores ciudadanos al servicio de nuestro país.

Agradezco a mi comité tutorial, Dra. Vero Souza, Dra. Conchita Gutiérrez y Dr. Emilio Rojas, por siempre estar atentos y darle dirección al proyecto de investigación.

Gracias a los doctores que aceptaron ser parte del jurado en el examen de grado, Dr. Mario Altamirano, Dra. Mayra Domínguez y Dra. Lety Bucio, por aportar su tiempo, conocimientos y experiencia profesional a la revisión de mi tesis.

Gracias a los miembros del laboratorio por todas las experiencias compartidas durante este tiempo.

De forma muy especial, quiero agradecer a mis hijas de proyecto de investigación, Caro y Becky, porque me permitieron transmitir el conocimiento que adquirí durante el posgrado e impulsar el término de su Licenciatura, al mismo tiempo, me enseñaron mucho de la academia y la vida. Las llevo en el corazón.

Gracias Ely, porque siempre has sido incondicional conmigo, tus consejos de la vida y la academia me han ayudado a llegar hasta aquí. Platicar y reír contigo siempre me reinicia la vida, te quiero mucho.

Gracias Mayra, porque tu apoyo y amistad son recompensas que obtuve en este posgrado sin buscarlas, las atesoro muchísimo y espero conservarlas por siempre.

Gracias Soraita, desde el principio formamos un excelente equipo de trabajo, pero aún más importante nació una amistad maravillosa que me ha permitido conocerte y vivir muchos de los momentos más felices del posgrado.

Gracias Cris, por compartir tu experiencia personal y profesional y por todas tus ocurrencias que hicieron el trabajo de laboratorio muy ameno.

Gracias Oscar, por ser mi cómplice en esta aventura del posgrado y andar vuelto loco a mi lado con tanto trámite, porque siempre me echas porras y por tu amistad.

Gracias Sha y Jhon por confiar en mí desde el primer momento y permitirme ayudarlos en todo lo que he podido, por dejarme conocerlos y tener su amistad, son personas increíbles, espero que sigamos compartiendo momentos profesionales y personales.

Gracias a todas las personas, que tal vez sin saberlo, aportaron un granito de arena en mi desarrollo profesional y personal a lo largo del Doctorado.

Dedicatorias

A mis padres, María Guadalupe y Eliazer por cuidar de mí siempre, porque su amor me ha llevado por un camino iluminado en todo momento, por sentirse orgullosos de la persona en la que me he convertido. Los amo infinitamente.

A mi hermana Jaqueline, porque gracias a tu confianza y compañía siento que puedo lograr lo que sea, siempre serás mi inspiración. No dejes de alegrarme los días.

A mi sobrino Oliver, mi alegría de vivir, porque vale la pena cada esfuerzo realizado con tal de enseñarte el mundo entero.

A Eduardo, el amor de mi vida, sin tu confianza en mí y tu apoyo en todo momento este camino hubiera parecido interminable. Dame la mano y vamos a darle la vuelta al mundo, te amo.

A mis abuelos Enrique y María Teresa, Francisco y Alba, a todos mis tíos, tías primas y primos, a mis padrinos Leo y Celia que siempre me alentaron a seguir adelante, aplaudieron mis triunfos y estuvieron a mi lado en los fracasos.

A los que me recibieron y me permitieron ser parte de otra familia, mis suegros Rubén y Virginia, mi cuñado Rubén. Esta alegría está en el corazón al igual que ustedes. A mi cuñada Trini, por compartir tus experiencias, consejos y apoyarme siempre, te quiero mucho.

A mis amigos Aimeé y Mickey, porque son la familia que elegí y estaré para ustedes como lo han hecho por mí, sin importar nada. Los quiero.

Nada en este mundo debe ser temido, solo entendido.

*Ahora es el momento de comprender más, para poder
temer menos.*

Marie Curie

RESUMEN

Los factores metabólicos son el mayor riesgo en la enfermedad del hígado graso no alcohólico, aunque también otros factores pueden contribuir a la esteatosis. La exposición a cadmio produce cambios histopatológicos y moleculares en el hígado, que son consistentes con esteatosis. En este estudio, describimos el efecto del tratamiento agudo de bajas dosis de cadmio en hepatocitos obtenidos de ratones alimentados con una dieta alta en colesterol.

Nuestros datos sugieren que los hepatocitos con sobrecarga de colesterol promueven una respuesta adaptativa contra la toxicidad aguda inducida por el cadmio, a través de incrementar proteínas anti-apoptóticas, controlar la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, aumentar la síntesis de glutatión y el contenido de metalotioneína II para evitar la oxidación de proteínas.

El tratamiento con cadmio incrementa el contenido de lípidos en los hepatocitos de ratones alimentados con la dieta alta en colesterol ya que la autofagia se encuentra impedida.

Así, nuestros datos sugieren una función esencial de la macroautofagia en la regulación del almacenamiento de lípidos inducido por cadmio en hepatocitos, e implica que las alteraciones en esta vía pueden ser un mecanismo que agrave la esteatosis hepática.

ABSTRACT

Metabolic factors are the major risk of non-alcoholic fatty liver disease, although other factors may contribute steatosis. Cadmium exposure produces histopathological and molecular changes in liver, which are consistent with steatosis. In the present study, we describe the effect of low cadmium acute treatment on hepatocytes obtained from mice fed with a high cholesterol diet.

Our data suggest that hepatocytes with cholesterol overload promote an adaptive response against cadmium-induced acute toxicity by up-regulating anti-apoptotic proteins, managing ROS overproduction, increasing GSH synthesis and MT-II content to avoid protein oxidation.

Cadmium treatment increases lipid content in cholesterol-fed mice hepatocytes because of an impaired autophagy process.

Our data suggest an essential function of macroautophagy in the regulation of lipid storage induced by cadmium on hepatocytes and implies, that alterations in this pathway may be a mechanism that aggravates hepatic steatosis.

ÍNDICE

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO	2
1.2 EPIDEMIOLOGÍA	3
1.3 ESTUDIOS CELULARES Y MOLECULARES	4
1.4 CADMIO	6
1.5 ESTRÉS OXIDANTE	8
1.6 CADMIO E HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO	9
1.7 AUTOFAGIA COMO RESPUESTA CELULAR	10
2. ANTECEDENTES	12
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
5. HIPÓTESIS	17
6. OBJETIVOS	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS	18
7.1 TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES	18
7.2 OBTENCIÓN DE CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATÓN	19
7.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	19
7.4 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR CRISTAL VIOLETA	20
7.5 DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS NEUTROS POR LA INCORPORACIÓN DE ACEITE ROJO O	21
7.6 DETERMINACIÓN DE LA GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	21
7.7 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS OXIDADAS POR OXYBLOT	22
7.8 CONTENIDO DE GLUTATIÓN	22

7.9 DETERMINACIÓN DE COLESTEROL LIBRE CON TINCIÓN POR FILIPINA Y CUANTIFICACIÓN.	23
7.10 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.	24
7.11 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.....	24
7.12 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOT.....	25
7.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	27
8. RESULTADOS	28
8.1 LA DIETA ALTA EN COLESTEROL INDUCE ESTEATOSIS Y DAÑO HEPÁTICO	28
8.2 CONFIRMACIÓN DE SOBRECARGA DE COLESTEROL EN HEPATOCITOS	30
8.3 LOS HEPATOCITOS HC MUESTRAN RESISTENCIA A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR EL CADMIO.	32
8.4 LOS HEPATOCITOS HC INCREMENTAN Y SOSTIENEN LA PRODUCCIÓN DE ERO EN RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN CON CADMIO.....	35
8.5 LOS HEPATOCITOS HC CONTROLAN LA SOBREPDUCCIÓN DE ERO BAJO LA EXPOSICIÓN A CADMIO.	37
8.6 EL CADMIO INCREMENTA EL CONTENIDO DE LÍPIDOS Y DE COLESTEROL LIBRE EN HEPATOCITOS PRIMARIOS.	41
8.7 EL CADMIO DISMINUYE LA AUTOFAGIA EN HEPATOCITOS CON SOBRECARGA DE COLESTEROL.	44
8.8 EL CADMIO ALTERA LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN HEPATOCITOS CON SOBRECARGA DE COLESTEROL.	48
9. DISCUSIÓN.....	53
10. CONCLUSIÓN.....	67
11. REFERENCIAS	68

1. Introducción

En décadas recientes, los hábitos dietéticos han cambiado progresivamente, dirigiéndose al consumo de alimentos bajos en nutrientes y con alto contenido de azúcar y grasas, lo que también se ha visto asociado con una disminución en la actividad física. Estos factores han tenido como consecuencia el incremento en la prevalencia de enfermedades metabólicas debidas a un desbalance energético.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en México la transición epidemiológica hacia enfermedades crónicas degenerativas afecta a la sociedad e impacta significativamente al Sistema de Salud. Nuestro país tiene una de las mayores prevalencias de obesidad y sobrepeso infantil en el mundo y más de 70% de los adultos tiene sobrepeso (OMS,2016). Esta condición es un factor de riesgo que conduce al desarrollo de patologías que destacan en los primeros lugares de mortalidad como diabetes, enfermedades cardiovasculares y hepáticas afectando gravemente la calidad de vida (OPS,2012).

Particularmente, los desórdenes hepáticos son la cuarta causa de muerte en México con más de 28,000 casos conocidos hasta 2010 (Salud,2010). Posteriormente, en 2014 se encontró que el hígado graso no alcohólico (HGNA) representó el 75% de todas las enfermedades hepáticas crónicas (IMSS,2014).

La historia natural del HGNA contempla una progresión en el daño que puede verse acelerada en presencia de factores ambientales o genéticos que promuevan el daño celular (Schwenger and Allard,2014).

Es por ello que estudiar y conocer las alteraciones celulares bajo estas condiciones, nos permitirá tener alcances clínicos más claros en materia de prevención y control de esta enfermedad.

1.1 Hígado Graso No Alcohólico

El HGNA es la causa de enfermedad hepática más común a nivel mundial, con una prevalencia del 15-30% en poblaciones occidentales (Calzadilla and Adams,2016), mientras que se ha observado un incremento substancial en niños y adolescentes las últimas dos décadas con una prevalencia de 40-70% (Conjeevaram *et al.*,2018).

El HGNA se define como la presencia de grasa en más del 5% de los hepatocitos demostrada por ultrasonido o histológicamente, en ausencia de ingesta de alcohol, enfermedad hepática viral, metabólica o autoinmune (Kleiner and Makhlof,2016). Esta condición comprende un espectro clínico-patológico que va desde la simple acumulación de grasa, también conocida como esteatosis, hacia grados variables de necroinflamación, lo que se conoce como esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), eventualmente lleva hacia fibrosis, cirrosis y hasta hepatocarcinoma celular (HCC) (Brown and Kleiner,2016). Aunque la progresión es más común y agresiva en adultos ya se han reportado casos de fibrosis e incluso cirrosis en niños con HGNA (Conjeevaram *et al.*,2018).

El diagnóstico de HGNA se sospecha en individuos obesos, diabéticos o con síndrome metabólico, sin embargo la mayoría de los pacientes son asintomáticos y la condición se detecta mediante un ultrasonido que detecta la presencia de grasa hepática o por un examen sanguíneo de rutina que muestra una elevación

inusual en las transaminasas (Schwenger and Allard,2014). Derivado de los estudios en pacientes, se conoce que el 25% de los adultos con hígado graso tienen esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), determinado a través de los niveles séricos de las transaminasas hepáticas que se incrementan en ausencia de otras lesiones. Un cociente ALT/AST a favor de ALT caracteriza a la EHNA, mientras que un cociente AST/ALT a favor de AST es encontrado en esteatohepatitis con cirrosis (Andronescu *et al.*,2018).

1.2 Epidemiología

En comparación con décadas pasadas, la prevalencia de HGNA se incrementó de 2.8% a 46% asociada a la epidemia de obesidad y diabetes mellitus mundial. La prevalencia de HGNA en autopsias, fue de 36% en pacientes no obesos comparado con 72% de obesos, al mismo tiempo se encontró una prevalencia de EHNA de 2.7% para no obesos y 18.5% para pacientes obesos (Corrado *et al.*,2014). Es importante notar que la progresión de esta enfermedad es asintomática, ya que aproximadamente 5% de los pacientes que mostraron evidencia de HGNA fueron diagnosticados con EHNA avanzada la cual se asocia a mortalidad por cirrosis (Miyake *et al.*,2013).

Diversos estudios sugieren que la etnicidad juega un papel importante en el desarrollo de HGNA, siendo los hispanos la población con mayor riesgo, seguida de los caucásicos y después los afroamericanos (Corrado *et al.*,2014). El HGNA es más frecuente en los hombres, teniendo una proporción de 68% en los Estados Unidos. Se han encontrado diferencias significativas en la edad según la raza para la aparición de HGNA siendo los México-Americanos en quienes se presenta a

menor edad (36.7 años), en comparación con los caucásicos no hispanos (43.1 años) y los negros no hispanos (39.5 años) (Schneider *et al.*,2014).

En la población general, la progresión de HGNA a EHNA fue de un 10-20%, mientras que de HGNA a cirrosis fue de 0 a 4% en un periodo de 10 a 20 años. El avance de EHNA a cirrosis fue del 3 a 15% en el curso de 10 a 20 años y de insuficiencia hepática con cirrosis fue de 38-45% después de 7-10 años, finalmente el desarrollo de hepatocarcinoma derivado de cirrosis es de un 2-5% por año (Chalasani *et al.*,2012).

1.3 Estudios celulares y moleculares

La esteatosis hepática se define como la acumulación de gotas lipídicas, que más que ser depósitos inertes están ganando reconocimiento como organelos que tienen funciones importantes más allá del almacenamiento de lípidos en los hepatocitos. La composición de lípidos y proteínas de las gotas lipídicas es muy dinámica y tiene influencia sobre sus propiedades metabólicas y de señalización, lo que al mismo tiempo se relaciona con los cambios en la función hepática (Mashek *et al.*,2015).

Diversos estudios han caracterizado el proteoma de las gotas lipídicas en varios tejidos y tipos celulares, pero las de origen hepático están siendo exploradas apenas en años recientes. Los estudios enfocados a la caracterización de estos organelos se han realizado en muestras de humanos con HGNA y en modelos murinos, revelando que la mayoría de las proteínas en las gotas lipídicas no están involucradas en el metabolismo de lípidos neutros, no obstante, tienen participación en otros procesos como señalización celular, tráfico membranal y

metabolismo de esteroides, proteínas y carbohidratos (Crunk *et al.*,2013, Su *et al.*,2014). Existe evidencia que sugiere la participación de proteínas específicas de las gotas lipídicas en la progresión del HGNA hacia EHNA, algunos estudios han señalado el incremento de proteínas antagonistas de la lipólisis como PLN1 y PLN2 en EHNA (Straub *et al.*,2008), mientras que en fibrosis existe una reducción significativa de la actividad hidrolítica (Guo *et al.*,2013).

Es de importancia señalar que se ha reportado que la composición lipídica de las gotas puede contribuir en la progresión de EHNA, un dato relevante es que el colesterol libre se encuentra en forma de cristales en las gotas lipídicas de muestras de EHNA de humanos y ratones, pero están ausentes en sujetos con esteatosis simple (Ioannou *et al.*,2013).

Con todo esto, la evidencia fisiológica señala que el contenido de las gotas lipídicas tienen un papel fundamental en el desarrollo y progresión del HGNA, por lo que resulta de gran importancia el estudio de su comportamiento.

Por otro lado, uno de los factores que más se ha asociado con la patogénesis del HGNA es la reducción en la secreción de insulina, acoplada a la insensibilidad a la insulina. Esta hormona regula los niveles de glucosa en la sangre manteniendo la síntesis de glucógeno durante la alimentación y restringiendo la producción hepática de glucosa durante el ayuno. La resistencia a la insulina está íntimamente ligada a la hiperinsulinemia, que a su vez estimula la lipogénesis hepática que resulta en esteatosis. Así, el aumento de diferentes especies lipídicas en el hígado provoca inflamación o estrés de retículo endoplásmico

activando numerosas cascadas de señalización que favorecen la progresión del daño (Titchenell *et al.*,2017).

Si bien, las vías de señalización afectadas por la acumulación de grasa en el hígado son diversas, una de las consecuencias mejor documentadas es la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), que se han propuesto como moduladoras de diversos receptores nucleares que actúan como sensores redox y juegan un papel fundamental en la homeostasis lipídica durante la patogénesis del HGNA (Serviddio *et al.*,2013). Es así, que la progresión del HGNA se define como un proceso multifactorial que incluye alteraciones del metabolismo lipídico, disfunción mitocondrial, inflamación y estrés oxidante (Rolo *et al.*,2012); entonces, el avance del HGNA hacia estados más graves de la enfermedad hepática, puede verse favorecido en presencia de algún factor que promueva alguna o todas estas alteraciones.

1.4 Cadmio

El cadmio (Cd) es un metal pesado no esencial y tóxico para los seres vivos que induce estrés oxidante y que se ha asociado al desarrollo de HGNA (Hyder *et al.*,2013). Se trata de un metal que se encuentra en la corteza terrestre, en combinación con otros metales formando cloruros, sulfuros u óxidos (Martínez-Flores *et al.*,2013b). Es ampliamente usado en la manufactura de baterías, estabilizadores, pigmentos, y recientemente ha sido encontrado en cantidades significativas en bisutería e incluso como pigmento en cosméticos (Bocca *et al.*,2014). Coexiste con hierro, zinc y cobre en varios productos y su liberación al ambiente ocurre paralelamente a la liberación de otros metales (Farkas *et*

al.,2007).

La principal fuente de exposición al Cd para la población en general, es la ingesta de agua y alimentos contaminados, como las especies marinas llamadas filtradoras (almejas y mejillones) que atrapan cantidades considerables de metales pesados (Ololade *et al.*,2011). Aproximadamente el 70% del Cd ingerido es absorbido por el organismo, sin embargo, este porcentaje se modifica en personas fumadoras, debido a que cada cigarro puede contener entre 1-2 µg del metal. Un estudio realizado en México determinó que cada cigarrillo contiene 2.8 µg de Cd lo que significa un riesgo aún mayor, considerando al mismo tiempo que entre el 40-60% del Cd que se inhala pasa a través del epitelio pulmonar hacia la circulación sistémica (Storelli,2009).

En humanos y otros mamíferos, el Cd afecta varios órganos y tejidos, incluyendo hígado, riñón, pulmón, páncreas y huesos. Sin embargo, inicialmente se acumula en el hígado en donde forma complejos con varias moléculas que tienen grupos tioles (SH) como el glutatión (GSH) y la metalotioneína (MT), explicando así su larga vida media en el organismo, que se estima entre 20-25 años, característica que lo hace particularmente tóxico (Dai *et al.*,2013).

El Cd se une a los grupos sulfhidrilo de las proteínas y del GSH, por lo que está asociado con cambios en el estado redox de la célula. La exposición al Cd se ha vinculado con varios tipos de cáncer, por ello la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) lo ha clasificado como carcinogénico clase I y la

Ley de Respuesta Ambiental, Compensación y Responsabilidad (CERCLA) lo ha enumerado como el 7 de una lista de 275 de materiales peligrosos (EFSA,2013).

1.5 Estrés Oxidante

La entrada de Cd a las células no es igual en todos los sistemas y puede ser mediada por transporte pasivo o activo o por canales de calcio. Se considera que uno de los mecanismos de toxicidad generados por este metal es un estado pro-oxidante, influenciado por la producción de ERO, las que al mismo tiempo pueden actuar como segundos mensajeros alterando diferentes vías de señalización (Souza *et al.*,1996).

Dentro de los mecanismos involucrados en la toxicidad aguda de Cd se ha sugerido la disminución de la síntesis de glutatión y de grupos SH de unión a proteínas, resultando en una sobreproducción de ERO como anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot OH$) que producen oxidación de proteínas, lipoperoxidación y dañan el material genético (Liu *et al.*,2009).

Se ha considerado que la hepatotoxicidad aguda inducida por Cd involucra dos posibles vías, primero, mecanismos de daño a los hepatocitos incluyendo la unión del Cd a los grupos sulfhidrilo, lo que resulta en pérdida de la permeabilidad mitocondrial con su consecuente disfunción e incremento del estrés oxidante. Por otro lado, un daño secundario mediado por un proceso inflamatorio vía activación de las células de Kupffer y la liberación de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias (Matovic *et al.*,2015).

1.6 Cadmio e Hígado Graso No Alcohólico

La exposición al Cd, se ha asociado al desarrollo de la HGNA pero el mecanismo molecular no se conoce con exactitud, aún así es claro que múltiples factores participan , entre ellos el estrés oxidante y la desregulación del metabolismo de lípidos (Hyder *et al.*,2013).

A pesar de que no hay muchas investigaciones que reporten directamente una asociación de la esteatosis con la exposición al cadmio y los posibles efectos del metal bajo esta condición, se considera que una de las principales vías de exposición de la población al Cd es a través del humo del cigarro (Hughes *et al.*,2009).

Existen estudios donde se demuestra una asociación entre la incidencia de fumar con la progresión de HGNA en la población (Liu *et al.*,2013b). En ratas obesas, se observó que el humo de cigarro causa estrés oxidante e incrementa la severidad de HGNA (Azzalini *et al.*,2010). Así mismo, en ratones con una dieta rica en grasa y en células hepáticas expuestas al humo de tabaco, se demostró un incremento de lípidos en el hígado debido a la modulación de la actividad de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c (SREBP-1c) (Yuan *et al.*,2009).

Estudios más directos de exposición a Cd reportan que, en ratas tratadas con este metal se incrementan significativamente los triglicéridos séricos, el colesterol total y se disminuye el colesterol esterificado en el hígado, concluyendo que el Cd favorece la progresión de esteatosis (Larregle *et al.*,2008). Por otro lado, el grupo de Hyder y colaboradores en 2013, examinó el impacto de la exposición al Cd en

humanos, y encontró una asociación entre los niveles altos de Cd en la orina con enzimas marcadoras de necroinflamación (Hyder *et al.*,2013).

Estudios recientes señalan que en ratones expuestos a concentraciones bajas del metal (10mg/L) en el agua de beber, se observó una acumulación hepática de Cd de hasta 10 veces mayor que en los controles y cambios en varios genes involucrados en rutas metabólicas clave, como el metabolismo de lípidos, apoptosis y la fosforilación oxidativa mitocondrial (Go *et al.*,2015).

1.7 Autofagia como respuesta celular

Existen varios mecanismos de defensa involucrados en la protección celular contra el estrés oxidante, entre los cuales están la sobreexpresión de enzimas antioxidantes, la remoción de proteínas específicas por el sistema de ubiquitin-proteosoma, así como la eliminación de proteínas y organelos dañados por autofagia. La autofagia es una vía lisosomal evolutivamente conservada, responsable de degradar proteínas citoplasmáticas, macromoléculas y organelos (Wang *et al.*,2015). Existen reportados hasta ahora, tres tipos de autofagia: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas y microautofagia. En la macroautofagia, organelos enteros como mitocondrias, gotas lipídicas o agregados de grandes de proteínas son secuestrados en una estructura de doble membrana conocida como autofagosoma (Czaja,2016).

La formación de autofagosomas, es regulada por varias moléculas y complejos, entre ellas la activación de p62 que conduce al reclutamiento de la proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos (LC-3) y de los genes relacionados a

autofagia (Atg's), ambos, constituyentes principales de la membrana externa de los autofagosomas (Gonzalez-Rodriguez *et al.*,2014).

Dentro de los estudios moleculares de la autofagia, se han establecido criterios que permiten señalar el inicio y término del proceso, así, el incremento de p62 y de la isoforma II de la proteína LC-3 marcan el inicio de la autofagia. Cuando la autofagia se ha llevado acabo de manera exitosa, la señal de p62 debe desaparecer, de lo contrario habría una autofagia constante que llevaría a la muerte celular, entonces, la acumulación de p62 a través del tiempo puede interpretarse como un defecto en el proceso autofágico (Klionsky and Zughaier,2016).

Un estudio clínico demostró que la autofagia está disminuida tanto en hígado de pacientes con HGNA como en hepatocitos humanos con sobrecarga de lípidos, y esa disminución puede elevar el estrés de retículo endoplásmico favoreciendo la apoptosis (Gonzalez-Rodriguez *et al.*,2014).

La implicación de la autofagia en el metabolismo lipídico del hepatocito, ha sido recientemente estudiada. En humanos, las alteraciones en la autofagia pueden tener un papel importante en HGNA, ya que la deficiencia en el flujo autofágico de hepatocitos no sólo promueve la esteatosis, si no que también favorece la progresión hacia EHNA (Czaja,2016).

Los efectos de la exposición a Cd sobre la autofagia son diversos y dependen de factores como el tipo celular, la concentración y el tiempo de exposición al metal (Templeton and Liu,2010). Sin embargo, se ha encontrado que la inhibición de la

autofagia inducida por el Cd se asocia con disfunción mitocondrial que agudiza la neurodegeneración (Wang *et al.*,2016).

En escenarios más peligrosos, la deficiencia en la autofagia es una característica prevalente en la carcinogénesis inducida por Cd en células de pulmón (Wang *et al.*,2018), mientras que en hígado el Cd se considera un factor de riesgo de exposición ocupacional para el desarrollo de HCC, enfermedad en la que la autofagia tiene un papel dual, inicialmente funcionando como supresor de tumores, pero una vez que el HCC se ha establecido las células transformadas utilizan la autofagia para evadir la apoptosis y contribuir a su crecimiento (Rapisarda *et al.*,2016).

Estos datos sugieren un papel importante de la autofagia en el desarrollo de HGNA y proveen nuevas perspectivas de sus alteraciones bajo la exposición a Cd.

2. Antecedentes

La acumulación de lípidos en los hepatocitos es la característica más representativa de HGNA, sin embargo se ha descrito que el daño hepático viene como consecuencia del tipo de lípido más que de la cantidad de este (Serviddio *et al.*,2016), considerando al colesterol importante en el desarrollo y progresión de esta condición, en particular cuando se acumula en la mitocondria, un evento prevalente en el desarrollo de EHNA y su progresión a HCC (Garcia-Ruiz *et al.*,2017).

En la actualidad, la literatura ha expuesto ampliamente que la sobrecarga hepática de colesterol está estrechamente asociada al incremento del daño generado por otra agresión como alcohol, ligadura del ducto biliar o ciertos químicos. Estos

reportes posicionan a este lípido como un factor clave determinante en la progresión de la enfermedad hepática (Musso *et al.*,2013).

De acuerdo con estudios previos de nuestro grupo de investigación, la sobrecarga de colesterol es un factor importante que puede mantener o agravar el daño hepático inducido por alcohol (Lopez-Islas *et al.*,2016).

También se reportó que una dieta alta en colesterol puede incrementar el estrés oxidante que agrava la esteatosis (Dominguez-Perez *et al.*,2016).

Además, se ha propuesto que pacientes con sobrecarga de colesterol en hígado presentan más riesgo de desarrollar complicaciones clínicas asociadas con colestasis (Nuno-Lambarri *et al.*,2016).

Más recientemente se ha dejado constancia de la participación crucial de la sobrecarga de colesterol en el desarrollo de tumores hepáticos de mayor tamaño y agresividad en un modelo murino (Enriquez-Cortina *et al.*,2017).

Este conjunto de resultados sugiere que la sobrecarga de colesterol puede tomar lugar como un signo clínico en la progresión y mal pronóstico de la enfermedad hepática.

Si bien, los mecanismos involucrados en la patogénesis del HGNA siguen bajo estudio, se ha propuesto que esta condición puede favorecerse e incluso acelerarse en presencia de factores que promuevan cambios celulares importantes, como el incremento en el estrés oxidante principalmente aumentando las ERO y alterando el funcionamiento mitocondrial y de otros organelos (Auger *et al.*,2015), al mismo tiempo mediando procesos inflamatorios y citotóxicos que pueden finalmente conducir a EHNA y fibrosis (Ahmed *et al.*,2015).

Entre los diversos factores están los ambientales a los que estamos expuestos diariamente, dentro de ellos encontramos el estilo de vida y factores socioeconómicos que llevan a un mayor consumo de comida “rápida” y productos ricos en grasa y la vida urbana que favorece el sedentarismo.

Además están el alto consumo de alcohol y tabaco en nuestra población, así como la desinformación de las consecuencias ambientales y sobre la salud de muchas actividades antropogénicas (Younossi *et al.*,2018).

Uno de los contaminantes ambientales que ha tomado importancia porque no es degradable y presenta amplia distribución es el Cd, un metal pesado con alta toxicidad. Se ha comprobado su efecto tóxico incluso a dosis bajas y provoca efectos agudos y crónicos sobre la salud. Entre los efectos a la exposición crónica destacan la falla renal, alteraciones en el metabolismo del calcio, daño óseo e incluso se ha visto relacionado con cáncer de pulmón y próstata (WHO,2003).

Las principales fuentes de contaminación de Cd a las que los humanos estamos expuestos son: depósitos ambientales, como consecuencia de extracción de otros metales como cobre y zinc, además de su uso común como componente de diversos fertilizantes (Sandbichler and Hockner,2016). En el ambiente marino, debido a los desechos industriales que dependen del uso de este metal en su manufactura diaria (Moulis and Thevenod,2010); y finalmente como componente de materiales de uso común como plásticos, baterías, pinturas y hasta cosméticos (Thevenod and Lee,2013, Bocca *et al.*,2014).

Una vez dentro del organismo, tiene una vida media larga estimada en aproximadamente 25 años, gracias a su fuerte afinidad y unión con proteínas de bajo peso molecular y ricas en grupos tioles, lo que conduce a una acumulación

del metal principalmente en el hígado (Thevenod,2009).

Nuestro grupo de trabajo ha investigado durante varios años los efectos del tratamiento con Cd en hepatocitos. Los resultados en la línea celular WRL-68 mostraron que el Cd entra en la célula utilizando sistemas para el transporte de metales esenciales, una parte por difusión y también mediante canales de calcio, una vez dentro ejerce la inhibición competitiva de la toma de calcio y altera significativamente su concentración intracelular al desplazarlo de sus sitios de almacenamiento (Souza *et al.*,1996, Souza *et al.*,1997).

A nivel molecular se encontró que en células HepG2 expuestas a Cd se induce la expresión de la proteína de choque térmico (HSP)-70 (Souza *et al.*,2004), y que el estrés inducido por el Cd incrementa la actividad del complejo NADPH oxidasa que produce ERO para activar la vía de señalización de STAT3 (Souza *et al.*,2009).

En hepatocitos primarios de ratón, el Cd promueve una respuesta de sobrevivencia a través de la activación del receptor al factor de crecimiento epidermal (EGFR) (Martinez Flores *et al.*,2013a).

Hasta ahora, hay pocas evidencias que relacionen la exposición a Cd con el desarrollo o avance del HGNA, uno de los primeros al respecto describió que ratas expuestas a Cd incrementan significativamente los triglicéridos (TG) en suero, así como el colesterol esterificado en hígado (Larregle *et al.*,2008), mientras que en otro trabajo se reportó que la exposición activa o pasiva al humo de tabaco incrementó la acumulación de lípidos en hepatocitos modulando la actividad de AMPK y el factor SREBP-1 (Yuan *et al.*,2009).

Recientemente, se encontró que la exposición a dosis bajas de Cd en ratones,

causa una desregulación en genes involucrados en el metabolismo de lípidos y que se han asociado directamente con el desarrollo de HGNA (Go *et al.*,2015).

Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados aún se desconocen, es por ello que en este estudio abordamos el efecto de la exposición a Cd de hepatocitos con sobrecarga de colesterol.

3. Justificación

El HGNA es una de las causas más comunes de enfermedades hepáticas crónicas en la población mundial y se considera que se convertirá en la causa más frecuente en pacientes que requieren de un trasplante hepático para el año 2030 (Byrne and Targher,2015). Los factores de riesgo para desarrollar HGNA son bien conocidos, e incluyen condiciones metabólicas adversas como obesidad, síndrome metabólico y diabetes (Ahmed *et al.*,2015).

Aunque las cifras de incidencia de HGNA varían entre país, edad y etnia, los índices más altos reportados se encuentran en China con un 42%, seguido de Brasil y Holanda con un 35% y México con un 33%, convirtiéndolo en un problema importante de salud pública a nivel mundial (Sayiner *et al.*,2016).

Su espectro comprende un rango que va desde la esteatosis hacia EHNA, fibrosis, cirrosis y HCC, aunque su progresión es un proceso multifactorial se ha descrito que puede acelerarse en presencia de elementos que favorezcan el estrés oxidante, la inflamación y la disfunción celular (Friedman *et al.*,2018).

Al mismo tiempo, los niveles de contaminación ambiental con Cd han incrementado en los últimos años, debido a su distribución global y uso en la industria (de Angelis *et al.*,2017). Su bioacumulación ocurre principalmente a

través de la ingestión de comida y agua contaminados y por la exposición al humo de tabaco, induciendo efectos adversos a la salud principalmente en riñón, hígado y testículos a través de mecanismos pro-oxidantes (Ramos-Trevino *et al.*,2018).

En este contexto, la exposición a Cd en condiciones de HGNA podría contribuir al daño hepático y progresión de la enfermedad. Los estudios experimentales en estas condiciones, que permitan conocer el mecanismo por el cual se desarrolla, permitirán mejorar las estrategias terapéuticas actuales para contrarrestar la progresión en el daño hepático.

4. Pregunta de Investigación

¿Cómo responden los hepatocitos con sobrecarga de colesterol que se exponen a Cd?

5. Hipótesis

El daño hepatocelular provocado por la sobrecarga de lípidos, se verá incrementado por exposición a Cd disminuyendo la viabilidad celular, incrementando el daño oxidante a través del aumento en la producción de ERO o la disminución de la defensa antioxidante y modificará el metabolismo de lípidos.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Describir la respuesta celular y molecular al tratamiento con Cd de hepatocitos obtenidos de ratones alimentados con una dieta alta en colesterol.

6.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto del Cd sobre la viabilidad celular de hepatocitos obtenidos de ratones alimentados con una dieta alta en colesterol.
- Evaluar el efecto del tratamiento con Cd en el estrés oxidante y el contenido de lípidos en cultivo primario de hepatocitos.
- Determinar el mecanismo molecular involucrado en las alteraciones inducidas por el Cd en hepatocitos con sobrecarga de colesterol.

7. Materiales y Métodos

Los ratones de la cepa C57BL/6, se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos y bajo cuidados específicos de acuerdo con el manual de procedimientos de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y la guía para trato y uso de animales de laboratorio establecido por el National Institute of Health (Bethesda, EUA).

7.1 Tratamiento de los animales.

Se utilizaron ratones macho de 8 a 12 semanas sometidos a un ayuno por 12 h y posteriormente alimentados con una dieta hipercolesterolémica (HC, 1 % colesterol y 0.5 % colato de sodio, Dyets) o con una dieta balanceada CW, estándar para roedores (sin colesterol, Harland), ambas por 48 h. Por lo menos 3 animales de cada dieta se sacrificaron después de las 48 h, para evaluar la morfología, histología y funcionalidad hepática bajo una dieta hipercolesterolémica.

7.2 Obtención de cultivo primario de hepatocitos de ratón.

Los hepatocitos se aislaron de los ratones (con dieta HC y con dieta CW al mismo tiempo) por la técnica de perfusión por colagenasa en dos pasos, seguida de la purificación sobre una solución de Percoll (Sigma Aldrich, St Louis Missouri, EE.UU.) como lo describe (Kao *et al.*,1996).

Las células viables se sembraron en una densidad de 254,000 células/cm² para cada ensayo y se mantuvieron en incubación por 4 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % y humedad a saturación. Después de que los hepatocitos se adhirieron al plato de cultivo se les cambió el medio de adhesión por Medio Williams con antibiótico y antimicótico, sin suero bovino fetal (SBF), en el que permanecieron durante 12 h antes de poner los tratamientos.

7.3 Diseño experimental.

El cultivo de hepatocitos se trató con diferentes concentraciones de CdCl_2 (25, 50, 100, 500 y 1000 nM) durante 1, 3, 6 y 12 h. Las células control sin CdCl_2 se sembraron al mismo tiempo.

7.4 Ensayo de viabilidad celular por Cristal Violeta.

Para este ensayo se sembraron los hepatocitos a la densidad indicada anteriormente.

Después de los tratamientos con 25, 50, 100, 500 y 1000 nM CdCl_2 durante 1, 3, 6 y 12 h, se retiró el medio, se lavaron con PBS para fijarse con metanol absoluto frío durante 15 min, posteriormente se lavaron nuevamente con PBS hasta eliminar el exceso de fijador, se dejaron secar toda la noche y al siguiente día se procedió con la tinción.

Se utilizó una solución de cristal violeta al 0.5 % en una mezcla de metanol-agua, durante 10 min y se lavaron varias veces con H₂O destilada para retirar el exceso de colorante. Se dejaron secar toda la noche. Posteriormente, se resuspendió el contenido de cada pozo en una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2% y se puso el contenido en tubos eppendorff para centrifugarse a 1,123 g durante 1 minuto para eliminar partículas insolubles. El contenido fue colocado en una placa de 96 pozos para leer la absorbancia a 620 nm.

7.5 Determinación de lípidos neutros por la incorporación de aceite rojo O.

Después de los tratamientos con Cd, se retiró el medio al cultivo y se lavó con amortiguador de fosfatos (PBS).

Para fijar las células se agregaron 0.4 ml de para-formaldehído (PFA) al 2.5 % en PBS a cada plato de cultivo durante 15 min, se lavaron nuevamente con PBS y se dejaron secar toda la noche. Al día siguiente, se tiñeron con 0.4 ml de Aceite Rojo O al 0.2 % en isopropanol durante 1 h, y se lavaron rápidamente con isopropanol al 60 % en H₂O desionizada para retirar el exceso de colorante, para el contraste se tiñeron los núcleos con hematoxilina de Harris durante 1 min. Se observaron al microscopio de luz y se tomaron las fotografías el mismo día de la tinción.

7.6 Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno.

Después de los tratamientos con 25 nM CdCl₂ durante 5, 10, 15, 30 y 60 min para la determinación de peróxidos las células se incubaron con el fluoróforo 2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma Aldrich, St Louis Missouri, EE.UU.) en concentración 5 µM, mientras que para detección de anión superóxido

se incubaron con dihidroetidio (DHE) (Invitrogen, Carlsbad California, EE.UU.) en concentración 1 μ M, durante 15 min a 37 °C. Al finalizar el tiempo de incubación la intensidad de fluorescencia fue observada en un microscopio invertido AX10 (Axio Observer Z1 Zeiss) como lo reportamos previamente (Enriquez-Cortina *et al.*,2017).

7.7 Determinación de proteínas oxidadas por Oxyblot.

Con los lisados obtenidos de los hepatocitos de ambas dietas sometidos a los tratamientos con 25 nM CdCl₂ durante 1, 3, 6 y 12 h se realizó la determinación de proteínas oxidadas utilizando el OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (Millipore, Burlington Massachusetts, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante para la preparación de muestras, y realizando la electroforesis en un gel de acrilamida al 10% siguiendo el mismo procedimiento para un Western blot, como lo describe (Nuno-Lambarri *et al.*,2016).

7.8 Contenido de glutatión.

Al término de los tratamientos con 25 nM de CdCl₂ por diferentes tiempos, se retiró el medio y las células se lavaron con PBS.

El contenido de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) se evaluó utilizando el ensayo comercial Glutathione assay kit™ (Sigma Aldrich, St Louis Missouri, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras biológicas fueron primero desproteinizadas con una solución de ácido 5-sulfoalíclico al 5%, centrifugadas para remover la proteína precipitada y después sometidas al ensayo. La medición de GSH usa un ensayo cinético en el que cantidades catalíticas (nmoles) de GSH causan la continua reducción de DNTB (ácido 5,5-

ditiobis (2-nitrobenzoico)) hacia TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico) un compuesto amarillo que puede detectarse espectrofotométricamente a 412 nm. El GSSG formado es reciclado por la enzima glutatión reductasa y NADPH. El GSSG presente también reacciona dando un valor positivo a esta reacción. Para evitar la rápida oxidación de GSH mantuvimos las muestras a una temperatura de 2-8 °C durante el ensayo.

7.9 Determinación de colesterol libre con tinción por filipina y cuantificación.

Después del tratamiento con 25 nM de CdCl_2 por diferentes tiempos, los hepatocitos en cultivo se lavaron con PBS y se fijaron con una solución comercial de formalina al 10% (Sigma Aldrich, San Louis Missouri, EE.UU.), durante 1 h a temperatura ambiente. Para la determinación de colesterol libre, las células se incubaron con Filipina, un antibiótico natural que se une al grupo OH libre (3') del colesterol no esterificado y fluoresce bajo luz ultravioleta (UV), siguiendo el método reportado por (Lopez-Islas *et al.*, 2016). Después de 3 lavados finales con PBS, las células se montaron para su observación en el microscopio confocal (NLO780 Carl Zeiss) usando excitación de luz UV.

La cuantificación del colesterol libre se realizó utilizando el ensayo comercial Total Cholesterol Assay Kit™ (Cell Biolabs, Inc., San Diego CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.10 Extracción de proteína total.

Para la técnica de Western blot, al término del tratamiento con y sin 25 nM de CdCl_2 los hepatocitos CW y HC se lavaron con PBS y posteriormente se incubaron con un amortiguador de lisis, formado por Tris-Base 20 μM , Cloruro de Sodio 150 μM , Igepal al 1%, esta solución a pH 8, se agregó una pastilla de inhibidor de proteasas Complete™ (Roche, Basilea Suiza) por cada 100 ml de solución. Por cada lisis se adicionó un inhibidor de fosfatasas P-Stop™ (Roche, Basilea Suiza) 1 X de un stock 10 X (una pastilla disuelta en 1 ml de agua destilada). Los hepatocitos con el amortiguador se dejaron 15 min a 4 °C en agitación, después se rasparon con un gendarme y se centrifugaron a 15,493 g durante 10 min a 4° C. El sobrenadante conteniendo la proteína celular se alicuotó y almacenó a -80° C. De una de las alícuotas se cuantificó la concentración de proteína con el ensayo de ácido bicinconínico (BCA) (Pierce Biotechnology, Walthman Massachusetts, EE.UU.).

7.11 Determinación de proteína total.

Esta determinación se realizó con el ensayo comercial del BCA siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se tomó una alícuota de 5 μl de las muestras y se agregaron 200 μl de reactivo BCA diluido 1:50 en CuSO_4 , al mismo tiempo se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina de 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$, todo se incubó por 10 min a 95° C.

Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un lector de micro placas y se determinó la concentración de la proteína utilizando la curva estándar de albúmina.

7.12 Análisis del contenido de proteína por Western blot.

El ensayo de Western blot se realizó de acuerdo con el método descrito por (Dominguez-Perez *et al.*,2016). Se tomaron 50 µg de la proteína total y se les agregó un amortiguador de muestra comercial Laemmli Sample Buffer 2X™ (BioRad, Hercules California, EE.UU.).

Las muestras se colocaron 5 min a 95° C y se corrieron en geles acrilamida de gradiente 8, 10 y 12 %, esto en una cámara de electroforesis con un amortiguador formado por Tris-Base 0.125 M, glicina 0.96 M y SDS al 0.5 % a 120 Volts por 90 min. La proteína se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) usando un amortiguador de transferencia formado por Tris-Base 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, SDS al 0.05 % y metanol al 20 % durante 30 min a 25 Volts y 1 A en el equipo Trans-Blot Turbo™ (BioRad, Hercules California, EE.UU.).

Después la membrana se bloqueó con una solución de leche descremada al 5 % en TBS-Tween formado por NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM y Tween 20 al 0.1 % pH 7.5 durante 60 min. Posteriormente, se lavó con TBS-Tween para agregarle un anticuerpo primario específico para cada proteína (tabla 1).

Tabla 1. Anticuerpos primarios				
Nombre	Peso molecular	Secundario	Dilución	Catálogo
Actina	42	Ratón	1:10000	Sigma, A3854
Bax	23	Conejo	1:200	Santa Cruz, sc-6236
BcL-2	26	Conejo	1:200	Santa Cruz, sc-492
Catalasa	60	Conejo	1:10000	Sigma Aldrich, c0979
Caspasa-3 Activa	17,19	Conejo	1:1000	Cell Signaling, 9661
GCL	73	Ratón	1:200	Santa Cruz, sc-166356
LC3B (I y II)	17,19	Conejo	1:1000	Cell Signaling, 2775S
Metalotioneína II	15	Ratón	1:500	Enzo, ADI-SPA-550
mTOR	289	Conejo	1:1000	Cell Signaling, 2972
p62/SQSTM1	62	Conejo	1:1000	Cell Signaling, 5114
P70S6K1	70,85	Conejo	1:1000	Cell Signaling, 9202
pAMPK-α	62	Conejo	1:1000	Cell Signaling, 2535
pmTOR	289	Conejo	1:1000	Cell Signaling, 2971
pP70S6K1	70,85	Conejo	1:1000	Cell Signaling, 9205
Raptor	150	Conejo	1:1000	Cell Signaling, 2280
SOD1	23	Conejo	1:200	Santa Cruz, sc-11407
SOD2	25	Conejo	1:1000	GeneTex, GTX116093

Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4° C. Se lavaron con 15 ml de TBS-Tween durante 10 min tres veces, y se agregó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa correspondiente a cada anticuerpo primario en dilución 1:8000 por 1 h. Como control de carga se utilizó el anticuerpo monoclonal contra β -Actina (1:10000) (Sigma) durante 1 h. Las membranas se lavaron con TBS-Tween 10 min por triplicado. Finalmente se trataron con el ensayo Super-Signal West Pico Substrate™ (Pierce Biotechnology, Waltham Massachusetts, EE.UU.) durante 5 min y se determinó su densitometría en un Imaging System Gel Logic 1500 (Kodak).

7.13 Análisis Estadístico.

Cada experimento se realizó en al menos tres eventos independientes utilizando al menos 3 animales. El análisis estadístico de los resultados se realizó por un análisis de varianza (ANOVA) seguida por la prueba post hoc de Tukey con el programa GraphPad Prisma versión 6. El nivel de significancia considerado fue de $p < 0.05$.

8. Resultados

8.1 La dieta alta en colesterol induce esteatosis y daño hepático

Previamente, nuestro grupo publicó que una dieta alta en colesterol (2% colesterol y 0.5% colato de sodio) induce sobrecarga de colesterol y lípidos neutros, condicionando al daño hepatocelular y hepatopatías (Lopez-Islas *et al.*,2016, Nuno-Lambarri *et al.*,2016). En este trabajo, disminuimos el porcentaje de colesterol con el objetivo de conocer el impacto que tiene una ingesta menor de colesterol. A pesar de que el contenido de colesterol en la dieta fue menor, los hepatocitos presentaron valores significativos en el contenido de colesterol y el daño era evidente.

Después de 48 h con la dieta HC, los animales fueron sacrificados. La figura 1A muestra la inspección macroscópica del hígado donde puede observarse que en los ratones de la dieta HC hay hepatomegalia, hipertrofia vesicular y el color pálido característico del hígado graso en comparación con la dieta control. La hepatomegalia se confirmó al determinar el cociente de peso hígado-ratón (figura 1B).

La histología hepática en la figura 1C por tinción con hematoxilina y eosina (H&E), muestra en los ratones HC una ligera esteatosis microvesicular. También hay hepatocitos más grandes e hinchados además de la presencia de infiltrado inflamatorio (flecha amarilla) en comparación con los ratones de la dieta CW. No encontramos diferencias significativas en los ratones alimentados con la dieta que únicamente contiene 0.5% de colato de sodio (figura 1D) en comparación con CW, corroborando que el colato no induce cambios morfológicos o fisiológicos.

También encontramos un incremento significativo en los valores de la actividad de las transaminasas AST y ALT en los ratones HC, mostrando claramente que existe alteración en la funcionalidad hepática (figura 1D). Si bien, redujimos la cantidad de colesterol suplementado en la dieta (1%) en comparación con trabajos previos del grupo de investigación, pudimos comprobar que tanto la sobrecarga de lípidos, como el daño hepático persisten.

Figura 1

Figura 1. Características del modelo de sobrecarga de colesterol. Los ratones fueron alimentados con dieta CW o HC durante 48 h. A) Análisis morfológico del hígado, en donde el HC presenta hepatomegalia y palidez debido a la dieta. B) Incremento del cociente peso hígado/ratón en HC. C) Micrografías representativas de la tinción H&E (200X), evidenciando el infiltrado inflamatorio (flecha amarilla) en HC. D) La dieta HC incrementa los niveles plasmáticos de las transaminasas AST y ALT. Los resultados se expresan como unidades internacionales (UI). Cada barra expresa el valor promedio $\pm$ el error estándar de al menos cinco animales diferentes. * $p < 0.05$ Significativamente diferente de CW.

8.2 Confirmación de sobrecarga de colesterol en hepatocitos

Para evidenciar la sobrecarga de colesterol en el modelo *in vitro*, se determinó el contenido de lípidos en los hepatocitos aislados de ratones alimentados con dieta CW o HC mediante la técnica de incorporación de aceite rojo O. Esta técnica se basa en la gran solubilidad del pigmento en grasas neutras, el aceite rojo O se disuelve en alcohol para teñir las muestras y cuando el tejido presenta grasas neutras el pigmento rojo O se desplaza de la solución de tinción hacia los lípidos ya que es mucho más soluble en éstos que en el alcohol. El resultado se aprecia en forma de gotas lipídicas de diversos tamaños y es directamente proporcional a la cantidad de lípidos en la muestra, se utiliza hematoxilina como contraste para teñir los núcleos.

En la figura 2 A-B se comparan los hepatocitos de ambas dietas observados bajo campo claro y tinción con aceite rojo O respectivamente, al observar bajo campo claro encontramos que los hepatocitos HC presentan hipertrofia celular en comparación con los CW. Mientras, la tinción con aceite rojo O y su cuantificación (figura 2C) corrobora el incremento de lípidos debido a la dieta HC, observamos específicamente un incremento en el contenido de colesterol libre (figura 2D).

Figura 2

Figura 2. Contenido de colesterol en cultivo primario de hepatocitos CW y HC. A) Morfología del cultivo por microscopía de campo claro de hepatocitos de ratones alimentados con dieta balanceada (CW) o con dieta hipercolesterolémica (HC). B) Tinción con aceite rojo O que muestra la diferencia en el contenido de lípidos entre CW y HC. C) Cuantificación. Los resultados se expresan como densidad óptica del rojo O en espectroscopía a 520nm. D) La dieta HC incrementa el contenido de colesterol libre. Los resultados se expresan como nmol/mg de proteína. Cada barra expresa el valor promedio $\pm$ el error estándar de al menos cinco animales diferentes. * $p < 0.05$ Significativamente diferente de CW.

8.3 Los hepatocitos HC muestran resistencia a la apoptosis inducida por el cadmio.

La viabilidad celular se determinó por un ensayo de tinción con cristal violeta, y encontramos que el cadmio disminuye la viabilidad en ambos, CW y HC de una manera dependiente de la concentración y el tiempo de exposición (figura 3). Sin embargo, algo que nos sorprendió fue encontrar que los hepatocitos HC mostraron una mayor viabilidad que los CW a concentraciones bajas de Cd después de 3 h de exposición y en todos los tiempos evaluados (figura 3B).

Debido a que nuestro objetivo en este trabajo fue describir los mecanismos moleculares en respuesta a la exposición a Cd en hepatocitos con sobrecarga de colesterol, elegimos trabajar los análisis posteriores con la concentración de 25 nM CdCl₂ ya que bajo ésta y al tiempo más largo de exposición (12 h), los hepatocitos CW y HC muestran una viabilidad del 77.1% y 84.7% respectivamente.

Para corroborar estos hallazgos, evaluamos por Western blot el contenido de tres proteínas clave involucradas en la apoptosis, Bax y caspasa-3 activa que tienen actividad pro-apoptótica y Bcl-2 que es anti-apoptótica. Interesantemente, el cociente Bax/Bcl-2 mostró una reducción significativa en las células HC tratadas con Cd, en todos los tiempos (figura 4A), lo que sugiere que hay resistencia a la apoptosis. Al mismo tiempo, al evaluar la activación de caspasa-3 nuevamente por Western blot (figura 4B), confirmamos que está significativamente disminuida en las células HC expuestas a Cd, en comparación con las CW. Estos resultados

indican que la apoptosis en hepatocitos HC expuestos a 25nM de CdCl_2 por 12 h es menor en comparación con los CW.

Figura 3

experimentos independientes. * $p < 0.05$ significativamente diferente de NT y & $p < 0.05$ significativamente diferente de 25nM de CdCl_2 .

Figura 4

Figura 4. La sobrecarga de colesterol en hepatocitos, previene la apoptosis inducida por el Cd. A y B) Análisis densitométrico con Western blot representativo del cociente Bax/Bcl-2 y de Caspasa-3 activa respectivamente. Los hepatocitos fueron expuestos a 25nM de CdCl_2 por diferentes tiempos. La proteína total fue extraída y preparada para Western blot. Los resultados se expresan como un cambio en veces el NT. Cada barra expresa el valor promedio $\pm$ el error estándar de al menos experimentos independientes. * $p < 0.05$ significativamente diferente de CW NT y # $p < 0.05$ significativamente diferente de HC NT.

8.4 Los hepatocitos HC incrementan y sostienen la producción de ERO en respuesta a la exposición con cadmio.

Debido a que está bien documentado en la literatura que uno de los principales mecanismos de daño por Cd es el incremento de ERO, determinamos la producción de dos moléculas: peróxidos y anión superóxido. En la figura 5A se observa que al utilizar DCFH-DA para determinar presencia de peróxidos, el cadmio incrementa la fluorescencia con un pico máximo a los 15 min que cae y prácticamente desaparece a los 60 min. Sin embargo, la dieta HC sin tratamiento de Cd (NT) incrementa la producción de peróxidos en comparación con la dieta balanceada. Al exponer los hepatocitos HC a Cd encontramos que la producción de peróxidos se incrementa a los 5, 10 y 15 min e incluso se sostiene hasta los 30 min en comparación con los hepatocitos CW, posteriormente a los 60 min también disminuye. De igual manera, utilizamos DHE como para evaluar la presencia de anión superóxido, y observamos el mismo comportamiento la presencia de Cd incrementa esta especie reactiva (en hepatocitos CW), la dieta HC por sí misma también favorece la producción y finalmente los hepatocitos HC expuestos a Cd incrementan la producción de anión superóxido y pueden sostenerla hasta los 30 min, a los 60 minutos baja en la producción tanto en CW como en HC (figura 5B). Este resultado nos permitió analizar que si bien, los hepatocitos HC incrementan y sostienen la producción de ERO en presencia de Cd, no se considera como un evento de estrés oxidante ya que la producción vuelve a caer a los 60 min de exposición. Estos datos sugieren que el tratamiento con Cd en hepatocitos HC promueve la producción de ERO sin llegar a causar daño celular, de hecho, las

especies reactivas podrían tener una participación específica en la regulación de vías de señalización claves para la sobrevivencia celular.

Figura 5

Figura 5. La sobrecarga de colesterol incrementa la generación de ERO producida por el Cd. Los hepatocitos CW y HC se expusieron a 25nM de CdCl₂ durante 5, 10, 15, 30 y 60 min. La producción de ERO se determinó mediante la fluorescencia de A) DCF-DA para peróxidos y B) DHE para anión superóxido. Imágenes representativas de microscopía invertida de fluorescencia (200X).

8.5 Los hepatocitos HC controlan la sobreproducción de ERO bajo la exposición a cadmio.

Posteriormente a la evaluación del contenido de ERO, nos dimos a la tarea de comprobar que aunque existe un incremento en la producción de especies reactivas, éstas no están promoviendo el daño celular. Para esto, medimos el contenido de proteínas oxidadas tanto en hepatocitos CW como en los HC y expuestos a Cd. Lo que encontramos fue que mientras los hepatocitos CW son más sensibles a la oxidación de proteínas dependiente de la concentración y el tiempo de exposición a Cd, los HC se comportan de manera totalmente contraria, a pesar de que únicamente la dieta HC incrementa la oxidación de proteínas, al exponer a estas células a Cd, el contenido de proteínas oxidadas disminuye con el tiempo (figura 5C), lo que nos llevó a concluir que el incremento tanto de peróxidos como de anión superóxido en los hepatocitos HC expuestos a Cd, no genera estrés oxidante que promueva el daño a proteínas en comparación con los hepatocitos CW. Además consideramos de gran interés estudiar los mecanismos involucrados en el control de la sobreproducción de ERO e los hepatocitos HC expuestos a Cd.

Así, posteriormente mediante Western blot evaluamos el contenido de algunas enzimas antioxidantes clave en la defensa celular, y encontramos que al parecer la superóxido dismutasa (SOD-1) y catalasa no tienen un papel importante. Sin embargo, la enzima γ -glutamyl-cisteinyl ligase (GCL) (limitante de la síntesis de glutatión) incrementa significativamente su contenido, de igual forma que la metalotioneína-II (MT-II) (figura 5D), que se sabe ampliamente que tiene un papel vital en la defensa celular ante la agresión con metales pesados, esencialmente en

respuesta a Cd. Una vez que determinamos el incremento en el contenido de la enzima GCL, medimos el contenido de glutatión, y al graficar el cociente entre glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG), encontramos que el tratamiento con Cd incrementa el contenido de GSH de forma muy similar a las 6 y 12 horas de exposición en los hepatocitos CW. Únicamente la dieta HC disminuye el contenido de GSH, sin embargo, estos hepatocitos en presencia de Cd incrementan el contenido de GSH a las 6 h de exposición de igual forma que los CW.

No obstante, a las 12 h de tratamiento el contenido de GSH en las células HC es 1.5 veces mayor en comparación con las CW del mismo tiempo (figura 5E). Estos datos nos llevan a considerar los efectos compensatorios que exhiben los hepatocitos HC expuestos a Cd, aún cuando el metal promueve un ambiente pro-oxidante.

Figura 5

Figura 5. La sobrecarga de colesterol reduce la oxidación de proteínas. Los hepatocitos CW y HC fueron expuestos a 25nM de CdCl₂ durante 1, 3, 6 y 12 h. C) Contenido de proteínas oxidadas mediante el ensayo de Oxyblot.

D)

Figura 5. El tratamiento con Cd incrementa el contenido de Mt-II, GCL y GSH en hepatocitos HC. Los hepatocitos CW y HC fueron expuestos a 25nM de CdCl_2 durante 1, 3, 6 y 12 h. D) Análisis densitométrico con Western blot representativo de SOD-1, Catalasa, Mt-II y GCL. Los resultados se expresan como un cambio en veces el NT.

E) Los hepatocitos CW y HC fueron expuestos a 25nM de CdCl_2 durante 6 y 12h. El cociente GSH/GSSG fue medido bioquímicamente y los resultados se expresan como el incremento del cociente respecto a las células no tratadas (NT). Cada barra expresa el valor promedio $\pm$ el error estándar de al menos experimentos independientes. * $p < 0.05$ significativamente diferente de CW NT y # $p < 0.05$ significativamente diferente de HC NT.

8.6 El cadmio incrementa el contenido de lípidos y de colesterol libre en hepatocitos primarios.

Con los datos obtenidos hasta aquí, el siguiente experimento estuvo enfocado en conocer la respuesta fisiológica de los hepatocitos primarios en cultivo después de la exposición a Cd, ya que como vimos, existe resistencia a la apoptosis, incremento de ERO pero también de mecanismos antioxidantes, entonces, nos preguntamos ¿el tratamiento con Cd altera el contenido de lípidos?. A continuación evaluamos el contenido de lípidos neutros mediante la tinción con aceite rojo O. Encontramos que la cantidad de lípidos incrementa en función del tiempo de tratamiento con Cd tanto en hepatocitos CW como en los HC, a pesar de que estos últimos ya contenían mayor cantidad de lípidos dada por la dieta. Las fotografías representativas dejan clara evidencia de el incremento en el contenido de lípidos (figura 6 A y B). Este hallazgo fue corroborado al cuantificar mediante espectroscopía la densidad óptica del rojo O (figura 6 C).

Estos datos confirman un incremento en el contenido de lípidos, sin embargo, se sabe que resulta más importante en cuestión de daño hepático el tipo de lípido que la cantidad de éste, por tal motivo decidimos evaluar el contenido de colesterol libre, ya que varios reportes señalan que la acumulación de este lípido es un evento clave en diversas enfermedades hepáticas prevalentes. Cuantificamos la cantidad de colesterol libre a las 12 h de tratamiento con Cd en hepatocitos CW y HC, encontramos que el contenido se eleva significativamente en ambos casos, siendo mucho más drástico en los hepatocitos HC con un incremento de 3.3 veces en comparación con los CW (figura 6D).

Confirmamos este resultado de forma cualitativa, al evaluar el colesterol libre en los hepatocitos mediante la tinción con filipina y observamos que mientras los hepatocitos CW expuestos a Cd exhiben el exceso de colesterol libre en sus membranas plasmáticas, los HC, que por la dieta ya tienen más colesterol libre, al exponerse a Cd incrementan aún más el colesterol libre y se observa distribuido por toda la célula (figura 6E).

Estos datos sugieren que la acumulación de lípidos, particularmente colesterol libre, puede favorecer un microambiente que promueve la sobrevivencia de células que presentan características de una posible transformación como son la anti-apoptosis, la defensa antioxidante y el exceso de lípidos.

Figura 6

Figura 6. El tratamiento con Cd incrementa el contenido de lípidos y de colesterol libre. A y B) Imágenes representativas de la tinción con aceite rojo O en hepatocitos CW y HC respectivamente, expuestos a Cd (400X). C) Cuantificación. Los resultados se expresan como densidad óptica del rojo O en espectroscopía a 520nm. D) Cuantificación de colesterol libre. Los resultados se expresan como nmol/mg de proteína. E) Imágenes representativas de la tinción con filipina en hepatocitos CW y HC expuestos a Cd durante 12h (400X). Cada barra expresa el valor promedio $\pm$ el error estándar de al menos cinco animales diferentes. * $p < 0.05$ Significativamente diferente de CW.

8.7 El cadmio disminuye la autofagia en hepatocitos con sobrecarga de colesterol.

Siguiendo con la evaluación del impacto del cadmio sobre el contenido de lípidos, ahora nos interesó conocer el proceso celular implicado en la acumulación de lípidos promovida por la exposición al metal.

Evaluamos la síntesis *de novo* de lípidos bajo la exposición a Cd, a través del contenido de la enzima limitante de este proceso, la sintasa de ácidos grasos (FASN) mediante Western blot. Los datos no mostraron cambios significativos (datos no mostrados), por lo que se evaluaron otras vías.

Datos previos en la literatura, muestran que la autofagia puede ser otro mecanismo implicado ampliamente en el manejo de lípidos en los hepatocitos, particularmente si hay exceso de lípidos, a través de un mecanismo conocido como lipofagia (DeBosch *et al.*, 2016). Así nuestro siguiente objetivo fue evaluar la participación de este mecanismo bajo nuestras condiciones experimentales. Se determinó por western blot el contenido de dos proteínas clave en el proceso de autofagia LC3, particularmente la conversión de su isoforma LC3-I hacia LC3-II y p62 de los hepatocitos CW y HC expuestos a Cd (figura 7A).

Los resultados muestran que el contenido de LC3-II no se modifica en los hepatocitos CW expuestos a Cd, sin embargo, en los hepatocitos HC tratados con Cd se disminuye significativamente el contenido de esta isoforma. En cuanto a p62, el efecto del Cd es contrario, en los hepatocitos CW disminuye significativamente el contenido a través del tiempo, mientras que en hepatocitos HC no se modifica (figura 7B).

Estos datos sugieren que no se está llevando a cabo la autofagia en los hepatocitos CW y HC expuestos a Cd, lo que podría relacionarse con la acumulación de lípidos inducida por el metal. Con base en estos resultados corroboramos si la inhibición de la autofagia es responsable de la acumulación de lípidos promovida por el Cd.

Se realizaron experimentos utilizando trealosa (Th), un disacárido natural capaz de promover la autofagia, pre-tratamos a los hepatocitos CW y HC durante 30 min, después agregamos el Cd, una vez terminados los tratamientos, evaluamos nuevamente el contenido de lípidos por tinción con aceite rojo O, así como el contenido de LC3-II y p62.

Encontramos, que el contenido de lípidos disminuyó significativamente tanto en los hepatocitos CW como en los HC expuestos a Cd (figura 7C), además el contenido de LC3-II se incrementa significativamente, mientras que el de p62 disminuye (figura 7D). Estos datos nos muestran que la autofagia es, por lo menos uno, de los mecanismos involucrados en la acumulación de lípidos promovida por el Cd en hepatocitos con sobrecarga de colesterol.

Figura 7

Figura 7. La exposición a cadmio disminuye la autofagia. Los hepatocitos CW y HC fueron expuestos a 25nM de CdCl₂ durante 1, 3, 6 y 12 h. A) Imágenes representativas de la acumulación de lípidos inducida por Cd en hepatocitos CW y HC (400X). B) Análisis densitométrico con Western blot representativo de LC3-I, LC3-II y p62. Los resultados se expresan como un cambio en veces el NT. Cada barra expresa el valor promedio $\pm$ el error estándar de al menos experimentos independientes. * $p < 0.05$ significativamente diferente de CW NT y # $p < 0.05$ significativamente diferente de HC NT.

Figura 7

Pre-tratamiento de Trealosa (Th)

Figura 7. El pre-tratamiento con trealosa activa la autofagia y disminuye el contenido de lípidos incrementado por Cd. Los hepatocitos CW y HC fueron tratados con 100 mM de Th durante 0.5 h y posteriormente expuestos a 25 nM de CdCl₂ durante 1, 3, 6 y 12 h. C) Imágenes representativas de la tinción con aceite rojo O para contenido de lípidos (400X). D) Análisis densitométrico con Western blot representativo de LC3-I, LC3-II y p62. Los resultados se expresan como un cambio en veces el NT. Cada barra expresa el valor promedio $\pm$ el error estándar de al menos experimentos independientes. * $p < 0.05$ significativamente diferente de CW NT y # $p < 0.05$ significativamente diferente de HC NT.

8.8 El cadmio altera la vía de señalización de la autofagia en hepatocitos con sobrecarga de colesterol.

Posteriormente, debido a las alteraciones inducidas por el Cd en el proceso de autofagia, corroboramos el efecto a nivel molecular. Mediante Western blot, medimos el contenido de proteínas de la vía de señalización involucrada en el inicio de la autofagia.

Encontramos que en los hepatocitos HC expuestos a Cd el represor por excelencia de la autofagia, mTORC1 incrementó el contenido de su forma activa fosforilada en serina 2448, así como el de su regulador Raptor y de la forma activa de la proteína p70S6K1 que es fosforilada directamente por mTORC1, comprobando su activación. Mientras, el agonista de la autofagia, AMPK α disminuyó el contenido de su forma activa fosforilada en treonina 172 en los mismos hepatocitos (figura 8A).

En el mismo sentido, evaluamos la ruta de señalización en los hepatocitos pre-tratados con trealosa y expuestos a Cd. Los resultados muestran que el contenido de proteínas se invierte, el represor mTOR en su forma activa así como su regulador Raptor disminuyen en hepatocitos HC expuestos a Cd, aunque p70S6K1 incrementa, considerando que puede ser un evento celular compensatorio. El pre-tratamiento con trealosa incrementa la fosforilación de la proteína AMPK α tanto en CW como en HC expuestos a Cd (figura 8B).

Para verificar la participación de mTOR en la inhibición de la autofagia utilizamos rapamicina un inhibidor químico, en una concentración de 10 nM como pre-

tratamiento durante 30 min, seguido por 12 h de exposición a Cd. Una vez terminados los tratamientos evaluamos el contenido de lípidos, que se incrementa en mayor proporción en hepatocitos HC en respuesta a la exposición a Cd por 12 h. Sin embargo, en el caso de los pre-tratamientos con trealosa y rapamicina, la acumulación de lípidos se ve disminuida significativamente (figura 8 C). El contenido de colesterol libre evaluado de forma bioquímica y cualitativa también disminuyó a valores basales (figura 8D y E).

Los resultados señalan a la autofagia como un mecanismo clave implicado en el manejo del exceso de lípidos en hepatocitos con sobrecarga de colesterol y que se ve afectado en respuesta a la exposición a Cd, agravando de esta forma la acumulación de lípidos que podría favorecer la progresión del daño hepático.

Figura 8

A)

Figura 8. La exposición a cadmio inhibe la vía de señalización de inicio de la autofagia. Los hepatocitos CW y HC fueron expuestos a 25nM de CdCl₂ durante 1, 3, 6 y 12 h. A) Análisis densitométrico con Western blot representativo de pmTORC1, Raptor, pP70S6K1 y pAMPKα. Los resultados se expresan como un cambio en veces el NT. Cada barra expresa el valor promedio $\pm$ el error estándar de al menos experimentos independientes. * $p < 0.05$ significativamente diferente de CW NT y # $p < 0.05$ significativamente diferente de HC NT.

Figura 8

B)

Figura 8. El pre-tratamiento con trealosa induce la autofagia disminuida por el Cd. Los hepatocitos CW y HC fueron tratados con 100 mM de Th durante 0.5 h y posteriormente expuestos a 25nM de CdCl₂ durante 1, 3, 6 y 12 h. B) Análisis densitométrico con Western blot representativo de pmTORC1, Raptor, pP70S6K1 y pAMPKα. Los resultados se expresan como un cambio en veces el NT. Cada barra expresa el valor promedio ± el error estándar de al menos experimentos independientes. * p<0.05 significativamente diferente de CW NT y # p<0.05 significativamente diferente de HC NT.

Figura 8

Figura 8. El pre-tratamiento con trealosa o Rapamicina disminuye el contenido de lípidos y colesterol libre incrementado por el Cd. Los hepatocitos CW y HC se trataron con 100 mM de Th o 10 nM de Rap durante 0.5 h y seguido de una exposición a 25 nM de CdCl₂ por 12 h. C) Imágenes representativas de la tinción con aceite rojo O para contenido de lípidos (400X). D) Cuantificación de colesterol libre. Los resultados se expresan como nmol/mg de proteína. E) Imágenes representativas de la tinción con filipina (400X). Cada barra expresa el valor promedio $\pm$ el error estándar de al menos cinco animales diferentes. * $p < 0.05$ Significativamente diferente de CW.

9. Discusión

La dieta es un factor importante que contribuye al desarrollo de HGNA, datos recientes experimentales y en pacientes sugieren que tanto las alteraciones en la homeostasis hepática de colesterol así como la acumulación de colesterol libre son relevantes para la patogénesis del HGNA y su progresión hacia EHNA (Arguello *et al.*,2015) y que la inflamación y el estrés oxidante están involucrados (Katsiki *et al.*,2016).

En este trabajo, utilizamos un modelo con una dieta alta en colesterol para inducir sobrecarga hepática de este lípido y poder analizar los efectos de la exposición con Cd en hepatocitos obtenidos de los ratones alimentados con la dieta.

Nuestros datos muestran que 48 h de administración de una dieta alta en colesterol (1%) en ratones, es efectiva para inducir la esteatosis en el hígado, como lo demostró (Mari *et al.*,2006) y colaboradores con un porcentaje más alto de colesterol. Los tejidos muestran incremento en el contenido de lípidos, mostrando un color más pálido, así como en los valores del cociente en el peso del órgano respecto al peso del ratón. Este cociente es importante ya que la dieta no induce obesidad en los animales de experimentación, únicamente incrementa el contenido de colesterol hepático como resultado de la ingesta de la dieta por 48 h. También observamos una elevación de transaminasas en sangre, lo cual indica daño funcional hepático y es usualmente observado en HGNA (Ofosu *et al.*,2018).

Estos datos confirman que el modelo dietético es adecuado para cumplir nuestro objetivo. Posteriormente, obtuvimos el cultivo primario de hepatocitos de los ratones alimentados con la dieta balanceada (CW) y con la dieta

hipercolesterolémica (HC) y encontramos que las células en cultivo mantenían el alto contenido de lípidos dado por la dieta, y nos permitirían tener un modelo celular para evaluar la respuesta por exposición a Cd.

Nuestros resultados mostraron que en los hepatocitos CW expuestos a Cd disminuyen la viabilidad celular en forma dependiente de la concentración y el tiempo de exposición, lo que confirma datos obtenidos en nuestro grupo (Martínez Flores *et al.*,2013a). Sin embargo, aunque los hepatocitos HC presentaron la misma respuesta dependiente de la concentración y el tiempo, mostraron porcentajes de viabilidad más altos en todos los tiempos, sugiriendo que estas células son más resistentes a la agresión con Cd .

Con el fin de determinar la concentración de Cd que utilizaríamos para el estudio, se consideró el criterio de una viabilidad alta de los hepatocitos que nos permitiera estudiar la respuesta a la exposición de Cd y no que únicamente las llevara a la muerte. Varias investigaciones reportan un efecto diferencial del Cd en función de la concentración, se ha observado que concentraciones bajas (sub-micromolares) no provocan muerte celular, mientras que concentraciones medias dirigen hacia apoptosis, y concentraciones altas (>60µM) causan principalmente necrosis (Templeton and Liu,2010). Además, de acuerdo con lo descrito por Go y colaboradores, las dosis bajas de Cd promueven cambios génicos y metabólicos asociados directamente con el HGNA en ratones, mientras que dosis altas únicamente conducen a la muerte celular (Go *et al.*,2015). Basados en estos hallazgos, convenimos trabajar con la dosis de 25 nM una dosis muy baja, y en la que la viabilidad es alta hasta por 12 h de exposición.

Posteriormente, evaluamos marcadores clave de la apoptosis, encontrando que los hepatocitos HC expuestos a Cd incrementan significativamente su contenido de Bcl-2 mientras reducen Bax y caspasa-3 activa, en relación con los hepatocitos CW. Esta respuesta aguda (12 h) de los hepatocitos con alto contenido de colesterol puede favorecer un ambiente de sobrevivencia y adaptación contra el daño celular que puede generar el Cd. El incremento en el contenido de Bcl-2 se ha observado en pacientes con HGNA, el proceso anti-apoptótico favorece la vida media del hepatocito, que incrementa la síntesis de TG como mecanismo de defensa contra la toxicidad generada por el exceso de ácidos grasos libres, lo que sugiere un papel protector de Bcl-2 en la progresión de la enfermedad (El Bassat *et al.*,2014).

Otro estudio, considera la sobreexpresión de Bcl-2 con una respuesta hormética, es decir, cuando las células están pre-condicionadas con un estrés subletal para provocar una respuesta de sobrevivencia que puede prevenir el daño y la apoptosis (Luna-Lopez *et al.*,2013), sin embargo, esta respuesta adaptativa no es buena bajo el escenario de una dieta hipercolesterolémica, ya que como está reportado en la literatura, la sobrecarga de colesterol en células transformadas confiere una respuesta anti-apoptótica al disminuir Bax y la actividad de caspasa-3, lo que da como resultado un fenotipo tumoral mucho más agresivo (Enriquez-Cortina *et al.*,2017).

Las ERO, cuando se liberan en cantidades limitadas contribuyen a la proliferación celular, senescencia y sobrevivencia al actuar como intermediarios en vías de señalización. Diversas investigaciones proveen nuevas perspectivas dentro del

papel de las ERO como controladoras del metabolismo lipídico bajo condiciones fisiológicas y patológicas, lo que sugiere que el incremento en la producción de ERO induce vías de señalización que participan en la progresión del HGNA (Serviddio *et al.*,2013).

Con base en lo anterior, este estudio sugiere que el incremento en los niveles de ERO puede tener una participación en la activación de varias vías de señalización que permiten la sobrevivencia celular de los hepatocitos HC que se exponen a Cd.

El Cd produce respuestas diferenciales, dependiendo de la concentración, el tiempo de exposición y el tipo celular (Cuypers *et al.*,2010). Datos previos de nuestro grupo muestran que el Cd, en concentraciones μM , produce principalmente estrés oxidante en las líneas celulares WRL-68 y HepG2 (Souza *et al.*,2004, Souza *et al.*,2009). Mientras que otro estudio plantea que las ERO producidas en hepatocitos primarios por la exposición a Cd, pueden ser señalizadores en las vías de Stat3 o ERK 1/2 contra la toxicidad del metal, sin embargo, esta respuesta no contrarresta la apoptosis mediada por p53 (Martinez Flores *et al.*,2013a).

En este estudio, evidenciamos que el tratamiento con Cd induce una producción temprana de ERO en hepatocitos CW y acentúa la producción de los HC. Debido a que en 60 min de tratamiento con Cd la producción de ERO disminuye y los hepatocitos HC tienen una viabilidad alta (85%) hasta las 12 h de exposición, concluimos que la sobreproducción de ERO está involucrada en vías de señalización y no promueve el estrés oxidante en condiciones de sobrecarga de lípidos.

Posteriormente, evaluamos el contenido de proteínas oxidadas y observamos que hay un incremento respecto al tiempo de tratamiento en los hepatocitos CW, mientras que los hepatocitos HC tienen una respuesta adaptativa al tratamiento con Cd y no incrementan el contenido de proteínas oxidadas en ningún tiempo de exposición.

Se ha documentado ampliamente que el Cd no es un metal con actividad oxidante propia siendo incapaz de formar radicales libres directamente, sin embargo, los mecanismos indirectos del estrés oxidante inducido por Cd involucran desde la disminución de antioxidantes, la inhibición de su actividad enzimática, el desplazamiento de metales esenciales, y hasta la interferencia con la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Cuypers *et al.*,2010), estos factores podrían explicar porqué los hepatocitos CW no pueden manejar el incremento de ERO y sus consecuencias, como la oxidación de proteínas inducida por el Cd aún en concentraciones bajas del metal.

No obstante, los hepatocitos HC ya presentan una respuesta que previene la oxidación de proteínas inducida por el Cd, en gran medida porque se sabe que la sobrecarga de colesterol promueve una respuesta hormética en los hepatocitos. La simple acumulación de grasa en el hígado se asocia con un incremento de lipotoxicidad, y como consecuencia se activan mecanismos protectores asociados al control del estrés de retículo endoplásmico, la producción de ERO y el estrés mitocondrial (Perla *et al.*,2017). Así, los hepatocitos HC despliegan mecanismos antioxidantes antes de exponerse a Cd, presentando una respuesta más eficiente ante la segunda agresión.

Adicionalmente, evaluamos el contenido de algunas proteínas claves en la maquinaria antioxidante. Aunque se conoce que en condiciones fisiológicas el Cd puede afectar la actividad enzimática de superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa (Valko *et al.*,2016) observamos que en los hepatocitos HC expuestos a Cd no hubo cambios en el contenido de SOD1 y catalasa, sugiriendo la participación de otro mecanismo en el control de H₂O₂.

Sin embargo, en estos mismos hepatocitos encontramos un incremento significativo en el contenido de la γ -glutamyl-cisteinil ligasa (GCL) la enzima heterodimérica regulada por NRF2, factor de señalización sensible a estrés oxidante, y que juega un papel importante en la síntesis de glutatión (GSH) (Krejsa *et al.*,2010). El GSH es el principal péptido de bajo peso molecular con alto contenido de grupos tioles presente en células vivas desde bacterias hasta mamíferos, y se considera el antioxidante más importante, además es fundamental para reacciones de conjugación con metales afines a grupos tiol y semi-metales (Rubino,2015). Debido a que la fuente principal de GSH en el humano es el hígado, un incremento en los niveles de GCL sugiere un aumento en la síntesis de GSH (Gaucher *et al.*,2018), por lo que se evaluó su contenido, midiendo tanto el GSH reducido como el oxidado (GSSG).

Los datos muestran que los hepatocitos HC tratados con Cd incrementan el contenido de GSH reducido. Tomando en cuenta que tanto la concentración de GSH así como el cociente GSH/GSSG son marcadores de estrés oxidante y de la homeostasis redox celular (Deponte,2017), los datos sugieren que los hepatocitos con sobrecarga de colesterol expuestos a Cd incrementan la síntesis de GSH, lo

que puede favorecer la conjugación de GSH con el metal para reducir su toxicidad, ya que se ha demostrado ampliamente que las reacciones de conjugación de metales pesados como Cd y mercurio (Hg) en mamíferos son la principal forma de excreción de estos metales (Rubino,2015).

Pese a que ha sido documentado que dietas altas en grasas disminuyen el contenido de antioxidantes y este es un factor asociado con la progresión del daño del HGNA (Brunt *et al.*,2015), el tratamiento con 25 nM de CdCl₂ en hepatocitos HC es suficiente para promover la síntesis de GSH y contrarrestar los efectos prooxidantes del metal, de forma muy similar a lo reportado por (Thijssen *et al.*,2007) quien describe un restablecimiento del estado redox y una respuesta adaptativa en riñón de ratones expuestos a dosis bajas de Cd. A pesar de que las células toleran los cambios inducidos por el Cd no se plantea un buen escenario, ya que se ha reportado que la adaptación a la exposición con Cd puede inhibir la apoptosis celular permitiendo la acumulación de mutaciones críticas y el desarrollo de cáncer (Sharma *et al.*,2014).

Si bien, el incremento en la síntesis de GSH en hepatocitos HC mitiga la oxidación de proteínas, nos interesó evaluar el contenido de metalotioneína-II ya que sabemos que tiene un papel fundamental en la defensa contra la toxicidad del Cd debido a que presenta una alta afinidad al metal y su unión es responsable de la acumulación en los tejidos y su vida media larga en el organismo (Rani *et al.*,2014). Los resultados indican que el Cd induce un incremento en el contenido de MT-II de forma dependiente al tiempo de exposición, además de que la dieta HC sin tratamiento con Cd (NT) también incrementa la MT-II y la subsecuente

exposición a Cd en estos hepatocitos incrementa los niveles de proteína, incluso a las 12 h de tratamiento.

Se ha documentado ampliamente la participación de la MT-II en el mantenimiento del balance redox, la represión de radicales libres y el control de la actividad de proteínas que contienen zinc, por ello se ha considerado que la MT-II tiene un papel protector contra la toxicidad inducida por metales pesados, principalmente ante la exposición a Cd. (Dziegiel *et al.*,2016). Sin embargo, se ha reportado que las células que se adaptan al reto con Cd al incrementar la expresión de MT-II, también se caracterizan por una capacidad reducida de reparar el daño al ADN y se vuelven más resistentes a los estímulos apoptóticos (Potts *et al.*,2001).

El papel que juega la MT-II en el HGNA no es claro (Ling *et al.*,2016), una propuesta podría ser que debido a la generación de ERO inducida por el exceso de lípidos, se favorezca un incremento en la expresión MT-II y su función antioxidante. No obstante, los efectos producidos por el incremento de MT-II deben estudiarse en cada contexto, ya que estudios recientes postulan una interacción de la MT con proteínas que participan en el proceso carcinogénico (Nagamine and Nakajima,2013).

Nuestros datos indican que en hepatocitos con sobrecarga de colesterol, el Cd incrementa la producción de ERO en tiempos cortos, sugiriendo que estas moléculas participan en procesos de señalización y no promueven estrés oxidante, además incrementa la síntesis de GSH y MT-II lo que podría disminuir la toxicidad del Cd, así las células se adaptan a la agresión y sobreviven.

Después de observar una respuesta hormética en los hepatocitos HC expuestos a Cd, nos preguntamos cuál sería la consecuencia en el contenido de lípidos en estas condiciones.

Los datos de la tinción con aceite rojo O, indican que la exposición a Cd induce un incremento de lípidos en los hepatocitos CW, que se hace más notorio en los hepatocitos HC tratados con el metal. La característica principal del HGNA es la acumulación de triglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos, aunque la esta condición de esteatosis simple se considera benigna, promueve un ambiente favorable para el desarrollo de cambios inflamatorios en el hígado, lo que se reconoce como un precursor de estados más severos de hígado graso (Matsuzawa *et al.*,2007). Como se ha demostrado en varios modelos experimentales, la exposición de células en cultivo a ácidos grasos insaturados resulta en un incremento significativo en el contenido de TG sin una disminución de la viabilidad celular (Alkhoury *et al.*,2009), no obstante, estas especies lipídicas interactúan con factores pro-inflamatorios que favorecen el desarrollo de EHNA (Yamaguchi *et al.*,2007).

Es importante considerar que muchos reportes indican que la acumulación de triglicéridos *per se* no es dañina para los hepatocitos ya que puede proteger al hígado al contener la acumulación de precursores lipotóxicos representando, de hecho, un mecanismo protector (Neuschwander-Tetri,2010, Musso *et al.*,2013).

En el modelo de esteatosis descrito por Mari (2006) y colaboradores se destaca el hecho de que es el tipo de lípido más que la cantidad de este el que determina la susceptibilidad hepatocelular, teniendo singular importancia el colesterol libre.

Cuando determinamos el contenido de colesterol libre, observamos que este lípido se incrementa en los tratamientos con Cd tanto para hepatocitos CW como para los HC, teniendo en estos últimos un incremento mucho más significativo a pesar de que ya contaban con un exceso de colesterol debido a la dieta. Corroboramos el resultado bioquímico usando filipina para localizar mediante fluorescencia el colesterol no esterificado y observamos el mismo comportamiento, una respuesta más intensa en los hepatocitos HC.

Particularmente, el metabolismo alterado de colesterol puede tener efectos tóxicos promoviendo el desarrollo de EHNA a través de diversos mecanismos, por ejemplo, al acumularse en membranas celulares como la plasmática, mitocondrial y nuclear la molécula de colesterol afecta la organización membranal y sus propiedades físicas alterando el funcionamiento de sus componentes tales como transportadores y canales (Musso *et al.*,2013).

Los mecanismos celulares para la acumulación de lípidos pueden ser resultado de un exceso de ingesta en la dieta, variaciones en la lipogénesis *de novo* y su oxidación para generación de energía o bien alteración en su exportación en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Kawano and Cohen,2013).

Con el fin de evaluar el mecanismo por el cual se acumulan los lípidos se determinó si había un incremento en la lipogénesis *de novo*. Para ello se evaluó el contenido de la enzima limitante en la síntesis de ácidos grasos (FASN). Los resultados no mostraron diferencias entre los tratamientos, sugiriendo que este proceso no está implicado en la acumulación de lípidos inducida por Cd, datos que concuerdan que lo reportado previamente por otros grupos, (Alvarez *et al.*,2007)

reportó que en ratas expuestas a concentraciones mM de Cd se modifica el perfil lipídico prostático, pero el contenido y la actividad de FASN permanecieron sin variaciones. Adicionalmente, otro estudio en adipocitos expuestos a Cd, detalló una disminución en la expresión de *fasn* y acetil-coenzima A-carboxilasa alfa (*Acc1*), genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos (Kawakami *et al.*,2013).

Se consideró importante evaluar la autofagia, ya que en la literatura existen datos que consideran a la autofagia como una vía poco estudiada y con implicaciones importantes en el manejo del exceso de lípidos en los hepatocitos (DeBosch *et al.*,2016).

La autofagia es una vía intracelular lisosomal de degradación que funciona promoviendo la sobrevivencia celular al proveer energía en momentos de estrés o para remover organelos y proteínas dañadas.

Singh reportó que la autofagia regula el metabolismo de lípidos al eliminar triglicéridos y así prevenir el desarrollo de esteatosis (Singh *et al.*,2009). Existen también reportes donde se señala que hay una disminución de la autofagia en el hígado graso en condiciones que lo predisponen a la EHNA (Stankov *et al.*,2012, Gonzalez-Rodriguez *et al.*,2014).

Con base en ello, determinamos el contenido de dos proteínas clave en la autofagia. En condiciones fisiológicas, SQSTM1/p62 está bien caracterizado como substrato para la formación de los autofagosomas, mientras LC3-I se combina con fosfatidiletanolamina para formar LC3-II, esta forma lipidada es constituyente de las membranas de los autofagosomas. Al finalizar el proceso LC3-II se disocia y

vuelve a LC3-I, mientras que p62 se degrada; así el flujo de autofagia está determinado por el incremento en LC3-II y la degradación de p62 (Klionsky and Zughaier,2016).

En este estudio observamos que en los hepatocitos HC expuestos a Cd, el contenido de LC3-II disminuyó en forma dependiente del tiempo, mientras los niveles de p62 se mantuvieron, lo que nos sugiere un defecto en la autofagia que podría conducir a la acumulación de lípidos en este modelo experimental.

Como consecuencia, durante la disminución de la macroautofagia se disminuye la tasa lipolítica de TG y colesterol de las gotas lipídicas provocando un incremento en la esteatosis después de un reto lipídico (Singh *et al.*,2009). Para comprobar los resultados, utilizamos trealosa (Th) un disacárido natural que induce la autofagia en los hepatocitos, al menos en parte, inhibiendo la toma de hexosas para activar la ruta de señalización dirigida desde AMPK hacia ULK1 (DeBosch *et al.*,2016).

Observamos que en el pre-tratamiento con Th seguido de la exposición a Cd, el contenido de lípidos, determinado mediante la tinción con aceite rojo O, disminuyó notablemente en comparación con los hepatocitos CW y HC que únicamente se exponen a Cd. Simultáneamente LC3-II se incrementa y p62 disminuye. La respuesta es más notoria en los hepatocitos CW, lo cual podría sugerir que: 1) la autofagia debe considerarse como uno de los mecanismos implicados en la acumulación de lípidos bajo la exposición a Cd, sin embargo, aún deben explorarse otros procesos como la oxidación y exportación de lípidos, 2) los lípidos

remanentes en las células HC después de activar la autofagia con Th, se deben a la dieta y no al tratamiento con Cd y 3) el tipo de lípido que se acumula en hepatocitos HC expuestos a Cd puede ser una variante adicional en el manejo del exceso de lípidos por autofagia.

Es importante señalar que el pre-tratamiento con Th fue antes de la exposición a Cd, es decir, tratamos de promover la autofagia que se afecta en presencia del metal, así, los lípidos remanentes en los hepatocitos HC son consecuencia de la dieta alta en colesterol con la que se alimentaron los ratones. Si la Th se empleara antes de la dieta HC, los lípidos disminuirían a los niveles basales de los hepatocitos CW, como lo demostró DeBosch, utilizando Th previamente al tratamiento con fructosa o ácidos grasos en hepatocitos primarios, y encontró una disminución en la acumulación de lípidos inducida por estos estímulos (DeBosch *et al.*,2016).

A nivel molecular, se ha postulado que AMPK y mTORC1 regulan la autofagia a través de fosforilaciones coordinadas (Klionsky and Zughaier,2016). En este proceso mTORC1 es el regulador negativo que bloquea la iniciación de la autofagia, mientras que AMPK α es el regulador positivo al inhibir la activación de mTORC1 (Wang,2016).

En este sentido, exploramos la ruta molecular involucrada determinando la forma activa de mTORC1, así como su proteína reguladora Raptor y la activación de uno de sus blancos moleculares canónicos p70S6K1; adicionalmente, examinamos la fosforilación de la subunidad catalítica de AMPK. Encontramos que en los

hepatocitos HC expuestos a Cd se incrementa la fosforilación de mTORC1 así como el contenido de Raptor y la fosforilación de p70S6K1, mientras se disminuye la fosforilación de AMPK α , resultando en una inhibición de la autofagia. Por el contrario, cuando usamos Th como pre-tratamiento, la vía de señalización se invirtió, la forma activa de mTORC1 disminuyó al igual que su regulador Raptor, mientras que la fosforilación de AMPK α se incrementó, restableciendo la señalización para iniciar la autofagia. DeBosh demostró que la Th puede inducir un estado de “inanición funcional” que activa la señalización dirigida por AMPK y la inhibición de mTORC1 limitando la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (DeBosch *et al.*,2016).

Finalmente, usando Th y rapamicina (inhibidor de mTORC1) como pre-tratamiento, evaluamos tanto el contenido de lípidos como de colesterol libre encontrando que ambos disminuyeron, lo que sugiere la participación activa de la vía de señalización canónica de autofagia regulada por la activación de AMPK y la inhibición de mTORC1 (Zhang,2013).

Nuestros datos sugieren una participación importante de la macroautofagia en la regulación del almacenamiento de lípidos inducido por Cd en hepatocitos, e implica que las alteraciones en esta vía pueden ser un mecanismo que agrave la esteatosis hepática.

Resumen de resultados

10. Conclusión

En conclusión, se sugiere un mecanismo celular implicado en la acumulación de lípidos inducida por el Cd en hepatocitos con sobrecarga de colesterol. Nuestros datos indican que hepatocitos con sobrecarga de colesterol promueven una respuesta adaptativa ante la toxicidad aguda ejercida por el Cd, a través de incrementar proteínas anti-apoptóticas, balancear el incremento de ERO con la síntesis de GSH y MT-II y finalmente inhibir la autofagia, favoreciendo la acumulación de lípidos y las condiciones necesarias que pueden agravar el HGNA.

Profundizar en el estudio de estas respuestas celulares y sus mecanismos moleculares debe ser el siguiente acercamiento para identificar blancos terapéuticos que ayuden a contrarrestar la progresión del hígado graso no alcohólico.

11. Referencias

- Ahmed, A., R. J. Wong and S. A. Harrison (2015). "Nonalcoholic Fatty Liver Disease Review: Diagnosis, Treatment, and Outcomes." Clin Gastroenterol Hepatol **13**(12): 2062-2070.
- Alkhoury, N., L. J. Dixon and A. E. Feldstein (2009). "Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal." Expert Rev Gastroenterol Hepatol **3**(4): 445-451.
- Alvarez, S. M., N. N. Gomez, L. Scardapane, M. W. Fornes and M. S. Gimenez (2007). "Effects of chronic exposure to cadmium on prostate lipids and morphology." Biometals **20**(5): 727-741.
- Andronesu, C. I., M. R. Purcarea and P. A. Babes (2018). "Nonalcoholic fatty liver disease: epidemiology, pathogenesis and therapeutic implications." J Med Life **11**(1): 20-23.
- Arguello, G., E. Balboa, M. Arrese and S. Zanlungo (2015). "Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease." Biochim Biophys Acta **1852**(9): 1765-1778.
- Auger, C., A. Alhasawi, M. Contavadoo and V. D. Appanna (2015). "Dysfunctional mitochondrial bioenergetics and the pathogenesis of hepatic disorders." Front Cell Dev Biol **3**: 40.
- Azzalini, L., E. Ferrer, L. N. Ramalho, M. Moreno, M. Dominguez, J. Colmenero, V. I. Peinado, J. A. Barbera, V. Arroyo, P. Gines, J. Caballeria and R. Bataller (2010). "Cigarette smoking exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in obese rats." Hepatology **51**(5): 1567-1576.
- Bocca, B., A. Pino, A. Alimonti and G. Forte (2014). "Toxic metals contained in cosmetics: a status report." Regul Toxicol Pharmacol **68**(3): 447-467.
- Brown, G. T. and D. E. Kleiner (2016). "Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis." Metabolism **65**(8): 1080-1086.
- Brunt, E. M., V. W. Wong, V. Nobili, C. P. Day, S. Sookoian, J. J. Maher, E. Bugianesi, C. B. Sirlin, B. A. Neuschwander-Tetri and M. E. Rinella (2015). "Nonalcoholic fatty liver disease." Nat Rev Dis Primers **1**: 15080.
- Byrne, C. D. and G. Targher (2015). "NAFLD: a multisystem disease." J Hepatol **62**(1 Suppl): S47-64.
- Calzadilla, B. L. and L. A. Adams (2016). "The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." Int J Mol Sci **17**(5).

Chalasani, N., Z. Younossi, J. E. Lavine, A. M. Diehl, E. M. Brunt, K. Cusi, M. Charlton, A. J. Sanyal, A. American Gastroenterological, D. American Association for the Study of Liver and G. American College of (2012). "The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology." Gastroenterology **142**(7): 1592-1609.

Conjeevaram, P. K., M. N. Kabbany and N. Alkhouri (2018). "Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: Not a Small Matter." Paediatr Drugs.

Corrado, R. L., D. M. Torres and S. A. Harrison (2014). "Review of treatment options for nonalcoholic fatty liver disease." Med Clin North Am **98**(1): 55-72.

Crunk, A. E., J. Monks, A. Murakami, M. Jackman, P. S. Maclean, M. Ladinsky, E. S. Bales, S. Cain, D. J. Orlicky and J. L. McManaman (2013). "Dynamic regulation of hepatic lipid droplet properties by diet." PLoS One **8**(7): e67631.

Cuypers, A., M. Plusquin, T. Remans, M. Jozefczak, E. Keunen, H. Gielen, K. Opdenakker, A. R. Nair, E. Munters, T. J. Artois, T. Nawrot, J. Vangronsveld and K. Smeets (2010). "Cadmium stress: an oxidative challenge." Biometals **23**(5): 927-940.

Czaja, M. J. (2016). "Function of Autophagy in Nonalcoholic Fatty Liver Disease." Dig Dis Sci **61**(5): 1304-1313.

Dai, S., Z. Yin, G. Yuan, H. Lu, R. Jia, J. Xu, X. Song, L. Li, Y. Shu, X. Liang, C. He, C. Lv and W. Zhang (2013). "Quantification of metallothionein on the liver and kidney of rats by subchronic lead and cadmium in combination." Environ Toxicol Pharmacol **36**(3): 1207-1216.

de Angelis, C., M. Galdiero, C. Pivonello, C. Salzano, D. Gianfrilli, P. Piscitelli, A. Lenzi, A. Colao and R. Pivonello (2017). "The environment and male reproduction: The effect of cadmium exposure on reproductive function and its implication in fertility." Reprod Toxicol **73**: 105-127.

DeBosch, B. J., M. R. Heitmeier, A. L. Mayer, C. B. Higgins, J. R. Crowley, T. E. Kraft, M. Chi, E. P. Newberry, Z. Chen, B. N. Finck, N. O. Davidson, K. E. Yarasheski, P. W. Hruz and K. H. Moley (2016). "Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis." Sci Signal **9**(416): ra21.

Deponte, M. (2017). "The Incomplete Glutathione Puzzle: Just Guessing at Numbers and Figures?" Antioxid Redox Signal **27**(15): 1130-1161.

Dominguez-Perez, M., N. Nuno-Lambarri, D. Clavijo-Cornejo, A. Luna-Lopez, V. Souza, L. Bucio, R. U. Miranda, L. Munoz, L. E. Gomez-Quiroz, S. Uribe-Carvajal and M. C. Gutierrez-Ruiz (2016). "Hepatocyte Growth Factor Reduces Free

Cholesterol-Mediated Lipotoxicity in Primary Hepatocytes by Countering Oxidative Stress." Oxid Med Cell Longev **2016**: 7960386.

Dziegiel, P., B. Pula, C. Kobierzycki, M. Stasioleck and M. Podhorska-Okolow (2016). Metallothioneins in normal and cancer cells. Switzerland, Springer International Publishing.

EFSA (2013). "European Food Safety Authority."

El Bassat, H., D. H. Ziada, E. A. Hasby, H. Nagy and M. H. Abo Ryia (2014). "Apoptotic and anti-apoptotic seromarkers for assessment of disease severity of non-alcoholic steatohepatitis." Arab J Gastroenterol **15**(1): 6-11.

Enriquez-Cortina, C., O. Bello-Monroy, P. Rosales-Cruz, V. Souza, R. U. Miranda, R. Toledo-Perez, A. Luna-Lopez, A. Simoni-Nieves, R. Hernandez-Pando, M. C. Gutierrez-Ruiz, D. F. Calvisi, J. U. Marquardt, L. Bucio and L. E. Gomez-Quiroz (2017). "Cholesterol overload in the liver aggravates oxidative stress-mediated DNA damage and accelerates hepatocarcinogenesis." Oncotarget **8**(61): 104136-104148.

Farkas, A., C. Erratico and L. Vigano (2007). "Assessment of the environmental significance of heavy metal pollution in surficial sediments of the River Po." Chemosphere **68**(4): 761-768.

Friedman, S. L., B. A. Neuschwander-Tetri, M. Rinella and A. J. Sanyal (2018). "Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies." Nat Med **24**(7): 908-922.

Garcia-Ruiz, C., V. Ribas, A. Baulies and J. C. Fernandez-Checa (2017). "Mitochondrial Cholesterol and the Paradox in Cell Death." Handb Exp Pharmacol **240**: 189-210.

Gaucher, C., A. Boudier, J. Bonetti, I. Clarot, P. Leroy and M. Parent (2018). "Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies." Antioxidants (Basel) **7**(5).

Go, Y. M., R. L. Sutliff, J. D. Chandler, R. Khalidur, B. Y. Kang, F. A. Anania, M. Orr, L. Hao, B. A. Fowler and D. P. Jones (2015). "Low-Dose Cadmium Causes Metabolic and Genetic Dysregulation Associated With Fatty Liver Disease in Mice." Toxicol Sci **147**(2): 524-534.

Gonzalez-Rodriguez, A., R. Mayoral, N. Agra, M. P. Valdecantos, V. Pardo, M. E. Miquilena-Colina, J. Vargas-Castrillon, O. Lo Iacono, M. Corazzari, G. M. Fimia, M. Piacentini, J. Muntane, L. Bosca, C. Garcia-Monzon, P. Martin-Sanz and A. M. Valverde (2014). "Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD." Cell Death Dis **5**: e1179.

Guo, F., Y. Ma, A. K. Kadegowda, J. L. Betters, P. Xie, G. Liu, X. Liu, H. Miao, J. Ou, X. Su, Z. Zheng, B. Xue, H. Shi and L. Yu (2013). "Deficiency of liver Comparative Gene Identification-58 causes steatohepatitis and fibrosis in mice." J Lipid Res **54**(8): 2109-2120.

Hughes, C. M., C. A. McCullough, I. Bradbury, C. Boyde, D. Hume, J. Yuan, F. Quinn and S. M. McDonough (2009). "Acupuncture and reflexology for insomnia: a feasibility study." Acupunct Med **27**(4): 163-168.

Hyder, O., M. Chung, D. Cosgrove, J. M. Herman, Z. Li, A. Firoozmand, A. Gurakar, A. Koteish and T. M. Pawlik (2013). "Cadmium exposure and liver disease among US adults." J Gastrointest Surg **17**(7): 1265-1273.

IMSS (2014). Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Hepática Grasa No Alcohólica del Adulto. México, Intituto Mexicano del Seguro Social.

Ioannou, G. N., W. G. Haigh, D. Thorning and C. Savard (2013). "Hepatic cholesterol crystals and crown-like structures distinguish NASH from simple steatosis." J Lipid Res **54**(5): 1326-1334.

Kao, C. H., S. J. Wang, C. T. Ting and Y. T. Chen (1996). "'Reverse redistribution pattern' during myocardial perfusion imaging with 99Tcm-MIBI." Nucl Med Commun **17**(5): 397-399.

Katsiki, N., D. P. Mikhailidis and C. S. Mantzoros (2016). "Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: An update." Metabolism.

Kawakami, T., K. Nishiyama, Y. Kadota, M. Sato, M. Inoue and S. Suzuki (2013). "Cadmium modulates adipocyte functions in metallothionein-null mice." Toxicol Appl Pharmacol **272**(3): 625-636.

Kawano, Y. and D. E. Cohen (2013). "Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease." J Gastroenterol **48**(4): 434-441.

Kleiner, D. E. and H. R. Makhlof (2016). "Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children." Clin Liver Dis **20**(2): 293-312.

Klionsky, D. J. and S. M. Zughair (2016). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)." Autophagy **12**(1): 1-222.

Krejsa, C. M., C. C. Franklin, C. C. White, J. A. Ledbetter, G. L. Schieven and T. J. Kavanagh (2010). "Rapid activation of glutamate cysteine ligase following oxidative stress." J Biol Chem **285**(21): 16116-16124.

Larregle, E. V., S. M. Varas, L. B. Oliveros, L. D. Martinez, R. Anton, E. Marchevsky and M. S. Gimenez (2008). "Lipid metabolism in liver of rat exposed to cadmium." Food Chem Toxicol **46**(5): 1786-1792.

Ling, X. B., H. W. Wei, J. Wang, Y. Q. Kong, Y. Y. Wu, J. L. Guo, T. F. Li and J. K. Li (2016). "Mammalian Metallothionein-2A and Oxidative Stress." Int J Mol Sci **17**(9).

Liu, J., W. Qu and M. B. Kadiiska (2009). "Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis." Toxicol Appl Pharmacol **238**(3): 209-214.

Liu, Y., M. Dai, Y. Bi, M. Xu, Y. Xu, M. Li, T. Wang, F. Huang, B. Xu, J. Zhang, X. Li, W. Wang and G. Ning (2013b). "Active smoking, passive smoking, and risk of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population-based study in China." J Epidemiol **23**(2): 115-121.

Lopez-Islas, A., V. Chagoya-Hazas, B. Perez-Aguilar, M. Palestino-Dominguez, V. Souza, R. U. Miranda, L. Bucio, L. E. Gomez-Quiroz and M. C. Gutierrez-Ruiz (2016). "Cholesterol Enhances the Toxic Effect of Ethanol and Acetaldehyde in Primary Mouse Hepatocytes." Oxid Med Cell Longev **2016**: 9209825.

Luna-Lopez, A., V. Y. Gonzalez-Puertos, J. Romero-Ontiveros, J. L. Ventura-Gallegos, A. Zentella, L. E. Gomez-Quiroz and M. Konigsberg (2013). "A noncanonical NF-kappaB pathway through the p50 subunit regulates Bcl-2 overexpression during an oxidative-conditioning hormesis response." Free Radic Biol Med **63**: 41-50.

Mari, M., F. Caballero, A. Colell, A. Morales, J. Caballeria, A. Fernandez, C. Enrich, J. C. Fernandez-Checa and C. Garcia-Ruiz (2006). "Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis." Cell Metab **4**(3): 185-198.

Martinez Flores, K., B. C. Uribe Marin, V. Souza Arroyo, L. Bucio Ortiz, A. Lopez Reyes, L. E. Gomez-Quiroz, E. Rojas del Castillo and M. C. Gutierrez Ruiz (2013a). "Hepatocytes display a compensatory survival response against cadmium toxicity by a mechanism mediated by EGFR and Src." Toxicol In Vitro **27**(3): 1031-1042.

Martínez-Flores, K., A. V. Souza, O. L. Bucio, L. E. Gómez-Quiroz and M. C. Gutiérrez-Ruiz (2013b). "Cadmio: Efectos sobre la salud, respuesta celular y molecular." ATA. Acta Toxicológica Argentina **21**.

Mashek, D. G., S. A. Khan, A. Sathyanarayan, J. M. Ploeger and M. P. Franklin (2015). "Hepatic lipid droplet biology: Getting to the root of fatty liver." Hepatology **62**(3): 964-967.

Matovic, V., A. Buha, D. Ethukic-Cosic and Z. Bulat (2015). "Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys." Food Chem Toxicol **78**: 130-140.

Matsuzawa, N., T. Takamura, S. Kurita, H. Misu, T. Ota, H. Ando, M. Yokoyama, M. Honda, Y. Zen, Y. Nakanuma, K. Miyamoto and S. Kaneko (2007). "Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet." Hepatology **46**(5): 1392-1403.

Miyake, T., T. Kumagi, S. Furukawa, Y. Tokumoto, M. Hirooka, M. Abe, Y. Hiasa, B. Matsuura and M. Onji (2013). "Non-alcoholic fatty liver disease: factors associated with its presence and onset." J Gastroenterol Hepatol **28 Suppl 4**: 71-78.

Moulis, J. M. and F. Thevenod (2010). "New perspectives in cadmium toxicity: an introduction." Biometals **23**(5): 763-768.

Musso, G., R. Gambino and M. Cassader (2013). "Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis." Prog Lipid Res **52**(1): 175-191.

Nagamine, T. and K. Nakajima (2013). "Significance of metallothionein expression in liver disease." Curr Pharm Biotechnol **14**(4): 420-426.

Neuschwander-Tetri, B. A. (2010). "Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites." Hepatology **52**(2): 774-788.

Nuno-Lambarri, N., M. Dominguez-Perez, A. Baulies-Domenech, M. J. Monte, J. J. Marin, P. Rosales-Cruz, V. Souza, R. U. Miranda, L. Bucio, E. E. Montalvo-Jave, M. Concepcion Gutierrez-Ruiz, C. Garcia-Ruiz, J. C. Fernandez-Checa and L. E. Gomez-Quiroz (2016). "Liver Cholesterol Overload Aggravates Obstructive Cholestasis by Inducing Oxidative Stress and Premature Death in Mice." Oxid Med Cell Longev **2016**: 9895176.

Ofosu, A., D. Ramai and M. Reddy (2018). "Non-alcoholic fatty liver disease: controlling an emerging epidemic, challenges, and future directions." Ann Gastroenterol **31**(3): 288-295.

Ololade, I. A., L. Lajide, V. O. Olumekun, O. O. Ololade and B. C. Ejelonu (2011). "Influence of diffuse and chronic metal pollution in water and sediments on edible seafoods within Ondo oil-polluted coastal region, Nigeria." J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng **46**(8): 898-908.

OMS. (2016). "La salud de México en cifras." Salud en cifras Retrieved 29-Mayo-2018, 2018, from https://www.paho.org/mex/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=780&Itemid=310.

OPS (2012). Salud en las Américas. Panorama regional y perfiles de país.

Perla, F. M., M. Prelati, M. Lavorato, D. Visicchio and C. Anania (2017). "The Role of Lipid and Lipoprotein Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." Children (Basel) **4**(6).

Potts, R. J., I. A. Bessalov, S. S. Wallace, R. J. Melamed and B. A. Hart (2001). "Inhibition of oxidative DNA repair in cadmium-adapted alveolar epithelial cells and the potential involvement of metallothionein." Toxicology **161**(1-2): 25-38.

Ramos-Trevino, J., S. Bassol-Mayagoitia, J. A. Hernandez-Ibarra, P. Ruiz-Flores and M. P. Nava-Hernandez (2018). "Toxic Effect of Cadmium, Lead, and Arsenic on the Sertoli Cell: Mechanisms of Damage Involved." DNA Cell Biol **37**(7): 600-608.

Rani, A., A. Kumar, A. Lal and M. Pant (2014). "Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review." Int J Environ Health Res **24**(4): 378-399.

Rapisarda, V., C. Loreto, M. Malaguarnera, A. Ardiri, M. Proiti, G. Rigano, E. Frazzetto, M. I. Ruggeri, G. Malaguarnera, N. Bertino, M. Malaguarnera, V. E. Catania, I. Di Carlo, A. Toro, E. Bertino, D. Mangano and G. Bertino (2016). "Hepatocellular carcinoma and the risk of occupational exposure." World J Hepatol **8**(13): 573-590.

Rolo, A. P., J. S. Teodoro and C. M. Palmeira (2012). "Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis." Free Radic Biol Med **52**(1): 59-69.

Rubino, F. M. (2015). "Toxicity of Glutathione-Binding Metals: A Review of Targets and Mechanisms." Toxics **3**(1): 20-62.

Salud, S. d. (2010). "Rendición de cuentas en salud 2010." Retrieved 30-Mayo-2018, from http://www.dged.salud.gob.mx/contenidos/dedss/descargas/rcs/RCS_09_6_Dic.pdf

Sandbichler, A. M. and M. Hockner (2016). "Cadmium Protection Strategies--A Hidden Trade-Off?" Int J Mol Sci **17**(1).

Sayiner, M., A. Koenig, L. Henry and Z. M. Younossi (2016). "Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World." Clin Liver Dis **20**(2): 205-214.

Schneider, A. L., M. Lazo, E. Selvin and J. M. Clark (2014). "Racial differences in nonalcoholic fatty liver disease in the U.S. population." Obesity (Silver Spring) **22**(1): 292-299.

Schwenger, K. J. and J. P. Allard (2014). "Clinical approaches to non-alcoholic fatty liver disease." World J Gastroenterol **20**(7): 1712-1723.

Serviddio, G., F. Bellanti and G. Vendemiale (2013). "Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease." Free Radic Biol Med **65**: 952-968.

Serviddio, G., F. Bellanti, R. Villani, R. Tamborra, C. Zerbinati, M. Blonda, M. Ciacciarelli, G. Poli, G. Vendemiale and L. Iuliano (2016). "Effects of dietary fatty acids and cholesterol excess on liver injury: A lipidomic approach." Redox Biol **9**: 296-305.

Sharma, B., S. Singh and N. J. Siddiqi (2014). "Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems." Biomed Res Int **2014**: 640754.

Singh, R., S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, K. Tanaka, A. M. Cuervo and M. J. Czaja (2009). "Autophagy regulates lipid metabolism." Nature **458**(7242): 1131-1135.

Souza, V., L. Bucio and M. C. Gutierrez-Ruiz (1997). "Cadmium uptake by a human hepatic cell line (WRL-68 cells)." Toxicology **120**(3): 215-220.

Souza, V., L. Bucio, D. Jay, E. Chavez and M. C. Gutierrez-Ruiz (1996). "Effect of cadmium on calcium transport in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells)." Toxicology **112**(2): 97-104.

Souza, V., M. C. Escobar, L. Bucio, E. Hernandez, L. E. Gomez-Quiroz and M. C. Gutierrez Ruiz (2009). "NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced-STAT3 activation in HepG2 cells." Toxicol Lett **187**(3): 180-186.

Souza, V., M. C. Escobar, L. Gomez-Quiroz, L. Bucio, E. Hernandez, E. C. Cossio and M. C. Gutierrez-Ruiz (2004). "Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells." Toxicology **197**(3): 213-228.

Stankov, M. V., D. Panayotova-Dimitrova, M. Leverkus, F. W. Vondran, R. Bauerfeind, A. Binz and G. M. Behrens (2012). "Autophagy inhibition due to thymidine analogues as novel mechanism leading to hepatocyte dysfunction and lipid accumulation." AIDS **26**(16): 1995-2006.

Storelli, M. M. (2009). "Intake of essential minerals and metals via consumption of seafood from the Mediterranean Sea." J Food Prot **72**(5): 1116-1120.

Straub, B. K., P. Stoeffel, H. Heid, R. Zimbelmann and P. Schirmacher (2008). "Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis." Hepatology **47**(6): 1936-1946.

Su, W., Y. Wang, X. Jia, W. Wu, L. Li, X. Tian, S. Li, C. Wang, H. Xu, J. Cao, Q. Han, S. Xu, Y. Chen, Y. Zhong, X. Zhang, P. Liu, J. A. Gustafsson and Y. Guan (2014). "Comparative proteomic study reveals 17beta-HSD13 as a pathogenic

protein in nonalcoholic fatty liver disease." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(31): 11437-11442.

Templeton, D. M. and Y. Liu (2010). "Multiple roles of cadmium in cell death and survival." Chem Biol Interact **188**(2): 267-275.

Thevenod, F. (2009). "Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be?" Toxicol Appl Pharmacol **238**(3): 221-239.

Thevenod, F. and W. K. Lee (2013). "Toxicology of cadmium and its damage to mammalian organs." Met Ions Life Sci **11**: 415-490.

Thijssen, S., A. Cuypers, J. Maringwa, K. Smeets, N. Horemans, I. Lambrichts and E. Van Kerkhove (2007). "Low cadmium exposure triggers a biphasic oxidative stress response in mice kidneys." Toxicology **236**(1-2): 29-41.

Titchenell, P. M., M. A. Lazar and M. J. Birnbaum (2017). "Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin." Trends Endocrinol Metab **28**(7): 497-505.

Valko, M., K. Jomova, C. J. Rhodes, K. Kuca and K. Musilek (2016). "Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease." Arch Toxicol **90**(1): 1-37.

Wang, K. (2016). "Molecular mechanism of hepatic steatosis: pathophysiological role of autophagy." Expert Rev Mol Med **18**: e14.

Wang, T., Q. Wang, R. Song, Y. Zhang, J. Yang, Y. Wang, Y. Yuan, J. Bian, X. Liu, J. Gu, J. Zhu and Z. Liu (2016). "Cadmium induced inhibition of autophagy is associated with microtubule disruption and mitochondrial dysfunction in primary rat cerebral cortical neurons." Neurotoxicol Teratol **53**: 11-18.

Wang, T., Q. Wang, R. Song, Y. Zhang, K. Zhang, Y. Yuan, J. Bian, X. Liu, J. Gu and Z. Liu (2015). "Autophagy Plays a Cytoprotective Role During Cadmium-Induced Oxidative Damage in Primary Neuronal Cultures." Biol Trace Elem Res.

Wang, Y., A. K. Mandal, Y. O. Son, P. Pratheeshkumar, J. T. F. Wise, L. Wang, Z. Zhang, X. Shi and Z. Chen (2018). "Roles of ROS, Nrf2, and autophagy in cadmium-carcinogenesis and its prevention by sulforaphane." Toxicol Appl Pharmacol **353**: 23-30.

WHO (2003). Cadmium Review. Health, Nordic Council of Ministers: 24.

Yamaguchi, K., L. Yang, S. McCall, J. Huang, X. X. Yu, S. K. Pandey, S. Bhanot, B. P. Monia, Y. X. Li and A. M. Diehl (2007). "Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **45**(6): 1366-1374.

Younossi, Z., Q. M. Anstee, M. Marietti, T. Hardy, L. Henry, M. Eslam, J. George and E. Bugianesi (2018). "Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **15**(1): 11-20.

Yuan, H., J. Y. Shyy and M. Martins-Green (2009). "Second-hand smoke stimulates lipid accumulation in the liver by modulating AMPK and SREBP-1." J Hepatol **51**(3): 535-547.

Zhang, J. (2013). "Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control." Redox Biol **1**(1): 19-23.

Cadmium exposure exacerbates hyperlipidemia in cholesterol-overloaded hepatocytes via autophagy dysregulation

Patricia Rosales-Cruz^{a,b,d}, Mayra Domínguez-Pérez^{b,c}, Elizabeth Reyes-Zárate^b, Oscar Bello-Monroy^{a,b}, Cristina Enríquez-Cortina^{a,c}, Roxana Miranda-Labra^{b,d}, Leticia Bucio^{b,d}, Luis Enrique Gómez-Quiroz^{b,d}, Emilio Rojas-Del Castillo^e, María Concepción Gutiérrez-Ruiz^{b,d,*}, Verónica Souza-Arroyo^{b,d,*}

^a Posgrado en Biología Experimental, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico

^b Laboratorio de Fisiología Celular, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico

^c Laboratorio de Genómica de Enfermedades Cardiovasculares, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico

^d Laboratorio de Medicina Experimental, Unidad de Medicina Translacional, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM/Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

^e Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

NAFLD
Cadmium
ROS
Cholesterol
Metallothionein
Autophagy

ABSTRACT

Metabolic factors are the major risk of non-alcoholic fatty liver disease, although other factors may contribute to steatosis. Cadmium exposure produces histopathological and molecular changes in liver, which are consistent with steatosis. In the present study, we describe the effect of low cadmium acute treatment on hepatocytes obtained from mice fed with a high cholesterol diet. Our data suggest that hepatocytes with cholesterol overload promote an adaptive response against cadmium-induced acute toxicity by up-regulating anti-apoptotic proteins, managing ROS overproduction, increasing GSH synthesis and MT-II content to avoid protein oxidation. Cadmium treatment increases lipid content in cholesterol-fed mice hepatocytes because of an impaired autophagy process. Our data suggest an essential function of macroautophagy in the regulation of lipid storage induced by Cd on hepatocytes, that implies that alterations in this pathway may be a mechanism that aggravates hepatic steatosis.

1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common cause of liver disease worldwide, with a prevalence of 15%–30% in Western populations (Calzadilla and Adams, 2016), meanwhile in childhood the estimated prevalence of NAFLD in obese children is rising to 40–70%. The hallmark of NAFLD is lipid accumulation in the hepatocytes that defines liver abnormalities ranging from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) with or without cirrhosis development (Streba et al., 2015).

Different cellular organelles have distinct and tightly regulated cholesterol content and lipid composition, with vast majority 60–90% of total cholesterol residing in the plasma membrane, the endoplasmic reticulum and mitochondria have lower content (3–5% of the total cellular cholesterol) and are highly sensitive to membrane fluidity loss induced by cholesterol enrichment (Luo et al., 2017).

In consequence cholesterol overload in the liver has been strongly associated to an enhancement of the damage due to a second insult such alcohol, bile duct ligation, or chemicals, these finding have positioned this lipid as a key determinant in the liver disease progression (Musso et al., 2013). Mari et al. (2006) reported that free cholesterol accumulation, but not triglycerides or free fatty acids play a key role as a first hit, because it sensitizes to inflammatory cytokines-mediated steatohepatitis (NASH). According to this, previous studies from our lab reported that cholesterol overload is a determinant factor that could maintain or aggravate the alcohol-induced liver damage (Lopez-Islas et al., 2016), besides a high-cholesterol diet can lead to oxidative stress that aggravates steatosis (Dominguez-Perez et al., 2016) and it had been proposed that patients with cholesterol liver overload could have more risk of developing clinical complications associated with cholestasis (Nuno-Lambarri et al., 2016). Thus, it is clear that cholesterol overload is a hallmark in the progression and poor prognosis of liver

* Corresponding author at: Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, Iztapalapa, D.F. 09340, México.

E-mail address: veso@xanum.uam.mx (V. Souza-Arroyo).

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.02.007>

Received 12 January 2018; Received in revised form 13 February 2018; Accepted 23 February 2018

Available online 24 February 2018

0300-483X/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

diseases.

The mechanisms for NAFLD pathogenesis are not completely understood. Nevertheless, recent studies suggest that autophagy is another way to degrade lipids besides cytosolic lipases (Ueno and Komatsu, 2017). Treatment with rapamycin, a pharmacological stimulator of autophagy, significantly decreases lipid droplets (Farah et al., 2016). Autophagy, is a ROS-dependent process (Basit et al., 2017) that facilitate lipid elimination on procedure that has been termed lipophagy. The initial finding that prompted interest in the involvement of autophagy in NAFLD was that macroautophagy mediates hepatocyte metabolism of intracellular lipids (Czaja, 2016), because both a pharmacological inhibition of autophagy and genetic knockdown of key autophagy genes increased lipid content in cultured hepatocytes in response to lipid challenges such as free fatty acid supplementation (Singh et al., 2009).

Cadmium (Cd) a rare, but widely dispersed element, is found naturally in the environment, but has been widely dispersed by different anthropogenic activities. Once in the environment, Cd moves easily through the soil and is taken up into the food chain (Sandbichler and Hockner, 2016) (Song et al., 2017). Human uptake occurs mainly by diet and exposure to cigarette smoke (Sekovanic et al., 2018).

Cd levels in the body increase over time because its slow elimination, and the principal organs affected by cadmium's toxicity are kidneys, liver, testes, bones and some of the cardiovascular system (Messner et al., 2016).

Different reports show that Cd produces cellular toxicity through different mechanisms like ionic mimicry (Souza et al., 1996, Souza et al., 1997, Choong et al., 2014) DNA damage (Lopez-Ortal et al., 1999) oxidative stress (Souza et al., 2004, Souza et al., 2009), protein mis- or unfolding malfunction and eventually endoplasmic reticulum (ER) stress (Thevenod and Lee, 2013).

Cadmium-induced reactive oxygen species (ROS) can interact with the cellular defense via the activation of MAPKs and other signaling pathways (Escobar et al., 2009, Martinez et al., 2013, Nemmiche, 2017) which promote the expression of metal binding proteins, such as metallothioneins (MTs) and some antioxidant enzymes, as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione cysteine ligase (GCL) (Shinkai et al., 2016).

Metabolic disorders are major risk factors for NAFLD, although other factors may also contribute to development of fatty liver disease. Lin (Lin et al., 2017) suggests a significant association between exposure to soil heavy metals and fatty liver disease in lean men. Besides environmental Cd exposure has been associated with hepatic necroinflammation, NAFLD and NASH in men (Hyder et al., 2013). Epidemiology studies found that NAFLD, common in USA adults, is associated with Cd burden (Go et al., 2015). Moreover Cd exposure exacerbates severe hyperlipidemia and fatty liver changes in zebrafish via enhancement of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity (Kim et al., 2017). In this study the aim was to explore the effect of an acute Cd treatment on hepatocytes with a cholesterol overload.

2. Materials and methods

2.1. Animal model

CD-1 male mice (8–10-weeks-old) were maintained in pathogen-free conditions with controlled temperature and humidity on a 12h light-dark cycle. The experimental protocol was approved for the Ethic Animal Care Committee of the Universidad Autonoma Metropolitana. All animals were maintained in specific pathogen-free housing and cared for in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.2. Experimental design

2.2.1. Mice

Twenty 8-weeks-old CD-1 mice were randomly separated in two groups: the first one was fed with a high cholesterol diet (HC, 1% cholesterol and 0.5% sodium cholate, Dyets, Inc.) for 48 h the second group was fed with control standard Chow diet (CW, Purina #5001) for the same time. A control group was fed with sodium cholate (0.5%) supplemented Chow diet. Animals received water *ad libitum*.

2.2.2. Histological analysis

After treatments, animals were weighed and sacrificed; livers were excised and weighed. Liver sections from HC and CW mice were fixed in absolute ethanol and embedded in paraffin for routine hematoxylin and eosin (H&E) staining.

2.2.3. Primary mouse hepatocytes isolation and culture

Hepatocytes were isolated by the two-step collagenase perfusion technique as previously described (Clavijo-Cornejo et al., 2013). Freshly isolated hepatocytes were seeded at 254,000 cells/cm² in Petri dishes (Corning, USA) using Williams' E medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Hyclone Laboratories Inc., Logan Utah, USA). The cells were incubated at 37 °C (5% CO₂ and 95% air at saturation humidity) and checked for adherence of monolayer after 4 h. Once adhered, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and the medium was replaced for a serum-free basal hepatocyte growth medium. The following day, cells were treated or not with serum-free basal growth medium with 25 nM CdCl₂.

2.2.4. Cadmium treatment

Hepatocytes were treated with CdCl₂ for different times (5, 10, 15, 30 min, 1, 3, 6 or 12 h). After Cd treatment, cells were washed twice with PBS, and cells were lysed. Control cells without CdCl₂ were seeded at the same time. All experiments were conducted at least by triplicate.

2.3. Cell viability

Cell viability was evaluated by crystal violet-staining assay as described by (Nakagawa, 1996).

2.4. Analysis of liver function

Serum activity of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were determined by automated method using Reflotron Plus (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain).

2.5. Neutral lipid determination

Cells incubated or not with CdCl₂, were washed carefully with PBS pH 7.4 after treatment. Oil red O staining was performed as described by Hernández et al. (Hernández et al., 2015). Briefly, hepatocytes were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and stained with 0.2% freshly prepared Oil Red O (ORO) solution for 1 h. After rinsing with PBS, cells were counterstain with hematoxylin. After obtaining representative images, Oil red O was removed using 1 ml of isopropyl alcohol for 10 min, followed by gently extraction. Oil red O optical density measurement was done at wavelength 510 nm.

2.6. Free cholesterol determination with filipin staining and quantification

Isolated hepatocytes were fixed with formalin 10% for one hour at room temperature. For free cholesterol determination, cells were incubated with filipin as previously reported (Lopez-Islas et al., 2016). After 3 final washes in PBS, cells were mounted and confocal (NLO780 Carl Zeiss) microscopy images were collected using UV light excitation. The quantification of free cholesterol was assessed using the Total

Cholesterol Assay Kit (Cell Biolabs, Inc., San Diego CA, USA) following the manufacturer instructions.

2.7. Reactive oxygen species (ROS) detection

Intracellular ROS was monitored by the incorporation of 6-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma Aldrich) for peroxides and the by dihydroethidium (DHE) for superoxide anion. Hepatocytes were exposed to 25 nM of CdCl₂ at different periods of time. After treatment, cells were washed with PBS and incubated with 5 μM DCFH-DA or 1 μM DHE respectively for 15 min at 37 °C. The fluorescence intensity was observed in an AX10 Inverted Fluorescence Microscope (Axio Observer Z1 Zeiss) as previously reported (Enriquez-Cortina et al., 2017).

2.8. Protein oxidation

Carbonyl modification of proteins is a key biomarker for the identification of oxidative stress and was addressed by using Oxyblot Protein Oxidation Detection kit (Millipore, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer instructions.

2.9. Glutathione content

Reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione were determined using the Glutathione assay kit (Sigma Aldrich, St Louis Missouri, USA) according to the manufacturer instructions. The biological samples are first deproteinized with the 5% 5-Sulfosalicylic Acid Solution, centrifuged to remove the precipitated protein, and then assayed for glutathione. The measurement of GSH uses a kinetic assay in which catalytic amounts (nmoles) of GSH cause a continuous reduction of 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to TNB, and the GSSG formed is recycled by glutathione reductase and NADPH. The GSSG present will also react to give a positive value in this reaction. To avoid fast oxidation of GSH we kept the samples at 28 °C during the assay.

2.10. Cell lysis and western blot

Hepatocytes were washed twice with ice-cold PBS after treatment. Cells were collected and centrifuged to obtain the pellet, that was resuspended 100 μl of lysis buffer: 20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl (J.T. Backer) and 1% Igepal pH 8.0, supplemented with proteases inhibitor and phosphatases inhibitor COMPLETE and phosSTOP respectively (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) (Table 1).

Western blot procedure was performed as we previously reported

(Valdes-Arzate et al., 2009). Bax and Bcl-2 (Santa Cruz, 1:200), Cleaved-Caspase 3, LC-3 and p62 (Cell Signaling, 1:000), MT-II (Enzo, 1:200) and Actin (Sigma Aldrich) as loading control were detected by this technique. Immunodetection was performed using primary antibody listed in Table 1. Secondary antibody was horseradish peroxidase-conjugated and was used according primary antibodies. Blots were revealed using luminol. Protein bands were scanned and the band intensities quantified using a densitometer Imaging System (Gel Logic 1500, Kodak).

2.11. Protein content determination

Total protein concentration was determined using the bicinchoninic acid (BCA) (Pierce Chemical, USA) assay according to the manufacturer's instructions.

2.12. Statistical analysis

The data are presented as mean ± S.E. for at least three independent experiments carried out by triplicate. Comparisons between groups were made using ANOVA test with a Tukey post-hoc analysis. Differences were considered significant at $p < 0.05$. The Prism software version 6 was used to run the analysis.

3. Results

3.1. High cholesterol diet induces steatosis and liver damage

Previously, our group published that a high cholesterol diet (2% cholesterol, 0.5% sodium cholate) induces liver overload of cholesterol and neutral lipids, conditioning to hepatocellular damage and liver disease. In the present work, we have decreased the percentage of cholesterol to 1%, in order to figure out the impact of a lesser cholesterol intake. Although the content of cholesterol in the diet was decreased liver remains uploading cholesterol and damage is still present. After 48 h under cholesterol diet, mice were sacrificed. Fig. 1A shows gross inspection of the livers where you could observe hepatomegaly, vesicular hypertrophy and the characteristic pale color of the fatty liver comparing with control diet. Hepatomegaly was confirmed by liver to body weight ratio (Fig. 1B).

The hepatic histology by H&E routine staining (Fig. 1C) showed slight micro vesicular steatosis. Also, there are swollen and bigger hepatocytes as well as presence of inflammatory infiltrate (yellow arrow) in HC mice compared with CW. No difference was found in mice fed with sodium cholate (0.5%) supplemented diet (Supplementary Fig. 1A) comparing with CW, corroborating that cholate did not induce physiological or morphological changes.

A significant increment of AST and ALT activity were determined in HC mice, clearly indicating liver damage with HC diet (Fig. 1D). The use of a diet with a lesser cholesterol content (1%) than previous works, clearly shows that liver lipid overload and damage persist.

Hepatocytes isolated from HC mice and cultured for 24 h were hypertrophic exhibiting a remarkable increase in lipid content judged by bright field microscopy and by ORO staining respectively (Fig. 2A–B), compared with CW; quantification of oil red clearly showed higher content of lipids in HC hepatocytes than CW (Fig. 2C). Cholesterol overload was corroborated with free cholesterol determination (Fig. 2D).

3.2. Hepatocytes from HC animals exhibit Cd-induced apoptosis resistance.

Cell viability was determined by crystal violet-staining assay, and we found that Cd decreased cell viability in both, HC and CW hepatocytes in a concentration and time dependent manner. Surprisingly, HC cells had greater viability than hepatocytes from mice with Chow diet in the presence of low Cd concentration treatment after 3 h exposure in

Table 1
Western blot Antibodies.

	Primary	MW kDa	Host	Dilution	Brand
1	Actin	42	Mouse	1:10000	Sigma, A3854
2	Bax	23	Rabbit	1:200	Santa Cruz, sc-6236
3	Bcl-2	26	Rabbit	1:200	Santa Cruz, sc-492
4	Catalase	60	Rabbit	1:10000	Sigma Aldrich, c0979
5	Cleaved Caspase-3	17,19	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, 9661
6	GCL	73	Mouse	1:200	Santa Cruz, sc-166356
7	LC3 B (I y II)	17,19	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, 2775S
8	Metallothionein	15	Mouse	1:500	Enzo, ADI-SPA-550
9	mTOR	289	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, 2972
10	p62/SQSTM1	62	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, 5114
11	P70S6K1	70,85	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, 9202
12	pAMPK-α	62	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, 2535
13	pmTOR	289	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, 2971
14	pP70S6K1	70,85	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, 9205
15	Raptor	150	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, 2280
16	SOD1	23	Rabbit	1:200	Santa Cruz, sc-11407
17	SOD2	25	Rabbit	1:1000	GeneTex, GTX116093

Antibodies used in the study.

Fig. 1. Cholesterol overload model establishment. Mice were fed with CW diet or HC diet for 48 h. (A) Livers were isolated and photographed for morphology recording. (B) Liver/Body weight rate. (C) Representative micrographs of H&E staining (200X). (D) Plasma AST and ALT levels. Results are expressed as international units (UI). Each bar represents the mean S.E. of at least five different animals. *Significantly different from CW ($p < 0.05$).

all times determined (Supplementary Fig. 2). In order to address the molecular events exerted by Cd on cholesterol overloaded hepatocytes we chose 25 nM CdCl₂, a concentration that preserves the highest survival percentages at 12 h of treatment, 77.1% and 84.7% in CW and HC respectively (Fig. 3).

To corroborate this finding, we evaluated the expression of Bax and Bcl-2 by Western blot in CW and HC hepatocytes exposed to 25 nM CdCl₂. Interestingly, the Bax to Bcl-2 ratio exhibited a significantly

decrease in HC cells treated with Cd in all times determined (Fig. 4A), suggesting apoptosis resistance. At the same time caspase 3 activation was addressed by Western blot, Fig. 4B shows that caspase 3 was significantly decreased in HC cells treated with Cd, comparing with CW cells, indicating that apoptosis was decreased in HC hepatocytes treated with Cd.

Fig. 2. Hepatocyte primary culture morphology. (A) Representative bright field microscopy images. (B, C) Oil red O staining of CW and HC diet hepatocytes (320 $\times$) and quantification. Each bar represents the mean S.E. of at least five different animals. *Significantly different from CW ($p < 0.05$). (D) Free cholesterol quantification. Results are expressed in nmol/mg protein. Each bar represents the mean S.E. of at least five different animals. *Significantly different from CW ($p < 0.05$).

Fig. 3. Effect of CdCl₂ treatment on primary cultured mice hepatocytes viability. CW hepatocytes or HC hepatocytes were exposed to 25 nM CdCl₂ for 1, 3, 6 and 12 h and viability was determined by crystal violet-staining assay. Results are expressed as percent viability vs. non-treated cells. Each bar represents the mean S.E. of at least three independent experiments. *Significantly different from NT CW ($p < 0.05$) and # significantly different from NT HC ($p < 0.05$).

3.3. HC hepatocytes exhibited a higher control against Cd induced oxidative stress

ROS are one of the main modulators of cell death and survival, then we proceeded to determine ROS content by DCFH-DA (Fig. 5A) for peroxides; and DHE (Fig. 5B) for superoxide. In both cases, Cd induced ROS production peaking at 10–15 min in CW cells, however HC cells exhibited a sustained superoxide production, even in not treated Cd cells with no changes observed in the course of the experiment. Peroxides production showed a time course response, increasing since 5 min and returning to control values at 60 min (Fig. 5B). This result was corroborated by the analysis of protein oxidation addressed by

Oxyblot (Fig. 5C). Next we determined the content of SOD1, catalase, GCL and MT-II. A marked increase in GCL content was found in HC hepatocytes in a time dependent manner. A relevant increase of MT-II was found, particularly in HC cells (Fig. 5D). GSH/GSSG ratio increased during the course of the experiment, showing the greatest value in HC hepatocytes treated during 12 h with Cd (Fig. 5E). This last result showed that GSH synthesis was higher in 12 h Cd treated HC hepatocytes, compared with Cd treated CW cells at the same time, suggesting that HC cells are more capable to control oxidative damage induced by Cd treatment.

3.4. Cadmium exacerbates the lipid content on hepatocytes

In order to evaluate the effects of Cd in the lipid content, we determined the neutral lipids on hepatocytes from animals under both diets. Remarkably, Cd by itself, induced a rapid accumulation of lipids, determined by ORO. This effect was exacerbated in HC hepatocytes (Fig. 6A–C), being 2.7-fold increase at 12 h of Cd treatment. Also, at this time, free cholesterol content is considerably increased, 3.1-fold in CW + Cd cells, and 2.4-fold in HC + Cd cells, comparing with not treated cells (Fig. 6D). Filipin staining confirmed the free cholesterol content in CW and HC hepatocytes treated with Cd (Fig. 6E).

3.5. Cadmium impairs autophagy in HC hepatocytes

Previous result shows that Cd increased lipid content even in those hepatocytes obtain from Chow diet fed mice (Fig. 7A). As autophagy is one of the key mechanism in lipid clearance in cells (Czaja, 2016), we proceeded to explore if Cd impaired autophagy. We addressed the protein levels of the two key molecules involved in autophagy, Fig. 7B shows the integral autophagosome membrane protein microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) form I and its conversion to form II and p62/sequestosome1, a protein that is degraded by complete autophagy. Fig. 7B shows an increased in LC-3II at 3 h of exposure and an decreased in p62 in CW hepatocytes treated with Cd. Contrary to this,

Fig. 4. Cholesterol overload restrains cadmium-induced apoptosis. (A, B) Densitometric analysis with representative western blots of Bax/Bcl-2 rate and Cleaved-caspase 3, respectively. Hepatocytes were exposed to 25 nM CdCl₂ for different times. The total protein was extracted and prepared for western blot. The results are expressed as fold increase compared with CW not treated cells (NT). Each bar represents the mean S.E. of at least three independent experiments. *Significantly different from NT CW ($p < 0.05$) and # significantly different from NT HC ($p < 0.05$).

Fig. 5. Cholesterol overload increases cadmium-induced ROS generation. The cells exposed to 25 nM CdCl₂ for 5, 10, 15, 30 and 60 min. Intracellular ROS formation was determined by (A) 2', 7'-Dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) fluorescence for peroxides and (B) Dihydroethidium (DHE) fluorescence for superoxide anion. Representative inverted fluorescence microscopy images (200X). (C) The total protein was extracted and prepared for Oxyblot. (D) The total protein was extracted and prepared for western blot. Representative images of at least three independent experiments. (E) The cells were exposed to 25 nM CdCl₂ for 6 and 12 h. GSH and GSSG were measured, results are expressed as fold increase of GSH/GSSG rate compare with non treated cells. Each bar represents the mean S.E. of at least three independent experiments. *Significantly different from NT CW (p < 0.05), # significantly different from NT HC (p < 0.05).

hepatocytes from HC mice show a decrease in LC-3 II protein, and p62 content do not change, suggesting that autophagy is impaired by Cd (Supplementary Fig. 4). The presence of cholesterol seems to abrogate this process, judged by the prevalence of p62 along time.

We proceeded to prove if the opposite process, activation of

autophagy, improves the lipid clearance on hepatocytes. We used trehalose (Th), a glucose-glucose disaccharide that has garnered attention for stimulating cellular autophagy in several cell types, specifically inhibiting hexoses uptake (DeBosch et al., 2016); cells were pre-treated with 100 mM Th for 30 min before Cd exposure. Fig. 7C showed a

Fig. 6. Effect of CdCl₂ treatment on lipid content. A) CW hepatocytes or (B) HC hepatocytes were exposed to 25 nM CdCl₂ for different times. Representative bright field images with Oil red O staining (400X). (C) Optical density of Oil red O at 520nm, results expressed as fold vs. non treated cells. Each bar represents the mean S.E. of at least three independent experiments. *Significantly different from NT CW ($p < 0.05$) and # significantly different from NT HC ($p < 0.05$). (D) Free cholesterol quantification. Results are expressed in nmol/mg protein. Each bar represents the mean S.E. of at least five different animals. *Significantly different from CW ($p < 0.05$) and # significantly different from NT HC ($p < 0.05$). (E) Representative confocal fluorescence images of Filipin stain (400 $\times$).

Fig. 7. Cadmium impairs autophagy. The CW and HC hepatocytes were exposed to 25 nM CdCl₂ for 1, 3, 6 and 12 h. (A) Representative bright field images with Oil red O staining (200 $\times$). (B) The total protein was extracted and prepared for Western blot. Representative Western blot of LC3-II and p62, actin was used as loading control. (C) CW and HC hepatocytes were pre-treated with 100 mM of trehalose for 0.5 h, after that were exposed to 25 nM CdCl₂ for different times. Representative bright-field images with Oil red O staining (200 $\times$). (D) The total protein of pre-treated cells was extracted and prepared for Western blot. Representative Western blot of LC3-II and p62, actin was used as loading control.

Fig. 8. Trehalose reestablishes the autophagy-signaling pathway inhibited by Cd. (A) The hepatocytes were exposed to 25 nM CdCl₂ for 1, 3, 6 and 12 h. (B) The hepatocytes were treated with 100 mM of trehalose for 0.5 h, after were exposed to 25 nM CdCl₂ for 1, 3, 6 and 12 h. The total protein was extracted and prepared for Western blot. Representative Western blot of mTORC1, Raptor, p70S6K1 and AMPK, actin was used as loading control. (C) CW and HC hepatocytes were pre-treated with 100 mM Trehalose or 10 nM Rapamycin for 0.5 h and then exposed to 25 nM CdCl₂ for 12 h. Representative bright-field images with Oil red O staining (200X). (D) Free cholesterol quantification. Results are expressed in nmol/mg protein. Each bar represents the mean $\pm$ S.E. of at least five different animals. *Significantly different from CW ($p < 0.05$) and # significantly different from NT HC ($p < 0.05$). (E) Representative confocal fluorescence images of Filipin stain (200X).

decreased in neutral lipid content in all treatments. Additionally p62 content decreased in HC hepatocytes pretreated with Th and exposed to Cd (Supplementary Fig. 4).

3.6. Cadmium modulates mTORC1 and AMPK signaling pathways to impair autophagy.

Next we assayed the protein content of the main signaling pathway associated to autophagy. Fig. 8A shows that mTOR is over-activated in HC hepatocytes without Cd treatment. It is known that mTOR is an autophagy-suppressive regulator that integrates growth factor, nutrient and energy signals. The inhibition of mTOR leads to the induction of autophagy, and AMPK activity is generally antagonistic toward mTOR function (Kim et al., 2011, Klionsky and Zughaier, 2016, Ueno and Komatsu, 2017). Western blot analysis of the mTOR signaling pathway (Fig. 8A) shows that HC hepatocytes showed increased content of mTOR phosphorylation (Ser2448) as well as its regulator Raptor and the phosphorylation (Thr 389) of its downstream p70S6K (Thr 389), and diminished the phosphorylation (Thr 172) of the subunit alpha (catalytic) of AMPK. This effect is maintained with Cd treatment until 3 h (Supplementary Fig. 4).

Later, we evaluated the same signaling pathway in cells pre-treated with trehalose in Fig. 8B we observed the contrary response, mTOR activation as well as its downstream protein levels were decreased, meanwhile AMPK phosphorylation was elevated.

To determine whether these signaling pathways have a direct participation in the lipid accumulation induced by Cd and the basal levels recovered after trehalose treatment, we measured the neutral lipids and free cholesterol content in presence of Th or rapamycin. We found that both Th and rapamycin pre-treatments decreased neutral lipids (Fig. 8C) and free cholesterol (Fig. 8D and E) as control values,

confirming the direct participation of impaired autophagy and the signaling pathways of mTORC1 and AMPK- α in Cd-induced lipid accumulation.

4. Discussion

In this study, we used hepatocytes obtained from mice fed with a HC diet to analyze the response of low concentration Cd exposure. The results suggest that cholesterol overload restrains Cd toxicity maintaining cell viability, decreasing apoptotic signals and protein oxidation, increasing GSH/GSSG ratio, inducing an increase in lipid content and free cholesterol accumulation, and impairing autophagy that alters metabolic regulation and stress response.

The progression of NAFLD is a multifactorial process in which the inflammation and oxidative stress are involved (Katsiki et al., 2016). A high fat diet is an important contributor to NAFLD, emerging experimental and epidemiological data suggesting that disturbed hepatic cholesterol homeostasis and free cholesterol accumulation are relevant to the pathogenesis of NAFLD and its progression to NASH (Arguello et al., 2015). Recent data show that Cd oral exposure of mice, which produces liver concentrations similar to those found in humans from dietary exposures, produced histopathological and molecular changes in liver, which were consistent with fatty liver disease. In the present work we used a dietary model to induce cholesterol overload in the liver to analyze the effect of low Cd concentration under this condition.

The results demonstrated that CW hepatocytes exposed to Cd decreased cell viability in a concentration and time dependent manner corresponding to previous data in our group (Martinez et al., 2013). However, although HC hepatocytes had the same time-dependent response, they show higher viability percentages at all times, suggesting that these cells are able to resist Cd toxicity. As HC hepatocytes increase

MT-II, the decrease Cd toxicity could be explained because MT-II could scavenge the metal, resulting in the increase in cell viability. HC hepatocytes also display antiapoptotic response against Cd treatment.

HC hepatocytes exposed to Cd significantly increased Bcl-2 while reduced Bax and active caspase-3 content, in relation with CW hepatocytes. These results could be considered as an acute response of HC hepatocytes against Cd, which could lead a survival and adaptive environment. Other study links the overexpression of Bcl-2 with an hormetic response (Luna-Lopez et al., 2013). Previous exposure to high cholesterol content allows hepatocytes to respond quickly to the second aggression with Cd. The presence of hormesis induced by cholesterol in the hepatocytes may be related to activation of adaptive pathways.

Cadmium exerts differential response, depending on concentration, exposure time and cell type. Previous data from our group showed that Cd mainly produces oxidative stress on WRL-68 and HepG2 cell lines (Souza et al., 2004, Souza et al., 2009). In this work, we present evidence that Cd induces an early ROS production in both CW and HC hepatocytes. We evaluated the oxidized proteins content and could observe that while CW hepatocytes are not able to handle cadmium-induced protein oxidative damage, HC hepatocytes prevent protein oxidation by Cd, probably due to the MT-II that has an antioxidant effect in HC hepatocytes.

Additionally, within the antioxidant proteins that were evaluated, we observed that HC hepatocytes maintained constant levels of SOD1 and catalase, but they significantly increased the content of GCL, a limiting enzyme in the synthesis of GSH, considered as one of the most important antioxidants at the cellular level. This result was corroborated by increased content of GSH in the HC hepatocytes exposed to Cd. It seems that Cd 25 nM in HC hepatocytes promotes GSH synthesis counteracting the pro-oxidant effects of this metal and the response is greater than in CW hepatocytes due to the previous aggression with cholesterol. These results support previous data reported by Thijssen et al. (2007) which a re-establishment of the redox state and an adaptive response in the kidney of mice exposed to low doses of Cd were reported. Although the increase in the synthesis of GSH in HC cells mitigates the oxidation of proteins, we were interested in evaluating the content of MT-II, as the vital role that it plays in the defense against Cd toxicity. Moreover, Cd induce MT-II production in a time-dependent manner, but we found intriguing that HC diet alone also increase MT-II content and Cd treatment accentuates protein levels even at 12 h of exposure. Increase evidence indicates a significant role for MT-II in the maintenance of the redox balance, scavenging free radicals, and control of the activity of zinc-containing enzymes, this features provides to MT a potential role in the pathogenesis of various liver diseases (Dziegiel et al., 2016). Our data supports the protective role of MT-II against Cd exposure and that previous aggression with cholesterol increased it.

The specific function of MT-II in NAFLD is unclear (Ling et al., 2016), but due to the high ROS generation under cholesterol overload, we hypothesize a key role of this protein particularly by its antioxidant effects. Nevertheless, even if induction of MT synthesis protects against acute Cd-induced lethality, recent studies postulated the interaction of MT with several proteins which have participated in the carcinogenic process (Nagamine and Nakajima, 2013). In relation to this, a redox control may be implicated in the early development and progression of fatty liver (Serviddio et al., 2013), this defines the redox-dependent molecular alterations and provides new insights into the role of ROS as controllers of liver lipid metabolism under physiological and pathological conditions.

At this point was necessary examine the metabolic state of HC hepatocytes unyielding Cd exposure and which were also able to handle ROS overproduction, then using oil red O staining, we detected that only Cd exposure induced a lipid increase on hepatocytes but the presence of HC diet first, intensify this increase leading to a lipid excess. The hallmark of NAFLD is triglyceride accumulation in the cytoplasm of hepatocytes, although simple steatosis is usually considered benign, promotes a favorable environment for the development of

inflammatory changes in the liver, which is recognized as a precursor to more severe stages of fatty liver (Matsuzawa et al., 2007). The molecular mechanisms of lipid accumulation arises from an imbalance between lipid acquisition (i.e., fatty acid uptake and *de novo* lipogenesis) and removal (i.e., mitochondrial fatty acid oxidation and export as a component of VLDL particles) (Kawano and Cohen, 2013). These data make fundamental describe which mechanisms are altered by HC diet plus cadmium exposure.

In the steatosis model described by Mari (Mari et al., 2006) highlights the fact that is the type of lipid rather than the amount of it, which determines hepatocellular susceptibility. Thus, in Fig. 6D we measured free cholesterol content and observe that this lipid is increased as result of Cd exposure, and the effect is intensified in HC cells that already had an excess of cholesterol. To support this result, using Filipin for detecting free (i.e., unesterified) cholesterol in biological membranes, we observed positive fluorescence on hepatocytes exposed to Cd, and an intensified fluorescence in HC hepatocytes (Fig. 6E).

Particularly, altered cholesterol metabolism has several toxic effects on each of these cells, promoting NASH through diverse mechanisms. With its large, rigid core, cholesterol molecule affects membrane organization and physical properties by modulating the coexistence of lipid-disordered and lipid-ordered phases, which is a critical determinant of membrane bilayer permeability and fluidity (Musso et al., 2013).

Noting that HC cells accumulate more lipids under Cd exposure, we investigated which mechanism could be involved. According to (Kawano and Cohen, 2013) the main mechanisms of hepatocytes lipid accumulation involve a precise balance between *de novo* lipogenesis and triglyceride disposal by fatty acid oxidation and by the secretion of triglyceride-rich lipoproteins. First we decide to probe *de novo* lipogenesis process by measuring the fatty acid synthase (FASN) protein content and we observe no difference between CW and HC hepatocytes exposed to cadmium (data not shown), suggesting that this process is not involved in lipid accumulation.

Autophagy is an intracellular lysosomal degradative pathway that functions to promote cell survival by supplying energy in times of stress or by removing damaged organelles and proteins after injury (Czaja, 2016). Singh reported, for the first time, that autophagy regulates lipid metabolism by eliminating triglycerides and preventing development of steatosis (Singh et al., 2009).

In this regard, some authors reported that one of the factors driving the concept that autophagy plays a role in NAFLD pathophysiology, is that autophagic function is decreased in the liver under several conditions that predispose to NASH (Gonzalez-Rodriguez et al., 2014). Therefore, we measured the content of two key proteins in the flow of autophagy. Under physiological conditions, SQSTM1/p62 is well characterized as a substrate for the formation of autophagosomes, while LC3-I combines with phosphatidylethanolamine to form LC3-II, this form is associated with the formation of the autophagosomes membranes. At the end of the autophagy process LC3-II dissociates and returns to LC3-I, while p62 degrades; thus the flow of autophagy is determined by the increase in LC3-II and the degradation of p62 (Klionsky and Zughaier, 2016). In this study we observed that under the treatment with Cd, LC3-II decreased in a time-dependent manner, while p62 levels were observed in the HC hepatocytes, which allowed us to propose that a defect in the flow of the autophagy leads to the accumulation of lipids in this model.

As a consequence, the inhibition of macroautophagy decreased the lipolytic breakdown of TG and cholesterol from lipid droplets leading to increased steatosis after a lipid challenge (Singh et al., 2009). To probe these findings, we used trehalose (Th) a naturally occurring disaccharide linked by an α, α -1,1-glycoside bond, is ubiquitous to diverse organisms (Shukla et al., 2015). A recent study describes that Th induces hepatocyte autophagy and mitigates hepatocyte lipid droplet accumulation, at least in part, by inhibiting hexose uptake and subsequently activating the AMPK to ULK1 pathway (DeBosch et al., 2016).

We note that using Th as a pre-treatment of Cd exposure, the lipid content measured by oil red O staining, decreased markedly compared to the CW and HC hepatocytes that were only exposed to Cd. Simultaneously LC3-II increased and p62 decreased (Fig. 7 CD). The response is more evident in the CW hepatocytes than in the HC by some factors: 1) autophagy should be considered as one of the mechanisms involved in lipid accumulation under Cd exposure, however, other processes should still be explored such as the lipid oxidation and export, 2) the remaining lipids in the HC cells after activating the autophagy with Th, are due to the diet by itself and 3) the type of lipid (cholesterol) administered by the diet could be an additional variant in lipid management when autophagy is activated by Th.

AMPK and mTORC1 regulate autophagy through coordinated phosphorylations (Klionsky and Zughaier, 2016). In this process mTORC1 is the negative regulator that blocks the initiation of autophagy, whereas AMPK is the positive regulator by inhibiting the activation of mTORC1 (Wang, 2016). In this way, we decided to explore the molecular pathway involved in cadmium-impaired autophagy through the phosphorylation of mTORC1 (active form) as well as its regulator protein Raptor and the downstream phospho-p70S6K; additionally we examined the phosphorylation of AMPK catalytic subunit. We found that Cd increases phosphorylation of mTORC1 as well as Raptor and phospho-p70S6K, while diminishes the phospho-AMPK α resulting in autophagy inhibition; on the contrary, when trehalose pre-treatment was used plus Cd exposure, the signaling pathway was inverted, the active form phospho-mTORC1 diminishes the same as Raptor and phospho-p70S6K while phospho-AMPK α was increased (Fig. 8B) recovering the autophagy flux. DeBosh shows that trehalose may therefore create a functionally “starved” state that activates AMPK signaling and the inhibition of mTORC1 limiting triglyceride accumulation in the hepatocyte (DeBosch et al., 2016).

Finally, using both trehalose or rapamycin (mTORC1 inhibitor) as pre-treatments, we evaluated lipid content as well as free cholesterol, and found that both decreased (Fig. 8C, E) suggesting the active participation of the autophagy signaling pathway regulated by the activation of AMPK that we corroborate through blocking in the activation of mTORC1.

Due to that autophagy is still a complex cellular process under investigation, its activation could have a variety of effects in the metabolism, it has been documented that mTORC1 inhibition activates autophagy (Zhang, 2013) nevertheless, the role of this inhibition on cholesterol metabolism remains unclear. Our data suggest an essential function of macroautophagy in the regulation of lipid storage induced by Cd on hepatocytes, that implies that alterations in this pathway may be a mechanism that aggravates hepatic steatosis.

In conclusion, we describe the cellular response involved in Cd exposure in HC hepatocytes. We propose that hepatocytes with cholesterol overload promotes an adaptive response against cadmium-induced acute toxicity by up-regulating anti-apoptotic proteins, managing ROS overproduction, increasing GSH synthesis and MT-II content to avoid protein oxidation, and impairing autophagy process, leading to conditions that could aggravate NAFLD. The study of molecular mechanisms involved has to be the next approaching to identify therapeutic targets against NAFLD progression.

Acknowledgements

This work was partially supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)166042, Fronteras de la Ciencia #1320, SEP-PRODEP913026-14612111, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Patricia Rosales Cruz was Ph.D. scholarship holder from CONACYT (283740).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the

online version, at <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.02.007>.

References

- Arguello, G., Balboa, E., Arrese, M., Zanlungo, S., 2015. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1852 (9), 1765–1778.
- Basit, F., van Oppen, L.M., Schockel, L., Bossenbroek, H.M., van Emst-de Vries, S.E., Hermeling, J.C., Grefte, S., Kopitz, C., Heroult, M., Hgm Willems, P., Koopman, W.J., 2017. Mitochondrial complex I inhibition triggers a mitophagy-dependent ROS increase leading to necroptosis and ferroptosis in melanoma cells. *Cell. Death. Dis.* 8 (3), e2716.
- Calzadilla Bertot, L., Adams, L.A., 2016. The natural course of non-alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (5).
- Choong, G., Liu, Y., Templeton, D.M., 2014. Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 211, 54–65.
- Clavijo-Cornejo, D., Enriquez-Cortina, C., Lopez-Reyes, A., Dominguez-Perez, M., Nuno, N., Dominguez-Meraz, M., Bucio, L., Souza, V., Factor, V.M., Thorgerisson, S.S., Gutierrez-Ruiz, M.C., Gomez-Quiroz, L.E., 2013. Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie* 95 (6), 1177–1184.
- Czaja, M.J., 2016. Function of autophagy in nonalcoholic fatty liver disease. *Dig. Dis. Sci.* 61 (5), 1304–1313.
- DeBosch, B.J., Heitmeier, M.R., Mayer, A.L., Higgins, C.B., Crowley, J.R., Kraft, T.E., Chi, M., Newberry, E.P., Chen, Z., Finck, B.N., Davidson, N.O., Yarasheski, K.E., Hruz, P.W., Moley, K.H., 2016. Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. *Sci. Signal.* 9 (416), ra21.
- Dominguez-Perez, M., Nuno-Lambarri, N., Clavijo-Cornejo, D., Luna-Lopez, A., Souza, V., Bucio, L., Miranda, R.U., Munoz, L., Gomez-Quiroz, L.E., Uribe-Carvajal, S., Gutierrez-Ruiz, M.C., 2016. Hepatocyte growth factor reduces free cholesterol-mediated lipotoxicity in primary hepatocytes by countering oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 7960386.
- Dziegiel, P., Pula, B., Kobierzycki, C., Stasiolek, M., Podhorska-Okolow, M., 2016. Metallothioneins in Normal and Cancer Cells. Springer International Publishing, Switzerland.
- Enriquez-Cortina, C., Bello-Monroy, O., Rosales-Cruz, P., Souza, V., Miranda, R.U., Toledo-Perez, R., Luna-Lopez, A., Simoni-Nieves, A., Hernandez-Pando, R., Gutierrez-Ruiz, M.C., Calvisi, D.F., Marquardt, J.U., Bucio, L., Gomez-Quiroz, L.E., 2017. Cholesterol overload in the liver aggravates oxidative stress-mediated DNA damage and accelerates hepatocarcinogenesis. *Oncotarget* 8 (61), 104136–104148.
- Escobar Mdel, C., Souza, V., Bucio, L., Hernandez, E., Gomez-Quiroz, L.E., Gutierrez Ruiz, M.C., 2009. MAPK activation is involved in cadmium-induced Hsp70 expression in HepG2 cells. *Toxicol. Mech. Methods* 19 (8), 503–509.
- Farah, B.L., Landau, D.J., Sinha, R.A., Brooks, E.D., Wu, Y., Fung, S.Y.S., Tanaka, T., Hirayama, M., Bay, B.H., Koerber, D.D., Yen, P.M., 2016. Induction of autophagy improves hepatic lipid metabolism in glucose-6-phosphatase deficiency. *J. Hepatol.* 64 (2), 370–379.
- Go, Y.M., Sutcliffe, R.L., Chandler, J.D., Khalidur, R., Kang, B.Y., Anania, F.A., Orr, M., Hao, L., Fowler, B.A., Jones, D.P., 2015. Low-dose cadmium causes metabolic and genetic dysregulation associated with fatty liver disease in mice. *Toxicol. Sci.* 147 (2), 524–534.
- Gonzalez-Rodriguez, A., Mayoral, R., Agra, N., Valdecantos, M.P., Pardo, V., Miquilena-Colina, M.E., Vargas-Castrillon, J., Lo Iacono, O., Corazzari, M., Fimia, G.M., Piacentini, M., Muntane, J., Bosca, L., Garcia-Monzon, C., Martin-Sanz, P., Valverde, A.M., 2014. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell. Death. Dis.* 5, e1179.
- Hernandez, I., Dominguez-Perez, M., Bucio, L., Souza, V., Miranda, R.U., Clemens, D.L., Gomez-Quiroz, L.E., Gutierrez-Ruiz, M.C., 2015. Free fatty acids enhance the oxidative damage induced by ethanol metabolism in an in vitro model. *Food Chem. Toxicol.* 76, 109–115.
- Hyder, O., Chung, M., Cosgrove, D., Herman, J.M., Li, Z., Firoozmand, A., Gurakar, A., Koteish, A., Pawlik, T.M., 2013. Cadmium exposure and liver disease among US adults. *J. Gastrointest. Surg.* 17 (7), 1265–1273.
- Katsiki, N., Mikhailidis, D.P., Mantzoros, C.S., 2016. Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: an update. *Metabolism* 65 (8), 1109–1123.
- Kawano, Y., Cohen, D.E., 2013. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.* 48 (4), 434–441.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., Guan, K.L., 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13 (2), 132–141.
- Kim, J.Y., Kim, S.J., Bae, M.A., Kim, J.R., Cho, K.H., 2017. Cadmium exposure exacerbates severe hyperlipidemia and fatty liver changes in zebrafish via impairment of high-density lipoproteins functionality. *Toxicol. In Vitro* 47, 249–258.
- Klionsky, D.J., Zughaier, S.M., 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12 (1), 1–222.
- Lin, Y.C., Lian, I.B., Kor, C.T., Chang, C.C., Su, P.Y., Chang, W.T., Liang, Y.F., Su, W.W., Soon, M.S., 2017. Association between soil heavy metals and fatty liver disease in men in Taiwan: a cross sectional study. *BMJ Open* 7 (1), e014215.
- Ling, X.B., Wei, H.W., Wang, J., Kong, Y.Q., Wu, Y.Y., Guo, J.L., Li, T.F., Li, J.K., 2016. Mammalian metallothionein-2A and oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (9).
- Lopez-Islas, A., Chagoya-Hazas, V., Perez-Aguilar, B., Palestino-Dominguez, M., Souza, V., Miranda, R.U., Bucio, L., Gomez-Quiroz, L.E., Gutierrez-Ruiz, M.C., 2016. Cholesterol enhances the toxic effect of ethanol and acetaldehyde in primary mouse hepatocytes. *Oxid. Med. Cell. Longevity* 2016, 9209825.
- Lopez-Ortal, P., Souza, V., Bucio, L., Gonzalez, E., Gutierrez-Ruiz, M.C., 1999. DNA damage produced by cadmium in a human fetal hepatic cell line. *Mutat. Res.* 439 (2),

- 301–306.
- Luna-Lopez, A., Gonzalez-Puertos, V.Y., Romero-Ontiveros, J., Ventura-Gallegos, J.L., Zentella, A., Gomez-Quiroz, L.E., Konigsberg, M., 2013. A noncanonical NF-kappaB pathway through the p50 subunit regulates Bcl-2 overexpression during an oxidative-conditioning hormesis response. *Free Radic. Biol. Med.* 63, 41–50.
- Luo, J., Jiang, L., Yang, H., Song, B.L., 2017. Routes and mechanisms of post-endosomal cholesterol trafficking: a story that never ends. *Traffic* 18 (4), 209–217.
- Mari, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., Enrich, C., Fernandez-Checa, J.C., Garcia-Ruiz, C., 2006. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab.* 4 (3), 185–198.
- Martinez Flores, K., Uribe Marin, B.C., Souza Arroyo, V., Bucio Ortiz, L., Lopez Reyes, A., Gomez-Quiroz, L.E., Rojas del Castillo, E., Gutierrez Ruiz, M.C., 2013. Hepatocytes display a compensatory survival response against cadmium toxicity by a mechanism mediated by EGFR and Src. *Toxicol. In Vitro* 27 (3), 1031–1042.
- Matsuzawa, N., Takamura, T., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Ando, H., Yokoyama, M., Honda, M., Zen, Y., Nakanuma, Y., Miyamoto, K., Kaneko, S., 2007. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* 46 (5), 1392–1403.
- Messner, B., Turkcan, A., Ploner, C., Laufer, G., Bernhard, D., 2016. Cadmium overkill: autophagy, apoptosis and necrosis signalling in endothelial cells exposed to cadmium. *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (8), 1699–1713.
- Musso, G., Gambino, R., Cassader, M., 2013. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog. Lipid Res.* 52 (1), 175–191.
- Nagamine, T., Nakajima, K., 2013. Significance of metallothionein expression in liver disease. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 14 (4), 420–426.
- Nakagawa, Y., 1996. Effects of dicoumarol on cytotoxicity caused by tert-butylhydroquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 84 (2), 63–68.
- Nemmiche, S., 2017. Oxidative signaling response to cadmium exposure. *Toxicol. Sci.* 156 (1), 4–10.
- Nuno-Lambarri, N., Dominguez-Perez, M., Baulies-Domenech, A., Monte, M.J., Marin, J.J., Rosales-Cruz, P., Souza, V., Miranda, R.U., Bucio, L., Montalvo-Jave, E.E., Concepcion Gutierrez-Ruiz, M., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J.C., Gomez-Quiroz, L.E., 2016. Liver cholesterol overload aggravates obstructive cholestasis by inducing oxidative stress and premature death in mice. *Oxid. Med. Cell. Longevity* 2016, 9895176.
- Sandbichler, A.M., Hockner, M., 2016. Cadmium protection strategies—a hidden trade-off? *Int. J. Mol. Sci.* 17 (1).
- Sekovanic, A., Jurasovic, J., Piasek, M., Pasalic, D., Orct, T., Grgec, A.S., Stasenko, S., Cakanic, K.B., Jazbec, A., 2018. Metallothionein 2A gene polymorphism and trace elements in mother-newborn pairs in the Croatian population. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 45, 163–170.
- Serviddio, G., Bellanti, F., Vendemiale, G., 2013. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 952–968.
- Shinkai, Y., Kimura, T., Itagaki, A., Yamamoto, C., Taguchi, K., Yamamoto, M., Kumagai, Y., Kaji, T., 2016. Partial contribution of the Keap1-Nrf2 system to cadmium-mediated metallothionein expression in vascular endothelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 295, 37–46.
- Shukla, E., Thorat, L.J., Nath, B.B., Gaikwad, S.M., 2015. Insect trehalase: physiological significance and potential applications. *Glycobiology* 25 (4), 357–367.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., Czaja, M.J., 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458 (7242), 1131–1135.
- Song, B., Zeng, G., Gong, J., Zhang, P., Deng, J., Deng, C., Yan, J., Xu, P., Lai, C., Zhang, C., Cheng, M., 2017. Effect of multi-walled carbon nanotubes on phytotoxicity of sediments contaminated by phenanthrene and cadmium. *Chemosphere* 172, 449–458.
- Souza, V., Bucio, L., Jay, D., Chavez, E., Gutierrez-Ruiz, M.C., 1996. Effect of cadmium on calcium transport in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology* 112 (2), 97–104.
- Souza, V., Bucio, L., Gutierrez-Ruiz, M.C., 1997. Cadmium uptake by a human hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology* 120 (3), 215–220.
- Souza, V., Escobar, M.C., Gomez-Quiroz, L., Bucio, L., Hernandez, E., Cossio, E.C., Gutierrez-Ruiz, M.C., 2004. Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology* 197 (3), 213–228.
- Souza, V., Escobar, M.C., Bucio, L., Hernandez, E., Gomez-Quiroz, L.E., Gutierrez Ruiz, M.C., 2009. NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced-STAT3 activation in HepG2 cells. *Toxicol. Lett.* 187 (3), 180–186.
- Streba, L.A., Vere, C.C., Rogoveanu, I., Streba, C.T., 2015. Nonalcoholic fatty liver disease, metabolic risk factors, and hepatocellular carcinoma: an open question. *World J. Gastroenterol.* 21 (14), 4103–4110.
- Thevenod, F., Lee, W.K., 2013. Cadmium and cellular signaling cascades: interactions between cell death and survival pathways. *Arch. Toxicol.* 87 (10), 1743–1786.
- Thijssen, S., Lambrechts, I., Maringwa, J., Van Kerrkhove, E., 2007. Changes in expression of fibrotic markers and histopathological alterations in kidneys of mice chronically exposed to low and high Cd doses. *Toxicology* 238 (2–3), 200–210.
- Ueno, T., Komatsu, M., 2017. Autophagy in the liver: functions in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14 (3), 170–184.
- Valdes-Arzate, A., Luna, A., Bucio, L., Licona, C., Clemens, D.L., Souza, V., Hernandez, E., Kershenovich, D., Gutierrez-Ruiz, M.C., Gomez-Quiroz, L.E., 2009. Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 47 (4), 424–430.
- Wang, K., 2016. Molecular mechanism of hepatic steatosis: pathophysiological role of autophagy. *Expert Rev. Mol. Med.* 18, e14.
- Zhang, J., 2013. Autophagy and mitophagy in cellular damage control. *Redox Biol.* 1 (1), 19–23.

Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00105

Matrícula: 2123801134

LA EXPOSICIÓN A CADMIO
EXACERBA LA HIPERLIPIDEMIA
EN HEPATOCITOS CON
SOBRECARGA DE COLESTEROL

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 7 del mes de septiembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ
DRA. MAYRA DOMINGUEZ PEREZ
DR. EMILIO DOMINGUEZ SALAZAR
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: DIANA PATRICIA ROSALES CRUZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIANA PATRICIA ROSALES CRUZ
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ

VOCAL

DRA. MAYRA DOMINGUEZ PEREZ

VOCAL

DR. EMILIO DOMINGUEZ SALAZAR

SECRETARIO

DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO