UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

"CITOCINAS COMO POSIBLES MEDIADORES EN LA INDUCCIÓN DE LA METALOTIONEINA EN EL DAÑO CELULAR PRODUCIDO POR EL CADMIO EN CÉLULAS HepG2"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

Biol. Exp. María del Carmen Escobar Villanueva

TUTOR

Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz

ASESORES

Dra. Patricia Rojas Castañeda
M. en C. Verónica Souza Arroyo

México D.F. **Agosto 2002**

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la **Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz,** *con la asesoría de* **la M. en C. Verónica Souza Arroyo** del mismo departamento y de **la Dra. Patricia Rojas Castañeda** del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Miguel Velásquez Sánchez".

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa con el número de registro **309-0**. Se encuentra dentro del patrón de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Mi agradecimiento al CONACYT por la beca-crédito otorgada con número de registro **137896.**

Esta tesis forma parte del proyecto de investigación "*Estudio de la relación de los diferentes parámetros involucrados en el daño celular producidos por el cadmio*" apoyado por el CONACYT con el número de convenio 400200-5-30671-M.

A la Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz

Quien me brindó la oportunidad de aceptarme en su laboratorio y confiar en mí, por compartir sus conocimientos y experiencias profesionales. Especialmente le agradezco el apoyo, la paciencia, la compresión para conmigo durante todos estos años, me siento afortunada de contar con usted, no solamente a nivel académico, sino personal.

Siempre le estaré agradecida por enseñarme la importancia de trabajar en un ambiente de respeto y armonía. Pero sobre todo por ser un excelente ejemplo en mi vida profesional y personal.

"Gracias Dra."

Los ideales son como las estrellas: nunca los alcanzamos, pero, igual que los marinos en altamar, trazamos nuestro camino siguiéndolos.

Anónimo

A mis asesoras:

M. en C. Verónica Souza Arroyo.

Por trabajar directamente a mi lado durante el proyecto, por darme siempre un consejo adecuado tanto profesional como personal, por confiar en mí desde el inició, por ser parte importante en mi formación profesional. Pero sobre todo por darme seguridad de que siempre te encuentras cerca cuando te necesitó.

"Gracias Veró"

Dra. Patricia Rojas Castañeda.

Gracias por realizar observaciones y sugerencias importantes en el desarrollo del proyecto, por brindarme su tiempo en la revisión y presentaciones en el periodo académico.

A mis Padres:

Sr. Victoriano Escobar y Sra. Carmen Villanueva.

Mis mejores maestros en el ámbito personal, ustedes las personas que me enseñaron a tener sueños, pero sobre todo a trabajar para transformarlos en una realidad. Los amo y una muestra pequeña de este cariño, es aprovechando la ocasión de expresar en estas líneas mi agradecimiento por todo.

"Gracias Papás por que nunca me dejaron sola, tengo la seguridad de que siempre estaremos unidos en los diversos proyectos que nos faltan".

A mis hermanos:

Carlos, Naty, Victor, Jesús y Julio. Gracias por que siempre con sus comentarios, me estimulaban a continuar estudiando y reforzar diariamente una ilusión que ahora y siempre compartiré con ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes, al Dr. Pablo Damián Matzumura y a la M. en C. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes por aceptar ser miembro del Jurado, pero especialmente por sus consejos y comentarios que han sido de valiosa ayuda en la revisión de este proyecto.

Al Dr. David Díaz Pontones, por su paciencia, orientación y apoyo en los trámites de esta tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Fisiología Celular.
Dra. Leticia Bucio Ortiz, M. en C. Elizabeth Hernández Pérez, M. en C. Luis Enrique Gómez Quiroz, Biol. Exp. Blanca Eugenia Farfán, Biol. Exp. Mario Gutiérrez y Sr. Pedro Palma. Quienes me han enseñado el significado de trabajar en un verdadero equipo, en un ambiente de respeto y amistad.

A mis compañeros de generación de la Maestría en Biología Experimental, Alfonso Olivos, Dolores Gavaldón, Javier López, Elizabeth Miranda, Alfonso Díaz, Pilar y Sergio. Pero ante todo con especial cariño a Roció León, Bernardo Chapa, Norma Díaz-Guerrero y Bertha Maqueda. Les agradezco su apoyo y amistad incondicional.

A Judith Morales, Blanca Blas, Ana Bertha de la Concha, David Tafoya, Esther Pérez, Guadalupe, Francisco, Braulio, Jaime, Eduardo Flores y Rogelio Platas Zavala por su amistad y el cariño que me han demostrado durante estos años.

Por último a la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA, mi segundo hogar durante estos años de preparación, por cambiar mi vida a través de todos mis profesores, quienes me enseñaron a trabajar, a dar lo mejor de mí y me motivaron siempre a concluir favorablemente mis objetivos realizados antes de ingresar a esta institución. Ahora y siempre gracias por darme un futuro mejor.

INDICE

ABREVIATURAS i

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1 Fuentes de contaminación por cadmio 1

1.2 Absorción del cadmio 2

1.3 Generalidades con relación a la toxicidad inducida por cadmio 4

1.3.1 Individuos 4

1.3.2 Nivel celular 5

1.4 Mecanismos para explicar la toxicidad producida por cadmio 6

1.4.1 Lipoperoxidación (LPO) 6

1.4.2 Interacción con grupos sulfhidrilos (SH) 7

1.4.3 Desplazamiento de metales esenciales 8

1.5. Generalidades del glutatión 9

1.5.1 Síntesis y metabolismo del glutatión 11

1.6 Generalidades de la metalotioneína 12

1.6.1 Síntesis y metabolismo de la metalotioneína 16

1.7 Mediadores de comunicación celular 17

2. ANTECEDENTES 19

3. JUSTIFICACIÓN 21

4. OBJETIVOS 22

5. MATERIAL Y MÉTODOS 23

5.1 Cultivo celular 23

5.2 Viabilidad celular (Prueba de MTT) 23

5.3 Inducción de la metalotioneína (MT) 24

5.4 Extracción del ARN total de los extractos celulares 24

5.5 Expresión génica de los ARNm de la MT-II y GAPDH por Northern-Blot ... 25

5.6 Citocinas pro-inflamatorias como mediadores en la inducción de la MT-II 26

5.6.1 TNF-α como mediador en la inducción de la MT-II 26

5.6.2 IL1-β como mediador en la inducción de la MT-II 27

5.7 Glutatión como mediador en la inducción de la MT-II 27

5.8 Estrés oxidativo como mediador en la inducción de la MT-II 27

5.9 Análisis Estadístico 28

6 RESULTADOS 29

6.1 Viabilidad de las células HepG2 expuestas a $CdCl_2$ 29

6.2 Inducción del gen de MT-II en células HepG2 expuestas a $CdCl_2$ y citocinas 31

6.3 Inducción del gen de MT-II en células HepG2 expuestas a $CdCl_2$ y Ac-TNF-α, Ac-IL1-β e IgG 31

6.4. Inducción del gen de MT-II en condiciones de estrés oxidativo 34

6.5 Inducción del gen de MT-II con diferentes antioxidantes 37

7. DISCUSIÓN 39

8. BIBLIOGRAFÍA..... 44

ABREVIATURAS

AcIL-1β	Anticuerpo monoclonal interleucina 1 beta
AcTNF-α	Anticuerpo monoclonal factor de necrosis tumoral alfa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSO	Butionina L-Sulfoximina
Cd	Cadmio
$CdCl_2$	Cloruro de cadmio
CO_2	Bióxido de carbono
Cys	Cisteína
DEPC	Dietil pirocarbonato
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
γ-GCS	gamma glutamilcisteína sintetasa
GGT	gamma glutamil transpeptidasa
GSH	Glutatión
GSHpx	Glutatión peroxidasa
GSSG	Glutatión oxidado
HepG2	Hepatoblastoma humano
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1β	Interleucina 1 beta

IL-6	Interleucina 6
Lys	Lisina
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPO	Lipoperoxidación
MT	Metalotioneína
MT-Cd	Complejo metalotioneína-cadmio
MT-Zn	Complejo metalotioneína-zinc
MTT	3-(amino-7-dimetiltiazol 2 yl)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio
NAC	N-acetil-cisteína
Na_2HPO_4	Fosfato de sodio dibásico
$O^{\bullet}_2$	Anión superóxido
$OH^{\bullet}$	Radical hidroxil
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
^{32}P	Fósforo-32 radioactivo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Ser	Serina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SH	Grupo Sulfhidrilo
SOD	Superóxido dismutasa
TMTU	1,1,3,3-tetrametil-2-tiourea
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

cm	Centímetro
h	Horas
mg	Miligramo
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
nm	Nanómetro
ng	Nanogramo
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µmol	Micromoles
°C	Grados centígrados
%	Porcentaje

1. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados son elementos cuyo peso específico supera los 5 $\mu g/cm^3$ y esta formado por un grupo muy numeroso que comprende aproximadamente dos tercios del total de los elementos químicos naturales. Entre ellos, el cadmio (Cd) es un elemento que se encuentra en la naturaleza asociado a muchos minerales. El hombre ha liberado Cd al ambiente de manera involuntaria, desde que fue apto para fundir y refinar metales como zinc, plomo y cobre. Dos investigadores alemanes, Ströhmeir y Hermann, descubrieron el Cd de manera independiente y casi simultáneamente en 1817. Estos investigadores examinaron muestras de carbonato de zinc procedentes de Salzgitter Alemania, un óxido de color café y un sulfuro amarillo que al calentarlo se obtuvo un metal nuevo en estado impuro, al que llamaron erróneamente Cd, ya que deriva de una palabra griega que significa óxido de zinc (Nriagu, 1980).

1.1 FUENTES DE CONTAMINACIÓN POR CADMIO

El Cd se encuentra en la corteza terrestre en una concentración promedio de 0.15-0.20 ppm, se localiza en rocas, carbón, arena, sedimentos oceánicos y en la tierra. Entre las fuentes de contaminación más evidentes y las que pueden causar un incremento en las concentraciones de Cd y otros elementos en el ambiente son las actividades mineras. Entre las industrias que contribuyen al incremento ambiental del Cd, están aquellas relacionadas con las baterías, los acumuladores, los cables eléctricos, los colorantes, el cloruro de polivinilo, los fusibles, entre otros. En la

atmósfera existe alrededor de 0.002 $\mu g/m^3$ de este metal y la principal fuente de contaminación son las industrias metalúrgicas (Nriagu, 1982).

La mayor parte del Cd que se emite a la atmósfera se deposita en la tierra y en las aguas cercanas a las fuentes de emisión y a partir de éstas, es ingerido por los organismos y transportado a todos los eslabones de la cadena alimenticia, incluyendo al hombre.

Las concentraciones del Cd en el agua potable son menores a 5 µg/l, mientras que en el agua de mar oscilan ente 0.03 y 0.04 µg/l (Albert, 1990), siendo las principales fuentes de contaminación las áreas metalúrgicas, los desechos industriales y los desagües de minas. El Cd en el agua puede estar en cuatro formas, ya sea a) disuelto, b) en forma de complejo soluble, c) como partícula inorgánica u orgánica y d) como partícula adsorbida. Generalmente las concentraciones del Cd en el suelo oscilan entre 0.01 y 0.50 mg/Kg (Albert, 1990), variando con base en la composición de la roca madre y suministro de metales que provienen de fertilizantes, los abonos y la contaminación atmosférica. A su vez, los vegetales pueden absorber cantidades considerables de Cd a partir de suelos contaminados, aunque los mecanismos de translocación no se conocen, se sabe que las semillas y los granos contienen menores concentraciones de Cd en comparación con las hojas (Street, 1978).

1.2 ABSORCIÓN DEL CADMIO

Actualmente se ha puesto más atención a la toxicidad del Cd, ya que su concentración en el ambiente se ha incrementado y, por lo tanto, puede causar efectos adversos sobre la salud del ser humano. De manera natural, este elemento

no se encuentra en el organismo, de tal forma que si se detecta su presencia es porque fue adquirido a través de una contaminación. En general, se sabe que el metal es absorbido en la mucosa intestinal, la piel y el pulmón (Rahola, 1972). La absorción depende de la vía de administración y de la forma química en que se encuentre este elemento. Por otra parte, se sabe que las personas con baja concentración de hierro en la sangre tienen una absorción de Cd cuatro veces mayor que los individuos con concentraciones de hierro normales (Vahter, et al. 2002). Este factor y otros como la deficiencia de proteínas, calcio, etc., favorecen la absorción del Cd (Nomiyama, et al. 1975).

El Cd entra al organismo también por vía respiratoria, entre el 10 y 20% de las partículas inhaladas de Cd se depositan en la zona alveolar de los pulmones donde son absorbidas y pasan a la sangre, donde el Cd es transportado a todas las partes del organismo (Bus, et al. 1978, Becker, et al. 2002), teniendo una vida media entre 35 y 40 años antes de ser eliminado. La población fumadora es la más expuesta al Cd (Barany, et al. 2002). Cada cigarro contiene alrededor de 1-2 μg de Cd. Parte de esto se elimina con la combustión, pero se inhala de 0.1 a 0.2 μg de Cd/cigarrillo. En un estudio realizado en México se encontraron 2.8 μg de Cd por cada cigarrillo, lo que significa un riesgo aún mayor para los fumadores de este país, que el reportado en otros países (Saldivar, et al. 1997).

La distribución del metal en los diversos órganos y organelos subcelulares va a depender de los mecanismos de transporte a través de la membrana plasmática y de la afinidad por los ligandos presentes en la célula. El Cd se acumula principalmente en el hígado, en el riñón y en menor concentración se encuentra en otros órganos y

tejidos como los músculos, el páncreas, las glándulas salivales y el sistema nervioso central (Satarug, et al. 2002, Antonio, et al. 2002, y Nishijo, et al. 2002).

La eliminación del Cd en el ser humano es a través de la orina en concentraciones menores a 5 µg/día (Satarug, et al. 2002). La bilis, las secreciones de las glándulas parótida y del páncreas contribuyen a la eliminación fecal del Cd y solo pequeñas cantidades del metal se llegan a eliminar por el sudor, la exfoliación epitelial y el pelo (Elinder, 1979).

1.3 GENERALIDADES CON RELACIÓN A LA TOXICIDAD INDUCIDA POR CADMIO.

1.3.1. Individuos

En el hombre, la intoxicación puede ser resultado de la inhalación (gases y humos) o la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas con Cd, la cual puede causar trastornos agudos y crónicos.

Para el caso de una exposición aguda al Cd puede ocasionar necrosis hepática, reflejada en la liberación de las enzimas aspartato amino transferasa y alanina amino transferasa, a la sangre, como consecuencia del incremento en la permeabilidad de la membrana debido al daño hepático (Coodley, l971), estas enzimas son cuantificadas como un indicador de hepatotoxicidad (Dudley, et al. 1984). En forma sistémica los síntomas producidos por ingestión de Cd pueden presentarse como náusea, salivación, vómito, dolor abdominal y cefalea; en casos severos se puede presentar diarrea y llegar hasta la conmoción. La dosis letal para el hombre se ha determinado que es de 90 mg/kg de peso corporal. Los síntomas producidos por la inhalación del Cd son: cefalea, irritación del tracto respiratorio, resequedad nasal y traqueal, tos,

disnea, escalofríos, fiebre y en casos severos, insuficiencia respiratoria con conmoción y finalmente la muerte. Algunos investigadores sugieren que la concentración letal de polvos de óxido de Cd para los seres humanos es de 5 mg/m^3 de superficie corporal.

La exposición crónica al Cd en el hombre y en animales experimentales causa daño al riñón que se manifiesta como proteinuria, caracterizada por alfa, beta y γ-globulinuria, albuminuria, incremento en la secreción en la transferrina e inmunoglobulinas, aminoaciduria, hipercalciuria y glucosuria. También se determinó que el Cd cambia la hidroxilación de la 25-hidroxivitamina-D a 1,25- hidroxivitamina-D, reduciendo la absorción de calcio en el tracto gastrointestinal, causando una alteración general en el metabolismo celular (Felman y Cousins, 1973). El Cd induce hipertensión y vasoconstricción *in vitro*, sugiriendo que puede producir daño endotelial. Se ha observado que la administración crónica de Cd produce desmineralización ósea, osteomalasia y daño renal. También tiene efectos teratogénicos y mutagénicos (Jarup, 2002).

1.3.2. Nivel Celular

Se conoce poco sobre la citotoxicidad inducida por Cd. En células aisladas de hígado y riñón, el Cd causa la liberación de enzimas citosólicas como la γ-glutamil transpeptidasa (GGT), la β-N-acetilglucosaminidasa, así como un incremento extracelular de la lactato deshidrogenasa (LDH), la cual indica daño inducido en la membrana plasmática. Se ha reportado también que el Cd produce un aumento en la lipoperoxidación (LPO). Una acumulación de Ca^{2+} intracelular dado por el flujo de calcio extracelular, así como la inducción de la síntesis de metalotioneína la cual

puede ser la responsable de la acumulación del Cd en los tejidos (Souza, et al. 1996, Escobar, et al. 2002).

1.4 MECANISMOS PARA EXPLICAR LA TOXICIDAD PRODUCIDA POR CADMIO

El Cd se puede unir a una proteína a través de grupos (hidroxilo, amino, carboxilo, sulfhidrilo, fosfatos etc.). La concentración del metal en un tejido depende de la presencia y biodisponibilidad del grupo químico al cual se unió. El mecanismo bioquímico de la citotoxicidad inducida por Cd no se conoce con exactitud, aunque se han descrito dos mecanismos principales de daño (Rikans y Yamano, 2000).

Mecanismo Primario de Daño

Son eventos en los cuales participan la LPO, inactivación de grupos sulfhidrilos (SH) y desplazamiento de metales esenciales (figura 1A).

1.4.1 Lipoperoxidación (LPO)

El proceso de LPO se ha relacionado con fenómenos como la inflamación, el envejecimiento, el cáncer y la toxicidad de agentes químicos. Durante este proceso, los ácidos grasos poli-insaturados son peroxidados por un mecanismo de radicales libres, lesionando la membrana celular con un aumento en la permeabilidad (Koizumi, et al.1996). La célula hepática tiene mecanismos de defensa que pueden protegerla de los efectos de la LPO (Haïdara, et. al. 1999). En el hígado los componentes más importantes en el mecanismo de defensa son el glutatión (GSH) y la vitamina E. La LPO de los ácidos grasos insaturados dentro de las membranas biológicas inducida por Cd resulta en una serie de eventos bioquímicos que llevan a la inactivación de funciones enzimáticas (Escobar, et al. 2002), tales como la inhibición de la superóxido

dismutasa (SOD) y la disminución en la actividad de glutatión peroxidasa (GSHpx) y concentraciones de GSH en hígado y riñón.

Los peróxidos orgánicos llevarán a la muerte celular posiblemente por dos mecanismos:

a) Peroxidación de los lípidos de la membrana celular y

b) Alterando la homeostasis del Ca^{2+} como una consecuencia de la oxidación de los tioles de las proteínas.

Algunos experimentos *in vitro* indican que la LPO no es el primer evento responsable de la citotoxicidad inducida por Cd, sino una consecuencia del daño producido en la membrana celular. Sin embargo, el ataque peroxidativo a los fosfolípidos de la membrana celular por el Cd, puede alterar la integridad de la membrana, necesaria para una función normal de la célula (Müller, 1986).

1.4.2 Interacción con grupos sulfhidrilo (SH)

La exposición a metales pesados trae como consecuencia una variedad de alteraciones bioquímicas tanto en el hígado como en el riñón. Varios de estos efectos se atribuyen a que los metales pueden unirse a sitios nucleofílicos en la célula, entre ellos los grupos sulfhidrilo (SH o tiol) libres (Maines y Kappas, 1977), los cuales están presentes en las proteínas membranales y citosólicas metaloproteínas, así como en el GSH y varias enzimas. Se ha demostrado que el GSH y la metalotioneína, protegen contra la hepatoxicidad debido a que son compuestos ricos en cisteína (Cys). Los grupos tiol son muy importantes en la regulación de la permeabilidad membranal porque conservan el estado de oxido-reducción. Se ha propuesto que la entrada del Cd a la célula se debe a la unión con los grupos SH de las proteínas de la

membrana celular, ya que al bloquearlos con N-etilmaleimida disminuye la acumulación del metal (Gerson y Shaikh, 1984).

1.4.3 Desplazamiento de metales esenciales.

El hígado es el órgano crítico en la homeostasis de los metales esenciales tales como el calcio, cobre, hierro y el zinc (Blazka y Shaikh, 1992). El Cd es uno de los metales más tóxicos y puede alterar el metabolismo y función de estos metales, al competir por los sitios de unión en los sistemas biológicos. La toxicidad dada por el Cd se ha atribuido específicamente al desplazamiento de los metales esenciales de sus sitios de unión en las proteínas y por lo tanto, altera sus funciones. Este desplazamiento da lugar a alteraciones en la actividad de algunas enzimas que son vitales para el funcionamiento celular, compite con el calcio y altera patrones de fosforilación en la regulación metabólica (Susuki, et al. 1985).

Mecanismo Secundario de daño

El mecanismo secundario de daño ocurre con procesos de inflamación y el primer evento en el hígado es la activación de las células Kupffer (Rikans y Yamano, 2000). Estas células activadas son las iniciadoras de la liberación de mediadores de daño tales como citocinas, moléculas de adhesión, quimocinas y radicales libres. La respuesta temprana de las citocinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), la interleucina 1 (IL-1) y la interleucina 6 (IL-6), es activar a otras células del hígado (hepatocitos, células estelares y endoteliales) e inducir la expresión de quimocinas como la interleucina 8 (IL-8) que atraen y activan a los neutrofilos y monocitos (figura 1B).

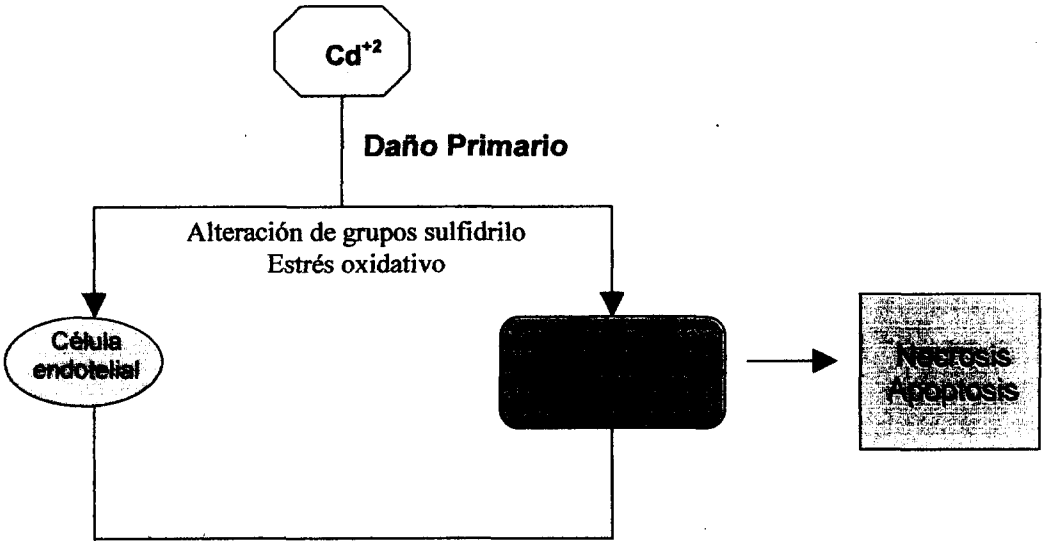
1.5. GENERALIDADES DEL GLUTATIÓN (GSH)

El GSH a sido considerado como defensa del organismo a la toxicidad aguda producida por el Cd. Esta hipótesis fue demostrada por Singhal, et al., 1987, en ratones tratados con butinona-L-sulfoximina (BSO), un inhibidor de la gamma-glutamilcisteína sintetasa (γ-GCS), presentaron un incremento en el daño por el metal.

El glutatión (GSH) es un tripéptido (L-γ-glutamil-cisteil-L-Glicina), el cual está presente en todas las células. Su concentración puede oscilar entre 0.1 a 10mM, estando presente el 85% en su forma reducida GSH y un 15% en su forma oxidada (GSSG). El GSH total se considera como GSH + GSSG y constituye en la mayoría de los tejidos más del 99%. En los humanos el GSH total está presente en el plasma en concentraciones bajas, aproximadamente de 1 a 3 μM (Arias, et. al. 1994).

La estructura del GSH presenta dos características importantes que le dan su funcionalidad: el grupo γ-glutamil y la presencia de un grupo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína juegan un papel importante en las funciones del GSH, se ha considerado que la presencia del grupo tiol en el GSH le permite participar de manera directa o indirecta en muchos fenómenos biológicos, entre los que se incluyen la síntesis de proteínas y del ácido desoxirribonucleico (ADN), participa en la transformación de diversas proteínas uniéndose al GSH por medio del grupo tiol permitiendo las reacciones de tipo tiol-disulfuro que están involucradas en el ensamblaje y degradación de proteínas y catálisis. El GSH proporciona capacidad reductora para varias reacciones, participa en reacciones de amortiguamiento de especies reactivas del oxigeno (ROS) y puede unirse a metales divalentes como el Cd (Chan y Cherian,

A.



B.

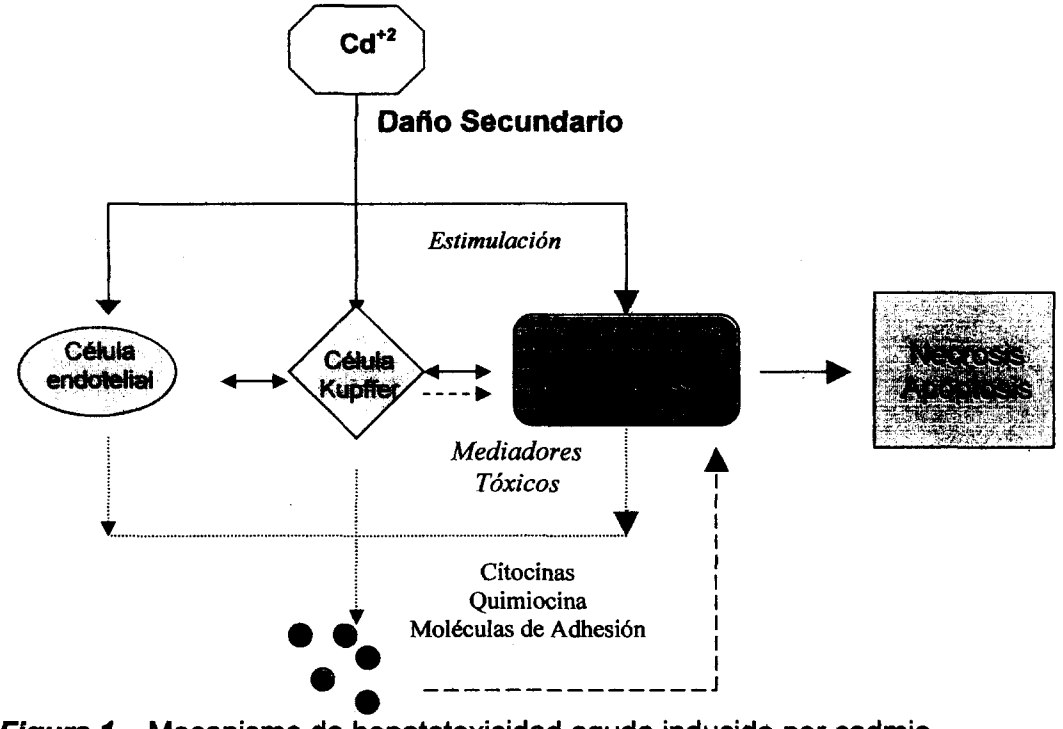


Figura 1. Mecanismo de hepatotoxicidad aguda inducida por cadmio.

A. Daño Primario se inicia con la unión del Cd con grupos sulfhidrilos de proteínas, generando estrés oxidativo y daño a nivel mitocondrial.

B. Daño Secundario es iniciado por la activación de células Kupffer, ya sea de forma directa o indirecta a través del daño de los hepatocitos o células endoteliales (Rikans y Yamano, 2000).

1992). El GSH participa en el metabolismo de varios compuestos endógenos, juega un papel catalítico en algunos casos y como reactante en otros, además interviene en el transporte de aminoácidos (Meister, 1973).

1.5.1 Síntesis y metabolismo del glutatión.

El GSH es sintetizado de novo por dos enzimas, la gamma-glutamilcisteína sintetasa (γ-GCS) y la glutatión sintetasa. La γ-GCS es un heterodímero constituído por dos subunidades 31 y 73 Kda, esta enzima interacciona con el ácido glutámico y cisteína formando al dipéptido γ-glutamilcisteína un intermediario que se encuentra en bajas concentraciones en el hígado y en otros tejidos porque es utilizado como sustrato por la GSH sintetasa, para sintetizar GSH. La γ-glutamiltranspeptidasa y γ-glutamilciclotransferasa son enzimas importantes en el ciclo γ-glutamil (figura 2). En condiciones normales, la actividad de la γ-GCS es baja, ya que es inhibida por la presencia del GSH. Si está bloqueada la actividad de la GHS sintetasa, la γ-glutamil cisteína es convertida a 5-oxoprolina y cisteína libre por la acción de la γ-glutamilciclotransferasa.

La hidrólisis del GSH y la transferencia del grupo γ-glutamil a aceptores tales como los aminoácidos cisteína, metionina, y glutamina, es catalizado por la γ-glutamiltranspeptidasa (GGT) enzima que actúa en la membrana externa. El GSH es transportado a través de la membrana celular, este interactúa con la GGT produciendo la hidrólisis del GSH a γ-glutamil y cisteil-L-glicina. Los aminoácidos libres se unen al grupo γ-glutamil y es transportado al interior celular. Convirtiéndose en sustrato de la γ-glutamilciclotransferasa cuya función es la liberación del

aminoácido y formación de 5-oxoprolina. La conversión de la 5-oxoprolina a L-glutamato, es dependiente de ATP y es catalizada por la 5-oxo-prolinasa. La cisteil-L-glicina, formada por la transpeptidasa, es digerida por la peptidasa ocasionando la ruptura del péptido. Estas reacciones constituyen el ciclo de la γ-glutamil, el cual toma parte en la síntesis y degradación del GSH (Meister, A. 1973).

1.6 GENERALIDADES DE LA METALOTIONEINA

Las metalotioneínas (MTs) son una familia de proteínas que tienen como características ser de bajo peso molecular de 6-7 KD, presentan un alto contenido de Cys (23-33%) y ausencia de residuos de aminoácidos aromáticos, participan de manera importante en el metabolismo intracelular de metales esenciales. La MT fue descubierta en el riñón de caballo (Margoshes y Vallee, 1957) y posteriormente se han encontrando proteínas similares (isoformas), designadas como MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV. La MT-I y MT-II están presentes en todos los órganos del ratón adulto, la MT-III parece estar distribuida únicamente en cerebro y la MT-IV está presente en ciertos tejidos de origen epitelial (Zheng, et. al. 1996). En presencia del Cd las células son capaces de inducir MT-I y MT-II, estas proteínas se unen con el metal, formando un complejo más soluble (MT-Cd) y de esta manera puede ser eliminado. La MT tiene la capacidad de capturar radicales libres formados en las células como son el $OH^{\bullet}$ y el $O_2^{\bullet}$ (Nath, et al. 2000, Kondoh, et al.2001, Cavaletto, et al. 2002, Ding, et al. 2002). Esto se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* y se considera

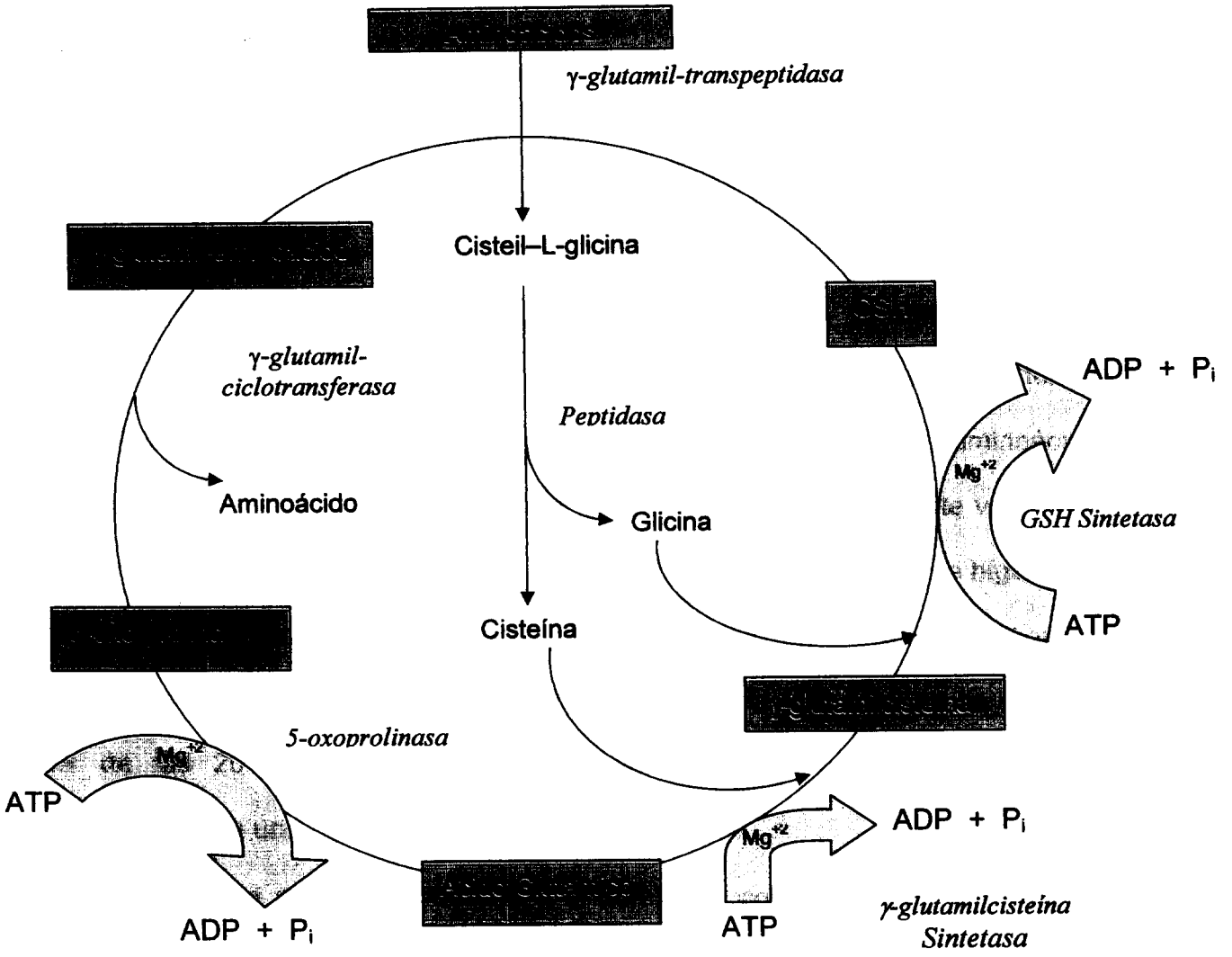
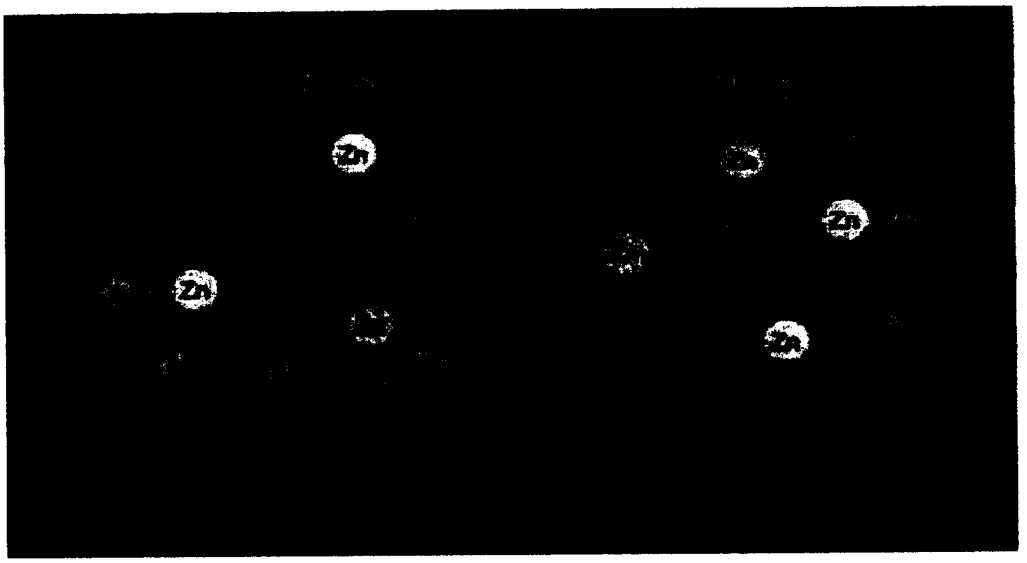


Figura 2. Ciclo γ-glutamil (Meister, A. 1973)

A.



B.

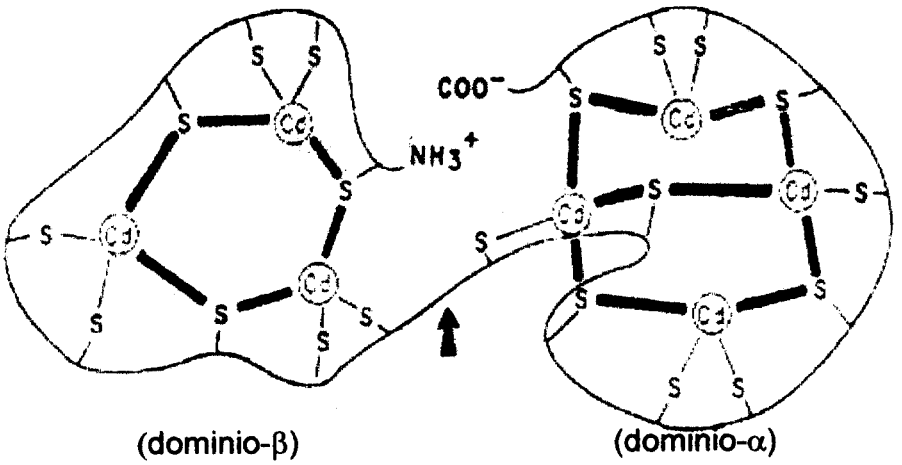


Figura 3

A. Estructura de la metalotioneína (MT), el dominio β se coordina a tres moléculas de zinc y el dominio α a cuatro.

B. El Cd desplaza al Zn y se une a la metalotioneína (Klaassen, et al. 1999).

Dos conclusiones se pueden obtener de la estructura de la MT: la proteína presenta exclusivamente la unión coordinada con metales pesados y puede adoptar diversas conformaciones dependiendo del tipo de ión, teniendo mayor afinidad 10^{-22} y 10^{-18} M, para Cd y Zn respectivamente (Kagi y Vallee, 1960).

1.6.1 Síntesis y metabolismo de la metalotioneína

La síntesis de las MTs es principalmente inducida en las células y los organismos expuestos a metales pesados. Esta inducción se ha explicado en función de un incremento de la transcripción del gen por la interacción entre la secuencia regulatoria del DNA y algunos factores reguladores. La síntesis de MT hepática se realiza exclusivamente en polisomas libres, lo que indica que es una proteína citosólica. La transcripción del gen de la MT es también inducida por una variedad de agentes, como el caso de iones metálicos, citocinas, factores de crecimiento, antioxidantes y condiciones de estrés, tales como la exposición a temperaturas extremas (Hamer, 1986, Palmiter, 1987; Dalton, et al. 1994, y Ebadi, et al. 1995).

La expresión de las MTs puede ser alterada por cambios en la estructura del gen, tales como la metilación, diferenciación celular y desarrollo. El mecanismo por el cual la metilación inhibe esta expresión no se conoce con exactitud, pero se explica que interfiere con la unión de la RNA polimerasa u otros factores regulatorios.

Los lisosomas juegan un papel muy importante en la degradación de muchas proteínas intracelulares, entre las cuales están las MTs. La enzima responsable es la cisteil catepsina B, que se encuentra en el hígado y riñón. La MT es tomada por

los lisosomas expuesta a un medio ácido. A este bajo pH intralisosomal, el metal es desplazado de la MT por iones hidrógeno, permitiendo así que la proteína pueda ser degradada en pequeños péptidos, los cuales son probablemente transferidos del lisosoma al citosol, donde su degradación se completa.

Por otro lado, se conoce que la inducción de la MT, además de ser estimulada por el Cd, se induce por algunos mediadores de señales, como las citocinas, que participan en procesos inflamatorios tales como: el TNF-α, la IL-6 y la IL-1β, (Lee, et al. 1999, y Kanekiyo, et al. 2002).

La MT y el GSH reducen el daño tóxico producido por el Cd (Shimizu y Morita, 1990 y Bose, et al. 1994). Sin embargo, a la fecha no se ha evaluado si existe una correlación entre ellos.

1.7 MEDIADORES DE COMUNICACIÓN CELULAR

Durante los últimos 25 años se han detectado, caracterizado y purificado, un grupo importante de mediadores peptídicos celulares. Estos mediadores, llamados citocinas, funcionan como reguladores del incremento y/o disminución de las respuestas inmunológicas, inflamatorias y como señales intercelulares que regulan la respuesta inflamatoria local y, en ocasiones, sistémica. Muchas citocinas son producidas simultáneamente por células activadas y son difíciles de separar unas de otras.

Las citocinas normalmente actúan de forma paracrina (cerca de la células que las producen) o autocrina (sobre las mismas células que las producen). Aunque ciertos linfocitos activados, macrófagos y líneas celulares de fibroblastos secretan

espontáneamente citocinas al medio de cultivo, las células en reposo y la mayoría de las líneas celulares deben estimularse para producirlas.

Una de las clasificaciones mejor aceptadas es cuando son agrupadas de acuerdo a su función, en pro-inflamatorias (IL-1, TNF-α, IL-6, IFNγ), anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13) y quimiotácticas (IL-8). Sin embargo, el hecho de que una citocina se incluya en un grupo, no la excluye del otro, este comportamiento puede depender de que las citocinas tengan efectos múltiples dependiendo del tipo celular.

Las citocinas en condiciones normales tienen una función biológica, sin embargo, en procesos patológicos como la toxicidad por Cd, su concentración se altera ocasionando un desbalance entre ellas ya que muchas regulan la secreción de otras, como por ejemplo el TNF-α que regula la inducción de IL-1, IL-6 etc. o en el caso de IL-4 que regula la actividad de TNF-α (Manna y Aggarwal, 1998) al disminuir el número de receptores en la célula.

2. ANTECEDENTES

Los efectos tóxicos de los metales pesados pueden ser diferentes dependiendo de una exposición aguda o crónica, ya que el daño crónico puede resultar de la acumulación del agente en el organismo en pequeñas concentraciones por dosis repetidas para producir daño biológico a largo plazo; en cambio, una exposición de tipo agudo se debe a que concentraciones mayores del agente tóxico, entra al organismo en períodos muy cortos de tiempo, produciendo un daño inmediato. Hay variaciones en los efectos toxicológicos entre las especies. Los criterios determinados para la selección del modelo animal están dados por una alta sensibilidad al metal y por una similitud en el metabolismo con respecto al hombre. Una variedad de datos experimentales revelan que, en los humanos, el Cd ocasiona numerosas alteraciones fisiológicas, por ejemplo, hepatotoxicidad y problemas respiratorios. Tradicionalmente los animales de laboratorio han sido utilizados como modelo para predecir los efectos adversos en humanos causados por diferentes agentes tóxicos, entre ellos el Cd. Sin embargo, es difícil contestar en el animal íntegro algunas preguntas a nivel celular, debido a los sistemas homeostáticos presentes, por ello es conveniente utilizar cultivos primarios o líneas celulares dependiendo de los objetivos del trabajo (Gutiérrez, et al. 1994).

Las líneas celulares son un modelo que se ha utilizado para estudiar los efectos tóxicos del Cd, debido a que las células conservan sus funciones hepatocelulares por lapsos largos, no presentan alteraciones fenotípicas y, por lo tanto, es posible analizar en este sistema el efecto de un agente tóxico por períodos prolongados o cortos. Ejemplos de líneas celulares son: LLC-PK de epitelio renal porcino, WRL-68 células fetales hepáticas humanas.

Las ventajas que presentan los cultivos celulares son: a) Se trata de un solo tipo celular sin glándulas, sin vasos, ni terminales nerviosas, b) Todas las células tienen la misma edad y se les puede sincronizar para que estén en la misma fase del ciclo celular, c) La composición del medio es conocido, d) Se pueden obtener grandes cantidades de células, lo que posibilita su análisis bioquímico y e) Se puede conocer las respuestas a nivel celular, sin interferencia de procesos homeostáticos.

En el laboratorio se han realizado estudios previos con la línea celular HepG2 (hepatoblastoma humano), para evaluar el daño ocasionado por diferentes tóxicos (Hernández, et al. 1998, Gutiérrez-Ruiz, et al. 1999, Gutiérrez-Ruiz, et al. 2001), siendo un modelo bien estandarizado es utilizado por diversos grupos de investigación (Roman, et al. 2000, Yoo, et al. 2002, Merrill, et al. 2002). Es por ello que las células HepG2 fueron utilizadas para estudiar la toxicidad con Cd y así evaluar algunas alteraciones morfológicas y funcionales que el metal produce sobre ellas y de esta manera poder contribuir a describir uno de los posibles mecanismos de daño a nivel celular.

3. JUSTIFICACIÓN

Con el incremento en la actividad industrial tanto los trabajadores, como la población en general está expuesta a contaminantes ambientales, como es el caso de los metales pesados, entre ellos el cadmio. Este metal produce daño en el hígado como consecuencia de su acumulación, ocasionando alteraciones funcionales que llegan a ser irreversibles y letales para el organismo. En la actualidad, se han utilizado líneas celulares de origen hepático, proporcionándonos información de alteraciones bioquímicas producidas por el metal, tales como un aumento en la formación de radicales libres que causan estrés oxidativo. Se ha demostrado que el GSH y las MTs protegen a la célula contra la toxicidad producida por el metal. Aunque se sabe que ellos, de manera independiente, interactúan con el metal uniéndose a los grupos tiol presentes en sus estructuras o capturando los radicales libres generados por el cadmio, a la fecha se desconoce de qué manera ciertos mediadores intracelulares participan en la inducción de las MT's. Los cultivos celulares son un modelo adecuado para estudiar el mecanismo de daño y elucidar los posibles mecanismos de protección celular y obtener un mejor conocimiento de las funciones fisiológicas y, de esta manera, contribuir a desarrollar una nueva modalidad terapéutica al daño oxidativo producido por el cadmio.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel que juegan las citocinas pro-inflamatorias y el estrés oxidativo en la inducción del gen de la metalotioneína ocasionada por el cadmio en las células HepG2 de origen hepático.

4.2. Objetivos Particulares:

4.2.1 Determinar la viabilidad de las células HepG2, tratadas con diferentes concentraciones de $CdCl_2$.

4.2.2 Evaluar la expresión del ARNm que codifica a la MT-II en células HepG2, tratadas con $CdCl_2$ y diferentes citocinas pro-inflamatorias.

4.2.3 Cuantificar la inducción del gen de la MT-II en células HepG2, tratadas con agentes que ocasionan estrés oxidativo, como el H_2O_2 y un agente que inhibe la síntesis del glutatión.

4.2.4 Evaluar la participación de diferentes antioxidantes en la inducción del gen de la MT-II en células HepG2.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. CULTIVO CELULAR

Las células HepG2 (hepatoblastoma humano) fue adquirida comercialmente de la América Type Culture Collection (ATCC), el medio de cultivo utilizado fue Williams (Sigma), al cual se le adicionó 8% de suero fetal de bovino (Hy-Clone) y penicilina 100 unidades/ml, con estreptomicina 100 μg/ml (Microlab). En adelante el medio así preparado se llamará Williams completo. Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Nunc) y el medio se les cambió cada tercer día. Las células se levantaron de la botella de cultivo con tripsina-EDTA al 0.025% (Sigma) una vez a la semana, resembrándose nuevamente a una dilución de 1:3 a 1:6. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera de 5% de CO_2 y 90% de humedad, a una temperatura de 37°C. Todos los experimentos se realizaron cuando las células se encontraban en fase logarítmica de crecimiento.

5.2. VIABILIDAD CELULAR (PRUEBA DE MTT)

Para determinar la viabilidad celular se utilizó la prueba de MTT por el método de Mosmann (1983), que se basa en la capacidad de las deshidrogenasas de la mitocondría de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) soluble en agua (amarillo), a formazán (azul) insoluble en agua. Se sembraron 200,000 células/pozo en multicámaras de 24 pozos (Nunc) con medio Willams completo y se dejaron crecer por 24 horas (h) a 37°C. Después se lavaron con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) y se les cambió el medio por uno sin suero fetal de bovino conteniendo diferentes concentraciones de cloruro de

cadmio ($CdCl_2$, Sigma) en un rango de 0.5 hasta 50 μM por 6h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se les agregó una solución de 0.5 mg/ml de MTT en PBS a pH 7.5. Se incubaron por 3 h a 37°C y 90% de humedad. Terminado el tiempo de incubación, las células se lavaron con PBS y se les agregaron 500 μl de una solución de HCl 0.04 N en 2-isopropanol, durante 15 minutos (min), para disolver el formazan. El cambio de absorbancia se leyó a 570 nm en un espectrofotómeto. La funcionalidad se determinó por el porcentaje del cambio de extinción del MTT (Doyle, et al. 1994).

5.3 INDUCCIÓN DE LA METALOTIONEÍNA (MT)

Para poder estudiar la inducción de la MT, las células HepG2 se sembraron en cajas Petri (Nunc) 2 x 10^6 células por 24 h, bajo condiciones fisiológicas. Pasado ese tiempo se les cambió el medio completo por otro medio sin suero y se le adicionaron 5 μM de $CdCl_2$. Se dejaron incubar durante 6 h a 37°C. Las células se lavaron con PBS y se aisló el ARN total para determinar la inducción de la MT por Northern-Blot. Las células control fueron mantenidas durante 6h con medio Williams sin suero en ausencia del metal.

5.4. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE LOS EXTRACTOS CELULARES

La extracción del ARN total de las células HepG2 se realizó empleando la técnica descrita por Chomczynski (1993). Se sembraron 2 x 10^6 de células por cada tratamiento, después de 24 h se retiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS. Posteriormente se les agregó 1 ml de Trizol® y se levantaron con un gendarme de goma estéril. El homogenado se depositó en tubos Ependorff en donde se les dejó

reposar 5 min. a temperatura ambiente. Después se le agregó 0.2 ml de cloroformo y se agitó el tubo por 15 segundos (s). Las muestras fueron centrifugadas 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se tomó la fase acuosa (superior) y se le agregó 0.5 ml de isopropanol, se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó 12000 rpm durante 15 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado (ARN total) obtenido fue secado al vacío y se resuspendió la pastilla de ARN en una solución de dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1% o agua libre de RNAasas.

Finalmente se cuantificó el ARN por espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm. Usando la siguiente relación:

Concentración de ARN = ($ID.O._{260}$) (40 μg/ml de ARN) (factor de dilución)

5.5 EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS ARNm DE LA MT-II Y GAPDH POR NORTHERN-BLOT

El ARN extraído de los cultivos celulares se sometió a un análisis de Northern-Blot (Sambrook, et al. 1989), el cual consistió en que el ARN total obtenido se corrió en una electroforesis de agarosa al 1% en formaldehído. El ARN total se transfirió a una membrana Zeta-Probe® y se pre-híbrido en una solución de Na_2HPO_4 0.5M pH 7.2 y SDS al 7% durante 5 h a 65°C. Después se híbrido con la sonda correspondiente MT-II (Sentido: 5' –CGT TCT TTA CAT CTG GGA GCG- 3', Antisentido: 5' -ATG GAT CCC AAC TGC TCC TG- 3', Studer, et al. 1997) y gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) previamente marcadas con ^{32}P y purificadas durante 24 h a 65°C en una solución de Na_2HPO_4 0.5M pH 7.2 y SDS al

7%. Después las membranas fueron lavadas con una solución de Na_2HPO_4 40 mM pH 7.2 y SDS al 5% a 65°C. Finalmente las membranas fueron expuestas al Molecular Imager (G5525, Bio-Rad) para evaluar la inducción de la síntesis del ARNm de MT-II y GAPDH en las células hepáticas.

5.6 CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS COMO MEDIADORES EN LA INDUCCIÓN DE LA MT.

Para evaluar la participación de citocinas pro-inflamatorias como el factor de *necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 beta (IL-1β), las* células HepG2 fueron sometidas a 2.5 ng/ml de la citocina (R & D Systems), en cuestión y se dejaron incubar durante 6 h a 37°C (Benito y Bosch, 1998, Dong, et al. 1998a). Pasado este tiempo las células fueron lavadas y el ARN obtenido de cada uno de los tratamientos fue utilizado para medir la expresión del ARNm de MT-II y GAPDH.

5.6.1 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF-α) COMO MEDIADOR EN LA INDUCCIÓN DE LA MT.

Para poder estudiar el papel del TNF-α como mediador de daño celular, las células HepG2 fueron pre-tratadas con 10 ng/ml de un anticuerpo monoclonal humano (Ac-TNF-α, R & D Systems) y se dejaron incubar durante 1 h a 37°C. Pasado ese tiempo, se les quitó ese medio y las células fueron tratadas con $CdCl_2$ y Ac-TNF-α 10 ng/ml por 6 h. a 37°C. Las células control estuvieron en ausencia del cadmio y Ac-TNF-α. Después de ese tiempo, se lavaron las células con PBS y se obtuvo el ARN para determinar la inducción de la MT-II y GAPDH.

5.6.2 INTERLEUCINA 1 BETA (IL-1β) COMO MEDIADOR EN LA INDUCCIÓN DE LA MT

Para poder estudiar el papel de la IL-1β como mediador de daño celular, las *células HepG2 fueron pre-tratadas con 5 ng/ml de un anticuerpo monoclonal* humano (Ac-IL-1β, R & D Systems) y se dejaron incubar durante 1 h a 37°C. Pasado ese tiempo, se cambio el medio, por otro que contenía el $CdCl_2$ y 5 ng/ml de Ac-IL-1β durante 6h a 37°C. Las células control estuvieron durante ese tiempo en ausencia del metal y del Ac-IL-1β. Posteriormente se lavaron las células con PBS y se obtuvo el ARN para determinar la inducción de la MT-II y GAPDH.

5.7 GLUTATIÓN (GSH) COMO MEDIADOR EN LA INDUCCIÓN DE LA MT.

Para poder estudiar el papel del GSH como mediador de daño celular *ocasionado por el metal, las células HepG2 fueron tratadas con 2 mM de L-butionina* sulfoximina (BSO, Sigma) el cual es un inhibidor en la síntesis de GSH y se dejó incubar durante 6 h a 37°C (Haïdara, et al. 1999, Shaikh, et al. 1999). Pasado ese tiempo, se lavaron las células con PBS y se obtuvo el ARN para determinar la inducción de la MT-II.

5.8 ESTRÉS OXIDATIVO COMO MEDIADOR EN LA INDUCCIÓN DE LA MT.

Para poder estudiar el papel del estrés oxidativo como mediador de daño celular ocasionado por el cadmio, se realizaron dos experimentos. Uno de ellos fue someter a las células HepG2 con 0.25 mM de peroxido de hidrógeno (H_2O_2, Sigma) durante 6 h a 37°C (Dong, et al. 1998a). Posteriormente, se lavaron las células con PBS y se obtuvo el ARN para determinar la inducción de la MT-II. Otra forma de

evaluar la participación de las especies reactivas es la utilización de antioxidantes, para ello se utilizó 10 mM de N-acetil-cisteína (NAC, Sigma), 10 mM 1,1,3,3-tetrametil-2-tiourea (TMTU, Sigma) y 2 U/ml catalasa (CTLS, Sigma). Las células HepG2 fueron expuestas a cada uno de estos compuestos durante 6h a 37°C (Dong, et al. 1998a). Concluido el tiempo de incubación, se lavaron las células con PBS y se obtuvo el ARN para determinar la inducción de la MT-II y GAPDH.

5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Cada experimento se realizó por triplicado en eventos independientes. El análisis estadístico de los resultados obtenidos fue hecho mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se empleó para el análisis el programa SPSS 7.0. El nivel de significancia fue de $p \leq 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS HepG2 EXPUESTAS A $CdCl_2$.

La viabilidad de las células HepG2 expuestas durante 6 h a una concentración de $CdCl_2$ entre 0.5 y 50 μM, se evaluó por la prueba de MTT. El daño ocasionado por $CdCl_2$ fue medido por la conversión de MTT a formazán por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células viables. El producto formado fue cuantificado espectrofotométricamente y comparado con el de las células no tratadas con el tóxico los resultados son expresados como % Absorbancia a 570 nm y se muestran en la Figura 4. Se considera que en las células control hay un 100 % de producto (formazán). Cuando las células fueron tratadas con concentraciones en el rango de 0.5-10μM de $CdCl_2$ durante 6 h mostraron valores cercanos al 100 % de producto, mientras que las células tratadas con 50 μM de $CdCl_2$ disminuyeron la viabilidad celular y presentaron un 70% de la absorbancia con respecto al control. Dado que el objetivo del presente trabajo es evaluar las alteraciones producidas por el metal a nivel celular, el interés estaba en encontrar la concentración del $CdCl_2$ que estuviese ocasionando daño celular, sin producir la muerte. De estos resultados se determinó tratar a las células con 5.0 μM de $CdCl_2$ donde las células presentaban una viabilidad del 97.8 ± 5.3 % durante 6h y mantenían su capacidad de proliferar al ser resembradas.

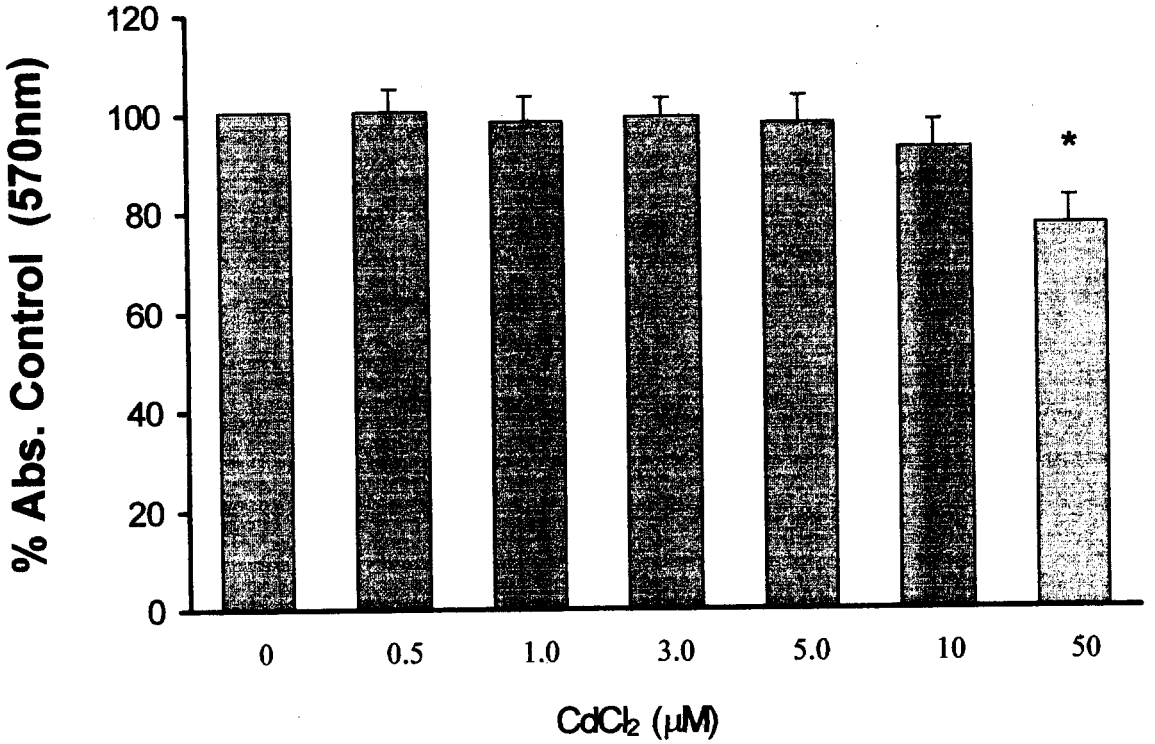


Figura 4. Curva de viabilidad de células HepG2 después de 6h en presencia de diferentes concentraciones de $CdCl_2$ Las células control fueron incubadas con medio Williams sin suero. Cada barra expresa el valor promedio ± error estándar.

* Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control.

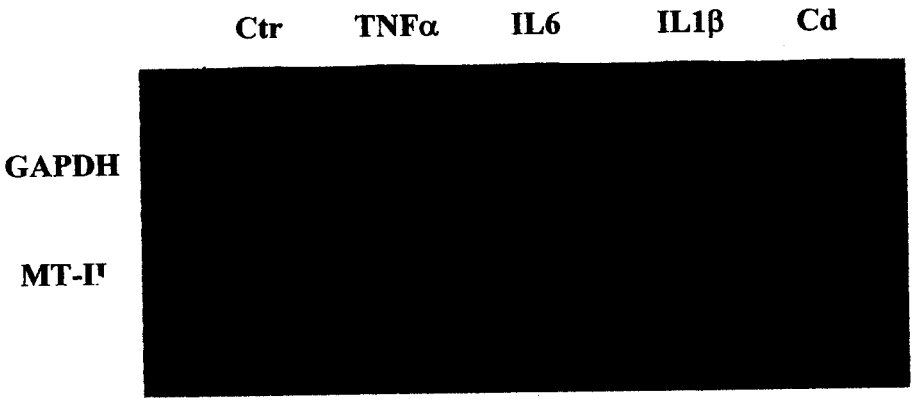
6.2. INDUCCIÓN DEL GEN DE MT-II EN CÉLULAS HepG2 EXPUESTAS A $CdCl_2$ Y CITOCINAS.

La inducción del ARNm de MT-II fue evaluado por el método de hibridización por Northern-Blott, utilizando una sonda de MT-II marcada con ^{32}P. La señal emitida fue analizada en el Molecular Imager para cuantificar la intensidad de la expresión del ARNm de MT-II. El valor basal del ARNm de MT-II en las células control fue de 0.375 ± 0.040 [Unidades (MT-II/GAPDH)] como se muestra en la figura 5. Por otro lado las células, tratadas con 5μM de $CdCl_2$ mostraron un incremento del 512% con respecto a las células control, siendo su valor absoluto de 1.92 ± 0.177 [Unidades (MT-II/GAPDH)]. Así mismo, se encontró que los tratamientos en presencia de 2.5 ng/ml de TNF-α, IL-6 e IL-1β mostró un aumento estadísticamente significativo con respecto al control de 266, 228 y 239% del ARNm de MT-II. Los valores en la inducción de la MT-II fueron de 0.999 ± 0.119, 0.8562 ± 0.051 y 0.8970 ± 0.060 [Unidades (MT-II/GAPDH)] respectivamente.

6.3. INDUCCIÓN DEL GEN DE MT-II EN CÉLULAS HepG2 EXPUESTAS A $CdCl_2$ Y Ac-TNF-α, Ac-IL-1β e IgG.

Con el fin de evaluar el papel que juega el TNF-α en la inducción de la MT-II, las células fueron tratadas con 10 ng/ml de anticuerpo monoclonal TNFα (Ac-TNFα). No se observa cambió en la expresión del ARNm de MT-II con respecto a las células control figura 6. La expresión del ARNm de MT-II presentó un valor absoluto de 0.6119 ± 0.046 [Unidades (MT-II/GAPDH)]. Al adicionar en conjunto el Ac-TNF-α con 5 μM de $CdCl_2$ se observa una inducción del ARNm de la MT-II de 1.559 ± 0.083 [Unidades (MT-II/GAPDH)], la cual corresponde a un incremento

A.



B.

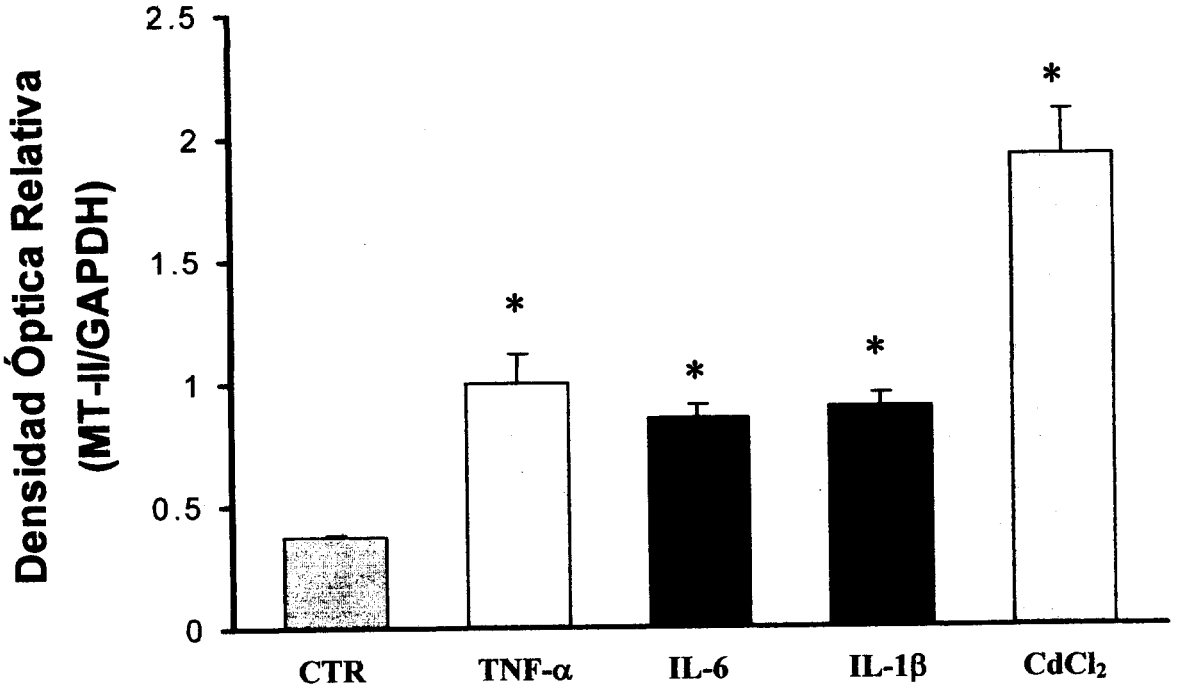
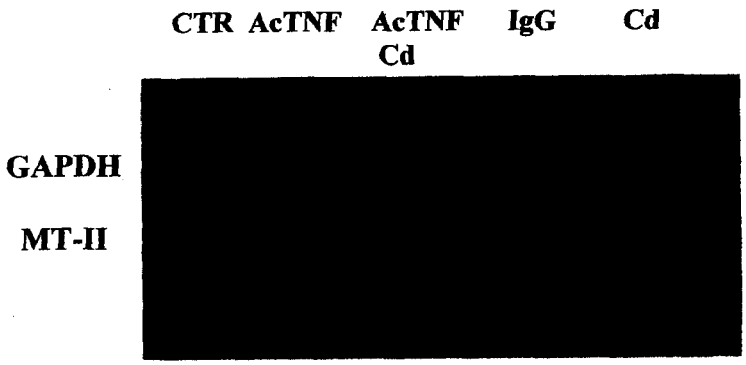


Figura 5. Inducción del ARNm de MT-II en células HepG2 tratadas con 5 μM de $CdCl_2$ y 2.5 ng/ml de las diferentes citocinas durante 6h de exposición. Cada barra expresa el valor promedio ± error estándar. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control.

A.



B.

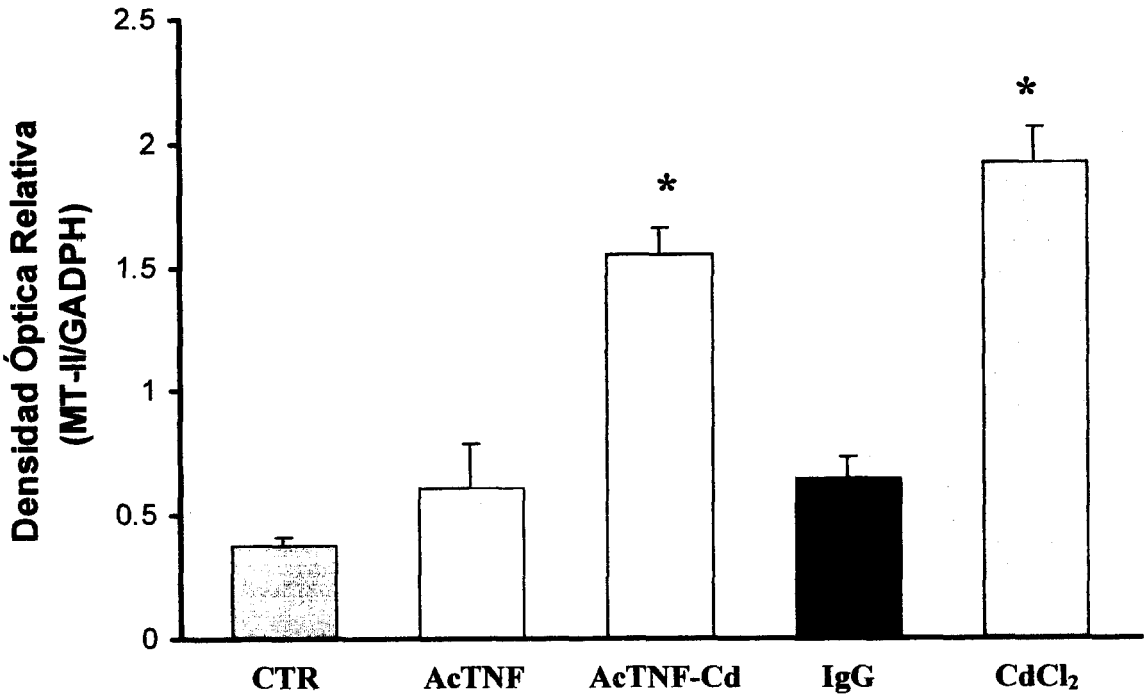


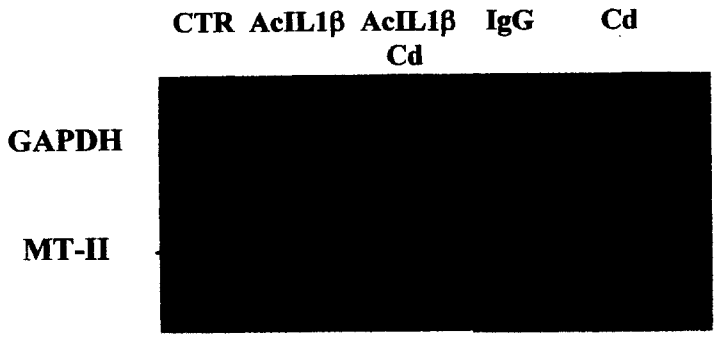
Figura 6. Inducción del ARNm de MT-II en células HepG2 tratadas con 5μM de $CdCl_2$, 10ng/ml de anti-TNF-α monoclonal (AcTNF), 10 ng/ml de AcTNF-α junto con $CdCl_2$ (AcTNF-Cd) y 2.5 ng/ml de IgG durante 6h de exposición. Cada barra expresa el valor promedio ± error estándar. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control.

estadísticamente significativo del 416% con respecto al control y una disminución del 19% con respecto a las células tratadas únicamente con 5 μM de $CdCl_2$. Lo anterior representa una tendencia a disminuir en presencia del Ac-TNF-α, indicando de manera indirecta la participación del TNF-α. Además, cuando las células fueron tratadas con 2.5 ng/ml de IgG no hubo cambio en la inducción de MT-II, encontrándose un valor absoluto de 0.6489 ± 0.036 [Unidades (MT-II/GAPDH)]. En la figura 7, se muestra un comportamiento similar para el caso de los tratamientos con 5 ng/ml del anticuerpo monoclonal de interleucina 1β (Ac-IL-1β), obtuvimos un valor similar al control de 0.3644 ± 0.0193 [Unidades (MT-II/GAPDH)]. Cuando fue adicionado aditivamente el Ac-IL-1β con el $CdCl_2$, se observa una tendencia a disminuir del 23 % con respecto a las células HepG2 tratadas únicamente con el metal obteniendo un valor de 1.478 ± 0.0495 [Unidades (MT-II/GAPDH)] y un incremento del 394% con respecto a las células control.

6.4 INDUCCIÓN DEL GEN DE MT-II EN CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO.

El H_2O_2 es uno de los precursores principales para generar especies reactivas de oxígeno que aumentan el estrés oxidativo en las células expuestas a metales pesados. En la figuras 8, podemos observar un incremento del 200% con respecto al control cuando las células fueron tratadas con 0.25mM de H_2O_2, siendo su valor en la inducción de MT-II del 0.7525 ± 0.0203 [Unidades (MT-II/GADPH)]. Sin embargo, el valor se incrementa a 0.992 ± 0.042 cuando fueron expuestas a 2 mM. de BSO durante 6 h, siendo de 264% más elevado que el de

A.



B.

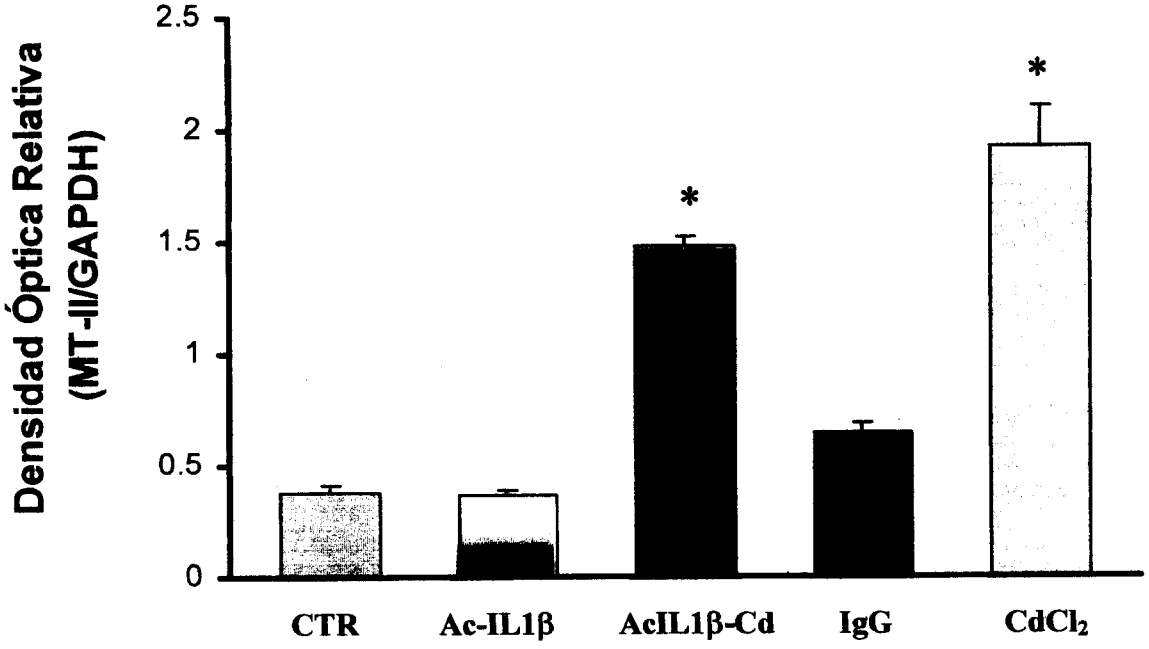
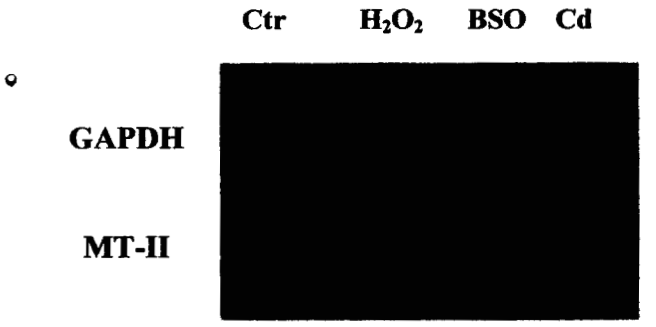


Figura 7. Inducción del ARNm de MT-II en células tratadas con 5 μM de $CdCl_2$, 5 ng/ml de anti-interleucina-1β monoclonal (Ac-IL1β) y Ac-IL1β junto con el metal (AcIL1 β-Cd) durante 6h de exposición. Cada barra expresa el valor promedio ± error estándar. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control.

A.



B.

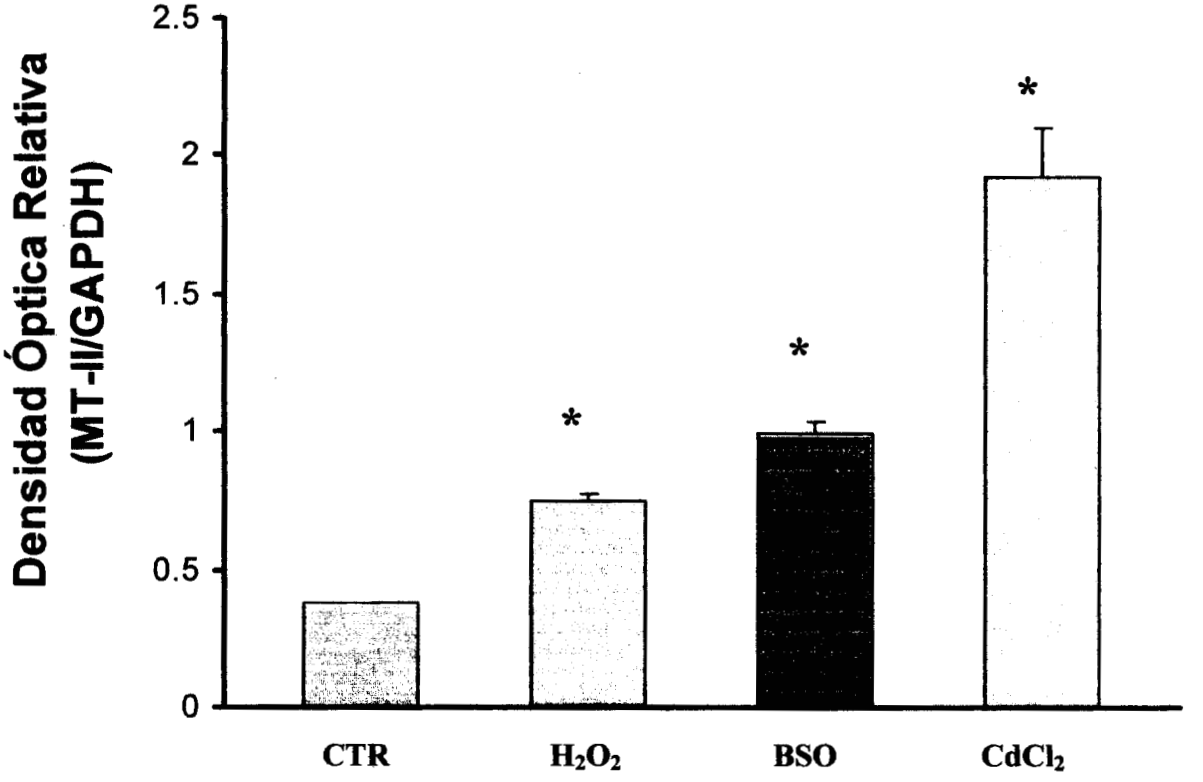


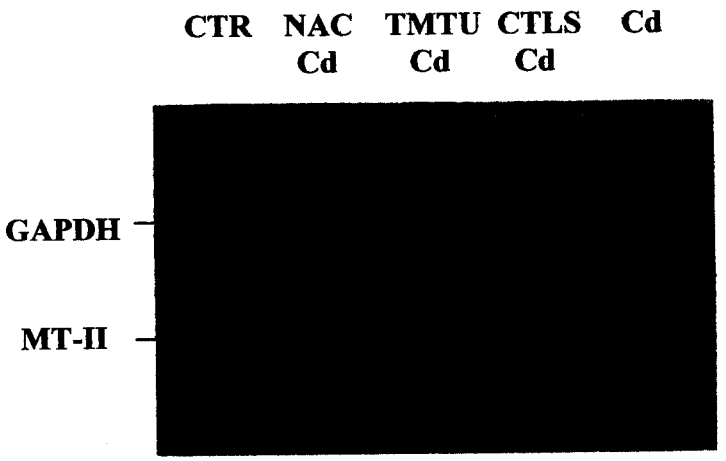
Figura 8. Inducción del ARNm de MT-II en células HepG2 tratadas con 0.25mM H_2O_2, 2mM de BSO y 5 μM de $CdCl_2$ durante 6h de exposición. Cada barra expresa el valor promedio ± error estándar. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control.

las células control. A pesar de que en ambos casos se demuestra un incremento significativo en la inducción de MT-II con respecto al control, ninguno de los tratamientos, indujo la expresión del ARNm de la MT-II a concentraciones semejantes a las encontradas cuando las células son tratadas con 5 μM de $CdCl_2$. En la grafica 8, se observa una tendencia a incrementar la inducción de MT-II en presencia del BSO comparándolo con H_2O_2.

6.5 INDUCCIÓN DEL GEN DE MT-II CON DIFERENTES ANTIOXIDANTES.

Con el fin de evaluar la participación del estrés oxidativo en la inducción de MT-II las células fueron tratadas con diferentes agentes antioxidantes junto con el Cd. En la Figura 9, se observa en todos los tratamientos una disminución significativa con respecto a las células tratadas con el metal, de aproximadamente un 40%, en la misma gráfica se muestra un incremento del 306% con respecto al control, cuando las células son sometidas a 10 mM de NAC y a 10 mM de TMTU, en donde el valor en la inducción de MT-II fue de 1.147 ± 0.111 y de 1.155 ± 0.152 [Unidades (MT-II/GAPDH)] respectivamente. De igual forma cuando las células fueron expuestas a 2 U/ml de catalasa al mismo tiempo que el $CdCl_2$ la inducción de MT-II se incrementa hasta un 285% con respecto al control, teniendo una estimación aproximada de 1.07 ± 0.047 [Unidades (MT-II/GAPDH)]. Por lo tanto, al analizar estos resultados se observa que la utilización de los antioxidantes junto con 5 μM de $CdCl_2$ fue significativamente diferente con respecto al control y con respecto a las células tratadas únicamente con el metal.

A.



B.

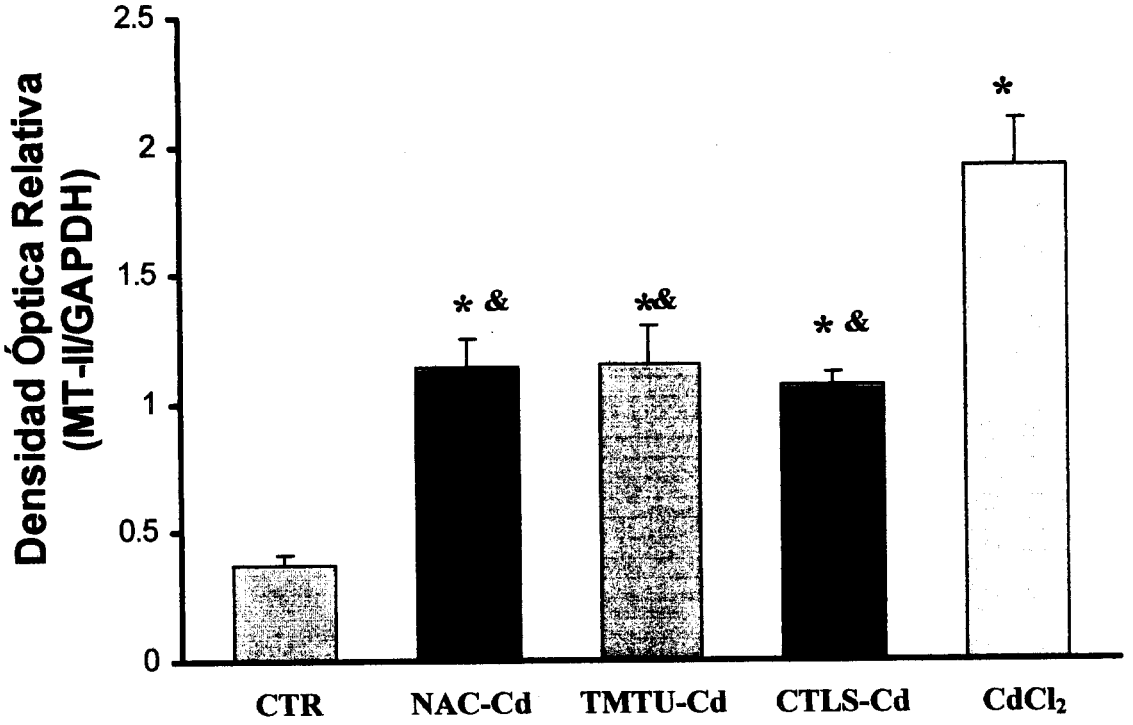


Figura 9. Inducción del ARNm de MT-II en células HepG2 tratadas con 5 μM de $CdCl_2$ y 10 mM de NAC (NAC-Cd), 10 mM de TMTU (TMTU-Cd) y 2U/ml de catalasa (CTLS-Cd) durante 6h de exposición. Cada barra expresa el valor promedio ± error estándar. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control. & Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto a las células expuestas al metal.

7. DISCUSIÓN

Las células HepG2, fueron utilizadas como modelo para estudiar el papel que juegan el estrés oxidativo y las citocinas en la inducción de MT-II. Primeramente fue necesario realizar una evaluación de la citotoxicidad producida por el cadmio, utilizando la prueba de MTT. Se encontró que las células presentaron una disminución en la viabilidad solamente a concentraciones de 50 μM de $CdCl_2$ (gráfica 1), y una viabilidad mayor al 90% cuando fueron expuestas con concentraciones en un rango de 0.5-10 μM de $CdCl_2$ con respecto al control. Koropantnick y Zalupus, (1997), utilizando la misma prueba encontraron que en los monocitos humanos (células THP-1), tratadas con concentraciones menores de 5μM de $CdCl_2$ durante 4h, no se da una reducción en la actividad metabólica con respecto al control. Sin embargo, después de 10 μM de $CdCl_2$ observaron una disminución del 40% tanto en la actividad metabólica como en la proliferación celular. Mitsuyoshi, et al. (1999) también realizaron un estudio con cultivos primarios de hepatocitos y obteniendo una disminución de la viabilidad del 59 y del 39 % cuando las células fueron tratadas con 3 y 6 μM de $CdCl_2$ respectivamente durante 24 h con respecto al control, alcanzando un 97% de mortalidad cuando las células fueron expuestas a 12.5 μM de $CdCl_2$. Por otro lado, en cultivos primarios de células epiteliales de pulmón (Hart, et al., 1999), reporta una viabilidad del 90% con respecto al control a concentraciones de 20 μM de $CdCl_2$ durante 24 h de exposición. De lo anterior notamos que los hepatocitos pueden ser más sensibles al daño ocasionado por el cadmio que las células de pulmón.

Para estudiar la participación del TNF-α, la IL-6 y la IL-1β en la inducción del ARNm de MT-II, tratamos a las células HepG2 con cada una de ellas y observamos que hay un incremento en la inducción del ARNm-MT-II de 2.6 veces en presencia de TNF-α 2.3 y 2.2 veces respectivamente con IL-Iβ e IL-6 con respecto al control. Esto nos indica que las citocinas participan en la inducción de MT-II de manera diferencial. La mayoría de las citocinas pro-inflamatorias (IL-1β, IL-6 y TNF-α) tienen la capacidad de inducir MTs (Sato, et al. 1992). En los experimentos con ratas tratadas durante 4h con TNF-α e IL-6 se demostró que la inducción de MT-I en el hígado se dio de manera similar (Sato, et al. 1995), Sin embargo, en el riñón del mismo animal no se observan cambios significativos en la inducción de MT-I con respecto a las células control. Koropatnick y Zalupus, (1997), evaluaron la capacidad de las células THP-1 para expresar ARNm de MT-II, al ser tratadas con 1 y 10 μM de $CdCl_2$ durante 20h, observando un incremento significativo de 14 y 8 veces respectivamente más con respecto al control. De lo anterior, es importante hacer notar que las células HepG2 tienen un comportamiento semejante a las células THP-1, ya que muestran un aumento significativo en la inducción de MT-II de 5 veces su valor con respecto a las células control, al ser tratadas solamente con 5 μM de $CdCl_2$ durante 6 h. Otros investigadores, como es el caso de Datfada y Young, (1999), evaluaron la participación de la IL-1 y la IL-6 en células HepG2 , encontrando que la IL-6 tiene menor efecto en la expresión del ARNm de MT-I que la IL-1, ya que 1 ng/ml de IL-6 incrementa hasta 2.7 veces su valor durante 4-8 h de exposición y 3 veces su valor con respecto al control con 5 ng/ml de IL-1 durante 8-12h.

Ahora bien, para determinar si las citocinas están participando directamente en la inducción de la MT o bien si la inducción esta dada por otro factor, se utilizaron Ac-TNF-α y Ac-IL1β, encontrándose ligeramente disminuida la inducción de MT-II en presencia del Cd. Otro de los efectos estudiados en la inducción de MT-II, fue la participación del estrés oxidativo provocado por la presencia de 0.25mM de H_2O_2 y 2mM de BSO concentración suficiente para inhibir la síntesis de la γ–GCS (Morales, et al. 1997) cuando las células HepG2 fueron expuestas a H_2O_2 durante 6h se observó una disminución del 48% con respecto a las células tratadas con $CdCl_2$ y el valor descendió aproximadamente 61% con respecto a las células tratadas con $CdCl_2$ cuando se administró el BSO. Esto nos proporciona información sobre la participación de las especies reactivas de oxigeno (ROS) producidas por el metal y su relación con el GSH, siendo este último una de las principales entidades hepatoprotectoras por su capacidad de neutralizar radicales libres, entre otras funciones (Tan, et al. 1998).

De los datos obtenidos, al evaluar de manera indirecta la participación del estrés oxidativo con antioxidantes como NAC, TMTU y CTLS, observamos una disminución en la inducción de MT-II aproximadamente de un 40% con respecto a las células tratadas con 5 μM de $CdCl_2$. Dong, et. al. 1998a, utilizaron las mismas concentraciones de antioxidantes en células HepG2 para evaluar la secreción de citocinas inflamatorias debido al estrés oxidativo ocasionado con 0.25 mM de H_2O_2, concluyendo que NAC y TMTU inhibe la secreción parcial de citocinas como IL-8 y TNF-α. La inhibición puede ocurrir posiblemente porque TMTU tiene la capacidad de capturar al radical $OH^{\bullet}$ (Aruoma, et al. 1989), por su parte NAC es un aminotiol

haciéndolo eficiente en atrapar radicales $OH^{\bullet}$ y manteniendo altas las concentraciones de GSH, ocasionando que éste a su vez aumente la capacidad de capturar ROS (Sekharam, et al. 1998), las cuales pueden inducir la secreción de TNF-α en hepatocitos (Dong, et al. 1998b, Collel, et al. 1998). Otros autores como Gong y Hart, (1997), consideran importante la participación de las ROS en inhibir la expresión de genes de MT-I, glutatión transferasa y hemo-oxigenasa I debido a la citotoxicidad producida por el cadmio en cultivo primario de pulmón de rata. Así mismo, Abe, et al. 1998, reportaron que NAC en células WISH (tejido amniótico humano) tiene una función diferencial dependiente de la dosis, ya que a 30 mM tiene la capacidad de suprimir la inducción de MT-II incrementando la concentración de GSH, bloqueando el daño ocasionado con 50μM de $CdCl_2$ durante 3 h, pero no se suprimió la inducción de la MT-II cuando utilizaron 1.5 mM de NAC, no se observa un aumento en el contenido de GSH, sin embargo, se da un incremento en LPO, ocasionado por un desbalance en el estado redox producido por cadmio.

De los resultados presentados se puede concluir que el estrés oxidativo y las citocinas participan en la inducción de la MT-II provocada por la exposición del Cd en las células HepG2. La MT-II tiene una participación importante en la protección celular, porque forma un complejo MT-Cd impidiendo que el metal se encuentre libre en el citoplasma, si el metal se encuentra en forma libre interactúa con los grupos tiol de las proteínas, produciendo perdida de la función. El mecanismo por el cual se induce la MT en la célula es un proceso multifactorial, ya que tanto citocinas pro-inflamatorias así como el incremento de los radicales libres y una disminución en el GSH, generan señales para que la célula se proteja del daño ocasionado por el Cd.

El conocimiento de estos resultados contribuyen al entendimiento de los mediadores de señales celulares, involucrados en la inducción de la MT-II.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abe T., Yamamura K., Gotoh S., Kashimura M. y Higashi K., (1998), Concentration-dependent differential effects of N-acetyl-L-cysteine on the expression of HSP70 and metallothionein genes induced by cadmium in human amniotic cells. Biochem. Biophys. Acta 1380: 123-132.
2. Albert L.A., (1990), Curso básico de toxicología ambiental. Ed. Limusa, México. CEPHS. OPS. OMS. Cap. 9, pp. 145-169.
3. Antonio M.T., Lopez N. y Leret M.L., (2002), Pb and Cd poisoning during development alters cerebellar and striatal function in rats, Toxicology 176: 59-66.
4. Arias M., Boyer L.J., Fausto N., Jakoby W.B., Schachter D. y Scafritz D.A., (1994), The liver biology and pathobiology, Cap. 23 "Glutathione" third edition, Ed. Raven Press, Lth., U.S., p.p. 401-417.
5. Aruoma O.I., Spencer J.P. y Mahmood N., (1989), Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine, Food Chem. Toxicol. 37: 1043-1053.
6. Barany E., Bergdahl I.A., Bratteby L.E., Lundh T., Samuelson G., Schutz A., Skerfving S. y Oskarsson A., (2002), Trace elements in blood serum of Swedish adolescents: relation to gender, age, residential area, and socioeconomic status, Environ. Res. 89: 72-84.
7. Blazka M.E. y Shaikh Z.A., (1992), Cadmium and mercury accumulation in rat hepatocytes: interactions with other metals ions. Toxicol. Appl. Pharmacol. 113: 118.125.

8. Becker K., Kaus S., Krause C., Lepom P., Schulz C., Seiwert M. y Seifert B., (2002), German environmental survey 1998 (GerES III): environmental pollutants in blood of the German population, Int. J. Hyg. Environ Health 205: 297-308.

9. Benito E. y bosch M.A., (1998), The inflammatory cytokines tumor necrosis factor α and interleukin-1β stimulate phosphatidylcholine secretion in primary cultures of rat type II pneumocytes, Mol. Cell Biochem. 189: 169-176.

10. Bose S., Mukhopadhyay B., Chaudhury S. y Bhattachrya S., (1994), Correlation of metal distribution, reduced glutathione and metallothionein levels in liver and kidney of rat. Indian, J. Exp. Biol. 32:679-681.

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

12. Cavaletto M., Ghezzi A., Burlando B., Evangelisti V., Ceratto N. y Viarengo A., (2002), effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein levels in the digestive gland of Mytilus galloprovincialis, Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 131: 447-455.

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

14. Chomczynski P.A., (1993), Reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples, Biotechiques 15: 532-536.

15. Colell A., Garcia-Ruiz C., Miranda M., Ardite E., Marí M., Morales A., Corrales F., Kaplowitz N. y Fernández-Checa J.C., (1998), Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor, Gastroenterology 115:1541-1551.

16. Coodley E.L., (1971), Enzyme diagnosis in hepatic disease, Am. J. Gastroenterol. 56: 413-419.

17. Dalton T., Palmiter R.D. y Andrew G.K., (1994), Transcriptional induction of mouse metallothionein-I gene in hydroperoxide treated hepatic-cell involves a composite major late transcription factor/antioxidant-response element and metal-response promoter elements. Nucleic Acid Res. 22: 5016-5023.

18. Datfada A.A.I. y Young S.P., (1999), Coordinated regulation of ceruloplasmin and metallothionein mRNA by interleukin-1 and copper in HepG2 cells, FEBS Letter 457:214-218.

19. Ding H.Q., Zhou B.J., Liu L. y Cheng S., (2002), Oxidative stress and metallothionein expression in the liver of rats with severe thermal injury, Burns, 28: 215-221.

20. Dong W., Simeonava P.P., Gallucci R., Matheson J., Fannin R., Montuschi P., Flood L. y Luster M.I., (1998a), Cytokine expression in hepatocytes: role of oxidant stress. J. Interferon Cytokine Res. 18: 629-638.

21. Dong W., Simeonava P.P., Gallucci R., Matheson J., Flood L., Wang S., Hubbs A. y Luster M.I., (1998b), Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. Toxicol. Appl. Pharmacol. 151:359-366.

22. Doyle A., Griffiths J.S. y Newell D.G., (1994), Cell & Tissue, Culture: Laboratory & Procedures, Ed. John Wiley & Sons, New York, 4B:7.

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

24. Ebadi M., Iversen P.L:., Hao R., Cerutis D.R., Rojas P., Happe H.K., Murrin L.C. y Pfeiffer R.F., (1995), Expression and regulation of brain metallothionein, Neurochem. Int. 27: 1-22.

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

26. Escobar Ma.C., V. Souza, L. Bucio, E. Hernández, P. Damián-Matzumura, V. Zaga, y Ma.C. Gutiérrez-Ruiz, (2002), Cadmium induces $\alpha_1$collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells, Toxicology 170: 63-73.

27. Felman F.L. y Cousins R.J., (1973), Influence of cadmium on the metabolism of 25-hydroxy calciferol in chicks. Nutr. Rep. Int. 8: 251-259.

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

29. Gong Q. y Hart B.A., (1997), Effect of thiols on cadmium-induced expression of metallothionein and other oxidant stress genes in rat lung epithelial cells, Toxicology, 119: 179-191.

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

31. Gutiérrez-Ruiz M.C., Quiroz S.C., Souza V., Bucio L., Hernández E., Olivares I.P., Llorente L., Vargas-Vorackova F. y Kershenobich D., (1999), Cytokines, growth factors, and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde, and LPS., Toxicology, 134: 197-207.

32. Gutiérrez-Ruiz M.C., Gomez Quiroz L.E., Hernández E., Bucio L., Souza V., Llorente L. y Kershenobich D., (2001), Cytokines response and oxidative stress produced by ethanol, acetaldehyde and endotoxin treatment in HepG2 cells., Isr. Med. Assoc. J., 3: 131-136.

33. Haïdara K., Moffatt P. y Denizeau F., (1999), Metallothionein induction attenuates the effects of glutathione depletors in rat hepatocytes. Toxicol. Sci. 49: 297-305.

34. Hamer D.H., (1986), Metallothionein. Ann. Rev. Biochem. 55: 913-951.

35. Hart B.A., Lee C.H., Shukla G.S., Shukla A., Osier M., Eneman J.D. y Chiu J.F., (1999), Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress, Toxicology 133:43-58.

36. Hernandez E., Gutierrez-Ruiz M.C. y Garcia Vargas G., (1998), Effect of acute lead treatment on coproporphyrinogen oxidase activity in HepG2 cells, Toxicology, 126: 163-171.

37. Jarup L., (2002), Cadmium overload and toxicity, Nephrol. Dial Transplant, 17: 35-39.

38. Kagi J.H.R. y Vallee B.L., (1960), Metallothionein, a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. J. boil. Chem. 235: 3460-3465.

39. Kanekiyo M., Itoh N., Kawasaki A., Matsuyama A., Matsuda K, Nakanishi T. y Tanaka K., (2002), Metallothionein modulates lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor expression in mouse peritoneal macrophages, Biochem. J., 361: 363-369.

40. Klaassen C.D., Liu J. y Choudhuri S., (1999), Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39: 267-294.

41. Koizumi T., Shirakura H., Kumagai H., Tatsumoto H. y Suzuki K.T., (1996), Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium-induced active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane, Toxicology, 114: 125-134.

42. Kondoh M., Inoue Y., Atagi S., Futakawa N., Higashimoto M. y Sato M., (2001), *Specific induction of metallothionein synthesis by mitochondrial oxidative stress*, Life Sci. 69: 2137-2146.

43. Koropatnick J. y Zalups R.K., (1997), Effect of non-toxic mercury, zinc or cadmium pretreatment on the capacity of human monocytes to undergo lipopolysaccharide-induced activation, British J. Pharmacol. 120: 797-806.

44. Lee D.K., Carrasco J., Hidalgo J. y Andrews K.G., (1999), *Identification of a* signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression. Biochem. J. 337: 59-65.

45. Maines M.D. y Kappas A., (1977), Metals as regulators of heme metabolism. Science 198: 1215-1221.

46. Manna S.K. y Aggarwal B.B., (1998), Interleukin-4 down-regulates both forms of tumor necrosis factor receptor and receptor mediated apoptosis, NF-κB, AP-1 and c-jun N-terminal kinase, J. Biol. Chem. 273: 33333-33341.

47. Margoshes M. y Vallee B.L., (1957), A cadmium protein from equine kidney cortex, J. Am. Chem. Soc. 79: 1813-1814.

48. Meister A., (1973), On the enzymology of amino acid transport. Science. 180: 33-39.

49. Merril C.L., Ni H., Ion L.W., Tirmenstein M.A., Narayanan P., Benavides G.R., Easton M.J., Creech D.R., Hu C.X., McFarland D.C., Hahn L.M., Thomas H.C. y Morgan K.T., (2002), Etomoxir-induced oxidative stress in HepG2 cells detected by differential gene expression is confirmed biochemically, Toxicol. Sci. 68: 93-101.

50. Mitsuyoshi H., Nakashima T., Sumida Y., Yoh T., Nakajima Y., Ishikawa H., Inaba K., Sakamoto Y., Okanoue T. y Kashima. K., (1999), Ursodeoxycholic acid protects hepatocytes against oxidative injury via induction of antioxidants, Biochem. Biophys. Res. Commun. 263: 537-542.

51. Mosmamm T., (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods. 65: 55-63.

52. Morales A., García-Ruiz C., Miranda M., Marí M., Colell A., Ardite E. y Fernández-Checa J.C., (1997), Tumor necrosis factor increases hepatocellular

glutathione by transcriptional regulation of the heavy subunit chain of γ-glutamylcysteine synthetase, J. Biol. Chem. 38: 30371-30379.

53. Müller L., (1986), Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. Toxicology, 40: 285-295.

54. Nath R., Kumar D., Li T. y Singal P.K., (2000), Metallothioneins, oxidative stress and the cardiovascular system, Toxicology, 155: 17-26.

55. Nishijo M., Nakagawa H., Honda R., Tanebe K., Saito S., Teranishi H. y Tawara K., (2002), Effects of maternal exposure to cadmium on pregnancy outcome and breast milk, Occup. Environ. Med. 59: 394-397.

56. Nomiyama K., Sugata Y., Yamamoto A., y Nomiyama H., (1975), Effects of dietary cadmium on rabbits. Early signs of cadmium intoxication. Toxicol. Appl. Pharmacol. 31: 4-12

57. Nriagu J.O., (1980), Production, uses and properties of cadmium. in: Cadmium in the environmental. Part 1. John Willy & Sons, New York. NY, pp. 35-70.

58. Nriagu J.O., (1982), Deposition and chemistry of the pollutant metals in lakes around the smelters at Sudbury, Ontario., Environ. Sci. Technol. 16: 551-560.

59. Palmiter R.D., (1987) Molecular biology of metallothionein gene expression. Experentia 52: 63-80.

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

61. Rikans L.E. y Yamano T., (2000), Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity, J. Biochem. Mol. Toxicol. 14: 110-117.

62. Roman J., Giménez A., Lluis J.M., Gasso M., Rubio M., Caballeria J., Pares A., Rodes J. y Fernández-Checa J.C., (2000), Enhanced DNA binding and activation of transcription factors NF-kappa B AP-1 by acetaldehyde in HepG2 cells, J. Biol. Chem. 275: 14684-14690.

63. Saldivar O. L., Tovar T. A. y Fortoul T.I., (1997), Introducción a la toxicología ambiental, CEPHS. OPS. OMS. México, Cap. 13, pp 211-226.

64. Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis, T., (1989), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

65. Satarug S., Baker J.R., Reilly P.E., Moore M.R. y Williams D.J., (2002), Cadmium levels in the lung, liver, kidney cortex, and urine samples from australians without occupational exposure to metals, Arch. Environ. Health 57: 69-77.

66. Sato M., Sasaki M. y Hojo H., (1992), Tissue-specific induction of metallothionein synthesis by tumor necrosis factor-α, Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 75: 159-172.

67. Sato M., Sasaki M. y Hojo H., (1995), Antioxidative roles of metallothionein and manganese superoxide dismutase induced by tumor necrosis factor-α and interleukin-6, Arch. Biochem. Biophys. 316: 738-744.

68. Sekharam M., Trotú A., Cunnick J.M. y Wu J., (1998), Suppression of fibroblast cell cycle progession in G1 phase by N-acetylcysteine, Toxicol. Appl. Pharmacol. 149: 210-216.

69. Shaikh Z.A., Northup J.B. y Vestergaard P., (1999), Dependence of acadmium-metallothionein nephrotoxicity on glutathione, J. Toxicol. Environ. Health, 56: 211-222.

70. Shimizu M., y Morita S., (1990), Effects of fasting on cadmium toxicity, *glutathione metabolism and metallothionein synthesis in rats*, Toxicol. Appl. Pharmacol. 103:28-39.

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

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

73. Susuki K., Ikebuchi H. y Terao T., (1985), Mercury and cadmium ions stimulate phosphosrylation of band 4.2 protein on human erythrocyte membranes. J. Biol. Chem. 260: 4526-4530.

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

75. Studer R., Vogt C.P., Cavigelli M., Hunziker P.E., y Kagi R.H.J., (1997), Metallothionein accretion in human hepatic cells is linked to cellular proliferation, Biochem. J., 328: 63-67.

76. Tan S., Sagara Y., Liu y., Maher P. y Schubert D., (1998), The regulation of reactive oxygen species prodution during programmed cell death, J. Cell Biol. 141: 1423-1432.

77. Vahter M., Berglund M., Akesson A. y Liden C., (2002), Metals and women's health, Environ. Res. 88: 145-155.

78. Yoo S.M., Oh S.M., Lee B.W., Ko W.G., Moon C.K. y Lee, B.H., (2002), Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by tetrandrine in HepG2 cells, J. Ethonopharmacol. 81: 225-229.

79. Zheng H., Liu J., Liu Y. y Klaassen D.C., (1996), Hepatocytes from metallothionein-I and II knock-out mice are sensitive to cadmium- and tert-butyldroperoxide-induced cytotoxicity, Toxicol. Lett., 87: 139-145.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 8 de agosto del 2002.

Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz

Presidente

M. en C. Verónica Souza Arroyo

Secretaria

Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

Vocal

Dr. Pablo Damián Matzumura

Vocal

M. en C. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes

Vocal