



# Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

**Facultad de Ciencias Químicas – Instituto de Ciencias**

Maestría en Ciencias Químicas

Área de Bioquímica y Biología Molecular

**“Evaluación de la respuesta oxidante en hipocampo de ratas  
administradas con cadmio”**

Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas en el área de  
Bioquímica y Biología Molecular

presenta

QFB. María Guadalupe Pulido Fernández

Directores de Tesis

D. C. Patricia Aguilar Alonso

D. C. Alfonso Díaz Fonseca

Noviembre, 2019

## Índice

Abreviaturas .....	1
1. Marco teórico .....	3
1.1 Contaminación ambiental y cadmio.....	3
1.2 Generalidades del Cd.....	3
1.3 Fuentes de emisiones de Cd al ambiente .....	4
1.4 Exposición a Cd .....	5
1.5 Entrada de Cd en el organismo .....	6
1.6 Distribución de Cd en el organismo .....	8
1.7 Complejos Cd-Metalotioneína .....	11
1.8 Cd y estrés oxidante .....	13
1.9 Cd y estrés nitrosante.....	15
1.10 Consecuencias clínicas de la toxicidad del Cd.....	16
1.10.1 Efectos del Cd sobre el SNC .....	17
2. Planteamiento del problema.....	20
3. Justificación .....	21
4. Objetivo general.....	22
4.1 Objetivos específicos .....	22
5. Hipótesis.....	23
6. Diseño experimental .....	24
7. Materiales y métodos .....	25
7.1 Animales de experimentación .....	25
7.2 Obtención de las muestras .....	25
7.3 Cuantificación de metales en hipocampo .....	26
7.4 Ensayos para determinar el balance redox en hipocampo .....	26
a) Cuantificación de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenoales (4HDA) .....	26
b) Cuantificación de ROS totales.....	26
c) Cuantificación de GSH y GSSG.....	27
d) Cuantificación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) .....	27
e) Cuantificación de la actividad de glutatión transferasa (GST) .....	27
f) Cuantificación de glutatión reductasa (GSSG-R).....	28
g) Cuantificación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) .....	28
h) Cuantificación de la actividad de catalasa (CAT).....	28

7.5 Inclusión en parafina .....	28
7.6 Inmunofluorescencia.....	29
7.7 Análisis estadístico .....	30
8. Resultados .....	31
8.1 El Cd se acumula en hipocampo de rata el ser administrado por vía oral .....	31
8.2 El Cd no modifica la inmunorreactividad de la claudina-5 en BHE .....	31
8.3 El Cd acumulado en hipocampo no incrementa los ROS pero si los marcadores de estrés nitrosante .....	33
8.4 El Cd incrementa la lipoperoxidación en hipocampo.....	37
8.5 La administración de Cd altera los sistemas antioxidantes celulares. ....	38
8.6. Metalotioneína 3 aumenta en hipocampo en respuesta a la acumulación de Cd.....	44
8.7. El Cd induce neurodegeneración en hipocampo a partir de 3 meses de administración .....	45
9. Discusión de resultados.....	47
10. Conclusiones .....	61
11. Bibliografía .....	62

## Abreviaturas

4-HDA	4-hidroxiálquenos
AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARE	Elemento de Respuesta Antioxidante
As	Arsénico
BHE	Barrera hematoencefálica
Ca	Calcio
CAT	Catalasa
Cd	Cadmio
CdCl <sub>2</sub>	Cloruro de cadmio
CdO	Óxido de cadmio
CTE	Cadena transportadora de electrones
Cu	Cobre
DMT1	Proteína transportadora de metales divalentes
eNOS	Sintasa endotelial de óxido nítrico
EO	Estrés oxidante
Fe	Hierro
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
GPx	Glutathion peroxidasa
GSH	Glutathion reducido
GSSG	Glutathion oxidado
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxido de hidrógeno
Hg	Mercurio
i.p.	Intra peritoneal
iNOS	Sintasa inducible de óxido nítrico
Keap1	Proteína 1 tipo Kelch asociada a ECH

LOAEL	Nivel mas bajo de efecto adverso observado
LTP	Potenciación a largo plazo
MDA	Malondialdehído
MTs	Metalotioneina
N	Nitrogeno
nNOS	Sintasa neuronal de oxido nitrico
NO	Oxido nitrico
NOS	Sintasa de oxido nitrico
NOX	Oxidasa de NADPH
Nrf2	Factor nuclear eritroide relacionado con el factor 2
O <sub>2</sub>	Oxígeno
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoxido
<sup>•</sup> OH	Radical hidroxilo
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
Pb	Plomo
RNS	Especies reactivas de nitrogeno
ROS	Especies reactivas de oxigeno
S	Azufre
Se	Selenio
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Super oxido dismutasa
ZIP14	Proteina transportadora de zinc 14
Zn	Zinc

## **1. Marco teórico**

### **1.1 Contaminación ambiental y cadmio**

La contaminación ambiental es uno de los problemas más importantes a nivel mundial, afectando la calidad de vida de la sociedad. Se ha estimado que, en los países industrializados, un 20% de la incidencia total de las enfermedades puede atribuirse a factores medioambientales relacionados a la exposición y/o consumo de agua, alimentos y aire contaminados. Los metales pesados como el mercurio (Hg), arsénico (As), plomo (Pb) y cadmio (Cd) son de los contaminantes más importantes debido al impacto económico y sobre la salud de la población. La exposición a estos metales puede contribuir al deterioro en la salud a mediano o largo plazo, lo que sumaría al desarrollo de enfermedades del tipo degenerativo. Sin embargo, es difícil establecer relaciones de causalidad (Reyes et al., 2016; Vargas-Marcos, 2005).

A pesar del conocimiento de los efectos adversos de los metales pesados sobre la salud, el crecimiento económico y la globalización han contribuido a un aumento en su liberación al medio ambiente, sobre todo en países en desarrollo. De manera notable, las emisiones de Cd al medio ambiente aumentaron durante el siglo XX, asociadas a la actividad metalúrgica y quema de combustibles. Además, los productos que contienen Cd como las baterías recargables, pinturas, pigmentos o aleaciones raramente son reciclados y muchas veces desechados junto con la basura común (Järup, 2003).

### **1.2 Generalidades del Cd**

El Cd es considerado el quinto contaminante más peligroso a nivel mundial. Es un metal pesado y pertenece al grupo 12 de la tabla periódica, de valencia 2, con el número atómico 48 y una masa atómica de 112.4 g/mol. Posee cuatro isótopos naturales y dos radioactivos. En estado puro es un metal de color blanco azulado, dúctil, inodoro, suave y maleable. Su punto de fusión es de 321.07°C, con una densidad de 8.65 g/cm<sup>3</sup> a 20°C. El Cd<sup>2+</sup> posee un orbital d<sup>10</sup> lleno y debido a esto no presenta química redox. Además de poseer características similares al ion zinc

---

( $Zn^{2+}$ ) con respecto a su flexibilidad en la coordinación (ATSDR, 2012). El  $Cd^{2+}$  es un ácido de Lewis más débil que el  $Zn^{2+}$  lo que propicia una menor estabilidad en complejos con ligandos de oxígeno y el nitrógeno. Sin embargo, la afinidad del  $Cd^{2+}$  con ligandos sulfuro es mayor que la del  $Zn^{2+}$ ; el log  $K$  para cisteína es de 9.2 para  $Zn^{2+}$  mientras que para  $Cd^{2+}$  es de 11.

### 1.3 Fuentes de emisiones de Cd al ambiente

#### *Fuentes naturales*

El Cd se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre en una concentración de hasta 0.1 ppm. Sin embargo, en las rocas sedimentarias y de minerales de sulfuro las concentraciones de Cd son más altas. La erosión física de rocas y suelos moviliza cantidades importantes de Cd a los océanos. Se estima que el mayor porcentaje de liberación de Cd en los océanos se atribuye a erosión continental (~30%). La movilización del Cd también ocurre a través de erupciones volcánicas. La actividad volcánica es responsable de alrededor del 60% de las 500 toneladas anuales de Cd emitidas al ambiente de manera natural (Sigel et al., 2013). Las emisiones atmosféricas tienden a ser las de mayor preocupación en términos de salud humana, debido a las cantidades, dispersión y el potencial de exposición (Järup, 2003).

#### *Fuentes antropogénicas*

Se estima que las actividades antropogénicas contribuyen con 4000-13,000 toneladas de Cd por año, sobrepasando por mucho a lo emitido por fuentes naturales. El Cd no se encuentra en la naturaleza en estado puro; por afinidad química se asocia a metales como en Zn, Pb, y cobre (Cu). Debido a esto, el Cd se libera al ambiente como subproducto del procesamiento de estos metales. El uso de combustibles fósiles y la incineración de basura contribuyen a la liberación y acumulación de este metal en la atmósfera y la tierra. El uso de fertilizantes fosfatados, donde el  $Cd^{2+}$  se encuentra como ion contaminante, contribuye a la acumulación de este metal en terrenos de cultivo y consecuentemente a la acumulación de este metal en cultivos y animales de consumo. Aunado a lo anterior,

---

las descargas industriales y la disposición de aguas residuales municipales en ríos contribuyen a la contaminación de suelos y mantos freáticos (García-Pérez & Cruz-Azcona, 2012; IARC, 2011). Debido a la emisión, distribución y acumulación del Cd en el ambiente, es inminente su presencia en productos de consumo humano.

## **1.4 Exposición a Cd**

### *Exposición ocupacional*

Los trabajadores de industrias implicadas en la industrialización del Cd se encuentran expuestos a niveles altos de este metal. El sistema respiratorio es la principal vía de entrada de Cd al organismo en trabajadores. El Cd se encuentra unido a partículas en el rango respirable. El óxido de cadmio (CdO) es una de las principales especies de Cd que se encuentran en el aire. Sin embargo, en los últimos años se ha encontrado que el cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>), usado en la industria de los pigmentos también contribuye a la exposición de este metal en trabajadores. Las concentraciones de Cd en el humo o polvo varían entre diferentes industrias. En países de la Unión Europea o EUA las mejoras en procesos industriales y de seguridad e higiene han llevado a una disminución de los niveles de Cd en el aire de los centros de trabajo, contrario a lo que pasa en países en desarrollo (García-Pérez & Cruz-Azcona, 2012; Järup, 2003).

### *Exposición no ocupacional*

Las plantas toleran el Cd mejor que humanos y animales. La planta del tabaco (*Nicotiana spp*) puede acumular una mayor cantidad de Cd que la presente en el suelo de cultivo. El consumo de tabaco contribuye a la entrada de Cd al organismo (Satarug et al., 2003). Se ha demostrado que el contenido de Cd en sangre de fumadores es de 4-5 veces mayor que la de no-fumadores. Un cigarro contiene de 1-2 ug de Cd del cual hasta el 10% se inhala al fumar y el 50% de esto es absorbido. Una persona que fuma 20 cigarros al día estaría absorbiendo hasta 1ug de Cd al día. A pesar del alto contenido de Cd en el humo del tabaco, los fumadores pasivos solo reciben bajas cantidades de este (Järup, 2003; Järup et al 1998).

En la población no fumadora, la dieta es la fuente más importante de exposición a Cd. El agua contribuye a un bajo porcentaje de la ingesta de este metal por lo que los alimentos son la principal fuente de Cd para la población general. El uso de fertilizantes fosfatados en la agricultura propicia la acumulación de Cd en el terreno de cultivo. Aunado a esto, las aguas tratadas que se usan para riego también contienen altas concentraciones del metal (Frías-Espéricueta et al., 2010). El Cd en los terrenos puede pasar a los cultivos, filtrarse a aguas subterráneas o ser arrastrado por aguas superficiales (Villanueva & Botello, 1992). La absorción de Cd por las plantas depende de la planta y el pH del suelo. Suelos con alta acidez favorecen la movilización del Cd hacia la planta (Satarug et al., 2003). Los vegetales de hoja verde, las papas, los cereales y leguminosas pueden contener cantidades importantes de Cd.

Especies como los moluscos y crustáceos también pueden acumular y concentrar Cd de aguas contaminadas. Se estima que estas especies pueden contener Cd en una concentración de 0.2mg/kg. La carne café de cangrejo puede contener Cd hasta 10mg/kg, mientras que el hepatopáncreas hasta 14.9mg/kg) (Satarug et al., 2003). La carne visceral de mamíferos terrestres contiene hasta 50ug/kg de tejido. Aunque el consumo de alimentos en general es menos eficiente que el consumo de agua o la exposición al aire contaminado. La cantidad de Cd ingerido varía de acuerdo con la dieta, pero se estima entre 8-25 ug/día del cual se absorbe ~10% (IARC, 2011; Järup et al., 1998).

## **1.5 Entrada de Cd en el organismo**

### *Pulmones*

El Cd entra principalmente por pulmones y tracto gastrointestinal. La absorción del Cd en piel es relativamente insignificante y solo se ha encontrado que el Cd puede entrar a través de la piel cuando se está expuesto a altas concentraciones o durante periodos prolongados de tiempo (Zalups & Ahmad, 2003).

La absorción en pulmones es más efectiva que en el intestino. La absorción en pulmones depende de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos de Cd, el tamaño de la partícula y por ende el sitio de deposición. Las partículas grandes como el polvo (>10 µm de diámetro) tienden a depositarse en las vías respiratorias superiores, mientras que las partículas pequeñas como vapores o humo (0.1 µm de diámetro) alcanzan los alveolos y allí son absorbidos y transferidos a sangre. El CdO presente en el humo del cigarro puede alcanzar los alveolos y allí entre el 50-100% será absorbido (Masters et al., 1994). Además, el Cd inhalado puede ser transportado de manera retrograda desde neuronas olfatorias primarias hacia el bulbo olfatorio, facilitando la entrada de Cd a sistema nervioso central (Sunderman, 2001).

### *Tracto gastrointestinal*

El tracto gastrointestinal es la otra vía de ingreso de Cd al organismo. La absorción de este metal depende de la especie de organismo expuesto, el tipo de compuesto de Cd, dosis y frecuencia de administración. Se ha demostrado que la eficiencia de absorción de Cd gastrointestinal es de solo 1-2% en ratas y ratones, mientras que en humanos es de 3-8% (ATSDR, 2012; Miller et al., 1969). Se ha reportado que la absorción se lleva a cabo principalmente en duodeno y yeyuno y que este porcentaje se ve disminuido por la suplementación de metales como hierro (Fe), calcio (Ca) y Zn (Brako et al., 2003). El Cd se acumula rápidamente en la mucosa intestinal y se transfiere a circulación sistémica de manera lenta.

Dado que el Cd no tiene funciones biológicas, no existen mecanismos de transporte especiales para este metal, por lo que se ha propuesto que el Cd "imita" a elementos esenciales para utilizar sus proteínas transportadoras (Zalups & Ahmad, 2003). A pesar de que no se han descrito detalladamente los mecanismos de transporte del Cd en los enterocitos, la evidencia indica que el transporte desde el lumen intestinal hasta el interior de los enterocitos está mediado por el transportador de metales divalentes tipo 1 (DMT1). Este transportador participa en la absorción de Fe no-hemo y se expresa principalmente en el duodeno. En condiciones de bajo Fe sérico, se induce su expresión en intestino para aumentar

la absorción de Fe de la dieta. Sin embargo, el aumento en la expresión de DMT1 favorece también la absorción intestinal de Cd (Ferguson et al., 2001). Otra de las proteínas que participa en la absorción de Cd en intestino es la proteína transportadora de Zn 14 (ZIP14), la cual tiene una alta afinidad para transportar Cd, al igual que los canales TRPV6 selectivos de  $Ca^{2+}$  (Girijashanker et al., 2008; Wang & Du, 2013). Además, el Cd puede formar complejos Cd-proteína con metalotioneínas (Cd-Mt) y glutatión (Cd-GSH), los cuales pueden ser absorbidos por enterocitos (**Figura 1**).

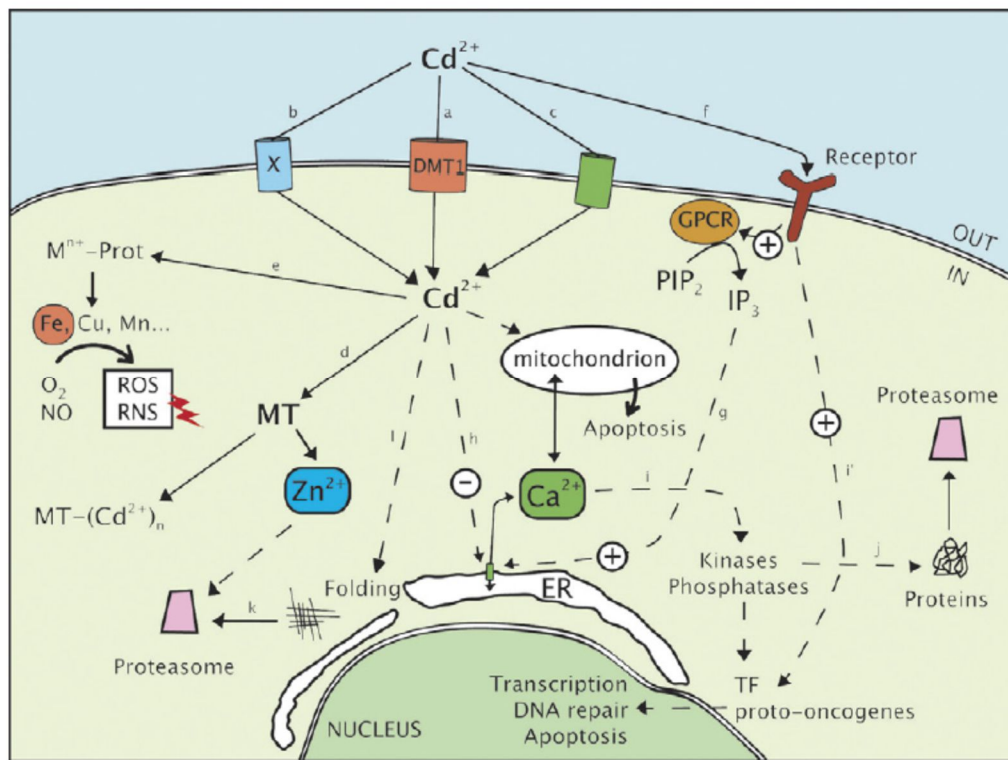


Figura 1. Entrada de Cd a los enterocitos. Tomada de Martelli et al. 2006

## 1.6 Distribución de Cd en el organismo

Una vez que el Cd llega a circulación se distribuye a la mayoría de los órganos. En sangre periférica el Cd es transportado unido a proteínas como albúmina, metalotioneínas (MTs) y otras que contengan grupos tiol. De manera importante el Cd puede concentrarse en eritrocitos y solo un pequeño porcentaje

permanece en plasma. El Cd puede unirse a la hemoglobina y a las metalotioneínas presentes en eritrocitos promoviendo así la distribución del metal a los tejidos. Vía porta, el Cd se distribuye primero en hígado. Este órgano concentra la mayor cantidad de Cd después de la administración (50-60% de la dosis administrada por vía enteral) (Järup et al., 1998). Después, el Cd acomplejado con MTs será transportado a riñones (Jonah & Bhattacharyya, 1989). Son estos órganos los principales blancos del daño generado por Cd. Se asocia que la acumulación de Cd en hígado y riñones está regulada por la síntesis de MTs, que son proteínas implicadas en la protección contra el daño celular generado por Cd (ATSDR, 2012; Dudley et al., 1985). En otros órganos como páncreas y bazo se han reportado altos niveles de Cd (Goering & Klaassen, 1983) y concentraciones menores en el corazón y testículos (**Figura 2**) (Nordberg et al., 1971).

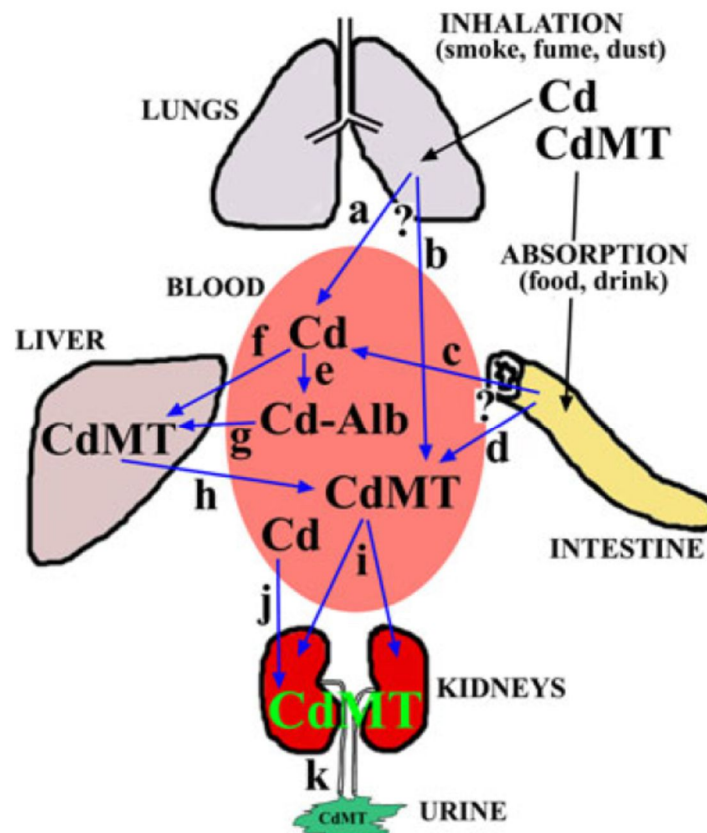


Figura 2. Distribución del Cd en el organismo de mamíferos. Tomado de Sábolic, 2010

### Entrada a sistema nervioso central (SNC)

En tejidos como hígado, riñón o páncreas, el Cd puede acumularse fácilmente. Sin embargo, órganos como los testículos o cerebro poseen barreras físicas altamente selectivas que disminuyen el transporte de sustancias desde circulación al interior de sus células. El SNC posee tres barreras que contribuyen a esto: la barrera hematoencefálica (BHE), la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo y el epitelio aracnoideo. A lo largo de los vasos sanguíneos del SNC se encuentra la BHE, la barrera más selectiva y controlada de estas barreras. La BHE es esencial en la regulación de la entrada y salida de iones, de oxígeno y de nutrientes entre la sangre en circulación y los compartimentos cerebrales. La BHE protege al tejido cerebral de la invasión de toxinas y patógenos (Keaney & Campbell, 2015).

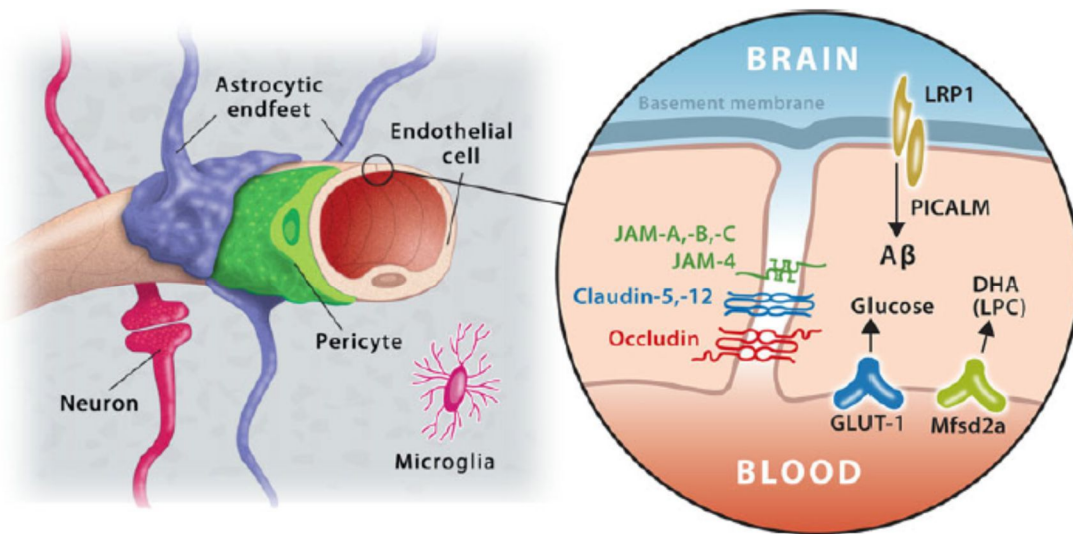


Figura 3. La unidad neurovascular de la BHE. Tomada de Keaney, 2015

La BHE se conforma de unidades neurovasculares, conformadas por astrocitos, pericitos, microglía y células endoteliales específicas. Entre las células endoteliales adyacentes existen conjuntos de proteínas que conforman las uniones estrechas, las cuales regulan el transporte paracelular de solutos a través del espacio intercelular (**Figura 3**)(Serlin et al. 2015). Los iones, nutrientes y otras moléculas atraviesan la BHE por difusión paracelular o por la vía transcelular. El

transporte transcelular incluye procesos de transcitosis mediada por receptor, sistema de eflujo, endocitosis y transporte mediado por acarreadores (Tajes et al., 2014).

A pesar de la presencia de la BHE y su alta selectividad se ha reportado que el Cd también puede acumularse en cerebro de ratones y ratas neonatos. En etapas previas al nacimiento, la BHE se encuentra totalmente formada pero aún no es tan selectiva ni funcional, lo que hace que los animales neonatos sean más vulnerables al Cd. En ratas adultas se describe que la BHE y el plexo coroideo impiden la entrada de Cd al SNC. Sin embargo, muchos estudios experimentales muestran el daño celular y funcional de cortezas cerebrales y cerebelares de animales en crecimiento expuestos a Cd. El mecanismo concerniente al transporte de Cd en el cerebro es muy poco estudiado (Branca et al., 2016; Méndez-Armenta et al., 2001).

### **1.7 Complejos Cd-Metalotioneína**

Dentro del organismo el Cd no se encuentra libre, se une a proteínas que favorecen su transporte y distribución. El Cd tiende a unirse mejor a proteínas que contengan grupos tiólicos. De acuerdo con la serie Irving-Williams; la cual indica la estabilidad de unión entre grupos donadores de oxígeno (O), nitrógeno (N) y azufre (S) a metales de transición, el  $Cd^{2+}$  es más afín a grupos tiólicos que el  $Zn^{2+}$ . Esto le confiere al Cd la capacidad de desplazar con facilidad al Zn de su unión a proteínas en sitios tiol (Irving & Williams, 1953). Intracelularmente existe un alto número de donantes tiólicos proteicos, a los cuales el Cd se une más eficientemente que el Zn. Esta característica es de las importante para entender la toxicología del Cd. En este sentido, una de las proteínas con mayor capacidad de unir Cd son las metalotioneínas. La unión de Cd a metalotioneínas es 3 veces mayor que la de Zn y es de mayor afinidad. Se ha descrito que el complejo Cd-MT es la principal forma de transporte del Cd hacia el riñón.

Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular (>10,000 Da), de las cuales existen 4 (I, II, III, IV) isoformas que mantienen homología estructural y funcional entre sí. Las isoformas I y II se expresan en todos los tejidos, la isoforma

IV se expresa solo en epitelio escamoso estratificado y la isoforma III se expresa, de manera fisiológica, exclusivamente en SNC. Estas proteínas contienen entre 60 a 68 residuos aminoacídicos, de los cuales 18-23 corresponden a cisteínas, de 6 a 8 a lisinas y 7 a 10 serinas. En su estructura terciaria, los residuos de cisteína se acercan y forman dos clusters tiolato, que forman los dominios  $\alpha$  y  $\beta$ ; y es en estos clusters donde se unen los metales. El dominio  $\alpha$  contiene el C-terminal y posee 11 cisteínas las cuales forman un cluster tiolato que puede unir hasta 4 átomos de Zn y/o Cd o 5 a 6 átomos de Cu. En el dominio  $\beta$  se encuentra el N-terminal y 9 cisteínas que al formar el clúster pueden unir 3 átomos de Zn y/o Cd o 6 átomos de Cu (Zatta, 2008).

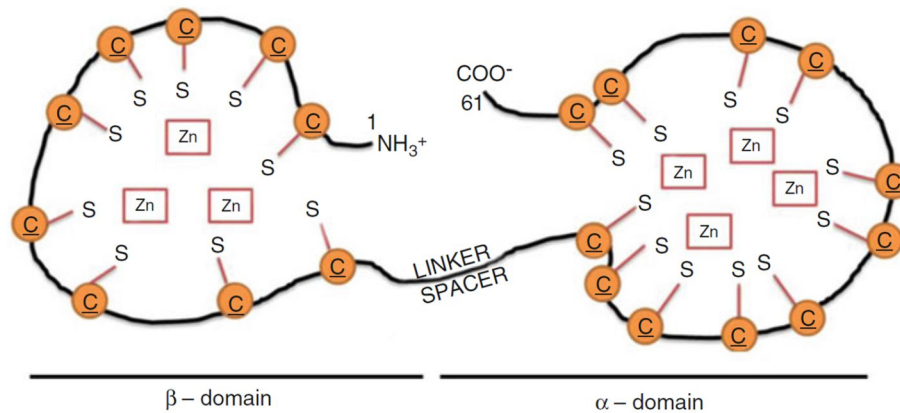


Figura 4. Sitios de unión de metales en las metalotioneínas. Tomado de Dzielgel et al. 2016

Fisiológicamente las MTs participan en la homeostasis de Zn y Cu. Regulan la concentración citosólica de estos iones uniéndolos o liberándolos de acuerdo con el estímulo que reciban. La expresión de las MTs se regula por la concentración de estos iones libres; a mayor concentración de Zn en citosol se induce la expresión de MTs. Estas proteínas también tiene actividad antioxidante intracelular frente a radicales libres. Se ha demostrado que poseen una alta afinidad por las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Esta capacidad brinda protección celular contra el daño por Cd. La formación de complejos Cd-MT, Cd-Zn-MT y NO-MT (óxido nítrico-metalotioneína) ayuda a detoxificar Cd y radicales libres (Zangger et al., 2001). Dada la alta afinidad del Cd por las MT, se requieren bajas concentraciones de Cd para desplazar al Zn de su unión (Sigel et al., 2013). La

---

unión de Cd a proteínas puede modificar su función. Existen proteínas reguladoras redox, que dependen de la asociación-disociación de zinc de centros tiolato, por lo que la unión a estos puede impedir la función de la proteína (Maret, 2006).

### **1.8 Cd y estrés oxidante**

Además de interferir con la función de las MTs, se ha propuesto que el Cd ejerce sus efectos tóxicos en el organismo al inducir estrés oxidante (EO). El EO es un desequilibrio celular en favor de los prooxidantes. Este desequilibrio promueve daño en la función y estructura de proteínas, ADN y lípidos, que se ha asociado al desarrollo de muchas enfermedades crónico-degenerativas (Valko et al., 2007). En condiciones fisiológicas las ROS son producidas durante el metabolismo oxidativo, sobre todo en mitocondria (Murphy, 2009; Valko et al., 2007). Las ROS cumplen funciones celulares en todos los tejidos. En cerebro son esenciales para el desarrollo neuronal pues regulan el crecimiento de células progenitoras hipocampales. También participan en la potenciación a largo plazo (LTP); proceso determinante en la formación de la memoria (Cobley et al., 2018; Salim, 2016).

Al no poseer química redox el Cd no puede inducir la producción de ROS directamente (Cuyppers et al., 2010). Sin embargo, al desplazar metales de su unión a proteínas, incrementa la concentración de metales redox como el Fe o Cu. Estos metales participan en reacciones tipo Fenton y de Haber-Weiss, produciendo radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) (Casalino et al., 1997; Dorta et al., 2003). Además del desplazamiento de metales redox, el Cd también puede interferir en la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones (CTE) e inducir la formación de ROS. Wang en 2004 evaluó la capacidad inhibitoria del Cd sobre los complejos de la CTE en hígado, cerebro y corazón. Sus resultados muestran que los complejos II y III son más sensibles a Cd. Mientras que el Cd induce la formación de ROS en el complejo III; promueve la acumulación de semiubiquinonas que son inestables y propensas a donar electrones al oxígeno molecular para formar el anión superóxido (Wang et al., 2004). Otros estudios muestran que el Cd también regula positivamente a genes *nox* y las proteínas NOX (NADPH oxidasas) producen ROS (Rockwell et al., 2004; Thijssen et al., 2007).

Ante la producción de ROS las células poseen mecanismos antioxidantes; enzimas, péptidos y metabolitos con capacidad amortiguadora o biotransformadora (Halliwell, 2007). Sin embargo, en condiciones de EO estos se ven sobrepasados por la producción de ROS. Estudios muestran que el Cd puede inhibir o activar sistemas antioxidantes celulares (Cuypers et al., 2010; Wang & Du 2013). La superóxido dismutasa (SOD) se encarga de catalizar la dismutación del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El peróxido de hidrógeno es biotransformado en agua por la acción de la catalasa o la glutatión peroxidasa. Se ha descrito que el Cd puede disminuir la actividad de la isoforma 1 de la SOD y de catalasa al unirse a ellas. Además, el Cd también puede desplazar el metal del centro activo en la catalasa y la peroxidasa, lo que inhibe su función (Polykretis et al., 2019; J. Wang et al., 2015).

El glutatión (GSH) es un tripéptido antioxidante que se encuentra a todas las células del organismo. Enzimas como la glutatión peroxidasa y glutatión transferasa utilizan glutatión como agente reductor en su función. Además, el GSH reacciona con moléculas prooxidantes, lo que evita la oxidación de macromoléculas y alteraciones celulares consecuentes. Existen otras moléculas que contienen grupos tioles y que por tanto pueden formar complejos con el Cd como las pioredoxinas, que pueden reducir el  $H_2O_2$ , hidroperóxidos orgánicos y peroxinitritos. Es importante mencionar que, en general, el SNC posee una defensa antioxidante endógena menor comparada con tejidos como el hígado.

Ante el incremento de ROS en la célula también se activan factores de transcripción antioxidante. Nrf2 es factor de transcripción central en la defensa antioxidante. Nrf2 pertenece a la subfamilia de factores tipo zipper de leucina básicos. En condiciones fisiológicas, Nrf2 se encuentra en citoplasma unido a la proteína Keap1. Ante estímulos electrofílicos, Nrf2 se separa de Keap1 y se transloca al núcleo. Allí se dimeriza con proteínas Maf pequeñas y este dímero reconoce al elemento de respuesta antioxidante (ARE) de sus genes blanco (**Figura 5**) (Suzuki & Yamamoto, 2015; Taguchi & Yamamoto, 2017). Nrf2-Keap1 regula genes que promueven antioxidantes directos, que inactivan antioxidantes, regula la

síntesis y regeneración de GSH y de NADPH. Además, regula la expresión de transportadores ABC que favorecen la salida de xenobióticos y de proteínas que inhiben la inflamación y el daño a proteínas (Kensler et al., 2007).

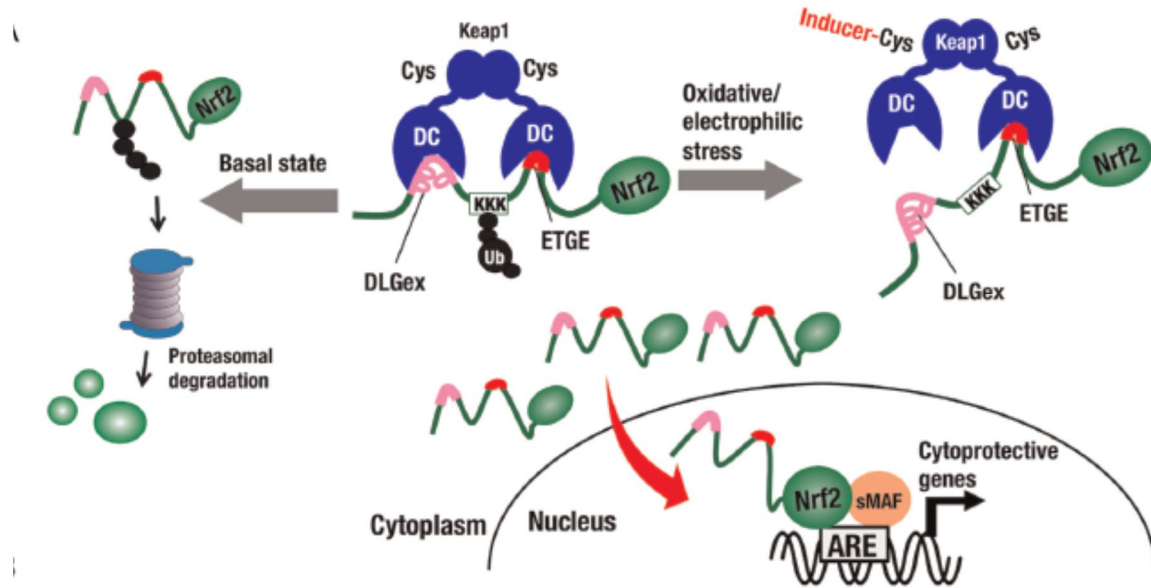


Figura 5. Interacción de Keap1-Nrf2 en estado basal y ante estímulos electrofílicos. Tomada de Suzuki et al. 2015.

### 1.9 Cd y estrés nitrosante

El Cd también puede promover estados de estrés nitrosante. El óxido nítrico (NO) es la molécula central en el desarrollo de este. El NO es un gas incoloro, considerado un radical libre y producido por muchos tipos celulares; células endoteliales, macrófagos, células gliales y neuronas. Su vida media en sistemas biológicos es de uno 30 segundos ya que se oxida formando nitritos y nitratos. Al ser un gas no polar, puede difundir a través de las membranas con facilidad. Participa en muchos procesos fisiológicos, mediados por la activación de la guanilato ciclasa y consecuente síntesis de GMPc (Valko et al., 2007). En SNC, el NO contribuye con la irrigación sanguínea al encéfalo, dirige el crecimiento de las terminaciones nerviosas, participa en la diferenciación de las células gliales y actúa como neuroregulador. El hipocampo es el área donde se consolida la memoria y allí el NO participa en la LTP. El NO actúa como mensajero retrógrado y difunde hacia las neuronas presinápticas para aumentar la liberación de neurotransmisores (Benarroch, 2011; Pérez-Neri, 2015).

---

El NO se forma por la actividad de la sintasa de óxido nítrico (NOS) con uso de L-arginina, O<sub>2</sub> y NADPH. Existen 3 isoformas de esta enzima; endotelial (eNOS, NOS III), neuronal (nNOS, NOS I) e inducible (iNOS, NOSII), siendo esta última isoforma la más eficiente en la producción de NO. Estudios han mostrado que el Cd incrementa la concentración de NO en hígado de ratas (Ke et al., 2019). Mientras que la expresión de eNOS aumenta en testículo de ratones después de ser administradas con bajas concentraciones de Cd y disminuye con concentraciones altas de Cd (Ren et al., 2019). Estudios en nuestro laboratorio determinaron que la exposición a Cd durante 3 y 4 meses aumenta la concentración de nitritos en hipocampo de ratas (Pulido et al., 2019). El NO puede reaccionar con el anión superóxido para formar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) que posee una mayor capacidad prooxidante. La sobreproducción de NO y de otras especies reactivas de nitrógeno (RNS) pueden oxidar lípidos membranales y nitrar proteínas, lo que cambia su función y aumenta su reciclaje.

### **1.10 Consecuencias clínicas de la toxicidad del Cd**

Los riñones regulan los fluidos y electrolitos en el cuerpo, eliminan sustancias potencialmente tóxicas y producen hormonas que regulan la presión sanguínea, la calcificación de los huesos y la producción de eritrocitos. El Cd puede generar daño renal, iniciando con lesión tubular caracterizada por un incremento en la excreción de proteínas como de bajo peso molecular como la β2-microglobulina (WHO, 1992). Se ha demostrado también que la exposición a Cd puede generar daño glomerular con una disminución de la tasa de filtrado glomerular. Mientras que se ha relacionado a la uremia como causa común de muerte entre granjeros que sufren de la enfermedad Itai-Itai generada por Cd (Järup, 2003).

Después de las primeras horas después de la exposición al Cd, es el hígado el órgano que almacena la mayor cantidad del metal. Diversos estudios acerca de la hepatotoxicidad del Cd indican que, en administraciones agudas, el Cd tiene un efecto tóxico directo sobre el hígado además genera isquemia debida al daño endotelial y la consecuente respuesta inflamatoria (Yamano et al., 2000). También en hígado se han observado cambios histopatológicos en ratas expuestas durante

---

22 días a Cd, que pueden resultar tanto en apoptosis como en necrosis (El-sokkary et al., 2010). En general, el daño que genera el Cd en hígado se asocia a su unión a grupos sulfhidrilo en proteínas de membrana, citosólicas y enzimas. El Cd también puede competir con metales esenciales como el Zn, el Se (selenio) o el (Cu), interfiriendo en los procesos celulares en los que participan estos metales. De igual manera, se ha descrito que el Cd afecta funciones celulares como actividad enzimática, sistemas de reparación del ADN, estado redox de la célula y transducción de señales (Kerkhove et al., 2010).

En exposiciones agudas por inhalación, los pulmones son los principales órganos dañados. El Cd propicia la destrucción de epitelio pulmonar generando edema, bronquitis y neumonitis en animales y humanos. A nivel celular, se disminuyen enzimas como catalasa, SOD, grupos sulfhidrilo no proteícos y glutatión peroxidasa (GPx). La respuesta al Cd en pulmones es similar a la observada con otros agentes que producen daño oxidativo. La exposición por largo tiempo disminuye la función pulmonar y genera enfisema y daña la función olfatoria. Cabe destacar que este tipo de exposición puede llevar al desarrollo de cáncer pulmonar, por lo que se ha clasificado al Cd y a sus compuestos dentro del grupo 1 de carcinogénicos humano (IARC, 2011)(IARC 2011; WHO, 2010). Si bien órganos como riñones e hígado son los principales órganos blanco del daño toxicológico generado por el Cd, en años recientes se ha demostrado que el SNC es particularmente susceptible al Cd (Agnihotri et al., 2015). Debido a la permeabilidad limitada de la barrera hematoencefálica y el plexo coroideo, la entrada de Cd al cerebro es limitada. Sin embargo, se han documentado efectos fisiológicos del Cd en sistema nervioso central después de ser administrado por vía oral.

#### **1.10.1 Efectos del Cd sobre el SNC**

El Cd afecta severamente la función del SNC con síntomas que incluyen dolores de cabeza y vértigo, disfunción olfatoria, síntomas parecidos al parkinsonismo, disminución de la función vasomotora, neuropatía periférica, pérdida de equilibrio, disminución en la capacidad para concentrarse y dificultades en el aprendizaje (Wang & Du, 2013). En estudios epidemiológicos con trabajadores

---

expuestos a Cd, se evidenció pérdida de la memoria y funciones motoras ralentizadas (Hart et al., 2001; Viaene et al., 2016). En niños de edad escolar se reportaron asociaciones entre la concentración de metales pesados como el Cd y comportamientos no adaptativos en niños. Además, se relaciona de manera inversamente proporcional el contenido de Cd en el cabello con el coeficiente intelectual en niños. Estos estudios muestran una asociación entre la concentración de Cd con el retardo mental y habilidades motoras disminuidas en humanos (Marlowe et al., 1985; Thatcher et al., 1982).

Los efectos del Cd sobre la conducta y cognición se relacionan a cambios estructurales y funcionales en las neuronas. Se ha observado que la administración de Cd por vía oral produce cambios perjudiciales en la morfología de neuronas piramidales en hipocampo. La comunicación neuronal depende en gran medida de la morfología de las neuronas; la longitud de sus procesos dendríticos y la arborización de estos favorecen el número de contactos entre neuronas y consecuentemente la comunicación neuronal. Trabajo realizado en el laboratorio demuestra que una administración oral de Cd hasta por 4 meses disminuye la arborización dendrítica, la longitud dendrítica total y el número de espinas dendríticas de neuronas hipocampales (Pulido et al., 2019). En estudios *in vitro* el Cd modificó la morfología neuronal después de una sola dosis de Cd (López et al., & González, 2003). Además, se ha demostrado que el Cd a bajas concentraciones induce apoptosis en precursores oligodendrocíticos, mientras que a altas concentraciones de Cd se observa necrosis (Almazan et al., 2000).

Aunado a los cambios morfológicos y de muerte neuronal, estudios reportan que el Cd inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en ratas neonatas (Gupta et al., 1991). Mientras que estudios a largo plazo muestran cambios en la actividad de la AChE y Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPasa en diferentes áreas del cerebro (Gonçalves et al., 2012). *In vitro*, se ha reportado que el Cd incrementa las ROS, afecta la actividad de enzimas antioxidantes e interfiere en la homeostasis de iones como Zn<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. Se ha reportado, *in vitro*, que el Cd interfiere con la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular libre lo que induce apoptosis. Además, estudios revelan que el Cd

puede disipar del potencial de membrana mitocondrial y activar caspasa 3 y 9, produciendo apoptosis mediada por la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  - mitocondria (Yuan et al., 2018). De manera importante, se ha demostrado que el Cd es un posible factor etiológico para enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson (Jiang et al., 2007; Okuda et al., 1997).

A pesar de los estudios acerca de la toxicidad del Cd en SNC, los mecanismos por los cuales genera daño y afecta la cognición aún no son totalmente claros.

## 2. Planteamiento del problema

La contaminación es un problema a nivel mundial. Si bien existen muchos productos, materiales o desechos que contribuyen a este problema, la contaminación por metales pesados representa un riesgo mayor para el ambiente y los seres vivos. Debido a su localización ubicua y a sus características toxicológicas, el Cd ha sido clasificado como el quinto contaminante más peligrosos a nivel mundial. Los efectos tóxicos de este metal sobre hígado y riñón se han reportado ampliamente. En estos órganos se ha descrito que el Cd induce de manera indirecta la formación de ROS y altera el estado redox de las células. Además, interfiere con la homeostasis de iones endógenos como  $Zn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, en años recientes se ha señalado al cerebro como el órgano más susceptible a daño generado por Cd. Diversos estudios demuestran que el Cd afecta la funcionalidad cognitiva en modelos animales y en humanos. Mientras que *in vitro* se ha reportado que el Cd induce apoptosis y necrosis. Además de cambios en la morfología de las neuronas. Sin embargo, se desconoce si el Cd puede inducir estrés oxidante y neurodegeneración en hipocampo; área esencial en la consolidación de la memoria. Es por lo que, en este trabajo se evaluó en un modelo animal de rata joven-adulta si el Cd puede inducir estrés oxidante y neurodegeneración en hipocampo al ser administrado por vía oral durante 2, 3 y 4 meses.

### **3. Justificación**

Uno de los problemas ecológicos y de salud que ha ganado importancia a nivel mundial, es la contaminación al Cd. Debido a su prolongado tiempo de vida media, baja tasa de excreción y bioacumulación, el Cd puede generar daño estructural y funcional en los organismos. El cerebro es particularmente susceptible a los daños generados por el Cd, afectando procesos cognitivos fundamentales como el aprendizaje y la memoria. Debido a esto, es de suma importancia la comprensión de los mecanismos que conllevan a su patogénesis, involucrando procesos como el estrés oxidante, cambios estructurales de la BHE y neurodegeneración. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demuestran que el Cd modifica de manera negativa la morfología de neuronas piramidales de hipocampo. Sin embargo, es preciso dilucidar los mecanismos de toxicidad del Cd sobre el cerebro. Si bien los efectos tóxicos de este metal se conocen desde hace años, existen pocos estudios de sus efectos sobre el hipocampo de ratas adultas. La información obtenida podría ayudar a comprender el efecto de factores exógenos que pueden alterar la memoria y posible desarrollo de enfermedades neurodegenerativas para así poder desarrollar estrategias que disminuyan estos factores de riesgo ambientales.

#### **4. Objetivo general**

Evaluar la respuesta oxidante y neurodegenerativa en hipocampo de ratas expuestas a Cd.

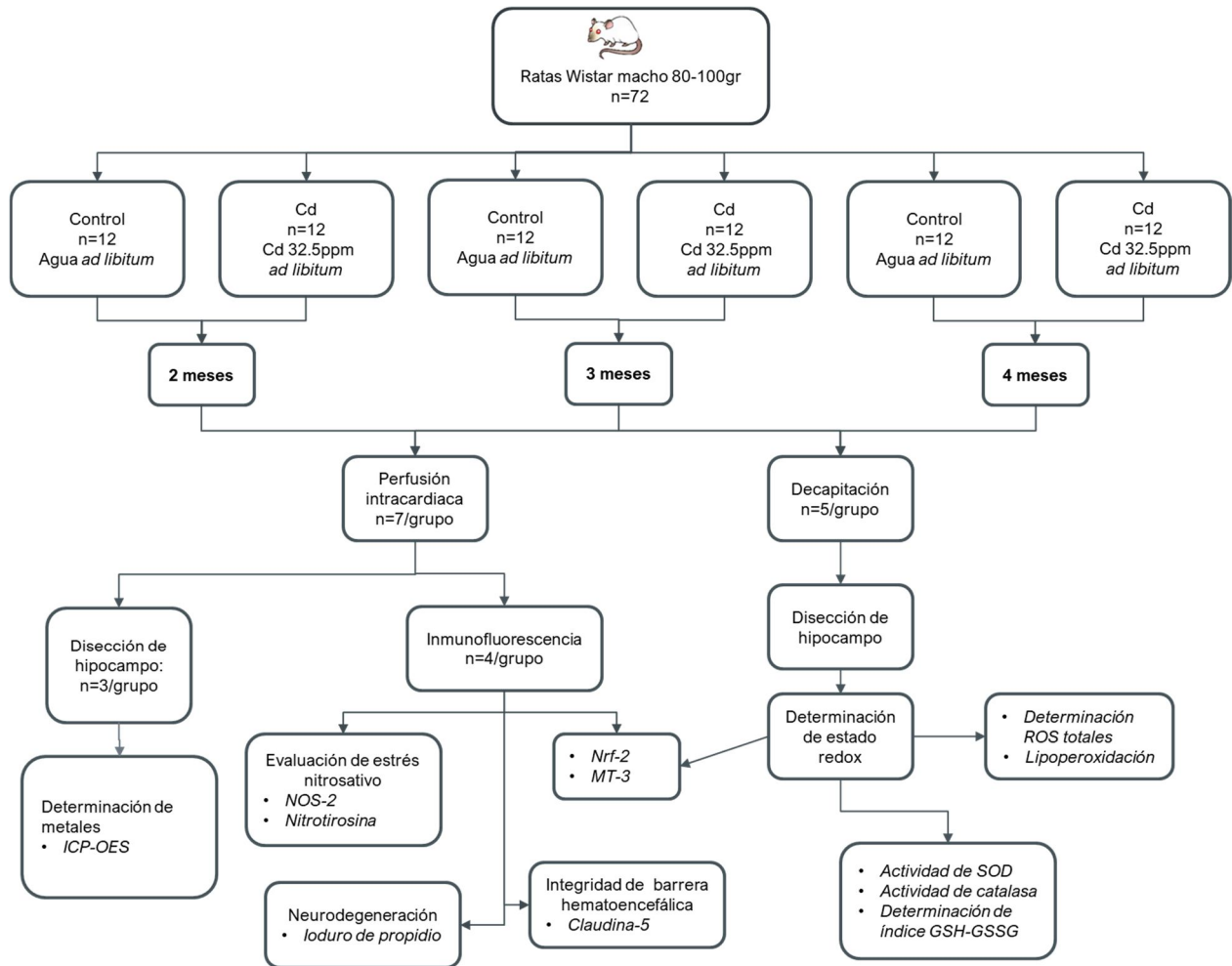
##### **4.1 Objetivos específicos**

1. Determinar la concentración de Cd en hipocampo de rata.
2. Evaluar integridad de la barrera hematoencefálica de ratas expuestas a Cd a diferentes tiempos.
3. Valorar el curso temporal del estrés oxidante en el hipocampo de ratas administradas con Cd.
4. Evaluar si existe degeneración neuronal en el hipocampo de ratas expuestas a Cd.

## **5. Hipótesis**

El Cd administrado por vía oral genera cambios estructurales en la barrera hematoencefálica, que favorecen la acumulación de este metal en el hipocampo de rata. En consecuencia, se induce una respuesta oxidante tiempo dependiente, que afecta la viabilidad de las neuronas hipocampales.

## 6. Diseño experimental



## **7. Materiales y métodos**

### **7.1 Animales de experimentación**

Se utilizaron 72 ratas de la cepa Wistar de peso entre 80-100 gr, obtenidas del Bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales fueron siempre manejados bajo los lineamientos de la guía del cuidado y uso de animales de laboratorio establecida por el CICUAL. Se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz-oscuridad de 12 horas y temperatura de 19-26°C, permanecieron en cajas de polipropileno con una cama de aserrín y con disponibilidad de agua y alimento "*ad libitum*"

Se conformaron 3 grupos con una n=24 ratas por grupo para cada tiempo de administración de Cd: 2, 3 y 4 meses respectivamente. Cada grupo se subdividió en dos grupos (n=12); un grupo control (agua ad libitum) y uno Cd, al cual se le administró una solución de CdCl<sub>2</sub> a 32.5ppm ad libitum.

### **7.2 Obtención de las muestras**

Una vez concluidos los periodos de exposición respectivos, se obtuvieron las muestras. 3 animales por grupo fueron anestesiados con pentobarbital sódico i.p. (10 mg/kg de peso). Se perfundieron intracardialmente con solución Hartman, se obtuvo el cerebro, se disectó el hipocampo y se almacenaron las muestras a -70 °C para su posterior procesamiento y determinación de metales.

Otros 4 animales por grupo fueron anestesiados y perfundidos intracardialmente con 100mL de solución Hartamn y 100mL de paraformaldehído 4%, se obtuvieron los cerebros y fueron fijados en más paraformaldehído 4% para su posterior deshidratación e inclusión en parafina.

Los 5 animales restantes por grupo fueron anestesiados y decapitados, se obtuvo el cerebro y se disectó el hipocampo para ser homogenado y realizar las determinaciones bioquímicas.

### **7.3 Cuantificación de metales en hipocampo**

Los hipocampos de cerebros perfundidos fueron incubados a 37°C en una estufa durante 3 días con una solución 50:50 de ácido nítrico y ácido perclórico hasta desintegrar el tejido. El sobrenadante se diluyó 1:10 en agua desionizada y se determinó la concentración de Cd y Zn por medio de espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (Varian Agilent 730-es ICP-OES).

### **7.4 Ensayos para determinar el balance redox en hipocampo**

#### **a) Cuantificación de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenes (4HDA)**

Los niveles de MDA y 4HDA fueron cuantificados por el método de Estebauer y Zollner (1989). A 100 µL del sobrenadante se adicionaron 650 µL de la solución 1 (1-metil-2-6-feni-indol 10.3mM en acetonitrilo y metanol), y 150 µL de ácido metanosulfónico. Las muestras se agitaron e incubaron a baño María, 45°C, 1 hora, se centrifugaron a 3500 rpm, 10 minutos. Se determinó la absorbancia del sobrenadante a 586 nm. Las concentraciones se obtendrán interpolando la absorbancia de las muestras en la curva estándar patrón de MDA; 1, 1, 3, 3 tetrahidropirano (0.5 a 5 µM).

#### **b) Cuantificación de ROS totales**

Los niveles de ROS intracelulares fueron medidos por fluorimetría. Los tejidos se incubaron con dihidroclorofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>-DCF-DA) 30 minutos, para que las esterasas celulares formen dihidroclorofluoresceína (DCFH), el cual al reaccionar con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) genera una molécula fluorescente. La fluorescencia fue detectada en un lector de placas para fluorescencia "Multi-well Plate Reader" a una longitud de onda de 485 nm de excitación y 530 nm de emisión. La absorbancia obtenida se trasladó a la curva estándar construida a partir de DCFH con concentraciones conocidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

---

### **c) Cuantificación de GSH y GSSG**

El contenido total de GSH y GSSG fue determinado mediante la técnica de reciclaje enzimático basada en el uso de la enzima glutatión reductasa. El glutatión es oxidado por el ácido 5,5'-nitrobenzoico (DNTB) y reducido por la NADPH en presencia de glutatión reductasa (Tietze, 1969). Para determinar la concentración de glutatión total, la formación del ácido 2-nitro-5-tiobenzóico fue monitoreada a 412 nm y el glutatión presente fue evaluado por la comparación del resultado con la curva estándar.

El procedimiento es específico para GSSG cuando se usa 2-vinilpiridina o 4-vinilpiridina (que no inhiben a la glutatión reductasa) para enmascarar GSH. Para el cálculo de la concentración de GSH se realizó la siguiente operación:  $GSH = GSH_{total} - GSSG$ . Para el cálculo de índice redox se utilizó la operación:  $\text{Índice redox} = \frac{GSH + [2 \times GSSG]}{(2 \times GSSG \times 100)}$ .

### **d) Cuantificación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx)**

La actividad de la GPx será determinada usando el método descrito por Flohé y Günzler (1984). La GPx presente en el sobrenadante reduce los hidroperóxidos al sustrato de tert-butil peróxido de hidrógeno y la enzima se oxida. La GPx oxidada es regenerada por el GSH, el cual se oxida a GSSG. El GSSG regresa a GSH por la donación de un electrón proveniente del NADPH vía glutatión reductasa (GR). La tasa de decremento de NADPH es directamente proporcional a la actividad de GPx y ésta se midió espectrofotométricamente a 340 nm (Perkin Elmer Lambda EZ-150). La actividad medida fue expresada en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

### **e) Cuantificación de la actividad de glutatión transferasa (GST)**

Será determinada usando el método descrito por Habig (1974). La reacción consiste en mezclar 33mM de buffer Hepes pH 7.5, 1.5 mM GSH, 1.5 mM de 1-cloro-2-dinitrobenzono (CDNB) y agua en un volumen total de 1 mL. La conjugación de GSH con CDBN en presencia de la GST es una medida de su actividad, la cual se puede seguir espectrofotométricamente a 340 nm durante 3 min. La actividad fue reportada como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

---

#### **f) Cuantificación de glutatión reductasa (GSSG-R)**

Será determinada monitoreando la oxidación de NADPH en presencia de GSSG de acuerdo con el método de Smith (1988). El GSH formado reacciona con 5,5-dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) mostrando un incremento en la absorbancia la cual fue medida a 412 nm. El sistema de reacción contenía 0.1M de buffer de fosfato (pH 7.5), 1 mM de EDTA, 2 mM de GSSH y 3 mM de solución DTNB. La reacción fue iniciada por la adición de 2mM de NADPH.

#### **g) Cuantificación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD)**

La superóxido dismutasa (SOD) fue analizada mediante el método del pirogalol en el que el pirogalol en medio básico se auto-oxida generado en el medio de reacción radicales superóxido, de esta forma la reacción radicalaria se propaga, acelerando la auto-oxidación absorbiendo el paso de luz a 420 nm. La presencia de SOD inhibe la autooxidación al evitar las reacciones de propagación. Por convenio se toma 1 U de SOD como la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la reacción de auto-oxidación del Pirogallol a 25°C y pH 8.2.

#### **h) Cuantificación de la actividad de catalasa (CAT)**

La cuantificación de la actividad de catalasa (CAT) se realizó mediante el uso de luz ultravioleta espectrofotometría según lo establecido por Nelson y Kiesow en 1972. Las muestras de tejido fueron homogenadas con buffer de fosfato de potasio 20mM (pH 7.4 y 150 mM NaCl, con dilución 1:20) y centrifugado a 10,000 x g por 10 min a 4°C. El ensayo consistió en mezclar 2.0 mL de buffer de fosfato de potasio (50 mM a pH 7.0), 0.05 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3 M) y 0.05 mL del homogenado. Los cambios en la absorbancia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se siguieron por 60 segundos a 240 nm. La actividad de catalasa se calculó como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína que es igual a U/mg de proteína

### **7.5 Inclusión en parafina**

Los cerebros fijados en paraformaldehído fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol (70, 80, 96, 100%) y en xilol. Los tejidos deshidratados fueron embebidos e incluidos en parafina (Paraplast) para la formación de bloques. Utilizando un microtomo (Leica) se obtuvieron cortes de

---

hipocampo de 7 $\mu$ M de grosor, los cortes se montaron en laminillas silanizadas previamente.

## 7.6 Inmunofluorescencia

Los cortes se desparafinaron en xilol 10 minutos (x2), e hidrataron en alcohol-xilol 50:50 10 minutos (x1), alcohol 100% 10 minutos (x2) y alcohol 70% 10 minutos (x1) hasta agua destilada (5 minutos). Se realizó la recuperación antigénica con buffer de citratos, pH 6, 95°C, 10 min. Las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con albúmina sérica de bovino (Sigma) al 5% en PBS-tritón durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron con los anticuerpos primarios: anti-MT3 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, sc-164990), anti-NRF2 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, sc-365949), anti-iNOS 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, sc-8310), anti-3-nitrotirosina 1:100 (Millipore, 06-284), anti-claudina-5 1:50 (Millipore, ABT45), y anti-caspasa-3 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7272); durante 24 a 48 horas a 4°C.

Para la inmunodetección indirecta se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína 5-isotiocianato (FITC) o rodamina, incubados 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegidos de la luz. Aquellas laminillas para la detección de Nrf2 y claudina-5 se incubaron con anti-GFAP 1:500 (Abcam, 53554) durante 24 horas a 4°C.

Todas las laminillas, exceptuando aquellas para caspasa-3 se montaron con medio Vecta-Shield (VectorLabs) conjugado con DAPI (2,4-diamino-2-fenilindol). Las laminillas para caspasa-3 fueron montadas con Vecta-Shield conjugado con yoduro de propidio como marcador para neurodegeneración. Se cubrieron con un cubreobjetos y se sellaron las orillas de este con una capa de barniz de uñas.

Las microfotografías fueron tomadas usando un microscopio de fluorescencia Olympus BX41 y se fotografiaron las regiones CA1, CA3 y giro dentado de hipocampo a 40X. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ.

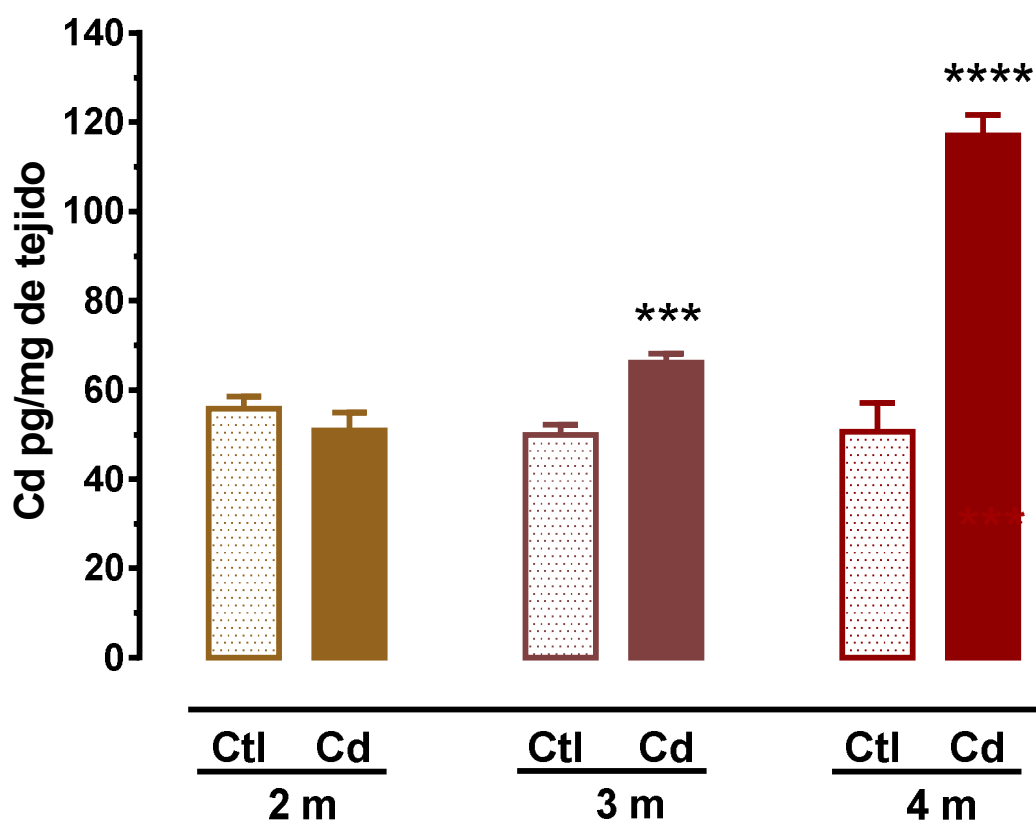
## 7.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos cuantitativos se realizó con ayuda del programa Graphpad Prism versión 6.0. Se realizó la comparación entre grupos control y problema de cada tiempo de exposición a Cd. Los datos de las pruebas bioquímicas fueron comparados por medio del estadístico  $t$  de "Student". El análisis del número de células inmunorreactivas se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. Los resultados fueron graficados como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) y un nivel de significancia menor del 0.05 ( $p < 0.05$ ) fue considerado significativamente diferente.

## 8. Resultados

### 8.1 El Cd se acumula en hipocampo de rata el ser administrado por vía oral

Al determinar la concentración de Cd en el hipocampo (**Figura 6**) no se encontró cambio después de 2 meses de administración. Sin embargo, al mes 3 existe un aumento significativo en la concentración de Cd (34%) y para el mes 4 la concentración aumentó en un 134%.

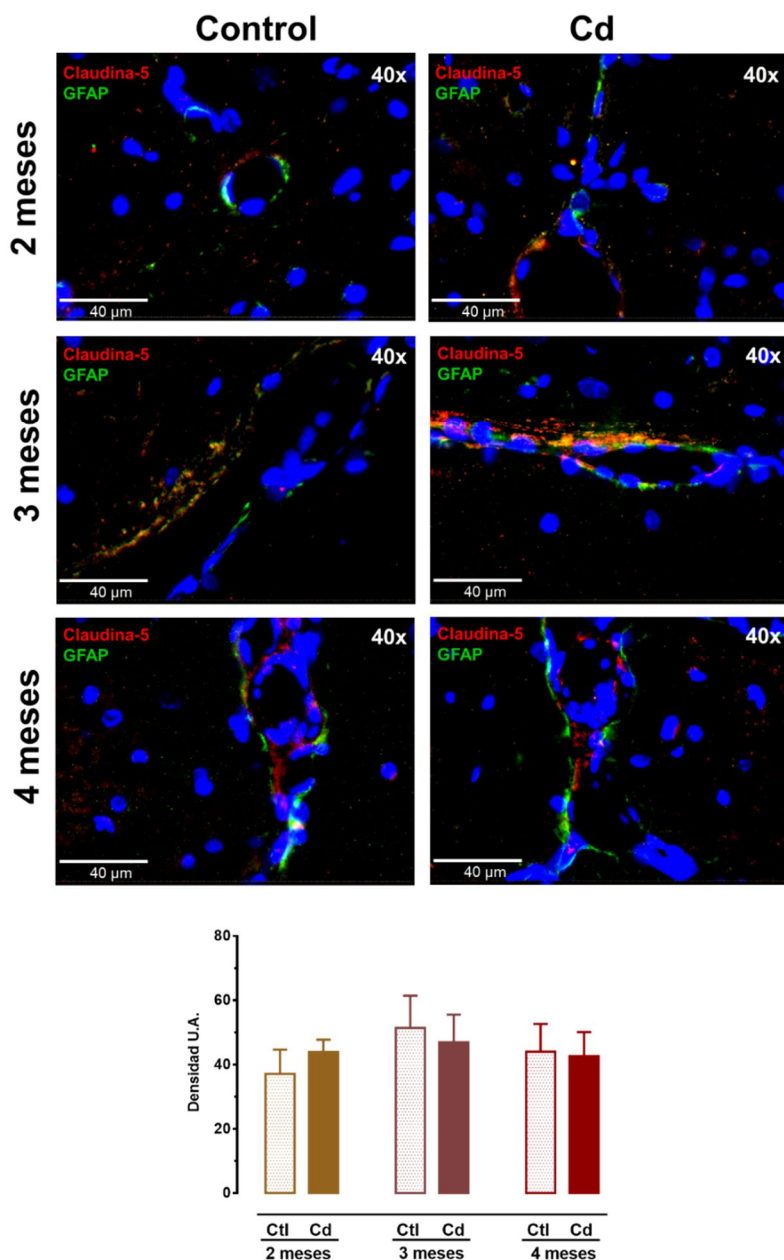


**Figura 6. Concentración de Cd en hipocampo.** Se determinó por ICP-OES la concentración de Cd en hipocampo después de 2, 3 y 4 meses de administración de una solución 32.5ppm de  $CdCl_2$ . Los datos representan la media de los valores  $\pm$  el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### 8.2 El Cd no modifica la inmunoreactividad de la claudina-5 en BHE

Una vez que se determinó que el Cd se acumula en hipocampo, se evaluó si la entrada de Cd se facilita al afectar a claudina-5; una proteína estructural de las uniones estrechas que regula el transporte paracelular en la BHE. Las microfotografías muestran a claudina-5 (rojo), GFAP (verde) y núcleos (azul)

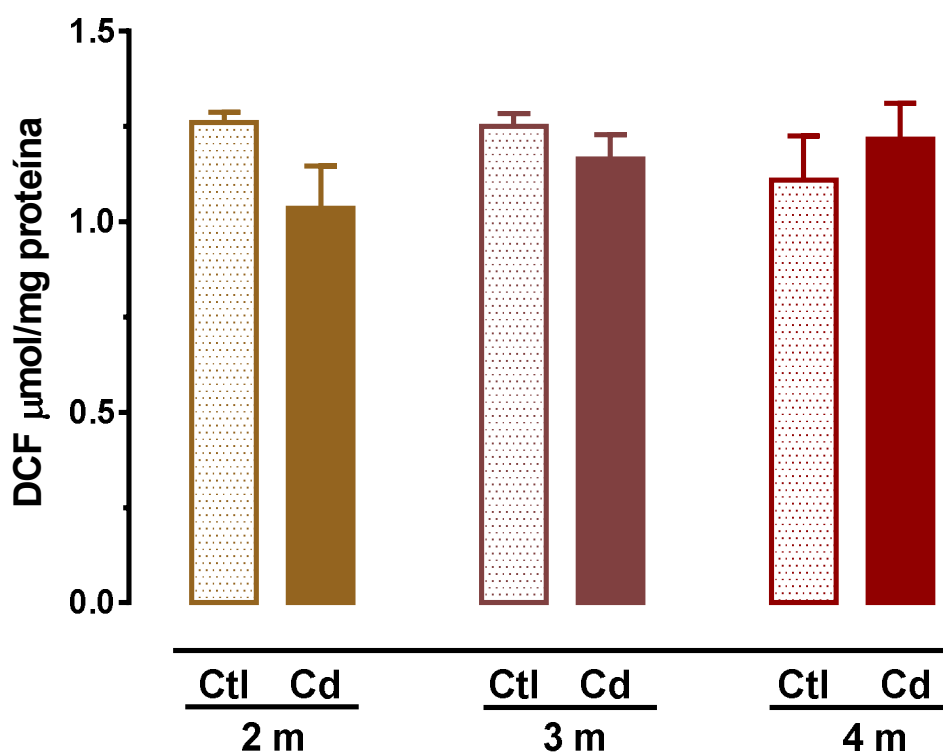
(Figura 7A). Los resultados demuestran que a ninguno de los tiempos de administración con Cd se observan cambios significativos en la inmunorreactividad a claudina-5 de los grupos con Cd cuando se comparan con respecto a su control (Figura 7B).



**Figura 7. Inmunorreactividad a claudina-5 y GFAP.** El Cd no cambia la inmunorreactividad a claudina-5 en hipocampo. Los datos representan la media de los valores  $\pm$  el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. \* $p < 0.05$

### 8.3 El Cd acumulado en hipocampo no incrementa los ROS pero si los marcadores de estrés nitrosante

Una vez que se determinó que el Cd administrado por vía oral puede acumularse en hipocampo desde el mes 3 de administración, se evaluó si el Cd aumenta la concentración de ROS. Por medio de fluorimetría se determinó la concentración de ROS, principalmente peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Los resultados obtenidos no muestran cambios significativos en la concentración de ROS en ninguno de los grupos Cd a ningún tiempo de administración (**Figura 8**).

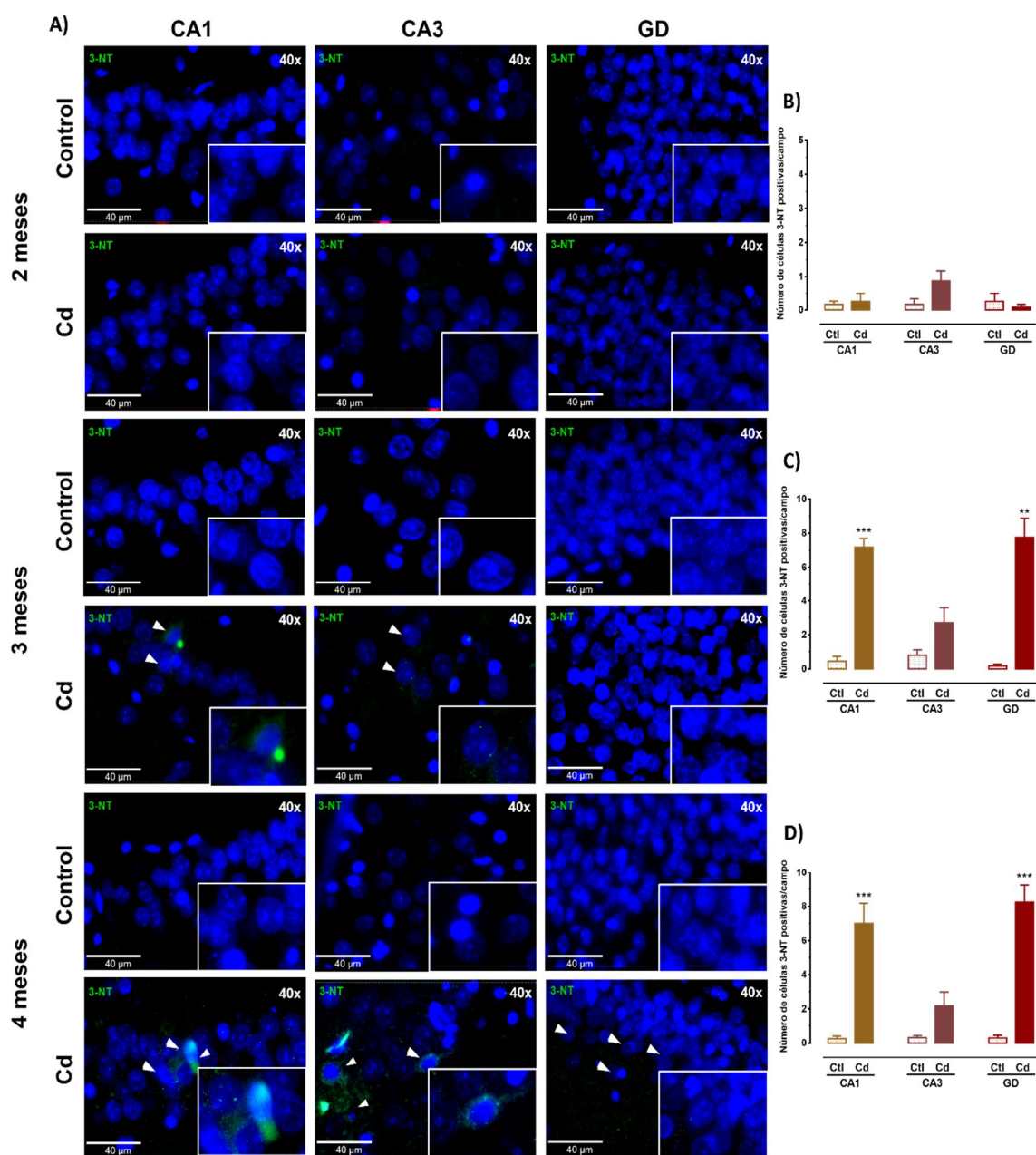


**Figura 8. Efecto del Cd sobre los ROS.** La administración de Cd no aumenta los niveles de ROS después de 2, 3 y 4 meses de administración de Cd. Los datos representan la media de los valores  $\pm$  el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. \* $p < 0.05$ .

Se considera que el Cd puede inducir la formación de ROS de manera indirecta al desplazar metales endógenos, como el hierro (Fe) de su unión a proteínas; estos metales pueden participar en reacciones tipo Fenton y generar ROS. Al mismo tiempo se ha relacionado al Cd con la sobreproducción de NO. Esta molécula tiene funciones importantes en el SNC, sin embargo, su producción

exacerbada puede llevar a estados de estrés nitrosante y contribuir con la oxidación y nitración de lípidos y proteínas.

Se evaluó por inmunofluorescencia al marcador 3-nitrotirosina (verde) (Figura 9A). Esta modificación postraducciona de las proteínas se asocia al proceso de estrés nitrosante.

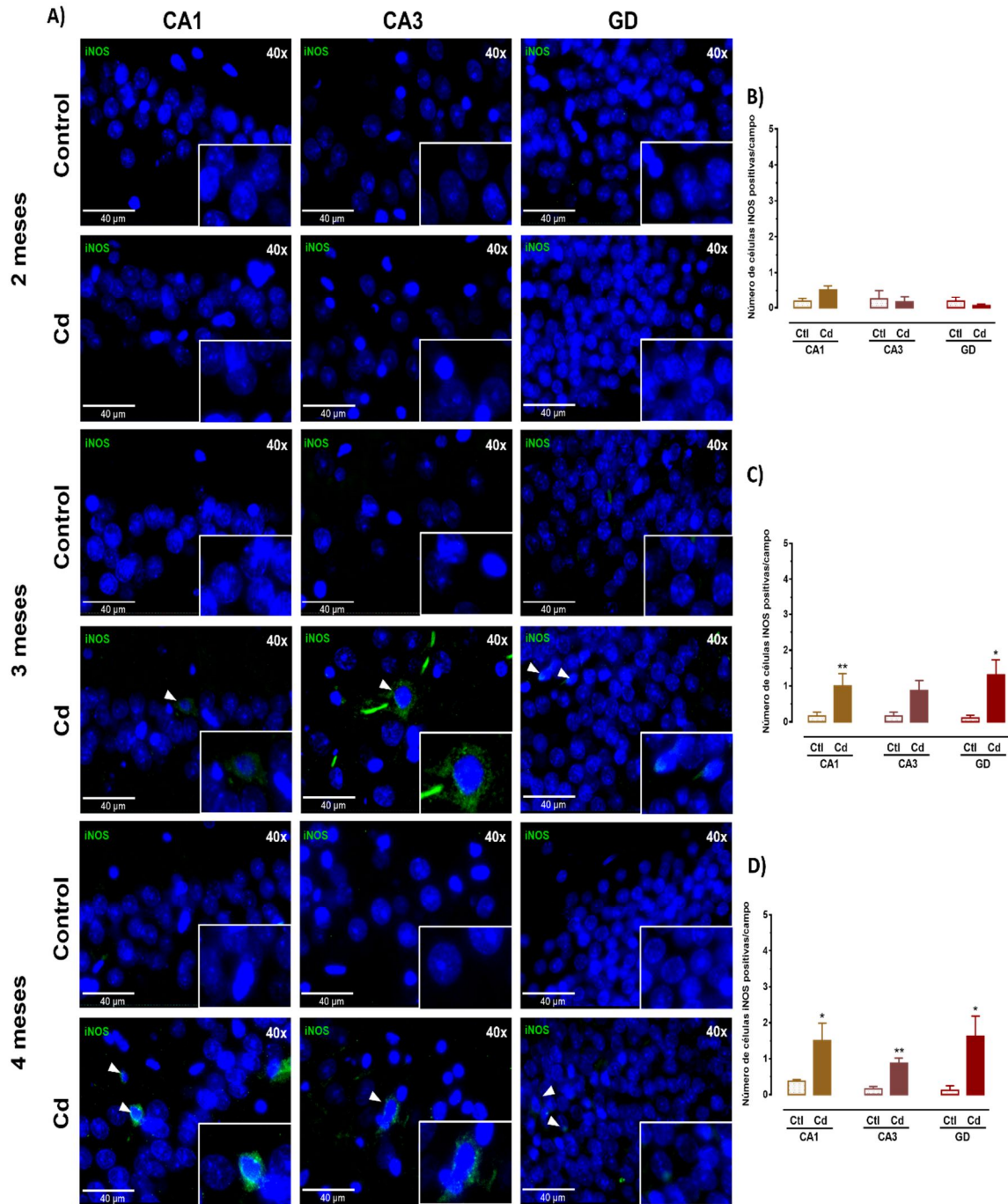


**Figura 9. Inmunorreactividad a 3-nitrotirosina.** Cd incrementa la inmunorreactividad a 3-nitrotirosina en las regiones CA1 y CA3 de hipocampo. Los datos representan la media de los valores  $\pm$  el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de U de Mann-Whitney, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

A los 2 meses de administración no existen cambios en la inmunorreactividad en ninguna de las áreas (**Figura 9B**). Los resultados indican aumento significativo en el número de células inmunorreactivas a 3-NT a los 3 meses en el área CA1 (633%) y giro dentado (843%) (**Figura 9C**) y a los 4 meses en las tres áreas de interés; CA1 (800%), CA3 (394%) y Gd (844%) (**Figura 9D**).

El aumento en este marcador está relacionado con un aumento en la concentración de NO, el cual ya ha sido reportado previamente. La producción de esta molécula esta mediada por enzimas sintasas de óxido nítrico (NOS), de las cuales la isoforma inducible es la más eficiente y que, por tanto, se asocia con procesos de estrés nitrosante.

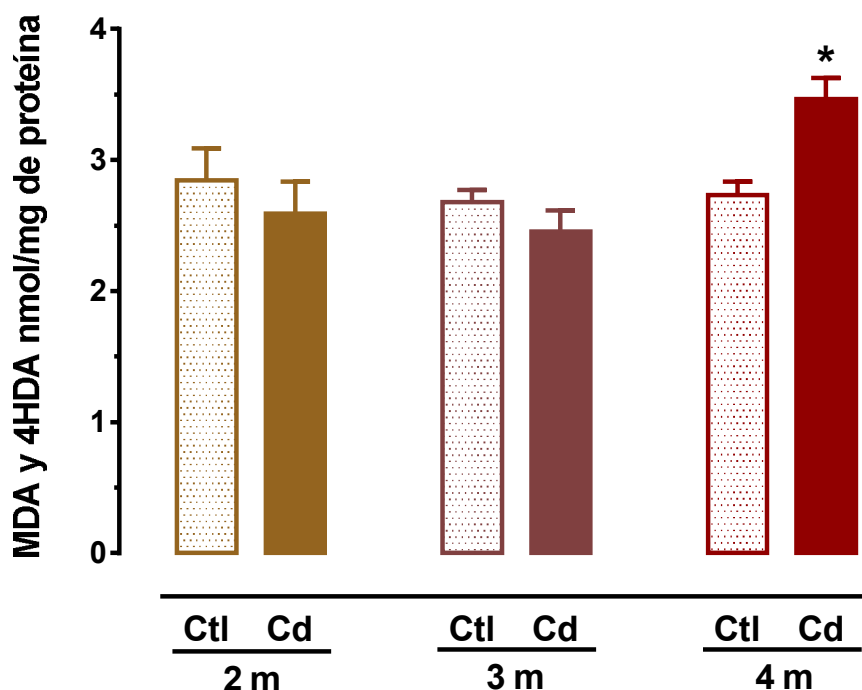
Las microfotografías muestran la inmunorreactividad a iNOS (verde) y núcleos (azul) (**Figura 10A**). La evaluación de la iNOS por fluorescencia muestra que los 2 meses no existen cambios significativos (**Figura 10B**) y a partir de los 3 meses existe un aumento en el número de células inmunorreactivas a este marcador en las tres áreas de interés: CA1 (125%), CA3 (143%) y Gd (181%) (**Figura 10C**). El aumento significativo también se observa al mes 4 (**Figura 10D**).



**Figura 10. Inmunorreactividad a iNOS en CA1, CA3 y Gd hipocampal.** Los datos representan la media de los valores  $\pm$  el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de U de Mann-Whitney. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$

#### 8.4 El Cd incrementa la lipoperoxidación en hipocampo

Las especies ROS pueden reaccionar con NO para formar peroxinitrito, el cual es altamente oxidante y que puede oxidar lípidos generando MDA o 4-HDA. Se determinó la concentración de estos marcadores de lipoperoxidación (**Figura 11**), los resultados muestran un incremento en su concentración en el grupo Cd del mes 4 de administración (26%), mientras que el resto de los grupos no muestra cambios significativos cuando se compararon con su control.



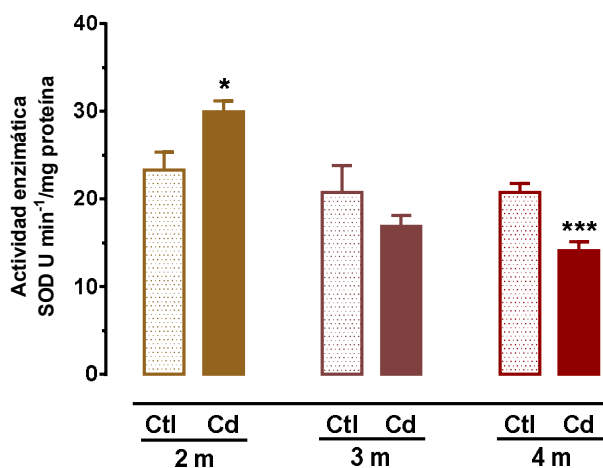
**Figura 11. Efecto del Cd sobre LPO.** La administración de Cd aumenta los niveles de LPO después de 4 meses de administración de Cd. Los datos representan la media de los valores  $\pm$  el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. \* $p < 0.05$ .

Estos resultados muestran que la acumulación de Cd en el hipocampo es dependiente del tiempo de administración. Además de que no genera un aumento en las ROS, pero si en la LPO y marcadores de estrés nitrosante.

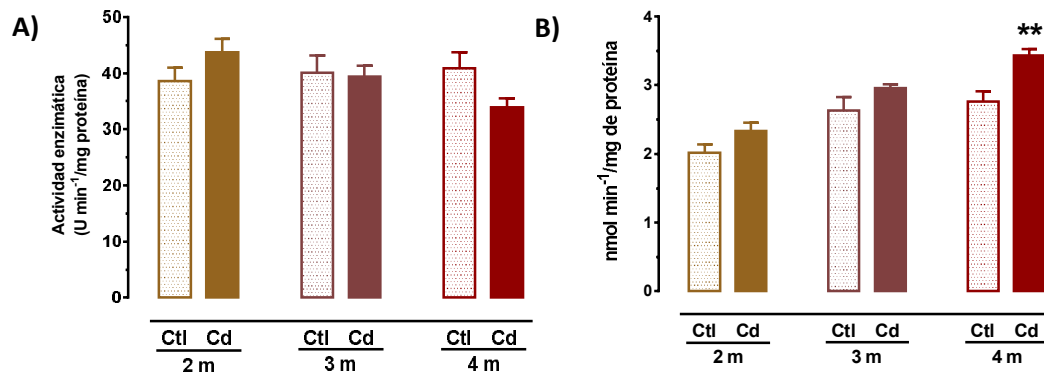
### 8.5 La administración de Cd altera los sistemas antioxidantes celulares.

La célula cuenta con sistemas antioxidantes que regulan la producción y acción de ROS y, de manera indirecta, de nitrógeno. Se evaluó la actividad de enzimas antioxidantes encargadas de la detoxificación de ROS. SOD es la enzima encargada de dismutar el anión superóxido, generado en la cadena de transporte de electrones, en una molécula menos reactiva, el peróxido de hidrogeno. Los resultados muestran un incremento en su actividad (26%) en el grupo Cd de 2 meses y una disminución en el grupo Cd de 4 meses (42%) (**Figura 12**).

El producto de la actividad de la SOD es el peróxido de hidrogeno, el cual puede ser transformado a agua por dos enzimas diferentes. Si bien la actividad de la catalasa no muestra cambios significativos (**Figura 13A**), si se observa que en los grupos administrados con Cd existe una tendencia a disminuir. GPx es segunda enzima que biotransforma el peróxido de hidrogeno, pero con el uso de glutatión. En este caso desde el mes 3 de administración de Cd (**Figura 13B**) se observa un aumento en su actividad sin ser significativo (12%), mientras que en el grupo Cd del mes 4 se observa aumento significativo de su actividad (24%), lo cual podría relacionarse con que no existan cambios en la concentración de ROS.



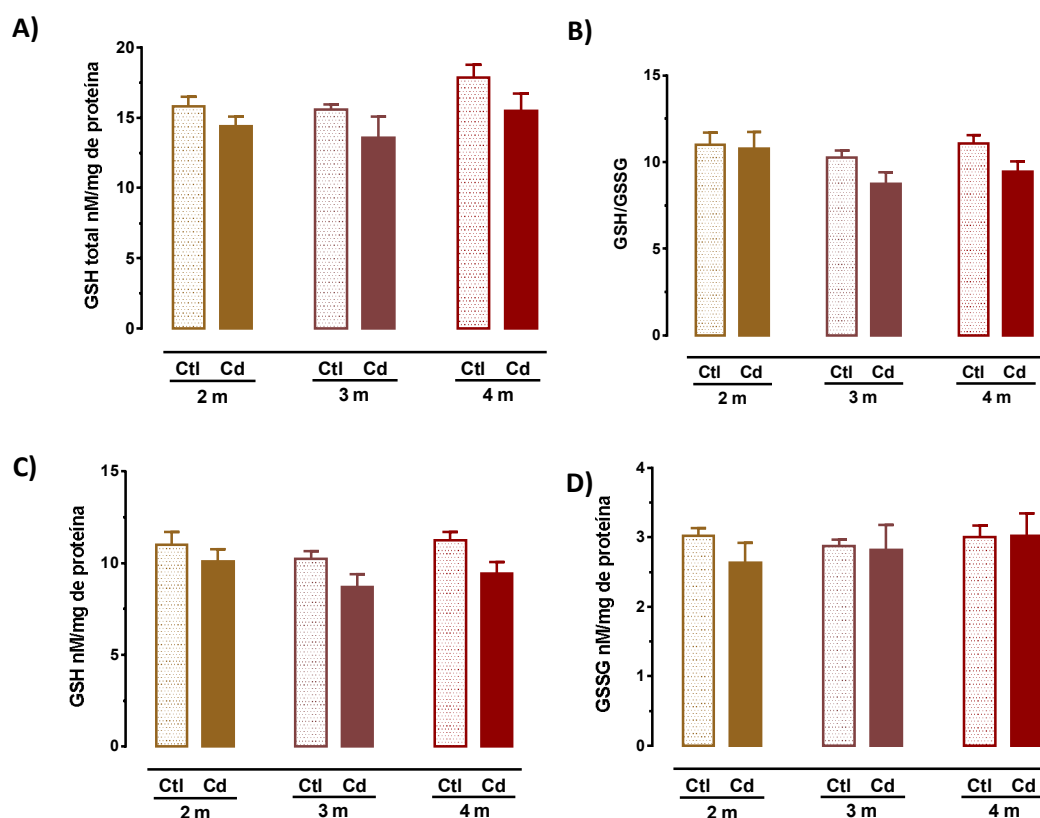
**Figura 12. Efecto del Cd sobre la actividad de la SOD.** La administración de Cd afecta la actividad de la SOD a los 2 y 4 meses. Los datos representan la media de los valores  $\pm$  el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figura 13. Efecto del Cd sobre la actividad de la catalasa y GPx.** El Cd durante 2, 3 y 4 meses no cambia la actividad de la catalasa (A) pero sí aumenta la actividad de la GPx después de 4 meses (B). Los datos representan la media de los valores  $\pm$  el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de “t” de Student. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

En cerebro, el sistema antioxidante más importante es el glutatión. Ante la exposición a Cd las células incrementan la producción de este péptido. Al evaluar la concentración total de glutatión no observamos cambios significativos a ningún tiempo de exposición (Figura 14A). Mientras que al observar los resultados del índice redox, es decir, el balance entre glutatión en su forma oxidada y reducida podemos observar que los grupos administrados con Cd tienden a índices menores que su grupo control (Figura 14B), lo cual indicaría que se favorece un estado oxidado. De manera más clara se observa que el glutatión reducido tiende a disminuir conforme aumenta el tiempo de administración (Figura 14C), mientras que el glutatión oxidado tiende a aumentar (Figura 14D). Al ser el glutatión el antioxidante más importante en cerebro resulta interesante el comportamiento que se observa al no haber aumento de GSH total, ni cambios significativos en el índice redox. Esto podría estar regulado por la actividad de enzimas que se encargan del uso y reciclaje del GSH.

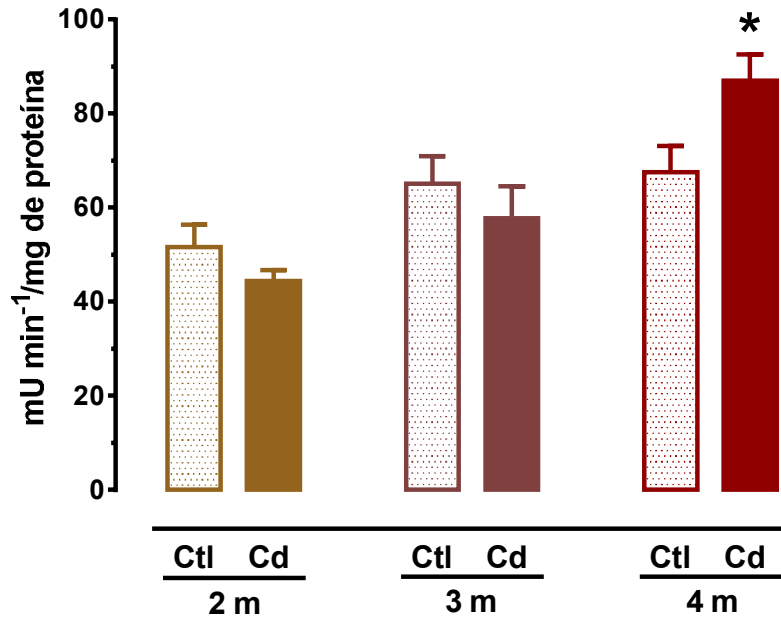
La enzima encargada del reciclaje de GSSG a GSH es la glutatión reductasa. Su actividad muestra una tendencia a aumentar desde el mes 3, mientras que el aumento es significativo al 4 mes de análisis (28%) (Figura 15). Esto concuerda con el hecho de no encontrar diferencias significativas en el índice redox ni en el glutatión total, pero es importante notar la tendencia a aumentar del GSSG aún cuando la actividad de glutatión reductasa aumenta.



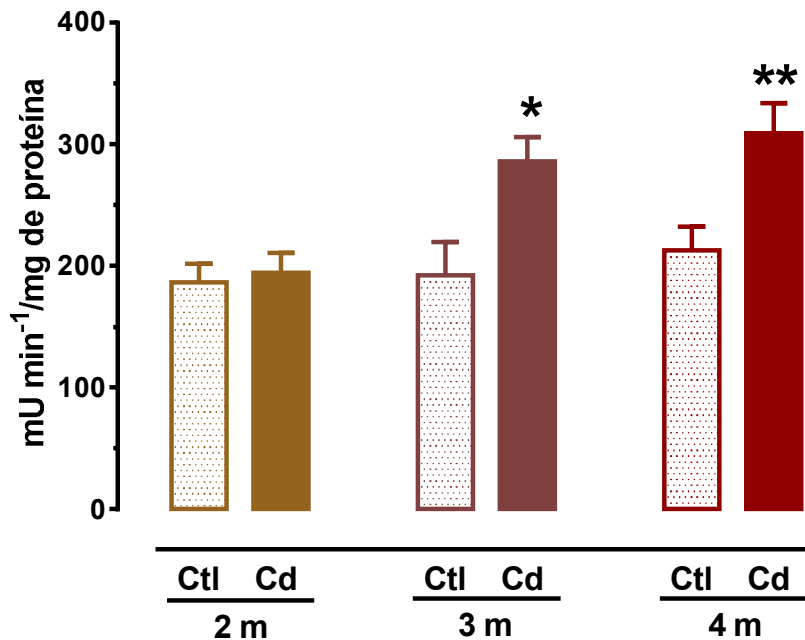
**Figura 14. Efecto del Cd sobre el GSH total y el índice GSH/GSSG.** La administración de Cd durante 2, 3 y 4 meses no cambia la concentración de GSH total en hipocampo de rata (A), ni altera el índice redox (B). Se observa que el Cd genera una tendencia a que el GSH reducido disminuya (C) y el GSSG aumente (D). Los datos representan la media de los valores  $\pm$  el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. \* $p < 0.05$

En este sentido, la actividad de la glutatión transferasa, enzima que cataliza la unión de GSH con moléculas electrofílicas como productos de LPO o xenobióticos, aumenta su actividad de manera significativa desde el mes 3 de administración (48%) y hasta el mes 4 con un aumento del 45% de su actividad (Figura 16).

Estos resultados se relacionan con los resultados de LPO, e índice redox. Es posible que el aumento en la actividad de esta enzima impida un aumento en la LPO, pero contribuyendo a la disminución de glutatión reducido.

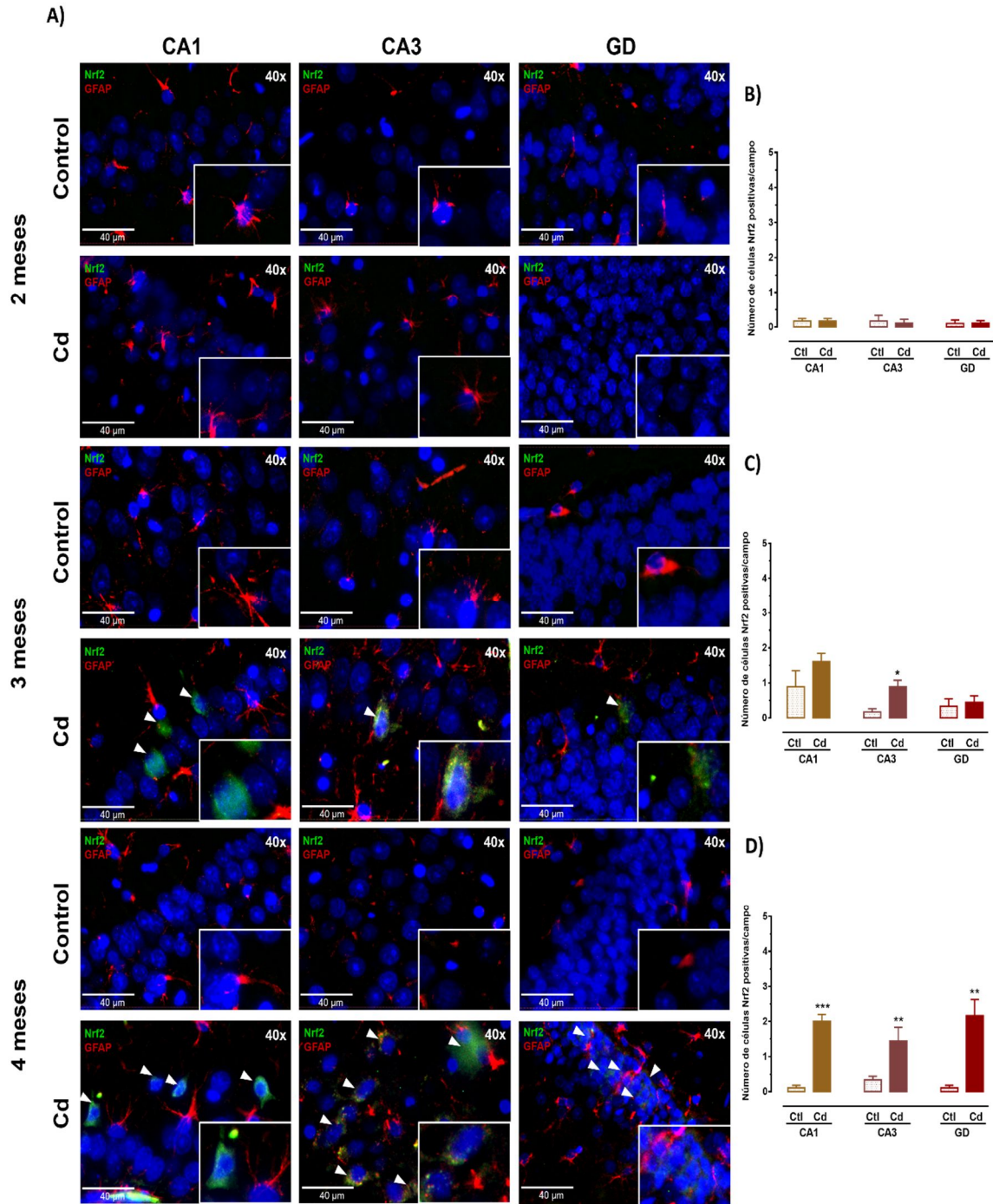


**Figura 15. Glutación reductasa.** La actividad de la glutación reductasa en hipocampo de ratas expuestas a Cd no cambia a lo largo del tiempo de exposición. Los datos representan la media de los valores  $\pm$  el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. \* $p < 0.05$



**Figura 16. Glutación S-transferasa (GST).** La actividad de la GST aumenta en hipocampo conforme con el tiempo de exposición: 2, 3 y 4 meses. Los datos representan la media de los valores  $\pm$  el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

Además del aumento en la actividad de enzimas antioxidantes ante la presencia de Cd, se pueden inducir factores de transcripción que regulen la expresión de estas enzimas. Nrf2 es uno de los principales factores que regulan esto. Al evaluar por inmunofluorescencia a Nrf2 se observan cambios en la inmunorreactividad a Nrf2 (verde) y a GFAP en el grupo Cd cuando se compara con su control después de 3 y 4 meses de administración de Cd (**Figura 17A**). El conteo de células inmunorreactivas no muestra cambios significativos en ninguna de las áreas de interés en el mes 2 (**Figura 17B**). Al tercer mes se observa el aumento de inmunorreactividad a ambos marcadores. El conteo de células indica un aumento significativo en CA3 (**Figura 17C**). Para el cuarto mes se evidencia un aumento tanto en Nrf2 como en GFAP, el conteo de células inmunorreactivas a Nrf2 muestra aumentos significativos en las tres áreas: CA1, CA3 y Gd (**Figura 17D**).



**Figura 17.** El Cd incrementa la inmunorreactividad a Nrf2 y GFAP en CA1, CA3 y Gd hipocampal. Los datos representan la media de los valores  $\pm$  el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de U de Mann-Whitney. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

### 8.6. Metalotioneína 3 aumenta en hipocampo en respuesta a la acumulación de Cd

Además de la acción de los sistemas antioxidantes, la célula cuenta con proteínas que pueden unir al Cd para disminuir su toxicidad. Las proteínas de mayor relevancia que pueden unir Cd son las metalotioneínas. Existen 4 isoformas, la isoforma III se expresa casi exclusivamente en cerebro.

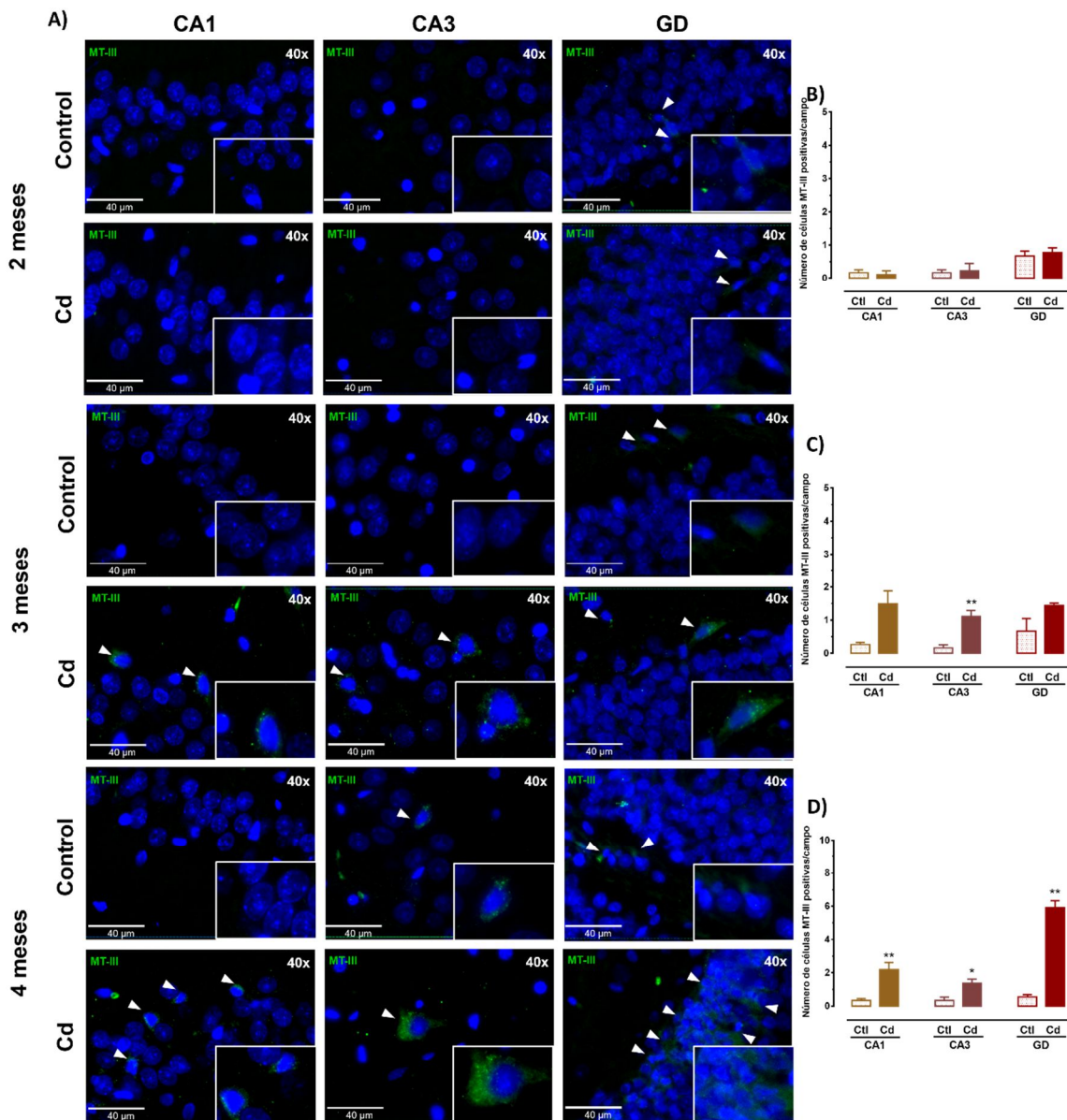
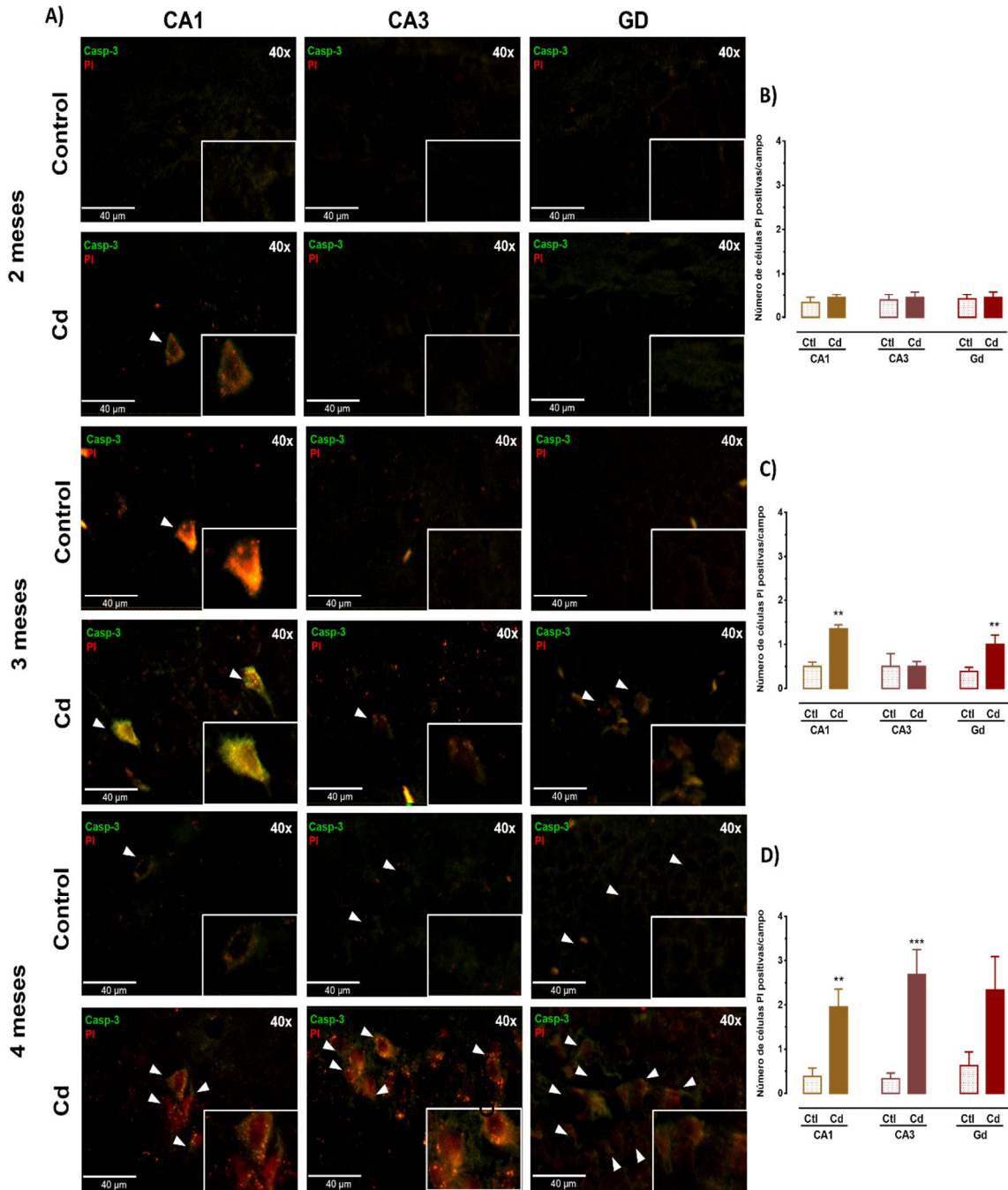


Figura 18. Cd incrementa la inmunorreactividad a metalotioneína 3 en las regiones CA1, CA3 y giro dentado de hipocampo. Los datos representan la media de los valores  $\pm$  el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de U de Mann-Whitney. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$

Se evaluó por fluorescencia a metalotioneína III (MT-III), las microfotografías muestran a MT-III en verde y los núcleos marcados en azul (**Figura 18A**); se observa un aumento en la fluorescencia que depende del tiempo de administración. La evaluación del número de células inmunorreactivas muestra que a partir de 3 meses de administración de Cd se aumenta de manera significativa la inmunorreactividad a MT-III en CA1 y CA3 (**Figura 18C**) y que este comportamiento continúa hasta el mes 4 de administración (**Figura 18D**). Además, es importante notar que, de manera basal, la Mt-III es mayor en el área de giro dentado que en las otras áreas analizadas.

### **8.7. El Cd induce neurodegeneración en hipocampo a partir de 3 meses de administración**

Finalmente, para determinar si el Cd puede inducir neurodegeneración se evaluó la inmunorreactividad a caspasa-3 y a ioduro de propidio, los cuales son indicadores de apoptosis celular. Las microfotografías muestran a caspasa-3 en verde y al ioduro de propidio (PI) en rojo (**Figura 19A**). En el grupo administrado por 2 meses no se observan cambios en la inmunorreactividad de ninguna de las marcas, al realizar el conteo de células positivas no se aprecian cambios significativos (**Figura 19B**). A partir del mes 3 y hasta el mes 4 se observa un aumento en la inmunorreactividad y en el número de células positivas a ambos marcadores. En el caso del mes 3 se observan cambios significativos en el área CA1 y CA3 (**Figura 19C**), mientras que en el mes 4 el aumento significativo es apreciable también en Gd (**Figura 19D**).



**Figura 19. Inmunorreactividad a caspasa-3 y ioduro de propidio en hipocampo.** Los datos representan la media de los valores  $\pm$  el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba U de Mann-Whitney. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

---

## 9. Discusión de resultados

La contaminación ambiental por metales pesados representa un riesgo a la ecología y los seres vivos. Particularmente, el Cd es el quinto contaminante ambiental más peligroso a nivel mundial. Las emisiones de este metal al ambiente promueven que el ser humano se encuentre en contacto con el Cd a través del aire y el consumo de agua y alimentos contaminados. Este metal produce efectos tóxicos en el organismo que dependen de la especie química del Cd, la vía de entrada al organismo, la dosis y el tiempo de exposición. Desde hace tiempo se conocen los efectos tóxicos del Cd en la salud humana. En particular, en SNC se sabe que este metal produce déficits cognitivos que puede estar involucrado en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson (Akinyemi et al., 2017; Gonçalves et al., 2012; Jiang et al., 2017; Jiang et al., 2007; Karri et al., 2016; Okuda et al., 1997) En parte, estos efectos pueden estar ligados a modificaciones en la morfología neuronal (Méndez-Armenta et al., 2001; Montes et al., 2015; Ohtani-Kaneko et al., 2008; Pulido et al., 2019). De igual manera se han reportado alteraciones en la homeostasis del  $Ca^{2+}$  (Chen et al., 2015; Xu et al., 2011) y disfunciones en enzimas que regulan a los neurotransmisores como la acetilcolina (Akinyemi et al., 2017; Gonçalves et al., 2012). Además, el Cd es un inductor indirecto de ROS, lo que puede generar estrés oxidante y consecuente daño a ADN, lípidos y proteínas (Valko et al., 2007). Muchos de estos estudios se han realizado en modelos de cultivo celular o animales neonatos. Sin embargo, estos modelos son muy susceptibles al daño generado por este metal; en animales neonatos la BHE aún no es funcional completamente lo que promueve la entrada del metal al SNC, mientras que en cultivo las neuronas no cuentan con la regulación de las células gliales. De los estudios llevados a cabo en animales jóvenes y adultos se sabe que el Cd también afecta de manera negativa los procesos cognitivos, pero el mecanismo o mecanismos por los cuales el Cd genera estos efectos aún no es claro.

En este trabajo, al exponer a ratas macho de la cepa Wistar a una dosis del nivel más bajo de efecto adverso observado para ratas Wistar en agua de beber

---

(LOAEL: 32 ppm) (ATSDR, 2012), se encontró que el Cd puede entrar a SNC y acumularse en hipocampo después de 3 y 4 meses de exposición (**Figura 6**). Muchos estudios demuestran que una vez que el Cd se absorbe en el organismo, ya sea por los pulmones o tracto gastrointestinal, se distribuye primero a hígado, seguido por riñones y secundariamente a otros tejidos (ATSDR, 2012; Swiergosz-Kowalewska, 2001). En estudios con animales neonatos, los resultados muestran que el Cd puede acumularse en diferentes áreas del cerebro luego de una sola dosis administrada por vía intraperitoneal (i.p.) (Méndez-Armenta et al., 2001; Montes et al., 2015). Mientras que, en estudios con animales adultos el Cd administrado por vía nasal puede acumularse en bulbo olfatorio (Evans & Hastings, 1992). Los autores relacionan una mayor acumulación de Cd en animales neonatos con la funcionalidad de la BHE. En animales neonatos la selectividad de la BHE difiere en comparación con animales adultos (Schmitt et al. 2017; Tobwala et al., 2014). La BHE forma parte del mecanismo de defensa contra la entrada de xenobióticos y otras sustancias al SNC, al regular de manera selectiva el transporte paracelular y transcelular (Serlin et al., 2015; Tajés et al., 2014). Sin embargo, diferentes estímulos pueden alterar su permeabilidad (Tobwala et al., 2014; Yokel, 2009).

La BHE está conformada por células endoteliales especializadas, pericitos y astrocitos. Entre las células endoteliales adyacentes se encuentran proteínas transmembranales que forman las uniones estrechas que son encargadas de controlar el transporte paracelular de iones y otras moléculas (Jia et al., & Jiang, 2014; Keaney & Campbell, 2015). Para conocer si el Cd afecta la integridad de la BHE, evaluamos por inmunofluorescencia a claudina-5. Nuestros resultados indican que el Cd no promueve alteraciones en las uniones estrechas en hipocampo (**Figura 7**), lo cual indicaría que la entrada de Cd a SNC no depende de alterar proteínas de las uniones estrechas. Existen más mecanismos que el Cd podría utilizar para entrar al SNC de animales adultos. Dado que el Cd no es metal esencial en el organismo se sabe que utiliza mecanismos de transporte para otros iones (Sabolić et al., 2010; Zalups & Ahmad, 2003). Uno de los más importantes es el transportador DMT1 que participa en el transporte de Fe desde el lumen intestinal hacia el interior de los enterocitos. Además, también se encuentra en la membrana endosomal de muchos

---

tipos celulares para facilitar la captura de Fe. DMT1 se expresa en células endoteliales de BHE y del plexo coroideo (Skjørringe et al., 2015) por lo que podría facilitar la entrada de Cd en las células endoteliales y después hacia SNC. Sin embargo, se debe considerar que la mayor proporción de Cd en circulación se encuentra formando complejos con proteínas lo que dificultaría la interacción del Cd con DMT1 (Zalups & Ahmad, 2003). También se ha descrito que el Cd puede acumularse en el plexo coroideo durante administraciones crónicas y agudas de Cd (Arvidson & Tjälve, 1986). El plexo coroideo forma parte de la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (LCR) y se ha demostrado que presenta una alta expresión de metalotioneínas, favoreciendo la formación de complejos Cd-MT y la acumulación del metal en esta área (Nishimura et al., 1992). Se cree que la acumulación de metales pesados en el plexo puede generar alteraciones en su estructura y causar apoptosis relacionada con estrés oxidante (Arvidson & Tjälve, 1986). La ruptura del plexo facilitaría la entrada de Cd al LCR y su distribución al resto del cerebro. A pesar de que no están claros los mecanismos que permiten la entrada de Cd al SNC, este estudio muestra que el Cd si se acumula en hipocampo de manera progresiva sin alterar la BHE.

Uno de los principales mecanismos de toxicidad del Cd es el estrés oxidante (Chen et al., 2015; Liu et al., 2009; Olszowski et al., 2015). El estrés oxidante es un desbalance en la célula que favorece la presencia de especies prooxidantes y que puede generar daño y promover la muerte celular. La fisiopatología de muchas enfermedades se ha ligado al estrés oxidante y se ha propuesto como un factor en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson (Halliwell, 2006; Karri et al., 2016; Okuda et al., 1997).

Las neuronas son especialmente susceptibles al daño oxidante debido a varios factores: 1) las ROS juegan un papel vital en la señalización neuronal;  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  regulan el crecimiento de progenitores hipocampales y regulan la LTP (Dickinson et al., 2010; Massaad & Klann, 2010). 2) El metabolismo de la glucosa en neuronas es primordialmente oxidativo. Además, la baja expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de glucosa en neuronas facilita la glucotoxicidad

---

(Magistretti & Allaman, 2015; Rabbani & Thornalley, 2008). 3) Para soportar la fosforilación oxidativa en cerebro se requiere una alta cantidad de oxígeno y de mitocondrias, lo que propicia un aumento en la producción de ROS mitocondriales (Magistretti & Allaman, 2015). 4) La defensa antioxidante endógena es baja comparada con otros órganos (Cobley et al., 2018).

Debido a su configuración electrónica el Cd no posee química redox (Cuypers et al., 2010). Sin embargo, es capaz de desplazar a metales redox endógenos (Fe y Cu) de su unión con proteínas, incrementando la concentración de estos metales libres en citoplasma (Dorta et al., 2003). Estos metales participan en reacciones de Fenton y Haber-Weiss lo que produce radicales hidroxilos ( $\cdot\text{OH}$ ). Los resultados de este estudio no muestran cambios en la concentración de ROS en ninguno de los grupos expuestos a Cd (**Figura 8**), a pesar del incremento en la concentración de Cd en el hipocampo. En este sentido existe la posibilidad de que el Cd sí induzca la formación de ROS pero que estos hayan reaccionado con otras moléculas o hayan sido detoxificadas por enzimas antioxidantes.

Algunos de los ROS son radicales libres porque contienen uno o más electrones desapareados en un orbital atómico o molecular. Este electrón desapareado le otorga un grado considerable de reactividad (Halliwell, 2012; Valko et al., 2007). El radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) tiene una alta reactividad con una vida media muy corta ( $10^{-9}$  segundos). *In vivo* reacciona inmediatamente con macromoléculas cercanas. El radical hidroxilo puede generar daño al ADN y promover la mutagénesis y carcinogénesis. Además, puede favorecer la lipoperoxidación y la generación de aldehídos  $\alpha$  y  $\beta$  insaturados como el malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenoales (4-HDA) los cuales pueden generar aductos mutagénicos de ADN (Valko et al., 2007).

En este trabajo se reporta que el Cd aumenta significativamente la concentración de MDA y 4HDA después de 4 meses de administración (**Figura 11**), lo cual concuerda con la acumulación de Cd en hipocampo. Estudios en diversos órganos, incluyendo cerebro describen el aumento en LPO debido a Cd (El-Maraghy et al., 2001). El aumento en la LPO también puede estar mediado por especies

---

reactivas de nitrógeno (RNS). En plantas se ha descrito que el Cd puede inducir estrés nitrosante, mientras que en mamíferos se han reportado el aumento en la concentración de NO y nitritos en cerebro (Ansari et al., 2017; J. Chen et al., 2017; Corpas & Barroso, 2014; Pulido et al., 2019).

El NO es una molécula pequeña que contiene un electrón desapareado, pero en condiciones de bajo oxígeno posee una gran estabilidad (vida media >15 s). Actúa como molécula señalizadora en procesos como la neurotransmisión, regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa inmune y relajación muscular (Valko et al., 2007). Es soluble en medios lipídicos y acuosos lo que facilita su difusión en citoplasma y a través de la membrana celular (Pérez-Neri, 2015). El aumento en la concentración de NO y de otras RNS se conoce como estrés nitrosante. Este tipo de estrés promueve la nitración de proteínas, lo que altera su estructura e inhibe su función normal. Nuestros resultados muestran aumento en la nitración de proteínas en CA1, CA3 y Gd de hipocampo a los 3 y 4 meses de administración de Cd (**Figura 9**). La nitración de residuos tirosina es una modificación postraduccional que consiste en adicionar un grupo nitro en un carbono del anillo aromático. Este proceso es considerado selectivo pues no todos los residuos tirosina pueden ser nitrados. Se ha reportado que la nitración de tirosina es capaz de cambiar la función de las proteínas, generalmente inhibiéndolas (Bartesaghi et al., 2007; Radi, 2013). Estudios proteómicos con células en condiciones pro-inflamatorias reportan la nitración de tirosina en proteínas que participan en el desarrollo de estrés oxidante, apoptosis y producción de ATP (Aulak et al., 2001). En este estudio, el aumento en la nitración de proteínas podría estar alterando su función y contribuyendo de esta manera a la patología generada por el Cd.

El aumento en la nitración de proteínas indica un aumento en la producción de NO. La síntesis de NO esta mediada por actividad de las NOS, la cual a partir de arginina producen NO y citrulina (Moncada & Higgs, 1993). Existen 3 isoformas de esta enzima (endotelial, neuronal e inducible), dos de las cuales son constitutivas (endotelial y neuronal) y su actividad está regulada por el sistema  $Ca^{2+}$ -calmodulina.

---

La tercera isoforma es inducible y se regula por moléculas proinflamatorias (Steinert, Chernova, & Forsythe, 2009). Al evaluar a la isoforma inducible (iNOS) en este estudio los resultados muestran que aumenta a los 3 y 4 meses en CA1, CA3 y GD (**Figura 10**), lo cual concuerda con el aumento en la nitración de proteínas. En este sentido, la inducción de la iNOS aumenta la concentración de NO lo que favorece la nitración de proteínas. La iNOS puede producir concentraciones micromolares de NO, mientras que las otras isoformas producen concentraciones nanomolares bajas. El NO tiene efectos duales dependiendo de su concentración: a bajas concentraciones actúa como neuromodulador y promueve la neuroprotección, mientras que a altas concentraciones puede producir neurotoxicidad y neurodegeneración. Esto ha llevado a asociar la inducción de la iNOS como marcador de estrés nitrosante (Benarroch, 2011; Pérez-Neri, 2015; Steinert et al., 2009).

Además, la inducción de la iNOS se ha asociado al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas por el mal plegamiento de proteínas debido a su nitración o aumento en la LPO (Beckhauser et al., 2016; Calabrese et al., 2004; Díaz et al., 2010). En este sentido, a pesar de no observar un aumento en los ROS después de la exposición a Cd si observamos el aumento en la LPO, lo cual podría estar relacionado con la producción de NO. Las células del sistema inmune producen tanto NO como  $O_2^{\bullet-}$  durante el estallido respiratorio (Džoljić et al., 2015; Luiking et al. 2010). Bajo estas condiciones el NO y  $O_2^{\bullet-}$  pueden reaccionar para producir cantidades significativas del anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), el cual tiene una mayor capacidad oxidante que el NO y  $O_2^{\bullet-}$  y puede fragmentar el ADN y oxidar lípidos. Ante bajas concentraciones de NO (10-100 nM) la mayor parte del  $O_2^{\bullet-}$  producido será catalizado por la SOD para producir  $H_2O_2$ . Sin embargo, durante la sobre activación de la eNOS o inducción de la iNOS, la concentración del NO excede los niveles micromolares y compite con la SOD por el  $O_2^{\bullet-}$  para generar  $ONOO^-$  (Radi, 2013). El método de detección usado para determinar la concentración de ROS detecta principalmente  $H_2O_2$  y en menor medida  $O_2^{\bullet-}$ . Cabe la posibilidad de que el Cd genere un aumento en la concentración de  $O_2^{\bullet-}$  en

---

mitocondria pero que al aumentar la concentración de NO sea preferente la formación de ONOO<sup>-</sup> y que esto favorezca la LPO observada en el 4° mes de exposición.

Para prevenir o contrarrestar el daño generado por las ROS o RNS, la célula cuenta con mecanismos de defensa antioxidante. En este estudio la SOD mostró un comportamiento dual: en el grupo administrado por 2 meses con Cd se observa un aumento en la actividad, a los 3 meses no existe cambio y a los 4 existe una disminución significativa en su actividad (**Figura 12**). En hígado se ha reportado que la actividad de enzimas como SOD, catalasa o GPx disminuye después de la exposición a Cd. Mientras que en neuronas la actividad de esta enzima varía de acuerdo con la dosis, tiempo de administración y modelo utilizado (Kanter et al., 2016; Unsal et al., 2015; Yuan et al., 2018). La Mn-SOD en mitocondria y la CuZn-SOD en citosol son enzimas que se encargan de catalizar la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno. En modelos animales se ha demostrado que el Cd<sup>2+</sup> afecta la actividad de la SOD en varios tejidos. El Cd puede alterar el plegamiento de la SOD y propiciar la agregación de estas proteínas. Esto se relaciona con la citotoxicidad observada en enfermedades neurodegenerativas (Huang et al., 2006; Jurczuk et al., 2004). Estudios *in vitro* han mostrado que el Cd<sup>2+</sup> no se une directamente a la CuZn-SOD, pero si promueve la oxidación de cisteínas C57 y C146 interfiriendo con la maduración de la SOD1 (Polykretis et al., 2019). Además, tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha reportado que la MnSOD puede ser nitrada en Tyr34, lo que la inactiva (MacMillan-Crow et al., 1996). Aunado a esto, se ha descrito que el Cd ejerce un efecto hormético sobre la actividad de SOD; bajas concentraciones de Cd incrementan la actividad, mientras que altas concentraciones la disminuyen (Zhang et al., 2009). Este efecto podría contribuir a los resultados reportados en este trabajo.

Otra de las enzimas que contribuye a la protección celular antioxidante es la catalasa. Esta enzima es una metaloproteína de Fe que cataliza la transformación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>. En este trabajo no se observan cambios significativos en su actividad en ninguno de los grupos administrados con Cd, aunque si existe una

tendencia a disminuir conforme aumenta el tiempo de exposición (**Figura 13A**). Los reportes de la actividad de esta enzima en diferentes órganos son variables y dependen del tiempo de administración y de la dosis (Casalino et al., 1997). En cerebro después de una administración de Cd a bajas concentraciones (i.p.) durante 30 días no se observan cambios significativos de la actividad de CAT (Agnihotri et al., 2015). Mientras que concentraciones mayores de Cd administradas durante 20 días se disminuye de manera significativa la actividad de CAT en hipocampo (Kanter et al., 2016). En cerebro, la cantidad de CAT es ~50 veces menor que en hígado y se encuentra principalmente en peroxisomas (Glorieux et al., 2015). Además, su mecanismo de reacción requiere de 2 moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo cual podría restringir su actividad cuando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se encuentra presente solo en concentraciones nanomolares (Kirkman & Gaetani, 2007). Además, existe otra enzima con la capacidad de detoxificar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la glutatión peroxidasa (GPx).

La GPx es una enzima de selenio que cataliza la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o lipoperóxidos con uso de 2 moléculas de GSH como agente reductor. En este estudio se observa que el Cd aumentó la actividad de GPx de manera tiempo-dependiente a partir del mes 3 (**Figura 13B**). Este aumento podría compensar la baja actividad de CAT en cerebro, ayudando a mantener los niveles de ROS sin cambios. Los resultados reportados en la bibliografía muestran resultados variables de acuerdo con el órgano. Treviño en 2015, utilizando el mismo modelo, reporta que la actividad de GPx en páncreas tiene un comportamiento dual, aumenta en los primeros meses de administración y disminuye desde el tercer mes (Treviño, 2015). Mientras que, después de 30 días de administración de bajas concentraciones de Cd en ratones, la actividad de GPx en cerebro no cambia (Agnihotri et al., 2015). Igual que otras enzimas en cerebro, el contenido y actividad de GPx son bajos, lo cual limitaría su acción frente a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (De Marchena et al., 1974). Además, estudios sobre la distribución celular de GPx en los diferentes tipos células muestran que microglía contiene GPx en mayor proporción comparado con el nivel reportado en neuronas y astrocitos (Power & Blumbergs, 2009). Esta distribución diferencial demuestra la dependencia de las neuronas en la capacidad

---

antioxidante de células de la glia y aumenta la susceptibilidad de las neuronas al daño oxidativo.

Adicionalmente a las enzimas antioxidantes, también se encuentra el péptido GSH que actúa como un “buffer redox” para mantener el potencial redox tiol/disulfuro (Sies, 1999). Los resultados obtenidos en este trabajo no muestran diferencias significativas en el contenido de GSH total en ninguno de los grupos administrados con Cd, ni en el contenido de GSSG (**Figura 14**). Esto se refleja en el índice GSH/GSSG, lo que nos indica que no hay alteraciones en el ambiente redox, pero es importante notar que existe la tendencia del GSSG a aumentar conforme al tiempo de exposición. En contraste con nuestros resultados, se ha reportado que en exposiciones crónicas a Cd el contenido total de GSH aumenta al igual que su especie oxidada (Ikediobi et al., 2004). Esto podría sugerir que, en nuestro modelo, las células en hipocampo (neuronas y glia) pueden amortiguar el estrés oxidante generado por Cd.

En cerebro, dado que la actividad de CAT es baja y confinada a los peroxisomas, el GSH y GPx juegan papeles predominantes en remover el exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La expresión de GPx y contenido de GSH es diferencial entre los tipos celulares presentes en cerebro: las neuronas contienen una menor concentración de GSH y GPx que los astrocitos y el pool de GSH es mayor en citosol que en mitocondria (J. Huang & Philbert, 1995). En este sentido se ha descrito que el Cd<sup>2+</sup> puede ingresar a mitocondria, aumentar la producción de ROS mediada por el complejo III de la CTE e inducir muerte celular (Y. Wang et al., 2004; Yuan et al., 2018). La entrada de Cd<sup>2+</sup> a mitocondria y aumento en los ROS y RNS aunado al bajo nivel de antioxidantes en este organelo podrían contribuir a la toxicidad de este metal en SNC y promover la neurodegeneración.

Los resultados no muestran cambios en el contenido total de glutatión ni en el índice GSH/GSSG después de la administración de Cd. Para mantener este microambiente reductor la glutatión reductasa (GR) cataliza la reacción de reducción de 1 mol de GSSG a 2 moles GSH por medio de la oxidación de NADPH y con uso de FAD. En nuestro estudio la actividad de la GR incrementó de manera significativa

-----  
a los 4 meses de administración (**Figura 15**). Lo cual podría explicar que no existan cambios en el contenido de GSH total ni incrementos significativos en la concentración de la especie oxidada. El aumento en la actividad en esta enzima también podría compensar la baja síntesis de GSH en cerebro.

Finalmente, el sistema de glutatión se cierra con la glutatión transferasa (GST). Esta enzima cataliza la conjugación del GSH con diferentes moléculas tóxicas para la célula. En este trabajo, la actividad de la GST en hipocampo aumentó en el tercer y cuarto mes de administración (**Figura 16**). GST puede detoxificar productos de la LPO, lo que concuerda con los resultados de LPO en este estudio; el aumento de la actividad de GST a los 3 meses impide que exista un aumento en MDA y 4-HDA, mientras que al cuarto mes, su actividad se ve sobrepasada y aumenta la LPO. En hígado se ha reportado que el Cd disminuye la actividad de la GST en ratas administradas con Cd durante 4 semanas (Renugadevi & Milton Prabu, 2010). Mientras que en administraciones agudas su actividad aumenta (Bai et al., 2014). En cerebro se ha reportado una disminución en la actividad de esta enzima después de 4 semanas de administración de Cd (Shagirtha et al., 2011). Nuestros resultados indican que el hipocampo tiene la capacidad de regular hasta cierto punto el daño oxidante que puede generar el Cd, mediado por el circuito de glutatión. Sin embargo, conforme aumenta el tiempo de exposición a este metal, el daño oxidante se hace presente.

Además de la importancia del GSH en la defensa antioxidante en SNC, una de las proteínas centrales en protección del daño generado por Cd son las MTs. Las MTs participan en la homeostasis del Zn y Cu al regular su concentración citoplasmática. Estas proteínas contienen dos clústeres tiolato que permiten la unión simultánea de 4  $\text{Cu}^{1+}$  y de 3-4  $\text{Zn}^{2+}$ . El  $\text{Cd}^{2+}$  puede desplazar al  $\text{Zn}^{2+}$  en las MTs formando el complejo Cd-MT que tiene una constante de estabilidad mayor que el complejo Zn-MT. Se ha descrito que en órganos periféricos el Cd genera un incremento en la expresión y síntesis de MT-I y MT-II. Esta inducción es mediada por la señalización del Zn liberado (Sabolić et al., 2010). Nuestros resultados muestran un aumento paulatino de MT-III en CA1, CA3 y Gd desde el mes 3 (**Figura**

---

**18).** MT-III se encuentra principalmente en cerebro y su expresión es mayor en Gd hipocampal, amígdala y corteza piriforme (Dziegiel et al., 2016). Aunado a su función en la homeostasis de Zn y Cu, MT-III regula la función de Zn como neuromodulador (Tóth, 2011). Además, MT-III contiene una secuencia de 6 aminoácidos en su extremo C-terminal lo que le otorga la función de inhibidor del crecimiento neuronal (GIF) (Vašák & Meloni, 2017).

Nuestros resultados muestran un aumento en MT-III en el mes 3 y 4 de administración con Cd, con lo que se incrementaría la formación del complejo Cd-MT como mecanismo de protección contra este metal. Se ha descrito que MT-III se expresa mayoritariamente en neuronas con alto contenido en Zn como las glutamatérgicas presentes en hipocampo (Masters et al., 2018). El Zn se almacena en vesículas presinápticas y se libera junto con los neurotransmisores para actuar como neuromodulador en el espacio sináptico. Se ha descrito que la desregulación en el Zn y Cu libres se asocia a la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer y Parkinson (Zatta, 2008). A diferencia de MT-I y MT-II, la expresión de MT-III no se induce por Cd u otros activadores clásicos de la isoforma I y II (Vašák & Meloni, 2017). Con lo que el aumento en MT-III que observamos podría relacionarse más con una desregulación del Zn en neuronas glutamatérgicas que con la formación del complejo Cd-MT. Aún se desconoce la regulación de la expresión y síntesis de MT-3, pero se ha descrito un aumento en su expresión con estrés oxidante en procesos de hipoxia (Tsui et al., 2019).

De manera interesante MT-III funciona también como factor inhibidor del crecimiento. Reportes indican que, en procesos de daño e inflamación, MT-III aumenta para inhibir el crecimiento neuronal con la finalidad de permitir la reparación del área dañada (Howells et al., 2010). En un trabajo anterior reportamos una disminución en la arborización dendrítica y número de espinas dendríticas en neuronas de CA1, CA3 y Gd después de la administración de Cd (Pulido et al., 2019). El aumento en MT-III podría estar implicado en la atrofia neuronal observada.

Además del aumento en MTs como factor protector contra el Cd, se ha reportado que las células incrementan la expresión de proteínas antioxidantes. Uno

de los reguladores centrales en la expresión de muchas proteínas antioxidantes es Nrf2 (Wu et al. 2016). Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) es un factor de transcripción tipo zipper de leucina. De manera normal, la proteína Keap1 regula la función de Nrf2 por la vía del proteasoma (Suzuki & Yamamoto, 2015). Cuando Nrf2 se activa, se transloca a núcleo y se une a proteínas Maf pequeñas. El dímero Nrf2-Maf reconoce y se une al elemento de respuesta antioxidante (antioxidant response element, ARE) en la región promotora de sus genes blanco. Entre los genes regulados por Nrf2 se encuentran las subunidades catalíticas de varias clases de glutatión transferasa (GST) y la  $\gamma$ -glutamyl-cistein sintasa; enzima determinante en la formación de GSH (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014). En este estudio los resultados muestran un aumento en la Nrf2 en CA1, CA3 y Gd a partir del mes 3 y que se exacerba en el mes 4 de administración (**Figura 17**). Existen reportes que muestran que el Cd, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y productos de lipoperoxidación son activadores de Nrf2 vía oxidación de Keap1 (Saito et al., 2015). El aumento en la actividad de enzimas antioxidantes podría relacionarse también a un aumento en su expresión. La defensa antioxidante en neuronas es baja y coincide con una baja expresión de Nrf2 en estas células (Cobley et al., 2018). Se ha reportado que en los astrocitos la expresión basal de genes dependientes de Nrf2 se encuentra muy elevado (100-1000 veces) en comparación con las neuronas (Liddell, 2017). Esto indica que la defensa antioxidante de las neuronas depende, en gran parte, de los astrocitos u otras células de la glia. Aunado al aumento en Nrf2, también se observa un aumento en la inmunorreactividad para GFAP (**Figura 17A**), la cual es una proteína del tipo filamento intermedio de citoesqueleto que durante la activación de los astrocitos se exacerba (Aguilar-Montilla, 2017).

Los astrocitos son células gliales encargadas de la regulación del microambiente cerebral y llevan a cabo funciones en la neurotransmisión, en el metabolismo neuronal y pueden liberar gliotransmisores. Además, participan activamente en las sinapsis (sinapsis tripartita) y regulan la potenciación a largo plazo (LTP) (Aguilar-Montilla, 2017). La activación de los astrocitos se asocia con procesos inflamatorios iniciados por células de la microglía. La microglía lleva a cabo funciones de macrófago en el SNC y está involucrada en la regulación de la

---

actividad de la red neuronal en hipocampo adulto; controla la integración de nuevas neuronas y la eliminación de neuronas apoptóticas. Estas funciones influyen en la plasticidad sináptica; mecanismo base de la memoria y por tanto ampliamente estudiado en hipocampo (Ghasemi et al., 2019; Liddell, 2017). El estrés oxidante puede activar células de microglía y astrogliá lo que implica la liberación de citocinas, quimiocinas y moléculas pro y antiinflamatorias. La sobreactivación de los astrocitos se conoce como astroliosis y se relaciona con estados pro-inflamatorios. Un estado pro-inflamatorio crónico produce un detrimento en la memoria, asociado a la producción exacerbada de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Sofroniew & Vinters, 2010).

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y ROS activan la vía NF- $\kappa$ B en astrocitos (Lattke, 2018). Dependiendo de la señal y tiempo del estímulo, la activación de la vía NF- $\kappa$ B induce la expresión de moléculas pro y antioxidantes y favorece estados pro y antiinflamatorios. Además, la regulación de su activación también está dada por otras vías de señalización. La vía NF- $\kappa$ B puede activar a la vía Nrf2-Keap, y esta a su vez, regula negativamente a NF- $\kappa$ B. Sin embargo, la activación de la astrogliá en procesos crónicos aumenta la expresión de moléculas pro-oxidantes como NOX2, xantina oxidoreductasa, iNOS, COX2, entre otras (Morgan & Liu, 2011). Por lo que el aumento que observamos en iNOS podría estar regulado también por la activación de los astrocitos y regulado por Nrf2. En estudios con ratones KO Nrf2<sup>-/-</sup> se aumenta la expresión de COX1 e iNOS, comparados con ratones WT (Chanas et al., 2002). Por lo que el incremento en Nrf2 protege a las células del NO al regular de manera negativa a la iNOS.

El estrés oxidante generalmente trae como consecuencia el daño y muerte celular. En este estudio, la tinción de yoduro de propidio y caspasa-3 muestra que el Cd produce aumento en la muerte celular desde el tercer mes y que este proceso se exagera a los 4 meses en las 3 áreas hipocampales. Los resultados concuerdan con la activación de los astrocitos y el desarrollo del estrés oxidante. Además de la muerte celular inducida por el estrés oxidante en neuronas se ha descrito que alteraciones en el metabolismo del Ca<sup>2+</sup> promueve la muerte celular. En cultivos de neuronas se ha reportado que Cd induce muerte celular por apoptosis a bajas

concentraciones; además de generar muerte por necrosis a altas concentraciones (López et al., 2003). Se ha reportado que la activación de las vías MAPK y mTOR median la muerte celular por apoptosis inducida por Cd y que la activación de estas vías se debe a la desregulación en el  $\text{Ca}^{2+}$  (Chen, Liu, & Huang, 2008; Xu et al., 2011). Se ha descrito que el Cd puede inducir estrés en el retículo endoplásmico lo que incrementa de  $\text{Ca}^{2+}$  en citosol y promueve la señalización de apoptosis (J. Chen et al., 2017; Orrenius et al., 2003). Por lo que la neurodegeneración observada puede ser multifactorial y no solo depender del estrés oxidante generado por Cd, sino también por alteraciones en  $\text{Ca}^{2+}$ , que además se han relacionado con enfermedades neurodegenerativas.

Nuestros resultados muestran que el Cd administrado por vía oral puede acumularse en hipocampo de animales adultos y que la entrada no depende del daño a proteínas de la BHE para facilitar su entrada. Una vez en hipocampo el Cd induce estrés nitrosante e incrementa la LPO conforme aumenta el tiempo de exposición. Al mismo tiempo, las defensas antioxidantes que dependen de glutatión aumentan e inhiben el daño oxidativo hasta cierto punto. Aunado a esto, se aumenta MT-III y Nrf2, lo que contribuye a la defensa antioxidante del sistema. Sin embargo, conforme aumenta el tiempo de exposición a Cd también aumenta la reactividad de astrocitos y posiblemente la inflamación. A pesar de la regulación positiva de los sistemas antioxidantes, conforme aumenta el tiempo de exposición, también aumenta la neurodegeneración en todas las áreas hipocampales estudiadas. Lo que finalmente podría contribuir con los déficits en la memoria reportados anteriormente.

## 10. Conclusiones

- El Cd administrado por vía oral se acumula en hipocampo de ratas adultas desde el 3 mes de administración
- El Cd no afecta la integridad de las uniones estrechas de la barrera hematoencefálica.
- Conforme se acumula el Cd en hipocampo aumentan los marcadores de daño oxidativo y de estrés nitrosante. Consecuentemente aumenta la actividad de los sistemas antioxidantes que se ven superados en el cuarto mes de exposición.
- El Cd genera neurodegeneración en CA1, CA3 y Gd de hipocampo de rata después de 3 y 4 meses de administración.

---

## 11. Bibliografía

Agnihotri, S. K., Agrawal, U., & Ghosh, I. (2015). Brain most susceptible to cadmium induced oxidative stress in mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 30, 184–193.

Aguilar-Montilla, F. J. (2017). *Implicación de las células gliales de microglía y astrogliá en los procesos de aprendizaje y memoria de reconocimiento de objetos* (p. 157). p. 157.

Akinyemi, A. J., Okonkwo, P. K., Faboya, O. A., Onikanni, S. A., Fadaka, A., Olayide, I., ... Oboh, G. (2017). Curcumin improves episodic memory in cadmium induced memory impairment through inhibition of acetylcholinesterase and adenosine deaminase activities in a rat model. *Metabolic Brain Disease*, 32(1), 87–95.

Almazan, G., Liu, H.-N., Khorchid, A., Sundararajan, S., Martinez-Bermudez, A., & Chemtob, S. (2000). Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(9), 858–869.

Ansari, M. A., Raish, M., Ahmad, A., Alkharfy, K. M., Ahmad, S. F., Attia, S. M., ... Bakheet, S. A. (2017). Sinapic acid ameliorate cadmium-induced nephrotoxicity: In vivo possible involvement of oxidative stress, apoptosis, and inflammation via NF- $\kappa$ B downregulation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*.

Arvidson, B., & Tjälve, H. (1986). Distribution of  $^{109}\text{Cd}$  in the nervous system of rats after intravenous injection. *Acta Neuropathologica*, 69(1–2), 111–116.

ATSDR. (2012). Toxicological Profile for Cadmium. *ATSDR's Toxicological Profiles*. [https://doi.org/10.1201/9781420061888\\_ch48](https://doi.org/10.1201/9781420061888_ch48)

Aulak, K. S., Miyagi, M., Yan, L., West, K. A., Massillon, D., Crabb, J. W., & Stuehr, D. J. (2001). Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge. *PNAS*, 98(21), 12056–12061.

Bai, M. M., Bhanu, S. K. H., & Thyagaraju, P. K. (2014). Determination of cadmium and zinc levels and oxidative status in cadmium treated developing chick embryonic liver. *IOSR Journal of Pharmacy*, 4(5), 4–13.

Bartesaghi, S., Peluffo, G., Valez, V., Zhang, H., Kalyanaraman, B., & Radi, R. (2007). Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. *Amino Acids*, 32,

501–515.

Beckhauser, T. F., Francis-oliveira, J., & Pasquale, R. De. (2016). Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity. *Journal of Experimental Neuroscience*, 10(s1), 23–48.

Benarroch, E. E. (2011). Nitric oxide: A pleiotropic signal in the nervous system. *Neurology*, 77(16), 1568–1576.

Brako, E. E., Wilson, A. K., Jonah, M. M., Blum, C. A., Cerny, E. A., Williams, K. L., & Bhattacharyya, M. H. (2003). Cadmium pathways during gestation and lactation in control versus metallothionein 1,2-knockout mice. *Toxicological Sciences*, 71(2), 154–163.

Branca, J. J. V., Maresca, M., Morucci, G., Mannelli, L. D. C., Ghelardini, C., Gulisano, M., & Pacini, A. (2016). Cadmium-induced neurotoxicity: impairment of the blood brain barrier. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 121(1).

Calabrese, V., Mancuso, C., De marco, C., Giuffrida, A. M., & Butterfield, A. (2004). Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: The role of vitagenes. In G. A. Qureshi & H. S. Parvez (Eds.), *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders* (Vol. 18, pp. 245–268).

Casalino, E., Sblano, C., & Landriscina, C. (1997). Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: The possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 346(2), 171–179.

Chanas, S. A., Jiang, Q., McMahon, M., McWalter, G. K., McLellan, L. I., R., E. C., ... Hayes, J. D. (2002). Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochemical Journal*, 365(2), 405–416

Chen, C., Zhang, S., Liu, Z., Tian, Y., & Sun, Q. (2015). Cadmium toxicity induces ER stress and apoptosis via impairing energy homeostasis in cardiomyocytes. *Bioscience Reports*, 35, 1–8.

Chen, J., Pan, T., Wan, N., Sun, Z., Zhang, Z., & Li, S. (2017). Cadmium-induced endoplasmic reticulum stress in chicken neutrophils is alleviated by selenium. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 170, 169–177.

Chen, L., Liu, L., & Huang, S. (2008). Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(7), 1035–1044.

Cobley, J. N., Fiorello, M. L., & Bailey, D. M. (2018). 13 Reasons Why the Brain Is Susceptible To Oxidative Stress. *Redox Biology*, 15(January), 490–503.

Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2014). Peroxynitrite ( ONOO<sup>-</sup> ) is endogenously produced in arabidopsis peroxisomes and is overproduced under cadmium stress. *Annals of Botany*, 113, 87–96.

Cuyppers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., ... Smeets, K. (2010). Cadmium stress: an oxidative challenge. *BioMetals*, 23(5), 927–940.

De Marchena, O., Guarnieri, M., & Mckhann, G. (1974). Glutathione peroxidase level in brain. *Journal of Neurochemistry*, 22(December), 773–776.

Díaz, A., Jesús, L. De, Mendieta, L., Calvillo, M., Espinosa, B., Zenteno, E., ... Daniel, L. (2010). The amyloid- B 25 – 35 injection into the CA1 region of the neonatal rat hippocampus impairs the long-term memory because of an increase of nitric oxide. *Neuroscience Letters*, 468, 151–155.

Dickinson, B. C., Peltier, J., Stone, D., Schaffer, D. V., & Chang, C. J. (2010). Nox2 redox signaling maintains essential cell populations in the brain. *Nature Chemical Biology*, 7(february), 1–7.

Dorta, D. J., Leite, S., Mingatto, E., Uyemura, A., Santos, A. C., & Curti, C. (2003). A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97, 251–257.

Dudley, R. E., Gammal, L. M., & Klaassen, D. (1985). Cadmium-Induced Hepatic and Renal Injury in Chronically Exposed Rats : Likely Role of Hepatic Cadmium-Metallothionein in Nephrotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 77, 414–426.

Dziegiel, P., Pula, B., Kobierzycki, C., Stasiolek, M., & Podhorska-Okolow, M. (2016). Metallothioneins: Structure and Functions. In P. Dziegiel (Ed.), *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* (Vol. 218, pp. 1–117).

Džoljić, E., Grabatinić, I., & Kostić, V. (2015). Why is nitric oxide important for our brain? *Functional Neurology*, 30(3), 159–163.

---

El-Maraghy, S. A., Gad, M. Z., Fahim, A. T., & Hamdy, M. A. (2001). Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 15(4), 207–214.

El-sokkary, G. H., Nafady, A. A., & Shabash, E. H. (2010). Melatonin administration ameliorates cadmium-induced oxidative stress and morphological changes in the liver of rat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(3), 456–463.

Evans, J., & Hastings, L. (1992). Accumulation of Cd(II) in the CNS depending on the route of administration: Intraperitoneal, intratracheal, or intranasal. *Toxicological Sciences*, 19(2), 275–278.

Ferguson, C. J., Wareing, M., Ward, D. T., Green, R., Smith, C. P., Riccardi, D., ... Nature, H. M. A. (2001). Cellular localization of divalent metal transporter DMT-1 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280, 803–814.

Frías-Espericueta, M. G., Osuna-López, G., Izaguirre-Fierro, G., Aguilar-Júarez, M., & Voltolina, D. (2010). Cadmio y plomo en organismos de importancia comercial de la zona costera de Sinaloa , México : 20 años de estudios. *CICIMAR Océánides*, 2(25), 27–39.

García-Pérez, P. E., & Cruz-Azcona, M. I. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 17(3), 199–205.

Ghasemi, F., Bagheri, H., Barreto, G. E., Read, M. I., & Sahebkar, A. (2019). Effects of Curcumin on Microglial Cells. *Neurotoxicity Research*.

Girijashanker, K., He, L., Soleimani, M., Reed, J. M., Li, H., Liu, Z., ... Nebert, D. W. (2008). Slc39a14 Gene Encodes ZIP14 , A Metal / Bicarbonate Symporter : Similarities to the ZIP8 Transporter. *Mol Pharmacol*, 73, 1413–1423.

Glorieux, C., Zamocky, M., Marcelo, J., Verrax, J., & Buc, P. (2015). Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 87, 84–97.

Goering, P. L., & Klaassen, C. D. (1983). Altered subcellular distribution of cadmium following cadmium pretreatment: Possible mechanism of tolerance to cadmium-induced lethality. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 70(2), 195–203.

Gonçalves, J. F., Pereira, J. S. F., Farias, J. G., Dias, G. R. M., Morsch, V. M., da Rosa, M. M., ... Carvalho, F. B. (2012). Behavior and brain enzymatic changes after long-term intoxication with cadmium salt or contaminated potatoes. *Food and Chemical Toxicology*,

50(10), 3709–3718.

Gupta, A., Gupta, A., & Chandra, S. V. (1991). Gestational Cadmium Exposure Development: a Biochemical and Brain Study Experimental studies have shown that maternal cadmium ( Cd ) retention from oral exposure during gestation is double that seen in nonpregnant mice , a small fraction of absorbed Cd i. *Industrial Health*, 29(80), 65–71.

Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1634–1658.

Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1147–1150.

Halliwell, B. (2012). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 120(5), 850.

Hart, B. A., Potts, R. J., & Watkin, R. D. (2001). Cadmium adaptation in the lung - A double-edged sword? *Toxicology*, 160(1–3), 65–70. h

Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 199–218.

Howells, C., West, A. K., & Chung, R. S. (2010). Neuronal growth-inhibitory factor (metallothionein-3): Evaluation of the biological function of growth-inhibitory factor in the injured and neurodegenerative brain. *FEBS Journal*, 277(14), 2931–2939.

Huang, J., & Philbert, M. A. (1995). Distribution of glutathione and glutathione-related enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells. *Brain Research*, 680(1–2), 16–22.

Huang, Y., Shih, C., Huang, C., Lin, C., Chou, C., Tsai, M., ... Chen, C. (2006). Effects of Cadmium on Structure and Enzymatic Activity of Cu , Zn-SOD and Oxidative Status in Neural Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98, 577–589.

IARC. (2011). Cadmium and cadmium compounds. *IARC Monographs*, 122–145.

Ikedobi, C. O., Badisa, V. L., Ayuk-takem, L. T., Wo, L. M. L., & West, J. (2004). Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 14, 87–92.

---

Irving, H., & Williams, R. J. P. (1953). The stability of transition-metal complexes. *Journal of Chemical Society*, 3192–3210.

Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68, 167–182.

Järup, L., Berglund, M., Elinder, C. G., Nordberg, G., & Vanter, M. (1998). Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian J Work, Environ Health*, 24(1), 1–51.

Jia, W., Lu, R., Martin, T. A., & Jiang, W. G. (2014). The role of claudin-5 in blood-brain barrier (BBB) and brain metastases (Review). *Molecular Medicine Reports*, 9(3), 779–785.

Jiang, H., Wang, J., Rogers, J., & Xie, J. (2017). Brain Iron Metabolism Dysfunction in Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, 54(4), 3078–3101.

Jiang, Yao, T., Zhu, Z., Wang, C., & Ji, L. (2007). Impacts of Cd ( II ) on the conformation and self-aggregation of Alzheimer ' s tau fragment corresponding to the third repeat of microtubule-binding domain. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1774, 1414–1421.

Jonah, M. M., & Bhattacharyya, M. H. (1989). Early changes in the tissue distribution of cadmium after oral but not intravenous cadmium exposure. *Toxicology*, 58(3), 325–338.

Jurczuk, M., Brzo, M. M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Galazyn-Sidorczuk, M., & Kulikowska-Karpinska, E. (2004). Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 429–438.

Kanter, M., Unsal, C., Aktas, C., & Erboğa, M. (2016). Neuroprotective effect of quercetin against oxidative damage and neuronal apoptosis caused by cadmium in hippocampus. *Toxicology and Industrial Health*, 32(3), 541–550.

Karri, V., Schuhmacher, M., & Kumar, V. (2016). Heavy metals (Pb, Cd, As and MeHg) as risk factors for cognitive dysfunction: A general review of metal mixture mechanism in brain. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 203–213.

Ke, Y., Yu, K., Zeng, W., & Lian, G. (2019). Protective roles of *Pyracantha fortuneana* extract on acute renal toxicity induced by cadmium chloride. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 34(7).

Keaney, J., & Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *FEBS Journal*,

282(21), 4067–4079.

Kensler, T. W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. (2007). Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 89–116.

Kerkhove, E. Van, Swennen, Q., & Pennemans, V. (2010). Cadmium and transport of ions and substances across cell membranes and epithelia. *BioMetals*, 23, 823–855.

Kirkman, H. N., & Gaetani, G. F. (2007). Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 44–50.

Lattke, M. and W. T. (2018). Signaling pathways regulating the pathophysiological responses of astrocytes: A focus on the IKK/NF- $\kappa$ B system. In *Astrocyte: Physiology and Pathology* (p. 25).

Liddell, J. (2017). Are Astrocytes the Predominant Cell Type for Activation of Nrf2 in Aging and Neurodegeneration? *Antioxidants*, 6(3), 65.

Liu, J., Qu, W., & Kadiiska, M. B. (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 209–214.

López, E., Figueroa, S., Oset-Gasque, M. J., & González, M. P. (2003). Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. *British Journal of Pharmacology*, 138(5), 901–911.

Luiking, Y. C., Engelen, M. P. K. J., & Deutz, N. E. P. (2010). Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 13(1), 97–104.

MacMillan-Crow, L. A., Crowt, J. P., Kerby, J. D., & Beckman, J. S. (1996). Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(October), 11853–11858.

Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2015). A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. *Neuron*, 86(4), 883–901.

Maret, W. (2006). Zinc coordination environment in proteins as redox sensors and signal transducers. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9), 1419–1441.

Marlowe, M., Cossairt, A., Moon, C., Errera, J., Macneel, A., Peak, R., ... Schroeder, C.

---

(1985). Main and Interaction Effects of Metallic Toxins on Classroom Behavior. *Journal of Abnormal Child Psychology*, 13(2), 185–198.

Martelli, A., Rousselet, E., Dycke, C., Bouron, A., & Moulis, J. M. (2006). Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie*, 88(11), 1807–1814.

Massaad, C. A., & Klann, E. (2010). Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(10), 2013–2054.

Masters, B. A., Kelly, E. J., Quaife, C. J., Brinster, R. L., & Palmiter, R. D. (1994). Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(2), 584–588.

Masters, B. A., Quaife, C. J., Erickson, J. C., Kelly, E. J., Froelick, G. J., Zambrowicz, B. P., ... Palmiter, R. D. (2018). Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *The Journal of Neuroscience*, 14(10), 5844–5857.

Méndez-Armenta, M., Barroso-Moguel, R., Villeda-Hernández, J., Nava-Ruiz, C., & Ríos, C. (2001). Histopathological alterations in the brain regions of rats after perinatal combined treatment with cadmium and dexamethasone. *Toxicology*, 161(3), 189–199.

Miller, W. J., Blackmon, D. M., Gentry, R. P., & Pate, F. M. (1969). Effect of Dietary Cadmium on Tissue Distribution of <sup>109</sup>Cadmium Following a Single Oral Dose in Young Goats. *Journal of Dairy Science*, 52(12), 2029–2035.

Moncada, S., & Higgs, A. (1993). The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *The New England Journal of Medicine*, 329(27), 2002–2012.

Montes, S., Méndez-Armenta, M., Nava-Ruiz, C., Heras-Romero, Y., Juárez-Rebollar, D., Ríos, C., ... Montes, S. (2015). Immunohistochemical Study of Nrf2-Antioxidant Response Element as Indicator of Oxidative Stress Induced by Cadmium in Developing Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015,

Morgan, M. J., & Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Research*, 21(1), 103–115.

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13.

Nishimura, N., Nishimura, H., Ghaffar, A., & Tohyama, C. (1992). Localization of

---

metallothionein in the brain of rat and mouse. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 40(2), 309–315.

Nordberg, G. F., Piscator, M., & Lind, B. (1971). Distribution of Cadmium Among Protein Fractions of Mouse Liver. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 29(5–6), 456–470.

Ohtani-Kaneko, R., Watanabe, C., Yoshida, M., Yokosuka, M., Tazawa, H., & Satoh, M. (2008). Suppressive effects of cadmium on neurons and affected proteins in cultured developing cortical cells. *Toxicology*, 253(1–3), 110–116.

Okuda, B., Iwamoto, Y., Tachibana, H., & Sugita, M. (1997). Parkinsonism after acute cadmium poisoning. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 99(4), 263–265.

Olszowski, T., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Piotrowska, K., Mierzejewska, K., Korbecki, J., ... Chlubek, D. (2015). The effects of cadmium at low environmental concentrations on THP-1 macrophage apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 21410–21427.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003). Regulation of Cell Death: the Calcium-Apoptosis Link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(July), 552–565.

Pérez-Neri, I. (2015). Casi todo sobre el óxido nítrico. *Arch Neurocién Mex*, 20(4), 271–280.

Polykretis, P., Cencetti, F., Donati, C., Luchinat, E., & Banci, L. (2019). Cadmium effects on superoxide dismutase 1 in human cells revealed by NMR. *Redox Biology*, 21(January).

Power, J. H. T., & Blumbergs, P. C. (2009). Cellular glutathione peroxidase in human brain : cellular distribution , and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson ' s disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathologica*, 117, 63–73.

Pulido, G., Treviño, S., Brambila, E., Vazquez-Roque, R., Moreno-Rodriguez, A., Peña Rosas, U., ... Diaz, A. (2019). The Administration of Cadmium for 2, 3 and 4 Months Causes a Loss of Recognition Memory, Promotes Neuronal Hypotrophy and Apoptosis in the Hippocampus of Rats. *Neurochemical Research*, 44(2), 485–497.

Rabbani, N., & Thornalley, P. J. (2008). Dicarbonyls linked to damage in the powerhouse : glycation of mitochondrial proteins and oxidative stress. *Biochemical Society Transaction*, 36(5), 1045–1050.

Radi, R. (2013). Protein tyrosine nitration: Biochemical mechanisms and structural basis of

functional effects. *Accounts of Chemical Research*, 46(2), 550–559.

Ren, Y., Shao, W., Zuo, L., Zhao, W. E. I., & Qin, H. (2019). Mechanism of cadmium poisoning on testicular injury in mice. *Oncology Letters*, 18, 1035–1042.

Renugadevi, J., & Milton Prabu, S. (2010). Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective effect of naringenin. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(2), 171–181.

Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Díaz, M., & González, E. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en la salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, 16(2), 66–77.

Rockwell, P., Martinez, J., Papa, L., & Gomes, E. (2004). Redox regulates COX-2 upregulation and cell death in the neuronal response to cadmium. *Cellular Signalling*, 16(3), 343–353.

Sabolić, I., Breljak, D., Škarica, M., & Herak-Kramberger, C. M. (2010). Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *BioMetals*, 23(5), 897–926.

Saito, R., Suzuki, T., Hiramoto, K., Asami, S., Naganuma, E., Suda, H., ... Yamamoto, M. (2015). Characterizations of Three Major Cysteine Sensors of Keap1 in Stress Response. *Molecular and Cellular Biology*, 36(2), MCB.00868-15.

Salim, S. (2016). Oxidative Stress and the Central Nervous System. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 360(1), 201–205.

Satarug, S., Baker, J. R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P. E. B., Williams, D. J., & Moore, M. R. (2003). A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology Letters*, 137(1–2), 65–83.

Schmitt, G., Parrott, N., Prinssen, E., & Barrow, P. (2017). The great barrier belief: The blood–brain barrier and considerations for juvenile toxicity studies. *Reproductive Toxicology*, 72, 129–135.

Serlin, Y., Shelef, I., Knyazer, B., & Friedman, A. (2015). Anatomy and Physiology of the Blood-Brain Barrier. *Semin Cell Dev Biol*, 38(2–6), 1–11.

Shagirtha, K., Muthumani, M., & Prabu, S. M. (2011). Melatonin abrogates cadmium induced oxidative stress related neurotoxicity in rats. *European Review for Medical and*

*Pharmacological Sciences*, 15, 1039–1050.

Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9–10), 916–921.

Sigel, A., Sigel, H., & Sigel, R. K. O. (2013). *Cadmium : From Toxicity to Essentiality* (11th ed.; A. Sigel & H. Sigel, Eds.). Switzerland: Metal Ions in Life Sciences.

Skjørringe, T., Burkhart, A., Johnsen, K. B., & Moos, T. (2015). Divalent metal transporter 1 (DMT1) in the brain : implications for a role in iron transport at the blood-brain barrier , and neuronal and glial pathology. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8(June), 1–13.

Sofroniew, M. V, & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35.

Steinert, J., Chernova, T., & Forsythe, I. (2009). Nitric Oxide in Brain Function and Dysfunction. *Acnr*, 9(5), 10–12.

Sunderman, F. W. J. (2001). Review: Nasal toxicity, carcinogenicity, and olfactory uptake of metals. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 31(1), 3–24.

Suzuki, T., & Yamamoto, M. (2015). Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radical Biology and Medicine*, 88(Part B), 93–100.

Swiergosz-Kowalewska, R. (2001). Cadmium Distribution and Toxicity in Tissues of Small Rodents. *Microscopy Research and Technique*, 222(May), 208–222.

Taguchi, K., & Yamamoto, M. (2017). The KEAP1–NRF2 System in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 7(May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00085>

Tajes, M., Ramos-Fernández, E., Weng-Jiang, X., Bosch-Morató, M., Guivernau, B., Eraso-Pichot, A., ... Muñoz, F. J. (2014). The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Molecular Membrane Biology*, 31(5), 152–167.

Thatcher, R. W., Lester, M. L., Mcalaster, R., & Horst, R. (1982). Effects of low levels of cadmium and lead on cognitive functioning in children. *Archives of Environmental Health*, 37(3), 159–166.

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

---

Tobwala, S., Wang, H.-J., Warren-Carey, J., Banks, W. A., & Ercal, N. (2014). Effects of Lead and Cadmium on Brain Endothelial Cell Survival, Monolayer Permeability, and Crucial Oxidative Stress Markers in an in Vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *Toxics*, 2, 258–275.

Tóth, K. (2011). Zinc in Neurotransmission. *Annual Review of Nutrition*, 31(1), 139–153. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-072610-145218>

Tsui, K.-H., Hou, C.-P., Chang, K.-S., Lin, Y.-H., Feng, T.-H., Chen, C.-C., ... Juang, H.-H. (2019). Metallothionein 3 Is a Hypoxia-Upregulated Oncogene Enhancing Cell Invasion and Tumorigenesis in Human Bladder Carcinoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 980.

Unsal, C., Kanter, M., Aktas, C., & Erboğa, M. (2015). Role of quercetin in cadmium-induced oxidative stress, neuronal damage, and apoptosis in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 31(12), 1106–1115.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84.

Vargas-Marcos, F. (2005). La contaminación ambiental como factor determinante de la salud. *Rev. Esp. Salud Pública*, 79(2), 117–127.

Vašák, M., & Meloni, G. (2017). Mammalian metallothionein-3: New functional and structural insights. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6).

Viaene, M. K., Masschelein, R., Leenders, M., De Groof, L. J., Swerts, V. C., & Roels, H. A. (2016). Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium : a cross sectional epidemiological study. *Occupational and Environmental Medicine*, 57(1), 19–27.

Villanueva, S., & Botello, A. (1992). Metales pesados en la zona costera del Golfo de México y Caribe mexicano: una revisión. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 8(1), 47–61.

Wang, B., & Du, Y. (2013). Cadmium and Its Neurotoxic Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1–12.

Wang, J., Zhang, H., Zhang, T., Zhang, R., Liu, R., & Chen, Y. (2015). Molecular mechanism on cadmium-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 59–67.

Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S., & Rao, K. M. K. (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(11), 1434–1443.

Wu, G., & Liu, Z. (2016). Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) Mediates Neuroprotection in Traumatic Brain Injury at Least in Part by Inactivating Microglia. *Medical Science Monitor*, 22, 2161–2166.

Xu, B., Huang, S., Chen, L., Zhou, H., Chen, Z., Chen, S., ... Chen, W. (2011). Calcium Signaling Is Involved in Cadmium-Induced Neuronal Apoptosis via Induction of Reactive Oxygen Species and Activation of MAPK/mTOR Network. *PLoS ONE*, 6(4).

Yamano, T., Decicco, L. A., Rikans, L. E., & Pharmacol, T. A. (2000). Attenuation of Cadmium-Induced Liver Injury in Senescent Male Fischer 344 Rats : Role of Kupffer Cells and Inflammatory Cytokines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 162, 68–75.

Yokel, R. A. (2009). Manganese flux across the blood-brain barrier. *NeuroMolecular Medicine*, 11(4), 297–310.

Yuan, Y., Zhang, Y., Zhao, S., Chen, J., Yang, J., Wang, T., ... Liu, Z. (2018). Cadmium-induced apoptosis in neuronal cells is mediated by Fas/FasL-mediated mitochondrial apoptotic signaling pathway. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11.

Zalups, R. K., & Ahmad, S. (2003). Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 186(3), 163–188.

Zangger, K., Oz, G., Haslinger, E., Kunert, O., & Armitage, I. M. (2001). Nitric oxide selectively releases metals from the amino-terminal domain of metallothioneins: potential role at inflammatory sites. *The FASEB Journal*, 15(7), 1303–1305.

Zatta, P. (2008). *Metallothioneins in Biochemistry and Pathology* (P. Zatta, Ed.). London: World Scientific Publishing.

Zhang, Y., Shen, G., Yu, Y., & Zhu, H. (2009). The hormetic effect of cadmium on the activity of antioxidant enzymes in the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 157(11), 3064–3068.