

51281
12es.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCION TOXICA
QUE PRODUCE EL MERCURIO A NIVEL CELULAR
(IN VITRO)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

M. en C. LETICIA BUCIO ORTIZ



Directora de tesis: Dra Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz

MEXICO, D.F.

1998



263020

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi familia la razón de vivir: mi esposo *Daniel* y mis hijos *Axel* y *Daniel*.

A mis padres: *Salvador* y *Caridad*, que han estado a mi lado en los buenos y malos momentos.

A mis hermanos: *Alberto*, *Salvador*, *Margarita*, *Ulises*, *Aquiles* y *José de Jesús*.

A mis amigas y compañeras: *Conchita*, *Vero*, *Ely*, *Paty* y *Claudia*, por su gran ayuda y compañerismo.

Lo esencial sigue siendo invisible a los ojos,
sólo con el corazón se ve....

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Celular, del Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa. Bajo la dirección y asesoramiento de la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz.

AGRADECIMIENTOS

A mi Asesora, la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz por permitirme realizar este trabajo en el Laboratorio de Fisiología Celular el cual ella dirige y por el tiempo que ha dedicado para el crecimiento y desarrollo académico de mi persona.

A mis Tutores Académicos designados: el Dr. José Miguel Betancourt Rule y el Dr. Mario A. Altamirano Lozano, por las varias revisiones, correcciones y comentarios al presente trabajo, así como a los otros miembros del jurado: Dr. Alfonso Cárabez Trejo, Dr. Edmundo Chávez Cossio, Dra. Teresa I. Fortoul Van Der Goes y Dra. Patricia Rosas Saucedo.

Al Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP) por el apoyo económico otorgado (clave no. 500304), para complementar la realización del trabajo experimental y la difusión de algunos de los resultados del presente trabajo.

INDICE

CONTENIDO	pag.
ABSTRACT	i
RESUMEN	ii
INTRODUCCIÓN	1
Aspectos Históricos	1
Generalidades	2
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	12
METODOLOGÍA	13
Mantenimiento de la Línea Celular WRL-68	13
Viabilidad Celular	14
Determinación de la actividad de enzimas citosólicas y transmembranales, en células expuestas a un tratamiento agudo baja concentración, crónico y agudo alta concentración de HgCl ₂	15
Determinación del grado de lipoperoxidación	16
Determinación del contenido de glutatión	17
Determinación del contenido de metalotioneina	18
Captación de Hg por las células WRL-68, efecto de la concentración de Hg	19
Captación de Hg por las células WRL-68 expuestas a HgCl ₂ , efecto del tiempo de exposición	20
Determinación de Hg adherido a la membrana plasmática, interior celular y en diferentes fracciones subcelulares de la línea celular WRL-68	20
Determinación de ADN	23
Electroforesis de subfracciones celulares	24
Autorradiografía de la electroforesis	25
Tratamiento estadístico	25
RESULTADOS	26
Microscopias óptica y electrónica de células WRL-68 expuestas a HgCl ₂	28
Determinación de las actividades enzimáticas: LDH, ALAT y ASAT	36
Cuantificación del grado de lipoperoxidación	38
Contenido de Glutatión	39
Cuantificación del contenido de metalotioneina	43
Captación de Hg por las células WRL-68 expuestas a diferentes concentraciones de HgCl ₂	44
Captación de Hg por las células WRL-68 expuestas a HgCl ₂ a diferentes tiempos	46
Contenido de Hg en: membrana plasmática, interior celular y las diferentes subfracciones celulares	47
Electroforesis y autorradiografía de subfracciones celulares	49
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	66
PERSPECTIVAS	68
BIBLIOGRAFÍA	69

ABSTRACT

The toxic effects of mercury (Hg), as chloride salt were studied using an hepatic human fetal cell line (WRL-68 cells). From viability curve and the proliferative capacity of the cell in presence of the metal, three different treatments were chosen, (1) 0.5 μM of the metal chloride for 24 h (low high dose treatment), (2) 0.5 μM of the metal chloride for 7 days (chronic treatment) and (3) 5 μM of the metal chloride for 24 h (acute high dose treatment). WRL-68 Hg treated cells increased their proliferative capacity. The metal produced ultrastructural cell alterations in different degrees, mainly as mitochondrial and RER structural changes, depending of the treatment. Cytotoxicity was assessed measuring the release of lactate dehydrogenase from the cells. Acutely high dose-treated cells showed the highest value for this parameter. Cell damage was also measured by alanine aminotransferase (ALAT) and aspartate aminotransferase (ASAT) activities. Acute high dose caused the highest value of these enzymatic release. Chronic and acute high dose treatments lipid peroxidation values were significantly different to control cells. Metallothionein (MT) induction was not detected and glutathione (GSH) levels remained unchanged.

Concerning to Hg uptake, the accumulation of Hg in WRL-68 cells was biphasic and temperature dependent at high Hg concentrations. The initial rapid phase of accumulation occurred during the first minutes of incubation. It was followed by a sustained but slower accumulation during the 180 min period of the determination. Cell Hg accumulation had the same values at 4 y 37°C when cells were exposed to smaller HgCl₂ concentrations than 50 μM . With higher concentrations, cells accumulated 30% less Hg at 4°C. This process is non-energy dependent. Hg distribution was 47.7% in mitochondrial fraction, 37.5% in nuclear fraction, 8.1% in cytosol and 6.7% in microsomal fraction. The Hg was linked to one mitochondrial or nuclear protein with molecular weight 76 Kd. Cytosol content was low in order that Hg did not induce metallothionein in WRL-68 cell line. In conclusion, evidence described in this work indicate that Hg is a heavy metal that produced toxic effects at cellular level determined by some biochemical and morphological parameters. Hg accumulates in a rapid biphasic way and mitochondrial and nucleus fraction presented the highest accumulation in WRL-68 cells.

RESUMEN.

Uno de los metales pesados y contaminante que ha incrementado su concentración en el medio ambiente es el Mercurio (Hg). El conocimiento que se tiene de este metal se remonta hasta la antigüedad años A.C., en donde, tuvo diferentes usos por las distintas culturas existentes, desde colorante hasta agente terapéutico. Presenta un ciclo global en el ambiente, en donde pasa a través de la cadena trófica hasta llegar al hombre, ya que no es biodegradable. Se utiliza en gran número de actividades humanas, como son la fabricación de diversos objetos, en la minería, en la agricultura, en la medicina, etc.

Los órganos blanco de este metal son: el hígado, el riñón, el cerebro, el tracto gastrointestinal y el pulmón, causando daño que va desde el leve hasta el grave, incluso la muerte, dependiendo de la dosis, tiempo y tipo de compuesto del Hg, a la que se exponga el individuo. Se ha reportado que 5-10 nmoles de Hg /dl de sangre producen daño en el riñón y sistema nervioso central.

Aunque se han realizado estudios para determinar los efectos tóxicos del Hg, la diferencia en el protocolo experimental no ha permitido el establecer un mecanismo general del daño del Hg a nivel celular. El trabajar con modelos *in vitro*, facilita establecer dicho mecanismo. La línea celular WRL-68, de origen hepático fetal humano, ha sido caracterizada como un buen modelo para estudios de toxicología, lo que permitirá establecer cual es el efecto del Hg a nivel celular.

En el presente trabajo, se establecieron tratamientos agudos y crónico de exposición, en donde las células mantuvieron una viabilidad alta y una capacidad de adhesión al substrato en presencia del metal. Se encontró que bajo tratamientos agudos las enzimas lactato deshidrogenasa y alanin y aspartato amino transferasas eran liberadas al medio de cultivo. El grado de lipoperoxidación aumentaba en forma dependiendo de la concentración y tiempo de exposición. No se encontró cambio en el contenido de glutatión. La célula no indujo la síntesis de metalotioneina en ningún tratamiento. Se encontró que una cantidad del Hg se enlaza a los grupos -SH de las proteínas de la membrana plasmática y otra parte penetra al interior celular. Tanto en la membrana plasmática como en los sistemas membranales internos, genera la formación de radicales libres, los que a su vez, pueden desencadenar otros mecanismos de daño. La distribución intracelular del metal resulta en presencia de mayor porcentaje de Hg en núcleo y mitocondrias lo cual es un reflejo del daño generalizado en la organización de síntesis de diversas moléculas y la producción de energía. El Hg a bajas concentraciones penetra al interior celular por un sistema no dependiente de temperatura y sin requerimiento de energía.

El Hg produce daño a nivel celular por diversos mecanismos incluyendo la generación de radicales libres y la interacción con grupos tioles de diversas proteínas, lo cual explica la liberación de enzimas citosólicas y el daño generalizado de la célula. Sería interesante estudiar cual es el mecanismo protector de la célula hacia este metal, ya que no hubo cambios en el contenido de glutatión, ni este metal tiene capacidad de inducir metalotioneina en este tipo celular.

INTRODUCCIÓN

El mercurio (Hg) es un metal pesado que se encuentra como contaminante en el ambiente y el cual se ha clasificado como tóxico para los humanos (Christensen y col., 1991). Su nombre proviene del latín *Argentum vivum* (plata viva) y del griego *Hydragyros* (agua plateada) del cual se deriva su símbolo Hg (Herrstrom, 1995).

ASPECTOS HISTÓRICOS

El conocimiento y utilización del mercurio por los humanos se remonta siglos atrás, ya que era extraído de las minas en una forma conocida como "cinabar" (sulfuro de mercurio cristalino). En el año 2000 A. C., el cinabar fue usado en China para hacer tinta roja y decorar "los huesos del oráculo" con inscripciones que eran precursoras de los ideogramas chinos modernos. Los griegos y los romanos explotaban las minas de Almaden en España, ricas en Hg y más tardíamente los egipcios lo utilizaron como pigmento de color rojo (Goering y col., 1992; Herrstrom, 1995). En el año 400 A. C., la forma líquida fue nombrada por Aristóteles como "azogue".

La literatura refiere al uso terapéutico del Hg en el tratamiento de la sífilis en el primer trabajo escrito sobre este uso en el libro "De Morbo Gallico" en 1496, continuando su uso hasta 1920. También se emplearon algunos diuréticos mercuriales, para el tratamiento de algunas alteraciones cardíacas, sin embargo en la actualidad su uso ha sido reemplazado por fármacos más efectivos y seguros (Klaassen, 1990). El calomel medicamento que contenía Hg, fue utilizado como laxante del cual hay reportes de muertes debidas a su mal uso. También se han utilizado compuestos de mercurio sublimados u orgánicos como conservadores en productos farmacéuticos, sin embargo, la Organización

Mundial de la Salud (OMS) publicó en 1991, que ésta puede ser una fuente importante de exposición para algunas poblaciones (Herrstrom, 1995).

GENERALIDADES

En la actualidad estamos constantemente expuestos al Hg tanto en el aire, como en el agua, las drogas, las amalgamas dentales, los alimentos (principalmente peces), algunos cosméticos (cremas blanqueadoras) y las industrias (Herrstrom, 1995; Al-Saleh y Shinwari, 1997; Kenneth, 1997). El Hg se encuentra en el ambiente formando parte de un ciclo, movilizándose en todos los sistemas: terrestre, acuático y aéreo (Figs. 1 y 2). El incremento de este metal en el ambiente se debe a su liberación ya que se utiliza en la extracción de oro y plata (Boffetta, y col., 1993; Aks, y col., 1995; Aula, y col., 1995), en la elaboración y posteriormente en el desecho de diversos productos químicos, fármacos, fungicidas, insecticidas, pinturas, baterías (Plunkett, 1974; Anttila, 1990; VonBurg, 1995), cloruros, catalizadores, así como del desecho de aparatos eléctricos, termómetros, etc. (Cordier y col., 1991) (Fig. 3). Sin olvidar, que en el hombre una fuente importante es el consumo de alimentos marinos contaminados con este metal (Tian-yi y McNaught, 1992; Hojbjerg y col., 1992) o bien mediante la cadena alimenticia (Fig. 4).

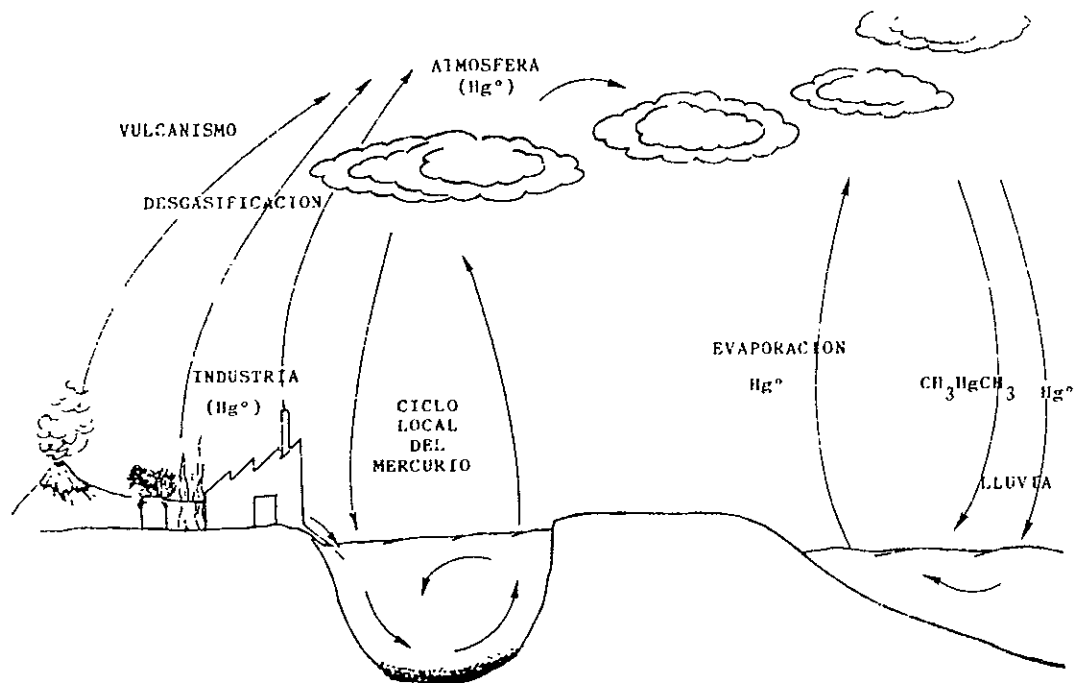


Figura 1.- CICLO GLOBAL DEL MERCURIO

Tomado de Galvao, L.A.C. y Corey, G., 1987.

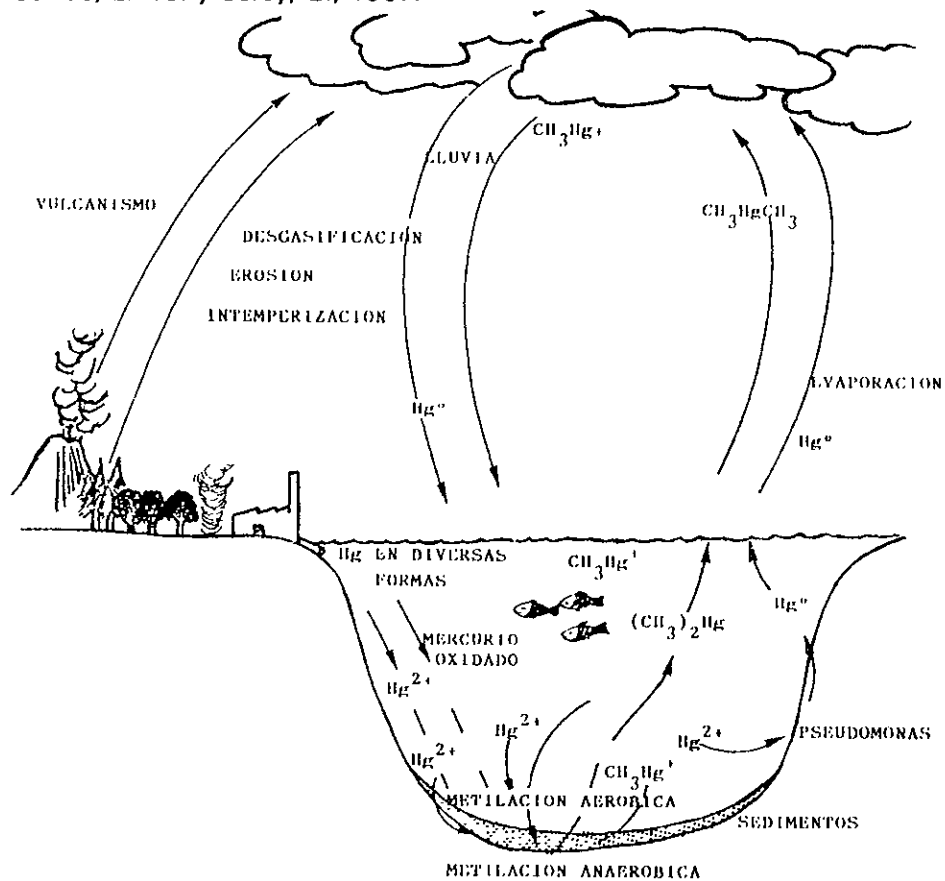


Figura 2.- CICLO LOCAL DEL MERCURIO Y DEL METILMERCURIO

Tomado de Galvao, L.A.C. y Corey, G. 1987.

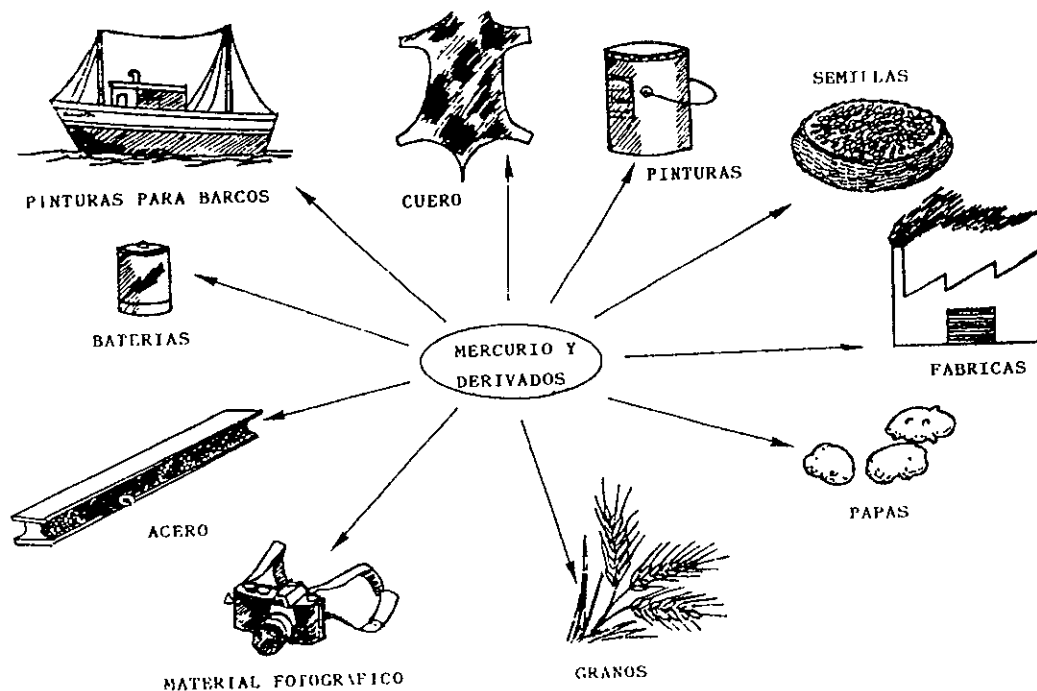


Figura 3.- DIFERENTES USOS DE COMPUESTOS DE MERCURIO
 Tomado de Galvao, L.A.C. y Corey, G., 1987.

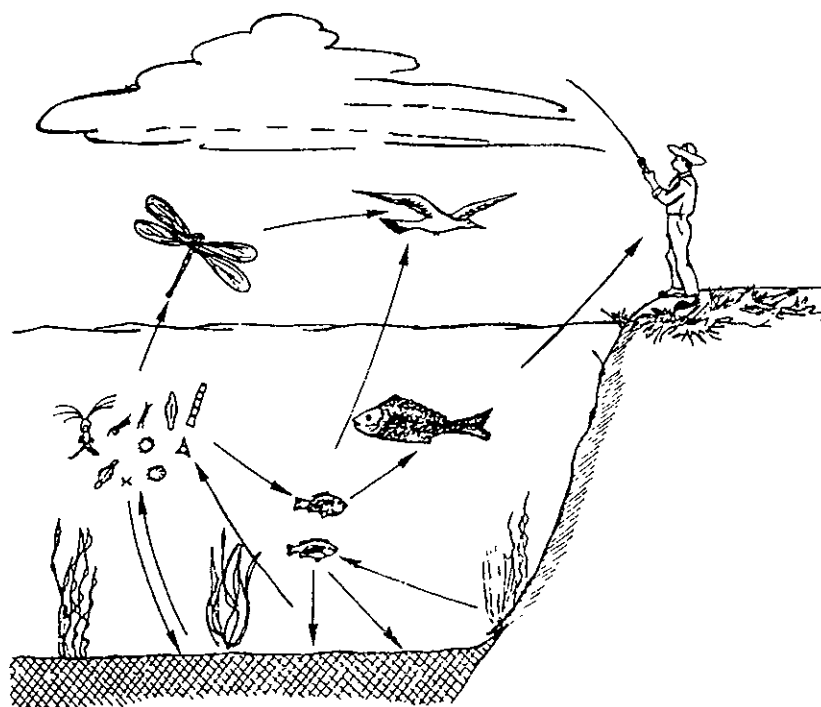


Figura 4.- BIOACUMULACION DE MERCURIO EN LA CADENA TROFICA.
 Tomado de Galvao, L.A.C. y Corey, G., 1987.

Herrstrom, publicó en 1995 datos de la OMS de 1991, en donde refiere algunos datos de cantidades de Hg utilizadas en el mundo (Tabla 1).

Tabla 1.- Producción y utilización de Hg en el mundo.

	Toneladas de Hg/año
Producción global para uso humano:	10 000 (20000)*
Cantidad emitida a la atmósfera:	3 000
Emisión natural de tierras y océanos	3 000 - 6 000
Cantidad utilizada en propósitos dentales	350

* por VonBurg, 1995.

VonBurg, (1995) refiere que los grupos mas expuestos son: los dentistas, los técnicos dentales, los trabajadores de plantas cloro-álcali y los técnicos histólogos debido al trabajo que desempeñan, en donde es muy importante el manejo del Hg.

Otro factor que contribuye a la contaminación con este metal en los humanos, es la utilización de pinturas en algunos juguetes infantiles, en cremas blanqueadoras y en pinturas que son utilizadas en cosméticos (Rastogi, 1992; Al-Saleh, 1997).

En los últimos 5 años han surgido una serie de estudios para examinar la contribución y efecto tóxico del Hg liberado por las amalgamas (Cordier y col., 1991; Fung y Molvar, 1992; Goerin y col., 1992). Lorscheider y col. (1995), refieren que en un estudio realizado en 1992, las amalgamas presentaron 50% del Hg metálico y en menor proporción otros metales como: plata, estaño, cobre y zinc. La cantidad de Hg utilizado por los dentistas ha disminuido en las últimas décadas, aunque en países como en USA el 92% de los odontólogos sigue prefiriendo el Hg para las amalgamas.

Se ha mostrado que una amalgama de aproximadamente 0.4 cm^2 puede liberar en la boca alrededor de $15 \text{ } \mu\text{g}$ de Hg/día por el desgaste mecánico, evaporación y disolución en la saliva; 8 amalgamas liberarían alrededor de $120 \text{ } \mu\text{g}$ /día de los cuales una porción puede ser inhalada o tragada. Algunos laboratorios describen que la captación de Hg derivado de amalgamas fluctúa entre 1.2 y $27 \text{ } \mu\text{g}$ /día (VonBurg, en 1995 mostró valores de 2.9 - $17.5 \text{ } \mu\text{g}$ /día), incluso cantidades extremas hasta de $100 \text{ } \mu\text{g}$ /día. También se ha encontrado que un 65% del Hg excretado por la orina es derivado de las amalgamas y que la cantidad excretada de Hg se correlaciona con el número de amalgamas, así como con las concentraciones de Hg en la sangre (Schweinsberg, 1994; Lorscheider y col., 1995; Al-Saleh, 1997).

La captación paulatina del Hg ocasiona su acumulación en órganos blanco como son: el hígado, el riñón, el cerebro, el tracto gastrointestinal y el pulmón, causando un incremento que se ha asociado con diversas alteraciones como son: el aumento en el número de abortos y problemas de fertilidad (Cordier y col., 1991), la enfermedad de Alzheimer y otros daños neurológicos como la disfunción psicomotora, la depresión de la actividad electroencefalográfica, el daño renal, el incremento en excreción de enzimas, etc. (Bluhm y col., 1992 a y b; Goering y col., 1992; Herrstrom, 1995).

Cordier y col., (1991), refieren que de los vapores de Hg formados e inhalados a temperatura ambiente, el 80% es depositado y retenido por el hombre.

Algunos reportes indican que el metal no es totalmente biodegradado por los organismos y parte de él se va acumulando paulatinamente. Asimismo se ha observado que es capaz de atravesar la barrera placentaria (Inouye y Kajiwara, 1990; Bernard y col., 1992; Kajiwara y col., 1996).

Estudios epidemiológicos indican que el mayor daño del metal se ejerce sobre la población infantil, ocasionando daño severo tanto en el sistema nervioso central como en el sistema locomotor (Kahaffey, 1984 y World Health Organization, 1976), debido a que en los infantes se encuentra una mayor permeabilidad al metal, ya que los órganos no han madurado totalmente.

Es conocido que el Hg puede ser mortal en los humanos en el caso de una intoxicación aguda, como ya se ha visto en el presente siglo en los accidentes ocurridos en Irak (Amin-Zaki y col., 1974) y Japón (Kazantzis, 1980). Sin embargo, pocos son los reportes en humanos, sobre concentraciones tóxicas específicas de compuestos mercuriales debido a que el efecto dañino depende de la forma química del compuesto y de la vía de entrada al organismo (Kahaffey, 1984), además que la sintomatología no es específica. Recientemente se ha publicado que concentraciones de 50-100 nmol de Hg/l de sangre y 14-28 nmol de Hg/ nmol de creatinina en orina, ejercen efecto tóxico en el riñón y el sistema nervioso central (Herrstron, 1995).

Otros autores refieren que concentraciones de 7-14 μg de Hg/100 ml de sangre y 300-600 μg de Hg/l en orina, ejercen efectos tempranos con sintomatología característica causada por el Hg (Verity, 1995), como dolor de cabeza, mareos, pérdida del campo visual, etc.

Algunos agentes quelantes han sido utilizados en la terapia contra intoxicaciones con Hg, como: 2,3-dimercapto- propanol (BAL), ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), ácido 2,3-dimercaptopropano-1-sulfónico (DMPS) y N-acetil-DL-penicilamida (NAPA), (Nielsen y Andersen, 1991, Aposhian y col., 1992, Louwerse y Buchet, 1995).

Nielsen y Andersen, 1991, realizaron investigaciones utilizando ratones a los que aplicaron diferentes concentraciones de Hg y diferentes agentes quelantes, encontrando una disminución en el porcentaje de mortalidad

principalmente con DMPS y en segundo lugar con DMSA. En 1992 Aposhian y col. reportaron que el uso de DMPS en humanos, mostró una correlación proporcional entre el número de amalgamas por individuo y la cantidad de Hg excretada al aplicar el quelante, indicando que el DMPS es capaz de penetrar al interior celular permitiendo la captación de Hg interno, mientras que el DMSA sólo actúa a nivel extracelular. No obstante los datos presentados por estos investigadores sobre el uso terapéutico de estos agentes quelantes, aún no se ha establecido un tratamiento adecuado para la intoxicación con Hg, ya que la utilización de dichos quelantes, se limita a algunos países y no hay suficientes bases científicas que apoyen resultados positivos. Además, de que el éxito de la terapia estará en función de la especificidad del quelante por el Hg, y no sólo de la capacidad quelante de una sustancia, ya que al no existir dicha especificidad, la mayoría de los quelantes atrapan otros metales incluso los esenciales.

La mayoría de los reportes en los que se estudian los efectos de Hg y otros metales pesados en los organismos, se han realizado utilizando como sistema modelo, diversos animales. Algunos estudios evalúan los niveles de Hg y en algunos casos el efecto de este metal en el organismo completo o bien sobre órganos específicos de estos (Kim y col., 1996). Se han utilizado animales de laboratorio como ratas o ratones, en donde los efectos tóxicos que causa el metal son evaluados en el hígado (Rana y Boora, 1992), en el intestino (James y Soni, 1990) o en el riñón (Dieter y col., 1992).

De los estudios realizados sobre los efectos que el Hg produce en los organismos vivos, hay gran cantidad de reportes en diferentes especies marinas, ya que son las que entran en contacto en primer término con materiales de desecho contaminados que se tiran al mar (Angelow y Nicholls, 1991; Sadiq y col., 1991; Blazka y col., 1992; Tian-yi y McNaught, 1992; Bigas y col., 1997), causando daño principalmente a nivel del hepatopáncreas.

Los datos obtenidos de estos ensayos y en animales de laboratorio, son el resultado final de la interacción conjunta de una serie de implicaciones metabólicas de tipo hormonal, inmunológico, detoxificante, neuronal y hemodinámico (Liu y col., 1990) incluyendo la homeostasis, lo que hace difícil evaluar el daño a nivel celular cuando se trabaja con sistemas completos.

Algunos investigadores de la toxicidad del Hg han empleado otros sistemas que no implican al organismo completo, como serían tejidos o células. Ejemplos de algunos de estos ensayos son: los de tejido renal (Smith y col., 1987; Aleo y col., 1992), tejido hepático (Beattie y col., 1990; Denizeau y col., 1990; Ashour y col., 1993; Lachapelle y col., 1993), en eritrocitos (Ribarov y col., 1984), en astrocitos (Aschner y col., 1991), en blastocitos (Matsumoto y Spindle, 1988), en neuronas (Saratian y Verity, 1990), en células gliales (Grundt y Neskovic, 1989; Frisk y col., 1997), en macrófagos (Christensen y col., 1991), en fibroblastos (Söderström y Ebendal, 1995), en células de invertebrados (Braeckman y col., 1997) y más escasamente en organelos celulares como serían las mitocondrias de riñón de rata (Chávez y Holguin, 1988) o bien partículas submitocondriales (Chien y col., 1978).

No obstante que se han realizado esta diversidad de ensayos, poco se puede concluir ya que haciendo un análisis de ellos, difieren en su protocolo experimental en aspectos como: el tipo de sistema, la forma química del Hg, la vía de administración, la dosis, los objetivos que persiguen, etc., lo que hace muy complejo el tratar de proponer un posible mecanismo de daño (Kahaffey, 1984). Y aunque, los reportes en donde se ha evaluado la toxicidad del HgCl₂ a nivel celular han sido pocos y se han utilizado diferentes tipos celulares, algunos concuerdan en que el HgCl₂ induce necrosis celular en hígado y riñón de rata después de una exposición *in vivo*, y otros que disminuye la viabilidad celular en cultivos de células de ovario de hámster expuestos *in vivo* y en células de riñón

de bovino expuestas *in vitro*, a medida que se exponen las células a concentraciones mayores del tóxico (Christensen y col., 1991).

Los cultivos celulares han sido utilizados como una herramienta para el estudio de los mecanismos de metabolismo de fármacos y acumulación de metales pesados y citotoxicidad (Endo y Sakata, 1995). EL hígado y particularmente los hepatocitos, experimentan los efectos tóxicos del metal y a la vez son los encargados de la detoxificación de los xenobióticos. Los cultivos celulares hepáticos pueden ser utilizados como un buen sistema para estudiar el efecto que los metales pesados producen a nivel celular, ya que presentan las siguientes características:

- La composición del medio es totalmente conocida, lo que permite tener un control de lo que entra y sale de la célula.
- Se pueden obtener grandes cantidades de células, lo que posibilita su análisis bioquímico y morfológico.
- Se pueden conocer las respuestas a nivel celular, sin la interferencia de procesos homeostáticos, etc.

Las líneas celulares son un modelo de estudio útil para determinar el efecto tóxico de diferentes agentes. La línea celular WRL-68 de origen fetal hepático humano, ha sido caracterizada (Gutiérrez y col., 1989, Gutiérrez y col., 1994) encontrándose que mantiene características del órgano del que proviene, como son:

- Morfología similar a los hepatocitos.
- Localización polarizada de ATPasa Na,K.
- Secreción de albúmina, alfa-feto proteína y colágena.
- Síntesis de glucógeno.
- Expresión de citoqueratinas con un patrón semejante al de los hepatocitos.

- Actividad de enzimas hepáticas características como: gamma-glutamyl-transpeptidasa, alanin-amino-transferasa y aspartato-amino-transferasa.

Teniendo en cuenta las características anteriores, se consideró que las células WRL-68 son un buen sistema de estudio para evaluar el efecto tóxico del Hg, y establecer el posible mecanismo de acción tóxica a nivel de células hepáticas.

HIPOTESIS

Es conocido que el mercurio es un metal pesado, tóxico para los organismos vivos del cual se desconocen los efectos dañinos a nivel celular, por lo que al exponer células a diferentes tratamientos con HgCl_2 y cuantificar parámetros como: viabilidad celular; actividades enzimáticas de lactato deshidrogenasa, alanin-amino transferasa y aspartato-amino transferasa; grado de lipoperoxidación; cantidad de glutatión; captación celular de mercurio a diferentes tiempos, dosis y temperaturas; cantidad de mercurio en subfracciones celulares y posibles proteínas a las que se enlaza el metal, será posible establecer un proceso mediante el cual se indique, el mecanismo de acción tóxica que el mercurio ejerce a nivel celular.

OBJETIVOS:

Objetivo General: Analizar el o los mecanismos de acción tóxica que el Hg ejerce en células hepáticas (Línea Celular WRL-68).

Objetivos Específicos:

Determinar la cinética de captación del Hg basándose en diferentes concentraciones y tiempos de exposición, para establecer los tratamientos adecuados para la realización del estudio.

Estudiar alteraciones de la actividad de enzimas como lactato deshidrogenasa (LDH), alanin y aspartato amino transferasas (ALAT y ASAT) consideradas como medidas de daño citotóxico, así como el grado de lipoperoxidación, debidas a la exposición de células WRL-68 a Hg, en condiciones aguda y crónica, para conocer el grado de toxicidad que el metal produce a nivel celular.

Estudiar la cantidad presente de agentes protectores como glutatión (GSH) y metalotioneina (MT) en las células WRL-68 expuestas a Hg, en condiciones agudas y cronica, para saber slla célula se está protegiendo mediante estos factores.

Analizar la cantidad de Hg adherido a grupos -SH de la membrana plasmática y la cantidad de Hg que se internaliza a las células WRL-68, para establecer la proporción del metal en ambos lados de la célula.

Analizar cual es la cantidad de Hg en las diferentes fracciones subcelulares, para establecer si hay una preferencia del metal por algún organelo celular.

Estudiar sí el Hg tiene preferencia por una proteína específica de uno de los organelos, para correlacionar la presencia del metal con cambios particulares observados en un organelo.

METODOLOGÍA

Las células utilizadas en la realización de este trabajo son de la línea celular WRL-68, de origen hepático fetal humano, la cual se ha cultivado y caracterizado en el laboratorio donde se desarrollo el presente trabajo de investigación (Gutiérrez, y col., 1989, Gutiérrez y col., 1994). En base a la caracterización se ha encontrado que son un modelo de estudio, adecuado para la realización de trabajos de investigación de tipo toxicológico.

MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR WRL-68.

Las células WRL-68 se cultivaron en condiciones de esterilidad en botellas de plástico (Nunc) con Medio de Dulbecco Modificado por Eagle (Sigma), suplementado con 8% de Suero Bovino de Ternera (STB) (HyClone) y 1% de aminoácidos no esenciales (Microlab), en lo sucesivo al medio de cultivo suplementado se le designara como DMEM. Una vez sembradas las células se incubaron a 37°C, 5 % de CO₂ en el ambiente y 95% de humedad, para su proliferación.

Las células se observaron diariamente al microscopio de luz, se les cambió el medio cada tercer día y se resembraron cuando llegaban a confluencia, aproximadamente cada 6 o 7 días.

Para la resiembra de las células, éstas se lavaron 2 veces con solución buffer de fosfatos (PBS) (Sigma), se les agregaron 0.5 ml de solución de tripsina-verseno al 0.025%, se incubaron por 1-3 min y una vez despegadas del substrato, se homogeneizaron con DMEM para ser resembradas a una dilución 1:3 aproximadamente.

VIABILIDAD CELULAR.

Se sembraron 30 000 células/pozo en multicámaras (Nunc) de 24 pozos con DMEM completo, 24 h después se cambió el medio de cultivo por 1 ml de DMEM, al cual se le adicionó HgCl_2 . Para este ensayo se probaron diferentes concentraciones de Hg las cuales se eligieron arbitrariamente desde 0.05 hasta 100 μM . Las células se dejaron en contacto con el HgCl_2 durante 24h. El medio de cultivo fue desechado, las células se lavaron con PBS y se despegaron del substrato mediante la acción de tripsina. Se realizó una prueba de viabilidad mediante el colorante vital, azul de tripano, el cual no es incluido por las células viables y se contaron en un hemocitómetro.

En base a la curva de viabilidad se eligió la concentración a la cual, las células cumplieran con los siguientes requerimientos:

- que mostraran un porcentaje de viabilidad mayor al 50%,
- que mantuvieran la capacidad de adhesión cuando eran resembradas y
- que mantuvieran su proliferación por varios días.

Se determinó utilizar los siguientes tratamientos de exposición celular:

- Agudo en alta concentración (a. c.), 5 μM de HgCl_2 , durante 24 h.
- Agudo en baja concentración (b. c.), 0.5 μM de HgCl_2 , durante 24 h.
- Crónico, 0,5 μM de HgCl_2 , durante 7 días.

Los tiempos de exposición se determinaron con base en la posibilidad de evaluar el efecto de una concentración baja del metal en períodos de exposición cortos (24 h) o largos (7 días), así como a una concentración alta (5.0 μM) por 24 h pero con la condición de que hubiera menos del 50% de muerte celular.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS CITOSÓLICAS Y TRANSMEMBRANALES, EN CÉLULAS EXPUESTAS A UN TRATAMIENTO AGUDO BAJA CONCENTRACIÓN, CRÓNICO Y AGUDO ALTA CONCENTRACIÓN DE HgCl₂.

Las células se sembraron y 24 h después se les cambió el medio con la concentración correspondiente de Hg, para exponerlas a los tratamientos: agudo b. c., agudo a. c. o crónico, este mismo procedimiento se realizó con las células para la determinación de las diferentes actividades enzimáticas. Se recolectó el medio de cultivo de 24 h de exposición a los diferentes tratamientos y se determinó la actividad de las enzimas: lactato deshidrogenasa (LDH), alanin amino transferasa (ALAT) y aspartato amino transferasa (ASAT).

La determinación de las actividades enzimáticas de la LDH, ALAT y ASAT se realizó por técnicas espectrofotométricas mediante ensayos comerciales de alta sensibilidad (Merck), tanto en el medio de las células expuestas al Hg como en el de las células control. Las células en la caja de cultivo se lavaron con PBS y se despegaron con solución de tripsina al 0.025% para ser contadas en un contador de células Coulter Conter, modelo ZM.

Las actividades enzimáticas específicas se expresaron en mU (nmoles de producto formado por min) por ml de medio de cultivo celular, por número de células.

DETERMINACIÓN DEL GRADO DE LIPOPEROXIDACIÓN.

Se les determinó a las células expuestas, el grado de lipoperoxidación utilizando el método de Buege y Aust, (1978), mediante la cuantificación del malondialdehído (MDA) por la reacción del ácido tiobarbitúrico.

A cada una de las muestras de homogenado celular (que contenga entre 0.1-2.0 mg de proteínas transmembranales) se le agregó 2 ml de una mezcla de ácido tricloroacético - ácido tiobarbitúrico - ácido clorhídrico (TCA -TBA -HCl) en una proporción de 15 %: 0.375 %: 0.25N respectivamente y se calentó en baño de agua a 96° C, durante 25 min.

Se dejó enfriar la mezcla, se centrifugó a 1000g por 10 min y se tomó el sobrenadante para leer su absorbancia a 534 nm contra un blanco de TCA -TBA -HCl.

Para determinar la concentración del malondialdehído se empleó el coeficiente de extinción molar (E) de 1.56×10^5 /M cm y se aplicó la fórmula de:

$$C = \frac{A}{E \cdot l}$$

donde: A = Absorbancia y l = grosor de la celda.

De los mismos homogenados celulares, se tomó una alícuota para determinar la cantidad de proteína por el método de Lowry y col., (1951). Los datos fueron reportados en nmoles de MDA por mg de proteína.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUTATIÓN.

El contenido de glutatión (GSH) se determinó mediante la técnica de Ellman (1959) con algunas modificaciones, la cual se basa en la formación de un compuesto colorido que se determina espectrofotométricamente al reaccionar el ácido 5,5'-ditio-bis(2nitrobenzónico) con los grupos -SH.

Se sembraron 16 000 células /cm² en botellas de cultivo de 175 cm² y se dejaron crecer durante 24 h. Posteriormente, se les agregó DMEM con o sin el metal de acuerdo a los tratamientos establecidos. Las células se rasparon del substrato con 1 ml de PBS para formar un homogenado celular. Las células se lisaron sometiéndolas a cambio de temperatura (las muestras se congelaron en N₂ líquido y se descongelaron a temperatura ambiente, este proceso se realizó 2 veces).

Del homogenado celular se formaron dos alícuotas, en una se determinó la cantidad de grupos -SH totales y la otra se le agregó 1 ml de solución de ácido tricloroacético al 5%, con EDTA 5 mM para precipitar proteína, esta se centrifugó a 6000 rpm, durante 15 min; del sobrenadante se tomó una alícuota de 0.5 ml para determinar los -SH correspondientes a la parte soluble (GSH) y el paquete se homogenizó en 0.5 ml de agua desionizada para determinar los -SH de la parte proteica. A cada una de estas 3 muestras se le agregó 2 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.3 M pH=8.2, 0.25 ml del reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) 1.0 mM en citrato de sodio al 1.0%) y se leyó la absorbancia a 412 nm en un espectrofotómetro Cary 118 (Davila y col., 1991; Pompella y col., 1991).

El valor de absorbancia obtenido se comparó con una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de GSH, se determinó la cantidad de proteína en cada una de las muestras por el método de Lowry y col., (1951) y los resultados se refirieron en nmoles de -SH por mg de proteína.

También se realizó un ensayo en donde a diferentes concentraciones de GSH se les agregó Hg y se cuantificó la cantidad de grupos -SH libres, para corroborar que los reactivos fueran estables en presencia del metal.

Dado que los tiempos de exposición utilizados en este ensayo son mas largos en comparación a los empleados por otros investigadores, se decidió cuantificar la cantidad de -SH en células expuestas a 0.5, 5.0 y 50 μM de HgCl_2 por 1 h.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE METALOTIONEINA

La cantidad de metalotioneina (MT) presente en las células WRL-68 expuestas y no expuestas al Hg, se determinó mediante el ensayo de saturación con plata de Scheuhammer y Cherian (1986). Se sembraron las células en el mismo número y condiciones que en las determinaciones anteriores, teniendo células control y de tratamientos: agudo b.c., crónico y agudo a.c.. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se cosecharon raspándolas con un gendarme, para formar un homogenado celular el cual se lisó en nitrógeno líquido. De este lisado se tomó una alícuota de 0.1ml para la determinación de proteína por el método de Lowry y col., (1951) y 0.4 ml a los que se les agregó 1 ml de buffer de glicina 0.5 M pH 8.5, 1 ml de solución de plata (20 ppm), se agitó vigorosamente y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente en ausencia de luz. Después, se le agregaron 0.020 ml de un hemolisado de rata para precipitar Ag no acomplejada, se agitó y se incubó en baño de agua a 96°C por 2 min. Las muestras se dejaron enfriar y se centrifugaron a 3000 rpm, 10 min. El sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro de absorción atómica. La concentración de MT se determinó basándose en una curva estándar de plata y aplicando la formula:

$$\mu\text{g MT} = (\text{ppm de plata}) (3.55) (\text{Vol. Total/Vol. Muestra})$$

Los resultados se expresan en μg de MT por mg de proteína.

La metodología de los parámetros cuantificados hasta el momento, son indicadores del estado funcional de la célula después de la exposición a los diferentes tratamientos con HgCl_2 , sin embargo, para poder determinar el mecanismo de acción tóxica del Hg a nivel celular, fue necesario emplear la siguiente metodología que nos indicará: si el Hg penetraba al interior celular, en qué forma se daba esta entrada, si era dependiente o no del tiempo y la dosis, si tenía preferencia por algún organelo y en particular por algún tipo de proteína.

CAPTACIÓN DE Hg POR LAS CÉLULAS WRL-68, EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE Hg.

Se sembraron 250 000 células/caja Petri de plástico (35 mm diámetro), se les agregaron 2 ml de DMEM y se dejaron crecer durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron 2 veces con solución de PBS, se les agregaron 2 ml de DMEM completo con 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0, 150.0 ó 200.0 μM de HgCl_2 mas ^{203}Hg con 0.025 μCi /ml de DMEM y se incubaron por 1 h a 37°C. El mismo ensayo se realizó a una temperatura de 4 °C.

Pasado el período de incubación, se desechó el medio radiactivo y las células se lavaron 2 veces con 1 ml de solución de PBS con ácido etilen diamino tetra-acético (EDTA) 10 mM.

Finalmente, se agregó 1 ml de solución de NH_4OH 1.5 M, a cada una de las cajas de cultivo, se sellaron con cinta parafilm y se mantuvieron así toda la noche para digerir las células. Del digerido se tomó una alícuota de 750 μl , se le agregaron 4.5 ml de líquido de centelleo para el determinar las cuentas por min (cpm) del ^{203}Hg y el resto se utilizó para cuantificar la cantidad de proteína (Lowry y col., 1951) los resultados finales se reportaron en nmoles de Hg por mg de proteína.

CAPTACIÓN DE Hg POR LAS CÉLULAS WRL-68 EXPUESTAS A HgCl_2 , EFECTO DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN.

Después de 24 h de sembradas las células, se les agregó 2 ml de DMEM completo conteniendo 0.5 ó 5.0 μM de HgCl_2 + 0.025 μCi /ml de ^{203}Hg a cada caja de cultivo y se incubaron por 15, 30 min, 1, 3, 5, 10, 20 ó 24 h a 37°C. Transcurrido cada uno de los tiempos de incubación, el medio radiactivo se removió y las células se lavaron 2 veces con solución PBS con EDTA 10 mM y se procedió de la misma forma que en el experimento anterior (Liu y col., 1991; Aleo y col, 1992) para determinar la cantidad de nmoles de Hg presente en las células por mg de proteína.

DETERMINACIÓN DE Hg ADHERIDO A LA MEMBRANA PLASMÁTICA, INTERIOR CELULAR Y EN DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES DE LA LÍNEA CELULAR WRL-68.

Con la finalidad de conocer la distribución del Hg, se realizaron dos ensayos, en uno se separó la membrana plasmática del interior celular y en el otro se llevó a cabo el subfraccionamiento celular para determinar la cantidad de Hg presente en cada una de estas partes.

Se sembraron 2.8×10^6 células de la línea WRL-68 en cada botella de cultivo de 175 cm^2 (Costar) y se cultivaron por 24 h. Al cabo de este tiempo se desechó el DMEM y las células se lavaron dos veces con PBS, se les agregó DMEM con $5.0 \mu\text{M}$ de HgCl_2 el cual contenía $0.025 \mu\text{Ci /ml}$ de ^{203}Hg y se incubó a las células durante 1 h. Se desechó el medio radiactivo, las células se lavaron dos veces con MgCl_2 frío, para quitar el Hg adherido inespecíficamente y se rasparon del substrato con ayuda de un gendarme de goma.

Para el primer ensayo, se rompieron las células por cambio drástico de temperatura al sumergirlas en N_2 líquido y ponerlas a temperatura ambiente, el proceso se realizó dos veces. Por centrifugación se separó la membrana plasmática del interior celular y se cuantificó la cantidad de nmoles de Hg por mg de proteína.

Para el subfraccionamiento celular, el homogenado celular se centrifugó a 2500 rpm por 10 min en una centrífuga (IEC Model Centra-4), con la finalidad de eliminar restos de sobrenadante con el Hg radiactivo.

Para obtener la cantidad de Hg distribuida en el interior celular, el paquete se lavó con 3 ml de solución de ácido etilen glicol bis-(β amino etil éter) tetra acético (EGTA) 250 mM para quelar el Hg adherido externamente a la membrana ya que se ha reportado como un buen agente quelante del Hg (Blazka y Shaikh, 1992), finalmente se centrifugó a 2500 rpm 10 min y se cuantificó la cantidad de Hg mediante las cpm presentes en el sobrenadante obtenido.

El paquete celular se resuspendió en 4 ml de solución buffer de sacarosa 0.25 M y Tris 10 mM, pH 7.4. Se tomó una alícuota para la determinación de proteína por el método de Lowry y col., (1951) y otra para determinar la presencia de ADN en las subfracciones celulares.

El resto de homogenado celular se sonicó para romper las células, mediante la aplicación de 5 series de 20 pulsos/seg durante 10 s con una

potencia de 130 wats, con intervalos de 5 s entre cada serie, usando un Sonicador Ultrasonic Processor XL, mod. XL2020 (Heat Systems) y se verificó que las células estuvieran rotas mediante observación en el microscopio invertido.

Para la obtención de las diferentes fracciones celulares se siguió la técnica reportada por Liu y col. (1990) y Kershaw y col. (1990), el lisado celular se centrifugó a 600 g, 10 min en una centrífuga mod. J-21B (Beckman), el sobrenadante y el paquete obtenido (fracción subcelular compuesta por núcleos) con 2 ml de solución buffer se centrifugaron una vez más a las mismas condiciones, los núcleos obtenidos se concentraron y resuspendieron en 1 ml de solución de sacarosa-tris de la cual se tomó una alícuota de 0.2 ml para determinar las cpm presentes en esta fracción.

Los sobrenadantes se combinaron y se centrifugaron a 10 000 g, 10 min en una centrífuga mod. J-21B (Beckman). El sobrenadante y el paquete (fracción mitocondrial) mas 2 ml de solución buffer se centrifugaron una vez más en las mismas condiciones, las mitocondrias se reunieron y resuspendieron en 1 ml de la solución buffer de sacarosa-tris, se tomó una alícuota de 0.2 ml para determinar las cpm presentes.

Los sobrenadantes resultantes se reunieron y centrifugaron a 100 000 g, 60 min en una ultracentrífuga XL-90 (Beckman), el sobrenadante y el paquete con la fracción microsomal, mas 2 ml de solución buffer, se centrifugaron una vez más en las mismas condiciones, los microsomas se juntaron y resuspendieron en 1 ml de solución buffer de sacarosa-tris y los dos sobrenadantes se combinaron para formar la fracción citosólica. De la fracción microsomal se tomó una alícuota de 0.3 ml y de la fracción citosólica 1 ml para determinar la cantidad de cpm presentes en cada fracción.

Las alícuotas que se tomaron para determinar las cpm fueron colocadas en viales de cristal, se les agregaron 4.5 ml de líquido de centelleo y se cuantificaron en un contador de centelleo modelo LS 5000 TA (Beckman). A partir de los valores de cpm se calculó la cantidad de Hg presente en cada fracción celular y se reportó por mg de proteína total.

Para cerciorarnos que las distintas fracciones no estaban contaminadas por núcleos se determinó el contenido de ADN en cada una de las subfracciones.

DETERMINACIÓN DE ADN

Se determinó la cantidad de ADN presente en cada una de las subfracciones celulares y en el homogenado celular según la técnica de Burton, (1965), con la finalidad de ver que las fracciones no se encontraban contaminadas con núcleos.

De cada una de las fracciones celulares y del homogenado celular se tomó una alícuota a la que se agregó 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%, se agitó en Vortex y se centrifugó a 4500 rpm, 10 min. El sobrenadante se desechó y el concentrato se lavó 1 o 2 veces más con TCA al 5%, el paquete resultante se resuspendió en 1 ml de ácido perclórico 1 N y se incubó a 70°C por 20 min, posteriormente se centrifugó a 4500 rpm por 10 min. El sobrenadante se utilizó para la determinación de ADN, usando una curva patrón como referencia.

Las determinaciones de ADN se realizaron con 1 ml de Reactivo de Dische (Difenilamina al 4% en ácido acético) y se colocaron durante 3 h en una caja con luz fría, finalmente se leyó la absorbancia a 590 y 700 nm. Asimismo se determinó la cantidad de proteína total por el método de Lowry y col. (1951), para referir el resultado como µg de ADN/mg de proteína.

ELECTROFORESIS DE SUBFRACCIONES CELULARES

Se preparó un gel de acrilamida al 10% utilizando las soluciones indicadas en la Tabla 2.

Las cantidades indicadas fueron las requeridas para un gel de una Cámara de Electroforesis (Mini-Protean II Cell, Bio Rad).

Tabla 2.- Componentes del gel de acrilamida.

Gel Separador	(ml)	Gel Concentrador	(ml)
1) Buffer pH 8.8	1.00	1) Buffer pH 6.8	0.5
2) Solución base de Acrilamida-bisacrilamida	1.32	2) Solución base de Acrilamida- bisacrilamida.	0.33
3) Agua destilada	1.68	3) Agua destilada	1.2
4) TEMED	0.02	4) TEMED	0.0133
5) Persulfato de amonio	0.04	5) Persulfato de amonio	0.025

Tanto el gel separador como el concentrador se prepararon siguiendo el orden de las soluciones 1,2,3,4 y al agregar la 5, la mezcla se vació inmediatamente en la placa, para dejar reposar 25 min a cada uno de los geles.

Las muestras a separar (fracciones subcelulares) así como el estándar de bajo Peso Molecular (SDS-Page Molecular Weight Standards, Low Range, Bio Rad) se prepararon a una dilución final que contuvieran 10 µg de proteína en un volumen de 25 µl conteniendo SDS al 10% y 3XSPB en una relación 20:5:15. Las muestras se calentaron por 3 min, a 100°C, y se colocaron en c/u de los carriles. La electroforesis se corrió a 55V durante 2 h, para ello se utilizó una Fuente de Poder (Electrophoresis Power Suppli. Mod. 300Xi, Bio Rad).

El gel se fijó en ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 24 h y posteriormente se tiñó con azul de Coomassie al 1% en 30 partes de TCA al 5% durante 2 h para finalmente ser fotografiado y secado para su conservación.

Algunas electroforesis se realizaron por duplicado en el mismo gel, con la finalidad de hacer autorradiografía a muestras idénticas para determinar el Peso Molecular de las proteínas a las que se encuentra preferentemente pegado el mercurio.

AUTORRADIOGRAFÍA DE LA ELECTROFORESIS

Del duplicado de la electroforesis de subfracciones celulares que contenían ^{203}Hg , se realizó la autorradiografía. El gel se secó, poniéndolo en una solución de glicerol 1% y TCA 10% y en un marco de acrílico entre papel celofan Slab Dryer, mod 443 (Bio-Rad), por 24 h.

Seco el gel, se colocó en una hoja de film Hyperfilm-MP, High performance autoradiography film RNP30- 2799435 (Amersham) y dentro de una placa que lo protege de la luz, y se guardó a -70°C o en frío, por el tiempo requerido, dependiendo del tipo de isótopo y cantidad de radiactividad que puede ser hasta por un mes si la actividad es muy baja. Posteriormente se dejó 1 h a temperatura ambiente, se sacó la placa y se reveló en una máquina X-Omatic, Regular, Intensifying Screens (Kodak) para observar las bandas que presenten el radioisótopo de Hg. Por comparación con el gel duplicado, teñido con azul de Coomassie se determinó el peso molecular de la proteína a la que se adhirió el Hg.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

Todos los datos fueron obtenidos de 3 ensayos independientes, los cuales fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por Analisis de Varianza (ANOVA) seguida la prueba de Tukey. Se consideró significancia estadística cuando p fue menor o igual a 0.05.

RESULTADOS.

En la Figura 5 se presentan los datos del porcentaje de viabilidad de células expuestas durante 24h a distintas concentraciones de HgCl_2 , basados en las concentraciones menores o iguales a $1\mu\text{M}$ de HgCl_2 los porcentajes de viabilidad no presentaron diferencias significativas con respecto al control, mientras que a medida que se incrementa la concentración disminuí, por lo que la viabilidad celular es un parámetro que depende de la concentración del metal. La LC_{50} aparentemente fue de $9.6\mu\text{M}$ para las células WRL-68 expuestas durante 24 h a HgCl_2 .

Tomando en consideración una concentración de Hg en donde las células presentaran: una viabilidad semejante al control, que la capacidad de proliferación celular se diera por varios días en presencia del HgCl_2 y además, que las células mantuvieran su potencial de adhesión cuando son resembradas, se decidió establecer tres tipos de tratamientos que fueron:

- Tratamiento agudo baja concentración (b. c.), $0.5\mu\text{M}$ durante 24 h.
- Tratamiento crónico, $0.5\mu\text{M}$ por 7 días.
- Tratamiento agudo alta concentración (a. c.), $5.0\mu\text{M}$ por 24 h.

La Figura 6 muestra la capacidad de proliferación de las células WRL-68 crecidas en presencia de HgCl_2 $0.5\mu\text{M}$ por 7 días, en donde observamos que *presentan una curva de proliferación semejante a la de las células control, sin embargo en el día 6 comienza a observarse una mayor proliferación de las células expuestas al metal la cual se vuelve más evidente en los días 7 y 8, encontrándose incrementada un 20.7, 76.3 y 44.2% respectivamente. En el día 8 la cantidad de células presentes en el cultivo disminuye, tanto en las células expuestas al Hg como en las control debido a que la alta densidad celular hace que las células se vayan despegando del sustrato.*

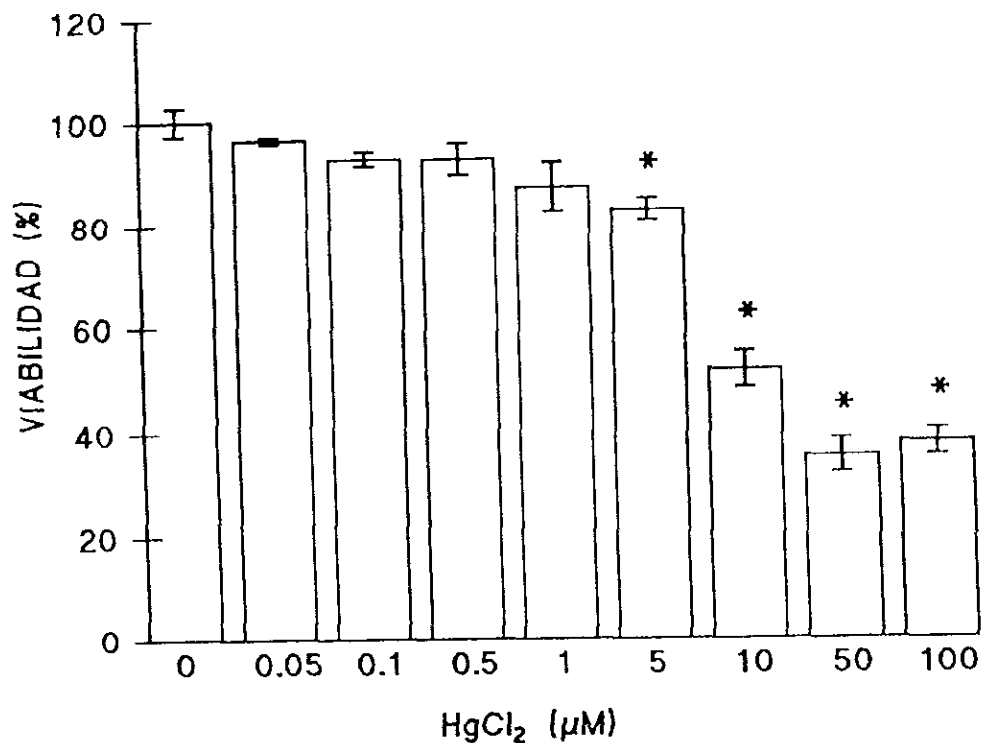


Figura 5.- Porcentaje de viabilidad de células WRL-68, expuestas a diferentes concentraciones de HgCl₂, por 24 h. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm D.S. (n=12). * ANOVA, Prueba de Tukey $p \leq 0.05$.

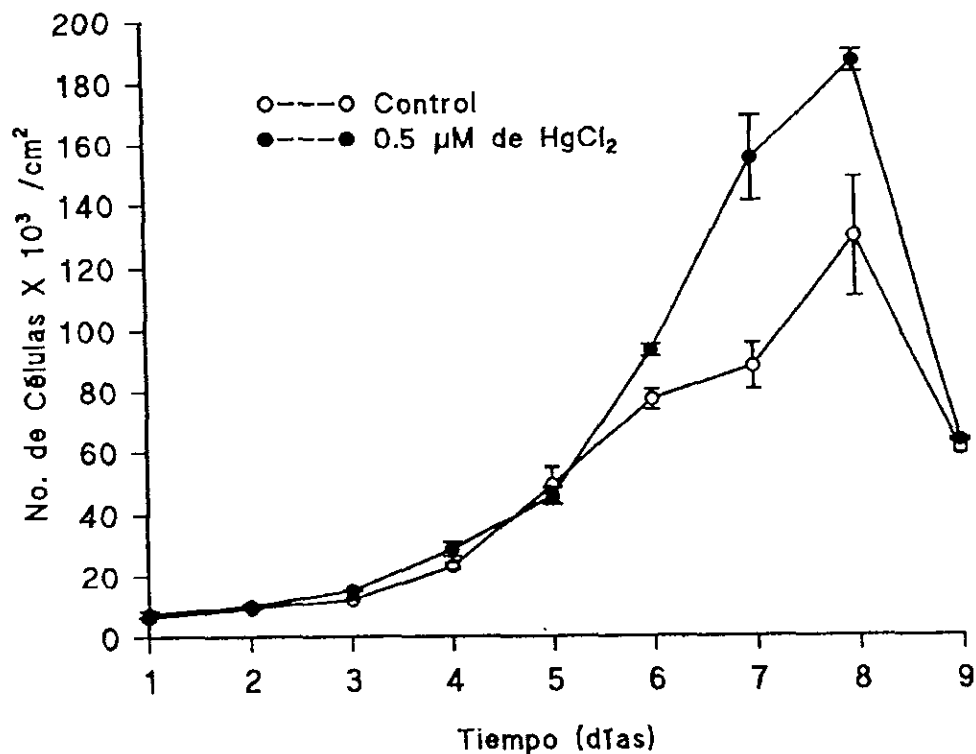


Figura 6.- Cinética de proliferación de células WRL-68 en presencia de HgCl₂. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm D.S. (n=12).

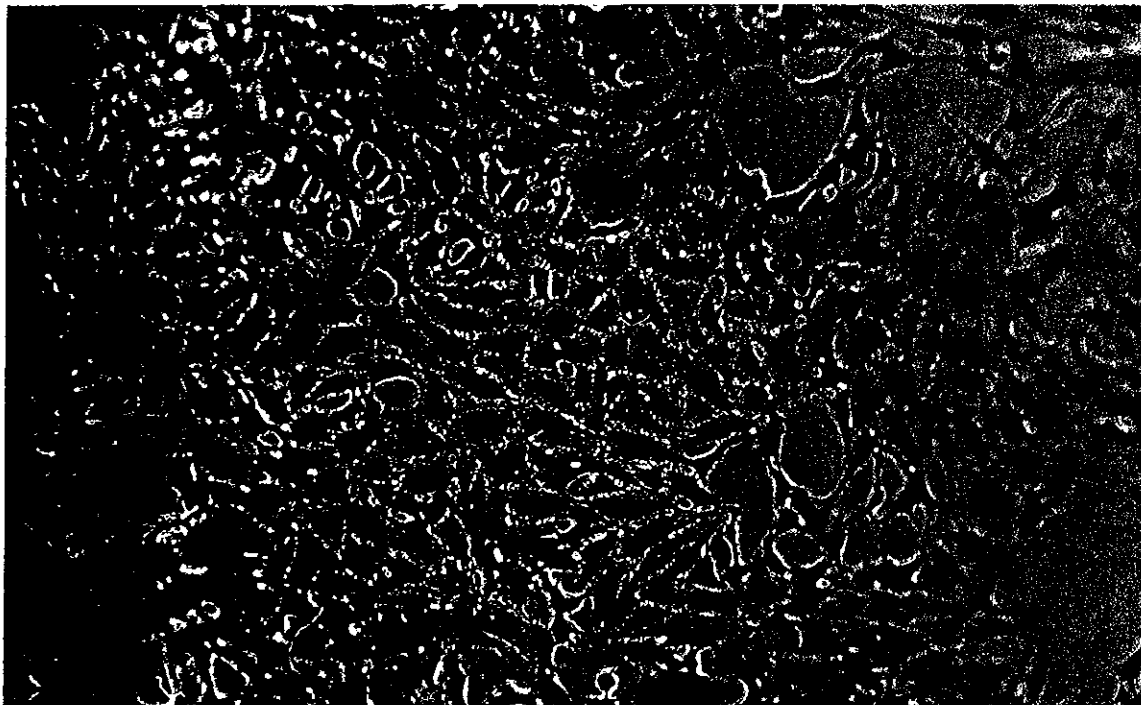
MICROSCOPIAS ÓPTICA Y ELECTRÓNICA DE CÉLULAS WRL-68 EXPUESTAS A HgCl_2 .

En la Figura 7 A-C, se muestran las fotomicrográficas de las células expuestas a los diferentes tratamientos con Hg. Se puede observar que las células al estar en cultivo, se encuentran adheridas al substrato de la botella de plástico, muestran una forma extendida y poliédrica. Al teñirse con el colorante Giemsa, se nota que el núcleo se encuentra mas teñido en comparación al citoplasma, también se puede distinguir en algunos núcleos la presencia de nucleolos. Las células en el cultivo también mostraron una tendencia a contactarse entre sí, conforme el cultivo avanzó y las células proliferaron.

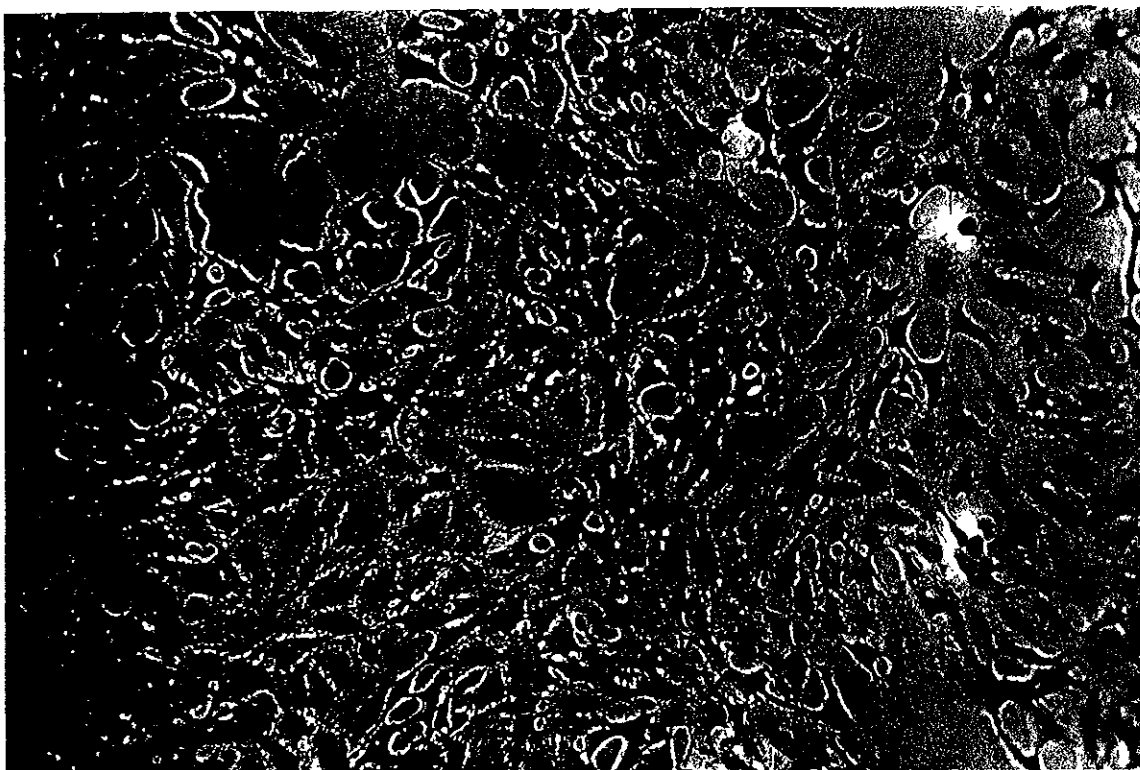
No se observaron cambios aparentes en la morfología celular con respecto al control (Fig. 7 A-C), sin embargo, las células expuestas a una concentración de $100 \mu\text{M}$ (Fig. 7 D), presentaron alteraciones evidentes como: pérdida de su forma poliédrica, las células se encuentran muy alargadas, con poco citoplasma, gran cantidad de vesículas y pérdida de prolongaciones que las contactan entre sí.

Figura 7.- Fotomicrográficas de Células WRL-68 expuestas a diferentes tratamientos con HgCl_2 . **A)** Células control (100X). **B)** Células de tratamiento agudo alta concentración ($5.0 \mu\text{M}$, 24 h) (100X). **C)** Células de Tratamiento agudo baja concentración ($0.5 \mu\text{M}$, 24 h)(200X). **D)** Células expuestas a $100\mu\text{M}$ de HgCl_2 , 24 h (200X).

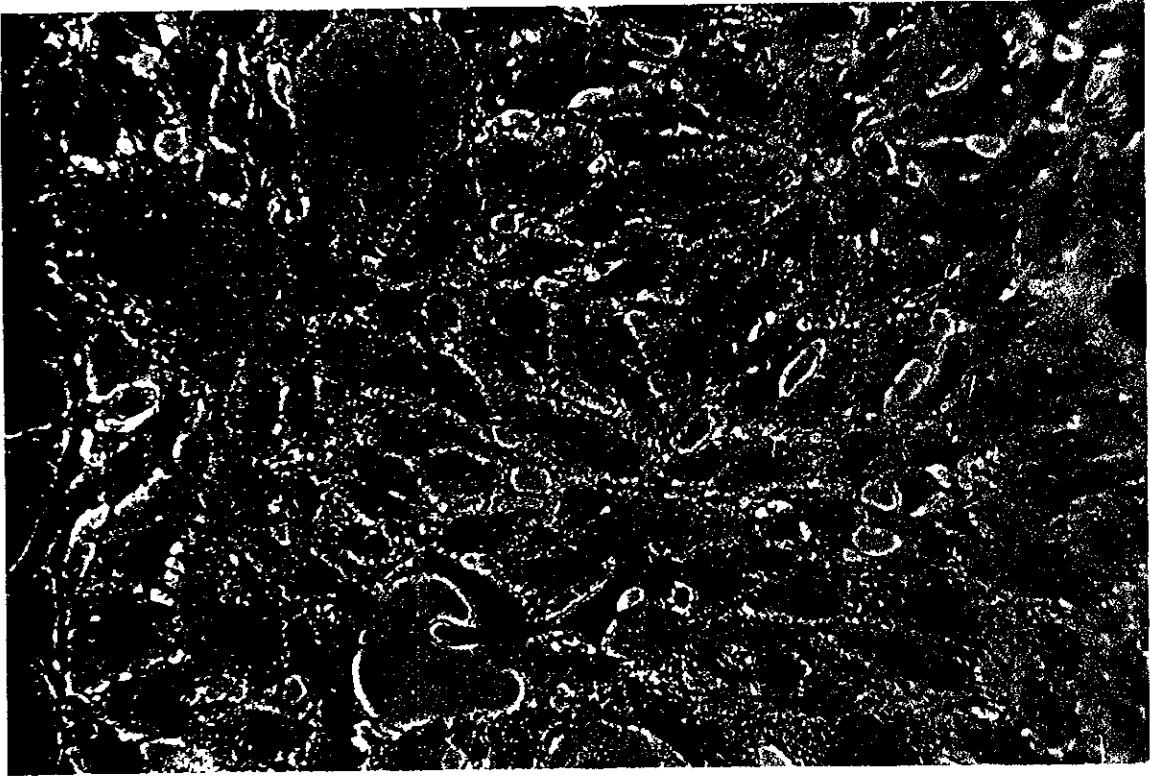
A) Células control (100X)



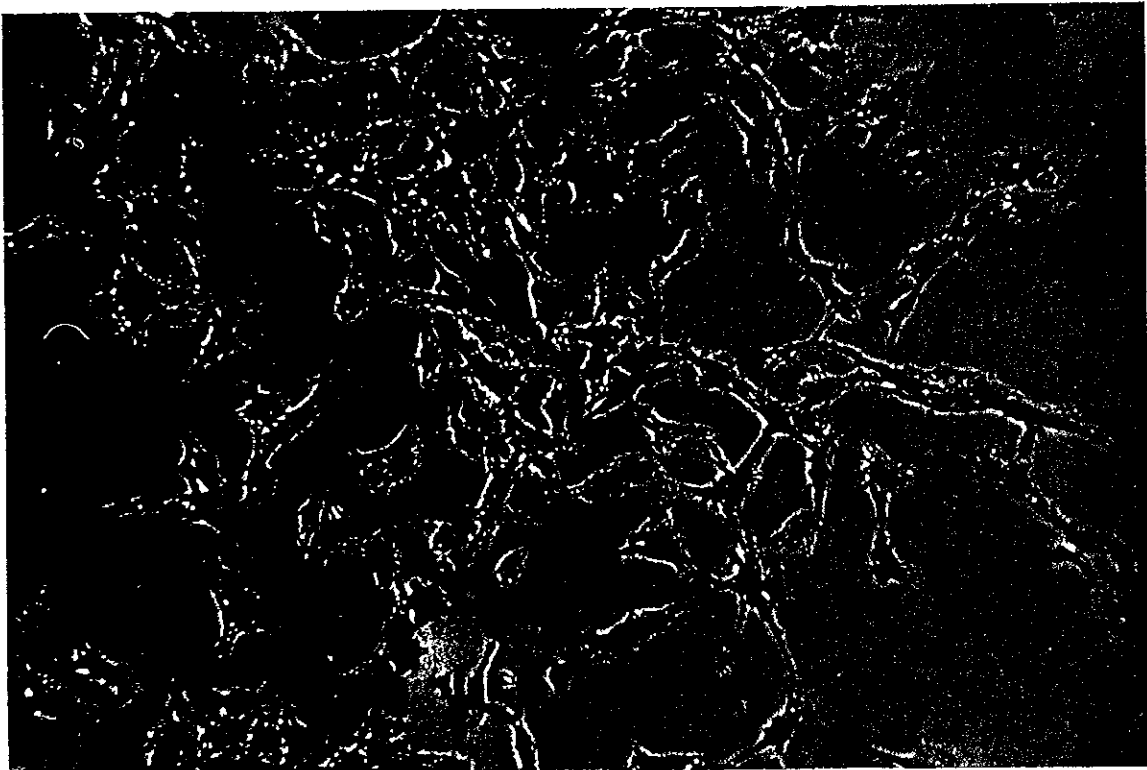
B) Células de tratamiento agudo alta concentración ($5.0 \mu\text{M}$ HgCl_2 , 24 h) (100X).



C) Células de tratamiento agudo baja concentración ($0.5 \mu\text{M HgCl}_2$, 24h) (200X).



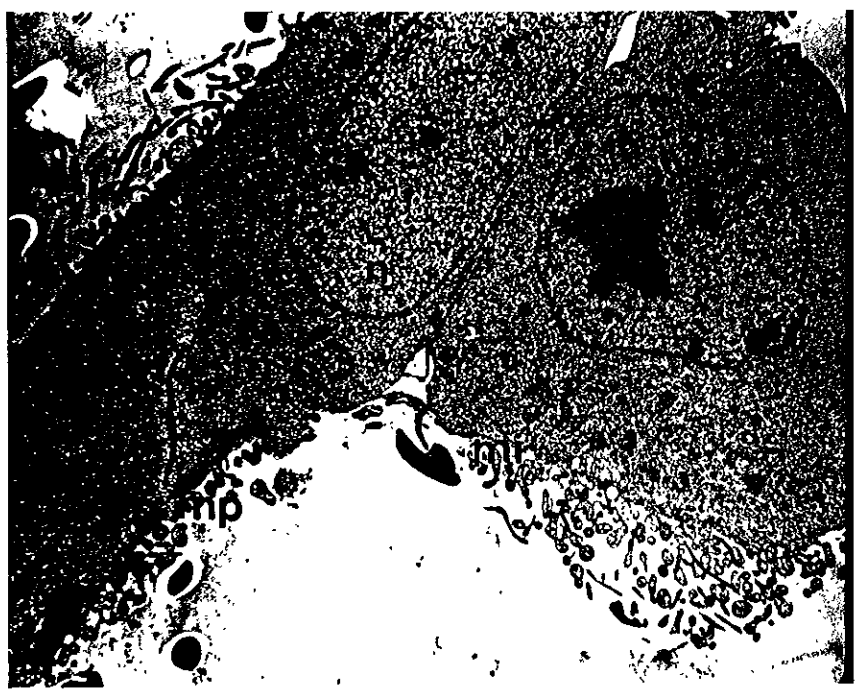
D) Células expuestas a $100 \mu\text{M}$ de HgCl_2 , 24 h (200X).



En la Figura 8 (A y B) se observan las fotomicrografías de las células WRL-68 control, en donde por microscopía electrónica de transmisión se aprecia la morfología poliédrica irregular que es característica de células en cultivo, que fueron crecidas sobre una superficie rígida. En la Fig. 8 A (4400X) se puede observar claramente el núcleo, con su envoltura nuclear continua, la presencia de organelos como mitocondrias y los microvellos de la membrana plasmática que se prolongan hacia el exterior. la Fig. 8 B (8500X) muestra una mayor resolución de la célula, en donde es mas clara la presencia de la envoltura nuclear, la presencia de organelos como mitocondrias, en algunas de las cuales se puede observar algo de membrana interna plegada, aparato de Golgi, retículo endoplasmico rugoso y liso, microtúbulos, presencia de ribosomas y glucógeno dispersos en el citoplasma.

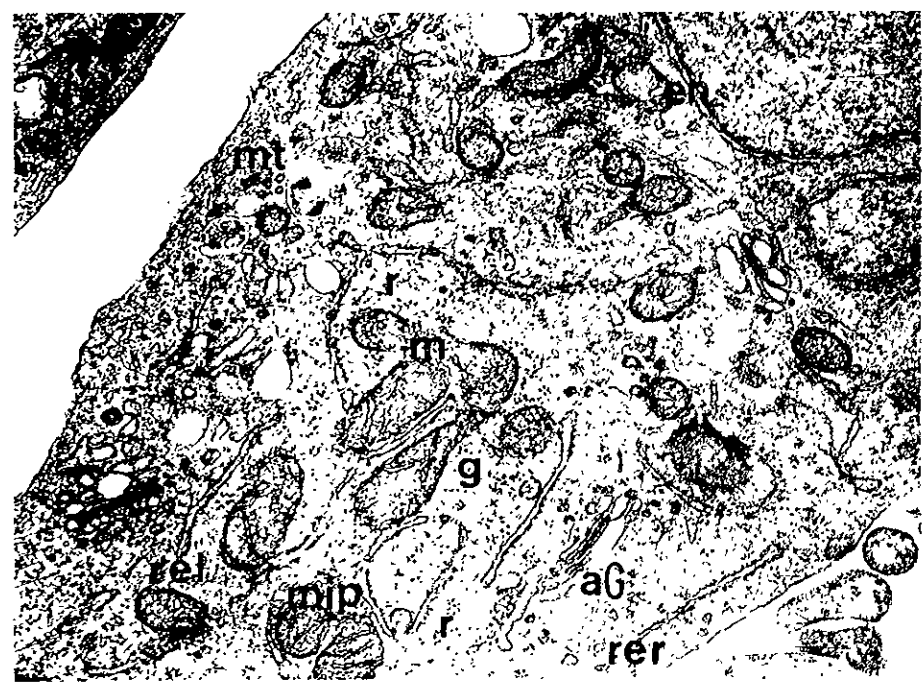
Figura 8.- Fotomicrograffas de Células WRL-68. En donde se observa la morfología típica de un hepatocito. En la Fig. A (4400X) se puede observar claramente el núcleo (n) con su envoltura nuclear continúa, la presencia de organelos como mitocondrías (m) y los microvellos (mi) de la membrana plasmática (mp) que se prolongan hacia el exterior.

A



La Fig. 8 B (8500X) muestra una mayor resolución de la célula, en donde es mas clara la presencia de la envoltura nuclear (en), la presencia de organelos como mitocondrías (m), en algunas de las cuales se puede observar algo de membrana interna plegada (mip), aparato de Golgi (aG), retículo endoplasmico rugoso (rer) y liso (rel), microtúbulos (mt), presencia de ribosomas (r) y gránulos de glucógeno (g) dispersos en el citoplasma.

B

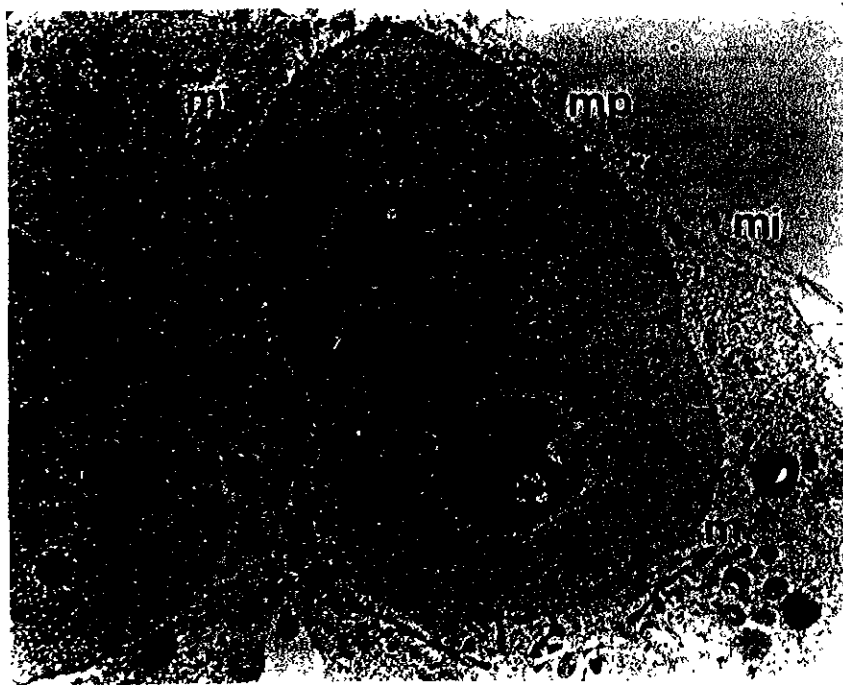


La Figura 9-A-D, muestra las fotomicrograffas de células WRL-68, expuestas a los diferentes tratamientos con HgCl_2 . Por microscopía electrónica de transmisión se observaron algunas alteraciones ultraestructurales. En células expuestas al tratamiento agudo b. c. Fig. A (4400X) la forma poliédrica irregular continúa observándose así como los microvellos de la membrana plasmática, la cromatina muestra un arreglo atípico, y se puede ver la presencia de organelos como mitocondrias las cuales están alteradas en su morfología, ya que se observan alargadas y mas densas, incluso localizadas en la cercanía del núcleo y membrana plasmática disgregada. En la Fig B (7000X) se tiene una mayor resolución de la célula, en donde las alteraciones que se observan son un plegamiento de la envoltura nuclear, el arreglo atípico de la cromatina, la presencia de mitocondrias que no presentan membrana interna plegada, membranas internas que conforman el retículo endoplásmico y aparato de Golgi disgregado así como la membrana plasmática.

La Figura 9C y D, correspondiente a las células expuestas al tratamiento agudo a. c., presentaron cambios inducidos por el Hg. En la Fig. C (4000X) se observó: acortamiento de los microvellosidades de la membrana plasmática, notable plegamiento de la envoltura nuclear, forma atípica de la cromatina, alteraciones en la forma de las mitocodrias así como mayor densidad y localización alrededor de y en las cercanias del núcleo, disminución en la cantidad de retículo endoplásmico rugoso y liso e incremento de ribosomas libres. La Fig. D (10000X) muestra una mayor resolución de la célula expuesta a este tratamiento, en donde se observaron mas claramente las mitocondrias, que presentaron poca cantidad de membrana interna plegada, forma muy alargada, muy densas, la lobulación de la envoltura nuclear, presencia de aparato de Golgi, disminución de la cantidad de retículo endoplásmico, alta cantidad de ribosomas y presencia de granulos de glucógeno.

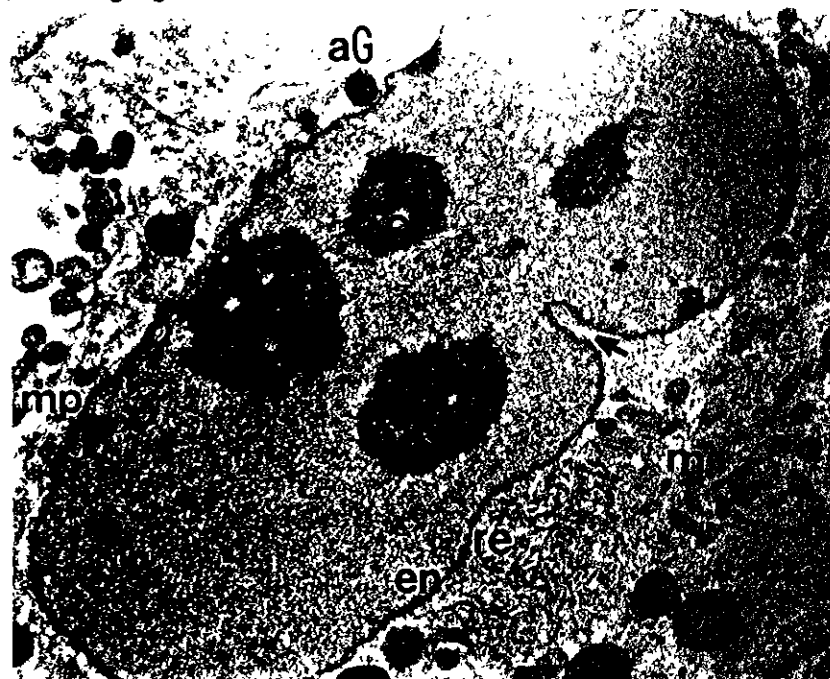
Figura 9.- Fotomicrografías de Células WRL-68 expuestas a diferentes tratamientos de HgCl₂ (A-D). La Figura 9A y B, corresponden a las células expuestas al tratamiento agudo b. c. (0.5 μM, 24 h). En la Fig. A (4400X) la forma poliédrica irregular continúa observándose así como los microvellos de la membrana plasmática (mi), la cromatina (c) muestra un arreglo atípico, y se puede ver la presencia de organelos como mitocondrias (m) las cuales están alteradas en su morfología, ya que se observan alargadas y mas densas, incluso localizadas en la cercanía del núcleo y membrana plasmática (mp) disgregada.

A

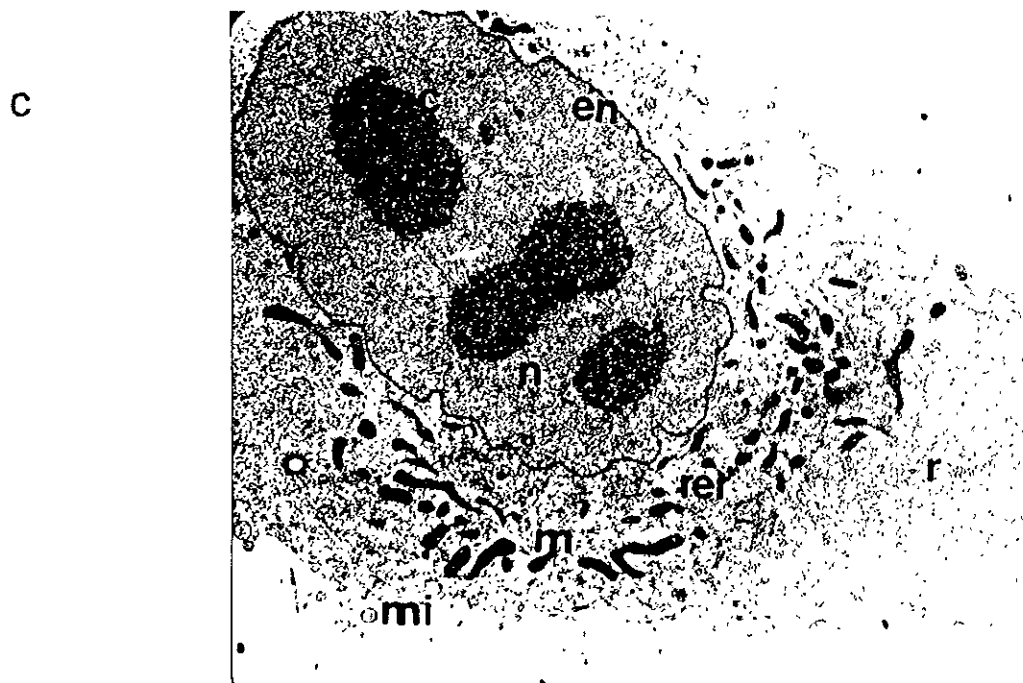


En la Fig B (7000X) se tiene una mayor resolución de la célula, en donde las alteraciones que se observan son: un plegamiento (→) de la envoltura nuclear (en), el arreglo atípico de la cromatina (c), la presencia de mitocondrias (m) que no presentan membrana interna plegada (mip), membranas internas que conforman el retículo endoplásmico (re) y aparato de Golgi (aG) disgregado así como la membrana plasmática (mp).

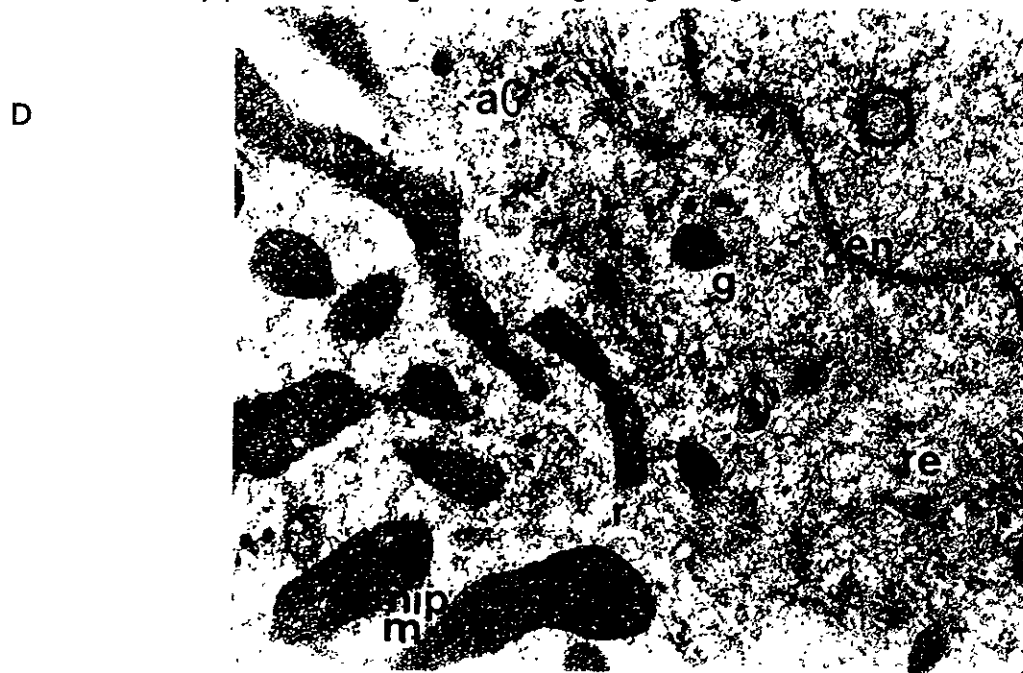
B



La Figura 9C y D, correspondiente a las células expuestas al tratamiento agudo a. c. (5.0 μ M, 24 h), presentaron cambios inducidos por el Hg. En la Fig. C (4000X) se observó: acortamiento de los microvellosidades (mi) de la membrana plasmática, notable plegamiento de la envoltura nuclear (en), forma atípica de la cromatina (c), alteraciones en la forma de las mitocondrias (m) así como mayor densidad y localización alrededor del núcleo (n), disminución en la cantidad de retículo endoplásmico rugoso (rer) y liso (rel) e incremento de ribosomas (r) libres.



La Fig. D (10000X), muestra una mayor resolución de la célula expuesta a este tratamiento, en donde se observaron claramente: mitocondrias (m) alteradas, que presentaron poca cantidad de membrana interna plegada (mip), forma muy alargada, muy densas; la lobulación (\rightarrow) de la envoltura nuclear (en), presencia de aparato de Golgi (aG), disminución de la cantidad de retículo endoplásmico (re), alta cantidad de ribosomas (r) y presencia de granulos de glucógeno (g).



DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS: LDH, ALAT Y ASAT.

Se cuantificó la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) (Fig. 10), ya que es considerada una enzima indicadora de citotoxicidad, cuando su actividad se encuentra aumentada en el medio extracelular. Los resultados indicaron que la LDH es liberada por las células WRL-68 como una respuesta al efecto del Hg cuando son expuestas a los tratamientos agudo b. c. y agudo a. c., ya que hay un incremento de su actividad del 59.5% y 95.2% respectivamente, en comparación al control, lo que indica un mayor daño con concentraciones de Hg altas. Para las células expuestas al tratamiento crónico (cultivadas por 7 días), no se registró ningún cambio en el contenido de LDH en el medio colectado de las últimas 24 h, lo cual indica que la LDH es un marcador de daño a tiempos cortos de intoxicación.

Las enzimas citosólicas Alanin Amino Transferasa (ALAT) y Aspartato Amino Transferasa (ASAT), enzimas indicadoras de necrosis celular, mostraron un patrón de actividad semejante al de la LDH (Figuras 11 y 12). Se encontró para ALAT un incremento de su actividad del 30.2% para el tratamiento agudo b.c. y del 70.6% para el tratamiento agudo a. c. Mientras que para ASAT la actividad se incrementó en 22.9% para el tratamiento agudo b. c. y 75.7% para el agudo a. c., indicando que estas enzimas son sensibles a tiempos cortos de exposición (24 h) y al incremento en la concentración del metal. Las células tratadas crónicamente no presentaron diferencia con respecto al control.

Fig. 10

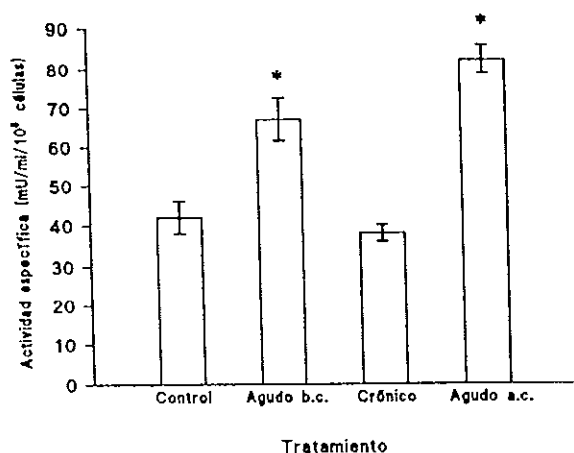


Fig. 11

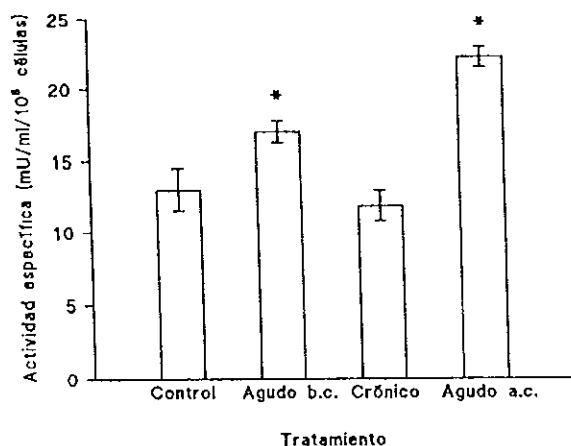


Fig. 12

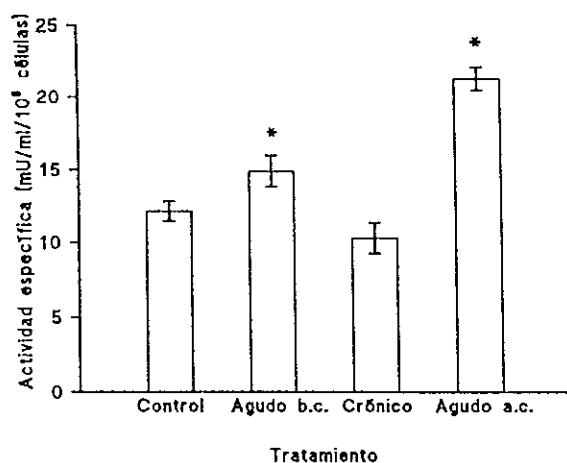


Figura 10.- Lactato Deshidrogenasa. 11.- Alanin Amino Transferasa. 12.- Aspartato Amino Transferasa. Actividad enzimática determinada en el medio de 24 h de cultivo, de células WRL-68 expuestas a HgCl₂ a los diferentes tratamientos: Control (sin metal), Agudo Baja Concentración (b. c.) (0.5 μ M, 24 h), Crónico (0.5 μ M, 7 días) y Agudo Alta Concentración (a. c.) (5.0 μ M, 24 h). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm D.S. (n = 15). *ANOVA, Prueba de Tukey $p \leq 0.05$, con respecto al control.

CUANTIFICACIÓN DEL GRADO DE LIPOPEROXIDACION.

La lipoperoxidación (LP) es un proceso considerado como degenerativo que ocurre en células que han sufrido daño por diferentes vías, entre ellas el efecto de algún agente tóxico. Se evalúa por la cantidad de malondialdehído (MDA) producido, en presencia de ácido tiobarbitúrico (TBA). En la Figura 13, se muestra la gráfica de la cantidad de MDA producido en nmoles por mg de proteína, de las células expuestas a los diferentes tratamientos. Se encontró un aumento en el grado de LP del 59.7 y 55.6% en las células expuestas a los tratamientos crónico y agudo a. c., con respecto al control. Se observó que este parámetro de daño fue sensible tanto a una mayor concentración como a un tiempo de exposición prolongado con el metal. Para el tratamiento agudo b. c. no se encontró diferencia significativa de este parámetro con respecto a las células control.

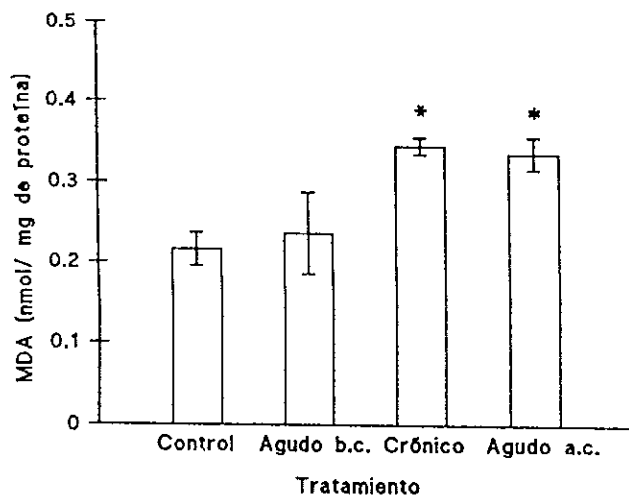


Figura 13.- Grado de lipoperoxidación. Determinado como producción de malondialdehído (MDA) en células WRL-68 expuestas a HgCl_2 a los diferentes tratamientos: Control (sin metal), Agudo Baja Concentración (b. c.) ($0.5 \mu\text{M}$, 24 h), Crónico ($0.5 \mu\text{M}$, 7 días) y Agudo Alta Concentración (a. c.) ($5.0 \mu\text{M}$, 24 h). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm D.S. ($n = 15$). *ANOVA, Prueba de Tukey $p \leq 0.05$, con respecto al control.

CONTENIDO DE GLUTATIÓN

El glutatión (GSH) es un agente hepatoprotector formado por un tripéptido que contiene cisteína, cuyo grupo -SH reacciona con sustancias xenobióticas entre las que se encuentran los metales pesados, así mismo el Hg presenta una afinidad alta por los grupos tioles presentes en proteínas. Sin embargo, la determinación de los grupos -SH totales en células WRL-68 expuestas a los diferentes tratamientos con Hg (Fig. 14), se llevó a cabo mediante la reacción de Ellman (1959), los resultados mostraron que el contenido de grupos -SH se incrementó significativamente, en las células del tratamiento agudo a.c. en un 22.5% mientras que en los otros tratamientos no hubo cambios.

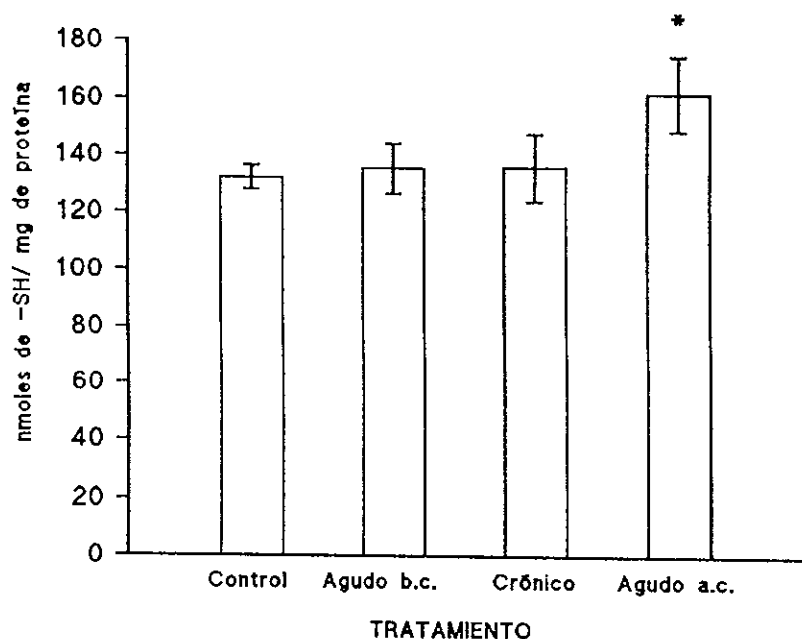


Figura 14.- Cantidad de grupos -SH, en células WRL-68 expuestas a HgCl_2 a los diferentes tratamientos: Control (sin metal), Agudo Baja Concentración (b. c.) ($0.5 \mu\text{M}$, 24 h), Crónico ($0.5 \mu\text{M}$, 7 días) y Agudo Alta Concentración (a. c.) ($5.0 \mu\text{M}$, 24 h). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm D.S. ($n = 15$). *ANOVA, Prueba de Tukey $p \leq 0.05$, con respecto al control.

La cantidad de -SH presentes en la fracción soluble y que corresponde al glutatión (GSH) agente hepatoprotector (Fig. 15), también mostró incremento sólo en las células del tratamiento agudo a. c., el cual fue de un 62.8% en comparación a la cantidad de GSH presente en las células control.

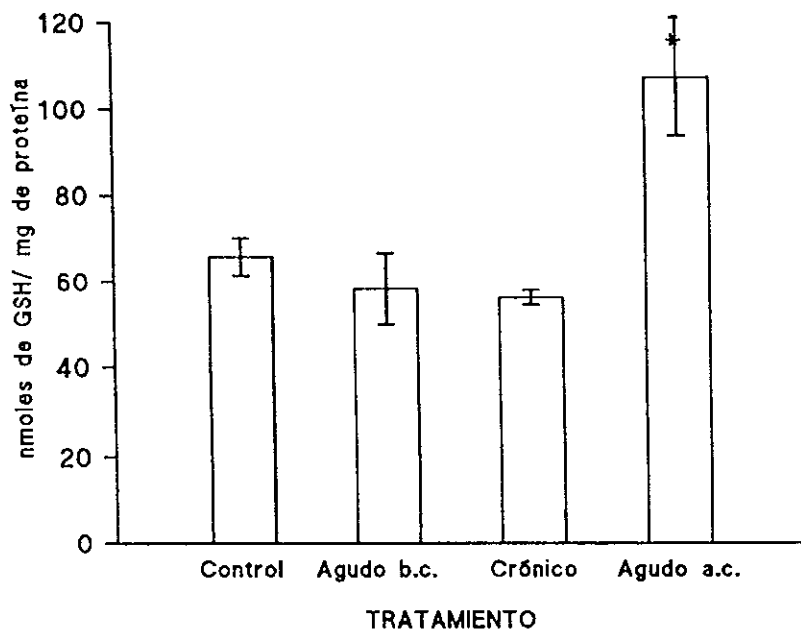


Figura 15.- Cantidad de glutatión (GSH) presente en células WRL-68 expuestas a HgCl_2 a los diferentes tratamientos: Control (sin metal), Agudo Baja Concentración (b. c.) ($0.5 \mu\text{M}$, 24 h), Crónico ($0.5 \mu\text{M}$, 7 días) y Agudo Alta Concentración (a. c.) ($5.0 \mu\text{M}$, 24 h). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm D.S. ($n = 15$). *ANOVA, Prueba de Tukey $p \leq 0.05$, con respecto al control.

La Figura 16 además de mostrar los resultados de -SH totales y los correspondientes a GSH, muestra los valores de grupos -SH correspondientes a las proteínas, encontrando que estos últimos no mostraron cambio significativo en ninguno de los tratamientos con respecto al control.

Del ensayo realizado para determinar la relación de nmols de Hg requeridos para bloquear GSH, y sí este bloqueo se daba realmente con las

sustancias empleadas en estos experimentos, se obtuvieron los datos relacionados en la tabla 3.

Tabla 3.- Porcentaje de grupos -SH libres mediante la técnica de Ellman (1959) al hacer reaccionar GSH con HgCl₂

Glutación (nmol)	HgCl ₂ (nmol)	Glutación libre (nmol)	Glutación libre (%)
65.1	1	65.0	100
65.1	10	56.7	87
65.1	100	0.0	0

Con la finalidad de establecer si el contenido de GSH y grupos -SH encontrados en la Figura 16 correspondía al efecto tóxico ejercido por la presencia del HgCl₂, o bien a una respuesta propia de la célula, dada después de haber transcurrido el tiempo de exposición (7 días o 24h), se realizó un ensayo en donde las células se expusieron a las concentraciones de 0.5, 5.0 y 50 µM de HgCl₂ pero sólo por 1 h.

Los resultados pueden observarse en la Figura 16-B en donde se apreció que la cantidad de GSH, grupos -SH de las proteínas y grupos -SH totales, para cada una de las diferentes concentraciones de HgCl₂, no varía significativamente con respecto a los valores obtenidos en las condiciones referidas en la Figura 16.

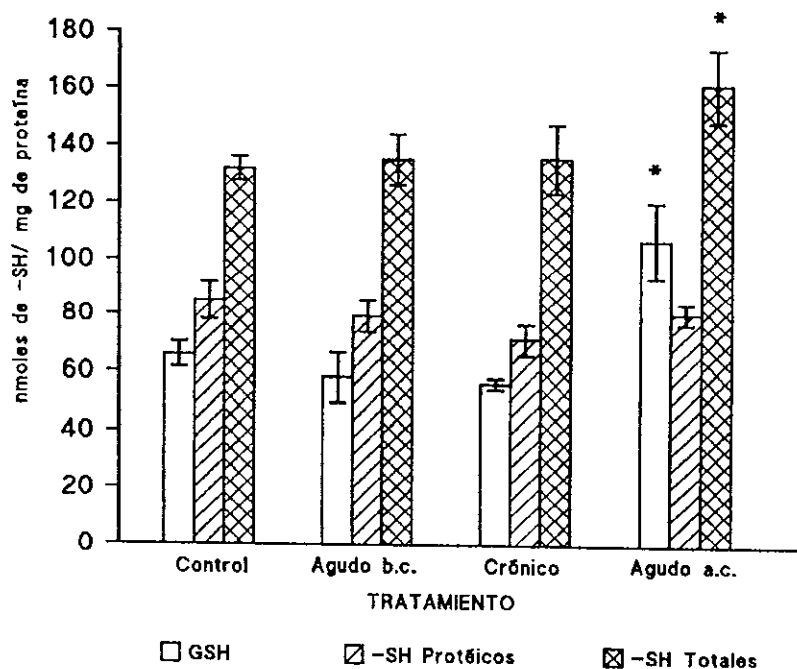


Figura 16.- Cantidad de glutatión (GSH) Y grupos -SH en células WRL-68 expuestas a HgCl_2 a los diferentes tratamientos: Control (sin metal), Agudo Baja Concentración (b. c.) ($0.5 \mu\text{M}$, 24 h), Crónico ($0.5 \mu\text{M}$, 7 días) y Agudo Alta Concentración (a. c.) ($5.0 \mu\text{M}$, 24 h). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm D.S. ($n = 15$). *ANOVA, Prueba de Tukey $p \leq 0.05$, con respecto al control.

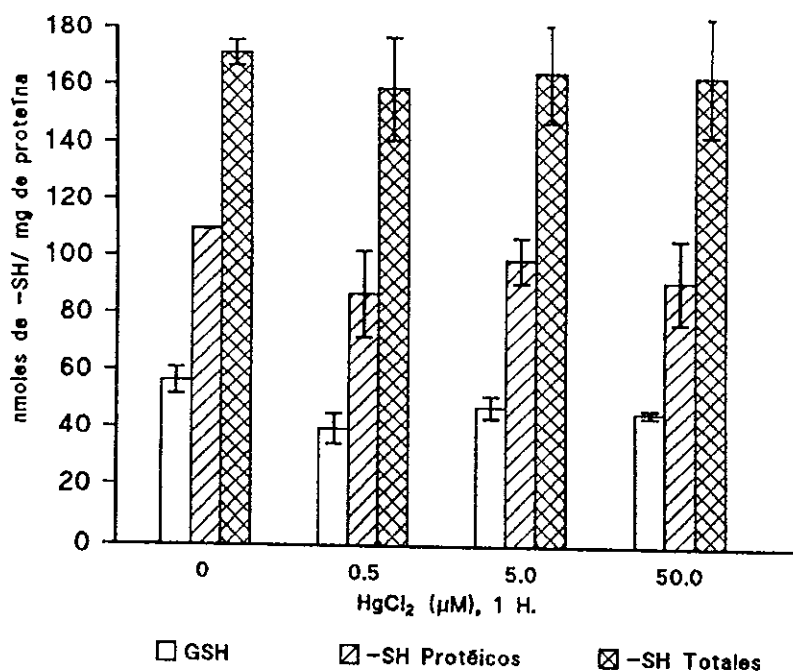


Figura 16 B.- Cantidad de glutatión (GSH) y grupos -SH en células WRL-68 expuestas a HgCl_2 , por 1h. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm D.S. ($n = 9$).

CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE METALOTIONEINA.

La metalotioneina (MT) es una proteína inducible de bajo peso molecular, que desempeña una función protectora contra la toxicidad causada por la presencia de diversos metales pesados o situaciones de estrés. Los valores del contenido de MT para las células control y expuestas a los diferentes tratamientos con Hg, mostraron valores por debajo de la sensibilidad del método utilizado y alrededor de la cantidad basal reportada, de $0.05 \pm 0.002 \mu\text{g}$ de MT/mg de proteína. Estos valores indican que la MT no es inducida por el Hg, en la línea celular WRL-68. Souza (1995) ha reportado que el Cd induce el contenido de MT de 50 a 100 veces con respecto al contenido basal en esta misma línea celular, el cual tiene un valor semejante al obtenido en este ensayo.

Los resultados mencionados hasta el momento, sólo nos indican el estado funcional en que se encuentra la célula al estar expuesta a los diferentes tratamientos con HgCl_2 . Para determinar el mecanismo de acción tóxica del Hg en la célula, se obtuvieron los siguientes datos:

CAPTACIÓN DE Hg POR LAS CÉLULAS WRL-68 EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HgCl₂.

En la Figura 17 se muestra la cantidad de Hg en nmoles por mg de proteína, presente en las células al ser expuestas a concentraciones de 0.5 a 5.0 μM del metal, durante 1 h a 4 y 37°C. Se observó que la cantidad de Hg presente en las células WRL-68, se incrementó en función de la concentración del metal, sin observarse cambios a las diferentes temperaturas. Con la finalidad de estudiar si esto sucedía con concentraciones mas altas del metal, se expusieron las células en presencia de hasta 200 μM de HgCl₂, por 1 h a las diferentes temperaturas. La Figura 18 muestra la cantidad de Hg presente en las células expuestas a concentraciones desde 0.5 hasta 200 μM en las condiciones ya mencionadas, en donde no se encontró diferencia en la cantidad de Hg presente en las células a concentraciones menores de 50 μM a las distintas temperaturas. Sin embargo, para concentraciones mayores de 50 μM la captación de Hg es mayor en las células que se incubaron a 37° en comparación a las que se incubaron a la temperatura baja. Los valores obtenidos para las exposiciones con 100, 150 y 200 μM , a 37°C mostraron en general que un 33 % de la captación del metal es vía un sistema sensible a la temperatura.

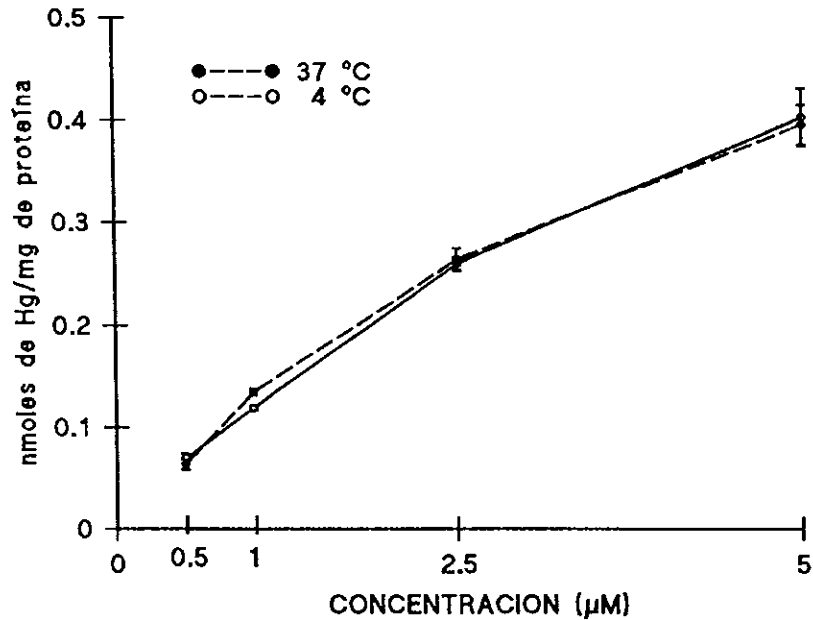


Figura 17.- Cantidad de mercurio por mg de proteína, en células WRL-68 expuestas 1h a 0.0, 0.5, 1, 2.5 y 5 μM de HgCl_2 , a 4 y 37°C. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm D.S. (n = 15).

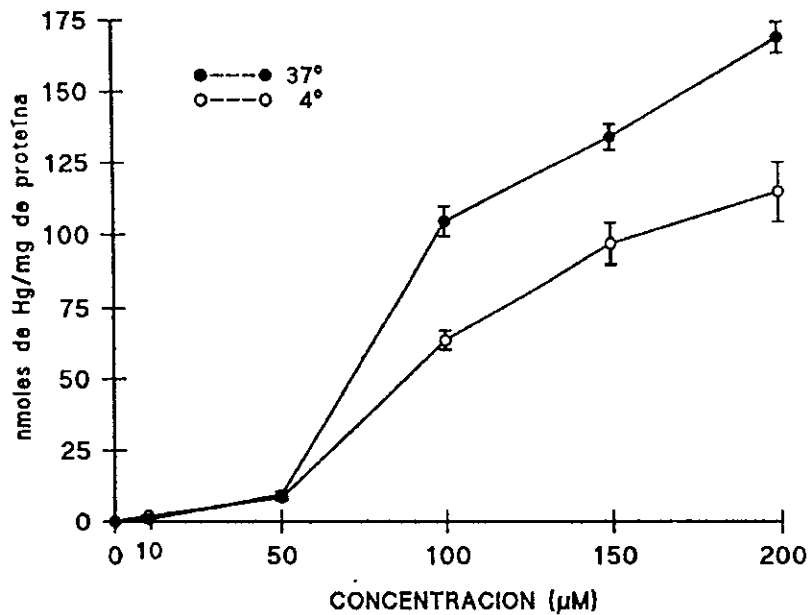


Figura 18.- Cantidad de mercurio por mg de proteína, en células WRL-68 expuestas 1h a 0, 10, 50, 100, 150 y 200 μM de HgCl_2 , a 4 y 37°C. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm D.S. (n = 15).

CAPTACIÓN DE Hg POR CÉLULAS WRL-68 EXPUESTAS A HgCl₂ A DIFERENTES TIEMPOS.

En la Figura 19 se muestra la cantidad de Hg presente en las células WRL-68 expuestas a 0.5 y 5.0 μM . La captación del metal presentó una forma bifásica, esto es, muy rápida en los primeros 5-10 min, para después mantenerse en una fase sostenida. Nuevamente, se pudo apreciar que la captación del Hg por las células es dependiente de la concentración, ya que las células expuestas a 5 μM de HgCl₂, presentaron en promedio 6.52 veces más para cada uno de los diferentes tiempos de exposición, que las expuestas a 0.5 μM .

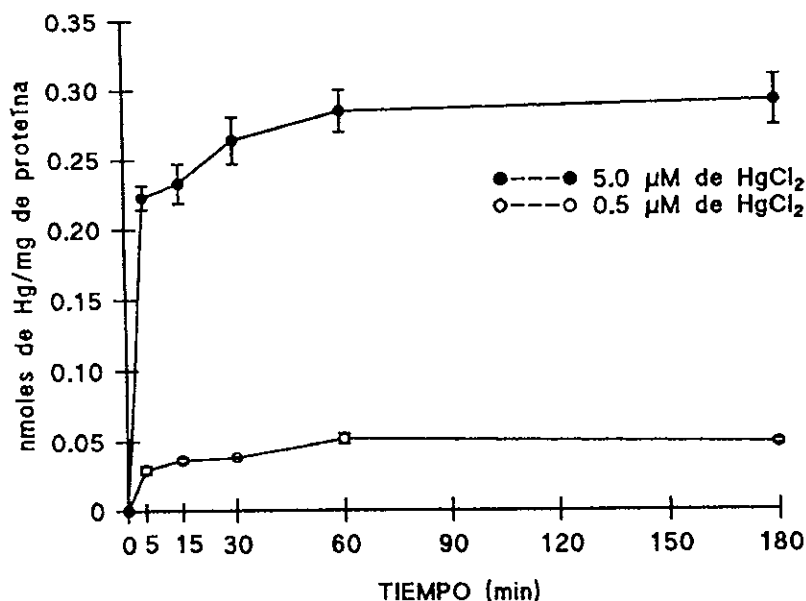


Figura 19.- Cantidad de mercurio por mg de proteína, en células WRL-68 expuestas a 0.5 y 5.0 μM de HgCl₂, por 5, 15, 30, 60, 120, 150 y 180 min. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm D.S. (n = 15).

CONTENIDO DE Hg EN MEMBRANA PLASMÁTICA, INTERIOR CELULAR Y LAS DIFERENTES SUBFRACCIONES CELULARES

La figura 20 muestra la cantidad de Hg/mg de proteína presente en el exterior e interior de las células WRL-68, en donde se puede observar que un 90 ± 5.6 % del total de Hg captado se encuentra localizado en el interior de la célula.

En los estudios realizados para determinar la cantidad de Hg presente en las diferentes subfracciones celulares, se utilizó el agente quelante EGTA, el cual es capaz de captar el Hg adherido a la parte externa de la membrana plasmática.

En la Figura 21 se muestra la gráfica del contenido de Hg presente en las diferentes subfracciones celulares por mg de proteína. Se observa una distribución diferencial con una afinidad alta, principalmente en las subfracciones nuclear y mitocondrial, ya que del total de Hg que entró, el contenido en cada una de estas fracciones fue de 37.5 ± 5.2 % y 47.7 ± 4.1 % respectivamente. Por otra parte, sólo se encontró en las fracciones microsomal y citosólica un 6.7 ± 0.6 y 8.1 ± 0.9 % de mercurio, respectivamente.

A cada una de las subfracciones celulares fue determinada la cantidad de ADN (Tabla 4), siendo la fracción nuclear la que presentó el mayor contenido con un 60.8 % mientras que las fracciones microsomal y citosólica, presentaron un 2.87 y 1.91 % de ADN, respectivamente.

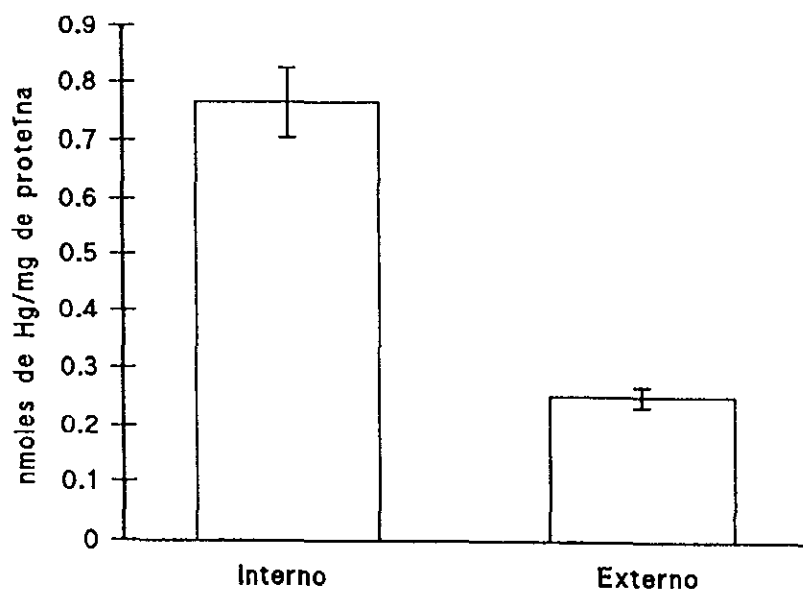


Figura 20.- Cantidad de mercurio por mg de proteína, en el interior y exterior de células WRL-68 expuestas 1h a $5.0 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm D.S. ($n = 15$).

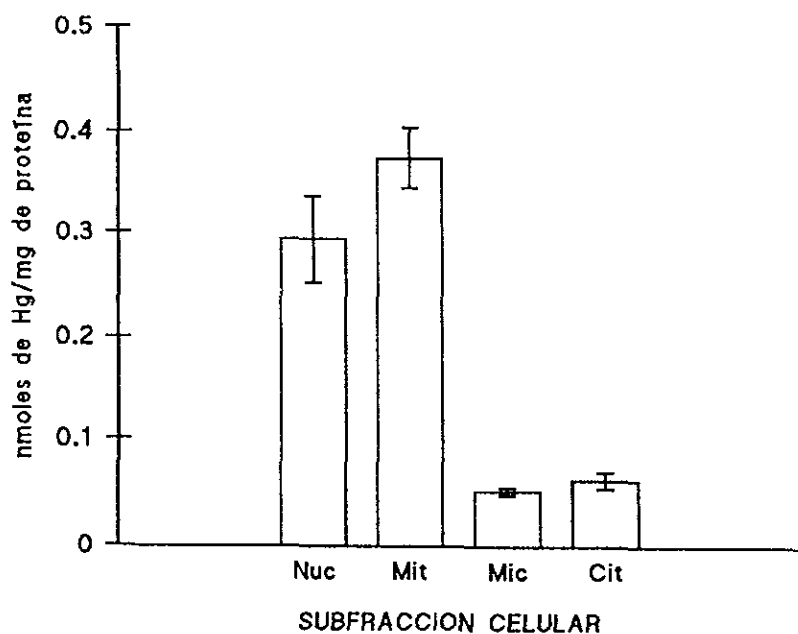


Figura 21.- Cantidad de mercurio por mg de proteína, en subfracciones de células WRL-68 expuestas 1h a $5.0 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm D.S. ($n = 15$).

Tabla 4.- Cantidad de ADN presente en cada subfracción celular.

Subfracción	No. de veces aumentado*
Homogenado celular	109.5 ± 2.1
Nuclear	31.8 ± 5.6
Mitocondrial	18.0 ± 4.0
Microsomal	1.5 ± 0.0
Citosólica	1.0 ± 0.5

* en comparación a la cantidad de ADN presente en citosol.

ELECTROFORESIS Y AUTORADIOGRAFÍA DE SUBFRACCIONES CELULARES.

La Figura 22 muestra una electroforesis de las diferentes fracciones celulares, obtenidas de células WRL-68 expuestas a 5.0 μM de HgCl_2 durante 1 h, en donde se aprecia el gran número de proteínas que contienen de 14 a 97 kd de peso molecular. Mediante análisis por densitometría se determinó la presencia de 12 bandas en la subfracción nuclear, 10 en la mitocondrial, 5 en la microsomal y 4 en la citosólica (Tabla 5). El gel duplicado al que se realizó la autorradiografía por contener ^{203}Hg Figura 23, mostró sólo una banda, en la fracción nuclear la cual corresponde a una proteína de alrededor de 76 kd de PM.

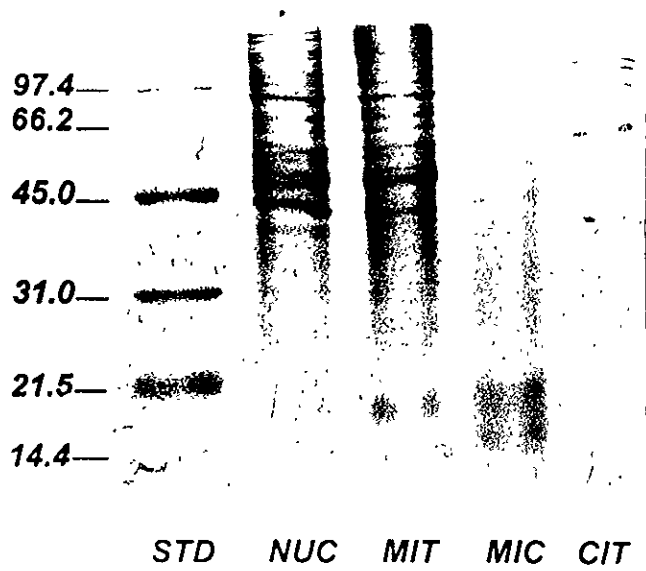


Figura 22.- Electroforesis de las diferentes subfracciones de células WRL-68 expuestas 1 h, a $5.0 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . Estándares de proteínas de Peso Molecular 97-14.4 Kd (STD), fracciones: nuclear (NUC), mitocondrial (MIT), microsomal (MIC) y citosólica (CIT).

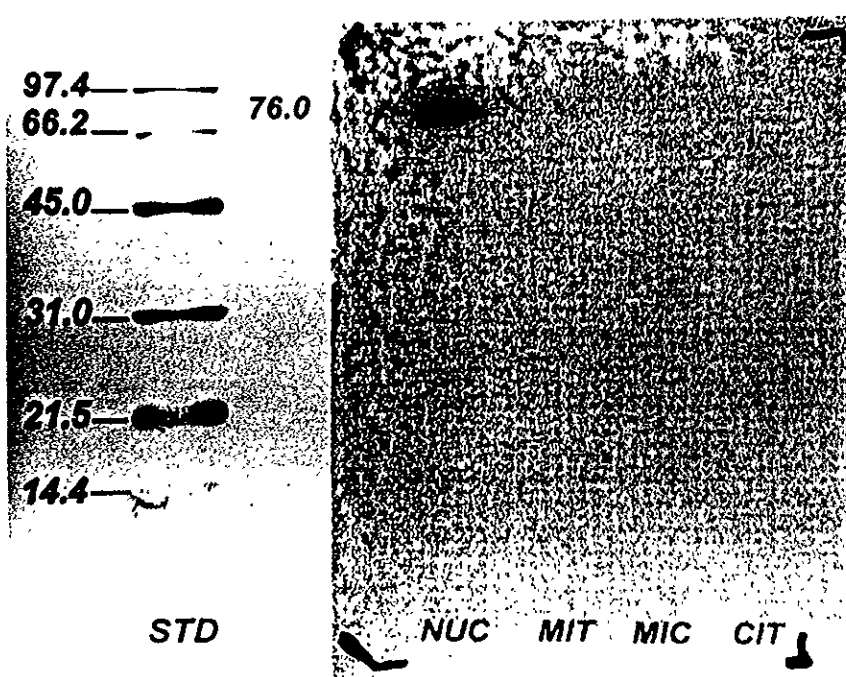
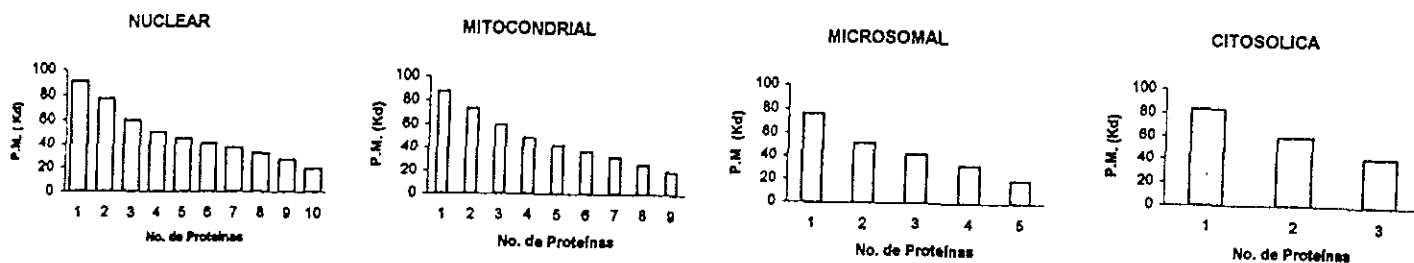


Figura 23.- Autorradiografía del gel de electroforesis de las diferentes subfracciones de células WRL-68, expuestas 1 h, a $5.0 \mu\text{M}$ de HgCl_2 con ^{203}Hg como trazador. Se indican los estándares de proteínas de Peso Molecular 97 - 14.4 Kd (STD) y las fracciones: nuclear (NUC), mitocondrial (MIT), microsomal (MIC) y citosólica (CIT).

Tabla 5.- Pesos Moleculares (Kd) de las diferentes proteínas encontradas en cada una de las fracciones de células WRL-68, expuestas 1 h a 5.0 μ M de HgCl₂

Estándar	Nuclear (10)	Mitocondrial (9)	Microsomal (5)	Citosólica (3)
97	90.5	87.0		83.5
	76.6	73.1	76.6	
66.2	59.7	59.7	51.5	59.7
	49.9	48.3		
45.0	44.3	42.0	42.0	42.0
	40.1	36.6		
	36.6	36.6		
	32.4	31.7	32.4	
31	27.0	25.5		
21.5	19.5	19.5	19.5	
14.4				

() Número de bandas localizadas por el densitómetro.



DISCUSION.

La utilización de modelos *in vitro* para el estudio de los efectos que producen diversos agentes xenobióticos producidos de manera natural o antropogénicamente, han tomado auge en los últimos años.

Los hepatocitos *in vitro* han sido utilizados como sistemas modelo en gran variedad de estudios, incluyendo los mecanismos de transporte, funciones metabólicas, biotransformación y estudios toxicológicos. La línea celular WRL-68 de origen fetal, hepático, humano, mantiene características que la hacen un sistema adecuado para evaluar las alteraciones resultantes de la exposición a un agente tóxico (Gutiérrez y col. 1994).

Aunque existen en la literatura estudios asociados con la toxicidad del mercurio, el mecanismo por el cual este metal induce la respuesta tóxica a nivel celular aún no ha sido identificado. Es por ello, que el presente trabajo se centró en la determinación de algunos parámetros considerados como medida de citotoxicidad en células WRL-68 expuestas a tres diferentes tratamientos con HgCl_2 : agudo baja concentración ($0.5 \mu\text{M}$ durante 24 H), agudo alta concentración ($5.0 \mu\text{M}$ durante 24 H) y crónico ($0.5 \mu\text{M}$ durante 7 días). Asimismo, se determinaron algunas características del sistema de transporte del metal y su distribución en el interior celular.

Las concentraciones elegidas para los distintos tratamientos se tomaron considerando tres criterios fundamentales:

- curva de viabilidad de las células WRL-68 expuestas a HgCl_2 ,

- proliferación celular por varios días en un medio con Hg y
- capacidad de adhesión celular después del tratamiento con el metal.

Las condiciones experimentales utilizadas, tomando en cuenta estos criterios, permitieron evaluar que los parámetros determinados eran el reflejo del daño producido por el metal y no una respuesta celular inespecífica ante un daño masivo general.

La literatura sobre diversos estudios de toxicología de metales pesados, muestra que, a pesar de los distintos objetivos perseguidos por otros grupos de investigación y los modelos utilizados para ello, las concentraciones de metal utilizadas están en el mismo intervalo que en el presente estudio. Beattie y col. (1990), en su ensayo con hepatocitos de hígado de rata exponen sus células por 2 h a 5.0 y 10.0 μM de HgCl_2 (considerando como baja y alta concentración respectivamente); Aleo y col. (1992), utilizan HgCl_2 en concentraciones que van de 0.04 a 34.2 μM y ven su efecto en células de túbulo renal de conejo; Brookes (1992), también trabaja con concentraciones menores a 1 μM y su objetivo es evaluar el efecto del Hg sobre la actividad del glutamato, para determinar toxicidad en el sistema nervioso central; Ariza y col. (1994), para determinar el efecto mutagénico que tiene el Hg en células eucarióticas, emplearon concentraciones de 1-25 μM de Hg en forma de acetato.

Recientemente Strubelt y col. (1996), emplearon concentraciones de 10 y 30 μM de HgCl_2 para exponer células de hígado de rata perfundido.

No obstante las diferencias que presentan dichos trabajos en cuanto a los

objetivos que desean alcanzar, los intervalos de concentración del metal utilizados son similares a los empleados en este trabajo, independientemente del tipo de células que se usen como modelo de estudio. Estas concentraciones reflejan el deseo de estudiar los efectos tóxicos que ocurren a nivel celular, pero sin causar un daño generalizado que pudiera dar una respuesta inespecífica.

La determinación de la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión de azul de tripano, mostró que a medida que las células son expuestas a concentraciones mayores de HgCl_2 , la viabilidad celular disminuye. Aleo, y col., 1992; Ashour, y col., 1993; Ariza, y col., 1994, han utilizado esta misma técnica para determinar la viabilidad celular ante exposiciones con HgCl_2 , encontrando un 100% de muerte celular al emplear 50 μM de Hg. Las exposiciones con Hg en forma orgánica presentan mayor toxicidad que al encontrarse en forma inorgánica, debido a que son mas liposolubles. La utilización del metal como HgCl_2 en el presente estudio, permitió que al ionizarse la sal en el sistema acuoso del medio, la acción del Hg^{2+} fuera en forma directa y la presencia del Cl^- no interfiriera con los objetivos planteados. Otro parámetro considerado como criterio de elección para las condiciones de tratamiento, fue la cinética de proliferación celular, en donde las células expuestas a 0.5 μM muestran una curva semejante a la de células control. En estas condiciones fue posible observar que las células expuestas al Hg presentaron una mayor proliferación a los 7 y 8 días de cultivo, haciendo pensar que el Hg ejerce un efecto mitogénico. Reardon y Lucas (1987) al utilizar células de músculo liso de aorta de conejo, encontraron que el Hg es tóxico a altas

concentraciones pero a bajas es mitogénico, por lo que el aumento que se observó en la proliferación de las células WRL-68 (Fig. 6), debe ser causado por un efecto estimulador de la proliferación, que puede explicarse en base a que el Hg acortó el tiempo del ciclo celular, probablemente en la fase G₁, efecto que también se ha observado con otros metales pesados (Lu y col., 1990).

Las alteraciones ultraestructurales observadas por microscopía electrónica de transmisión (Fig. 8), muestran proliferación del Retículo Endoplásmico Rugoso (RER), pérdida de ribosomas del RER y aparición de lisosomas secundarios. Pocos son los trabajos que se han enfocado a este aspecto, sin embargo, efectos similares a los reportados han sido descritos por Lachapelle y col. (1993), tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. Recientemente, Kishimoto y col. (1995), publicaron que en células endoteliales cultivadas en presencia de metilmercurio, presentaron: mitocondrias hinchadas, densidad citoplásmica reducida y dilatación del RER. Esto último indica que las alteraciones ultraestructurales causadas por efecto de la toxicidad del mercurio, pueden variar dependiendo del sistema utilizado, la forma química, concentración y tiempo de exposición del Hg.

También se observó la presencia de arreglos atípicos de la cromatina lo que se ha reportado como indicio de daño apoptótico, en este caso causado por la presencia del Hg, efecto que recientemente ha sido descrito por Shenker y col. (1997), ya que en su trabajo concluyeron que el Hg puede ser capaz de inducir apoptosis en células T.

La actividad extracelular de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) considerada como indicadora de daño citotóxico se incrementó en los tratamientos

agudos, tanto con baja como con alta concentración, no así en el tratamiento crónico, indicando que la determinación de la LDH es una medida de daño a tiempos cortos de tratamiento. Stacey y Kappus, 1982; Beattie y col., 1990 y Lachapelle y col., 1993; publicaron no haber encontrado liberación de LDH en células expuestas a Hg a concentraciones cercanas a las utilizadas en este trabajo.

Aleo y col., (1992), evaluaron la LDH en células renales expuestas a Hg orgánico e inorgánico, encontrando, que la actividad de la enzima disminuye a nivel celular, indicando que la liberación de la enzima al medio de cultivo es producto de alteraciones en la integridad de las células (Fig. 10).

Las actividades enzimáticas de la alanin y aspartato amino transferasas (ALAT y ASAT) (Figs. 11 y 12) se incrementaron en las células expuestas a los tratamientos agudo b. c. y agudo a. c., mostrando la sensibilidad de éste parámetro ante el efecto tóxico del Hg a tiempos cortos y además que es dependiente de la concentración. Estos datos concuerdan con los valores elevados de ALAT y ASAT, encontrados por investigadores que realizan estudios con metales (Kershaw y col. 1990; Shomita y col. 1991).

La actividad de ALAT y ASAT en las células expuestas al tratamiento crónico, (Figs. 11 y 12) no mostraron cambios significativos con respecto al control, posiblemente debido a la propia respuesta que da la célula ante un daño tóxico o bien a procesos de tipo adaptativo o de recuperación, que desarrolla en un medio con Hg a concentración baja o bien a que son indicadores de daño reciente.

El grado de lipoperoxidación es un parámetro indicador de daño, producido por un agente xenotóxico, ya que éste al entrar en contacto con las células y lograr

internalizarse, comienza a generar radicales libres en la membrana plasmática. Los radicales libres a su vez desencadenan una serie de reacciones desestabilizando otros sistemas internos y generan cada vez, mayor número de radicales libres. En este trabajo, se encontró que el valor del grado de lipoperoxidación para las células expuestas al tratamiento b. c., permaneció semejante al de las células control mientras que para los tratamientos crónico y agudo a.c. se incrementó, ya que el Hg ejerce daño en las membranas al desestabilizarlas para formar radicales libres, dependiendo tanto de la concentración como del tiempo de exposición. Bano y Hasan, (1989) han reportado incremento en el grado de lipoperoxidación en estudios de exposición a Hg tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los resultados obtenidos en la cantidad de grupos -SH totales en células expuestas a Hg, mostraron que sólo en el tratamiento agudo a. c. hubo mayor cantidad de -SH en comparación al control (Fig. 14). Este incremento podría deberse a un aumento en la cantidad de glutatión (GSH) o bien de grupos -SH de tipo proteico, se comprobó que se debió a una mayor cantidad de GSH (Fig. 15) y no de grupos -SH proteicos (Fig. 16).

Se esperaba que las células expuestas con Hg, mostraran cantidades bajas de GSH (Figs. 14 y 15), sin embargo, es posible que la concentración utilizada en los tratamientos no sea suficiente como para causar una disminución en la cantidad de GSH, o bien el tiempo de exposición es tan alto que la interacción del Hg con organelos u otros agentes protectores o captadores del metal ocurra en los primeros minutos y los valores obtenidos del GSH sean el reflejo de una recuperación o adaptación a las condiciones del tratamiento empleado. Los

resultados obtenidos de GSH y grupos -SH presentes en las células cuando se expusieron al metal por 1 h, para establecer si ocurrían en este tiempo (Fig. 16B), no mostraron cambios con diferencias significativas con respecto a los de 24 h (Fig. 16).

En los experimentos para determinar el efecto de Hg sobre la cantidad de GSH, se utilizaron concentraciones del orden de 0.5, 5.0 y 50 μM de HgCl_2 (Figs. 16 y 16B) que corresponden a 0.5, 5.0 y 50 nmoles de Hg/ml en el medio de cultivo, con los datos de captación de Hg por las células, figuras 17 y 18, se pudo establecer que para exposiciones con concentraciones de 0.5, 5 y 50 μM hay un promedio de captación de Hg del medio, del orden de $37.15\% \pm 4.14\%$ lo que corresponde a cantidades aproximadas de: 1.2, 12 y 120 nmoles de Hg/mg de proteína que logran entrar a las células, valores que aparentemente no afectan las concentraciones de GSH o grupos -SH proteicos. Para la exposición con 50 μM en donde tampoco hay cambios en la cantidad de GSH aún cuando la cantidad de Hg que entra a las células es mayor, gran parte de este es captado por los grupos -SH de las proteínas de membrana y sólo una mínima cantidad entra a la célula, que no es suficiente como para disminuir los niveles de GSH.

Algunos autores han reportado la disminución de los niveles de GSH, como efecto de exposición a metales pesados como el Hg, sin embargo, la disminución también está en función de la concentración utilizada y del tiempo de exposición que llega a ser de pocos minutos. Ariza y col., (1994), evaluaron la cantidad de glutatión reducido y oxidado en células expuestas a 1-25 μM de HgCl_2 y aunque

mostraron una disminución en las cantidades de GSH, hacen la observación de que ésta, sólo ocurrió a concentraciones de Hg en donde se pudo observar muerte celular de manera significativa. Strubelt y col., (1996), publicaron que la cantidad de GSH en células perfundidas de hígado de rata expuestas a Hg, se reducen hasta en un 80% en comparación al control, sin embargo, utilizaron concentraciones de hasta 30 μM por 90 min. En el presente trabajo los valores de GSH, no cambiaron significativamente en comparación al control y las concentraciones utilizadas no afectaron el porcentaje de viabilidad (Fig. 5).

El incremento de GSH que se observó en las células expuestas al tratamiento agudo a. c., posiblemente sea una respuesta que tiene la célula para reaccionar ante el efecto tóxico que el Hg ejerce en ella. Hay estudios, mostrando que agentes xenobióticos como el etanol, inducen incremento de GSH total en cerebro y sugieren que es en respuesta a un mecanismo protector en este órgano o bien que la cantidad elevada de GSH se debe a que es suplementado desde otros órganos (Wlodek y Rommelspacher, 1994). Eaton y col., (1980), publicaron que al exponer riñón de rata a Hg, se observó un incremento en la cantidad de GSH. Nielsen y col., (1991), al trabajar con riñón de ratas, a las que administraron oralmente diferentes dosis (25, 50 100 y 200 μM) de HgCl_2 por Kg de peso corporal, también mostraron haber encontrado cantidades elevadas de GSH, pero sólo en la dosis menor, y una disminución en el nivel de GSH en el tratamiento de la dosis mas alta. Ellos comentan que el aumento pudo deberse a la inducción de la síntesis de GSH, aumentando la captación renal del complejo de Hg con GSH y la inhibición de

enzimas que catabolizan al GSH.

Verity, (1995), menciona que la cantidad de glutatión, el principal antioxidante celular, aumentó en riñón de rata durante un tratamiento con metilmercurio y en estudios previos, también comprobó el incremento de GSH en neuronas de cerebro, a las 24 h de exposición a concentraciones bajas de metilmercurio, explicando esto como una respuesta adaptativa inicial al estrés oxidativo inducido por el metilmercurio.

Aunque estos datos muestran la posibilidad de obtener un incremento en los valores de GSH como ocurrió en el presente estudio, es difícil establecer una correlación entre los ensayos ya que estos difieren en las concentraciones, la forma química del Hg y los sistemas biológicos utilizados.

Referente a la metalotioneína (MT), proteína de bajo peso molecular que interviene en la detoxificación en células expuestas a metales, se ha publicado que es inducida en diferentes tipos de tejido y por diferentes metales, pero sólo para ciertas concentraciones (Eaton y col., 1980; Bracken y Klaassen, 1987). Hay reportes de que el Hg es capaz de inducir MT en tejidos renales. En las células WRL-68 de origen hepático la MT no fue inducida por el Hg aunque sí fue inducida en grandes cantidades por Cd (Souza,1995). Algunos investigadores también han obtenido que es un pobre inductor en tejido hepático (Gerson y Shaikh, 1982; Mitane y Tohyama, 1988; Chan y col., 1992).

De los resultados obtenidos con la finalidad de establecer un mecanismo de acción tóxica del Hg a nivel celular, se encontró que la cantidad de Hg internalizado en células expuestas a bajas concentraciones (Figs. 17 y 18), se debe a procesos

independientes de temperatura. Gerson y Shaikh (1984), en su trabajo, ya daban indicios de que la captación de Hg en cultivo primario de hepatocitos podía ser por difusión pasiva. Al exponer células a altas concentraciones de Hg (50-200 μM) a 4 y 37°C, la cantidad de Hg internalizado no fue el mismo en las células para ambas temperaturas (Figura 18), ya que se encontró una mayor cantidad del metal en las células expuestas a 37°C con respecto a las de 4°C, lo que indica que en la entrada de Hg puede intervenir un translocador el cual disminuye su movilidad a temperaturas bajas. Blazka y Shaikh (1992), reportaron datos semejantes a los encontrados en el presente trabajo, que refieren una igual captación de Hg por hepatocitos aislados de rata al exponerlos a 3 μM de Hg. Blazka y col. (1992), también mostraron que no hay diferencia en la captación de Hg al exponer los hepatocitos a 3 μM de HgCl_2 a tiempos menores de 30 min, a las diferentes temperaturas de 4 y 37°C.

Kajiwara y col., (1996), al realizar estudios de transporte de Hg en forma de metil mercurio a través de la placenta de ratas, sugieren que dicho transporte es llevado a cabo mediante la intervención de algún tipo de acarreador de aminoácidos y plantean un posible mecanismo de transporte, en donde el metilmercurio forma un complejo con algunos aminoácidos y de esta forma el Hg puede atravesar la barrera placentaria, sin embargo esto no ha sido comprobado.

La cantidad de Hg en las células que estuvieron expuestas a 0.5 y 5.0 μM de Hg (Fig. 19), corresponde tanto al unido a la membrana como al que logró entrar, por un sistema de transporte no dependiente de temperatura, como ha sugerido

Endo y col., (1995), al reportar que parte del HgCl_2 logra penetrar a través de canales o translocadores. Aleo y col., (1992) refieren que la acumulación de Hg en las células presenta un comportamiento lineal al utilizar concentraciones bajas, pero se desvía la linearidad a concentraciones altas, sugiriendo que esto ocurre debido a una menor eficiencia de captación del Hg. Datos similares también son reportados por Gerson y Shaikh (1984) y Blazka y Shaikh (1992), para concentraciones menores de $10 \mu\text{M}$ y a tiempos de exposición cortos (menores de 20 min). En los resultados también se pudo observar una fase rápida de captación del Hg en los primeros 5 min, para después mantenerse constante, esto se explica si al entrar el Hg en contacto con la célula interacciona inmediatamente con los grupos -SH de las proteínas de la membrana plasmática, pero conforme pasa el tiempo parte del Hg entra a la célula y se establece un equilibrio en el contenido inter y extracelular.

Blazka y col. (1992), reportaron que el EGTA es un agente quelante muy eficiente en la captación de Hg adherido a la membrana plasmática, un año antes ya se había comprobado que el EGTA no era capaz de atravesar la membrana de hepatocitos, pero sí de captar y remover el metal que no ha sido internalizado (Blazka y Shaikh, 1991). El EGTA se utilizó en el presente ensayo para lavar las células expuestas a Hg y así poder determinar la cantidad del metal adherido a la membrana plasmática e internalizado, así como en cada una de las subfracciones celulares. La Figura 20, muestra que la cantidad de Hg adherido a la membrana plasmática es del orden del 10% del total de Hg presente en la célula.

Referente a la cantidad de Hg distribuido en las diferentes fracciones

celulares (Fig. 21), pocos son los resultados encontrados en la literatura. Chmielnicka y col., (1983), publicaron que en tejido hepático el Hg tiene una preferencia por acumularse en la subfracción nuclear y mitocondrial, sin embargo, también encontraron que la fracción citosólica presentó un elevado porcentaje del metal, resultado muy diferente al obtenido en este trabajo. La cantidad de Hg presente en el citosol, en el presente trabajo muestra una correlación con la cantidad de MT, ya que ésta al no inducirse no ocasiona la captación del metal. Aunque se ha reportado (Souza, 1995), que en las células WRL-68 la MT fue inducida al exponerlas a Cd.

Al encontrar baja cantidad de Hg en microsomas, tenemos la certeza de que los lavados con EGTA, lograron liberar el Hg unido a la membrana, y que el 10% de Hg presente en membrana se debe a la poca cantidad de metal enlazado a ella y no a la baja afinidad del EGTA por el Hg.

Los resultados de la electroforesis de las subfracciones celulares (Fig. 22 y Tabla 5) mostraron la alta variabilidad de proteínas presentes en cada una de ellas, ya que al menos se determinaron 18 diferentes pesos moleculares de proteínas celulares, algunas de ellas presentes en dos o más subfracciones. En la autorradiografía (Fig. 23) sólo se pudo determinar la presencia de una banda en la subfracción nuclear, con alto contenido de ^{203}Hg , la cual correspondió a una proteína de alrededor de 76 Kd. En la Tabla 5, se puede apreciar que la proteína correspondiente a este PM, también se localiza en la subfracción microsomal, sin embargo, esta no se aprecia en la autorradiografía debido a la baja cantidad de cpm presentes.

Finalmente, podemos mencionar que el Hg ejerce su efecto tóxico a nivel celular, por medio de una serie de interacciones directas e indirectas, que se van desencadenando (Fig. 24). Una vez que el Hg entra en contacto con la célula, un porcentaje de Hg^{2+} queda adherido a las proteínas de la membrana plasmática y otro se internaliza a través de ella, posiblemente mediante la intervención de uno o varios translocadores y así llegar a organelos como el núcleo y las mitocondrias. La presencia del Hg genera la lipoperoxidación en las membranas ocasionando se afecte la integridad celular, lo que provoca la liberación de enzimas como lactato deshidrogenasa (LDH), alanin amino y aspartato transaminasas (ALAT y ASAT). El Hg tiene alta afinidad por las mitocondrias y el núcleo, el cual presenta alteración de la envoltura nuclear debido a la presencia del metal, estos organelos probablemente presenten una proteína de PM alrededor de 76 Kd que tenga alta afinidad por enlazar Hg. El glutatión (GSH) al parecer no ejerce su función protectora además de que no hay inducción de metalotioneina (MT) que contrarreste el efecto tóxico ocasionado por el Hg.

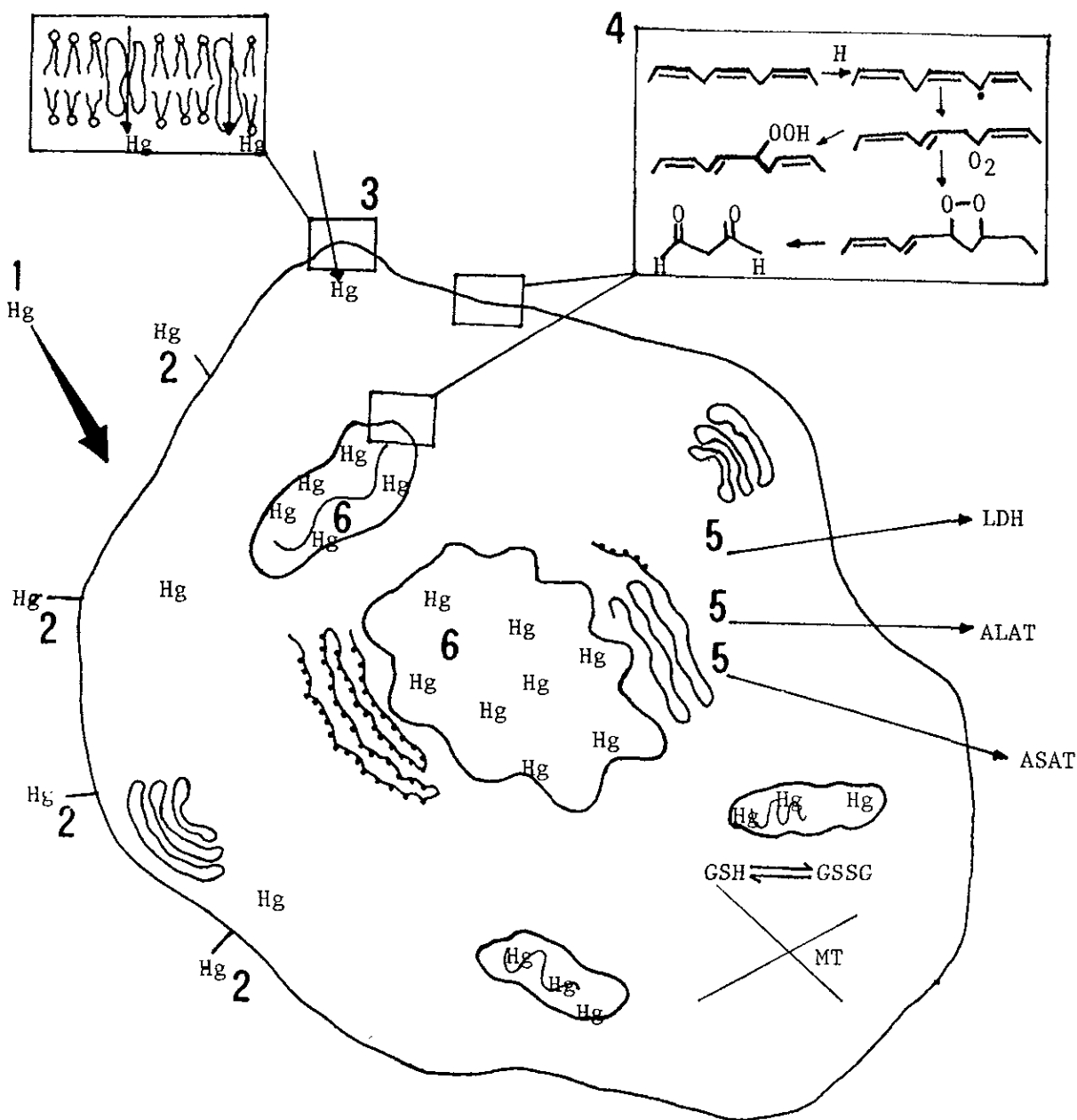


Figura 24.- Esquema general de una célula, en donde se muestran los efectos que sufrieron distintos parámetros como: Actividad enzimática de Lactato Deshidrogenasa (LDH), Alanin y Aspartato Amino Transferasa (ALAT y ASAT); Grado de Lipoperoxidación; Contenido de grupos -SH y Glutati6n (GSH); sntesis de Metalotioneina (MT) y entrada de Hg, despu6s de una exposici6n a HgCl₂ en diferentes condiciones.

CONCLUSIONES

1.- Al exponer células WRL-68 a un medio que contenga de 0.5 hasta 200 μM de HgCl_2 , parte del metal queda adherido a la membrana plasmática y otra parte se internaliza en la célula.

2.- El efecto tóxico del Hg comienza a manifestarse con la liberación de enzimas citosólicas como Lactato Deshidrogenasa (LDH), Alanin Amino Transferasa (ALAT) y Aspartato Amino Transferasa (ASAT).

3.- Las enzimas LDH, ALAT y ASAT son parámetros sensibles a la presencia del Hg, dependientes de la dosis.

4.- Al haber un daño directo a la membrana plasmática se genera lipoperoxidación. El grado de lipoperoxidación es dependiente tanto de la dosis como del tiempo de exposición.

5.- El glutatión no actúa como agente hepatoprotector, a los tiempos de exposición con el Hg que se utilizaron en este ensayo.

6.- La metalotioneína, proteína inducida por la presencia de metales pesados no es generada por la presencia del Hg, en este tipo celular de origen fetal hepático humano.

7.- La entrada de Hg a través de la membrana plasmática se realiza mediante la intervención de uno o varios translocadores y dependiendo de la dosis a la que se encuentran expuestas estas células.

8.- El Hg se distribuye principalmente en núcleo y mitocodrias.

9.- La escases de Hg en el citoplasma concuerda con la ausencia de MT, que

no es inducida por este metal.

10.- Las alteraciones en la forma de mitocondrias y núcleo, se deben a la alta proporción que encontramos de Hg en ellos.

11.- Se localizó una proteína nuclear de 76.0 Kd a la cual se liga el Hg.

El mecanismo por el cual el Hg causa efectos tóxicos en la célula se origina desde el momento en que ésta entra en contacto con el metal, es difícil determinar que eventos se dan primero, pero se puede establecer que al interactuar primero con la membrana plasmática, se genera la lipoperoxidación, la cual a su vez, puede desencadenar la liberación de las enzimas tanto citosólicas como transmembranales. Además de generarse consecutivamente mas lipoperoxidación en otros sistemas membranales internos, como son el retículo endoplásmico , el aparato de Golgi, mitocondrias, etc., la acumulación del Hg en ciertos organelos como núcleo y mitocondrias, provoca en ellos alteraciones morfológicas. Al ser la mitocondria afectada, se provoca una disminución en la producción de energía, que a su vez desencadena que se afecten muchas funciones metabólicas que la requieren, por otra parte, al presentarse una gran cantidad del metal en el núcleo, se pueden dar alteraciones a nivel de ADN, que trae consigo que se afecte la información requerida para los procesos de traducción y transcripción de proteínas requeridas para la funcionalidad celular. Los sistemas de protección celular, glutatión y metalotioneina, no actúan para los tipos de tratamiento, empleados en este ensayo, sin embargo, la célula se adapta a vivir en las condiciones crónicas por lo que ciertos mecanismos de defensa tienen que actuar.

PERSPECTIVAS.

- Hacer estudios que tengan como fin revertir el daño causado por el Hg y ver si las células recuperan su funcionalidad.

- Conocer el tipo y forma de acción del o los translocadores que intervienen en el paso del Hg a través de la membrana plasmática.

- Estudiar si estos translocadores u otros factores (canales) intervienen en la entrada de Hg cuando se exponen las células a dosis menores de 0.5 μM

- Analizar si la entrada de Hg al interior celular, depende de la presencia de energía.

- Si el glutatión no actúa como agente hepatoprotector, a los tiempos empleados en este ensayo, determinar si lo hace a tiempos muy cortos.

- Si el glutatión y la metalotioneína no actúan para la protección de la célula, ¿cómo se defiende ésta?

- Qué factores impiden que la metalotioneína no se induzca con Hg, pero sí con otros metales como el Cd.

- ¿Qué tipo de proteína es la que liga el Hg preferentemente y a qué se debe?

- ¿Qué utilidad real tienen los agentes quelantes utilizados terapéuticamente y si esto se refleja *in vitro*, en las células WRL-68.

BIBLIOGRAFIA

Al-Saleh y Shinwari, N. 1997. Urinary mercury levels in females: Influence of skin-lightening creams and dental amalgam fillings. *Biometals*. 10:315-323.

Aks, S.E., Erickson, T., Brauches, F.J.P., Noleway, C., Chow, H-N., Levy, P. y Hryhorczuk, D. (1995). Fractional mercury levels in Brazilian gold refiners and miners. *Clin Toxicol*. 33:1-10.

Aleo, M.D., Taub, M.L. y Kostyniak, P.J. (1992). Primary cultures of rabbit renal proximal tubule cells. III. Comparative citotoxicity of inorganic and organic mercury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 112:310-317.

Amin-Zaki, L., Elhassani, S.B., Majeed, M.A., Clarkson, T.W., Doherty, R.A. y Greenwood, M. (1974). Intrauterine methylmercury poisoning in Iraq. *Pediatrics*. 54:587-595.

Angelow, R.V. y Nicholls, D.M. (1991). The effect of mercury exposure on liver mRNA translatability and metallothionein in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol*. 100:439-444.

Anttila, S. (1990). Biological effects of occupational and environmental exposure to chromium. In: *Metal Ions in Biology and Medicine*. Eds. Ph. Collery, LA. Poirier, M, Manfait, J.C. Etienne. John Libbey Eurotext, Paris. pp 315-319.

Aposhian, H.V., Maiorino, R.M., Rivera, M., Bruce, D.C., Dart, R.C. Hurlbut, K.M., Levine, D.J., Zheng, W., Fernando, Q., Carter, D. y Aposhian, M.M. (1992). Human studies with the chelating agents, DMPD and DMSA. *Clin Toxicol*. 30:505-528.

Ariza, M.E., Holliday, J. y Williams, M.V. (1994). Mutagenic effect of mercury (II) in eukaryotic cells. *In Vivo*. 8:559-564.

Aschner, M., Chen R. y Kimelberg, H.K. (1991). Effects of mercury and lead on rubidium uptake and efflux in cultured rat astrocytes. *Brain Res Bull*. 26:639-642.

Ashour, H., Abdel-Rahman, M. y Khodair, A. (1993). The mechanism of methyl mercury toxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Lett*. 69:87-96.

Aula, J., Braunschweiler, H. y Malin, I. (1995). The watershed flux of mercury examined with indicators in the Tucuruí reservoir in Pará, Brazil. *Sci Tot Environment*. 175:97-107.

Bano, Y. y Hasan, M. (1989). Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxidation in different body organs of cat-fish *Heteropneustes fossilis*. *J Environ Sci Health. Part B.* 24:145-166.

Beattie, J.H., Marion, M., Schmit, J-P y Denizeau F. (1990). The cytotoxic effects of cadmium chloride and mercuric chloride mixtures in rat primary hepatocyte cultures. *Toxicology.* 62:161-173.

Bernard, A.M., Collette, C. y Lauwerys, R. (1992). Renal effects of in utero exposure to mercuric chloride in rats. *Arch Toxicol.* 66:508-513.

Bigas, M., Amiard-Triquet, C., Durfort, M. y Poquet, M. 1997. Sublethal effects of experimental exposure to mercury in european flat oyster *Ostrea edulis*: cell alterations and quantitative analysis of metal. *Biometals.* 10: 277-284.

Blazka, M.E. y Shaikh, Z.A. (1991). Differences in cadmium and mercury uptakes by hepatocytes: role of calcium channels. *Toxicol Appl Pharmacol.* 110:355-363.

Blazka, M.E. y Shaikh, Z.A. (1992). Cadmium and mercury accumulation in rat hepatocytes: interactions with other metal ions. *Toxicol Appl Pharmacol.* 113:118-125.

Blazka, M.E., Yoshida, M. y Shaikh, Z. A. (1992). Comparison of cadmium, mercury and calcium accumulations by isolated hepatocytes of the small skate (*Raja erinacea*) and rat. *Comp Biochem Physiol.* 101:631-639.

Bluhm, R.E., Bobbitt, R.G., Welch, L.W., Wood A.J.J., Bonfiglio, J.F., Sarzen, Ch., Heath, A.J. y Branch, R.A. (1992a). Elemental mercury vapour toxicity, treatment, and prognosis after acute, intensive exposure in chloralkali plant workers. Part I: History, neuropsychological findings and chelator affects. *Hum Exper Toxicol.* 11:201-210.

Bluhm, R.E., Breyer, J.A., Bobbitt, R.G., Welch, L W., Wood, A.j.j. y Branch, R.A. (1992b). Elemental mercury vapour toxicity, treatment, and prognosis after acute, intensive exposure in chloroalkali plant workers. Part II: Hyperchloraemia and genitourinary symptoms. *Hum Exp Toxicol.* 11:211-215.

Boffeta, P., Merler, E., Vainio, H. (1993). Carcinogenicity of mercury and mercury compounds. *Scan J Work Environ Health.* 19:1-7.

Bracken, W.M. y Klaassen, C.D. (1987). Induction of metallothionein in rat primary hepatocyte cultures: evidence for direct and indirect induction. *J Toxicol Environ Health.* 22:163-174.

Braeckman, H., Raes, H. y Van Hove, D. 1997. Heavy-metal toxicity in an insect cell line. Effects of cadmium chloride, mercuric chloride and methylmercuric chloride on cell viability and proliferation in *Aedes albopictus* cells. *Cell Biol Toxicol.* 13:389-397.

Brookes, N. (1992). *In vitro* evidence for the role of glutamate in the CNS toxicity of mercury. *Toxicology.* 76:245-256.

Buege, J.A. y Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In: *Methods of Enzymology*, Vol.53. Eleischer, S. and Packer, L. Eds. Academic Press. New York. pp 302-310.

Burton, K. (1965). A study of the condition and mechanism of the diphenilamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. *Bioch J.* 62:315-318.

Cordier, S., Deplan, F., Mandereau, L y Hemon, D. (1991). Paternal exposure to mercury and spontaneous abortions. *Brit J Indust Med.* 48:375-381.

Chan, H.M., Satoh, M., Zalups, R.J. y Cherian, M.G. (1992). Exogenous metallothionein and renal toxicity of cadmium and mercury in rats. *Toxicology.* 76:15-26.

Chávez, E. y Holguin, J.A. (1988). Mitochondrial calcium release as induced by Hg^{2+} . *J Biol Chem.* 263:3582-3587.

Chien, K.R., Abrams, J., Serroni, A., Martin, J.T. y Farber, J.L. (1978). Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *J Biol Chem.* 253:4809-4817.

Chmielnicka, J., Komsta-Szumaska, T. y Zareba, G. (1983). Effect of interaction between ^{65}Zn , mercury and selenium in rats (retention, metallothionein, endogenous copper). *Arch Toxicol.* 53:165-75.

Christensen, M., Ellerman- Eriksen, S., Rungby, J., Mogensen, S.C. y Danscher, G. (1991). Histochemical and functional evaluation of mercury chloride toxicity in cultured macrophages. *Progress Histo- and Cytochem.* 23:306-315.

Davila, J.C., Davis, P.J. y Acosta, D. (1991). Changes in glutathione and cellular energy as potential mechanisms of papaverine-induced hepatotoxicity *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol.* 108:28-36.

Denizeau, F., Marion, M., Chtaib, M. y Schmit, J.P. (1990). Toxicity of heavy metals in cultured hepatocytes. *Environ Toxicol Chem.* 9:737-743.

Dieter, M.P., Boorman, G.A., Jameson, C.W., Eustis, S.L. y Uraih, L.C. (1992). Developmente of renal toxicity in F344 rats gavaged with mercuric chloride for 2 weeks, or 2, 4, 6 15 and 24 months. *J Toxicol Environ Health*. 36:319-340.

Eaton, D.L., Stacey, N.H., Wong, K-L y Klaassen, C.D. (1980). Dose-response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase and cytochrome P-450. *Toxicol Appl Pharmacol*. 55:393-402.

Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 82:70-77.

Endo, T., Nakaya, S., y Kimura, R. (1991). Mechanisms of absorption of inorganic mercury from rat small intestine. IV. Effect of chelating agents and cysteine on absorption of mercuric chloride *in situ* and *in vitro*. *Pharmacol Toxicol*. 68:171-176.

Endo, T., Sakata, M. y Shaikh, Z.A. (1995). Mercury uptake by primary cultures of rat renal cortical epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 132:36-43.

Endo, T. y Sakata, M. (1995). Effects of sulfhydryl compounds on the accumulation, removal on cytotoxicity of inorganic mercury by primary cultures of rat renal cortical epithelial cells. *Pharmacol & Toxicol*. 76:190-195.

Frisk, P., Saetre, A., Couce, B., Stenerlow, B., Carlsson, J. y Lindh, U. 1997. Effects of Pb^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} y Se^{4+} on cultured cells: Analysis of uptake, toxicity and influence on radiosensitivity. *Biometals*. 10:263-270.

Fung, Y.K. y Molvar, M.P. (1992). Toxicity of mercury from dental environment and from amalgam restorations. *Clin Toxicol*. 30:49-61.

Galvao, L.A.C. y Corey, G. (1987). Mercurio. Serie Vigilancia. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. México. pp 82.

Gerson, R.J. y Shaikh, Z.A. (1982). Uptake and binding of cadmium and mercury to metallothionein in rat hepatocyte primary cultures. *Biochem J*. 208:465-472.

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

Goering, P.L., Galloway, W.D., Clarkson, T.W., Lorscheider, F.L., Berlin M. y Rowland, A.S. (1992). Toxicity assessment of mercury vapor from dental amalgams. *Fund Appl Toxicol*. 19:319-329.

Grundt, I.K. y Neskovic, N.M. (1989). Glial cells in primary cultures exposed to mercury and lead. *Toxicology*. 16:248-252.

Gutiérrez, M.C., Gómez, J.L., Bucio, L., Souza, V., Díaz, P.D. y Mourelle, M. (1989). Caracterización de una línea celular hepática humana. XXXII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Oaxtepec, Mor.

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

Herrstrom, Per. (1995). Dental amalgam and exposure to mercury in children and adolescents. Allergology and immunologic aspects. Malmo. Sweden. 110 pp.

Hojbjerg, S., Nielsen, J.B. y Andersen O. (1992). Effects of dietary lipids on whole-body retention and organ distribution of organic and inorganic mercury in mice. *Fd Chem Toxicol.* 30:703-708.

Honeycutt, M.E., Roberts, B.L. y Roane, D. (1995). Cadmium disposition in the earthworm. *Eisenia fetida*. *Toxicol Env Saf.* 30:143-150.

Inouye, M. y Kajiwara, Y. (1990). Placental transfer of methylmercury and mercuric mercury in mice. *Environ Med.* 34:169-172.

James A. y Soni V.C. (1990). Changes in activities of adenosine triphosphatase in mice treated with mercuric chloride and its chelators. *J Anim Morphol Physiol.* 37:41-46.

Kahaffey, K.R. (1984). Toxicity of lead, cadmium, and mercury: considerations for total parenteral nutritional support. *Bull. N.Y. Acad. Med.* 60:196-209.

Kajiwara, Y., Yasutake, A., Adachi, T. y Hirayama, K. (1996). Methylmercury transport across the placenta via neutral amino acid carrier. *Arch Toxicol.* 70: 310-314.

Kazantzis, G. (1980). Mercury. In: *Metals in the Environment*. Ed. by Waldron H.A. Academic Press. London. pp 333.

Kenneth, G.O. 1997. Human exposure to elemental mercury in a contaminated residential building. *Arch Environ Health.* 52:169-172.

Kershaw, W.C., Iga, T. y Klaassen, C.D. (1990). Ethanol decreases cadmium hepatotoxicity in rats: possible role of hepatic metallothionein induction. *Toxicol Appl Pharmacol.* 106:448-455.

Kim, E.Y., Murakami, T., Saeki, K. y Tatsukawa, R. (1996). Mercury levels and its chemical form in tissues and organs of seabirds. Arch Environ Contam Toxicol. 30:259-266.

Kishimoto, T., Oguri, T. y Tada, M. (1995). Effect of methylmercury (CH_3HgCl) injury on nitric oxide synthase (NOS) activity in cultured human umbilical vascular endothelial cells. Toxicology. 103:1-7.

Klaassen, C.D. (1990). Heavy metals and heavy-metal antagonists. In: Gilman, AG, Rall, TW, Nies, AS, Taylor, P eds. The pharmacological basis of therapeutics. New York. Pergamon Press. pp 1592-1614 .

Lachapelle, M., Guertin, F., Marion, M., Fournier, M. y Denizeau, F. (1993). Mercuric chloride effects protein secretion in rat primary hepatocyte cultures: a biochemical ultrastructural, and gold immunocytochemical study. J Toxicol Environ Health. 38:343-354.

Liu, J., Kershaw, W.C. y Klaassen, C.D. (1990). Rat primary hepatocyte cultures are a good model for examining metallothionein-induced tolerance to cadmium toxicity. In Vitro Cell Dev Biol. 26:75-79.

Liu, J., Kershaw, W.C. y Klaassen, C.D. (1991). The protective effect of metallothionein on the toxicity of various metals in rat primary hepatocyte culture. Toxicol Appl Pharmacol. 107:27-34.

Lorscheider, F.L., Vimy, M.J. y Summers, A.O. (1995). Mercury exposure from "silver" tooth fillings:emerging evidence questions a traditional dental paradigm. FASEB J. 9:504-508.

Louwerse, E.S. y Buchet, J-P. (1995). Urinary excretion of lead and mercury after oral administration of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid in patients with motor neurone disease. Int Arch Environ Health. 67:135-138.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement from phenol reagent. J Biol Chem. 193:265-275.

Lu, K.P., Zhao, S.H. y Wang, D.S. (1990). The stimulatory effect of heavy metal cations proliferation of aortic smooth muscle cells. Sci China Ser. 33:303-310.

Matsumoto, N. y Spindle, A. (1988). Methylmercury toxicity in mouse blastocysts invitro. Influence of amino acids. Environ. Occupational Chem Hazards. Ed. Sumino K. pp 267-272.

Mitane, Y. y Tohyama, C. (1988). Urinary excretion of metallothionein in cadmium and mercury-treated rats. In: Environmental and Occupational Chemical Hazards. Ed. Sumino K. pp 163-170.

Nielsen, J.B. y Andersen, O. (1991). Effect of four thiol-containing chelators on disposition of orally administered mercuric chloride. *Hum Exper Toxicol.* 10:423-430.

Nielsen, J.B., Andersen, H.R., Andersen, O. y Starklint, H. (1991). Mercuric chloride-induced kidney damage in mice: time course and effect of dose. *J Toxicol Environ Health.* 34:469-483.

Plunkett, E.R. (1974). Manual de toxicología industrial. URMO,S.A. España, pp 559.

Pompella, A., Romani, A., Benedetti, A. y Comporti, M. (1991). Loss of membrane protein thiols and lipid peroxidation in allyl alcohol hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 41:1255-1259.

Rana, S.V.S. y Boora, P.R. (1992). Antiperoxidative mechanisms offered by selenium against liver injury caused by cadmium and mercury in rat. *Bull Environ Contam Toxicol.* 48:120-124.

Rastogi, S.C. (1992). Cadmium, chromium, lead and mercury residues in finger-paints and make-up paints. *Bull Environ Contam Toxicol.* 48:289-294.

Reardon, C.L. y Lucas, D.O. (1987). Heavy-metal mitogenesis:Zn and Hg induce cellular cytotoxicity and interferon production in murine T lymphocytes. *Immunology.* 175:455-469.

Ribarov, S.R., Benov, L.C. y Benchev, I.C. (1984). HgCl₂ increases the methemoglobin prooxidant activity. Possible mechanism of Hg⁺⁺ induced lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Bio Interact.* 50:111-119.

Sadiq, M., Zaidi, T.H. y Al-Mohana, H. (1991). Sample weight and digestion temperature as critical factors in mercury determination in fish. *Bull Environ Contam Toxicol.* 47:335-341.

Saratian, T. y Verity, M.A. (1990). Altered patterns of protein phosphorylation and synthesis caused by methyl mercury in cerebellar granule cell culture. *J Neurochem.* 55:922-929.

Scheuhammer, A.M. y Cherian, G. (1986). Quantification of metallothionein by silver-saturation method. *Toxicol Appl Pharmacol.* 82:417-425.

Schweinsberg, F. (1994). Risk estimation of mercury intake from different sources. *Toxicol Lett.* 72:345-351.

Shenker, B.J., Datar, S., Mansfield, K y Shapiro. 1997. Introduction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds: a flow cytometric analysis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 143:397-406.

Shomita, M., Leon, P., Kevin, S. y Rao, C.V. (1991). Effect of feeding mercury and Aroclor 1260 on certain liver enzymes of Wistar rats. *Toxicol Environ Chem.* 33:277-281.

Smith, M.W., Ambudkar, I.S., Phelps, P.C., Regec, A.L., y Trump, B.F. (1987). HgCl₂ induced changes in cytosolic Ca⁺⁺ of cultured rabbit renal tubular cells. *Biochem Biophys Acta.* 931:130-142.

Söderström, S. y Ebendal, T. (1995). In vitro toxicity of methylmercury: effects on nerve growth factor (NGF)-responsive neurons and on NGF synthesis in fibroblasts. *Toxicol Lett.* 75:133-144.

Souza, V. (1995). Estudio de algunas alteraciones en células fetales hepáticas humanas (WRL-68) producidas como resultado de exposición al cadmio. Efecto del metal sobre la entrada de calcio a la célula. Tesis de Maestría. Fac. de Med. UNAM. México.

Stacey, N.H. y Kappus, H. (1982). Cellular toxicity and lipid peroxidation in response to mercury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 63:29-35.

Strubelt, O., Kremer, J., Tilse, A., Keogh, J. y Pentz, R. (1996). Comparative studies on the toxicity of mercury, cadmium and copper toward the isolated perfused rat liver. *J Toxicol Environ Health.* 47:267-283.

Tian-yi Ch. y McNaught, D.C. (1992). Toxicity of methylmercury to Daphnia pulex. *Bull Environ Contam Toxicol.* 49:606-612.

Verity, M.A. (1995). II. Inorganic and organic mercury. In: Metal toxicology. Goyer, R.A., Klaassen, C.D. y Waalkes, M.P. Eds. Academic press. USA. pp 525 .

VonBurg, R. (1995). Toxicology update. Inorganic update. *J Appl Toxicol.* 15:483-493.

Wlodek, L. y Rommelspacher H. (1994). Ethanol-induced changes in the content of thiol compounds and of lipid peroxidation in livers and brains from mice: protection by thiazolidine derivatives. *Alcohol Alcoholism.* 29:649-657.

World Health Organization: Environmental Health Criteria. I. Mercury. Geneva, world Health Organization. 1976.