

11281

30



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN AL CADMIO EN EL
ENCÉFALO DE RATAS EN DESARROLLO Y EL PAPEL
PROTECTOR DE LA METALOTIONEINA CUANDO
ES INDUCIDA POR DEXAMETASONA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

MARISELA MÉNDEZ ARMENTA

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA

MÉXICO, D. F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ
Director General de la
Administración Escolar
Presente.

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité Académico del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas que tuvo lugar el 22 de agosto del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Biol. MARISELA MENDEZ ARMENTA con no. de cuenta 80152796 y no. de expediente 100440 con la tesis titulada: "Efecto de la exposición al cadmio en el encéfalo de ratas en desarrollo y el papel protector de la metalotioneína cuando es inducida por dexametasona", dirigida por el Dr. Camilo Ríos Castañeda.

Presidente:	Dr. Alfredo Feria Velasco
Secretario:	Dr. Camilo Ríos Castañeda
Vocal:	Dr. Luis Felipe Jiménez Jiménez
Vocal:	Dra. Regina Montero Montoya
Vocal:	Dr. Alfonso Carabez Trejo
Suplente:	Dra. Martha León Olea
Suplente:	Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"Por mi raza hablara el espíritu"

Cd. Universitaria, D.F., 27 de agosto de 2001.

Dr. J. Javier Espinosa Aguirre
Responsable en el Instituto de
Investigaciones Biomédicas

Dr. Abel Moreno Cárcamo
Coordinador
Doctorado en Ciencias Biomédicas

c.c.p. - Secretaría de Asuntos Escolares

**Porque todos llevamos dentro un
Juan Salvador Gaviota, listo para aprender
y saber que no existen límites cuando
se quiere alcanzar algo por lo que
se ha de vivir y luchar, amándolo tanto
como la libertad de ser uno mismo.**

Este trabajo fue realizado en:

El Lab. de Neuromorfología Celular y Depto. de Neuropatología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

El Depto. de Patología Experimental del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán bajo la dirección del Dr. Rogelio Hernández Pando a quien agradezco su tiempo y confianza.

El Depto. de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, bajo la dirección del Dr. L. Camilo Ríos Castañeda a quien le agradezco infinitamente todo su apoyo y enseñanzas.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con No. de Becario 57524.

AGRADECIMIENTOS

- A Camilo por su ayuda desde siempre, porque con su apoyo y consejos pude obtener otra visión de lo que es la investigación científica para beneficio de mis estudios y de mi trabajo.
- Un especial agradecimiento a los Drs. Rogelio Hernández Pando y Ma. Eugenia Gonsebatt porque como miembros de mi comité tutorial fueron muy valiosos sus consejos, sus aportaciones al trabajo y su apoyo para el exámen de candidatura, pero sobre todo por su increíble calidad humana.
- A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones para este trabajo:
Dr. Alfredo Feria Velasco
Dr. Luis Felipe Jiménez Jiménez
Dra. Regina Montero Montoya
Dr. Alfonso Carabez Trejo
Dra. Martha León Olea
Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte.
- A la Dra. Barroso porque me acepto desde el primer día, porque sus consejos y enseñanzas han sido fundamentales para mí.
- A Juanita por todo el apoyo, ayuda y compañerismo que me ha demostrado durante todo este tiempo, porque ha sido una inigualable compañera en los tiempos buenos y malos pero sobre todo por su amistad.
- A Laura, Sonia y Conchita porque han estado presentes cuando he necesitado su ayuda en el trabajo, en lo académico, en la charla pero sobre todo porque cuento con una amiga en cada una de ellas.
- A todas las personas que de una u otra manera me ayudaron a hacer posible la realización de este proyecto.

DEDICATORIAS

- Con profundo amor y admiración a Fernando porque sin su apoyo, su infinita paciencia y cariño esto no hubiera sido posible.
- A mis adorados hijos César y Paulina simplemente por ser la razón de mi vida.
- A mis padres Ma. de Jesús y Manuel, por todo su amor, apoyo, comprensión para conmigo .
- A mis hermanas María y Ma. Elena (ahora con Jessica) porque solo tengo de ellas cariño, ayuda y mucho amor.
- A mis abuelos, en la tierra o en el cielo porque siempre vivirán en mi recuerdo.
- A mi familia cuñados, tíos, primos y sobrinos, por su cariño.
- A mis amigos porque se que como yo están comprometidos con la verdadera realidad de lo que es la amistad.
- Al recuerdo de mis amigos y compañeros de la facultad, a los que primero fuimos cinco y después La Mafia, porque en donde estemos sabemos que podemos contar con nuestra amistad.

Abreviaturas

Cd (cadmio)

Dx (Dexametasona)

MT (Metalotioneina)

Cx (Corteza parietal)

Hp (Hipocampo)

Es (Estriado)

Ce (Cerebelo)

DA (Dopamina)

Ca²⁺(Calcio)

Ni²⁺ (Niquel)

Ppb (Partes por billón)

ADN (Acido dexosirribonucleico)

ATP (Adenosin trifosfato)

ARN(Acido ribonucleico)

ATP_{asa} (Adenosintrifosfatasa)

K (Potasio)

Mg (Magnesio)

ROS (Especies de Oxigeno Reactivas)

Fe (Fierro)

INDICE

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
4. Antecedentes.....	5
4.1 Epidemiología.....	5
4.2 Toxicidad del cadmio.....	6
4.3 Intoxicación aguda.....	7
4.4 Intoxicación crónica.....	8
4.5 Neurotoxicidad del cadmio.....	9
4.6 Genotoxicidad del cadmio.....	11
4.7 Apoptosis y cadmio.....	13
4.8 Peroxidación de lípidos y cadmio.....	14
4.9 El papel de la metalotioneina en la intoxicación por cadmio.....	18
4.10 Histopatología y cadmio.....	22
5. Hipótesis.....	25
6. Objetivo general.....	25
6.1 Objetivos particulares.....	25
7. Materiales y Métodos.....	26
7.1 Animales.....	26
7.2 Tratamientos experimentales.....	26
7.3 Determinación de Cd en sangre.....	28
7.4 Determinación de Cd en regiones cerebrales.....	28
7.6 Análisis por microscopía óptica.....	29
7.6 Análisis inmunohistoquímico.....	29
7.7 Análisis por microscopía electrónica.....	30
7.8 Determinación de metalotioneina.....	31
7.9 Determinación de peroxidación de lípidos.....	32
7.10 Determinación de proteínas.....	32
7.11 Análisis estadístico.....	33
8. Resultados.....	34
8.1 Concentraciones de Cd en sangre.....	34
8.2 Concentraciones de Cd en regiones cerebrales.....	35

8.3 Niveles de peroxidación de lípidos en regiones cerebrales.....	36
8.4 Niveles de metalotioneína en regiones cerebrales.....	38
8.5 Inmunohistoquímica de la metalotioneína en regiones cerebrales.....	40
8.7 Análisis de las lesiones por microscopía óptica.....	44
8.7 Análisis ultraestructural de las lesiones.....	54
9. Discusión.....	56
10. Conclusiones.....	64
11. Referencias.....	66
12. Glosario.....	76
13. Artículo Publicado.....	77

1. RESUMEN

El cadmio (Cd) es un metal tóxico, no esencial, que tiene efectos nocivos sobre la salud. El Cd administrado en forma aguda o crónica se acumula en tejidos como: hígado, bazo, riñón, páncreas, testículo y cerebro. El Cd produce cambios neuropatológicos que incluyen hemorragias en cerebro y cerebelo de ratas y conejos recién nacidos, así como hiperactividad, alteraciones bioquímicas y en la conducta operante. El cadmio produce estrés oxidativo ya que incrementa la peroxidación de lípidos como resultado de la formación de radicales libres. Por otro lado, la metalotioneína es una proteína de bajo peso molecular que participa en la homeostasis de metales esenciales como el zinc y el cobre, funciona también como atrapadora de radicales libres y secuestrando metales como Cd, Ag o Hg como sistema de detoxificación. La síntesis de esta proteína puede ser inducida por metales o compuestos orgánicos tales como la dexametasona. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto tóxico del cadmio en ratas en desarrollo y evaluar el papel protector de la metalotioneína cuando es inducida por dexametasona. Se utilizaron ratas cepa Wistar de 13 días de edad las cuales se dividieron en 4 grupos: a) sol. salina; b) sol. salina + Cd (1mg/kg/día); c) sol. salina+ Dx (2mg/kg/día); d) Cd (1mg/kg/día)+Dx (2mg/kg/día). Las ratas fueron inyectadas diariamente por vía i.p. durante 5 días y se sacrificaron a los 18 y 28 días de edad. Se estudiaron 4 regiones cerebrales: corteza parietal, estriado, hipocampo y cerebelo. Se hicieron determinaciones de cadmio en sangre y en regiones cerebrales; análisis microscópico, inmunohistoquímico y ultraestructural así como determinación de niveles de peroxidación de lípidos y de metalotioneína. Los niveles de Cd en sangre y en regiones cerebrales a las dos edades se incrementaron en los grupos tratados con Cd y Cd+Dx. La peroxidación de lípidos también se incrementó en todas las regiones (menos el hipocampo) en los grupos tratados con Cd y Cd+Dx; así mismo los niveles de metalotioneína aumentaron en el grupo tratado con Cd+Dx y el mayor nivel de metalotioneína fue en el estriado y cerebelo. El análisis inmunohistoquímico mostró que la localización de la metalotioneína fue evidente en células gliales y el cerebelo en los grupos tratados con Cd+Dx y Dx. Se observaron alteraciones morfológicas como células hiper Cromáticas, edema intersticial, fibras destruidas y células de Purkinje picnóticas en el grupo tratado con Cd en ambas edades, las lesiones disminuyeron en el grupo tratado con Cd+Dx. La región con menos lesiones fue el hipocampo. Estos resultados sugieren que el Cd produce efecto neurotóxico por un incremento en los niveles de peroxidación de lípidos, alteraciones morfológicas y ultraestructurales. Es importante notar que los efectos neurotóxicos por exposición al cadmio se disminuyeron por dexametasona.

2. ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a toxic metal, with not biological importance, with toxic effects in the health. Cd acute or chronic exposure is accumulative tissues like: liver, spleen, kidney, pancreas, testis and brain. Cd is neurotoxic the neuropathological changes induces hemorrhages in brain of newborn rats and rabbits, also motor hyperactivity, behavioral and biochemical alterations were reported. Cd produce oxidative stress since Cd increase lipid peroxidation through free radicals production. Metallothionein is a low-molecular-weight protein which participates in the storage and homeostasis of essential trace metals such as zinc or cooper, also is capable to scavenge free radicals and sequester metals (Cd, Ag or Hg) as part of detoxification system. This protein can be induced by metals or steroids such as dexamethasone. The aim of this study was to evaluate the toxic effect of Cd in developing rats and the protective effect of dexamethasone-induced metallothionein. Thirteen days old Wistar rats were used and separated in four groups: a) saline solution; B) saline+Cd(1mg/kg/day); c) saline+dexamethasone (2mg/kg/day); d) Cd(1mg/kg/day)+dexamethasone (2mg/kg/day). Rats were injected ip. daily for 5 days and were killed at either 18 or 28 days of age. The parietal cortex, striatum, hippocampus and cerebellum were studied. Blood and brain cadmium determinations were made. Light microscope, immunohistochemical and ultrastructural studies such as lipid peroxidation and metallothionein measurements were perormed. The levels of Cd in blood and brain regions at 18 and 28 days of age were increased in the treated groups with Cd and Cd+Dx. The lipoperoxidation levels were increased in all brain regions (except the hippocampus) in the group treated with Cd and Cd+Dx; likewise the metallothionein levels were increased more evidently in the group treated with Cd+Dx; and high levels of metallothionein in striatum and cerebellum were observed. The immunohistochemical study showed that the localization of metallothionein was more evident in the glial cells and the cerebellum layers in the groups treated with Dx and Cd+Dx. Morphological alterations such as hyperchromatic cells, destroyed fibers, interstitial edema and picnotic Purkinje cells were observed in the group treated with Cd in both ages; diminished lesions were shown in the group treated with Cd+Dx. The region with minimal lesions was the hippocampus. This results suggests that the cadmium produce neurotoxic effects by an increase in the lipoperoxidation levels, morphological and ultrastructural alterations. It is important to note that the main neurotoxic effects of Cd exposure observed in these studies were diminsished by dexamethasone.

3. INTRODUCCIÓN

El Cadmio (Cd) es un metal de color plateado, sin importancia biológica, distribuido en la corteza terrestre, en una concentración de 0.1 a 0.22 ppm; tiene una estructura hexagonal compacta, es insoluble en agua, se oxida lentamente al contacto con el aire, presenta diferente reactividad frente a los ácidos y no reacciona con los álcalis. No existe en estado puro, sino asociado con otros metales, tales como plomo, cobre o zinc, por lo que la extracción y el procesamiento de estos últimos, propicia la contaminación ambiental por el Cd (*Agency for Toxic Substance and Disease Registry, ATSDR, 1993*). México es uno de los principales productores mundiales de Cd, la mayor extracción de este metal se da en los estados de Zacatecas y Chihuahua; en 1995 se exportaron 674121 toneladas anuales del metal (*Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, INEGI 1995*). El Cd como la mayoría de los metales pesados se presenta en concentraciones del orden de $\mu\text{g/l}$ o menores en el mar. El aporte continental probablemente es la ruta principal de entrada a la zona costera de las sales de Cd y las actividades humanas han contribuido al incremento de los niveles de los metales pesados con potencial tóxico importante (*Instituto Nacional de Ecología, INE, 1997*).

La obtención industrial primaria de Cd es dependiente de la producción de zinc; la contaminación ambiental por Cd se debe a las actividades mineras y metalúrgicas principalmente, así como su utilización para galvanizar, como cloruro de polivinilo y plásticos, en baterías recargables de níquel y cadmio, así como catalizador y conservador en la industria del plástico. El Cd también se utiliza en muchas aleaciones, colorantes de Cd y otros productos de uso artístico que contienen pigmentos con sales de Cd (INE, 1997). La exposición laboral varía según las actividades que se realicen (Tabla I).

La OMS (1987) menciona que en las grandes ciudades en donde hay actividades industriales importantes, se reportaron concentraciones de 0.04 a $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en el aire. En las regiones donde hay contaminación en el agua se han identificado niveles de 0.001mg/l hasta 0.015 mg/l. En áreas no industrializadas, se reportó la presencia de Cd en el suelo en concentraciones de hasta 16mg/kg, derivada del depósito de partículas del aire o agua movilizadas a largas distancias desde lugares donde se realizan actividades industriales. La población abierta se expone al Cd principalmente a través de la cadena alimenticia, o por el consumo de tabaco contaminado con Cd, debido a que los campos son abonados con fertilizantes fosfatados conteniendo Cd. El Cd se acumula en el organismo

fundamentalmente en los riñones, causando hipertensión arterial (Frieberg et al. 1974). La absorción pulmonar es mayor que la intestinal, por lo que el riesgo de exposición es mayor cuando el Cd es aspirado (ATSDR 1993). La concentración crítica en la corteza renal, que da lugar a una presencia permanente de 10% de proteinuria (a expensas de proteínas de bajo peso molecular) en la población en general, es aproximadamente de 200mg/kg y se alcanza con una ingestión alimentaria diaria de unos 175µg por persona durante 30 años. Partiendo de una tasa de absorción de Cd vía alimentaria de 5% y de una tasa diaria de excreción del 0.005% de la carga corporal, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios llegó a la conclusión de que, para que las concentraciones de Cd en corteza renal no sobrepasen 50mg/kg, la ingestión total de este elemento no debe de ser superior a 1µg diario /kg de peso corporal. Por lo tanto se estableció un nivel de ingestión semanal tolerable provisional de 7µg/kg (OMS, 1995).

Tabla I.- Ocupaciones con exposición potencial a Cadmio

EXPOSICIÓN ALTA (actividades de alto riesgo)

Soldadores y aleaciones de cadmio
Fundidores de cadmio
Trabajadores de cadmio
Limpiadores de bolsas para recolección de compuestos de cadmio
Manipuladores de bolsas para recolección de compuestos de cadmio,
Soldadores (con cadmio)

EXPOSICIÓN MEDIANA (actividades con mediano riesgo)

Fabricantes de aleaciones de cadmio,
Fabricantes de baterías de cadmio-níquel
Galvanizadores de cadmio
Fabricantes de celdas fotoeléctricas
Aplicadores de funguicidas con cadmio
Fabricantes de lámparas de vapor de cadmio
Metalizadores
Fabricantes de soldaduras de cadmio
Refinadores de zinc

EXPOSICIÓN BAJA (actividades de bajo riesgo)

Fabricantes de bombas de humo
Fabricantes de funguicidas con cadmio
Soldadores de materiales de cadmio galvanizado
Fabricantes de municiones para armas pequeñas

Las determinaciones hechas en algunos países respecto a la cantidad de Cd que se ingiere a través de los alimentos, mostraron que ésta puede ser de 10-60 µg/día para una persona de 70kg. En algunos casos, se ha notificado la ingestión de hasta 150µg/día. El tabaco es una importante fuente de Cd por inhalación (Elinder y col. 1983; Galvao y Corey 1987; Wagner, 1991). La planta del tabaco absorbe el Cd desde el suelo y lo acumula en las hojas, las cuales son usadas para la fabricación de cigarrillos, y por combustión se transfiere Cd al humo y posteriormente es inhalado por el fumador (Gairola, 1991). Se estima que cada cigarrillo contiene alrededor de 1 o 2µg de Cd; Saldivar y cols. (1991) determinaron que en los cigarros mexicanos el contenido de Cd era de 2.8µg/cigarrillo. Una parte de esta cantidad se elimina con la combustión, pero se inhala de 0.1 a 0.2 µg por cigarrillo, lo que puede causar una acumulación de 15mg de Cd en el organismo al cabo de 20 años de haber fumado 20 cigarrillos diarios (OMS, 1995).

4. ANTECEDENTES

4.1 Epidemiología

El interés en el estudio del cadmio surgió cuando agua contaminada con el metal, se utilizó para regar cultivos de arroz, con esto se produjo el surgimiento de una enfermedad llamada Itai-Itai (Ay-Ay, debido a los fuertes dolores de huesos que se padecen), en Japón. Estudios adicionales confirmaron la importancia del problema particularmente con respecto a la extracción y utilización del cadmio (Shigematsu y col. 1979). Un estudio epidemiológico en tres ciudades de Rusia, determinó los niveles de cadmio en orina y cabello de trabajadores expuestos al metal en una fábrica de pilas, también se cuantificó la concentración de cadmio en orina y sangre en personas que viven cercanamente a la fábrica, principalmente niños. Los resultados obtenidos mostraron un incremento de los niveles del metal tanto en adultos como en niños en cabello y orina; algunos trabajadores presentaron disfunción renal correlacionado con un nivel elevado en la excreción de beta-2-microglobulina (Bustueva, y col. 1994). Resultados similares se han observado en Alemania y Polonia (Minoia, y col. 1990), Japón (Takagi, y col. 1987). En México estudios recientes en el norte del país (que es donde se encuentran la mayor cantidad de fundidoras de metales) han mostrado que en ciudades como Torreón, Chihuahua y Monterrey lugares cercanos a las refinerías o fundidoras de metales existe un alto índice de contaminación con los metales arsénico, cadmio y plomo. En las tres ciudades los niveles de esos metales se encuentran elevados tomando en cuenta que entre más

cercana a la refinera o fundidora se tome la muestra con altos indices de contaminación (Benin y col, 1999). Se ha reportado que los niveles de cadmio, arsénico y mercurio, se encontraron elevados en el agua potable en ciudades tales como Hermosillo, Guaymas y Nacozari encontrándose el plomo en primer lugar, seguido del mercurio y en último el cadmio, estos niveles sobrepasaron los niveles que establece la EPA (*Environmental Protection Agency*) (Wyatt y col. 1998). En la ciudad de México, se realizó un estudio en mujeres y sus hijos en el momento del nacimiento para medir niveles de cadmio en la sangre de la madre, el recién nacido y del cordón umbilical; los resultados una elevación en los niveles de cadmio de las madres que tuvieron antecedentes de fumadoras. No se observó una correlación significativa entre los niveles de cadmio de la sangre de la madre y el recién nacido. Mientras que los niveles de cadmio en sangre fueron correlacionados significativamente entre la madre y el cordón umbilical; por otro lado se correlacionaron los niveles de cadmio observados en el cordón umbilical y la sangre del recién nacido; estos resultados sugieren la presencia de una barrera placentaria en donde es detenido el cadmio (Galicia-García, y col, 1997).

4.2 Toxicidad del Cd

El cadmio ocupa un sitio muy cercano al del plomo y el mercurio como metal de interés toxicológico. En el medio natural se encuentra junto con el zinc y el plomo y de este modo, la extracción y procesamiento de estos dos metales ocasiona contaminación ambiental. El elemento fue descubierto en 1817 y rara vez se utilizó hasta que hace unos 50 años se le encontraron aplicaciones al cadmio en la galvanoplastia, la galvanización, plásticos y pinturas así como su empleo en la fabricación de baterías de níquel y cadmio donde su importancia radica en su gran resistencia a la corrosión y propiedades electroquímicas (Friberg y col. 1986). La vida media del cadmio en el ser humano es de 10 a 30 años, en consecuencia con exposiciones continuas, tiende a acumularse principalmente en hígado y riñón. La dosis letal media (DL_{50}) de $CdCl_2$ en ratas varía según la vía de administración: es de 255 mg/kg cuando la administración es por vía oral, 9mg/kg si es por vía subcutánea, 3.55mg/kg para la vía intraperitoneal y de 3.35 mg/kg en administraciones endovenosas (Kotsonis y Klaassen, 1977). El metal casi no se absorbe por vía gastrointestinal; estudios en animales de laboratorio señalan que del Cd ingerido solo se absorbe 1.5% (Engstrom y Nordberg, 1979), y mientras que en estudios hechos en humanos indican que del Cd ingerido se absorbe aproximadamente 5% (Rahola y col.,

1972). La absorción por vía respiratoria parece ser más completa, y quienes fuman cigarrillos pueden absorber 10 a 40% del cadmio inhalado (Friberg y col. 1974).

El cadmio es transportado a todo el cuerpo por la sangre, unido a los albúmina, mientras que una pequeña fracción de cadmio sanguíneo puede ser transportado por la metalotioneina. Los niveles sanguíneos de cadmio en adultos con exposición crónica son usualmente menores a 1µg/dl (Friberg y col. 1986). Los recién nacidos de madres fumadoras tienen bajo contenido de cadmio, usualmente menos de 1mg en todo el cuerpo, esto debido a que la placenta sintetiza metalotioneina funcionando como barrera placentaria para el cadmio, (Galicia-García y col. 1997).

Los efectos tóxicos del Cd son variables y dependen de la vía de absorción, la cantidad absorbida y el tiempo de exposición del organismo. En los humanos la exposición a Cd, aguda o crónica puede causar toxicidad sistémica como: disfunción renal caracterizada por proteinuria frecuentemente por daño tubular, algunas veces acompañada de daño glomerular (Chia y col. 1989; Roels y col. 1991). También se han descrito alteraciones respiratorias como traqueobronquitis, edema pulmonar y enfisema pulmonar (Steenland y col. 1996).

4.3 Intoxicación aguda

La intoxicación aguda por Cd en humanos suele ser la consecuencia de la inhalación de polvos y vapores de Cd (por lo común óxidos de cadmio), y de la ingestión de las sales de este metal. Los primeros efectos tóxicos se deben a irritación local, después de su ingestión se producen náusea, vómito, diarrea y cólicos abdominales; a corto plazo el Cd es más tóxico si se inhala. Los signos y síntomas que aparecen en términos de horas comprenden irritación de vías respiratorias, neumonitis tempranas e intensas, dolores retroesternales, náusea, mareo y diarrea. La toxicidad puede evolucionar hasta incluir edema pulmonar mortal o enfisema residual con fibrosis peribronquial y perivascular (Klaassen, 1996).

4.4 Intoxicación crónica

Los efectos tóxicos de la exposición prolongada al Cd difieren un poco según la vía por la que ésta se produzca. El riñón es afectado después de la exposición pulmonar o gastrointestinal. El cadmio produce daño renal y hepático ya que el metal es captado por el hígado y se combina con el glutatión para ser excretado por la bilis. De mayor importancia, el cadmio se liga a la metalotioneina y en esta forma es almacenado en las células renales o hepáticas. Parte del cadmio ligado a la metalotioneina pasa al plasma para ser captado por el riñón. Una concentración de 200 µg/g es suficiente para lesionar las células del glomerulo y producir proteinuria (Klaassen, 1996). La exposición crónica produce daño glomerular, disminuye la filtración y ocurre aminociduria, glicosuria y proteinuria, aunque se desconoce en su totalidad los mecanismos moleculares del daño glomerular (Lauwerys y col. 1984) (Figura 1). Por otro lado tenemos que la excreción de β_2 -microglobulina en la orina parece ser un índice sensible, aunque inespecífico, de la nefrotoxicosis inducida por cadmio (Jin y col, 1998; Kelley, 1999).

El sistema respiratorio también es afectado por la intoxicación con Cd principalmente a nivel de los pulmones, y como consecuencia el síntoma más frecuente en individuos con neumopatía inducida por Cd es la disnea. No se conoce en detalle la patogenia del enfisema y la fibrosis pulmonar inducidas por Cd (Davison et al, 1988); pero si se sabe que la inhalación excesiva de vapores y polvos de cadmio produce pérdida de la capacidad ventilatoria, con un incremento correspondiente en el volumen residual pulmonar; sin embargo, en forma específica, el cadmio inhibe la síntesis de α_1 - antitripsina plasmática (Choudhury y Louria, 1976) observándose una relación entre la deficiencia intensa de la antitripsina mencionada, de origen genético y el enfisema en el ser humano.

En la ciudad de Toyama en Japón, ocurrió un brote epidémico de intoxicación ocasionado por la ingestión de arroz contaminado con cadmio, el cual era irrigado con agua contaminada. Las personas afectadas principalmente mujeres post-menopáusicas, sufrieron deformación de los huesos, osteomalacia, acompañada de intenso dolor y fracturas, además de proteinuria, glaucoma y se determino como Síndrome de Itai-itai.

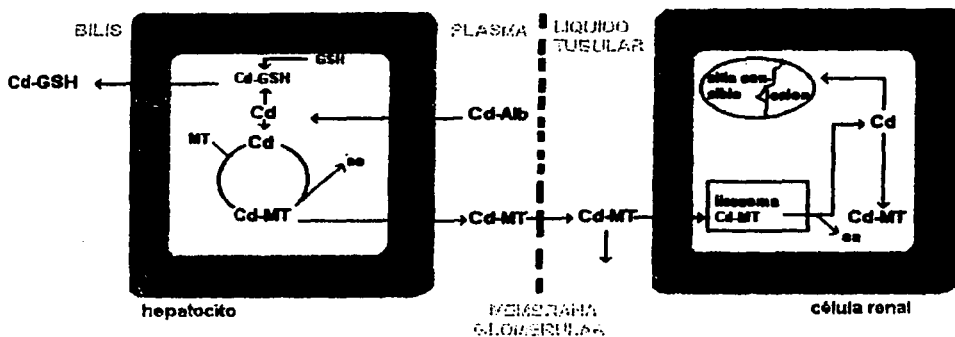


Fig. 1 Mecanismos hipotéticos de la toxicosis renal inducida por cadmio. El cadmio (Cd) captado por el hígado se combina con glutatión (GSH) y se excreta en la bilis o se liga a la metalotioneina (MT), y así crea una forma de depósito del metal. Parte del complejo en cuestión, al ser captado por las células renales penetra en los lisosomas; MT es degradada en sus componentes aminoácidos (aa); se libera el cadmio de tales estructuras y pasa al citosol. En concentraciones de 200µg/g o mayores, el cadmio daña el tejido renal y ocasiona proteinuria. Albumina (Alb). Tomado de Klaassen CD, Metales pesados y sus antagonistas, En: Las Bases Farmacológicas de la Terapeutica Eds. Goodman & Gilman, 1996.

Uno de los signos característicos del Síndrome de *itai-itai* fue la osteomalacia; que es un síntoma que indica una deficiencia de calcio en los huesos (Scott et al, 1980); así mismo se ha observado que en sujetos expuestos al cadmio en su trabajo, disminuyen las reservas corporales de calcio; este se debe a una interferencia con la regulación del equilibrio de calcio y fosfato por los riñones. (Scott y col. 1980)

4.5 Neurotoxicidad del cadmio

En relación con la neurotoxicidad, son pocas las investigaciones relacionadas con las manifestaciones de daño neurológico, ya que la capacidad del cadmio para atravesar la barrera hematoencefálica en adultos es pobre (Pal y col, 1993), pero en concentraciones elevadas o en exposiciones a largo plazo el cadmio al igual que otros metales, puede afectar al sistema nervioso central. Este metal tiene un potencial tóxico y se acumula más

en el cerebro de animales en desarrollo que en los adultos, esta diferencia se debe a que las primeras han alcanzado un desarrollo incompleto de la barrera hematoencefálica y a que están en un periodo crítico de crecimiento, siendo más susceptibles a los efectos del cadmio (Shukla y col, 1996, Choudhuri, y col. 1996). Esto adquiere importancia ya que los niños de igual manera no tienen completamente madura la barrera hematoencefálica y por lo tanto son más susceptibles al daño neurotóxico del cadmio u otros contaminantes ambientales. Los metales como el cadmio, plomo, talio o mercurio afectan el sistema nervioso central de los niños de manera diferente que el del adulto produciendo una variedad de daños neurológicos. Por ejemplo, el plomo produce vértigos, náuseas, cefaleas, insomnio, irritabilidad y disminución en el coeficiente intelectual en dosis de alrededor de 100µg/dl; mientras que el mercurio provoca pérdida de la memoria, inestabilidad emocional, insomnio e inapetencia (Goyer, 1991). El talio causa cefalea, neuropatía progresiva, inapetencia, ansiedad, psicosis, depresión y agresividad (Galván-Arzate y Santamaría, 1998).

Los estudios clínicos indican que el cadmio afecta al sistema nervioso central, Hart y col. (1989) encontraron que la exposición ocupacional al cadmio estaba asociada con una disminución en la atención, la velocidad psicomotora, el aprendizaje asociativo y la memoria. Otros estudios hechos en escolares se observó una asociación entre los altos niveles de cadmio en el cabello y la dificultad en el aprendizaje, hiperactividad, cambios conductuales y electrofisiológicos relacionados con la excitabilidad neuronal (Tatcher y col, 1982, 1984; Bonithon-Kopp y col., 1986). Esto también se encontró en ratas que mostraron hiperactividad (Wong y Klaassen, 1982; Smith y col., 1985), aumento en la conducta agresiva (Arito y col, 1981), disminución en la memoria social (Holloway y Thor, 1988) y alteraciones en la conducta operante (Newland y col, 1986) después de haber sido intoxicadas por cadmio.

La neurotoxicidad del cadmio se ha relacionado con el bloqueo de los canales de Ca^{2+} por la entrada de cadmio (Souza y col, 1993). Normalmente la regulación de entrada y salida de Ca^{2+} en la célula se lleva a cabo por canales iónicos transmembranales (Hille, 1984); los cuales pueden ser bloqueados por metales tales como Ni^{2+} y Cd^{2+} (Sauer y Watanabe, 1988); mientras que la homeostasis interna del Ca^{2+} es mantenida por la mitocondria y el retículo endoplásmico. Un elevado nivel del Ca^{2+} citosólico libre esta

asociado con daño celular por a una activación irreversible de fosfolipasas, endonucleasas, proteasas y a cambios del citoesqueleto debido a la defosforilación de tubulina y actina (Nicotera, y col. 1988). La observación de que el Ca^{2+} es un mediador de citotoxicidad esta asociada con una alteración de la relación de los grupos tioles/disulfuro de las proteínas los cuales se ven alterados cuando metales como el Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} interactúan con estos sitios en las proteínas en lugar del calcio (Viarengo y Nicotera, 1991). Procesos dependientes de Ca^{2+} tales como: liberación de neurotransmisores como la dopamina (Gutierrez-Reyes y col. 1998); disminución en la actividad de la adenosintrifosfatasa $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ e inhibición de la Ca,Mg-Mg-ATPasa (involucrada en el transporte de Ca^{2+}) por la formación de la enzima fosforilada, (Viarengo y Nicotera, 1991) y la inactivación o activación de la calmodulina (Chao y col, 1984) son alterados por la presencia de Cd.

La neurotoxicidad del cadmio también se relaciona con cambios en el contenido de algunos neurotransmisores en diferentes regiones del cerebro de rata crónicamente expuestas a cadmio, por ejemplo, Gupta y col. (1993) observaron un aumento en el contenido de serotonina y dopamina en el hipocampo de la rata y una disminución en el contenido total de estos neurotransmisores en el estriado. Otros estudios sugieren la existencia de supersensibilidad del sistema dopaminérgico al cadmio (Smith y col 1985). Rajanna y col. (1990) y Fasitsas y col (1991) demostraron que la exposición a cadmio disminuye la recaptura de dopamina y serotonina en sinaptosomas de cerebro de ratas, que al parecer es un fenómeno ocasionado por la peroxidación de lípidos de la membrana (Gutierrez-Reyes y col. 1998).

4.6 Genotoxicidad del cadmio

El ADN es la molécula encargada de almacenar la información genética que codifica las funciones celulares que se han dado durante el curso de la evolución por la selección natural; los daños al ADN son inducidos por una gran cantidad de agentes físicos, biológicos y químicos (Rojas y col. 1993). Metales tales como el cadmio son conocidos como carcinogénicos en humanos y en animales experimentales, induciendo tumores en pulmón, testículos y próstata (IARC, *International Agency for Research on Cancer* 1993). Diversos estudios de células *in vitro* demostraron que a concentraciones de 1mM o más altas, el cadmio produce rompimiento de las hebras de DNA con aberraciones

cromosómicas (Beyersmann y Hechtenberg, 1997). Hartwit y col (1994, 1995, 1998) y Calvero y col. (1998) demostraron además que el cadmio inhibe el mecanismo de reparación por escisión de bases del ADN, eso porque el cadmio inhibe la ADN polimerasa afectando la síntesis de ADN para reparación o para replicación; esto se debe a la competencia del cadmio con los iones de zinc, los cuales son esenciales para el funcionamiento de la ADN polimerasa (fig. 2) (Mildvan y Loeb, 1981). Así mismo se ha observado que el cadmio también inhibe la función de la ARN polimerasa en células aisladas de hígado (Hidalgo y col, 1976). Otro mecanismo frecuentemente discutido es la inducción de daño oxidativo al ADN, esto debido a la generación de radicales libres por cadmio, por la reacción de Fenton o por su interferencia con los sistemas antioxidantes de defensa celular (Sugiyama, 1994; Kasprzak, 1995). Los daños ocasionados por los radicales libres sobre la molécula de ADN son: deaminación, hidrólisis espontánea y metilación no-enzimática de bases del ADN (Lindahl, 1993). Si los mecanismos de defensa celulares que eliminan los radicales libres no son capaces de prevenir

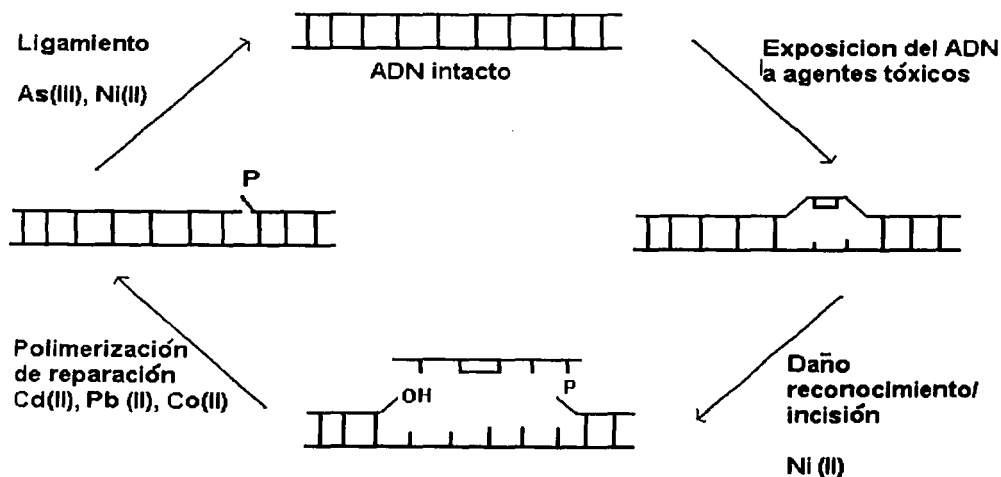


Fig.2.- Inhibición del mecanismo de reparación de escisión de bases por metales en células de mamíferos; los sitios de acción propuestos (Tomado de Hartwig A. Biometals(1995), 8:3-11)

completamente el efecto, entonces el mecanismo de reparación por escisión de bases del ADN se convierte en el mecanismo más importante de reparación de la molécula de ADN (Hartwig, 1998), siempre y cuando éstos no sean afectados también por el daño oxidativo lo cual produciría una disminución en la capacidad de reparación, originando lesiones del ADN no reparadas, teniendo como consecuencia mutaciones y errores en la síntesis de proteínas (Calevro y col. 1998).

El cadmio también es capaz de modular la expresión de algunos genes; este efecto regulatorio se observa como la capacidad para inducir la expresión de los genes que expresan la síntesis de la metalotioneína y del glutatión, así como también a concentraciones de $\mu\text{mol/l}$ puede inducir proteínas de *heat shock* (Beyersmann y Hechtenberg, 1997). Una tercera clase de genes que se inducen por concentraciones no tóxicas y micromolares de cadmio son algunos proto-oncogenes: c-jun, c-fos y c-myc. La inducción de estos genes indica un mecanismo por el cual el cadmio puede promover el desarrollo de cáncer. Recientemente, la inducción del gen supresor de tumores p53 fue detectada en ratones tratados con cadmio (Zheng y col, 1996).

4.7 Apoptosis y cadmio

La apoptosis se define como el proceso activo de muerte celular programada, distinto de la necrosis y caracterizado por cambios específicos morfológicos y bioquímicos. La muerte celular controlada es esencial para el desarrollo de organismos multicelulares, porque la apoptosis es un mecanismo de homeostasis, que probablemente regule a proteínas inducibles o constitutivas (Kondo y col. 1997). Los cambios morfológicos que se observan por microscopía de luz en células apoptóticas incluyen: retracción celular, separación de las células, condensación de cromatina y fragmentación del núcleo en múltiples cuerpos de cromatina envueltos por la membrana nuclear (Hart y col. 1999); con microscopía electrónica se observan células en apoptosis con cromatina condensada, membrana ondulada, cuerpos apoptóticos y fragmentación nuclear (Hamada y col. 1996). La apoptosis puede ser inducida por una variedad de factores en los cuales se incluyen drogas anti-cáncer, mutágenos, oxidantes, radiaciones, factores de crecimiento, óxido nítrico y metales entre otros (Thompson, 1995). Algunos estudios mostraron que el cadmio tiene efectos sobre el incremento de apoptosis en diferentes tipos celulares. Se observó un incremento en la apoptosis en células de riñón humano 293 (Hamada y col.

1996), en células renales LLC-PK de rata (Ishido y col. 1998), en células de pulmón (Hart y col. 1999) expuestas a diferentes concentraciones de Cd_2Cl . Habeebu y col. (1998) mostraron aumento en el índice apoptótico en células de hígado de ratón expuestas a Cd_2Cl sugiriendo que la apoptosis es el mejor modo de eliminación de células dañadas por la exposición a cadmio cuando menos en células de hígado de ratón.

4.8 Peroxidación de lípidos y cadmio

Los radicales libres de oxígeno son generados durante diversos procesos bioquímicos normales en tejidos vivos. Los electrones no apareados hacen que estos componentes sean altamente reactivos y que puedan iniciar reacciones de peroxidación con varios substratos importantes para la sobrevivencia de la célula tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Un sistema complejo de defensa el cual está formado por superóxido dismutasa, catalasa, y glutatión peroxidasa principalmente, está involucrado para proteger el tejido celular de los radicales libres y minimizar el daño que pueden causar. Las neuronas son especialmente vulnerables al ataque de los radicales libres y una exposición excesiva a radicales libres puede llevar a una muerte neuronal (Bonorden y Pariza, 1994; Jesberger, 1991).

La química de los radicales involucra tres pasos: iniciación, propagación y terminación. El paso de iniciación se inicia cuando una especie con un electrón desapareado es generado, frecuentemente por camino de la transferencia reductiva de un electrón. La propagación es la reacción de un radical con un substrato para producir un segundo radical por donación o abstracción de un electrón. La unión de dos radicales para formar un especie no-radical produce la terminación (fig.3). Entonces un radical formado *in vivo*, en la propagación puede llevar a un incremento en los niveles de daño hasta el paso final de terminación (Robb-Gaspers y Connor, 1997). En situaciones de estrés oxidativo se forman sustancias reactivas al oxígeno (Reactive Oxidative Substances, ROS), que incluyen radicales y no-radicales derivados del oxígeno. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un ejemplo de una ROS que no es radical, mientras que el superóxido ($\cdot O_2$) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) son radicales libres, potencialmente más dañinos. Cuando el H_2O_2 es generado *in vivo*, éste atraviesa las membranas fácilmente (Halliwell y Gutteridge, 1989) y a través de una reacción de reducción con transferencia de un electrón puede llevar a la generación de $\cdot OH$ el cual a su vez puede causar peroxidación de lípidos y daño al ADN.

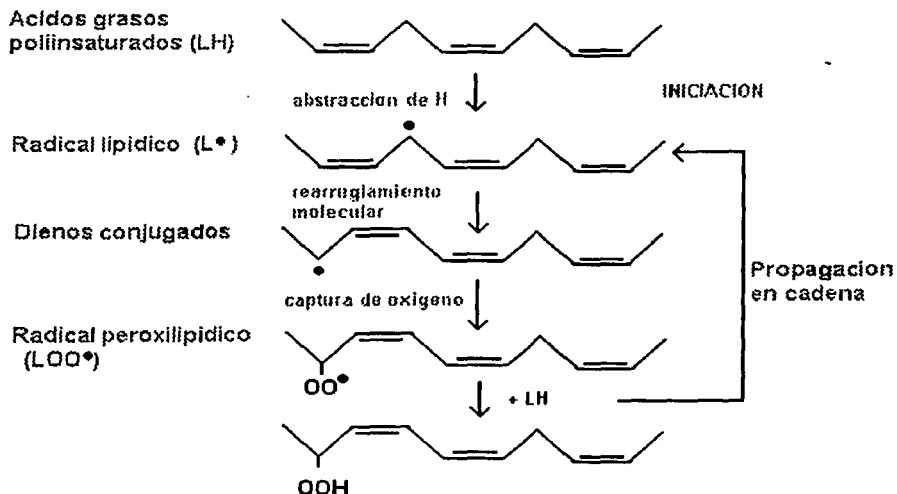
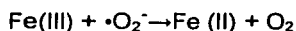


Fig.3. Iniciación y propagación de la peroxidación de lípidos. (Tomado de Halliwell B. And Gutteridge JMC. 1985; Free radicals in biology and medicine. Claredon Press, Oxford).

El cerebro es más vulnerable que otros órganos al estrés oxidativo, ya que tiene un elevado consumo de oxígeno, es rico en lípidos y relativamente bajo en antioxidantes. El cerebro contiene diversos tipos celulares que varían en su consumo de oxígeno, requerimientos de hierro y funcionalidades diferentes.

Si bien la neurona representa la unidad funcional del cerebro las células gliales son también requeridas para un funcionamiento neurológico normal. Las neuronas y las células gliales contienen mecanismos protectores para combatir el estrés oxidativo, incluyendo mecanismos de defensa (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión) contra las especies reactivas del oxígeno (Robb-Gaspers y Conno, 1997). Sin embargo estos sistemas no están igualmente distribuidos en el cerebro, sugiriendo que las células pueden tener diferente susceptibilidad al daño oxidativo (Robb-Gaspers y Connor, 1997). La catalasa por ejemplo se encuentra predominantemente en oligodendrocitos (McKenna y col, 1976) mientras que el glutatión se encuentra preferentemente en astrocitos (Raps y col. 1989).

La peroxidación de lípidos que es la destrucción oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de membrana producidos por la exposición a radicales libres u otros agentes oxidantes, está relacionada con la capacidad del ión Fe para quelar o catalizar la formación de especies reactivas al oxígeno y estimular esta peroxidación de lípidos. Diversas evidencias indican que el Fe actúa como un catalizador en la reacción de Fenton, facilitando la conversión del anión superóxido y peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo, como especies frecuentemente iniciadoras de la lipoperoxidación (Halliwell y Gutteridge, 1989):



La mitocondria tiene los tres componentes necesarios para llevar a cabo la reacción de Fenton: cuando el $\cdot\text{OH}$ es generado en la mitocondria, es capaz de reaccionar con lípidos en el interior de la membrana mitocondrial causando peroxidación de lípidos y pérdida del gradiente de protones. En situaciones en las que la integridad de la membrana se pierde, la mitocondria desacopla la fosforilación oxidativa y no puede llegar a formar ATP (Robb-Gaspers y Connor, 1997).

Los electrones son desapareados durante la respiración mitocondrial normal, las especies reactivas del oxígeno incluyen $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 (Halliwell y Gutteridge, 1989). Los equivalentes son usados para pasar electrones de bajo a alto potencial por los cuatro complejos proteínicos de la cadena respiratoria en la mitocondria. La cadena puede ser desacoplada llevando a una reducción de electrones de oxígeno di-atómico a $\cdot\text{O}_2^-$ (Halliwell y Gutteridge, 1989). Dos $\cdot\text{O}_2^-$ son unidos por la superóxido dismutasa para producir H_2O_2 . El peróxido producido es inactivado por la acción de la catalasa y la glutatión peroxidasa, llevando a la producción de agua y oxígeno di-atómico que no son reactivos. Estos sistemas de defensa son eficientes para mantener el balance electroquímico intercelular, el cual es alterado como resultado del estrés oxidativo al que se sometió a la célula. Los astrocitos son bajos en catalasa y pueden primariamente defender con la glutatión peroxidasa para la detoxificación de H_2O_2 (Sato y Bremner, 1993).

Aunque no se sabe con certeza cuales son los mecanismos de formación de radicales libres en la intoxicación por cadmio, si se conoce que el cadmio aumenta de manera significativa los niveles de lipoperoxidación. Manca y col. (1991); demostraron que la exposición de ratas a dosis bajas y moderadas de cadmio por vía intraperitoneal, el nivel de lipoperoxidación se incremento de manera significativa en hígado, riñón, pulmón, corazón, testículo y cerebro. En regiones cerebrales de ratas en desarrollo expuestas perinatalmente a Cd, el estriado es la región que más incremento su nivel de lipoperoxidación (Gutierrez-Reyes y col. 1998; Gupta y col. 1995) seguida de la corteza, cerebelo, e hipocampo. El cadmio causa cambios en las biomembranas en diferentes regiones del cerebro, debido a la generación de radicales libres lo cual lleva a una alteración significativa en la fluidez de la membrana, la concentración intracelular de calcio y la composición de fosfolípidos (Kumar y col, 1996). Otro factor importante por lo cual se incrementa la peroxidación de lípidos es la inhibición por cadmio de los sistemas de defensa: la glutatión reductasa (Acan y Tezcan, 1995), la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa (Shukla y col, 1996).

Un factor determinante en la neurotoxicidad del cadmio es la edad; los animales en desarrollo son más vulnerables al daño del metal debido a que el cadmio penetra la barrera hematoencefálica con mayor facilidad cuando ésta todavía no se ha desarrollado completamente y se encuentra inmadura; mientras que en los animales adultos ya ha sido completado su desarrollo y por lo tanto la penetración y distribución del cadmio es menor que en los animales en desarrollo (Gupta y col, 1990; Shukla y col., 1996; Antonio y col, 1999). La barrera hematoencefálica es un sistema formado por un complejo de células endoteliales, astrocitos, pericitos, macrófagos perivasculares y lamina basal (Jolliet-Riant y Tillement, 1999). El daño del cadmio sobre la barrera hematoencefálica se basa principalmente en un aumento en la peroxidación de lípidos y en un disminución en la función de los sistemas de defensa contra los radicales libres, ya que la actividad de las enzimas antioxidantes (glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa) de las células endoteliales se inhiben en animales en desarrollo o de 21 días de edad con exposición al cadmio (Shukla y col, 1996). En ratas expuestas perinatalmente a cadmio, se observó disminución en el funcionamiento de los sistemas de defensa celular y aumento en la peroxidación de lípidos durante el desarrollo (Gupta y col., 1995), además de una significativa reducción en el contenido de lípidos cerebrales (los cuales son importantes en la etapa de mielinización), cuando las ratas han sido expuestas a bajas dosis de cadmio en etapas tempranas de desarrollo postnatal (Gupta y Shukla, 1996).

4.9 El papel de la metalotioneína en la intoxicación por cadmio

La metalotioneína es un proteína intracelular de bajo peso molecular con gran contenido de cisteína, con alta afinidad por los metales y fue descubierta en 1957 por Margoshe y Vallee; esta proteína se distribuye filogenéticamente con expresión celular en las bacterias, hongos, plantas y eucariotes (Aschner, 1996). La familia de las metalotioneínas en mamíferos consta de 4 isoformas similares y designadas como MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV (Palmitier y col. 1992; Kille y col. 1994; Ebadi, y col.1995). Las isoformas MT-I y MT-II se encuentran en el cerebro y en tejidos periféricos; la isoforma MT-III se expresa principalmente en el cerebro y muy poco en páncreas y la isoforma MT-IV se encuentra en tejidos con células epiteliales estratificadas escamosas (Ebadi y col, 1996). Las metalotioneínas son proteínas que contienen de 61 a 62 residuos de aminoácidos no aromáticos con aproximadamente de 25-30% de cisteínas (fig.4), sin puentes disulfuro, a la cual se le unen 5-7 átomos de zinc, 12 de cobre o 7 átomos de cadmio por mol de proteína (Ebadi y col. 1996; Aschner, 1996).



Fig. 4 Estructura de la metalotioneína- II humana. (Tomado de Sato y Bremner, 1993. Free Radical Biology & Medicine 14: 325-337)

Las diferencias estructurales entre MT-I y MT-II son aparentes, con el isómero de MT-III que contiene 2 aminoácidos adicionales y una sola treonina en la posición 5 y 6; la presencia de 8 residuos de glutamato confiere propiedades ácidas a la MT-III mientras que las isoformas convencionales MT-I y MT-II son de naturaleza básica (Aschner, 1996). Los genes que codifican cada isoforma están en el cromosoma 8 del ratón y en el cromosoma 16 del humano con una estructura de intrón/exón (Palmitier y col, 1993). El promotor del gen de las metalotioneinas esta compuesto por una región promotora con diversos elementos: elementos metalorreguladores que consisten en una secuencia específica de bases; elementos responsivos a glucocorticoides que consiste en una secuencia palindrómica de 20 pares de bases (TGGTACAAATGTTCT) también llamado elementos potenciadores porque generalmente funcionan para potenciar la transcripción y los factores de transcripción (en este caso factor metal regulador 1) los cuales son esenciales para la expresión basal e inducción por metales unidos a los otros elementos del promotor; los elementos múltiples metalorreguladores en los promotores de las metalotioneinas no son idénticos y por ello no responden uniformemente (Beyersmann y Hectenber, 1997; Hidalgo y col. 2001). En el promotor del gen los diferentes elementos metalorreguladores donde se unen proteínas responden a diferentes iones metálicos y pueden funcionar como mecanismos reguladores de manera positiva o negativa del gen de la metalotioneina (Palmitier, 1994).

PROMOTOR DEL GEN

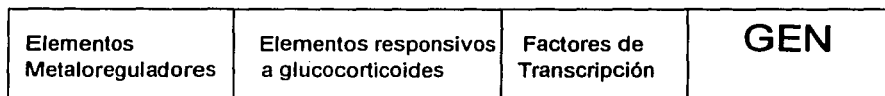


Fig.5.- Esquema del promotor del gen de la metalotioneina incluyendo todos los elementos reguladores (Tomado de Beyersmann y Hechtenberg, 1997).

La distribución de la cantidad y el tipo de metalotioneina en el cerebro no es uniforme, hay diferencias dependiendo de las etapas de desarrollo y de la isoforma de la que se trate. La cuantificación de los niveles constitutivos de ARNm de la MT-I, -II y -III (expresada como fmol de RNAm MT/ μ g total de RNA) en el cerebro de ratón fue de MT-I (0.04)>MT-III(0.028)>MT-II(0.019) (Choudhuri y col. 1993). El ARNm de las 3 isoformas de MT en cerebro fue determinado por Choudhuri y col (1995) observando que la expresión mas elevada de las 3 isoformas se presento en el bulbo olfatorio; mientras que para el cerebelo la expresión más elevada fue para la MT-I y -II y la menos expresada fue la MT-III. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de las e isoformas en corteza, caudado, hipocampo, talamo y ojo. La diferencia entre los niveles altos y bajos de expresión las 3 isoformas fue de 2 y 2.5 veces. (Choudhuri y col. 1995). Se reporto que existe una corelación entre el ARNm de la MT-III y la presencia de altas concentraciones de zinc, tales como el hipocampo, corteza piriforme y amígdala (Palmitier 1994; Masters y col. 1994). Hidalgo y col. (1994) y Aschner (1996), observaron que la MT-I se encuentra poco en la población neuronal del hipocampo y giro dentado; pero al mismo tiempo la MT-I -II que normalmente se asocia a células gliales, se encuentra también presente en las neuronas CA3 del hipocampo. *In vivo* las MT-I y MT-II son abundantes en astrocitos protoplásmicos y fibrosos pero ausentes en microglia y oligodendrocitos (Hidalgo, y col. 1994). Las formas MT-I y MT-II también se pueden encontrar en células ependimarias, aracnoides y células endoteliales de capilares cerebrales; en contraste la MT-III se expresa predominantemente en las neuronas, especialmente aquellas que contienen altas cantidades de zinc en las vesículas sinápticas así como también es abundante en las células de plexos coroideos (Choudhuri y col, 1994; Masters y col. 1994; Nishuimura y col, 1992).

La cantidad de la metalotioneina en el cerebro puede aumentar por la acción de diferentes factores tales como la edad (Choudhuri y col. 1996), la dieta o el estrés ya que estos factores inducen la expresión de la MT, aunque un factor relevante en la concentración de la MT esta directamente asociada con los niveles de zinc citosólico (Gastull, y col. 1994). La concentración citosólica de zinc varia en las diferentes regiones cerebrales (hipocampo 7.58, corteza parietal 6.32, estriado 6.31, hipotalamo 4.78 y cerebelo 3.58 todos los valores expresados en μ g zinc/g peso de tejido) y estos niveles de zinc se correlacionan con los niveles de MT encontrados en estas mismas regiones por lo que se postula un posible papel regulador del zinc para la expresión de la MT (Gastull y

col, 1994). Penkowa y col. (1999) analizaron la distribución de la metalotioneina en diferentes etapas de desarrollo del cerebro en la rata encontrando una correlación entre la cantidad de vesículas de zinc y la expresión de MT-I y MT-II, cuando se comparo el patrón de desarrollo de las vesículas de zinc se observó que conforme avanza la edad postnatal cuando las fibras de proyección conteniendo zinc del cerebro medio fueron mas visibles, los astrocitos con inmunorreactividad para MT-I, -II fueron mas evidentes en los campos terminales de estas proyecciones. La misma situación se observo en la región CA3 del hipocampo donde hubo un aumento en el zinc similar al aumento de astrocitos con MT-I, -II, lo mismo fue observado en neocorteza, cerebelo, fimbria y tallo cerebral (Hidalgo y col. 1994; Aschner, 1996). Por otro lado Hao y col. (1994) mostraron resultados similares pero en cerebro de rata adulta, observando que la MT-I se encontraba en altas concentraciones en astrocitos en hipocampo, cerebelo, caudado putamen, núcleos talámicos paraventriculares. El zinc sirve como cofactor de alrededor de 300 enzimas que funcionan manteniendo la homeostasis celular (Vallee y Auld, 1990; Valle 1995). El zinc se une a residuos de cisteína e histidina en ciertas proteínas, confiriéndoles un complejo de estructura terciaria el cual tiene afinidad para pequeñas regiones del promotor del ADN, estas configuraciones son conocidas como dedos de zinc (Ebadi y col. 1995). Otra posibilidad para la regulación de la concentración de metalotioneina en el cerebro son los glucocorticoides en el citoplasma. Los receptores tipo I y II para corticosteroides están asociados con un complejo multiproteínico (Heat Shock Proteins, HSP); este complejo mantiene libre a los receptores de corticosteroides y accesibles para un ligando. La unión de un ligando causa una disociación de receptores de las proteínas HSP seguida de una translocación de los receptores activos al núcleo; en el núcleo estos receptores unidos al corticosteroide se unen a los elementos responsivos de glucocorticoides del promotor del gen (Eberwine, 1999) de esta forma las hormonas inducen la transcripción de la metalotioneina (Beyersmann y Hachtenberg, 1997). Un esteroide probado como inductor de la metalotioneina es la dexametasona, y se reporto que cuando es administrado los niveles de metalotioneina en todas las regiones del cerebro se ven significativamente incrementados (Palmitier y col. 1992; Gasull y col. 1994).

A la metalotioneina se le han asignado diferentes funciones: almacenamiento y distribución de iones metálicos tales como el cobre y el zinc; regulación de la biosíntesis y actividad de las metaloenzimas; citoprotección contra el daño producido por radicales libres; citoprotección contra el daño ocasionado por metales pesados;

compartimentalización del zinc, enzimas zinc-dependientes y factores de transcripción entre astrocitos y neuronas; detoxificación de los metales pesados del líquido cefalorraquídeo, del espacio extracelular por medio del epitelio coroideo, células ependimales y astrocitos y neuromodulación de la transmisión de glutamato y GABAérgica particularmente zinc-érgica y la expresión de MT-III en neuronas. (Aschner, 1996).

Los radicales libres son frecuentemente producidos en el sistema nervioso central. En contra de ellos existen diferentes sistemas de defensa celular entre los cuales se incluyen una variedad de antioxidantes tales como: catalasa para el peróxido de hidrógeno, superóxido dismutasa para el superóxido, glutatión peroxidasa para el peróxido de hidrógeno y peroxilípidos y antioxidantes no específicos como: glutatión reducido, ceruloplasmina y transferrina (Sato y Bremner, 1993). Recientemente se ha incluido a la metalotioneina como un atrapador de radicales libres debido a su capacidad para mantener un grupo sulfhidrilo esencial, esto previene una formación intramolecular de disulfuro (Ebadi, y col.1996). Otros han sugerido que los residuos de cisteína de la metalotioneina sirven como sitios blanco para los radicales libres (Sato y Bremner, 1993; Lazo y col. 1995).

Se sabe que la metalotioneina forma un grupo tiol de alta afinidad con muchos metales pesados, lo cual reduce la posibilidad de que estos metales puedan reaccionar con otras biomoléculas, este ciclo puede mantenerse con metales pesados en forma inactiva y no tóxica para la célula (por ejemplo el astrocito), protegiéndose a sí mismo y a las neuronas, de la citotoxicidad de los metales pesados (Aschner, 1997). Las metalotioneinas pueden servir como amortiguadores de metales o atenuar indirectamente su toxicidad y proteger a los grupos sulfhidrilos de los astrocitos vulnerables tales como los acarreadores de glutamato (Aschner, 1996).

4.10 *Histopatología y cadmio*

El primer estudio sobre las alteraciones morfológicas del cadmio en el sistema nervioso central fue realizado por Gabbiani y col. (1967), en donde después de exponer a ratas albinas y conejos de diversas edades a intoxicación con cloruro de cadmio de 1mg/100g

de peso corporal y 2mg/100g respectivamente, se encontró en los adultos, hemorragias en cerebro y cerebelo, mientras que en los animales recién nacidos los cambios cerebrales y cerebelares fueron más intensos; hemorragias, núcleos picnóticos e hipercromáticos, fibras destruidas y células de neuroglia con núcleos picnóticos. En cerebelo, las células de Purkinje se observaron masivamente desintegradas, estableciendo que la encefalopatía producida por metales son más severas en niños que en adultos. Wong y Klaassen (1982) observaron lesiones en diferentes áreas del encéfalo (corteza parietal, cerebelo, cuerpo caloso y caudado-putamen) en ratas recién nacidas, mostrando áreas de necrosis, hemorragias, reacción de gliosis; los capilares cercanos a las áreas de necrosis se observaron con paredes intactas, pero por ellas hubo infiltración de macrófagos y linfocitos, sin embargo, los capilares de la corteza parietal distante a las áreas dañadas o del foco de gliosis en el caudado y en las meninges estaban normales. En ratas adultas no se observaron daños de ningún tipo; los cambios menores que se observaron en los capilares de las áreas de necrosis pueden ser secundarios al daño que causa la necrosis por sí misma. Provias y col.(1994) reportaron el caso de un niño que murió por una intoxicación aguda por cadmio; la autopsia mostró que había edema cerebral, y resultados obtenidos por espectrofotometría de absorción atómica revelaron elevados niveles intracelulares de cadmio estos resultados sugirieron alteraciones en la barrera hematoencefálica del niño.

No obstante el hecho de que la inducción de cambios morfológicos en el cerebro en animales adultos está restringido a altas dosis de cadmio, las concentraciones bajas ejercen efectos tóxicos a nivel celular. En otros órganos cultivos celulares de la línea LLC-PK₁ (células epiteliales renales) expuestas a concentraciones micromolares de cadmio, mostraron que las uniones adherentes entre célula y célula se separan 15 min. después de exposición y a las 6 horas, la separación es total; el análisis ultraestructural mostró el desarreglo inicial en la unión adherente entre célula y célula coincidiendo con un decremento en la densidad de las placas asociadas con las uniones adherentes. Lo anterior evidencia la capacidad del cadmio para incrementar la permeabilidad (a iones) de varios epitelios y endotelios, así como su capacidad de dañar estas uniones puede incrementar la permeabilidad del lecho vascular en una variedad de tejidos, lo que eventualmente lleva a un cambio necrótico secundario (Nolan y Shaikn, 1986; Niewenhuis y col. 1997).

Las mitocondrias son los organelos celulares de forma oval en donde se lleva acabo la fosforilación oxidativa, el ciclo del ácido cítrico y la oxidación de los ácidos grasos. Las mitocondrias poseen dos sistemas membranosos: una membrana externa y una interna. La membrana interna esta doblada originando una serie de pliegues denominados crestas; de aquí que existan dos compartimentos en la mitocondria: el espacio intermembranoso entre las membranas externa e interna y la matriz que esta limitada por la membrana interna. La membrana externa se compone aproximadamente de un 50% de lípidos, incluyendo colesterol y numerosas enzimas que participan en los procesos de oxidación. La membrana interna posee una proporción proteínica/lípida muy alta (aproximadamente 4:1 por unidad de peso, lo cual corresponde a una molécula de proteína por cada 15 fosfolípidos), a pesar de sus diferencias a nivel de microscopía electrónica la estructura es semejante. Por sus características de composición de membranas, las mitocondrias pueden ser susceptibles al daño por radicales libres ya que su alto contenido de lípidos lo hace un blanco para la peroxidación de lípidos (Halliwell y Gatteridge, 1985). En el nervio óptico periférico tratado con cadmio se observaron alteraciones ultraestructurales en las mitocondrias que presentaron vacuolización y destrucción de las crestas mitocondriales; en muchos axones los microtúbulos del citoesqueleto fueron destruidos mientras que la mielina presentó sólo vacuolización de manera ocasional, asociada a una alteración en la velocidad de la conducción nerviosa en el nervio óptico. (Fern, y col. 1996). Similares resultados con mitocondrias alteradas y vacuoladas en neuronas de ganglio espinal de ratas expuestas a acetona fueron observados por Chang (1993).

5.HIPÓTESIS

Si el cadmio es capaz de inducir cambios morfológicos cerebrales en asociación con los incrementos en la peroxidación de lípidos, entonces estos cambios pueden ser revertidos por un efecto protector de la metalotioneina cuando es inducida exógenamente por la dexametasona.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto toxico del cadmio en el encéfalo de ratas en desarrollo y evaluar el posible efecto protector de la metalotioneina cuando es inducida por la dexametasona.

6.1 *Objetivos particulares*

- Determinar las concentraciones de cadmio en sangre y regiones encefálicas de ratas en desarrollo que fueron expuestas a Cd.
- Evaluar las alteraciones morfológicas y ultraestructurales en corteza parietal, estriado, hipocampo y cerebelo de ratas que fueron expuestas a Cd.
- Localización y expresión de la MT en corteza parietal, estriado, hipocampo y cerebelo mediante inmunohistoquímica
- Cuantificar la concentración MT en las diferentes regiones del encéfalo de ratas expuestas a Cd y Dx por espectrofotometría de absorción atómica..
- Determinar los niveles de peroxidación de lípidos en regiones cerebrales de ratas expuestas a Cd y Dx .

7. MATERIALES Y METODOS.

7.1 Animales.

Se utilizaron ratas Wistar machos y hembras de 13 días de edad (a esta edad las hormonas no juegan papel determinante para las respuesta de los animales a los tratamientos experimentales), de la cepa del Bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Las ratas se dejaron lactar *ad libitum* y se mantuvieron en cajas de polipropileno con una temperatura aproximada de 22°C, ciclos de luz-obscuridad de 12h y una humedad ambiental relativa de 40%.

Las ratas Wistar preñadas se mantuvieron en cajas individuales y fueron alimentadas con Purina Chow y agua *ad libitum*. Las ratas se evaluaron a diario para determinar el día del parto. El día de nacimiento de las ratas fue definido como el día uno postnatal. Un día después del nacimiento el número de crías se redujo a 8 sin importar el sexo, eliminándose el exceso de ratas al azar. Las crías que fueron seleccionadas se quedaron con sus madres durante todo el experimento. Cuando las crías cumplieron los 13 días de edad se iniciaron los tratamientos.

A partir de una camada se obtuvo un bloque experimental constituido por 8 animales a los que se les administró al azar uno de los tratamientos. Este procedimiento se repitió de 8 a 12 veces.

7.2 Tratamientos experimentales.

A las ratas se les administro intraperitonealmente (i.p.) con los siguientes compuestos:

Grupo Control.- Sólo solución salina al 0.9%

Grupo Cd.- Cd1mg/kg/día + solución salina al 0.9%

Grupo Dx.- Dx 2mg/kg/día + solución salina al 0.9%

Grupo Cd+Dx.- Cd 1mg/kg/día + Dx 2mg/kg/día al 0.9%

Las ratas se pesaron diariamente y luego de recibir el tratamiento se regresaron con sus madres. Al quinto y décimo quinto día de tratamiento las ratas fueron sacrificadas para obtener el cerebro o la sangre para los diferentes análisis y procedimientos (fig.6).

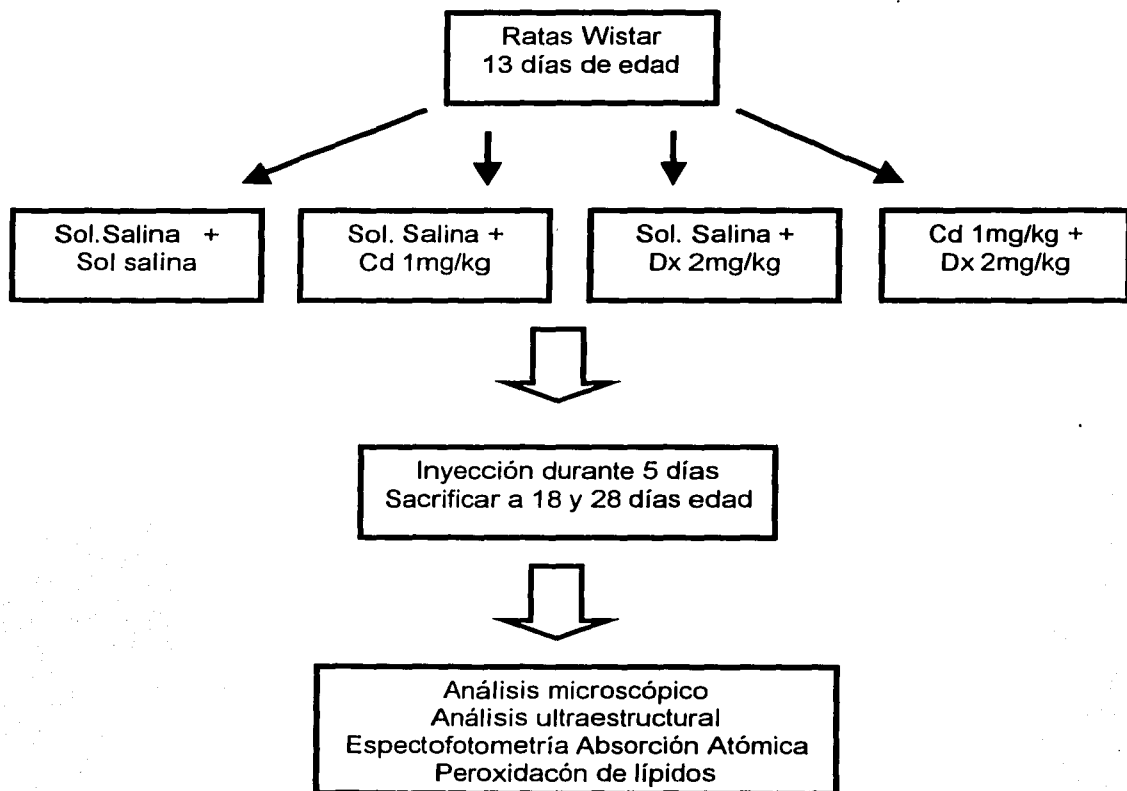


Fig.6.- Esquema del diseño experimental

7.3 Determinación de Cd en Sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca directa bajo anestesia con cloroformo y para determinar Cd en sangre se procedió de acuerdo a la técnica descrita por Peterson y col. (1991). Se colocaron 2 tubos (ya que la medición se hizo por duplicado) para cada muestra de sangre. A cada tubo se adicionó 1 ml de ácido nítrico 0.8N, esto con el fin de precipitar las proteínas de la sangre. En los tubos etiquetados se transfirió 1ml de sangre adicionada con ácido, se agito bien y se centrifugo durante 10 minutos a 15,000 rpm en una ultracentrifuga refrigerada Beckman Modelo J-21C. El sobrenadante se guardo en un vial etiquetado y en refrigeración para su posterior medición. Se tomó del sobrenadante 100 μ l y se diluyeron con 400 μ l una solución de modificador de matriz (solución de tritón , fosfato dibásico de amonio y ácido nítrico) , y la mezcla se colocó en el automuestreador del espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito Perkin-Elmer 3110, con las siguientes condiciones: longitud de onda 228.8; temperatura de secado 100°C, temperatura de carbonización 400°C y temperatura de atomización 2,500°C.

Estas condiciones se establecieron previamente utilizando un estandar de Cd (estandar de referencia de Cd N° 3108, obtenido del National Bureau of Standard, Gaithesburg, MD) para obtener las condiciones optimas de las lecturas. La concentración de Cd se determinó interpolando en una curva de calibración construida con un estandar de Cd, cuya concentración es de 10mg/ml. Se tomaron 5ml de la muestra y se disolvieron con 100 ml de una solución de modificador de matriz, hasta obtener una concentración de 50 ppm de Cd (50mg/ml), a partir de la cual se prepararon soluciones con concentraciones de 5ppb (5mg/L), 2.5 ppb , 1.25 ppb y 0.625 ppb por dilución con la misma solución modificadora. Los resultados se expresaron como mg Cd/dl (ppb).

7.4 Determinación de Cd en regiones cerebrales.

Las ratas se sacrificaron por decapitación, se obtuvo el encéfalo y se realizó la disección de las regiones cerebrales (corteza parietal, estriado, hipocampo y cerebelo) según Glowinski e Iversen (1966).

Se siguió la técnica descrita por Christian (1969) y modificada por Eller (1977). Primero se pesaron los tubos vacíos, y después se volvieron a pesar con el tejido para obtener el peso del tejido total; se agregó al tejido 1 ml de ácido nítrico Suprapur. Una vez digeridas las muestras, se tomaron alícuotas de 100µl y se diluyeron 1:50 con modificador. Las muestras y los estándares fueron colocados en el automuestreador del espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito Perkin-Elmer 3110, con las mismas condiciones utilizadas para la deteminación de cadmio en sangre. Los resultados se expresaron en ng Cd/g de tejido húmedo.

7.5 Análisis por microscopía óptica.

Las ratas (25-30 g de peso) se anestesiaron con hidrato de cloral al una concentración de 0.124mg/kg por vía i.p. y se perfundieron por vía intracardiaca con 250ml de solución salina a 4°C seguida de 400ml de solución de formol al 10% también a 4°C con una presión de perfusión de 13.69 KPa. Los cerebros disectados, se fijaron en formol al 10% por 15 días. Las muestras de tejido se deshidrataron en alcoholes 60%, 70%, 80%, 96%, absoluto, absoluto-xilol, xilol cada uno de una hora y finalmente se infiltraron en parafina 2 veces 1 hora posteriormente se incluyeron en bloques de parafina. El tiempo total del proceso fue de 9 horas. Ya obtenidos los bloques se hicieron cortes de 5µm de grosor con el micrótopo; estos cortes fueron adheridos a portaobjetos y después rehidratados para su posterior tinción con la técnica de hematoxilina-eosina (Heffes C, y Mullick F, 1992). También se realizaron las impregnaciones argénticas de Río-Hortega y la variante para fibras nerviosas de Barroso-Moguel (Estrada y col 1982). Los cortes fueron analizados y fotografiados con un fotomicroscopio Carl Zeiss FOMI II.

7.6 Análisis Inmunohistoquímico

Para el análisis inmunohistoquímico se llevo a cabo el mismo procedimiento de sacrificio disección, fijación y deshidratación que para el apartado de estudio histopatológico (sección. 7.5). Los bloques de parafina se cortaron a 5µ de grosor y fueron adheridos al portaopbjetos previamente preparados con silano (que es un adhesivo para evitar desprendimiento de cortes) Las secciones de tejido se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en alcohol absoluto, 96%, 80%, 70%, 60%, 40% y agua destilada cada

cadmbio fue de 3 minutos. Las peroxidases endógenas fueron bloqueadas con peróxido de hidrógeno al 3% por 30 minutos a temperatura ambiente. Se aplicó el anticuerpo monoclonal contra Metalotioneína (MT-I y MT-II) de DAKO, durante 24 hrs, en cámara húmeda a temperatura ambiente, se adicionó el anticuerpo conjugado biotinilado por 20 minutos seguido del complejo estreptavidina conjugada con peroxidasa por 20 minutos a temperatura ambiente. Después de cada incubación las muestras fueron lavadas con PBS pH 7.6. Finalmente las inmunoreacciones se revelaron con di-amino-bencidina (DAB) por 5 minutos, lavadas y contrateñidas con hematoxilina-carbonato de litio. Las laminillas fueron analizados y fotografiadas con un fotomicroscopio Carl Zeiss FOMI II.

7.7 Análisis por microscopía electrónica.

Las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral al una concentración de 0.124mg/kg por vía i.p. y profundidas por vía intracardiaca con 250 ml de solución salina seguido 300ml de una solución fijadora (amortiguador de cacodilatos 3M, paraformaldehído 8% y glutaraldehído al 2.5%). Se realizó la disección de las regiones, los fragmentos fueron colocados en glutaraldehído 2.5% por 2 hrs. Se cambiaron a una solución amortiguadora de cacodilatos y se hicieron 2 lavados de 10 minutos cada uno y a temperatura ambiente. Los tejidos fueron postfijados en tetraoxido de osmio al 1% durante 1:30 hrs. y se lavaron 2 veces en amortiguador de cacodilatos durante 10 minutos cada cambio. Se prosiguió con la deshidratación con solución de alcoholes porcentuales a las siguientes concentraciones: 70%, 80%, 90% y 100% de 10 minutos cada uno, seguido de 2 cambios de 15 minutos con Oxido de propileno. Los tejidos fueron preincluidos con óxido de propileno-EPON 1:1 por 24 hrs, para ser finalmente incluidos en Epon puro y polimerizados a 60°C por 18hrs (Heffes C, y Mullick F, 1992).

Los cortes de los bloques fueron realizados en un ultramicrotomo Reicher-Jung Om U3 con cuchilla de vidrio. Los cortes semifinos de 1µ de grosor fueron teñidos con azul de toluidina para seleccionar el área a estudiar. Se realizaron los cortes finos que fueron adheridos a rejillas de cobre y contrastados con Acetato de Uranilo alcoholico al 3% pH 4.5 por 15 minutos, lavados con agua destilada y Citrato de Plomo pH 9 por 10 minutos (Heffess C, y Mullick F, 1992). Los cortes fueron analizados con un Microscopio Electrónico Zeiss EM-10. Se estudiaron las 4 regiones obtenidas (corteza parietal,

estriado, hipocampo y cerebelo). Observamos principalmente mitocondrias cerca del núcleo y en la región sináptica de las neuronas, fueron elegidos 10 campos al azar de cada rata por cada tratamiento.

7.8 Determinación de metalotioneína

Para determinar esta proteína se siguió la técnica de saturación con Ag, descrita inicialmente por Scheuhammer y Cherian (1986) con modificaciones mínimas. Este método hace uso de la afinidad de la MT por la Ag y de que esta proteína es termoestable, de tal manera que la cantidad de Ag soluble después de hervir una suspensión proteica enriquecida con este elemento, permite calcular la concentración de MT presente en el tejido.

Las ratas se sacrificaron por decapitación y se realizó la disección de las regiones cerebrales como se describe en la sección 4.4. El tejido se pesó y homogenizó en 300 µl de una mezcla (1.5:1 v/v) de buffer de fosfatos, 0.05 M y NaCl, 0.375 M. Al homogenizado se le agregaron 400 µl de solución amortiguadora de glicina, 0.5 M y 250 µl del estándar de Ag, se mezclaron suavemente, dejándose reposar a temperatura ambiente durante 5 min, luego se le agregaron 100 µl de hemolizado (su preparación se menciona en el siguiente párrafo), la mezcla se hirvió durante 2 minutos, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min., se tomó el sobrenadante, al que se le agregaron de nuevo 100 µl del hemolizado, y la mezcla se hirvió nuevamente por un periodo de tiempo semejante, luego se centrifugó, se tomó el sobrenadante y se repitió el procedimiento una vez más. El sobrenadante final se resuspendió en HNO₃ al 3% en una proporción de 1:10 v/v y se determinó el total de Ag por espectrofotometría de absorción atómica, el cual es proporcional a la cantidad de MT, las lecturas se hicieron bajo las siguientes condiciones: longitud de onda 328.1 nm; temperatura de secado 85°C; temperatura de carbonización 850°C; temperatura de atomización 2,400°C. Estas condiciones se establecieron previamente utilizando un estándar acuoso de Ag (Mallinckmdt Speciality Chemicals, Co, Paris, KY) para obtener las condiciones óptimas de lectura. La concentración se determinó por una curva acuosa construida con un estándar de Ag cuya concentración es 20 ppm, a partir del cual se preparan soluciones con concentraciones de 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 ppm. Los resultados se expresaron en mg MT/g húmedo de tejido.

Para la preparación del **hemolizado**: una vez obtenida la sangre de las ratas, se midió el volumen y por cada 10 ml se le agregaron 20ml de KCl; 1.15%, se agitó y se centrifugo a 3,000 rpm por 5 min. el sedimento se resuspendió en 20ml de KCl, se agitó nuevamente y se centrifugo a 3,000 rpm por 5 min, se repitió este paso una vez más. Finalmente la pastilla se resuspendió en 30 ml de bufer de TRIS 30mM, se dejó reposar durante 10 min, después se centrifugo a 10,000 rpm por 10 min. y el sobrenadante (hemolizado) se congeló a -70°C .

7.9 Determinación de peroxidación de lípidos.

Se siguió la técnica descrita por Triggs y Willmore (1984), esta técnica se basa en la determinación de productos lipídicos de peroxidación que generan fluorescencia. Se sacrificaron a las ratas por decapitación y se disecaron las regiones cerebrales como se indica en el segmento 4.4 . El tejido se homogenizó en 3 ml de solución salina al 9% y a 4°C , se tomaron alícuotas de 1ml por duplicado (una alícuota de 1ml se guardó en congelación para la determinación de proteínas) y se les agregaron 4ml de una mezcla de cloroformo-metanol. Después de ser agitada durante 5 seg, la mezcla fue refrigerada por 30 min, protegidas de la luz, para permitir la separación de fases. La fase acuosa (fase superior) se aspiró con una bomba de vacío y se descartó; de la parte inferior se tomaron 900 μl y se les agregaron 100 μl de metanol. La fluorescencia se determinó en esta fase usando un Espectrofotómetro de Luminiscencia Perkin Elmer LS 50B, a longitudes de onda de 370 nm de excitación y 430nm de emisión. La sensibilidad del espectrofotómetro fue calibrado a 140 unidades de fluorescencia con la solución estándar de quinina (0.1 $\mu\text{g/ml}$ de H_2SO_4 0.5M). Para expresar los niveles de peroxidación/ μg de proteína se hizo la determinación de proteínas por medio del método de Lowry (1951).

7.10 Determinación de Proteínas.

Para la determinación de proteínas, se descongeló la alícuota (que se había guardado en el primer paso de la determinación de peroxidación de lípidos). De esta alícuota se tomaron 50 μl y se le agregaron 950 μl de agua desionizada. De esta dilución se tomó una alícuota de 400 μl y se agregaron 2ml de NaOH 0.1 N más 0.5 ml de tartrato de Sodio y potasio al 2% más 0.5ml de CuSO_4 al 1%. Todo esto se agitó por 5 seg y se dejó reposar

durante 10 min. A cada tubo se le agregaron 200 μ l del reactivo Folin-Fenol diluido previamente en agua en una porción de 1:1. Se agitó por 5 seg y se dejó reposar por 30min. La absorbancia del cromógeno azul se midió en el Espectrofotómetro de Ultravioleta Visible Perkin-Elmer Lambda a una longitud de onda a 550nm. Para obtener la concentración de proteínas se interpolan los valores de una curva estándar construida por concentraciones de albúmina conocida. Las unidades son expresadas en nmoles de proteína/g de tejido. Todo se realizó por duplicado.

7.11 Análisis estadístico

Todos los datos generados fueron analizados estadísticamente empleando un análisis de varianza de bloques seguido de una prueba de Tukey.

8. RESULTADOS

8.1 Concentración de Cd en sangre

La concentración de Cd encontrada en sangre se incrementó en los grupos tratados con Cd y Cd+Dx a los dos tiempos en que fueron sacrificados los animales (fig.7). El incremento en el grupo tratado con Cd fue de 43 y 23.4 veces a los 18 y 28 días respectivamente. Así mismo el incremento de Cd en los grupos tratados con Cd+Dx fue de 25.3 y 21.5 veces a los 18 y 28 días.

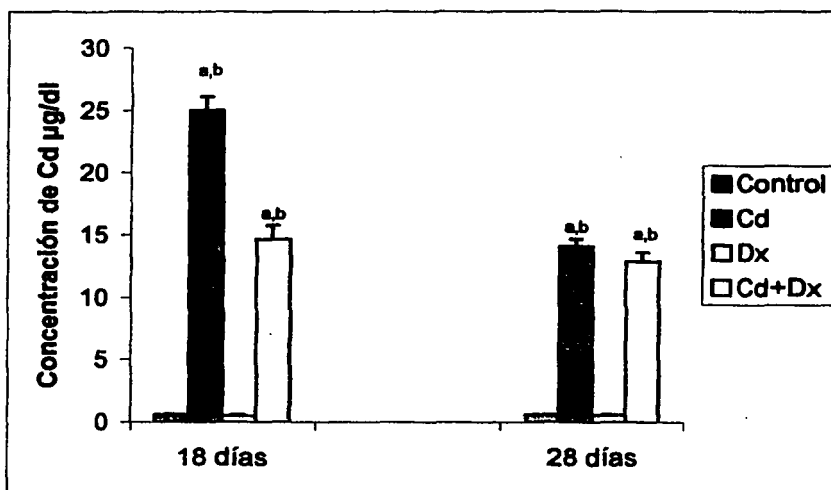


Fig.7.- Concentraciones de Cd en sangre a los 18 y 28 días de edad en los diferentes grupos de tratamiento. Cadmio (Cd 1mg/kg/día) Dexametasona (Dx 2mg/kg/día). a diferente vs control; b diferente vs Dx $p < 0.01$. Prueba de Tukey.

8.2 Concentración de Cd en regiones cerebrales

En las regiones cerebrales también se encontraron incrementos en el contenido de Cd a las dos edades estudiadas en los grupos tratados con Cd y Cd+Dx. El contenido de Cd en corteza parietal a los 18 días de edad en el grupo tratado solo con Cd, se incrementó 58.3 veces, en estriado 9.4 veces, 18.3 en hipocampo y 11.4 veces en cerebelo (fig.8), mientras que a los 28 días de edad los incrementos fueron de 6.6 en corteza , 5.8 en estriado, 22.3 en hipocampo y 11.3 en cerebelo veces respectivamente (Fig.9). En el grupo tratado con Cd+Dx , el incremento en el contenido de Cd en corteza parietal fue de 58.3 veces, estriado 6.3, hipocampo 11.5 y cerebelo 13.6 veces (fig.8) a los 18 días de edad; mientras que a los 28 días de edad en las mismas regiones el incremento fue de 18.4 veces, 8.2, 13 y 11.7 veces (fig.9) con respecto al grupo control. Tanto a los 18 como a los 28 días de edad la concentración mas alta del metal fue encontrada en el hipocampo seguida del estriado, corteza y cerebelo; estos resultados fueron diferentes estadísticamente con una $p < 0.01$.

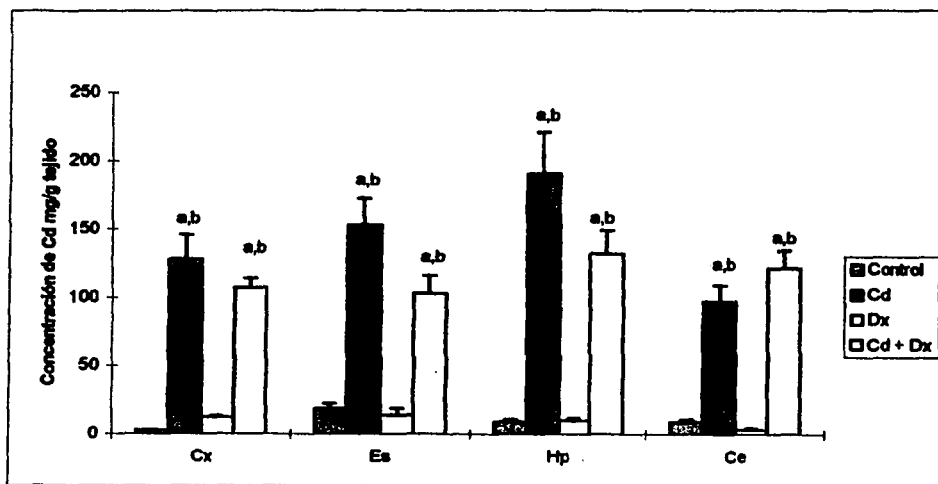


Fig.8.- Concentraciones de Cd en regiones encefálicas a los 18 días de edad. Cadmio (Cd 1mg/kg/día) Dexametasona (Dx 2mg/kg/día). a diferente vs control; b diferente vs Dx $p < 0.01$. Prueba de Tukey.

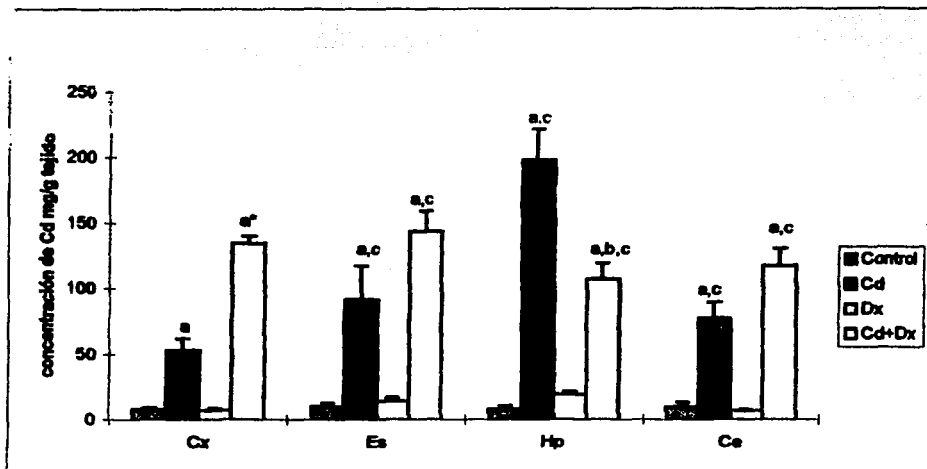


Fig.9.- Concentraciones de Cd en regiones encefálicas a los 28 días de edad. Cadmio (Cd 1mg/kg/día) Dexametasona (Dx 2mg/kg/día). a diferente vs control; b diferente vs Dx $p < 0.01$. Prueba de Tukey.

8.3 Niveles de peroxidación de lípidos en regiones cerebrales

La peroxidación de lípidos también se vio incrementada en las ratas tratadas con Cd y Cd+Dx. La peroxidación de lípidos se incremento a los 18 días en el grupo tratado con Cd en corteza parietal 2.7, estriado 2.4 y cerebelo 1.5 veces de forma significativa con respecto al control, mientras que en el hipocampo el aumento fue de 1.3 veces sin tener significancia estadística (fig.10). La peroxidación de lípidos en corteza parietal fue 1.7 incrementada con respecto al grupo tratado solo con Dx.

El grupo de ratas tratado con Dx también mostró un incremento en la peroxidación en las mismas regiones que el grupo anterior: corteza parietal 1.9, estriado 1.6 y cerebelo 1.3 veces con respecto al grupo control; el hipocampo se mantuvo sin diferencias (fig.10) así mismo también estriado fue diferente con respecto al grupo tratado solo con Cd. El grupo tratado con Cd+Dx siguió la misma tendencia de incrementar la lipoperoxidación en las misma regiones: corteza 1.7, estriado 1.6 y cerebelo 1.4 veces;

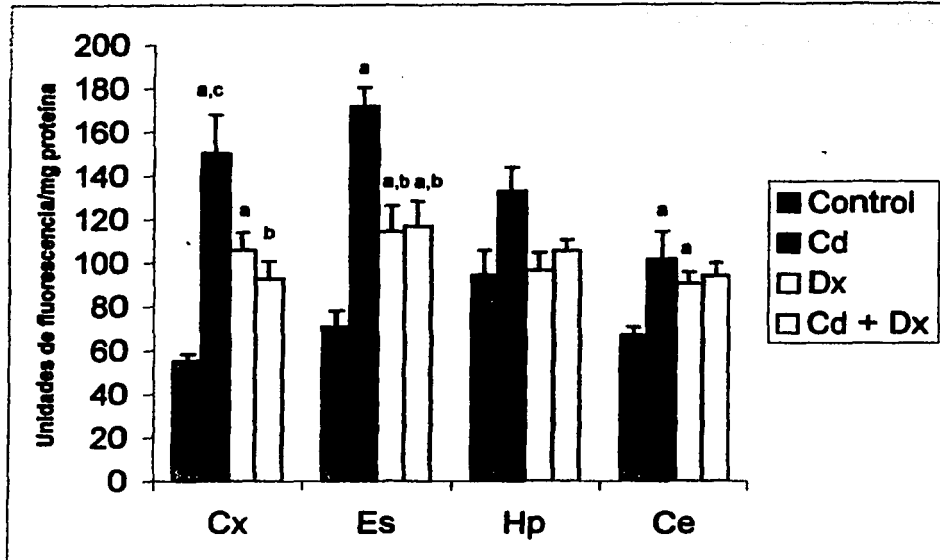


Fig. 10.- Peroxidación de lípidos en regiones cerebrales a los 18 días de edad; a diferente vs. control $p < 0.05$; b diferente vs Cd $p < 0.05$; c diferente vs Cd+Dx $p < 0.05$. Prueba de Tukey.

mientras que el hipocampo 1.1 veces no mostró ningún incremento significativo, estos incrementos fueron con respecto al control, en este mismo grupo también estriado y corteza fueron diferentes con respecto al grupo tratado solo con Cd (fig.10).

A los 28 días de edad en la peroxidación de lípidos no se observaron cambios marcados. En el grupo tratado con Cd la peroxidación de lípidos se incrementó 1.5 veces en el estriado, corteza parietal, cerebelo e hipocampo no mostraron cambios en este mismo grupo (fig.11). En estriado y corteza el grupo tratado con Dx mostró una tendencia a disminuir los niveles de peroxidación con respecto al control; no así en cerebelo e hipocampo (fig.11) que se mantuvieron sin diferencia con respecto al control. Por último el grupo tratado con Cd+Dx mostró una tendencia muy similar en las cuatro regiones estudiadas, con respecto al control no se mostraron cambios significativos. La

Única diferencia en este grupo se vio con respecto al grupo tratado con Cd solo en el estriado en donde la diferencia fue de 0.72 veces menos que en ese grupo (fig.11).

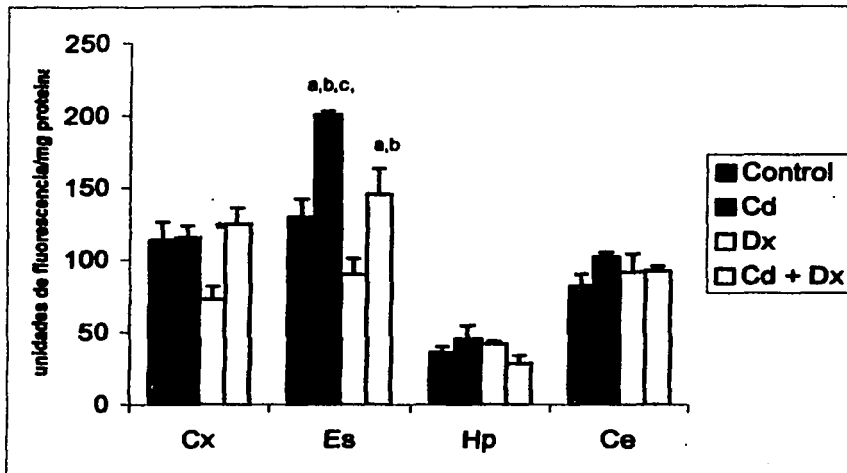


Fig. 11.- Peroxidación de lípidos en regiones cerebrales a los 28 días de edad, a diferente vs control; b diferente vs.Dx; c diferente vs Cd+Dx ; * diferente vs los 3 grupos con una $p < 0.05$. Prueba de Tukey

8.4 Niveles de metalotioneína en regiones cerebrales

Las concentraciones de metalotioneína se incrementaron en los grupos tratados con Dx y Cd+Dx en las diferentes regiones. A los 18 días de edad, en el grupo tratado solo con Cd el incremento no fue significativo en ninguna región (fig.12) con respecto al control. Mientras que en el grupo tratado con Dx los niveles de metalotioneína se elevaron de manera significativa: en corteza 2.1, estriado 3.6, hipocampo 1.9 y en cerebelo 6.8 veces con respecto al grupo control, así mismo en el grupo tratado con Cd+Dx los niveles de metalotioneína también se incrementaron en corteza 2.49, en estriado 4.15, en hipocampo 2.19 y en cerebelo 9.5 veces siendo el hipocampo la región que presentó los niveles más altos de proteína seguido de corteza estriado y cerebelo (fig.12) en ambos grupos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A los 28 días de edad el incremento en los niveles de metalotioneína con respecto al grupo control en las 4 regiones cerebrales fueron los siguientes; en el grupo tratado con Cd en corteza 0.8, estriado 0.5, hipocampo 0.9 y cerebelo 1.5 veces (fig.13). En el grupo tratado solo con Dx la corteza aumento 1.9, estriado 4.1, hipocampo 3.6 y en cerebelo 4.2 veces, siendo todas las regiones estadísticamente diferentes con respecto

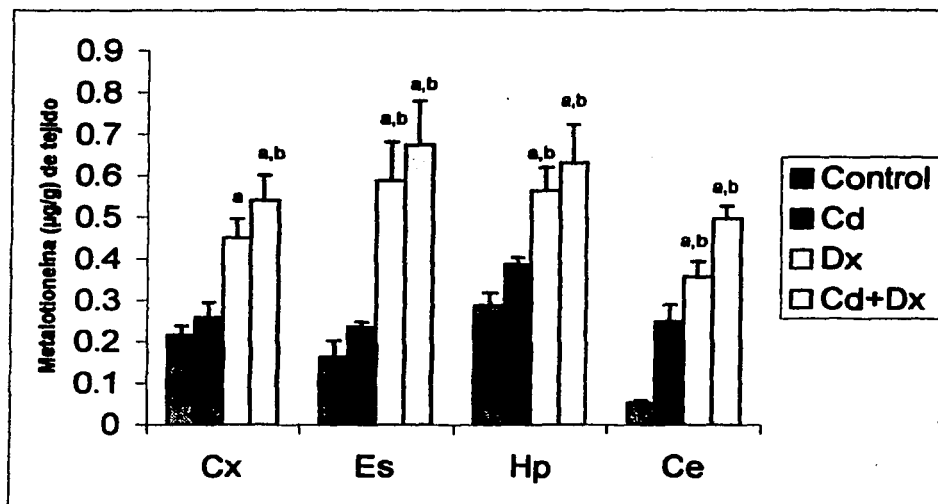


Fig. 12.- Niveles de metalotioneína en regiones cerebrales a los 18 días de edad; a diferente vs control; b diferente vs Cd $p < 0.01$.

al control. El último grupo, el tratado con Cd+Dx también mostró niveles elevados de metalotioneína que fueron significativos para las 4 regiones con respecto al control (fig.13). En donde no hubo diferencias significativas fue en los grupos tratados solo con Dx y el grupo tratado con Cd+Dx excepto en estriado en donde el incremento fue de 1.1 veces con respecto al grupo tratado con Dx. Los valores de metalotioneína en las dos edades cuantificadas presentan la misma tendencia aunque es mas evidente a los 18 días de edad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

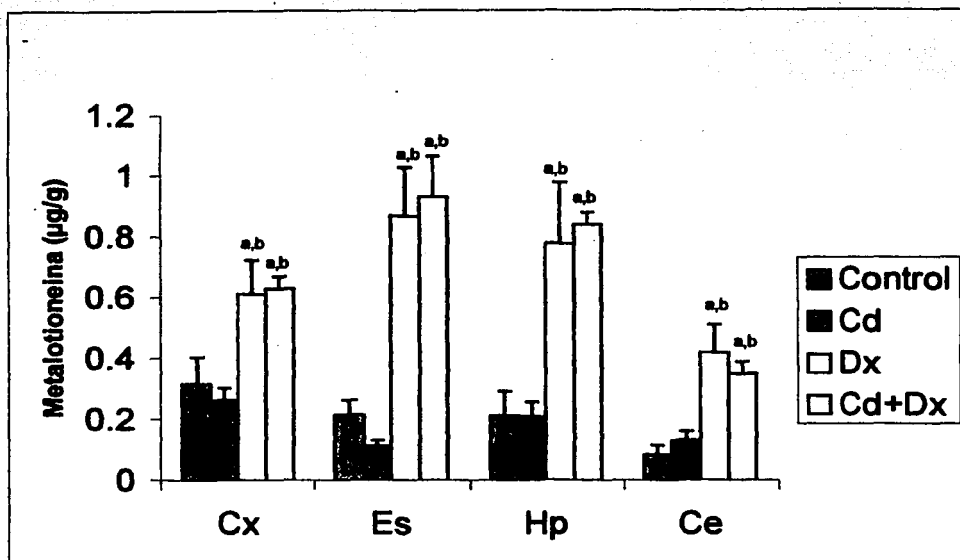


Fig.- 13.- Niveles de metalotioneina en regiones cerebrales a los 28 días de edad; a diferente vs control; b diferente vs Cd $p < 0.05$.

8.5 Inmunohistoquímica de la metalotioneina en regiones cerebrales

El estudio inmunohistoquímico con el anticuerpo contra Metalotioneina I-II nos permitió observar la distribución de la proteína en las diferentes regiones estudiadas a los 18 días de edad. En la figura 14, observamos la corteza parietal con los cuatro tratamientos; en el control (fig. 14A), no se observa la inmunoreactividad del anticuerpo en ninguna célula de esta área, en el grupo tratado sólo con Cd (fig. 14B) se muestra el marcaje del anticuerpo (en tono café) en las células de glia entre las neuronas, en el grupo solo con Dx (fig. 14C) se observa marcaje similar al grupo anterior, el marcaje del anticuerpo en las células de glia entre las neuronas es con mayor fuerza. En el grupo tratado con Cd+Dx (fig. 14D) se observa fuerte marcaje del anticuerpo (color café) en las células de glia, así como también se pueden apreciar parte de las prolongaciones de las células, y también reacción del anticuerpo muy cerca de la aracnoides.

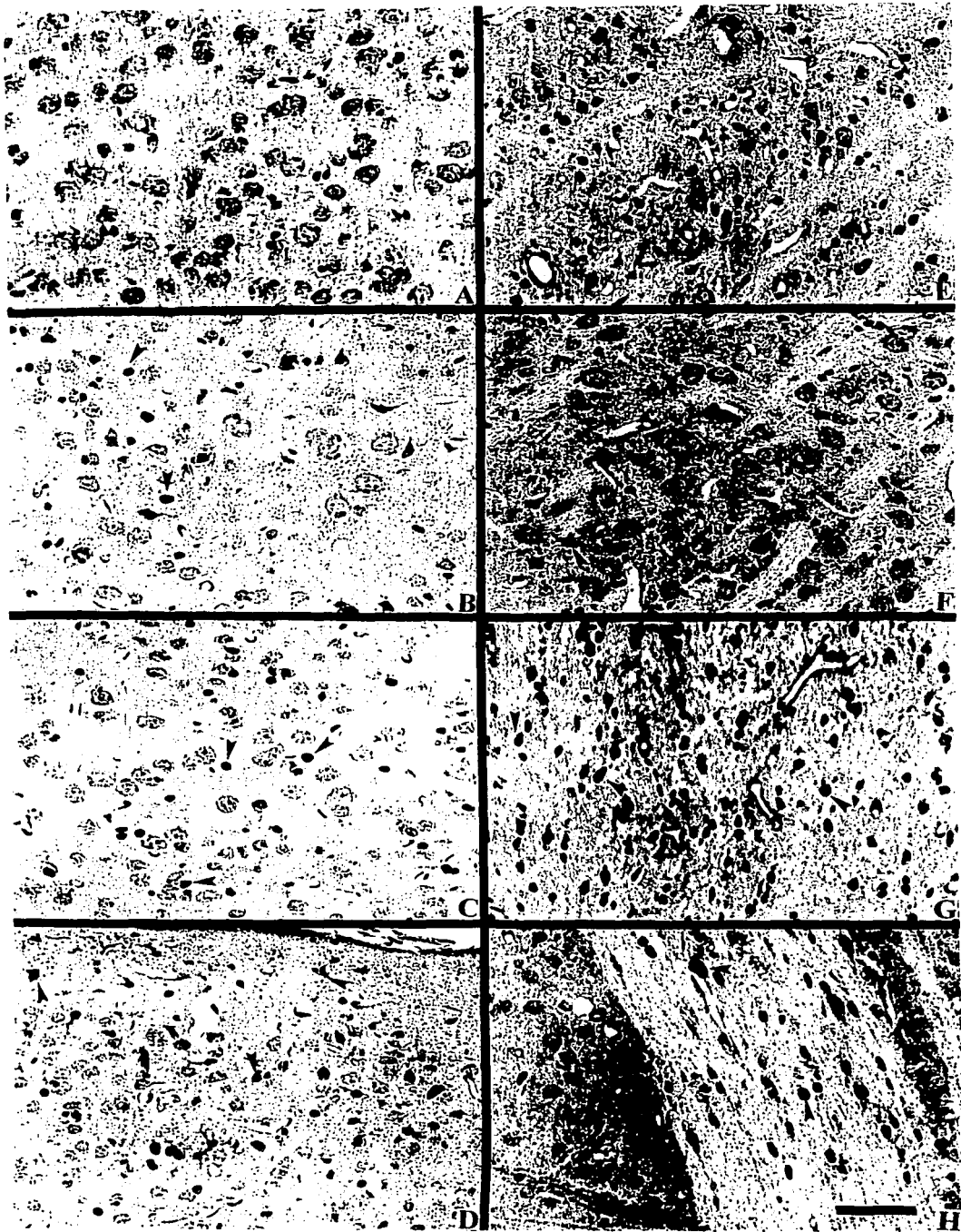


Fig.- 14 Inmunolocalización de la MT en corteza parietal (A,B,C,D) y estriado (E,F,G,H) a los 18 días de edad. Rata control (A,E), Cd (B,F), Dx (C,G) y Cd+Dx (D,H). La mayor inmunoreactividad se observó en las células gliales (▲) (A,B,C,E,F,G). Las células gliales de las ratas tratadas con Cd+Dx fueron las más inmunoreactivas(D,H). Barra= 50µm.

En la misma figura 14, se observa también el estriado en los 4 grupos; el estriado del grupo control (fig. 14E) muestra muy poca reactividad al anticuerpo, solo algunas células gliales con ligera marca, no así en la misma región del animal tratado con Cd en donde el marcaje del anticuerpo es mas evidente sobre todo en el neuropilo y algunas células de glia inmunoreactivas (fig. 14F). En el grupo tratado con Dx (fig. 14G) la inmunoreactividad fue mas intensa en las células de la glia y cerca de los vasos capilares. En el grupo tratado con Cd+Dx (fig. 14H) la reactividad con el anticuerpo fue mas evidente en las células gliales en el neuropilo y entre las fibras.

En la figura 15 se presenta al hipocampo de los animales bajo los 4 distintos tratamientos y a los 18 días de edad. El hipocampo del grupo control (fig. 15 A) muestra ligera marca del anticuerpo pero bien definida, en las células gliales que están entre las células piramidales del hipocampo en la capa CA2. En el grupo tratado con Cd (fig. 15 B) y Dx (fig. 15C) se observa la marca del anticuerpo en las células gliales que están entre las células piramidales del hipocampo. En el hipocampo del grupo tratado con Cd+Dx (fig. 15D) se observa mucho mas fuerte la marca del anticuerpo de las células gliales, entre las células piramidales de la capa CA2, también en algunas de ellas se alcanzan a ver las prolongaciones de las células en un tono color café, típico del cromógeno evidenciando la reactividad del anticuerpo.

Por ultimo en la misma figura 15, se muestra al cerebelo en los 4 grupos experimentales en donde se muestra el marcaje del anticuerpo contra metalotioneina a los 18 días de edad. En la figura 15E tenemos al cerebelo control, en donde no se observa marca del anticuerpo. En el cerebelo tratado con Cd (fig. 15F) se visualiza que la marca del anticuerpo se encuentra en el neuropilo de la capa molecular así como en las células gliales muy cercanas a las células de Purkinje. En el grupo tratado con Dx (fig. 15G) el marcaje fue más intenso y se ve claramente que este se encuentra en todo el neuropilo de la capa molecular, en las células gliales adjuntas a las células de Purkinje y una muy ligera marca en algunas células de la capa granulosa. En el cuarto grupo el tratado con Cd+Dx (fig. 15H) la marca del anticuerpo tiene la misma intensidad que la observada en el grupo tratado con Dx pero ahora también se encuentra en muchas células de la capa granulosa. De manera evidente se observo que en ninguno de los 4 grupos tratados hubo inmunoreactividad para la metalotioneina en células de Purkinje.

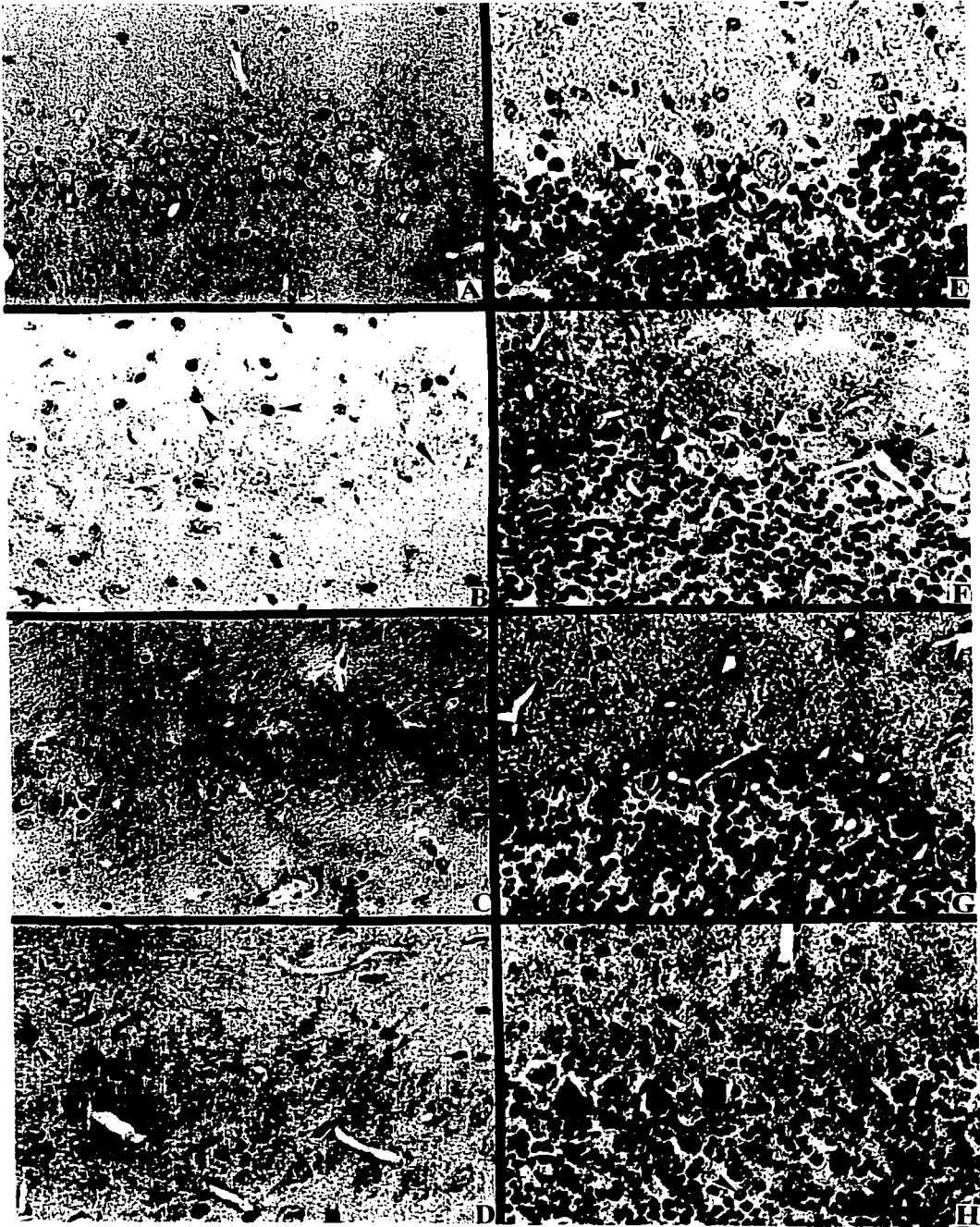


Fig.-15 Inmunolocalización de la MT en hipocampo (A,B,C,D) y cerebelo (E,F,G,H) a los 18 días de edad. Rata control (A,E). Cd (B,F), Dx (C,G) y Cd+Dx (D,H). Las células gliales que están entre las células piramidales del hipocampo presentaron mayor inmunoreactividad (▲) (B,C,D). En las células gliales y neuropilo de la capa granular del cerebelo se observa una marcada inmunoreactividad (▲) (F,G,H). Nótese que ninguna neurona de Purkinje fue inmunoreactiva. Barra= 25µm.

8.6 Análisis de las lesiones por microscopía óptica

En general, el análisis microscópico mostró la existencia de destrucción celular en las regiones cerebrales de las ratas tratadas con Cd y que estas alteraciones se ven disminuidas en las ratas tratadas con Cd+Dx. Para hacer este análisis se utilizaron dos técnicas de tinción: la tinción de rutina de Hematoxilina–Eosina y la Doble impregnación de plata de Río–Hortega modificada para parafina, de esta manera se reforzaron los resultados de rutina con una técnica especial para el sistema nervioso. A los 18 días de edad en las figuras 16A y 17A, la corteza parietal mostró apariencia normal, no hay células dañadas y el neuropilo se observa sin alteración. En la corteza del grupo tratado con Cd (figs. 16B y 17B) se observaron numerosas células hipercromáticas con necrosis y un ligero edema intersticial. En la corteza de las ratas tratadas solo con Dx (figs. 16C y 17C) se observaron células picnóticas con edema intersticial. En el grupo tratado con Cd+Dx (figs. 16D y 17D) se observa el tejido casi con apariencia normal, algunas células hipercromáticas y ligero edema intersticial. A los 28 días de edad en las figuras 16 y 17 se observa la corteza parietal con aspecto normal, numerosas neuronas con núcleos y nucléolos bien definidos y un neuropilo compacto (figs. 16E y 17E). En el grupo tratado con Cd (figs. 16F y 17F) se observan células con picnosis, el tejido de la corteza con zonas de necrosis y severo edema intersticial en el neuropilo. En la corteza de las ratas tratadas con Dx (figs. 16G y 17G) se observa el tejido con apariencia normal tanto en las neuronas bien definidas como en el neuropilo compacto. En las mismas figuras 16 y 17 el grupo tratado con Cd+Dx (figs. 16H y 17H) mostraron pocas células hipercromáticas con un neuropilo normal así como la mayoría de las neuronas que mostraron un núcleo y nucléolos bien definidos.

En las figuras 18 y 19, se observa el estriado a los 18 días de edad, en el grupo control (figs. 18A y 19A) se muestra el tejido completamente normal con numerosas células gliales mezcladas con neuronas bien definidas con núcleos y nucleolos y haces de fibras entre estas células. Las ratas tratadas con Cd (figs. 18B y 19B) mostraron algunas células con retracción somática y ligero edema entre las fibras, así como la presencia de numerosos vasos con presencia aparente de trombos. Tanto las ratas

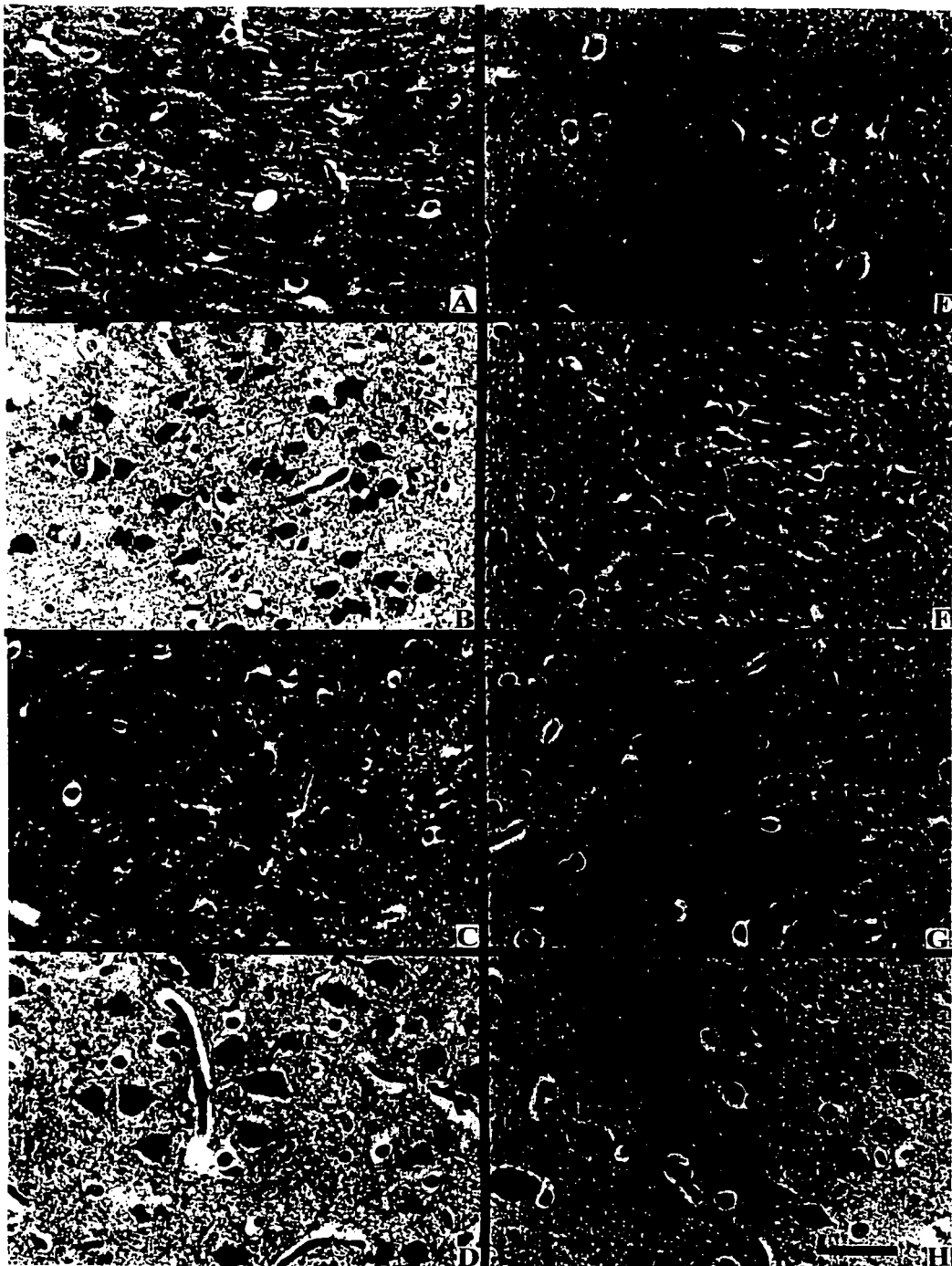


Fig.- 16 Fotomicrografías de corteza parietal a los 18 (A,B,C,D) y los 28 (E,F,G,H) días de edad. Rata Control (A,E), Cd (B,F) : Dx (C,G) y Cd+Dx (D,H). Las ratas control mostraron tejido con aspecto normal (A,E). En B y F se observaron células picnóticas (t), edema intersticial e inicio de necrosis. En C y G se observó ligero edema intersticial y células hiper cromáticas. En D y H se observaron células hiper cromáticas con edema intersticial principalmente a los 18 días (D,H). Tinción de H-E. Barra= 25µm

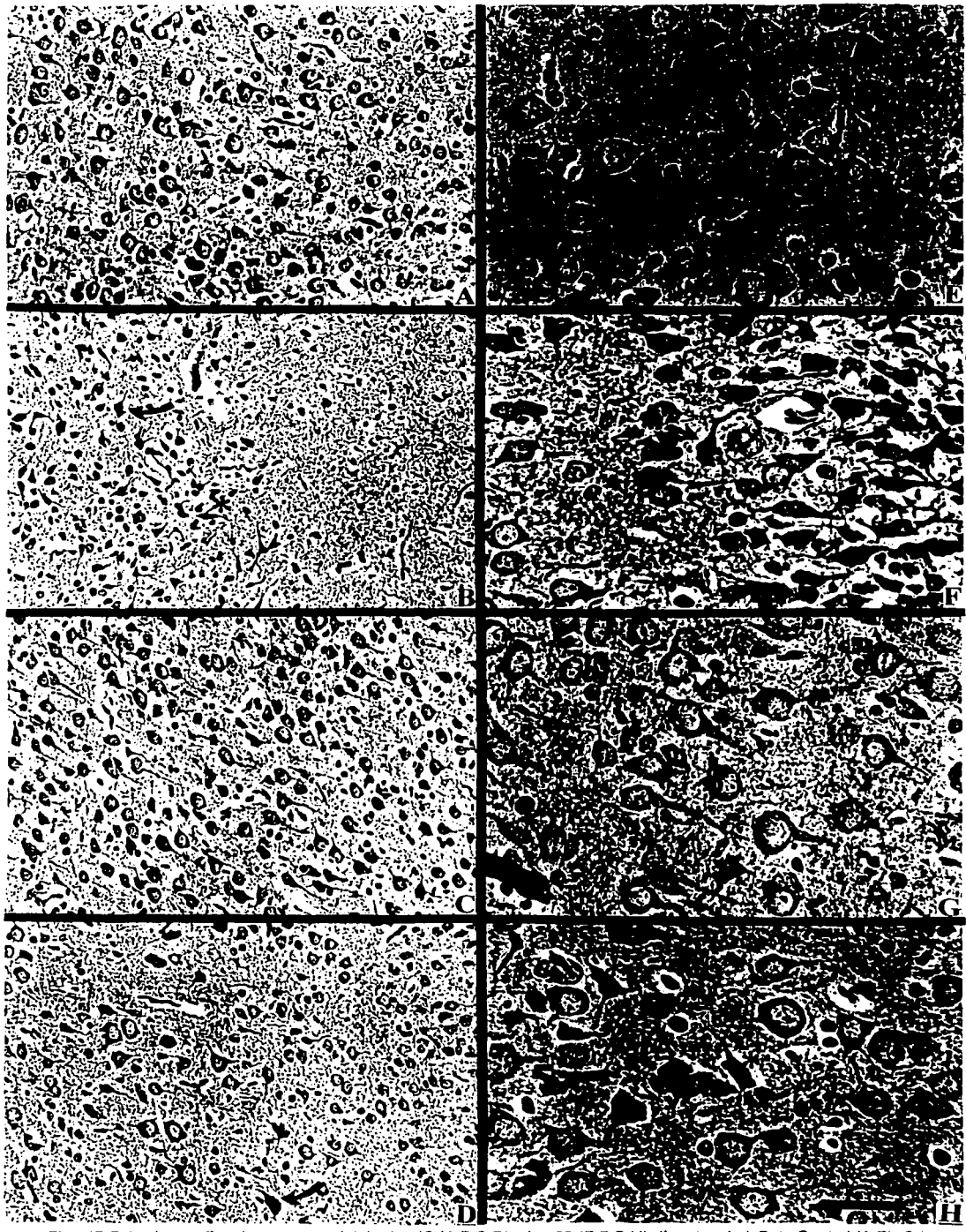


Fig.- 17 Fotomicrografías de corteza parietal a los 18 (A,B,C,D) y los 28 (E,F,G,H) días de edad. Rata Control (A,E), Cd (B,F) ; Dx (C,G) y Cd+Dx (D,H). Se observan cuerpos celulares y neuropilo con aspecto normal (A,E). En B y F se observa condensación nuclear de la cromatina en células (*), fibras destruidas (x) y edema intersticial (†). En C,G,D,H, se observa igeramente edema intersticial (†) y algunas células hiper cromáticas (*). Doble impregnación de Río-Hortega. Barra= 50µm.

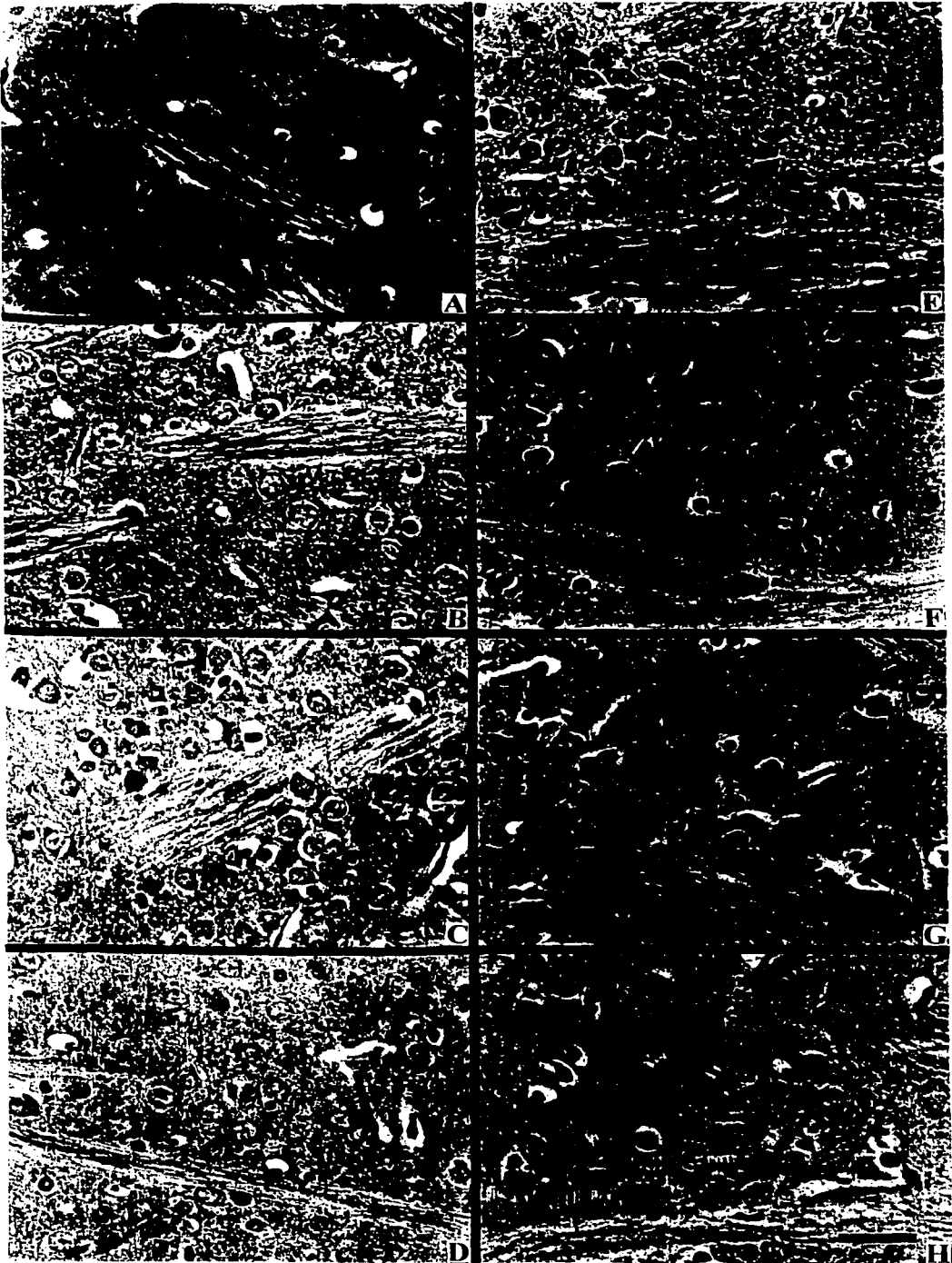


Fig.-18 Fotomicrografías de estriado a los 18 (A,B,C,D) y los 28 (E,F,G,H) días de edad. Rata Control (A,E), Cd (B,F) ; Dx (C,G) y Cd+Dx (D,H). Aspecto normal de neuronas y fibras nerviosas (A,E). El estriado presenta células hipercrómicas (*), edema intersticial en el neuropilo (∧) y entre las fibras (B,F). En C,G y H se observó el tejido con ligero edema intersticial (C,D,G,H) Tinción H-E. Barra= 50 µm.

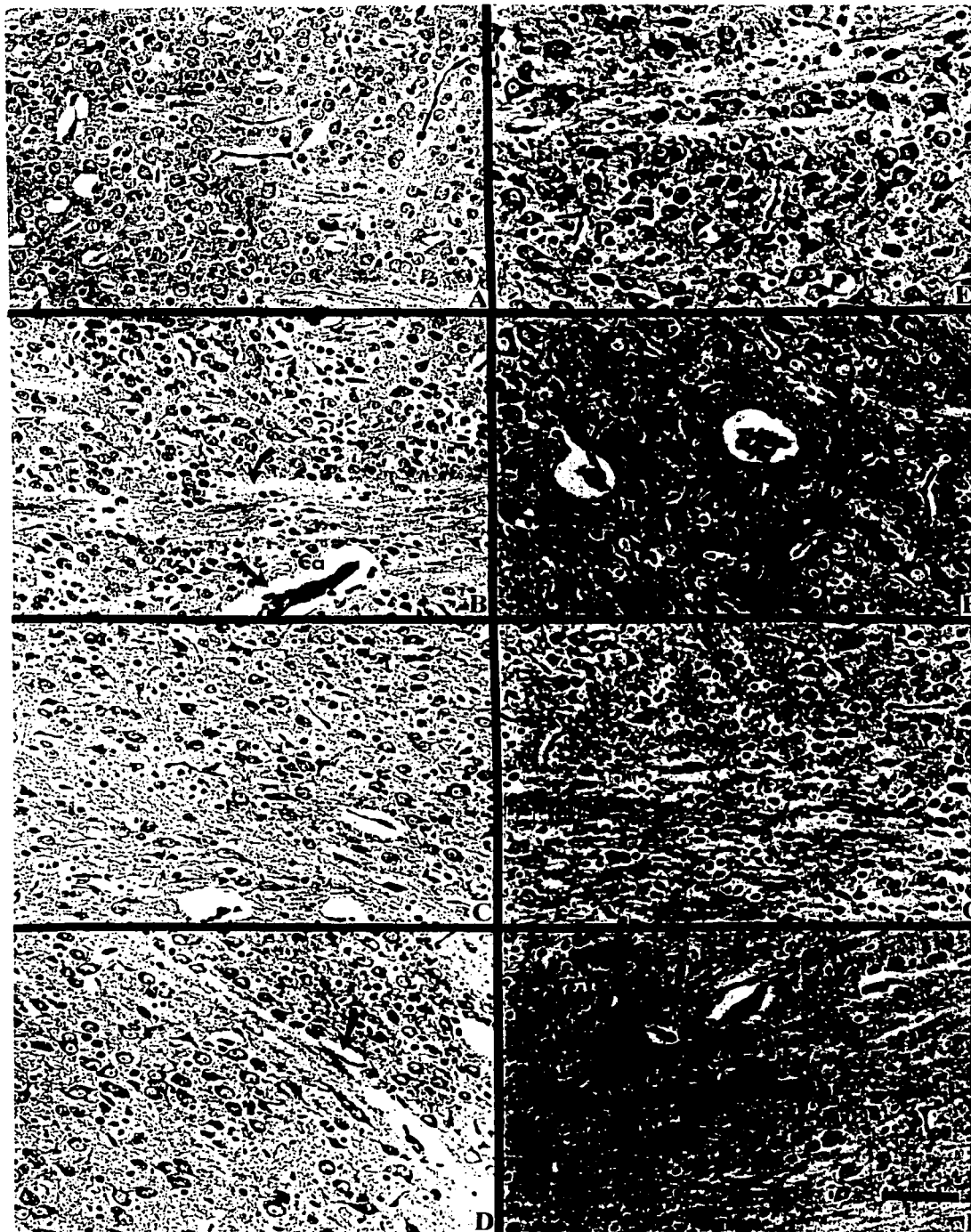


Fig. - 19 Fotomicrografías del estriado a los 18 (A,B,C,D) y los 28 (E,F,G,H) días de edad. Rata control (A,E), Cd (B,F), Dx (C,G) y Cd+Dx (D,H). En el grupo control el tejido presenta aspecto normal (A,E). En el grupo tratado con Cd se observó congestión inicial en capilares (Ca) además de edema entre las fibras (↑, B,F). En C,G,D y H se observó ligero edema intersticial (↑). Doble impregnación de Río-Hortega. Barra=50µm.

tratadas con Dx sola (figs.18C y 19C) como las tratadas con Cd+Dx (figs.18D y 19D) mostraron una apariencia semejante con solo pocas células hipercromáticas y fibras nerviosas normales, pero no se observó edema intersticial. A los 28 días de edad, figuras 18 y 19, las ratas del grupo control (figs.18E y 19E) mostraron tejido con estructura normal, numerosas neuronas y células gliales con núcleo y nucléolo bien definidos y fibras nerviosas entremezcladas. El estriado de las ratas en el grupo tratado con Cd (figs.18F y 19F) se observó con aspecto casi normal sólo con algunas células hipercromáticas y la presencia de algunos trombos aparentes. En los grupos tratados con Dx figuras 18G y 19G y el grupo tratado con Cd+Dx figuras 18H y 19H, se observa el tejido con aspecto casi normal, con escasas células hipercromáticas así como un ligero edema intersticial.

En el hipocampo, el grupo que presentó las alteraciones más evidentes fue el tratado con Cd tanto a los 18 como a los 28 días de edad. En las figuras 20 y 21, observamos el hipocampo a los 18 días de edad en donde los grupos control (figs. 20A y 21A), solo Dx (figs.20C y 21C) y Cd+Dx (figs.20D y 21D) muestran el tejido con apariencia normal, las células piramidales orientadas en empalizada con citoplasma núcleo y nucléolo bien definido así como un neuropilo bien conservado. Mientras en el grupo tratado con Cd (figs.20B y 21B) se observan escasas células hipercromáticas pero el neuropilo bien conservado. A los 28 días de edad los grupos control (figs.20E y 21E), solo con Dx (figs. 20G y 21G) muestran tejido bien conservado con las neuronas piramidales normales. En el grupo tratado con Cd (figs.20F y 21F) se observa que algunas células piramidales están hipercromáticas provocando inicio de necrosis con ligero edema intersticial. El grupo tratado con Cd+Dx (figs. 20H y 21H) muestra el tejido bien conservado con escasas células alteradas por hipercromacia.

En el cerebelo se observó claramente el daño celular en el grupo tratado con Cd a las 2 edades, el daño es menor en las ratas tratadas con Cd y Cd+Dx a los 18 y 28 días de edad. El cerebelo a los 18 días de edad en las figuras 22 y 23 en los grupos control (paneles A) se observan las tres principales capas del cerebelo: molecular, células de Purkinje y granulosa. En el grupo tratado con Cd (figs.22B y 23 B) se observan las capas molecular y granulosa con apariencia normal, pero las células de Purkinje están hipercromáticas y retraídas provocando espacios alrededor. En el grupo tratado con Dx (figs.22C y 23C) tanto la capa molecular como la granulosa tienen un aspecto normal

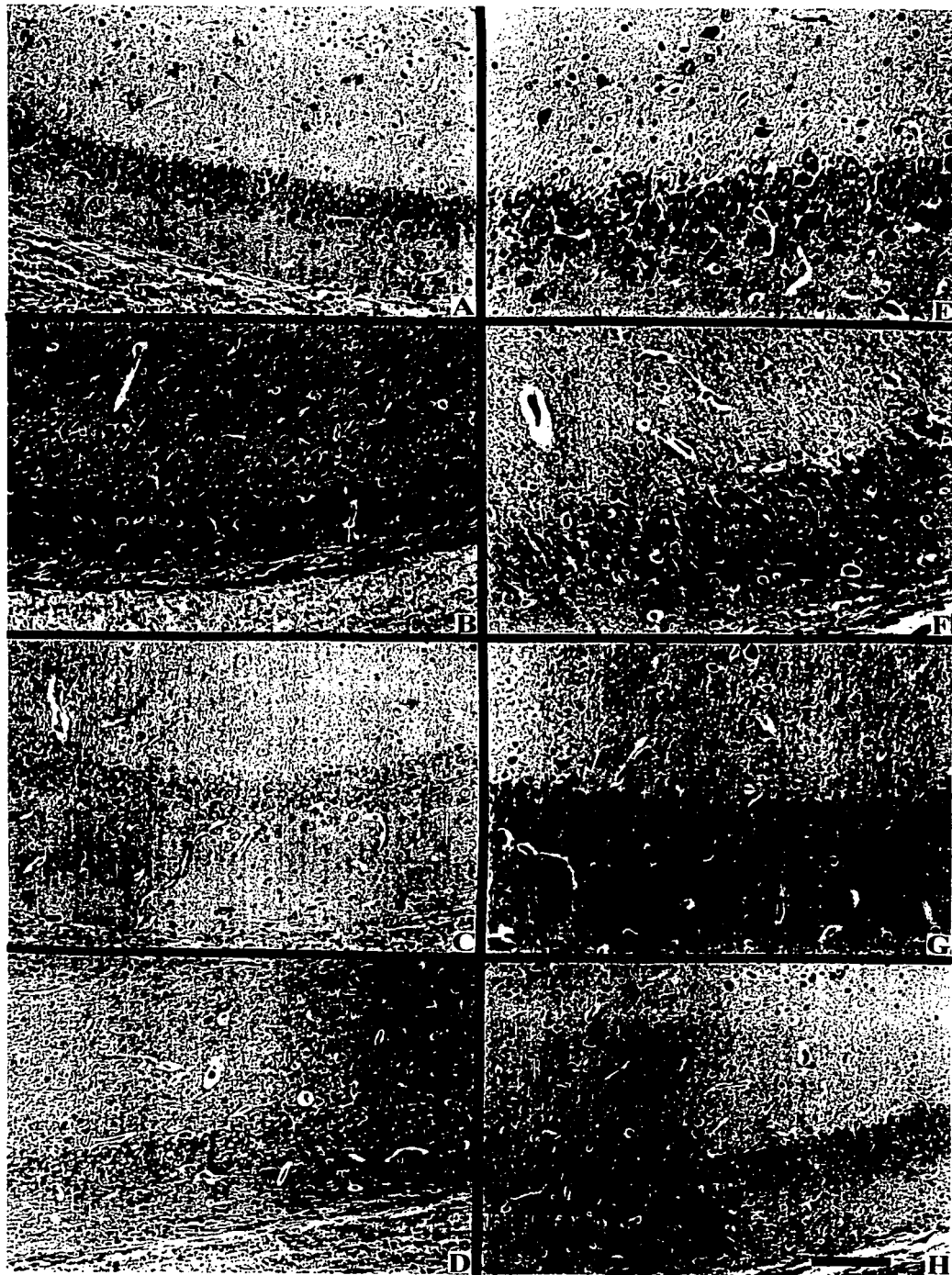
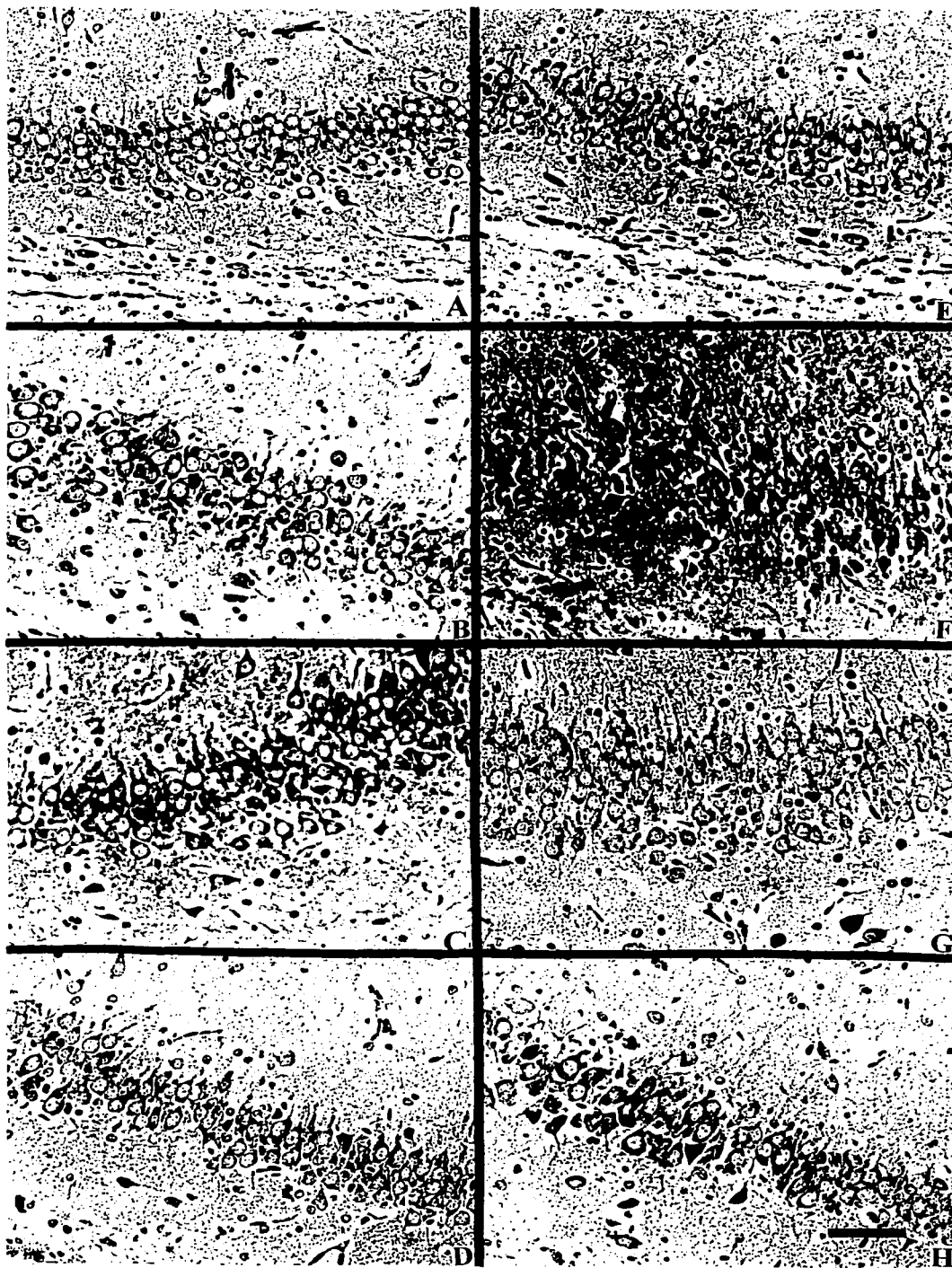


Fig.-20 Fotomicrografías de hipocampo a los 18 (A,B,C,D) y los 28 (E,F,G,H) días de edad. Rata Control (A,E), Cd (B,F), Dx (C,G) y Cd+Dx (D,H). El tejido se observó con apariencia normal y células piramidales bien definidas (A,C,D, E,G). Algunas células piramidales mostraron hiper cromacia (†) (B) o picnosis (▲) (F). Tinción de H-E. Barra=50µm.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Fig.- 21 Fotomicrografías de hipocampo a los 18 (A,B,C,D) y los 28 (E,F,G,H) días de edad. Rata Control (A,E), Cd (B,F), Dx (C,G) y Cd+Dx (D,H). En A,E,B,C,D y G se observaron células piramidales con apariencia normal (†). En F y H se observaron algunas células piramidales con cromatina condensada (*) y edema intersticial fue observado (∧, F,H). Doble impregnación de Río-Hortega. Barra= 50µm

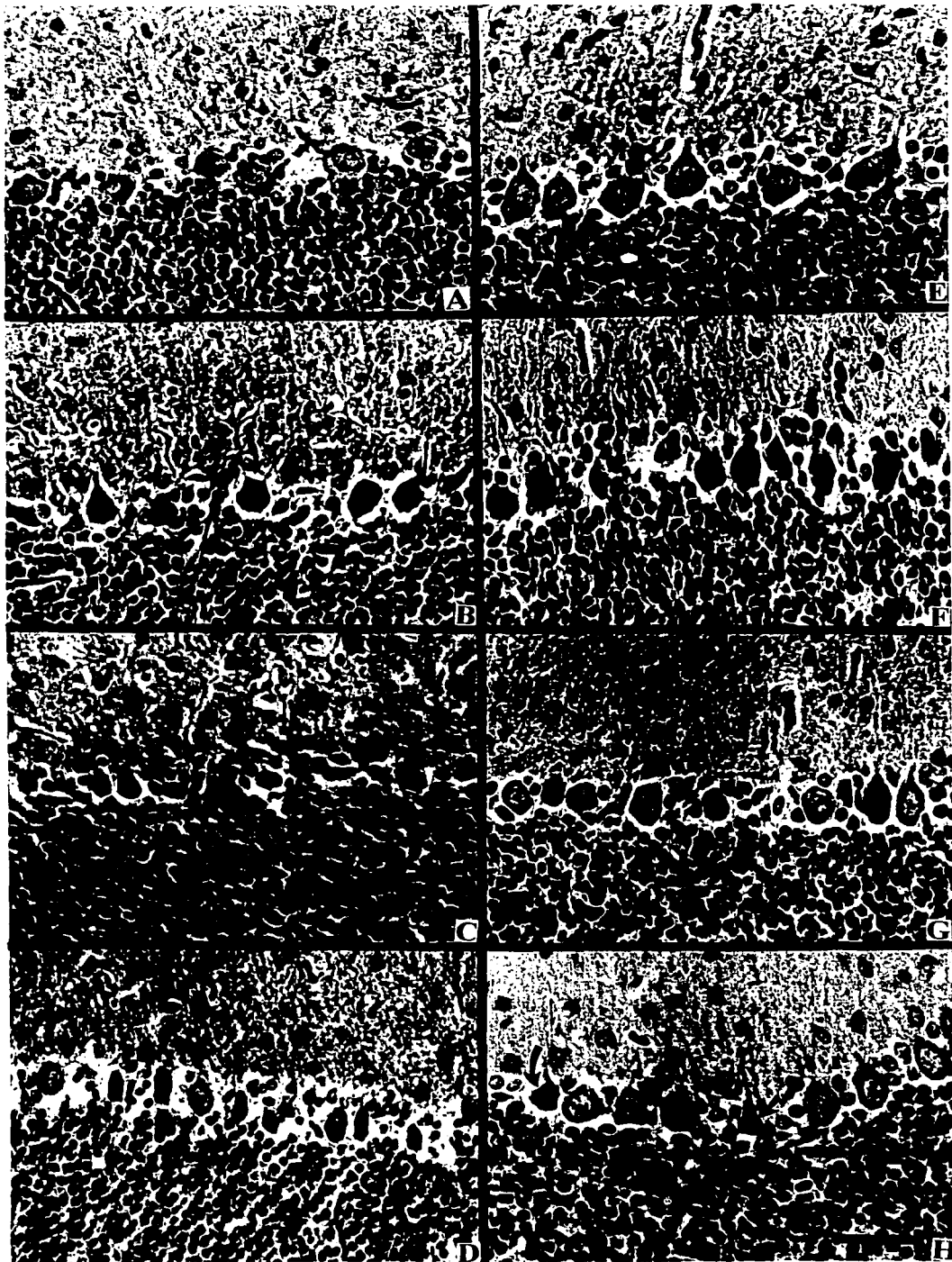
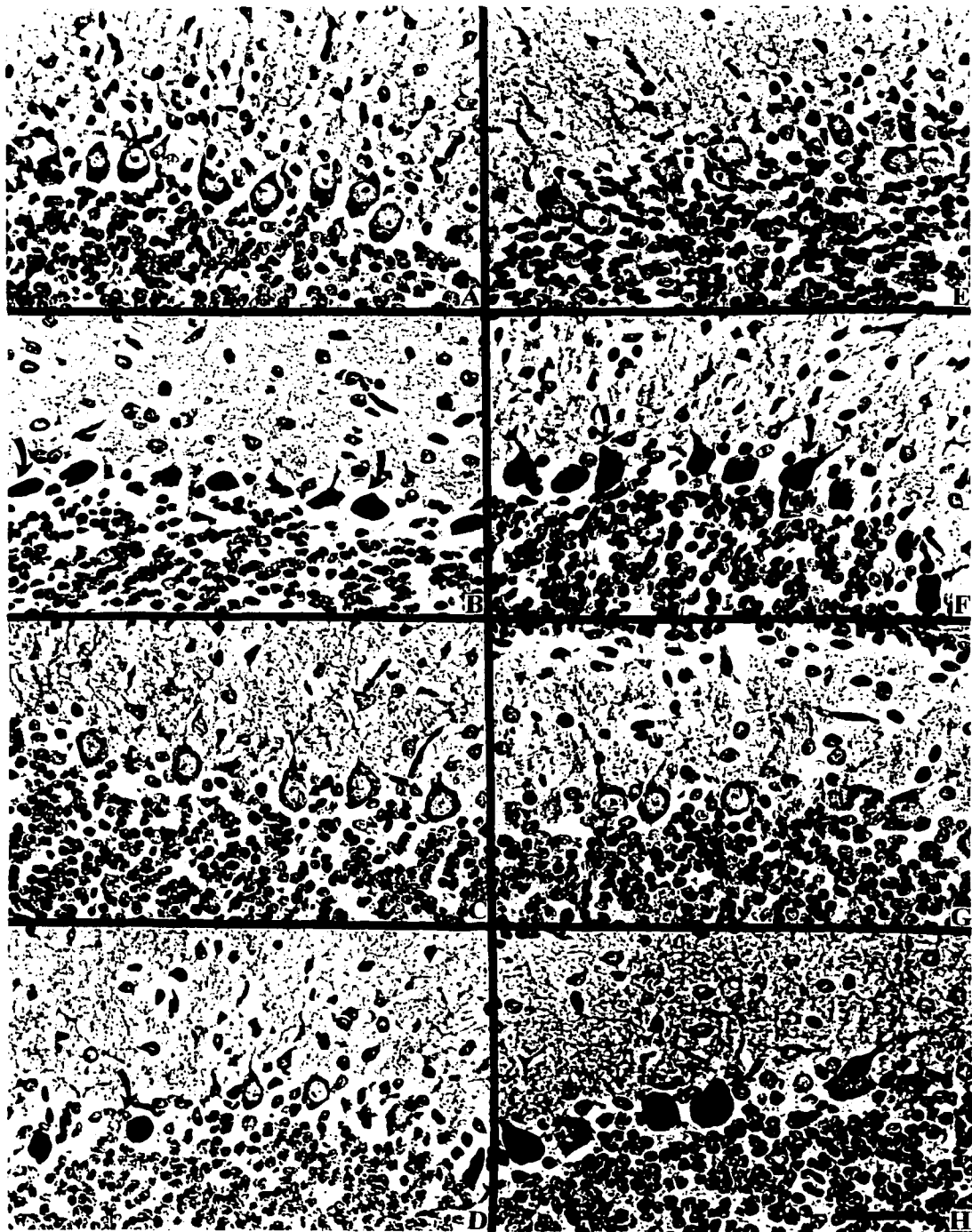


Fig.- 22 Fotomicrografías del cerebelo a 18 (A,B,C,D) y 28 (E,F,G,H) días de edad. Rata Control (A,E), Cd (B,F) ; Dx (C,G) y Cd+Dx (D,H). Las tres principales capas del cerebelo se observaron con una apariencia normal (A,E,G). En B,D y F las neuronas de Purkinje presentaron picnosis (†). Algunas de las neuronas de Purkinje mostraron hiper cromacia (*) (C) Las neuronas de Purkinje se observan picnoticas, en tanto que las capas molecular y granulosa con apariencia normal (H). Tinción de H-E. Barra= 25µm

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Fig. - 23 Fotomicrografías de cerebelo a 18 (A,B,C,D) y 28 (E,F,G,H) días de edad. Rata Control (A,E), Cd (B,F) ; Dx (C,G) y Cd+Dx (D,H). Cerebelo con aspecto normal del tejido en grupo control (A,E). Condensación de la cromatina, células de Purkinje con picnosis (*) y edema intersticial en la capa molecular fue también observado (λ, B,F). Se observo ligero edema intersticial en las capas molecular y granular (↑G,H). Condensación de la cromatina en las células de Purkinje y retracción de las mismas fue también observado. Doble impregnación de Río-Hortega. Barra= 25µm

mientras que algunas de las células de Purkinje presentan hipercromacia. En el grupo tratado con Cd+Dx (figs.22D y 23D) las capas molecular y granulosa se encuentran con apariencia normal mientras que pocas células de Purkinje muestran hipercromacia con retracción somática. A los 28 días de edad el cerebelo presentó en el grupo control (figs.22E y 23E) y solo Dx (figs.22G y 23G) aspecto normal en las tres capas del cerebelo, mientras que el grupo tratado con Cd (figs.22F y 23F) mostró a las células de Purkinje hipercromáticas con ligero edema intersticial en la capa molecular así como una disminución celular en la capa granulosa. En el grupo tratado con Cd+Dx (figs.22H y 23H) el cerebelo se observó con aspecto normal y solo con pocas células de Purkinje hipercromáticas y con retracción somática.

8.7 Análisis ultraestructural de las lesiones

El análisis ultraestructural nos mostró que en las ratas tratadas con Cd las mitocondrias se encontraban alteradas ya que presentaban destrucción de las crestas mitocondriales observándose hinchamiento mitocondrial con amplios huecos (fig. 24B). En las ratas control mostraron ultraestructura normal, bien definida con la doble membrana y las crestas mitocondriales bien definidas (fig.24A). En el grupo de ratas tratadas con Dx las mitocondrias presentaron hinchamiento en algunas mitocondrias mientras que otras mostraron estructura normal (fig.24C). En las ratas tratadas con Cd+Dx se observaron mitocondrias con destrucción de la membrana, así como de las crestas mitocondriales, y otras vacuoladas; también numerosas mitocondrias con aspecto y ultraestructura normal (fig.24D). En las 4 áreas del cerebro que estudiamos los resultados fueron similares para los 4 grupos de ratas tratadas.

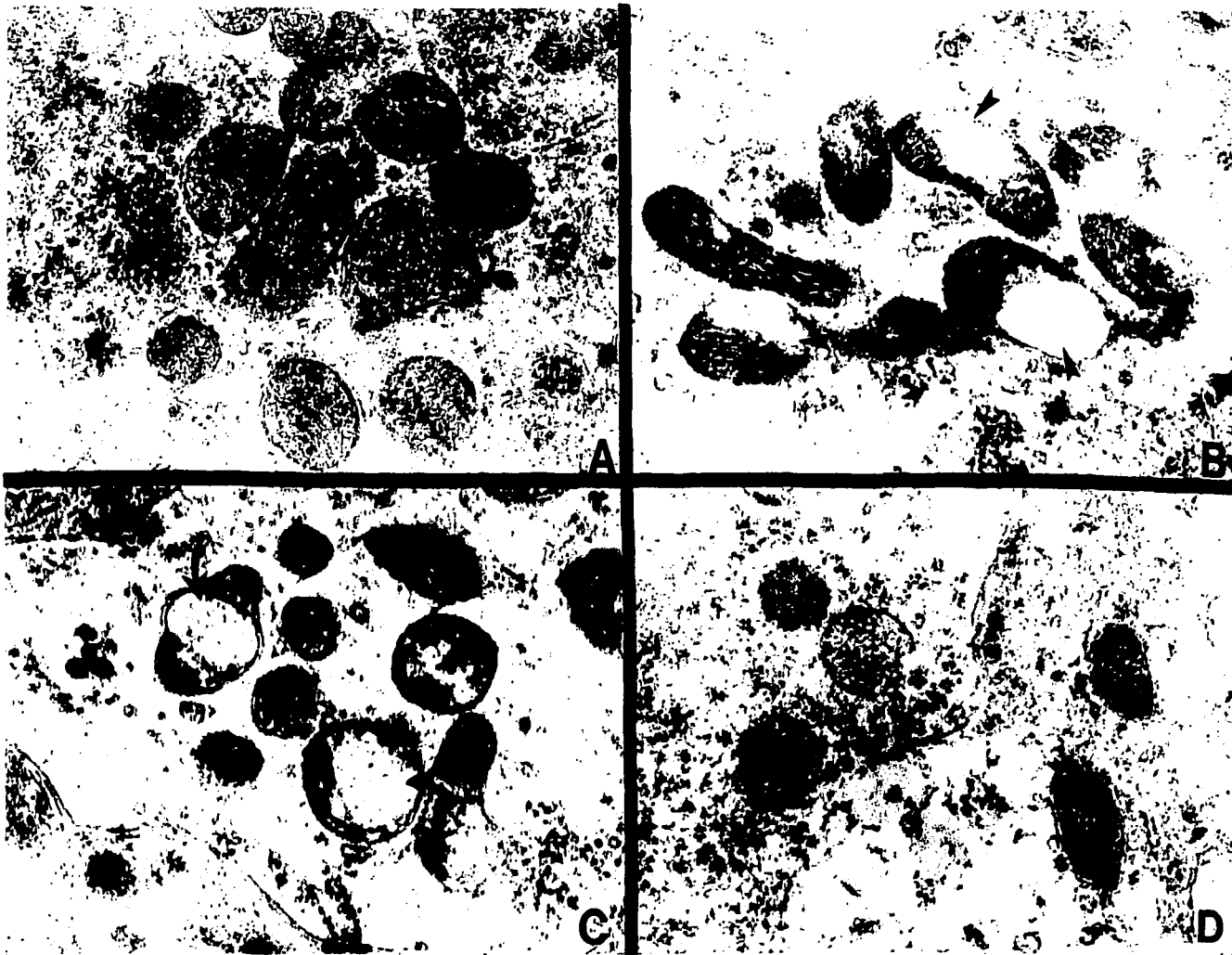


Fig.24 Fotomicrografías electrónicas de mitocondrias a los 18 días de edad. A) Aspecto normal de la mitocondria en el grupo control. B) Grupo tratado con Cd, mitocondria (▲) con hincamiento y crestas mitocondriales destruidas. C) Grupo tratado con Dx, mitocondrias con hinchamiento, conservando todavía la doble membrana, entre algunas normales (1). E) Grupo tratado con Cd+Dx, mitocondrias con ligeras alteraciones y presencia de algunos lisosomas.32000X.

9. DISCUSION

Muchos metales tienen efectos neurotóxicos conocidos provocando el deterioro de algunas funciones del sistema nervioso central, el cadmio es uno de ellos. En este trabajo estudiamos el efecto neurotóxico del cadmio así como el papel neuroprotector de la metalotioneína cuando es inducida por la dexametasona. Se ha reportado que en las regiones encefálicas con funciones tales como el aprendizaje, la actividad locomotora y la memoria en humanos expuestos al cadmio se encuentran disminuidos (Hart, y col. 1989). Los resultados del presente estudio mostraron un aumento en las concentraciones de cadmio en sangre y en las diferentes regiones cerebrales de las ratas tratadas con Cd y Cd+Dx (figs. 7,8,9), las concentraciones de cadmio encontradas en el encéfalo indican que el metal puede atravesar la barrera hematoencefálica con facilidad, debido a que la barrera hematoencefálica en los niños y/o en los animales en desarrollo no está todavía completa (Gabbiani, 1967; Wong y Klaassen 1990; Shukla y col. 1996; Choudhuri y col, 1996) lo que hace que los humanos o animales en desarrollo sean más susceptibles a la exposición del metal. Esta facilidad para atravesar la barrera hematoencefálica va desapareciendo conforme el animal madura (Gupta y Shukla, 1996) hasta que en los adultos el cadmio no atraviesa la barrera hematoencefálica (Pal y col. 1993). Aunque existen mecanismos celulares de detoxificación de metales en el cerebro como la metalotioneína (que es capaz de atrapar hasta 7 mol de Cd por mol/proteína), estos son muy lentos, ya que esta proteína captura e inactiva al metal por quelación sin eliminarlo del tejido por lo que los niveles de Cd en cerebro se pueden mantener por mucho tiempo (ACAN y Tezcan, 1995). Conforme la célula va removiendo el cadmio, este se va liberando hacia los plexos coroideos los cuales secuestran los metales pesados, entre ellos cadmio, y poco a poco se va liberando hacia el líquido cefalorraquídeo (Zheng, y col. 1991) el cual se encarga de llevarlo fuera del cerebro hacia la sangre para ser eliminado por el riñón. Los niveles de cadmio en las distintas regiones cerebrales estudiadas son diferentes, esto puede deberse a que el cadmio se une a la metalotioneína y dependiendo de donde haya más proteína es donde va haber mayor concentración de cadmio ya que la metalotioneína va a atrapar 7 mol. de Cd. La concentración y distribución diferencial de la metalotioneína en el cerebro, ha sido reportada y determinada por numerosos autores (Gasull y col. 1994; Hao y col. 1994; Gasull y col. 1994; Zheng y col. 1995; Ebadi y col, 1996; Penkowa y col. 1999) mostrando que en regiones como estriado,

cerebelo, corteza e hipocampo hay una mayor cantidad de la proteína presente. Gasull y col. (1994) observaron concentraciones muy altas de cadmio en cada una de las mismas regiones analizadas. La mayor concentración de metalotioneina en el cerebro se encuentra en el hipocampo y se ha visto además que esta correlacionada con la concentración de zinc en estas mismas regiones (a mayor concentración de zinc mayor concentración de metalotioneina) recordando que una de las principales funciones de la metalotioneina es mantener la homeostasis del zinc a nivel intracelular (Gasull y col. 1994). El hipocampo es una estructura que contiene altos niveles de zinc, además de que estos se van a incrementar conforme avanza el desarrollo del animal, entre mas avanzada sea la etapa del desarrollo mas alto el contenido de zinc intracelular y por tanto mayor contenido de metalotioneina principalmente las isoformas MT-I y MT-II (Penkowa y col. 1999). Los niveles de cadmio también se incrementaron en los grupos tratados con cadmio y dexametasona aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo solo tratado con cadmio y el combinado, la tendencia es a incrementar el contenido de cadmio en todas las regiones, esto es debido a se utilizó la dexametasona como un inductor de la metalotioneina y al haber mas metalotioneina en el cerebro la captación y el contenido de cadmio se vieron también incrementados, pero el cadmio en un estado inactivo por estar unido a la proteína.

Se determinó la localización de la metalotioneina (MT-I y MT-II) con estudios inmunohistoquímicos que mostraron la inmunoreactividad del anticuerpo contra metalotioneina; en las 4 regiones estudiadas se observó una inmunoreactividad basal pero cuando estos grupos fueron tratados con cadmio, dexametasona o cadmio+dexametasona esta reactividad se intensificó siendo el cerebelo la región cerebral que mas reactividad mostró (fig.15). Nishimura y col. (1992), Palmitier y col. (1994), Masters y col (1994) y Zheng y col. (1995) demostraron que el cerebelo es una de las regiones con abundantes transcritos de RNAm para los isómeros MT-I y MT-II aunque presenta baja concentración de transcritos para MT-III; con nuestros resultados corroboramos la elevada presencia de metalotioneina en el cerebelo y que esta intensa reactividad se incrementaron en los grupos tratados con dexametasona, cadmio+dexametasona evidenciando que tanto la dexametasona como el cadmio funcionaron como inductores de la proteína. La proteína se localizó principalmente en células gliales ya que ninguna de las células de Purkinje ni de las células piramidales

del hipocampo mostraron reactividad contra este anticuerpo, esto esta de acuerdo con los reportes que mencionan que las isoformas de la metalotioneina MT-I y MT-II se encuentran principalmente en astrocitos protoplásmicos y fibrosos, células endimarias, plexos coroideos, aracnoides y células endoteliales (Young y col, 1991; Nishimura y col. 1992).

La peroxidación de lípidos como ya mencionamos es la destrucción oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana producidos por la exposición a radicales libres u otros agentes oxidantes y sirve como un indicador de daño celular ya que se postula que a mayor peroxidación de lípidos mayor daño celular se puede encontrar. Nosotros estudiamos la peroxidación de lípidos como un indicador de estrés oxidativo; observando en el grupo tratado con cadmio un incremento de ella en estriado, corteza y cerebelo siendo estadísticamente significativa con respecto al control y esta se vio disminuída cuando las ratas se trataron con cadmio+ dexametasona. Diversos autores han reportado que aunque no se sabe a ciencia cierta cuales son los mecanismos del cadmio para generar los radicales libres el incremento en la peroxidación de lípidos puede darse en diferentes órganos incluyendo el cerebro (Manca y col. 1991; Kumar y col. 1996) y que esto puede deberse a que los sistemas de defensa tales como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa se ven inhibidos con el cadmio impidiendo que los sistemas de detoxificación contra los radicales libres no funcionen bien y los niveles de peroxidación de lípidos se incrementen (Acan y Tezcan, 1995; Gupta y col, 1995 y 1996).

Los diferentes valores de peroxidación encontrados entre las regiones no habían sido reportados antes con estas diferencias aunque era de esperarse ya que tanto la funcionalidad como los sistemas de defensa incluida a la metalotioneina tienen diferente distribución en el cerebro y hay regiones mas susceptibles al daño que otras (Ebadi y col. 1996; Penkowa y col. 1999). Este es el caso del hipocampo en donde se encontró que los niveles de peroxidación de lípidos en los cuatro grupos experimentales no mostraron diferencias entre los distintos tratamientos, esto se debió a que el hipocampo es muy rico en contenido de metalotioneina y esta sirve como atrapador de metales y de radicales libres (Sato y Bremner, 1993), al atrapar el cadmio e inactivarlo no origina radicales libres que puedan generar un aumento en la peroxidación de lípidos y por lo

tanto no puedan dañar a la célula (Gutierrez-Reyes y col, 1998). También se analizaron las concentraciones de metalotioneina en el cerebro encontrando que concuerdan con los reportado por otros autores (Gasull y col. 1994;Hao y col. 1994; Gasull y col. 1994; Zheng y col. 1995; Ebadi y col, 1996; Penkowa y col. 1999) en cuanto a que uno de los lugares con mas cantidad de la proteína es el hipocampo seguido del estriado y el cerebelo, estas concentraciones se mantuvieron en las dos edades estudiadas en los grupos control. En cuanto a los grupos tratados con cadmio la metalotioneina aumento de manera significativa, lo mismo que los grupos con dexametasona y el efecto fue aún mayor cuando el grupo fue tratado con cadmio+dexametasona. Es bien conocido que uno de los principales inductores de la metalotioneina es el cadmio (Beyersmann y Hectenber, 1997) pero es la dexametasona la que mayor capacidad de inducción tiene sobre esta proteína. Palmitier y col. (1994) fueron de los primeros en determinar que la dexametasona junto con los lipolisacaridos son los mejores inductores de la metalotioneina en el cerebro pero solo de las isoformas MT-I y MT-II ya que la isoforma MT-III es poco o nada inducible, mientras que el cadmio es el mejor inductor de la proteína en el hígado y el riñón en los mamíferos (Beyersmann y Hectenber,1997). En el presente estudio, observamos que cuando hay mayor contenido de metalotioneina en las regiones cerebrales existe un menor nivel de peroxidación de lípidos, por lo que podemos postular que la dexametasona esta protegiendo al cerebro de los efectos del cadmio por medio de la inducción de la metalotioneina como un mecanismo de defensa celular.

La dexametasona es un corticosteroide exógeno capaz por si mismo de ocasionar alteraciones en la morfología celular dependiendo de la dosis y la etapa del desarrollo en la cual se administre al organismo (Uno, y col. 1994). El cerebro tiene cierta vulnerabilidad al aumento de corticosteroides (este aumento puede ser endógeno o exógeno) y si esté es mantenido el daño cerebral puede ser irreversible. La acción de los glucocorticoides es mediada por receptores a glucocorticoides tipo I o II y la dexametasona actua sobre el receptor tipo II. Los receptores a glucocorticoides están distribuidos en el cerebro de manera difererenciada, en el hipocampo, giro dentado y cerebro medio se localiza una cantidad elevada de receptores (McEwen,1999). Un constante estrés fisiológico o aumento en los niveles de corticosteroides en primates o roedores puede causar cambios patológicos incluso pérdida neuronal en el hipocampo cuando han sido expuestos en etapas embrionarias (Uno, y col. 1994), además, se ha

reportado que con estos cambios en los niveles de glucocorticoides endógenos sobre todo en las etapas del desarrollo postnatal, puede originar que las células sean capaces de tolerar estos cambios de concentraciones de glucocorticoides; durante este tiempo los receptores son capaces de adaptarse a estos cambios proporcionando a la célula plasticidad, esta plasticidad se ve disminuida durante la etapa de maduración (Cameron y Gould, 1996; McEwen, 1999). En nuestro estudio el grupo de ratas tratado con dexametasona mostró en corteza parietal y cerebelo células hiperclomáticas, picnoticas y severo edema intersticial, en estriado sólo ligero edema (con algunas mitocondrias hinchadas a nivel ultraestructural) y en hipocampo no se observaron alteraciones morfológicas evidentes. Esta diferencia en cuanto a localización de las alteraciones morfológicas en este grupo pudo deberse a que la concentración de receptores a los glucocorticoides es diferente, sobre todo tomando en cuenta que el organismo está todavía en desarrollo. Probablemente en corteza y cerebelo las células fueron más susceptibles al incremento en la concentración de los glucocorticoides viéndose más afectadas; en tanto que el hipocampo y en el estriado las células resistieron mejor el incremento en la concentración de los glucocorticoides debido a la plasticidad que tienen las células en esta etapa del desarrollo. Los receptores juegan un doble papel en el funcionamiento cerebral; bajo circunstancias adecuadas los receptores pueden actuar de manera "normal" con respecto a las señales hormonales que se reciban, pero aun con las mismas señales en situaciones de estrés celular pueden promover daño e incluso pérdida neuronal (McEwen y col. 1995), cabe mencionar que esto no sucede de la misma manera en los organismos en etapa embrionaria o adulta, experimentalmente se observó que con una administración elevada y crónica de dexametsona tanto en animales como en humanos se incrementa la actividad locomotora y en los niveles de ácido homovanílico (HVA), en algunos casos humanos produjo psicosis por esteroides (Wolkowitz, 1994).

Morfológicamente el grupo tratado con cadmio mostró alteraciones como hiperclomacia, edema, fibras destruidas y en algunos casos células destruidas (figs.16 a 23) en tanto que en grupo de ratas tratadas con cadmio y dexametasona las alteraciones encontradas fueron menos evidentes que en el grupo solo con cadmio. Gabiani y col (1967) ya había reportado que en los animales en desarrollo a una concentración de 1mg/kg de cadmio se producían alteraciones histopatológicas como: hemorragias, vacuolización, destrucción de fibras y necrosis del tejido, algo similar fue corroborado

por Wong y Klaassen (1982). En el presente estudio se observó, que el hipocampo no muestra alteraciones evidentes ya que en todos los grupos la estructura mostró una apariencia normal, esto se puede correlacionar con los resultados de peroxidación de lípidos en donde no se observaron cambios en los niveles de peroxidación en esta región probablemente debido al funcionamiento de sus sistemas de defensa como es el alto contenido basal de MT. Por otro lado observamos que en el cerebelo morfológicamente las células mas afectadas fueron las células de Purkinje, mientras que la capas molecular y granulosa mantuvieron su apariencia normal, nosotros pensamos que estas células son las mas sensibles ya que se ha reportado que estas células no contienen MT-I y MT-II, (observado en el análisis inmunohistoquímico figuras 14 y 15) y solo sintetizan MT-III, disminuyendo la cantidad de proteína que pueda proteger funcionando contra el cadmio o atrapando radicales libres (Hao y col. 1994; Sato y Bremner, 1993). Tanto en la corteza como en el núcleo estriado se mostró lo mismo en las ratas tratadas con cadmio.

La destrucción celular observada en las ratas tratadas con cadmio puede también estar ocurriendo acompañada de modificaciones en la molécula de ADN, ya que sabemos que el cadmio afecta a esta molécula por dos caminos, uno produciendo radicales libres que alteran a la molécula y por otro lado con alteraciones directas a la ADNpolimerasa impidiendo que se lleve a cabo el mecanismo de reparación de ADN (Hartwig, 1994,1995, 1998). Estas alteraciones en las moléculas pueden llevar a alteraciones en el funcionamiento celular produciendo una necrosis o apoptosis, que aunque no esta reportada, esta última en neuronas, si se han reportado en otros tipos celulares (Hamada y col. 1996; Calvero y col, 1998; Hart y col. 1999).

El mecanismo probable del efecto neurotóxico del cadmio implica un aumento en los niveles de peroxidación de lípidos en regiones cerebrales (corteza, estriado, hipocampo y cerebelo) como se demostró en este trabajo, una disminución de los niveles de glutatión reducido (que es un mecanismo de defensa antioxidante) inhibiéndose también la glutatión reductasa (Acan y Tezcan, 1995; Gupta y col. 1995; Kumar y col. 1996) llevando de esta manera a un aumento en la producción de radicales libres que a su vez van a ocasionar un aumento en la peroxidación de lípidos de las membranas plasmática y mitocondrias produciendo daños morfológicos (Fern y col. 1996). La membrana plasmática modifica su fluidez por efecto de la peroxidación de lípidos

permitiendo la entrada de otros iones como el Ca^{2+} al interior de la célula (Fasitsas y col. 1991, Viarengo y Nicotera, 1991). En tanto que la membrana de la mitocondria así como en las crestas mitocondriales se pueden destruir alterando la fosforilación oxidativa (Fern, y col. 1996). El aumento de la peroxidación de lípidos (como pudimos observar en nuestros resultados) a su vez producen mas radicales libres que pueden afectar los sistemas de reparación del ADN provocando efectos genotóxicos, además del efecto que tiene por si solo el cadmio sobre la ADNpolimerasa (Hartwig 1995; Dally y Hartwig, 1997) lo que puede llevar a la célula a alteraciones graves en la regulación celular. La metalotioneina va a funcionar como atrapadora de cadmio y de radicales libres (Valle, 1995; Choudhuri y col, 1996; Sato y Bremner, 1993) jugando un doble papel para la defensa de la célula. Cuando la metalotioneina es inducida, la célula tiene mayor

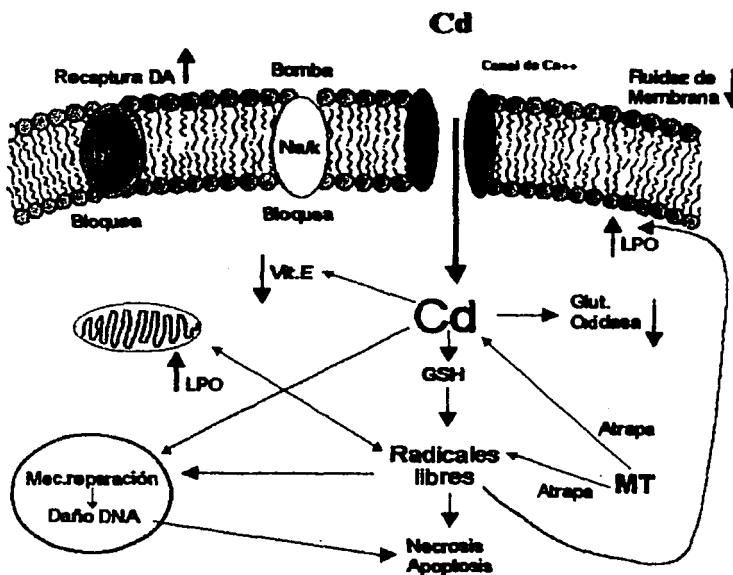


Fig. 25.- Esquema del posible mecanismo neurotóxico del cadmio. DA.- dopamina; Na/K.- bomba Na/K; LPO.- lipoperoxidación; GSH.- glutatión reducido; MT.- metalotioneina; Ca^{++} .- calcio; Vit.E.- vitamina E; Cd.- cadmio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

capacidad de protegerse debido al incremento de esta proteína. Entre otros mecanismos involucrados en la acción tóxica del cadmio en el sistema nervioso central, está el hecho de que el cadmio también puede bloquear la síntesis del transportador de dopamina e incrementar la liberación de la dopamina en el cerebro (Gutierrez-Reyes y col. 1998) y disminuir los niveles de serotonina en ratas en crecimiento (Gupta y col. 1990) provocando alteraciones conductuales importantes como hiperactividad en los animales en desarrollo (fig.25).

En este estudio encontramos que el cadmio mostró un efecto neurotóxico en el cerebro de las ratas en desarrollo tratadas con el metal, así mismo observamos que tal efecto disminuyó cuando las ratas fueron tratadas con dexametasona, lo cual se observó a las dos edades estudiadas.

El estudio de la neurotoxicidad del cadmio nos lleva al entendimiento de algunos de sus mecanismos de acción así como la probable inclusión del estudio en un proceso determinado Valoración de Riesgo. Dentro de la valoración de riesgo el primer paso es determinar la toxicidad de las sustancias o metales que se estén estudiando, comúnmente esto se lleva a cabo en un laboratorio o en el campo, lo que nos permite determinar los tipos de efectos tóxicos que puede ocasionar el metal y estimar la relación entre la dosis o concentración ambiental y la incidencia o severidad de los efectos (INE, 1997). La posibilidad de que ocurra un efecto adverso en una persona o grupo de personas expuestos al metal a una concentración determinada se puede determinar como riesgo. Este estudio de la toxicidad del cadmio ha demostrado que a concentraciones de 1mg/kg/día en animales en desarrollo se encuentran efectos adversos en la salud del animal mostrando las dosis en las que hay un efecto adverso (Méndez-Armenta y col. 2001). Los estudios de evaluación y caracterización de riesgo son importantes ya que es la primera parte de todo un proceso para entender como se encuentra y determina la toxicidad de un metal o sustancia para después determinar el procedimiento para poder evitar que las elevadas exposiciones al metal puedan dañar a la salud.

10. CONCLUSIONES

- 1.- Como era de esperarse la administración de cadmio durante 5 días en animales en desarrollo aumenta significativamente las concentraciones del metal en sangre así como en las 4 regiones cerebrales estudiadas.
- 2.- El cadmio aumento la peroxidación de lípidos en las áreas estudiadas, este efecto fue disminuido en los grupos tratados con dexametasona por inducción de la metalotioneina, indicando que el cadmio es un elemento generador de estres oxidativo en su forma de metal libre.
- 3.- El hipocampo fue la región con menor nivel de peroxidación de lípidos, el aumento de metalotioneina fue significativo en esta región cerebral y fue la región con menos alteraciones morfológicas asociadas al Cd.
- 4.- El cerebelo presento incremento en los niveles de peroxidación que se vio disminuida en el grupo tratado con dexametasona, así mismo se incremento el nivel de metalotioneina, pero las alteraciones morfológicas que se observaron fueron en las células de Purkinje probablemente debido a que estas células contiene solo metalotioneina-III la cual no es inducible.
- 5.-El cadmio produce hiperchromacia, edema y picnosis en las áreas estudiadas a las 2 edades y a nivel ultraestructural el cadmio produce vacuolización y destrucción de las mitocondrias y lisosomas.
- 7.- La dexametasona por si sola produce alteraciones morfológicas en corteza y cerebelo, así como mínimas alteraciones en estriado. Un incremento significativo en la peroxidación de lípidos con respecto a su control en estas mismas áreas tambien fue observado.

8.- Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la exposición a cadmio a bajas dosis es capaz de inducir incrementos en la peroxidación de lípidos asociados a lesiones cerebrales a las dos edades estudiadas, los cuales fueron revertidos por la participación de la metalotioneína inducida por la dexametasona sugiriendo con esto un mecanismo protector sobre la neurotoxicidad inducida por el cadmio.

11. REFERENCIAS

- Acan NL. and Tezcan EF. (1995) Inhibition kinetics of sheep brain glutathione reductase by cadmium ion. *Biochem.Mol.Med.* 54: 33-37.
- Agency fro Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1993). U.S. Public Health Service. *Toxicological Profile for Cadmium.* Atlanta, GA.
- AntonioMT, Corpas I, Leret ML. (1999). Neurochemical changes in newborn rat's brain after gestational cadmium and lead exposure. *Toxicol.Lett.* 104: 1-9.
- Arito H, Ayako S, Suzuki Y. (1981). Aggressive behavior of the rat induced by repeated administration of cadmium. *Toxicol.Lett.* 7: 457-461.
- Aschner M, Cherian GM, Klaassen CD, Palmitier DR, Erickson JC, Bus AI. (1997). Metallothionein in brain- The role in physiology and pathology. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 142: 229-242.
- Aschner M. (1996). The functional significance of brain metallothionein. *FASEB J.* 10: 1129-1136
- Benin AL, Sargent JD, Dalton M, Roda S. 1999. High concentrations of heavy metals in neighborhoods near ore smelters in northern Mexico. *Environ Health Perspect.* 107: 279-284.
- Beyersmann D, Hechtenberg S. (1997) Cadmium, gene regulation and cellular signaling in mammalian cells. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 144: 247-261.
- Blayne J, Adams RG, Brewer DB, Harvey TC. (1980). Cadmium-induced osteomalacia. *Br.J.Ind.Med.* 37: 278-284.
- Bonithon-Kopp C, Huel G, Moreau T and Wendling R. (1986). Prenatal exposure to lead and cadmium and psychomotor development of the child at 6 years. *Neurobehav.Toxicol.Teratol.* 8: 307-310.
- Bonorden WR. And Pariza MW. 1994. Antioxidant nutrients and protection from free radicals, In: *Nutritional Toxicology* pp. 19-48. Eds. FN, Kotsonis M, Mackey and J. Hjelle. Raven Press. Ltd.: New York.
- Bustueva KA, Revich BA, Bezpalko LE. (1994). Cadmium in the environment of three russian cities and in human hair and urine. *Arch.Environ.Health.* 49: 284-288.
- Calevro F, Beyersmann D, Hartwig A. (1998). Effect of cadmium (II) on the extent of oxidative DNA damage in primary brain cell cultures from *Pleurodeles* larvae. *Toxicol.Lett.* 94: 217-225.
- Cameron HA, Gould E. 1996. The control of neuronal birth and survival. En: *Receptor dynamics in neural development* . Ed.Shaw CA. Boca Raton, Florida USA. pp141-157.

- Chao SH, Suzuki Y, Zysk JR, Cheung WY. (1984). Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius. *Mol.Pharmacol.* 26: 75-82.
- Chia KS, Ong CN, Ong H, and Endo G (1989). Renal tubular function of workers exposed to low levels of cadmium. *Br.J.Ind.Med.* 46: 165-170.
- Choudhury P, Louria DB. (1976). Influence of cadmium and other trace metals on human α_1 -antitrypsin: an in vitro study. *Science.* 191: 480-481.
- Choudhuri S, McKim JM. and Klaassen C. (1993). Differential expression of the metallothionein gene in liver and brain of mice and rats. *Toxicol.Pharmacol.* 119: 1-10.
- Choudhuri S, McKim JM, Klaassen CD. (1994). Induction of metallothionein by superantigenic bacterial exotoxin: probable involvement of the immune system. *Biochem.Biophys. Acta.* 1225: 171-179.
- Choudhuri S, Kramer KK, Berman NE, Dalton TP, Andrews GK , Klaassen CD. (1995). Constitutive expression of metallothionein genes in mouse brains. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 131: 144-154.
- Choudhuri S, Li LW, Berman EN, Klaassen C. (1996). Cadmium accumulation and metallothionein expression in brain of mice at different stages of development. *Toxicol.Lett.* 84: 127-133.
- Chretien GD. (1969). Medical trace metals and absorption spectroscopy. *Anal.Chem.* 41: 24A-40A.
- Davison AG, Fayers PM, Taylor AJ, Venables KM, Darbyshire J, Pickering CA, Chettle DR, Franklin D, Guthrie CJ, Scott MC, O'Malley D, Holden H, Mason HJ, Wright AL. and Gompertz D. (1988). Cadmium fume inhalation and ephysema. *Lancet.* 1:663-667.
- Ebadi M, Hiramatsu M, Shiraga H, Rojas-Castañeda P. (1996). Zinc metallothionein isoforms in free radical-mediated striatal damage in Parkinson's disease. En: *Free Radicals in Brain Physiology and Disorders* . Academic Press, Inc.
- Ebadi M, Iversen PL, Hao R, Cerutis DR, Rojas P, Happe HK, Murrin LC, Pfeiffer RF. (1995). Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem.Int.* 27: 1-22.
- Elinder CG, Kjellstrom T, Lind B, Linnman L, Piscator M, Sundstedt K. (1983). Cadmium exposure from smoking cigarettes: variations with time and country where purchased. *Environ.Res.* 32: 220-227.
- Eller PM, Haartz JC. (1977). An study of methods for the determination of lead and cadmium. *Am.Ind.Hyg.Assoc.* 38: 116-124.
- Engstrom B, Nordberg GF. (1979) Dose dependence of gastrointestinal absorption and biological half-time of cadmium in mice. *Toxicology.* 13: 215-222.
- Estrada FE, Peralta ZL, Rivas MP. (1982). Manual de técnicas histológicas. Ed. AGT Editor, S.A. 140p.

- Fasitsas CD, Theocharis SE, Zoulas D, Chrissimou S, and Deliconstantinos G. (1991) Time-dependent cadmium-neurotoxicity in rat brain synaptosomal plasma membranes. *Comp.Biochem.Physiol.* 100: 271-275.
- Fern R, Black JA, Ransom RB and Waxman GS. (1996) Cd²⁺-induced injury in CNS white matter. *J.Neurophysiol.* 76: 3264-3273.
- Friberg L, Elinder CG, Kjellstrom T, Nordberg G. (eds.): Cadmium and Health . A toxicological and Epidemiological Appraisal. Vol.I General Aspects; Vol.II, Effects and Response. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 1986.
- Frieberg L, Piscator M, Norrdrberg GF, and Kjellstrom T (1974). *Cadmium in the enviroment.* 2th edition. C.R.C. Press, Cleveland, OH.
- Gabbiani G, Baic D, Deziel C. (1967). Toxicity of cadmium for the central nervous system. *Exp.Neurol.* 18: 154-160.
- Galicia García V,Rojas-Lopez M, Rojas R, Olaiz G, Rios C. (1997). Cadmium levels in maternal, cord and newborn in Mexico City. *Toxicol.Lett.* 91,57-61.
- Galván-Arzate S. and Santamaría A. (1998). Thallium toxicity. *Tox.Lett.* 99: 1-13.
- Galvao LAC , Corey G. (1987). *Serie vigilancia 4. Cadmio.* Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Metepec México.
- Gasull T, Giralt M, Garcia A, Hidalgo J. (1994). Regulation of metallothionein-I+II levels in specific brain areas and liver in the rat: role of catecholamines. *Glia.* 12:135-143.
- Gasull T, Giralt M, Hernández J, Martínez P, Bremner I, Hidalgo J. (1994). Regulation of metallothionein concentrations in rat brain: effect of glucocorticoids, zinc, copper, and endotoxin. *Am.J.Physiol.* 29: E760-E767.
- Glowinski J, Iversen LL (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of 3H-DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13: 655-669.
- Goyer RA. Toxic effects of metals. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 4th ed. (Amdur MO, Doull's and Klaassen, CD. eds). Pergamon Press. New York, 1991. pp. 623-680.
- Gupta A, Gupta A, Murthy RC, Thakur SR, Dubey MP and Chandra SV. (1990) Comparative neurotoxicity of cadmium in growing and adult rats after repeated adminastration. *Biochem.Inter.* 21: 97-105.
- Gupta A, Gupta A, Murthy RC, Chandra SV. (1993). Neurochemical changes in developing rat brain after pre-and postnatal cadmium exposure. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* 51: 12-17.

- Gupta A, Gupta A. and Shukla G. (1995) Development of brain free radical scavenging system and lipid peroxidation under the influence of gestational and lactational cadmium exposure. *Hum.Exp.Toxicol.* 14: 428-433.
- Gupta A, Shukla SG. (1996). Ontogenic profile of brain lipids following perinatal exposure to cadmium. *J.Appl.Toxicol.* 16: 227-233.
- Gutierrez-Reyes EY, Albores A, Rios C.(1998).Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone-induced metallothionein. *Toxicology.* 134: 145-154.
- Habeebu SS, Liu J, Klaassen COD. (1998). Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 149: 203-209.
- Halliwell B., Gatteridge, JMC. (1985) Free radicals in biology and medicine. Claredon Press, Oxford
- Halliwell B. and Gatteridge J. (1989). Free radicals in biology and medicine, Clearedon Press, Oxford.
- Hamada T, Sasaguri T, Tanimoto A, Arima N, Shimajiri S, Abe T, Sasaguri Y. (1996). Apoptosis of human kidney 293 cells in promoted by polymerized cadmium-metallothionein. *Biochem.Biophysic.Res.Com.* 219: 829-834.
- Hao R, Cerutis DR, Blaxall HS, Rodriguez-Sierra JF, Pfeiffer RF, Ebadi M. (1994). Distribution of zinc metallothionein I mRNA in rat brain using in situ hybridization. *Neurochem.Res.* 19: 761-767.
- Hart BA, Voss GW and Willean CL. (1989) Pulmonary tolerance to cadmium following cadmium aerosol pretreatment. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 101: 447-460.
- Hart BA, Lee CH, Shukla GS, Shukla A, Osier M, Eneman JD, Chiu JF. (1999). Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for participation of oxidant stress. *Toxicology.* 133: 43-58
- Hartwig A. (1994). Role of DNA repair inhibition in lead and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ.Health Perspect.* 102 (Suppl 3): 45-50.
- Hartwig A. (1995). Current aspects in metal genotoxicity. *BioMetals.* 8:3-11.
- Hartwig A. (1998). Carcinogenicity of metal compounds: posible role of DNA repair inhibition. *Toxicol.Lett.* 102-103: 235-239.
- Heffess C.S. Mullick F.G. Eds. Métodos Histotecnológicos , Manual del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Usa, 280 p.
- Hidalgo HA, Koppa V, Bryan SE. (1976). Effect of cadmium on RNA polymerase and protein síntesis in rat liver. *FEBS Lett.* 64: 159-162.

- Hidalgo J, García A, Oliva AM, Giralt M, Gastull T, Gonzales B, Milenerowicz H, Wood A, Bremner I. (1994) Effect of zinc, cooper and glucocorticoids on metallothionein levels of cultured neurons and astrocytes from rat brain . *Chem.Biol.Int.* 93: 197-219.
- Hille B. (1984). Calcium channels. In: *Ionic Channels and Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 76-98 pp.
- Holloway WR, Thor DH. (1988). Cadmium exposure in infancy: effects on activity and social behaviors of juvenile rats. *Neurotoxicol.Teratol.* 10: 135-142.
- IARC; 1993. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 58, Beryllium, Cadmiu, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. IRAC, Lyon.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informatica 1995. XIV Censo Industrial, industria manufactureras, pproductos y materias primas. Resumen General, Censos Económicos 1994. Aguascalientes, México.
- Intituto Nacional de Ecología (1997). *Programa de gestión ambiental de substancias tóxicas de atención prioritaria*. SEMARNAP. 126 p.
- Ishido M, Homma TS, Tohyama C, Suzuki T. (1998). Apoptosis in rat renal proximal tubular induced by cadmium. *J.Toxicol.EnvIRON.Healt.* 11: 1-12.
- Jesberger JA. 1991. Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int.J.Neurosci.* 57: 1-17
- Jin T, Lu J, Nordberg M. (1998). Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. *Neurotoxicology.* 19: 529-535.
- Jolliet-Riant P, Tillement JP. (1999). Drug transfer across the blood-brain barriero and improvement of brain delivery. *Fundam.Clin.Pharmacol.* 13: 16-26.
- Kasprzak, KS. 1995. Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Invest.* 13: 411-430.
- Klaassen CD. Metales pesados y sus antagonistas. En: *Las Bases Farmacologicas de la Terapeutica*. 9a. edición. Editada por JG Hardman, LE Limbird, PB Molinoff, RW Ruddon y AG Goodman-Gilman. McGraw-Hill Interamericana. 1996. pp1755-1779.
- Kelly C. (1999). Cadmium therapeutic agents. *Curr.Pharm.Des.* 5: 229-240.
- Kille P, Hemmings A, Lunney EA. (1994). Memories of metallothionein. *Biochim.Biophys. Acta.* 1025: 151-161.
- Kondo Y, Rusnak JM, Hoyt DG,Settineri CE, Pitt BR, Lazo JS. (1997). Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Mol.Pharmacol.* 52: 195-201.
- Kotsonis F. and Klaassen CD. (1977). Toxicity and distribution of cadmium administered to rats at sublethal doses. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 41, 667-680.

- Kumar R, Agarwal AK, Seth KP. (1996) Oxidative stress-mediated neurotoxicity of cadmium. *Toxicol.Lett.* 89: 65-69.
- Lauwerys RR, Bernard A, Roels H, Buchet J-P. (1995). Health risk assessment of long-term exposure to non-genotoxic chemicals: application of biological indices. *Toxicol.Lett.* 77:39-44.
- Lazo JS, Kondo Y, Dellapiazza D, Michalska AE, Choo KHA, Pitt BR. (1995). Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *J.Biol.Chem.* 270: 5506-5510.
- Lindahl T. (1993). Instability and decay of primary structure of DNA. *Nature.* 362: 709-715.
- Lohmann RD, Beyersmann D. (1994). Effects of zinc and cadmium on apoptotic DNA fragmentation in isolated bovine liver nuclei. *Environ.Health.Perspect.*
- Lowry O.H. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193: 265-275.
- Manca D, Ricard CA, Trottier B and Chevalier G. (1991). Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology.* 67: 303-323.
- Masters BA, Quaife CJ, Erickson JC, Kelly EJ, Froelick GJ, Zambrowicz BP, Brinster RL, Palmitier RD. (1994). Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J.Neurosci.* 14: 5844-5857.
- McEwen BS, Albeck D, Cameron H. 1995. Stress and the brain: A paradoxical role for adrenal steroids. *Vitam.Horm.* 51: 371-402.
- McEwen BS. (1999). Endocrine effects on the brain and their relationship to behavior. En: *Basic Neurochemistry.Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Eds. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers WR, Fisher KS, Uhler DM, Lippincott-Raven Press.Philadelphia, USA. pp 1007-1026.
- McKenria O, Arnold G, and Holtzman E. 1976. Microperoxisome distribution in the central nervous system of the rat. *Brain Res.* 117: 181-194.
- Méndez-Armenta M, Barroso-Moguel R, Villeda-Hernández J, Nava-Ruiz C, Rios C. (2001) histopathological alterations in the brain regions of rats after perinatal combined treatment with cadmium and dexamethasone. *Toxicology.* 161: 189-199.
- Mildvan AS, Loeb LA. The role of metal ions in the mechanisms of DNA and RNA síntesis. In: *Metal Ions in Genetic Information Transfer* (Eichhorn GL, Marzilli LG, eds.). New York: Elsevier 1981; 103.123.
- Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P. 1990. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European community. *Sci.Total Environ* 95: 89-105.

- Newland MC, Wendy WN, Baggs RB, Gentry GD, Weiss B, Miller RK. (1986). Operant behavior in transition reflects neonatal exposure to cadmium. *Teratology*. 34: 321-241.
- Niewenhuis RJ, Dimitriu C, Prozialeck CW. (1997). Ultrastructural characterization of the early changes in intercellular junctions in response to cadmium (Cd²⁺) exposure in LLC-PK₁ cells. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 142: 1-12.
- Nishimura N, Nishimura H, Ghaffar A, Tohyama C. (1992). Localization of metallothionein in the brain of rat and mouse. *J.Histolchem.Cytochem.* 40:309-315.
- Nolan CV, Shaikh ZH. (1986). The vascular endothelium as a target tissue in acute cadmium toxicity. *Life Sci.* 39: 386-389
- Organización Mundial de la Salud (1995). Guías para la calidad del agua potable . Recomendaciones, Vol. 1. 2a.ed. Ginebra, OMS.
- Pal R, Nath R, and Gill DK. (1993). Influence of ethanol on cadmium accumulation and its impact on lipid peroxidation and membrane bound functional enzymes (Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase) in various regions of adult brain. *Neurochem.Int.* 23: 451-458.
- Palmitier RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM. (1992). MT-III a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 89: 6333-6337.
- Palmitier RD, Sandgreen EP, Koeller DM, Findley SD, Brinster RL. (1993). Metallothionein genes and their regulation in transgenic mice . In: *Metallothionein III: Biological Roles and Medical Implications* . Eds. KD Suzuki, N Imura and M Kimura. Pp 399-406. Birkhauser, Basel.
- Palmitier RD. (1994) Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to mediated by zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 91: 1219-1223.
- Penkowa M, Nielsen H, Hidalgo J, Bernth N, Moos T. (1999) Distribution of metallothionein I+II and vesicular zinc in the developing: central nervous system correlative study in the rat. *J.Comp.Neurol.* 412: 303-318.
- Peterson DP, Huff EA and Bhattacharyya MH. (1991) Determination of cadmium in blood, plasma and urine by electrothermal atomic absorption spectrophotometry after isolation by anion exchange chromatography. *Ann.Bioche.* 192: 434-440.
- Provias JP, Ackerley CA, Smith C. and Becker LE. (1994) Cadmium encephalopathy: a report with elemental analysis and pathological findings. *Act.Neuropathol.Berl.* 88: 583-586.
- Rajanna B, Hobson M, Boykin M, Chetty C. (1990). Effects of chronic treatment with cadmium on ATPases, uptake of catecholamines and serotonin in neonatal rat brain. *J.Neurochem.* 28: 789:794.
- Rahola T, Aaran RK, Miettinen JK. Half-time studies of mercury and cadmium by whole body counting. International Atomic Energy Agency symposium on the assessment of radioactive organ and body burdens. In, *Assessment of Radioactive Contamination in Man.* International Atomic Energy Agency, Vienne, 1972.

- Raps SP, Lai JC, Hertz L and Cooper AJ. 1989. Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Res.* 493: 398-401.
- Robb-Gaspers SJ, Connor RJ. Oxidative stress-induced cell damage in the CNS. En: *Metals and oxidative damage in neurological disorders*. Ed. James R. Connor. Plenum Press, New York, 1997.341-349 pp.
- Robb-Gaspers SJ. And Connor, JR. Oxidative stress-induced cell damage in the CNS. In: *Metals and Oxidative Damage in Neurological Disorders*, Ed. J.R.Connor, Plenum Press, New York, 1997, pp, 341-351.
- Roels HA, Lauwerys RR, Bernard AM, Buchet JP, Vos A and Oversteyns M. (1991). Assessment of infiltration reserve capacity of the kidney in workers exposed to cadmium. *Br. J. Ind. Med.* 48: 365-374.
- Rojas E, Montero R, Herrera LA, Gonsebatt, Ostrosky-Wegman P. (1993). Reparación del ADN. *Rev.Fac.Med.UNAM.* 36: 138-142.
- Saldívar L, Luna M, Reyes E, Soto R and Fortul T. (1991). Cadmium determination in mexican-produced tobacco. *Environ.Res.* 55, 91-96.
- Sato M and Bremner I. (1993). Oxygen free radicals and metallothionein. *Free.Rad.Biol.Med.* 14: 325-337.
- Sauer GR, Watanabe N. (1988). The effects of heavy metals and metabolic inhibitors on calcium uptake by gills and scales of *Fundulus heteroclitus in vitro*. *Comp.BiochemPhysiol.* 91C: 473-478.
- Scott R, Haywood JK, Boddy K, Williams ED, Harvey I. and Paterson PJ. (1980) Whole body calcium deficit in cadmium-exposed workers with hypercalciuria. *Urology.* 15: 356-359.
- Scheuhammer AM, Cherian GM.(1986). Quantification of metallothionein by a silver-saturation method. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 82: 417-425
- Shigematsu I, Minowa M, Yoshida T, Miyamoto K. (1979) Recent results of health examinations on the general population in cadmium-polluted and control areas in Japan. *Environ.Health Perspect.* 28; 205-210.
- Shukla GS, Hussain T and Chandra SV. (1987). Possible role of superoxide dismutase activity and lipid peroxide levels in cadmium neurotoxicity: *In vivo* and *In vitro* studies in growing rats. *Life Sciences.* 14:2215-2225.
- Shukla A, Shukla G and Simal RC. (1996) Cadmium-induced alterations in blood-brain barrier permeability and its possible correlation with decreased microvessel antioxidant potential in rat. *Hum.Exp.Toxicol.* 15: 400-405.
- Smith MJ, Pihl RO, Farell B. (1985). Long term effects of early cadmium exposure on locomotor activity in the rat. *Neurobehav.Toxicol. Teratol.* 7: 19-22.

- Souza V, Bucio L, Gutierrez CM, Chavez E (1993). Interacción del cadmio con la entrada de calcio en células de origen hepático y evaluación del daño celular producido por este metal. XVI Congreso Nacional de Farmacología. Resúmenes de Trabajos Originales. Guanajuato, Gto. pp.18.
- Steenland K, Loomis D, Shy C. and Simonsen N. (1996) Review of occupational lung carcinogens. *Am.J. Ind.Med.* 29: 474-490.
- Sugiyama, M. 1994. Role of antioxidants in metal-induced damage. *Cell.Biol.Toxicol.* 10: 1-22.
- Takagi Y, Matsuda S, Imai S. 1987. Trace elements in human hair an international comparison. *Bull. Environ Contam Toxicol. Sci. Total. Environ* 36: 793-800.
- Thatcher RW, Lester ML, McAlaster R. and Horts R. (1982) Effects of low levels of cadmium and lead on cognitive function in children. *Arch.Environ.Health.* 37: 159-166.
- ThatcherRW, McAlaster R. and Lester ML. (1984). Evoked potentials related to hair cadmium and lead in children. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 425: 384-390.
- Thornalley PJ. and Vasák m. (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Bioch.Bioph.Act.* 827: 36-44.
- Triggs W. and Wilmore L.J. (1984) In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *J.Neurochem.* 42: 976-980.
- Uno H, Eisele S, Sakai A, Shelton S, Baker E, DeJesus O, Holden J. (1994). Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm.Behav.* 28: 336-348.
- Vallee BL and Auld DS. (1990) Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29: 5647-5659.
- Vallee BL. (1995) The function of metallothionein. *Neurochem.Int.* 27: 23-33.
- Van Der Vliet A. And Bast A. 1992. Effect of oxidative stress on receptors and signal transmission. *ChemBiol.Interactions.* 85: 95-116.
- Variengo A. and Nicotera P. (1991). Possible role of Ca²⁺ in heavy metal cytotoxicity. *Comp. Biochem. Physiol.* 100: 81-84.
- Wilson JD. Andrógenos. En: Las Bases Farmacológicas de la Terapeutica. Editada por. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A. McGraw-Hill Interamericana. 1996. pp.1531-1549.
- Wolkowitz OM. (1994). Prospective controlled studies of the behavioral and biological effects of exogenous corticosteroids. *Psychoneuroendocrinology.* 19: 233-255.
- Wong KL, Klaassen DC.(1982). Neurotoxic effects of cadmium in young rats. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 63: 330-337.

-Wyatt CJ, Fimbres C, Romo L, Méndez RO, Grijalva M.(1998). Incidence of heavy metal contamination in water supplies in northern México. *Environ.Res.* 76: 114-119.

-Young JK, Garvey JS, Huang PC. (1991). Glial immunoreactivity for metallothionein in the rat brain. *Glia.* 4: 602-610.

-Zeng H, Berman NEJ, Klaassen COD. (1995). Chemical modulation of metallothionein I and III mRNA in mouse brain. *Neurochem.Int.* 27: 43-58.

-Zheng H, Liu J, Choo KHA, Michalska AE and Klaassen COD. 1996. Metallothionein-I and II knock-out mice are sensitives to cadmium-induced liver mRNA expression of c-jun and p53. *Toxicol.Appl. Pharmacol.* 136: 229-235.

- Zheng W, Perry DF, Nelson DL, Aposhian VH. (1991). Choroid plexus protects cerebrospinal fluid against toxic metals. *FASEB J.* 5: 2188-2193.

12. GLOSARIO

Edema.- acumulación excesiva de líquido subcutáneo y espacio intersticial en el tejido celular, debido a diversas causas: disminución de la presión osmótica del plasma por reducción de las proteínas; aumento de la presión hidrostática de los capilares; mayor permeabilidad de la pared de los capilares.

Hipercromasia.- forma de degeneración del núcleo celular en la que éste se llena de partículas pigmentarias.

Necrosis neuronal.- muerte neuronal que puede ser reconocida o cambios nucleares tales como condensación de cromatina nuclear con citoplasma eosinófilo puede ser también referido como células picnóticas.

Picnosis.- condensación, espesura, especialmente degeneración celular en la que el protoplasma se hace más denso y el tamaño de la célula disminuye// Coloración uniforme intensa del núcleo celular en la que no se distingue la red de cromatina atribuida a la muerte del núcleo.

Retracción .- encogimiento, contracción de una parte resultando en deformidad.

Vacuolización celular.- resultado de la acumulación excesiva de agua en el citoplasma de la célula capaz de distender o alargar la célula. Es uno de los más comunes y rápidos cambios en la morfología de la célula dañada

Histopathological alterations in the brain regions of rats after perinatal combined treatment with cadmium and dexamethasone

M. Méndez-Armenta ^a, R. Barroso-Moguel ^{a,*}, J. Villeda-Hernández ^a,
C. Nava-Ruíz ^{a,b,c}, C. Ríos ^{a,b,c}

^a *Lab. Neuromorfología Celular, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Insurgentes Sur 3877, 14269 Mexico D.F. Mexico*

^b *Depto. Neuropatología Experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Insurgentes Sur 3877, 14269 Mexico D.F. Mexico*

^c *Depto. de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Insurgentes Sur 3877, 14269 Mexico D.F. Mexico*

Received 8 August 2000; accepted 25 January 2001

Abstract

Industrial and environmental exposure to cadmium (Cd) is well known to produce multiorgan toxicity in humans. Metallothionein (MT) is a cellular ligand for Cd. MT has been shown to protect against Cd-induced toxicity in many organs, including brain. In this study, we described the histopathological alterations in parietal cortex, striatum, hippocampus and cerebellum of rats following perinatal combined exposure to cadmium and dexamethasone (Dx), a drug known to induce MT synthesis in brain. Wistar rats of 13 days of age were treated for 5 days, as follows: (1) saline solution, (2) CdCl₂ 1 mg/kg per day, (3) Dx 2 mg/kg per day, (4) CdCl₂ 1 mg/kg per day + Dx 2 mg/kg/day. Rats were killed on either 18 or 28 days of age. The content of Cd in parietal cortex, striatum, hippocampus and cerebellum at 18 days old age increased 58.3-, 9.4-, 18.3- and 11.3-fold, while at 28 days of age in the same regions the increases were 6.6-, 5.8-, 25.3- and 11.3-fold in the Cd treated rats, respectively. No lesions were observed in the brain of control rats. Rats treated with Dx at 28 days of age showed interstitial edema in the four regions. Cd-treated rats at 28 days of age showed lesions in the four studied regions. In general, Dx treatment attenuated all Cd-induced lesions. © 2001 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cadmium (Cd) is an important industrial and environmental pollutant that has been shown to cause damage in several organs, including lung, liver, kidney, testis and placenta (Morselt, 1991:

* Corresponding author. Tel.: + 525-606-3822; fax: + 525-528-0095.

ATSDR, 1993). Cd also produces neurotoxicity with a complex pathology, which includes neurological dysfunction (Shukla and Singhal, 1984; Hart et al., 1989a), changes in brain neurochemistry (Gupta et al., 1990, 1993; Gutierrez-Reyes et al., 1998) and behavioral alterations (Wong and Klaassen, 1982; Holloway and Thor, 1988). Experimental studies have shown extensive histopathological damage in the cerebral and cerebellar cortices from developing rats and rabbits, as compared with adults after identical Cd exposure (Gabbiani et al., 1967) and according to those authors, the CNS lesions produced by Cd are located primarily in the white matter (Gabbiani et al., 1967b). The ultrastructure of optic nerves exposed to Cd was characterized by swollen mitochondria with disrupted cristae, dissolution of

microtubule and axonal swelling (Fern et al., 1996), moreover, Cd induced alterations in the endothelial cell of the fetal brain after prenatal exposure to the metal (Rorher et al., 1978). All these studies have suggested that age of the animals is very important to make them susceptible to the neurotoxic effects of Cd due to the immaturity of the blood–brain barrier (Shukla et al., 1996). On the other hand, metallothionein (MT) is a cystein-rich protein able to reduce the toxicity of heavy metals such as Cd by binding them. The MT-mediated protection against Cd is thought to lie in its ability to sequester Cd in cytosol, thus, it is considered to have a role in detoxification of toxic metals (Nishimura et al., 1992). Metallothionein synthesis can be induced by metals, steroids and other factors (Hidalgo et al., 1988),

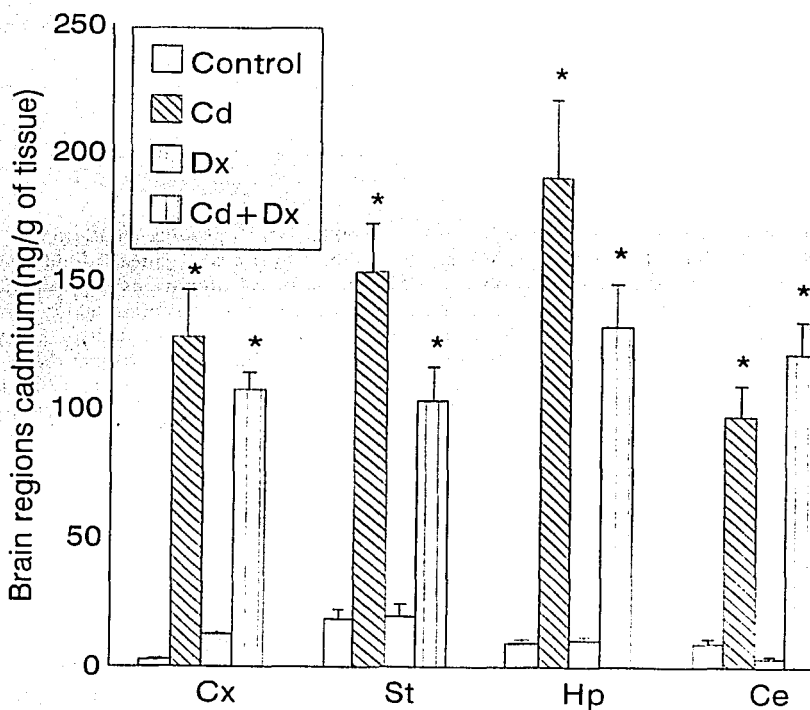


Fig. 1. Brain regional cadmium concentrations at 18 days of age. Values are the mean \pm S.E.M. of duplicate analysis for each animal. $n = 8$ per group. * Different from control group and Dexamethasone. $P < 0.01$, block-design analysis of variance followed by Tukey's test.

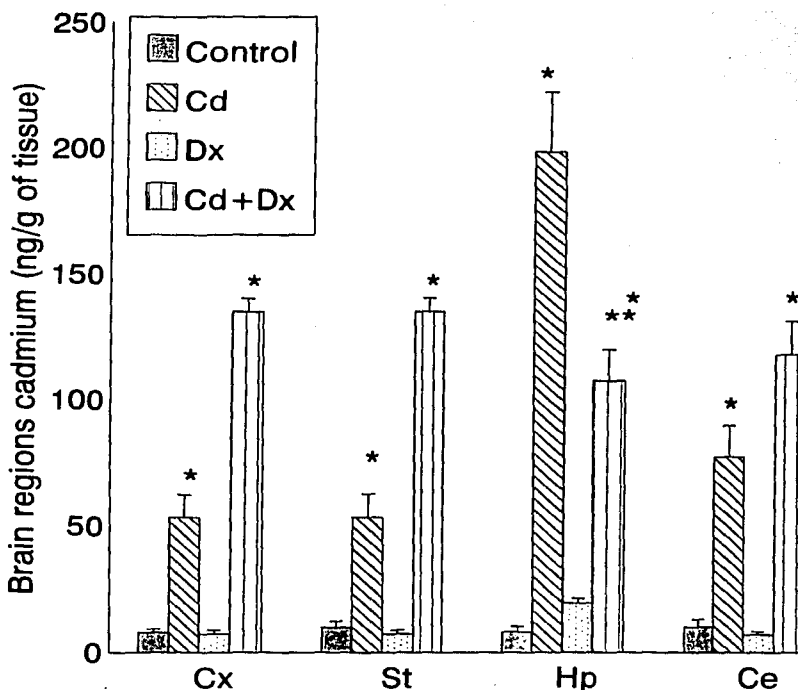


Fig. 2. Brain regional cadmium concentrations at 28 days of age. Values are the mean \pm S.E.M. of duplicate analysis for each animal, $n = 8$ per group. *, Different from control group and Dexamethasone; **different from group Cd, $P < 0.01$, block-design analysis of variance followed by Tukey's test.

including the administration of Dexamethasone (Dx) the best inducer of MT synthesis in brain (Palmitier et al., 1992). In the present work, we studied the morphological alterations in the brain of developing rats exposed to Cd and Dx in order to search for a protective effect of Dx-induced MT on Cd neurotoxicity. The concentrations of Cd in brain regions were also measured to relate the different Cd treatments with histopathological findings.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

CdCl_2 was from J.T.Baker de México, México. AgNO_3 , Absolute Alcohol, 39% Formaldehyde,

were all from E.Merck, México. Cd standard (Reference material 3108, National Bureau of Standart, Gaithesburg, MD), and all other reagents of analytical grade were purchased. Glassware and plastic material were immersed for 24 h in 3% v/v $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$, thoroughly rinsed with deionized water and dried in a stove before use.

2.2. Animals

We used 13 days old Wistar rats bred in-house, 0 day old being the day of birth, and with initial weight of 15–20 g. We choose this age to take advantage of the immaturity of the rat blood–brain barrier. The newborn rats were allowed to remain with their dams throughout the experiment. Rats were kept at 21°C and 40% relative

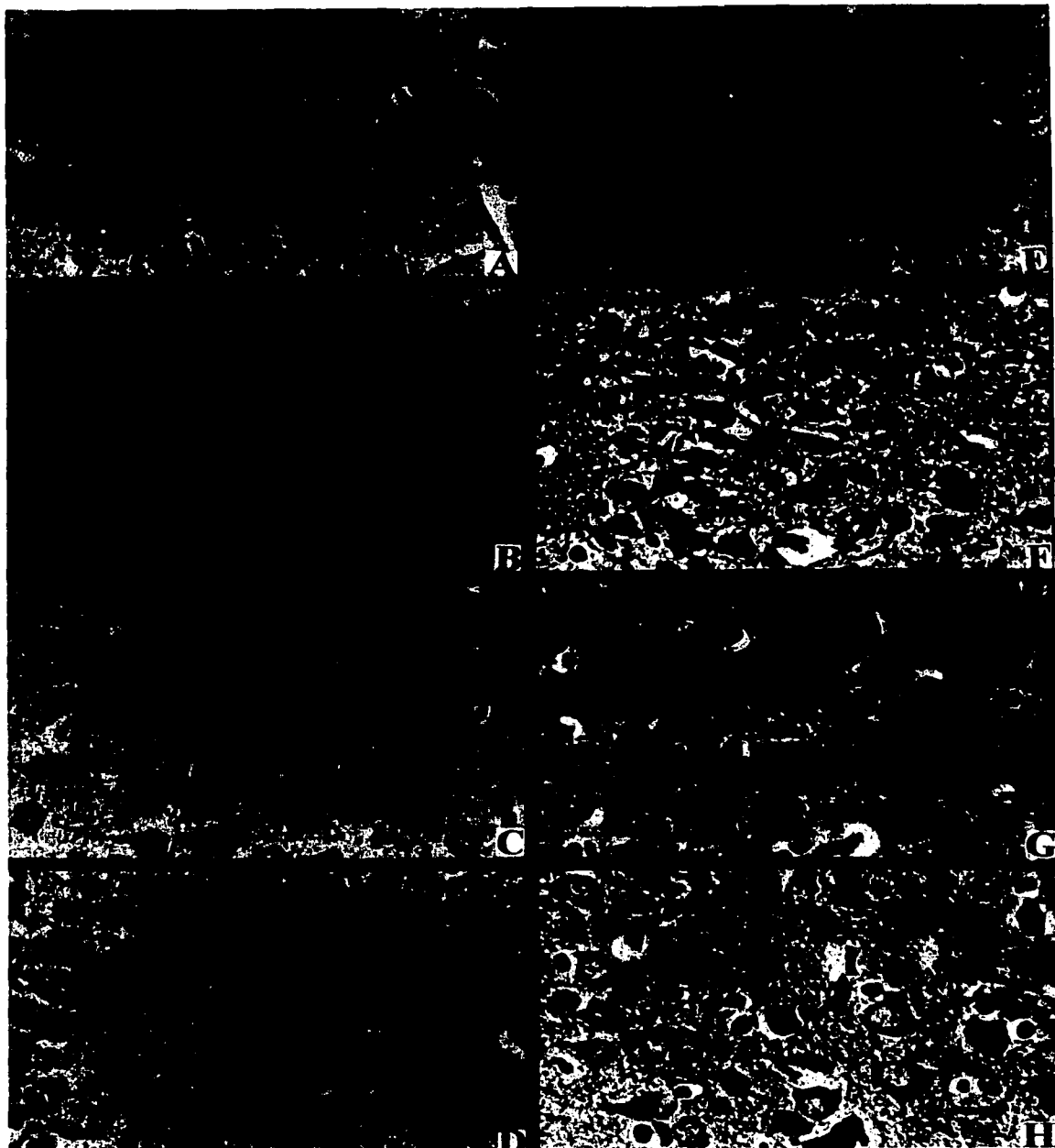


Fig. 3. Photomicrographs showing the parietal cortex at 18 (A, B, C and D) and 28 (E, F, G and H) days of age. Control rat (A and E). Cd alone (B and F). Dx alone (C and G) and Cd + Dx (D and H). Normal appearance of cell bodies and neuropil (A and E). Nuclear condensation of chromatin in cells (*), fibers destroyed (λ) and interstitial edema (T) were observed (B and F). Slight interstitial edema (T) and few hyperchromatic cells were observed (*) (C,G,D and H). Silver stain, Rio Hortega's method, 80X and 100X.

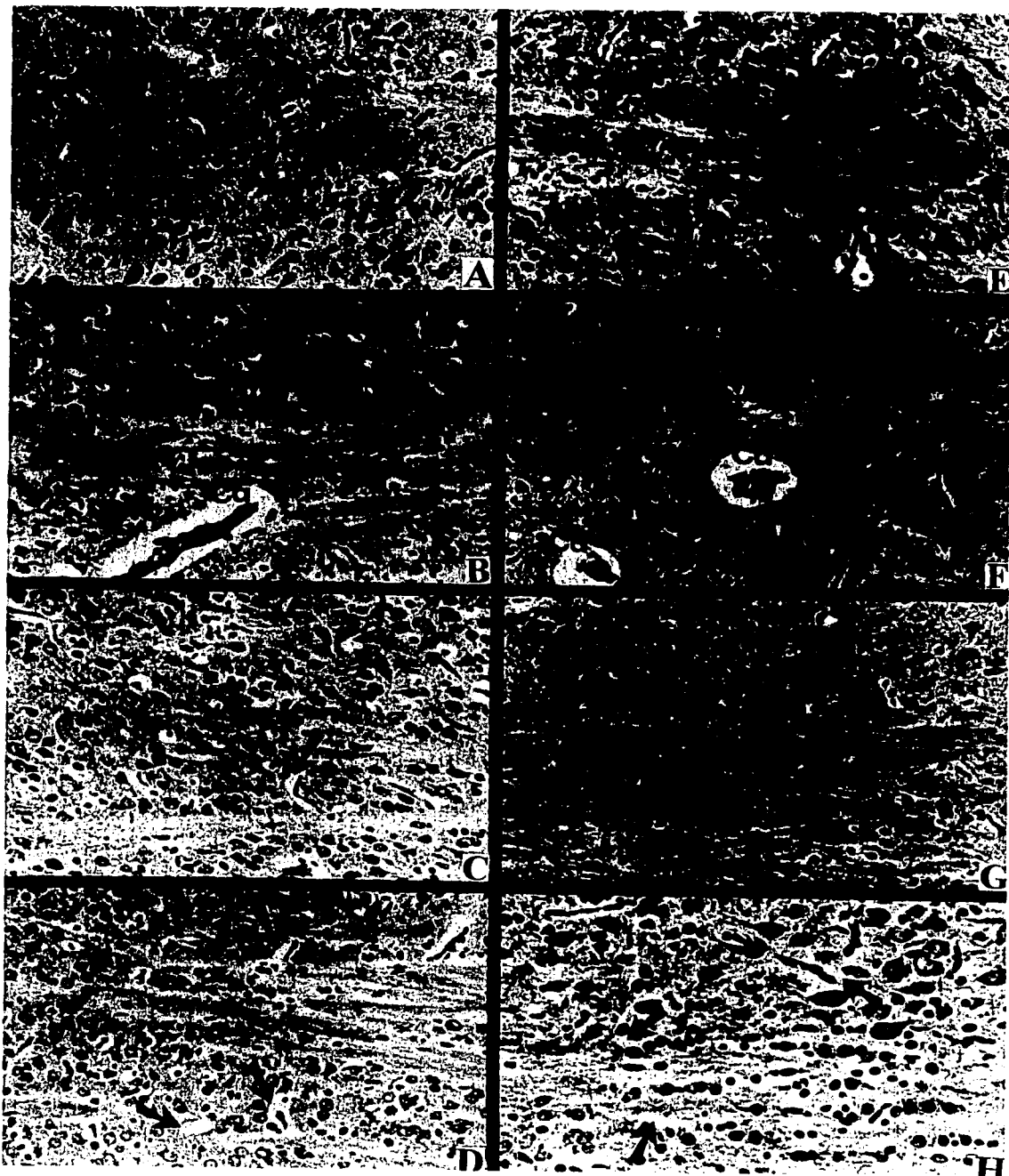


Fig. 4.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

81

humidity with a 12-h light:12-h dark cycle starting at 07:00 h.

2.3. Treatments

Each experimental block consisted of eight pups from the same litter, injected intra peritoneally (i.p.) at day 13 of age with either; (1) CdCl₂ (1 mg Cd/kg) dissolved in 0.5 ml of saline (0.9% NaCl w/v), (2) Dx (2 mg/kg) dissolved in 0.5 ml of saline, (3) CdCl₂ (1 mg of Cd/kg) and Dx (2 mg/kg) each dissolved in saline, and (4) saline 0.5 ml, volume of injection was approximately 0.5 ml for each animal. All treatments were administered daily for 5 consecutive days. For histological examination, eight rats per group and for Cd determination additional eight rats per group were killed at either 18 or 28 days old age.

2.4. Brain cadmium determinations

The brain regions were dissected out in parietal cortex (Cx), striatum (St), hippocampus (Hp) and cerebellum (Ce) (Glowinski and Iversen, 1966), the Cd content was determined taking the precautions described by Christian, 1969; Stoeppler and Brandt, 1980 and using the conditions described by Eller and Haartz (1977). Analyses were performed by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry, using a Perkin-Elmer 3110 spectrophotometer equipped with an HGA-600 furnace and AS-60 auto sampler. Regional brain Cd concentrations were expressed as ng of Cd/g wet brain weight.

2.5. Histopathological study

For the light microscope study, rats were anesthetized with 0.3 ml of 3.5% chloral hydrate i.p. and then perfused through the heart with cold saline solution, followed by 10% w/v formaldehyde solution at 4°C. Brains were dissected out

and kept in the same fixative for 15 days. Tissue samples were processed separately in Histokinette 2000 (Reichert Jung) with a program specific for brain. Brains were paraffin-embedded and sectioned to 5–7 μm thin slices. We applied hematoxylin-eosin, and Rio-Hortega's argentoauric impregnation (Luna, 1960; Barroso-Moguel and Costero, 1962) techniques. Sections were then examined with a Zeiss light photomicroscope.

2.6. Statistical analysis

The experiment was conducted as a block design in order to control variability from one set of conditions (eight rats from the same litter were used in parallel) to another. Therefore, results of Cd brain regions were analyzed using block-design analysis of variance followed by the Tukey's test for multiple comparisons, after checking for homogeneity of variances (Steel and Torrie, 1969).

3. Results

3.1. Cadmium concentration in brain regions

The content of Cd in parietal cortex, striatum, hippocampus and cerebellum at 18 days old age were increased 58.3-, 9.4-, 18.3- and 11.4-fold, while at 28 days of age in the same regions the increases were 6.6-, 5.8-, 25.3- and 11.3-fold in the Cd treated rats, respectively, as compared with the control group values (Fig. 1). In the group treated with Cd + Dx, the content of Cd in parietal cortex, striatum, hippocampus and cerebellum at 18 days old age were increased 58.3-, 6.3-, 11.5-, 13.6-fold while rats at 28 days old age in the same regions the increase was 18.4-, 8.2-, 13- and 11.7-fold (Fig. 2).

3.2. Histological evaluation

Light microscope examination showed no les-

Fig. 4. Photomicrographs of the striatum at 18 (A, B, C and D) and 28 (E, F, G and H) days of age. Control rat (A and E). Cd alone (B and F), Dx alone (C and G) and Cd + Dx (D and H). Normal aspect (N) of striatum in control group (A and E). Rats treated with Cd showing initial congestion in capillaries (Ca) and interstitial edema between fibers (†, B and F). Slight interstitial edema (‡, C, G, D and H). Silver Stain, Rio-Hortega's method, 80X.

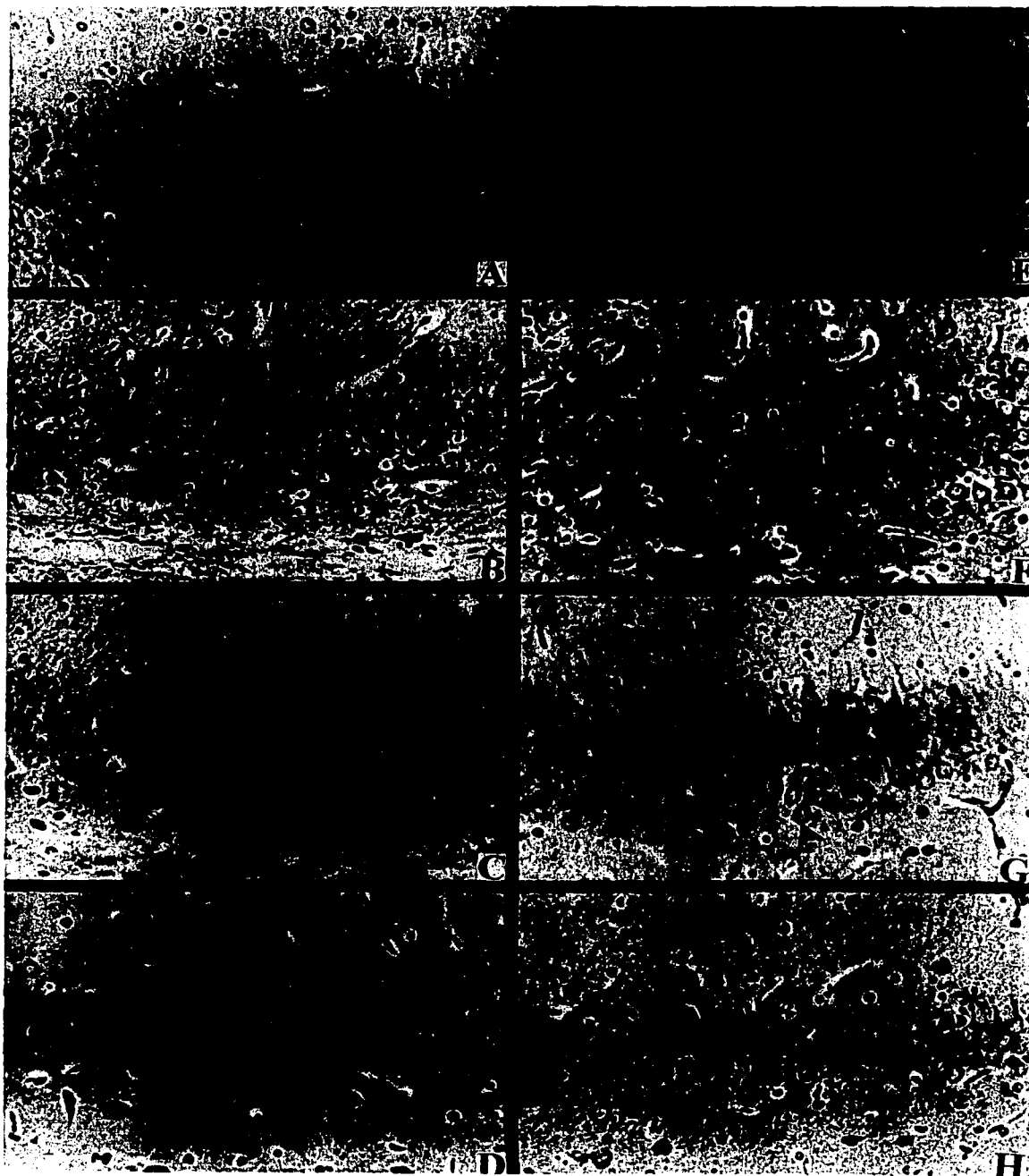


Fig. 5.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

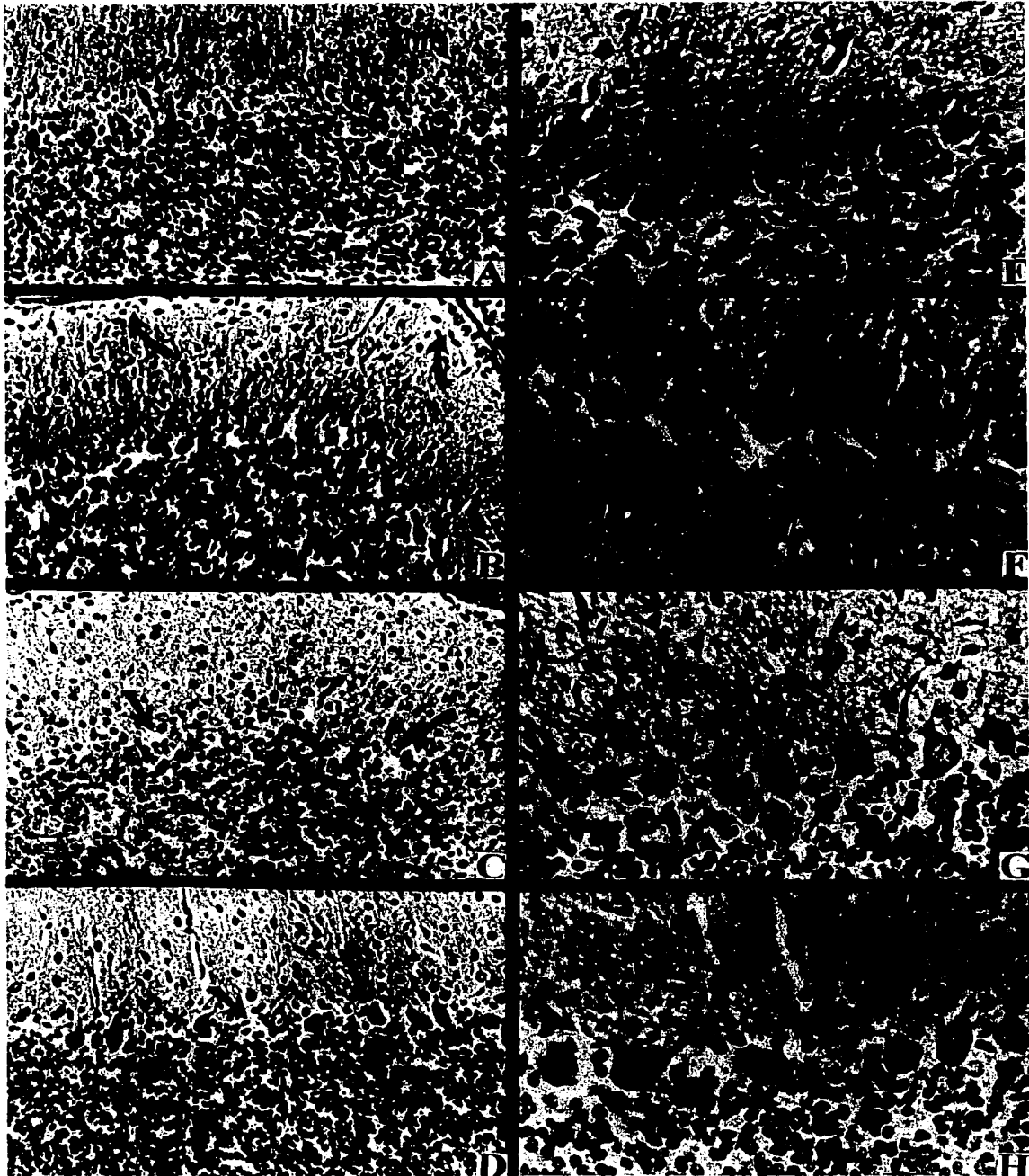


Fig. 6.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

sions in parietal cortex, striatum, hippocampus and cerebellum in control rats of 18 and 28 days old (Fig. 3A and E; Fig. 4A and E, Fig. 5A and E, Fig. 6A and E). In the 18 days old rats treated with five daily doses of Cd, parietal cortex showed hyperchromatic cells with slight interstitial edema in the cerebral parenchyma (Fig. 4B), whereas at 28 days old, the parietal cortex showed several hyperchromatic cells with necrosis and intense interstitial edema (Fig. 3F). At 18 and 28 days of age, with the same treatment, the striatum showed congestion of capillaries with slight interstitial edema (Fig. 4B and F). The hippocampus pyramidal cells are normal in appearance at 18 days old age (Fig. 5B), however, at 28 days of age they show several hyperchromatic soma with edema (Fig. 5F). In the same group treated with Cd at 18 days of age, the cerebellum showed shrunken and hyperchromatic Purkinje cells with intense edema in the molecular layer (Fig. 6B) and at 28 days of age the same lesions were present with higher intensity (Fig. 6F). At 18 old days with Dx treatment minor lesions (slight edema interstitial or between fibers and few hyperchromatic cells) were found in parietal cortex (Fig. 3C), striatum (Fig. 4C), hippocampus (Fig. 5C) and cerebellum (Fig. 6C). At 28 days of age the same type of slight alterations were found in rats treated with Dx (Fig. 3G, Fig. 4G, Fig. 5G and Fig. 6G). The group treated with Cd + Dx showed less intense histopathological lesions than that observed in the group treated with Cd alone. At 18 and 28 days of age parietal cortex and striatum show few hyperchromatic cells and slight edema between fibers (Fig. 3D and H, Fig. 4D and H), no lesions were found in hippocampus (Fig. 5D and H), and cerebellum was found with few hyperchromatic Purkinje cells (Fig. 6D and H).

4. Discussion

This study shows that Cd and Cd + Dx perinatal treatment of rats for 5 days was able to increase the concentration of Cd in brain regions of two different ages. High Cd content in striatum and hippocampus were also significantly increased by Cd treatment in a similar extent as reported earlier (Gutierrez-Reyes et al., 1998). Among the brain regions assayed, hippocampus resulted with the highest Cd accumulation in the absence of Dx treatment, probably as a result of the high content of MT in this region (Ebadi et al., 1995; Aschner, 1996) and this high concentration was maintained until 28 days of age (Fig. 2). We also found light microscope lesions in the four brain regions of rats perinatally exposed to Cd, which included pyknosis, interstitial edema, destroyed fibers and alteration of Purkinje cells. This is in agreement with findings of Gabbiani et al. (1967), who reported damage in the brain and cerebellar cortices from developing rats and rabbits with high concentration of Cd, as compared with adults after identical Cd exposure, showing that Cd penetrates the developing blood–brain barrier more easily than in adult rats (Gupta and Shukla, 1996).

It is interesting to remark a lack of correlation between the intensity of the regional lesion with the region Cd content. In hippocampus, only slight lesions were observed in spite of the high Cd content, this effect might be due to the high concentrations of MT in hippocampus (Aschner 1996), which is able to sequester seven atoms of Cd per mole of protein (Ebadi et al., 1995). MT might be involved in the homeostasis of various metals as well as the chelation and detoxification of heavy metals (Hidalgo et al., 1988). The pari-

Fig. 5. Photomicrographs of the hippocampus at 18 (A, B, C and D) and 28 (E, F, G and H) days of age. Control rat (A and E), Cd alone (B and F), Dx alone (C and G) and Cd + Dx (D and H). Control rat showing normal appearance (†) of pyramidal cells (A and E). Normal aspect of pyramidal cells were observed (†, B, C, D and G) nuclear condensation of chromatin in several pyramidal cells (*) and interstitial edema were observed (∧, F and H).

Fig. 6. Photomicrographs of the cerebellum at 18 (A, B, C and D) and 28 (E, F, G and H) days of age. Control rat (A and E), Cd alone (B and F), Dx alone (C and G) and Cd + Dx (D and H). Normal aspects were observed in control rat (A and E). Nuclear condensation of chromatin, shrunken Purkinje cells (*) and interstitial edema in molecular layer were observed (∧, B and F). Slight interstitial edema was observed in granular and molecular layers (†, G and H). Nuclear condensation of chromatin Purkinje cells were also observed (*, D and H).

etal cortex and cerebellum show the more severe lesions and the lowest concentrations of Cd probability by the low concentration of MT in the tissue striatal shows an intermediate damage and Cd content. It is important to note that main neurotoxic effects of Cd exposure observed in these studies were diminish by Dx, a well known brain MT inducer (Palmitier et al., 1992) and their higher capacity of MT to chelate Cd and to inactivate it, indicating that these lesions could be mediated by cadmium not bound to MT.

Recent studies have shown that metals as Cd depletes glutathione and protein-bound sulfhydryl groups, resulting in the production of reactive oxygen species that determine oxidative DNA damage (Stohs and Bagchi, 1995). Cd is able to generate DNA strand breaks and to interfere with the repair of oxidative DNA damage that could explain the stage neurotoxicity of Cd (Calevro et al., 1998). This damage might induce cellular death as a response to the toxicity of the metal and to produce severe tissue damage. Studies in others organs such as kidney and liver show that Cd might produce biochemical and morphological changes which are characteristic of apoptosis (Habeebu et al., 1998; Ishido et al., 1998). However, our results are not sufficient to show the kind of neuronal death, if any, after Cd administration.

In summary, the results presented in this work showed that Cd exposure at a relatively low dose is able to induce lesions in brain regions at two times after Cd administration and that the participation of MT as a protective mechanism against cadmium-induced neurotoxicity is suggested. Further studies are needed to investigate whether or not cadmium-induced free radicals generation and apoptosis can lead to alterations in different brain regions and the possible mechanism involved.

Acknowledgements

The authors wish to thank Leticia Andrés Martínez and Roxana Huerta Romero for their technical assistance. This work was supported by CONACYT fellowship to Marisela Méndez Armenta.

References

- Agency for Toxic Substance and Disease Registry (ATSDR). 1993. US Public Health Service. Toxicological Profile for Cadmium, Atlanta GA, USA.
- Aschner, M., 1996. The functional significance of brain metallothioneins. *FASEB J.* 10, 1129–1136.
- Barroso-Moguel, R., Costero, I., 1962. Argentaffin cells on the carotid body tumor. *Am. J. Pathol.* 41, 344–389.
- Calevro, F., Beyersmann, D., Hartwig, A., 1998. Effect of cadmium (II) on the extent of oxidative DNA damage in primary brain cell cultures from *Pleurodeles* larvae. *Toxicol. Lett.* 94, 217–225.
- Christian, G.D., 1969. Medical trace metals and absorption spectroscopy. *Ann. Chem.* A 41, 24A–40.
- Ebadi, M., Iversen, P.L., Hao, R., Cerutis, D.R., Rojas, P., Happe, H.K., Murrin, L.C., Pfeiffer, R.F., 1995. Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem. Int.* 27, 1–22.
- Eller, P.M., Haartz, J.C., 1977. A study of methods for the determination of lead and cadmium. *Ann. Ind. Hyg. Assoc.* 38, 116–124.
- Fern, R., Black, A.J., Ransom, R.B., Waxman, S.G., 1996. Cd²⁺-Induced injury in CNS white matter. *J. Neurophysiol.* 76, 3264–3273.
- Gabbiani, G., Baic, D., Deziel, C., 1967. Toxicity of cadmium for the central nervous system. *Exp. Neurol.* 18, 154–160.
- Gabbiani, G., Gregory, A., Basic, D., 1967b. Cadmium-induced selective lesions of sensory ganglia. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 26, 498–501.
- Glowinski, J., Iversen, L.L., 1966. Regional studies of catecholamines in the rat brain: disposition of [3H]-norepinephrine, [3H]-dopamine and [3H]-DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13, 665–669.
- Gupta, A., Gupta, A., Murthy, R.C., Thakur, S.R., Dubey, M.P., Chandra, S.V., 1990. Comparative neurotoxicity of cadmium in growing and adult rats after repeated administration. *Biochem. Int.* 21, 97–105.
- Gupta, A., Gupta, A., Murthy, R.C., Chandra, S.V., 1993. Neurochemical changes in developing rat brain after pre- and postnatal cadmium exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 12–17.
- Gupta, A., Shukla, G.S., 1996. Ontogenic profile of brain lipids following perinatal exposure to cadmium. *J. Appl. Toxicol.* 16, 227–233.
- Gutierrez-Reyes, E.Y., Albores, A., Rios, C., 1998. Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone-induced metallothionein. *Toxicology* 131, 145–154.
- Habeebu, S.S., Liu, J., Klaassen, C.D., 1998. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149, 203–209.
- Hart, R.P., Rose, C.S., Hamer, R.M., 1989a. Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 11, 933–943.
- Hidalgo, J., Campmany, L., Borra, M., Garvey, J., Armario, A., 1988. Metallothionein response to stress in rats: role in free radicals scavenging. *Am. J. Physiol.* 225, E518–E524.

- Holloway, W.R., Thor, D.H., 1988. Cadmium exposure in infancy: effects on activity and social behaviors of juvenile rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 10, 135–142.
- Ishido, M., Homma-Takeda, S., Tohyama, C., Suzuki, T., 1998. Apoptosis in rat renal proximal tubular cells induced by cadmium. *J. Toxicol. Environ. Health* 55, 1–12.
- Luna, G., (Ed.) 1960. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology American Registry of Pathology*, Washington DC, pp. 258.
- Morselt, A.F.W., 1991. Environmental pollutants and diseases. *Toxicology* 70, 1–132.
- Nishimura, N., Nishimura, H., Ghaffar, A., Tohyama, C., 1992. Localization of metallothionein in the brain of rat and mouse. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 309–315.
- Palmitier, R.D., Findley, S.D., Whitmore, T., Durnam, D.M., 1992. MT-III, a brain specific member of metallothionein gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6333–6337.
- Rorher, S.R., Shaw, S.M., Lamar, C.H., 1978. Cadmium induced endothelial cell alterations in fetal brain from prenatal exposure. *Acta Neuropathol.* 44, 147–149.
- Shukla, G.S., Singhal, R.L., 1984. The present status of biological effects of toxic metals in the environment: lead, cadmium, and manganese. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62, 1015–1031.
- Shukla, A., Shukla, G.S., Srimal, R.C., 1996. Cadmium-induced alterations in blood-brain barrier permeability and its possible correlation with decreased microvessel antioxidant potential in rat. *Hum. Exp. Toxicol.* 15, 400–405.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., 1969. *Principles and Procedures of Statistics*. McGraw-Hill, New York.
- Stoeppler, M., Brandt, K., 1980. Contributions to automated trace analysis part V: determination of cadmium in blood and urine by electrothermal atomic absorption spectrophotometry. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 300, 372–380.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* 18, 321–336.
- Wong, K.-L., Klaassen, C.D., 1982. Neurotoxic effect of cadmium in young rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 56, 317–325.