



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

---

---

EFFECTO DEL CADMIO EN LA PROGRESIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO EN  
ESTEATOSIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:  
BIÓLOGA EXPERIMENTAL DIANA PATRICIA ROSALES CRUZ

Comité Tutorial:

DIRECTORA DE TESIS: DRA. VERÓNICA SOUZA ARROYO

ASESORA: DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUÍZ

ASESOR: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

México, D.F.

Agosto 2014

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa con número de registro (UAM-1:309-1) pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad de CONACyT PIFOP-CONACYT-SEP y recibe apoyo por parte del mismo consejo a través del convenio 309-0, con clave C/PFPN-2002-35-32.

Durante el transcurso de la Maestría en Biología Experimental, en la UAM-Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONACYT, con un número de becario/CVU 283740/405050, en el periodo 2012-2014.

El trabajo de investigación fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por medio del proyecto con clave Conacyt-Sep. CB-2008-106194, bajo la dirección de la Dra. Verónica Souza.

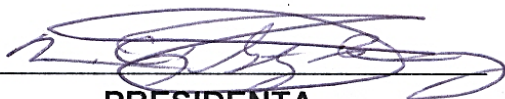
El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“Efecto del Cadmio en la progresión del daño hepático en esteatosis”, que  
presentó

**Biol. Exp. Diana Patricia Rosales Cruz**

El día 26 de Agosto del año 2014

### SINODALES



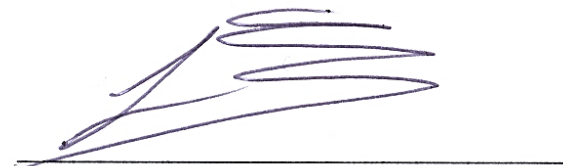
**PRESIDENTA**

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz  
Departamento de Ciencias de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana.  
México, D.F.



**SECRETARIO**

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



**VOCAL**

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz  
Departamento de Ciencias de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana.  
México, D.F.



**VOCAL**

Dra. Karina Martínez Flores  
Laboratorio de Líquido Sinovial.  
Instituto Nacional de Rehabilitación.  
México, D.F.

## COMITÉ TUTORAL

### DIRECTORA DE TESIS:

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

### ASESORA:

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

### ASESOR:

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

## *Agradecimientos*

Quiero agradecer profundamente a mi directora de tesis y amiga, la Dra. Vero Souza por su excelente calidad humana y científica, por sus consejos apoyo y paciencia para la realización de éste trabajo, pero principalmente por creer en mí desde el primer momento y no abandonar esa decisión ni un instante, ¡gracias!

A mi asesora, la Dra. Conchita Gutiérrez por su calidez en cada momento, por sus palabras y decisiones que siempre nos alientan a seguir en el camino y nos inspiran a alcanzar su grandeza algún día.

A mi asesor el Dr. Emilio Rojas por su apoyo incondicional, porque desde el principio no dudó en formar parte del equipo y por todas sus aportaciones y comentarios durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Luis Enrique Gómez primero, por permitirme formar parte de su excelente equipo de trabajo sin dudarlo, y después porque siempre enriquece nuestro trabajo tratando de orientarnos en el camino y poniendo a nuestro alcance lo más innovador de la ciencia.

A la Dra. Karina Martínez, por aceptar ser parte del jurado y por todos sus comentarios y aportaciones a la tesis, pero sobre todo por que fuiste mi amiga desde el día en que nos conocimos y fuiste la primera luz en mi camino en este nuevo proyecto de investigación.

A todos y cada uno de los integrantes del laboratorio por su apoyo en cada momento, pero especialmente:

A Ely porque te has convertido en una de las personas más importantes para mí al regañarme y divertirme todos los días, sólo sé que ni la tesis ni mi vida serían lo mismo sin ti.

A Mayra, porque nunca me dijiste que no cuando necesité tu ayuda y eso es más que suficiente.

A Cris, porque no todo fue fácil al principio pero ahora sé que mi vida no estaría completa sin tus locuras.

A Denise por que en muchas ocasiones no hubiera sabido que hacer sin tu ayuda, eres lindísima.

A Nat porque tu apoyo fue incondicional desde el principio, y por nuestros momentos de diversión.

A Benja porque siempre tienes una palabra de aliento y un comentario que nos roba una sonrisa.

A Nelly simplemente porque el trabajo era más sencillo y divertido si estabas ahí.

A Roberto por tu ayuda en el trabajo y por todas tus ocurrencias.

A Oscar por tu calidad humana y por correr a mi lado siempre que fuera necesario.

A Soraya por ser de las personas más divertidas que he conocido y por compartirlo conmigo, gracias por ser mi amiga y también mi cómplice en muchas ocasiones.

A Arturo por que siendo tan parecidos increíblemente nos llevamos de maravilla, gracias por ser gruñón un instante y divertido al siguiente y gracias por alegrarme los días cantando a mi lado.

Todos ustedes se han convertido en mi familia y no sólo porque nos vemos todo el día, todos los días, sino porque funcionamos como una, estamos todos para todos en las buenas y en las malas, en el trabajo y en la vida y eso no tengo cómo agradecerlo.

A la Universidad Autónoma Metropolitana porque ha sido mi casa abierta al tiempo y me ha permitido disfrutar de todos sus recovecos al mismo tiempo que me ha preparado para retribuírselo algún día.

## *Dedicatorías*

A mis padres, María Guadalupe y Eliazer porque gracias a ustedes soy quien soy y he logrado todo lo que me he propuesto, por su amor infinito y su apoyo a cada segundo, más que darme la vida ustedes son mi vida, los amo.

A mi hermana, Jaqueline porque siempre has sido una inspiración para seguir adelante y ser mejor persona y cuando nazca mi sobrino espero serlo también para él.

A la mitad de mi alma, Eduardo, porque juntos hemos logrado tantas cosas, eres mi equilibrio y mis ganas de ser mejor cada día, eres mi sueño hecho realidad, no tengo como agradecer tu apoyo incondicional, te amo.

A los pilares de mi familia, mis abuelos María Teresa y Enrique, Alba y Francisco a todos los tíos, tías, primos y primas, a Don Leo y Doña Celia que soportaron las ausencias y apoyaron en todo momento mi desarrollo profesional.

A mi otra familia, mis suegros Virginia y Rubén, y mi cuñado Rubén porque su recuerdo permanece y los extrañamos todos los días. A mi cuñada Trini, por todo tu apoyo, tus consejos y todos los momentos felices, y los que nos faltan.

A mis amigos, Mickey y Aimeé por que han estado ahí siempre sin importar nada, Sam e Isabel por sus consejos y las madrugadas de risas interminables, los quiero mucho.

## RESUMEN

La esteatosis no alcohólica es el padecimiento hepático crónico más común en el mundo y su progresión puede deberse en parte, al resultado de la lipotoxicidad hepática causada por un exceso de ácidos grasos libres que promueven un exceso de ERO y la consecuente disfunción y muerte celular por necrosis o apoptosis. Sin embargo, las investigaciones acerca del avance de ésta condición indican que su progresión se ve potenciada cuando el hígado se somete a un segundo agresor que incrementa la inflamación, el estrés oxidante y la fibrosis.

El cadmio es un metal ampliamente utilizado en la industria y se considera un contaminante cuando es liberado al ambiente, la exposición al él produce varios efectos adversos sobre la salud humana de acuerdo a la dosis, fuente y tipo de exposición; se ha demostrado que el cadmio es un poderoso inductor de estrés oxidante, incrementando considerablemente la producción de ERO.

En ésta investigación se analizó el efecto del cloruro de cadmio en el incremento del daño celular en presencia de esteatosis, y se comprobó que si bien la esteatosis desencadena mecanismos de sobrevivencia que impiden el efecto inmediato del cadmio, la exposición prolongada al metal provoca daño celular irreversible incrementando la muerte celular, por un lado a través de la inducción de estrés oxidante mediante un incremento de ERO y la oxidación de proteínas, y por otra parte disminuyendo las enzimas antioxidantes, todo esto desencadena el proceso de lipogénesis. Así, el hepatocito se vuelve incapaz de manejar una segunda agresión prooxidante, lo que conduce a la muerte celular.



## ABSTRACT

Non alcoholic fatty liver disease is the most common chronic liver disease in the world and its progression may be due, in part, to the outcome of liver lipotoxicity produced by an excess of free fatty acids that promotes reactive oxygen species, and consequently, cell dysfunction and death by necrosis or apoptosis. However, research on this field indicates that progression of liver damage could be associated to a second liver aggression that produces inflammation, aggravates oxidative stress that could result in progression of liver damage to fibrosis.

Cadmium is a pro-oxidant metal, that is considered an environmental pollutant, widely used in the industry. Cadmium could induce adverse effects on human health principally in liver and kidney.

In this study we analyzed the effect of cadmium on the progression of liver damage in steatotic hepatocytes from mice feed with high cholesterol diet. Our results show that, although steatosis triggered survival mechanisms that compensates cadmium aggression, prolonged exposure with the metal causes cell death. The mechanism is an increase in reactive oxygen species and protein oxidation that induce oxidative stress, and a decrease in the antioxidant enzymes, producing an increase in the lipogenesis process. Thus, hepatocyte becomes unable to handle a second prooxidant aggression, which leads in hepatocyte death.

## ÍNDICE

1. Introducción .....	- 4 -
1.1 Esteatosis .....	- 4 -
1.2 Especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidante .....	- 6 -
1.3 El Cadmio .....	- 10 -
1.4 El cadmio en esteatosis .....	- 13 -
2. Antecedentes .....	- 15 -
3. Justificación .....	- 18 -
4. Pregunta de Investigación .....	- 19 -
5. Hipótesis .....	- 19 -
6. Objetivos .....	- 19 -
6.1 Objetivo General .....	- 19 -
6.2 Objetivos particulares .....	- 20 -
7. Materiales y Métodos .....	- 20 -
7.1 Tratamiento de los animales .....	- 20 -
7.2 Obtención de cultivo primario de hepatocitos de ratón. ....	- 21 -
7.3 Diseño experimental. ....	- 21 -

7.4	Determinación de lípidos neutros por la incorporación de aceite rojo O...	- 22 -
7.5	Ensayo de viabilidad celular por Cell Counting Kit 8 (CCK8).....	- 23 -
7.6	Análisis de la morfología con cristal violeta .....	- 23 -
7.7	Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno. ....	- 24 -
7.8	Determinación de proteínas oxidadas por Oxyblot. ....	- 24 -
7.9	Determinación de lípidos por incorporación de aceite rojo O.....	- 24 -
7.10	Extracción de proteína total. ....	- 25 -
7.11	Determinación de proteína total.....	- 25 -
7.12	Análisis del contenido de proteína por Western blot.....	- 26 -
7.13	Análisis Estadístico.....	- 27 -
8.	Resultados.....	- 28 -
8.1	Confirmación del modelo de esteatosis .....	- 28 -
8.2	Viabilidad celular de hepatocitos CW y HC tratados con Cadmio.....	- 30 -
8.3	Análisis de la morfología celular de hepatocitos CW y HC tratados con Cadmio .....	- 34 -
8.4	Determinación de generación de ERO .....	- 38 -
8.5	Análisis del contenido de proteínas oxidadas .....	- 41 -

8.6	Contenido de enzimas antioxidantes .....	- 44 -
8.7	Efecto del cadmio en el contenido de lípidos .....	- 53 -
8.8	Efecto del trolox en el metabolismo de lípidos alterado por cadmio .....	- 55 -
8.9	Expresión de enzimas lipogénicas .....	- 59 -
9.	Discusión .....	- 66 -
10.	Conclusión.....	- 88 -
11.	Referencias .....	- 89 -

## 1. Introducción

Durante el último siglo se han observado cambios en el estilo de vida del mexicano, teniendo menos actividad física aunado a una dieta con un alto consumo de grasas repercutiendo de manera negativa en la salud de nuestra población. Se ha reportado un incremento de enfermedades crónicas como la obesidad, enfermedades cardiovasculares y la predisposición de desarrollar hígado graso (esteatosis) a edades cada vez más tempranas, el crecimiento en estos padecimientos se ha vuelto muy común en países desarrollados afectando a más de un tercio de la población y se asocia con la mortalidad relacionada a enfermedades cardiovasculares y hepáticas (Bellentani et al., 2009; Berlanga et al., 2014; Perichart-Perera et al., 2010).

### 1.1 Esteatosis

La esteatosis no alcohólica o la enfermedad del hígado graso no-alcohólico (NAFLD por sus siglas en inglés) es el padecimiento hepático crónico más común en el mundo occidental tanto en adultos, (Musso et al., 2010) como en niños (Loomba et al., 2009) teniendo una prevalencia superior al 30% en población adulta.

Es una condición clínico-patológica definida por la infiltración de grasa en más del 5% de los hepatocitos en ausencia de una ingesta crónica de alcohol y se caracteriza predominantemente por la presencia de macrovesículas grasas en los hepatocitos (Berlanga et al., 2014). Desde el punto de vista histopatológico, comprende un espectro que varía entre el simple depósito de grasa en el hígado (esteatosis) hasta la esteatohepatitis, fibrosis y cirrosis (figura 1) (Lazo et al., 2008). Los primeros estudios consideran ésta condición como una manifestación hepática del síndrome metabólico,

el cual está acompañado por obesidad central, resistencia a la insulina (IR), dislipidemia y diabetes mellitus tipo 2 (Bellentani et al., 2009). Sin embargo, el mecanismo molecular de la progresión en el caso de la esteatosis no está totalmente descrito, y se interpreta mediante la hipótesis de “doble agresión”, donde la primera incluye la acumulación de lípidos en el hígado seguida por una segunda agresión donde participan intermediarios pro-inflamatorios que dirigen hacia daño hepatocelular y fibrosis (Berlanga et al., 2014).

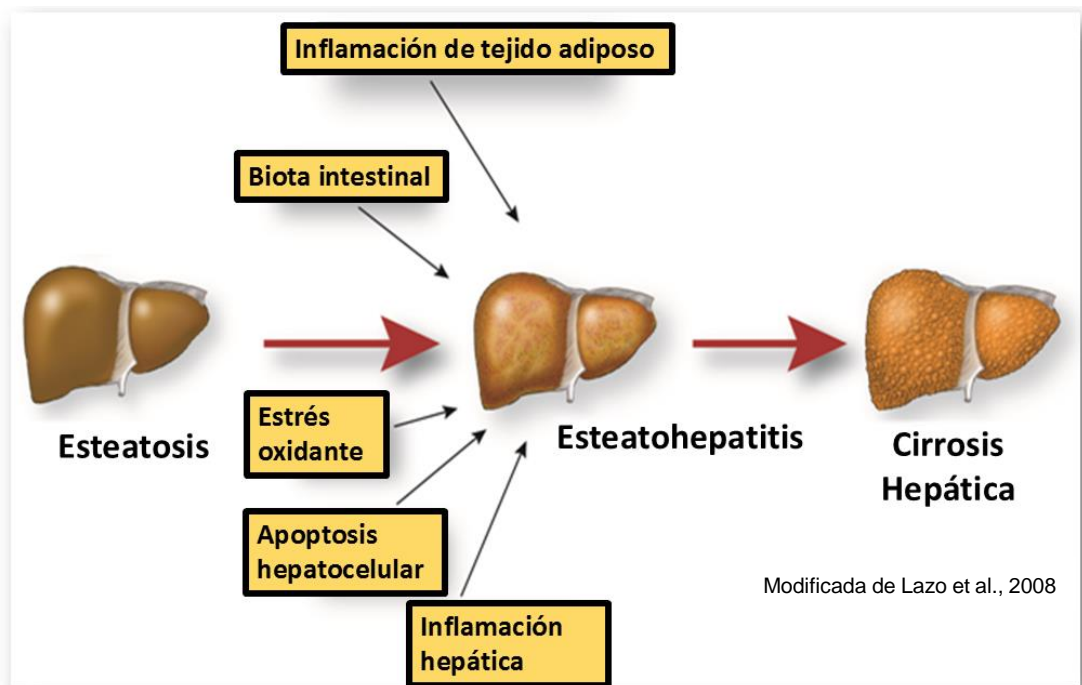


Figura 1 Progresión de la esteatosis hepática hacia fases más severas.

La esteatosis también se encuentra asociada con desórdenes metabólicos de los lípidos, incluyendo hipertrigliceridemia y/o hipercolesterolemia. De acuerdo con lo reportado por el Instituto Nacional de Salud Pública hubo un incremento del 21% en la prevalencia de dislipidemias del año 1994 al 2000, mientras que en el análisis de una

subpoblación con peso normal se detectó la presencia de hipercolesterolemia en un 42.6% de la muestra del cual sólo un 6% ha sido diagnosticado (INSP 2010).

La prevalencia de esteatosis hepática en México no se conoce con precisión, sin embargo, extrapolando los datos de sobrepeso y obesidad obtenidos por la encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT) de 2012 en la que se informa que el 68.9% de niños y niñas entre 5 y 11 años padecen sobrepeso u obesidad al igual que un 71.2% de adultos de 20 años y más, considerando adicionalmente las cifras reportadas de las dislipidemias, se predice al hígado graso no alcohólico como la principal causa de enfermedad hepática para el año 2020 (ENSANUT, 2012).

Las investigaciones acerca del avance de ésta condición hacia estados más graves como la esteatohepatitis, la fibrosis y la cirrosis, indican que su progresión se ve potenciada cuando el hígado se somete a un segundo agresor que incrementa la inflamación, la fibrosis y el estrés oxidante (Bellentani et al., 2009).

## **1.2 Especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidante**

Cuando las especies reactivas de oxígeno (ERO) se producen bajo condiciones controladas y en cantidades limitadas contribuyen en varios procesos celulares, como la proliferación, la senescencia y la sobrevivencia ya que actúan como intermediarios en diversas vías de señalización, sin embargo, una sobreproducción de ellas deriva en una condición conocida como estrés oxidante que representa disfunción celular que conduce a la muerte de los hepatocitos y otras células hepáticas, contribuyendo a la progresión de las enfermedades hepáticas agudas y crónicas (Serviddio et al., 2013).

En las células existen varias fuentes de ERO que pueden clasificarse como, mitocondriales, principalmente los complejos I y III de la cadena respiratoria, y extramitocondriales, como el citocromo P450, la xantina oxidasa, la óxido nítrico sintetasa y la NADPH oxidasa; los neutrófilos y las células de Kupffer son los productores principales de ERO en el hígado, mientras que en los hepatocitos los principales sistemas de liberación de radicales libres son el citocromo P450 y la mitocondria (Mari et al., 2010).

El estrés oxidante representa un desequilibrio entre la producción de ERO y la actividad antioxidante en la célula, entre los marcadores más importantes de estrés está la actividad de algunas enzimas antioxidantes encargadas de contrarrestar el daño generado por los radicales libres a través de diversas reacciones, entre las más estudiadas se encuentran: las superóxido dismutasas (SOD), una familia caracterizada por su estructura y cofactores entre ellos el manganeso en SOD2 y el cobre/zinc en SOD1, su actividad potencia la dismutación de los radicales superóxido hacia peróxido de hidrógeno.

También están las glutatión peroxidasas (GPXs) las cuales tienen como función biológica reducir los hidroperóxidos lipídicos hacia los alcoholes correspondientes, y reducir el peróxido de hidrógeno libre hacia agua. Con la misma relevancia, están las enzimas involucradas en la síntesis de glutatión (GSH), que es el mayor antioxidante endógeno que producen las células, participando directamente en la neutralización de radicales libres y compuestos reactivos de oxígeno así como auxiliando en la regeneración de antioxidantes exógenos como las vitaminas C y E, así la gama-



glutamil cisteín sintetasa (γ-GCS) y la glutatión S-transferasa (GST) son claves en el proceso antioxidante (Rajendran et al., 2014).

De igual manera, cuando se expone a la célula a estresores, se inducen una serie de proteínas llamadas proteínas de estrés que confieren protección celular, entre las más representativas se encuentran las proteínas de choque térmico (heat shock proteins, HSPs) y su sobre-regulación, particularmente de HSP70 provee resistencia contra estrés oxidante, y promueve el re-plegamiento de proteínas o su desnaturalización si no existe mejora (Kiang, 2004); también se ha visto que una sobre-expresión de ésta proteína disminuye considerablemente el daño en el tejido causado por isquemia/reperfusión (Mizushima, 2014).

La esteatosis se caracteriza por promover el estrés oxidante en el hígado, la progresión de ésta condición es multifactorial e incluye alteraciones en el metabolismo lipídico, disfunción mitocondrial, inflamación y estrés oxidante, así los radicales libres tienen un papel importante en la activación o inhibición diversas vías de señalización que pueden regular el metabolismo lipídico.

Por ejemplo, el estado redox celular puede afectar la actividad de muchas enzimas involucradas en éste proceso, causando modificaciones post-transcripcionales directas, regulando la actividad de varias cinasas o fosfatasas, actuando como segundos mensajeros o induciendo cambios conformacionales en varios ligandos (Serviddio et al., 2013).

La progresión de esteatosis hacia esteatohepatitis puede ser el resultado de la lipotoxicidad hepática causada por un exceso de ácidos grasos libres que promueven un exceso de ERO y la consecuente disfunción y muerte celular por necrosis o apoptosis. Al mismo tiempo, el exceso de colesterol se ha relacionado principalmente con la sobre-producción de enzimas pro inflamatorias y con la disfunción mitocondrial, ya que se acumula en las crestas mitocondriales impidiendo el buen funcionamiento del organelo y disminuye la síntesis de glutatión lo a su vez se relaciona con una respuesta enzimática que promueve estrés oxidante en el retículo endoplásmico (figura 2) (Noguchi et al., 2009).

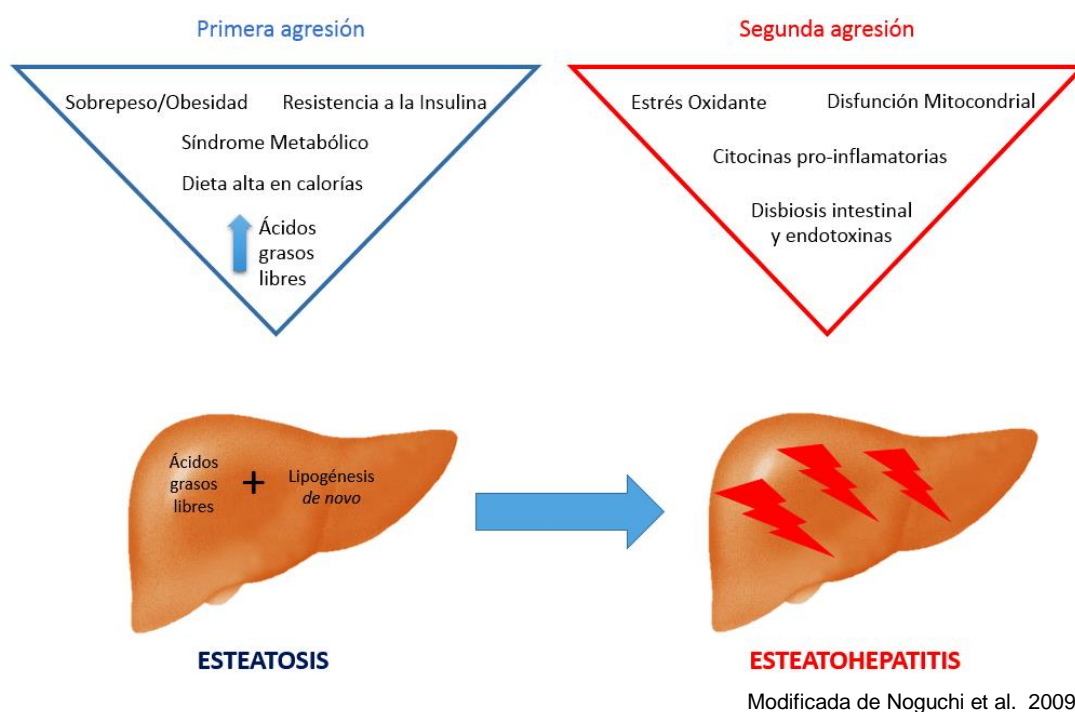


Figura 2 El estrés oxidante como mediador en la progresión de la esteatosis hepática.

Entonces, el inicio de la esteatosis se caracteriza por cambios en el estado redox hepatocelular que dirige a un daño en la regulación del metabolismo de lípidos, pero

que al mismo tiempo puede agravarse en presencia de otros factores que promuevan la inflamación y el estrés oxidante impulsando la progresión de esteatosis hacia fases más severas.

### 1.3 El Cadmio

El cadmio (Cd) es un metal que se encuentra en la corteza terrestre, en combinación con otros metales formando cloruros, sulfuros u óxidos (Martínez-Flores et al., 2013b). Es ampliamente utilizado en la industria y se considera un contaminante cuando es liberado al ambiente como subproducto de la extracción de cobre, hierro y cinc. La exposición al Cd produce una variedad de efectos adversos tanto en el humano como en los animales; una vez absorbido en el organismo tiene una vida biológica de entre 15-20 años; con base en la dosis, fuente y tipo de exposición puede dañar varios órganos como el riñón, hígado, pulmón, hueso, testículos y placenta. (Farkas et al., 2007)

El ser humano está expuesto al Cd principalmente a través de la ingesta de alimentos, como las especies marinas llamadas filtradoras (almejas y mejillones) que atrapan cantidades considerables de metales pesados tales como plomo y cadmio (Ololade et al., 2011); también a través de agua contaminada con desechos industriales, sin embargo, la forma más común es a través de la exposición al humo del cigarro ya que se ha reportado que cada cigarrillo contiene entre 1 y 2 µg del metal, mientras que un estudio realizado en México encontró 2.8 µg de Cd por cigarrillo lo que significa un riesgo aún mayor para los fumadores de este país (Storelli, 2009).

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

Se ha demostrado que el cadmio es un poderoso inductor de estrés oxidante, incrementando considerablemente la producción de ERO, estudios *in vivo* demuestran que en pulmones, el cadmio incrementa la oxidación lipídica, determinada por la formación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) e induce la producción de anión superóxido y óxido nítrico, los que se conocen por ser fuertes inductores de apoptosis, mientras que en el hígado y cerebro incrementa la excreción de malondialdehído (MDA) como un producto de la lipoperoxidación (Szuster-Ciesielska et al., 2000); aunque el mecanismo molecular no está totalmente descrito, se ha vinculado al cadmio con la disfunción mitocondrial que conduce a un exceso en la producción de ERO y se sabe que un daño mitocondrial severo perpetua el estrés oxidante (Gobe et al., 2010).

Otro mecanismo que está involucrado en la inducción de ERO por el cadmio es el sistema de NADPH oxidasa, existen evidencias recientes que vinculan la exposición al metal en hepatocitos con un incremento en la actividad de ésta enzima y la consecuente producción de ERO que a su vez, activa vías de señalización como la de Src/EGFR y Stat3 como mecanismo de sobrevivencia (Martinez Flores et al., 2013a).

Al mismo tiempo se ha visto que el cadmio inhibe la actividad de enzimas antioxidantes como SOD1 y GPX y que reduce la cantidad de glutatión en hígado y plasma, además de incrementar la expresión de citosinas pro-inflamatorias tales como interleucinas (1 $\beta$ , 6 y 10) así como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) (El-Boshy et al., 2014).

El humo del cigarro es uno de los factores de mayor riesgo para el desarrollo de aterosclerosis, el componente que contribuye de forma más significativa a la enfermedad cardiovascular. Así en fumadores, se ha encontrado que la concentración de Cd en la sangre es de 1-4  $\mu\text{g/l}$  un valor de 4 a 5 veces más alta que en los no fumadores (Storelli, 2009).

Los efectos de la toxicidad por Cd dependen del tipo de exposición, ya sea a través de la inhalación de aire contaminado, particularmente cerca de fundidoras e incineradoras o del humo del cigarro, consumo de alimentos y agua contaminados. Además la deficiencia de metales esenciales como el Fe, Cu, Zn y Ca en el cuerpo humano facilita la absorción de Cd, por lo tanto sus órganos blanco son el riñón (especialmente en la corteza renal), hígado, pulmón, hueso y placenta. El Cd asimilado, es captado por el hígado donde forma complejos con pequeños péptidos como el glutatión (GSH) (Cd-GSH) o proteínas de bajo peso molecular como la metalotioneína (MT) (Cd-MT) y es secretado en la bilis o bien liberado a la circulación. Estos complejos son una forma importante de transporte y almacenamiento del metal dentro del organismo, explicando así su larga vida biológica entre los 10-30 años (EFSA, 2009).

Dado que se considera que en una segunda agresión el estrés oxidante juega un papel relevante en la progresión del daño hepático y que el Cd es un metal pro-oxidante,

resulta de interés evaluar el efecto de este metal en la susceptibilidad a la progresión del daño hepático que causa la esteatosis.

#### 1.4 El cadmio en esteatosis

No hay muchas investigaciones que reporten directamente una asociación de la esteatosis y la exposición al cadmio y los posibles efectos del metal bajo ésta condición, sin embargo (Yuan et al., 2009b), reporta que la exposición activa o pasiva al humo del cigarro puede ser uno de los estresores que contribuyen a la progresión del daño hepático en el caso de la NAFLD ya que incrementa la acumulación de lípidos en los hepatocitos, modulando la actividad de la AMP cinasa y la SREBP-1, dos moléculas involucradas particularmente en la síntesis de lípidos (figura 3).

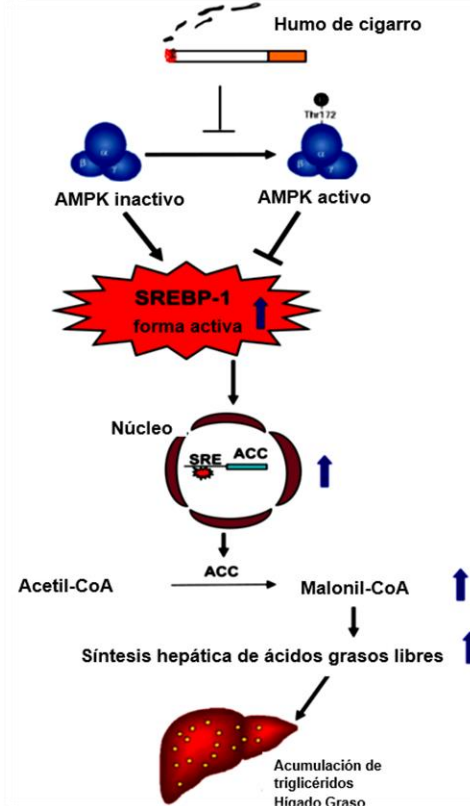


Figura 3 Mecanismo mediante el cual el humo de cigarro induce acumulación de lípidos en el hepatocito.

Las proteínas unidas a elementos reguladores de esteroides (SREBPs) son una familia de factores de transcripción que controlan la expresión de genes requeridos para la biosíntesis de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos. Las tres isoformas de los precursores de SREBP se localizan en la membrana de retículo endoplásmico, y son SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2, tienen diferentes funciones y distribución en los tejidos. Los precursores son activados por un proceso dividido en dos pasos que libera la forma activa que se transloca al núcleo celular para estimular la expresión de genes. Específicamente, SREBP-1c controla la expresión de genes involucrados en la síntesis y acumulación de triglicéridos como la sintetasa de ácidos grasos (FASN) y la acetil-coenzima A carboxilasa (ACC), mientras que la actividad de SREBP-2 se encuentra más relacionada con la expresión de genes involucrados en la síntesis y toma de colesterol como el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR); en el tejido hepático, la forma predominante de SREBPs es SREBP-1c (Yuan et al., 2009a).

El humo del cigarro puede contener más de 47 000 sustancias tóxicas de las que 9 se consideran carcinógenos del grupo 1, entre los que está el Cd (Hughes et al., 2009) se sabe que un cigarrillo puede contener hasta 6.67 µg de Cd (Yuan et al., 2009b), y la exposición al humo del cigarro acelera la progresión de enfermedades hepáticas incluyendo la hepatitis C y a la cirrosis biliar primaria, asimismo en conjunto con la obesidad incrementan el riesgo para desarrollar carcinoma hepatocelular (Bailey et al., 2009).

Mientras, otros estudios en ratas a las que se les administraron 5 mg/kg de CdCl<sub>2</sub> vía intragástrica, diariamente por 4 semanas, reportan un incremento en el peso del hígado así como un aumento plasmático y en tejido de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres y fosfolípidos, también hubo un incremento significativo en la actividad de la enzima HMGCR, un importante intermediario de la ruta de síntesis de colesterol. Además se encontraron cambios significativos en las lipoproteínas, reportando altos niveles plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad y de muy baja densidad (LDL y VLDL) y una disminución igualmente significativa de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Prabu et al., 2010).

Entonces, algunos estudios sugieren que la exposición al cadmio puede alterar el metabolismo lipídico y contribuir al desarrollo de enfermedades, sin embargo, poco se sabe acerca del mecanismo bioquímico y molecular mediante el cual el cadmio ejerce éstos efectos más aún en personas que ya cuentan con alteraciones metabólicas mediadas por la esteatosis. Conocer el mecanismo por el cual el cadmio es capaz de alterar rutas metabólicas importantes contribuyendo a la progresión del daño hepático, nos permitirá especificar blancos moleculares para contrarrestar el daño.

## 2. Antecedentes

Los hepatocitos fisiológicamente no son células almacenadoras de lípidos, por lo que el desarrollo de la esteatosis está asociado con una disfunción celular y apoptosis. En conjunto, este fenómeno se conoce como lipotoxicidad y se considera que juega un papel relevante en la patogénesis del daño hepático (Brown et al., 2013). De hecho, hay reportes que correlacionan la apoptosis con la severidad de la esteatosis en



humanos (Feldstein et al., 2003). Así, la acumulación de grasa en los hepatocitos puede inducir citotoxicidad de manera directa o bien a través de sensibilización a otras agresiones.

Estudios epidemiológicos sugieren que la hipercolesterolemia es un factor de riesgo importante en el daño hepático, mientras que los estudios realizados en roedores y conejos demuestran una asociación directa entre una ingesta alta de colesterol y grasas con la esteatosis y la inflamación (Pendino et al., 2005). Al mismo tiempo, en modelos animales de hígado graso no alcohólico se ha detectado apoptosis de los hepatocitos desde tiempos muy tempranos de ingesta de alimento rico en ácidos grasos insaturados, con un incremento de la proteína pro-apoptótica Bax y una disminución de la anti-apoptótica Bcl-2 (Tipoe et al., 2009).

En nuestro grupo de investigación se ha reportado que una dieta alta en colesterol retrasa la activación de la ruta de señalización mediada por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), lo que representa una deficiencia en el proceso de reparación, que en caso de una agresión continua podría favorecer la progresión del daño hepático (Gutiérrez-Ruiz et al., 2012).

Con respecto al Cd, (Larregle et al., 2008), reportan que ratas tratadas con este metal incrementan significativamente los triglicéridos séricos y el colesterol total (LDL +VLDL), y disminuyen el colesterol esterificado en el hígado, concluyendo que el cadmio favorece la progresión de esteatosis, sin embargo no existen estudios sobre los efectos contrarios, es decir, el impacto de la esteatosis sobre un tratamiento con Cd.

Mientras que en nuestro grupo de investigación se ha reportado que a nivel intracelular, los hepatocitos sometidos a un tratamiento con cadmio presentan alteraciones a nivel mitocondrial y de retículo endoplásmico rugoso, además de incrementar su producción de metalotioneína (MT) (Bucio et al., 1995).

Igualmente, se reportó que el Cd entra al hepatocito en parte por los canales de calcio y que involucra interacciones con grupos tioles (Souza et al., 1996). En células HepG2 se encontró que el cadmio induce la secreción de IL-1, TNF-alfa, IL-6 e IL-8 y la producción de la proteína de choque térmico (HSP) 70. Se demostró la participación de AP-1 en esta respuesta, además del incremento del daño lipoperoxidativo y la reducción en un 65% del glutatión (GSH) por el tratamiento con Cd (Souza et al., 2004).

Los estudios moleculares reportan que el patrón de señalización involucrado en la respuesta celular protectora al Cd es mediante la inducción de la actividad de la NADPH oxidasa con la consecuente producción de ERO, que permiten la activación de ERK, la cual promueve la fosforilación de STAT-3 suscitando la producción de HSP-70 (Souza et al., 2009).

Con base en la literatura revisada, se muestra que el estrés oxidante ha sido reconocido como el componente clave responsable de la progresión en el caso de la esteatosis, y los mecanismos que promueven su avance involucran múltiples adaptaciones celulares al estrés oxidante que ocurren cuando el metabolismo de los ácidos grasos está perturbado.

### 3. Justificación

En la actualidad, la población mexicana tanto adulta como infantil presenta una prevalencia muy alta de sobrepeso y obesidad. Declaraciones de la Secretaría de Salud señalan que en menos de una década el sobrepeso infantil ha crecido en más de 77 %; mientras que la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición señala que 47.9 millones de mexicanos sufren sobrepeso y obesidad, y cerca de un 43 % presenta algún desorden en el metabolismo de lípidos como hipercolesterolemia, o hipertrigliceridemia, y sólo un 6 % lo sabe mediante un diagnóstico médico.

Varios estudios han demostrado que el mexicano tiene una predisposición genética al síndrome metabólico, y que en su dieta, el consumo de grasas es superior al valor recomendado, (Stern and Haffner, 1991; Tellez-Avila et al., 2008) lo cual nos lleva a concluir que una proporción muy alta de la población mexicana padece o tiende a desarrollar hígado graso, considerando ésta condición como un precursor de enfermedades hepáticas más severas, las cuales son una de las principales causas de mortalidad en nuestro país.

Al mismo tiempo, la contaminación de mantos freáticos con Cd es cada vez más frecuente, además de que el metal está muy presente en la industria de plásticos, baterías, pinturas e incluso recientemente se ha visto involucrado en los cosméticos (Bocca et al., 2014; Moulis and Thevenod, 2010). En el mismo sentido, se sabe que el inicio del consumo de tabaco se presenta en edades cada vez más tempranas, y que más del 40% de los niños tienen al menos un progenitor que fuma (Yuan et al., 2009a).

Si bien, las leyes contra el humo protegen la salud de los no fumadores, no existe un nivel seguro de exposición al humo de tabaco (OMS, 2013).

Considerando que la esteatosis puede sensibilizar al hígado para una siguiente agresión, y que los mecanismos de reparación del órgano se ven alterados, las enfermedades hepáticas crónicas se incrementarán.

La caracterización de la susceptibilidad al daño hepático debida a la presencia de lípidos y de Cd, nos permitirá conocer los mecanismos involucrados en la inducción del daño celular y así contar con posibles blancos moleculares para evitar su aumento.

#### **4. Pregunta de Investigación**

¿Cómo altera el cadmio la respuesta de sobrevivencia de hepatocitos con esteatosis en cultivo primario?

#### **5. Hipótesis**

El incremento en el daño hepatocelular se verá promovido por un tratamiento con Cd, ante la sensibilización celular provocada por la esteatosis.

#### **6. Objetivos**

##### **6.1 Objetivo General**

Determinar el mecanismo de respuesta celular, en un modelo *in vitro* de esteatosis tratado con Cd.

## 6.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto del Cd sobre el estado oxidante en un modelo *in vitro* de esteatosis.
- Evaluar el contenido de enzimas antioxidantes, mediante la expresión de las enzimas SOD1, GPX, Y-GCS y HSP70 en un modelo *in vitro* de esteatosis tratado con cadmio.
- Determinar el efecto del Cd en el incremento de lípidos y en la expresión de enzimas lipogénicas como FASN y ACC en cultivo primario de hepatocitos de ratones con una dieta alta en colesterol.

## 7. Materiales y Métodos

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

### 7.1 Tratamiento de los animales.

Se utilizaron ratones de 8 a 12 semanas sometidos a un ayuno por 12 h y posteriormente alimentados con una dieta hipercolesterolémica (HC, 2 % colesterol y 0.5 % colato de sodio, Dyets) o con una dieta balanceada CW, estándar para roedores (sin colesterol, Harland), ambas por 48 h.

## 7.2 Obtención de cultivo primario de hepatocitos de ratón.

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

Las células viables se sembraron en una densidad de 254,000 células/cm<sup>2</sup> para cada ensayo y se mantuvieron en incubación por 4 h a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de que los hepatocitos se adhirieron al plato de cultivo se les cambió el medio de adhesión por Medio Williams con antibiótico y antimicótico, sin suero bovino fetal (SBF), en el que permanecieron durante 12 h antes de poner los tratamientos.

## 7.3 Diseño experimental.

El cultivo de hepatocitos se trató con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (0.1, 0.5, 1, 2.5 y 5 µM) durante 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 y 24 h. Las células control sin CdCl<sub>2</sub> se sembraron al mismo tiempo.

Inicialmente se realizó la determinación de lípidos neutros por incorporación de Aceite Rojo O con la finalidad de validar la presencia de esteatosis en el modelo.

Después de los tratamientos con CdCl<sub>2</sub>, las células se sometieron a un ensayo de viabilidad utilizando el Cell Counting Kit 8 (CCK8) (Dojindo), para determinar el efecto de las distintas concentraciones y tiempo de exposición al CdCl<sub>2</sub>.

Posteriormente, los cultivos se tiñeron con Cristal Violeta para denotar los cambios morfológicos producidos por un tratamiento con CdCl<sub>2</sub> a diferentes tiempos.

A continuación, para evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las células, se utilizó el método fluorométrico con 2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma Aldrich) (Martinez Flores et al., 2013a).

Siguiendo con la caracterización del estado oxidante celular, se determinaron las proteínas oxidadas presentes en las células tratadas con CdCl<sub>2</sub> en función del tiempo mediante un ensayo del estado de oxidación de proteínas (Oxyblot).

Nuevamente, se utilizó la técnica de determinación de triglicéridos por incorporación de aceite rojo O pero ésta vez para definir el efecto del tratamiento con CdCl<sub>2</sub> en función del tiempo.

Finalmente, se obtuvieron lisados de los cultivos para determinar la expresión de las proteínas involucradas en el equilibrio del estado redox tales como GPX, SOD-1, Y-GCS y HSP70 y también las involucradas en la síntesis de lípidos como FASN, ACC y SREBP-1c todas ellas se analizaron mediante Western blot.

#### 7.4 Determinación de lípidos neutros por la incorporación de aceite rojo O.

Se obtuvo el cultivo primario de hepatocitos, el cual se estabilizó y posteriormente se le retiró el medio y se lavaron con buffer de fosfatos (PBS).

Para fijar las células se agregaron 0.4 ml de para-formaldehído (PFA) al 2.5 % en PBS a cada plato de cultivo durante 15 min, se lavaron nuevamente con PBS y se dejaron secar toda la noche. Al día siguiente, se tiñeron con 0.4 ml de Aceite Rojo O al 0.2 % en isopropanol durante 1 h, y se lavaron rápidamente con isopropanol al 60 % en H<sub>2</sub>O desionizada para retirar el exceso de colorante, para el contraste se tiñeron los

núcleos con hematoxilina de Harris durante 30 s. Se observaron al microscopio de luz y se tomaron las fotografías el mismo día de la tinción.

#### 7.5 Ensayo de viabilidad celular por Cell Counting Kit 8 (CCK8).

Para éste ensayo se sembraron los hepatocitos en placas de 96 pozos tratadas para cultivo celular y estériles.

Después de los tratamientos con 1  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  durante 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 y 24 h, se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de la solución CCK8 en cada pozo y se incubaron con el reactivo por 1.5 h. Posteriormente, la placa se leyó a una longitud de onda de 450 nm en un detector multimodal de microplacas DTX 880 Beckman.

#### 7.6 Análisis de la morfología con cristal violeta

Para examinar la morfología se tomaron las células utilizadas en el ensayo de viabilidad sembradas en placas de 96 pozos, a las que se les retiró el reactivo anterior y se lavaron con PBS.

Las células se fijaron con 500  $\mu\text{l}$  de metanol absoluto frío por pozo durante 15 min y se dejaron secar toda la noche, posteriormente se tiñeron con una solución de Cristal Violeta al 0.5 % por 10 min y se lavaron varias veces con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada para retirar el exceso de colorante. Se observaron al microscopio de luz y se describieron las diferencias de forma general, como núcleos, citoplasmas y uniones entre células entre las no tratadas y las expuestas a cadmio por diferentes tiempos. Las fotografías se el mismo día de la tinción.



### 7.7 Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno.

Para éste ensayo, se sembraron hepatocitos en placas de 96 pozos oscuras, estériles y especiales para fluorescencia.

Después de los tratamientos con 1  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  durante 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 y 24 h, las células se incubaron con 5  $\mu\text{M}$  DCFH-DA en etanol durante 30 min, y se utilizó como control positivo para la técnica 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Al finalizar el tiempo de incubación la placa se leyó a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm usando un detector multimodal de microplacas DTX 880.

### 7.8 Determinación de proteínas oxidadas por Oxyblot.

Con los lisados obtenidos de los hepatocitos de ambas dietas sometidos a los tratamientos con 1  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a diferentes tiempos, se realizó un Oxyblot utilizando el OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante para la preparación de muestras, y realizando la electroforesis de las mismas en un gel de acrilamida al 10 % siguiendo el mismo procedimiento para un Western blot, como lo describe (Valdes-Arzate et al., 2009).

### 7.9 Determinación de lípidos por incorporación de aceite rojo O.

Los hepatocitos se sembraron en una placa de 12 pozos y después de la estabilización del cultivo se colocaron los tratamientos de 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durante diferentes tiempos, al terminar el tratamiento, se retiró el medio y las células se lavaron PBS.

Para fijar las células se agregaron 0.4 ml de PFA al 2.5 % en PBS por pozo durante 15 min., se lavaron con PBS dejándolas secar toda la noche. Después se tiñeron con

0.4 ml de aceite rojo O al 0.2 % en isopropanol durante 1 h, y se lavaron rápidamente con isopropanol al 60 % en H<sub>2</sub>O desionizada para retirar el exceso, se tiñeron los núcleos con hematoxilina de Harris durante 30 s. Se observaron al microscopio de luz y se tomaron las fotografías el mismo día de la tinción.

#### 7.10 Extracción de proteína total.

Para la técnica de Western blot, a un millón de hepatocitos HC y CW con y sin 1  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>, se les agregaron 70  $\mu$ l de un amortiguador de lisis, formado por Tris-Base 20  $\mu$ M, Cloruro de Sodio 150  $\mu$ M, Igepal al 1%, esta solución a pH 8. Se agrega una pastilla de inhibidor de proteasas (Complete, Roche) por cada 100 ml de solución de lisis. Por cada lisis se agrega inhibidor de fosfatasas P-Stop (Roche) 1 X de un stock 10 X (una pastilla disuelta en 1 ml de agua destilada). Los hepatocitos con el amortiguador se dejaron 15 min a 4 °C en agitación, después se rasparon con un gendarme y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 7 min a 4° C. El sobrenadante conteniendo la proteína celular se alícuotó y almacenó a -80° C. De una de las alícuotas se cuantificó la concentración de proteína con el kit de ácido bicinonínico (BCA, Pierce Biotechnology, USA).

#### 7.11 Determinación de proteína total.

Esta determinación se realizó con el estuche comercial del ácido bicinonínico (BCA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se tomó una alícuota de 5  $\mu$ l de las muestras y se agregaron 200  $\mu$ l de reactivo BCA diluido 1:50 en CuSO<sub>4</sub>, al mismo tiempo se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina de 0.1-10  $\mu$ g/ml, todo se incubó por 10 min a 95° C.

Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (DTX880, Beckman Coulter) y se determinó la concentración de la proteína utilizando la curva estándar de albúmina.

#### 7.12 Análisis del contenido de proteína por Western blot.

El ensayo de Western blot se realizó de acuerdo con el método descrito por (Valdes-Arzate et al., 2009). Se tomaron 50 µg de la proteína total y se les agregó un amortiguador de muestra comercial Laemmli Sample Buffer 2X (Bio-Rad).

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

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

**Tabla 1. Anticuerpos primarios**

<b>Nombre</b>	<b>Marca</b>	<b>Catálogo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Secundario</b>
<b>GPX</b>	Sta. Cruz	sc-133160	1:200	Ratón
<b>SOD-1</b>	Sta. Cruz	sc-11407	1:200	Conejo
<b>Y-GCS</b>	Sta. Cruz	sc-22755	1:200	Conejo
<b>HSP70</b>	Sta. Cruz	sc-1060	1:200	Cabra
<b>SREBP-1c</b>	Sta. Cruz	sc-366	1:200	Conejo
<b>FASN</b>	Cell Siganling	3189	1:1000	Conejo
<b>ACC</b>	Cell Siganling	3662	1:1000	Conejo

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

#### 7.13 Análisis Estadístico.

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

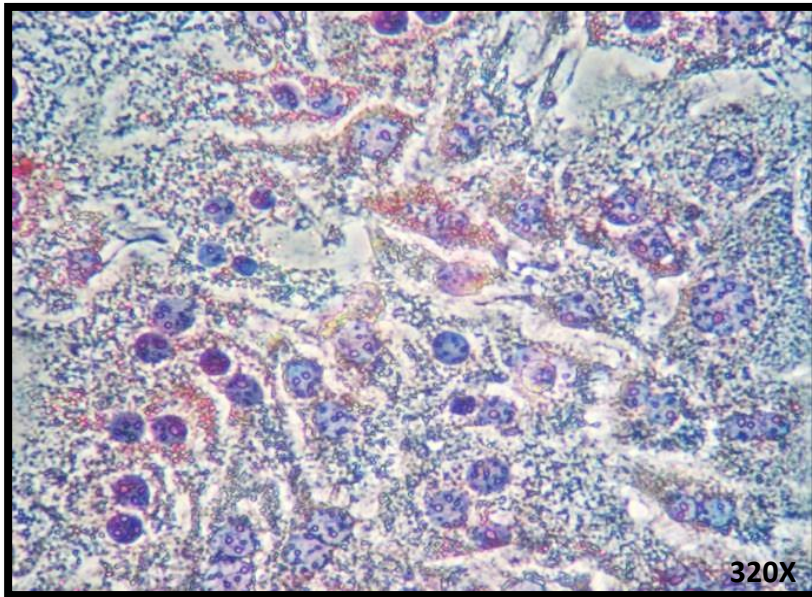
## 8. Resultados

### 8.1 Confirmación del modelo de esteatosis

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

En la figura 4, se observa la tinción con aceite rojo O en los hepatocitos aislados de ratones alimentados con la dieta CW o HC durante 48 h.

La diferencia en el contenido de lípidos es evidente, mientras que los hepatocitos CW (Fig 1A) muestran cantidades basales de lípidos, los hepatocitos HC (Fig 1B) incrementan considerablemente sus lípidos, teniendo como consecuencia una acumulación de éstos que tiende a incrementar el tamaño de las células.



(A)

(B)

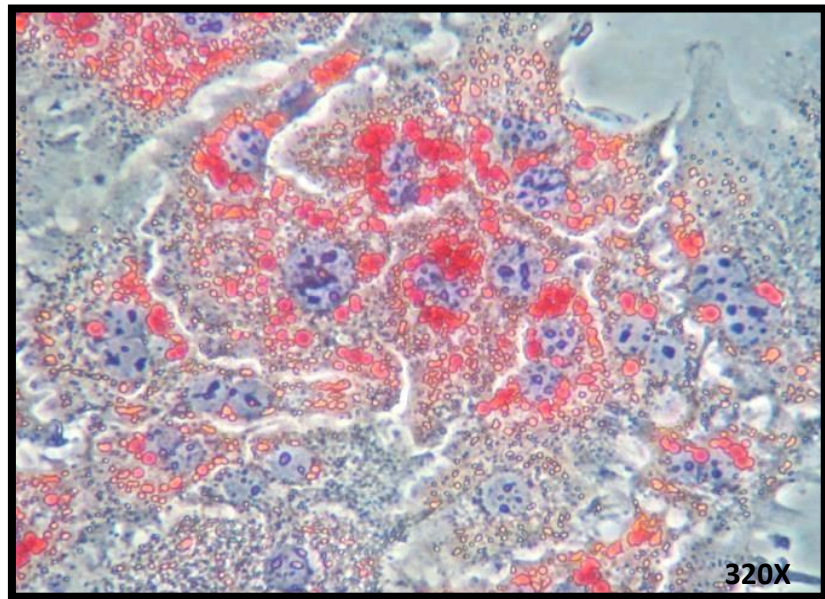


Figura 4 **Contenido de lípidos en hepatocitos CW y HC.** Se distinguen claramente las diferencias en el contenido de lípidos entre los hepatocitos de una dieta balanceada (CW) **(A)** y los de una dieta alta en colesterol (HC), los cuales incluso son más grandes **(B)**. Las fotografías representativas fueron tomadas con un microscopio con contraste de fases.

## 8.2 Viabilidad celular de hepatocitos CW y HC tratados con Cadmio

Con la finalidad de elegir la concentración de  $\text{CdCl}_2$  que se utilizaría en los experimentos posteriores, los hepatocitos de ambas dietas se trataron con las siguientes concentraciones: 0.1, 0.5, 1, 2.5 y 5  $\mu\text{M}$  durante 6 h.

Una vez elegida la concentración de  $\text{CdCl}_2$ , los hepatocitos se expusieron por diferentes tiempos 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 y 24 h y para ambos experimentos se midió la viabilidad utilizando el kit comercial CCK8. Este kit utiliza una sal de tetrazolio altamente soluble en agua WST-8® [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt], por lo que no induce citotoxicidad ni interfiere con ensayos posteriores como alguno de proliferación o los colorimétricos en las mismas células. La WST-8 es reducida por las deshidrogenasas de células vivas en presencia de un mediador de electrones, produciendo un compuesto de tonalidad naranja (formazan) también soluble. La cantidad de pigmento formazan generado es directamente proporcional a la cantidad de células vivas.

En la figura 5, se muestra la viabilidad celular en función de la concentración de  $\text{CdCl}_2$ , y se graficó como el porcentaje de hepatocitos vivos con dieta CW o HC tratados con  $\text{CdCl}_2$  con respecto a los hepatocitos con dieta CW no tratados (NT).

Se observa que en los hepatocitos no tratados que tienen la dieta HC, disminuyen significativamente la viabilidad hasta un 36.2 % con respecto a los hepatocitos CW no tratados (NT). Cuando los hepatocitos con dieta CW son expuestos al Cd, se observa que la viabilidad disminuye significativamente de manera dependiente de la concentración. En los ratones con la dieta HC y tratados con Cd, la viabilidad disminuye

con respecto a los ratones CW no tratados y a partir de 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  es significativamente diferente con respecto a los ratones HC no tratados, por lo que elegimos esta concentración de Cd para los experimentos posteriores.

En la figura 6, se muestra la viabilidad celular con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por diferentes tiempos de exposición y se observa de igual forma, que en los hepatocitos que tiene sólo la dieta HC, disminuye significativamente la viabilidad con respecto a los hepatocitos CW no tratados. Cuando los hepatocitos con dieta CW son expuestos con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  se observa que la viabilidad disminuye significativamente de manera dependiente del tiempo de exposición. En los ratones con la dieta HC y tratados con Cd, la viabilidad disminuye con respecto a los ratones CW no tratados y a partir de las 4 a las 24 h es significativamente diferente con respecto a los ratones HC no tratados.



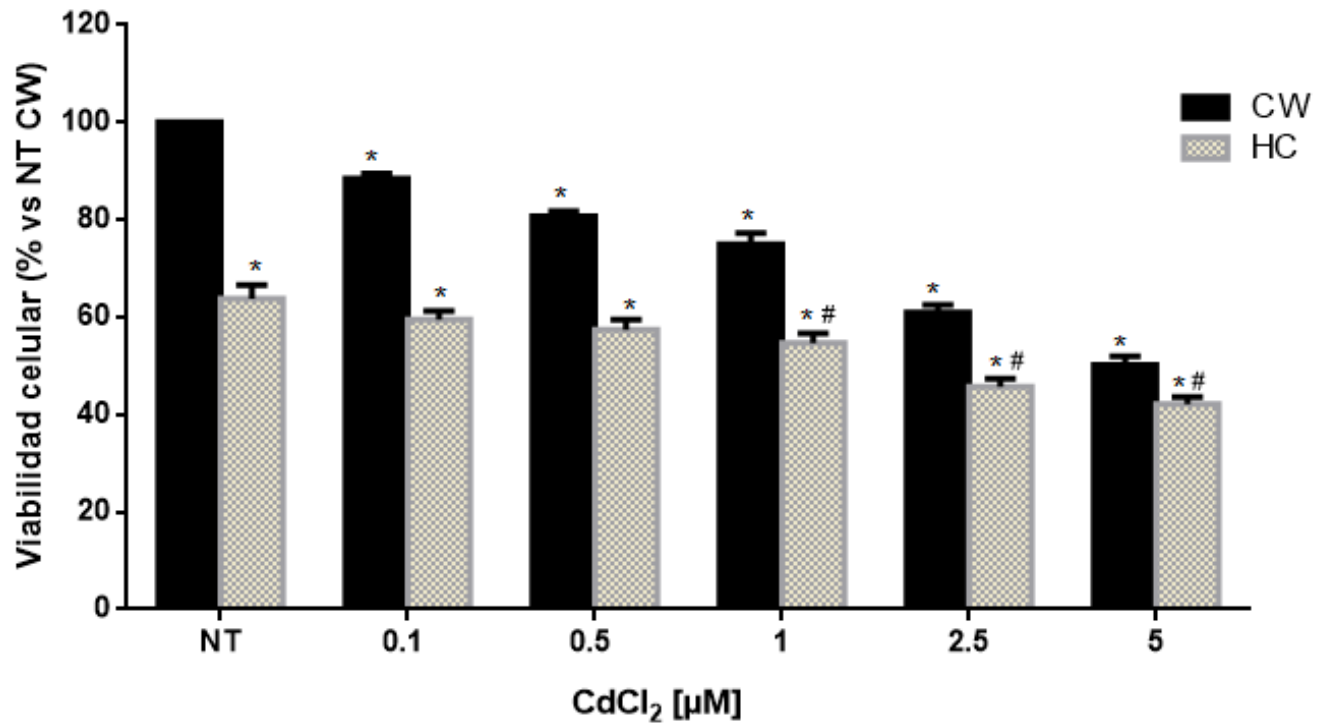


Figura 5 **Viabilidad celular.** Los hepatocitos fueron tratados con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 μM) durante 6 h. La viabilidad se determinó con el kit CCK8. Cada barra expresa el valor promedio ± error estándar de tres experimentos independientes (n=3). \* p<0.05 con respecto a los hepatocitos con dieta CW no tratados (NT). # p<0.05 con respecto a los hepatocitos con dieta HC no tratados (NT).

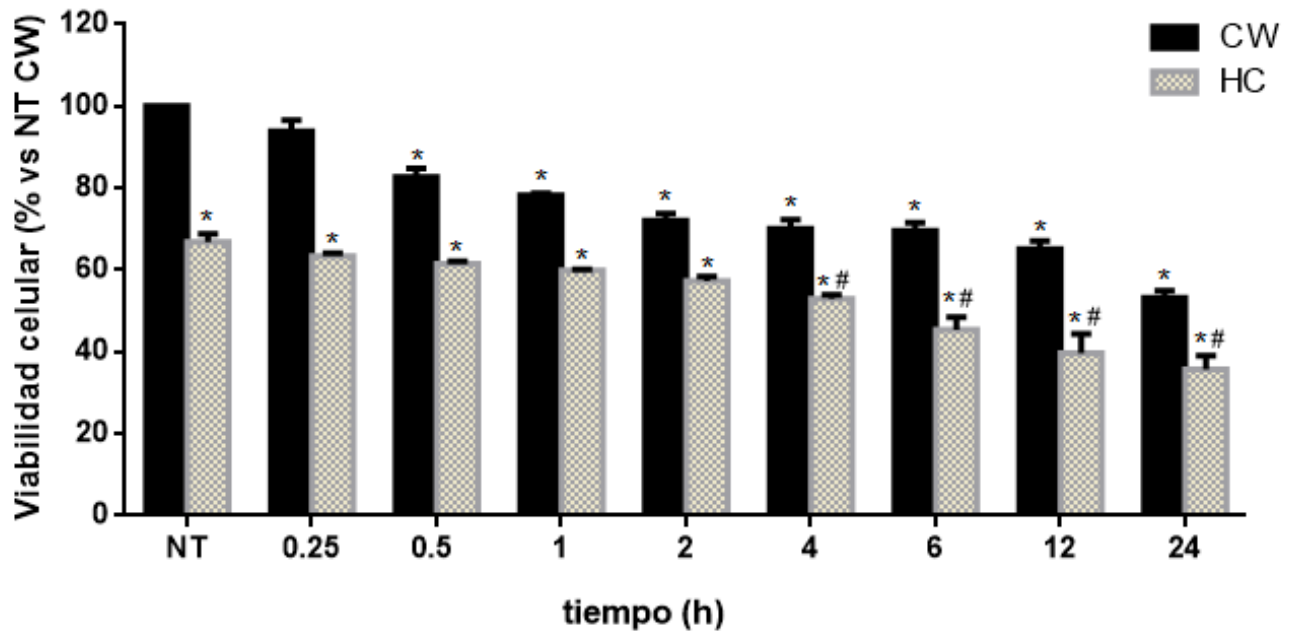


Figura 6 **Viabilidad celular.** Los hepatocitos fueron tratados por diferentes tiempos 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 y 24 h con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . La viabilidad se determinó con el kit CCK8. Cada barra expresa el valor promedio  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes (n=3). \* p<0.05 con respecto a los hepatocitos con dieta CW no tratados (NT). # p<0.05 con respecto a los hepatocitos con dieta HC no tratados (NT).

### 8.3 Análisis de la morfología celular de hepatocitos CW y HC tratados con Cadmio

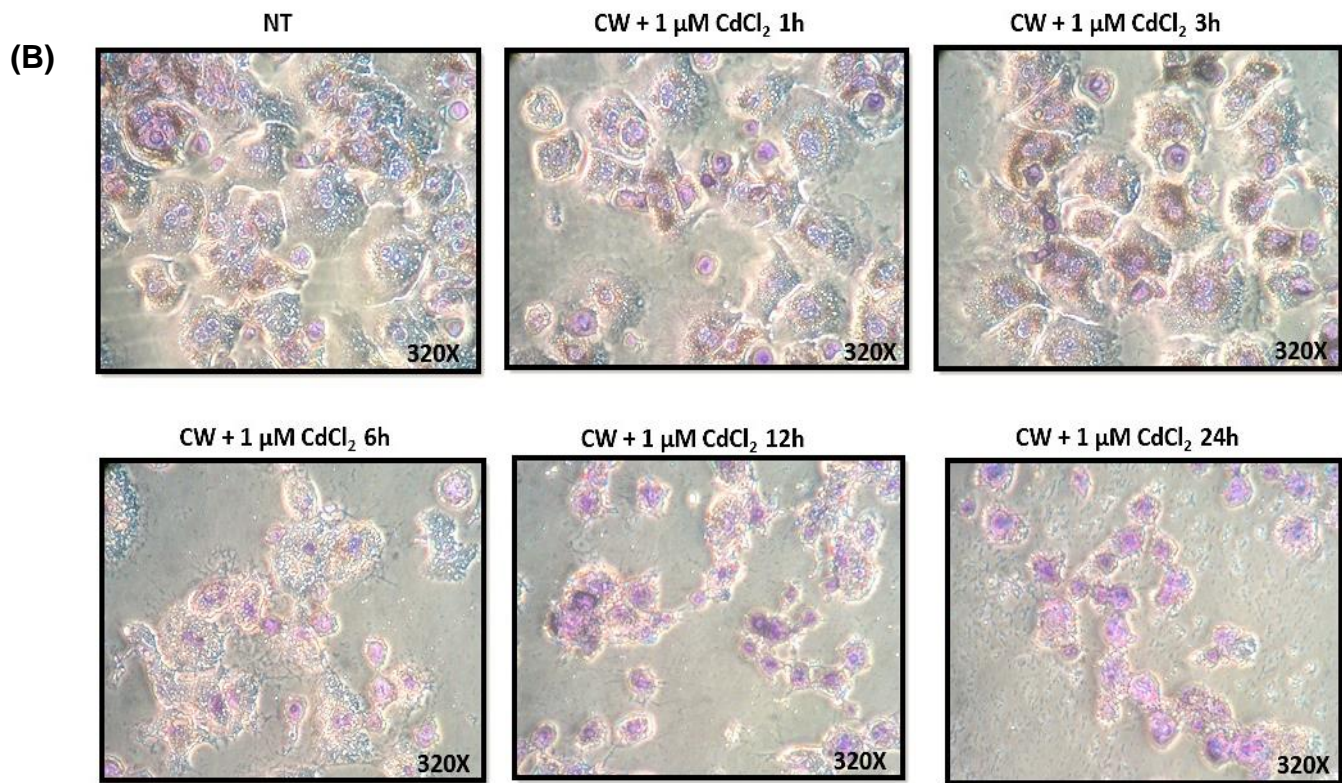
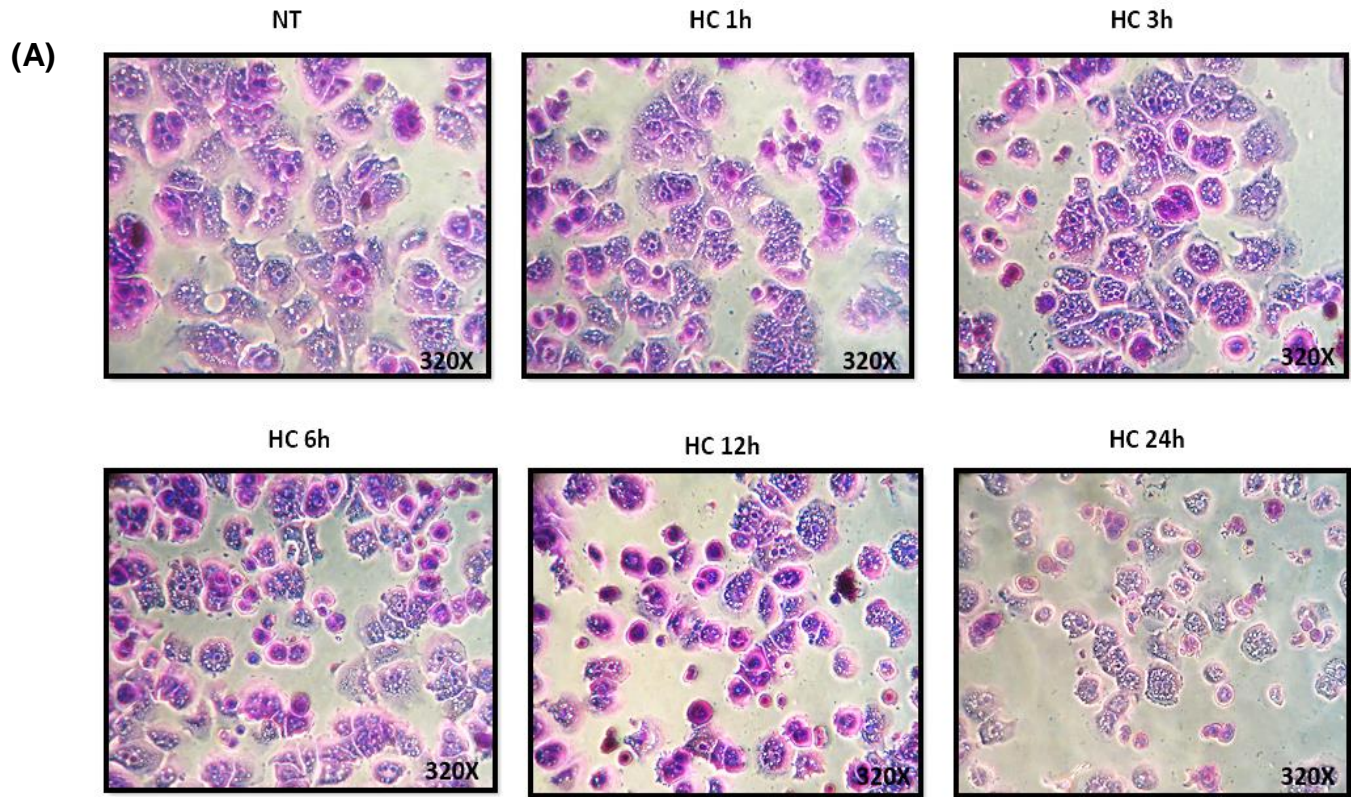
Con la finalidad de evaluar el impacto del tratamiento con  $\text{CdCl}_2$  en la morfología celular, las mismas células en las que se evaluó la viabilidad con respecto al tiempo se tiñeron con cristal violeta que es una molécula cargada positivamente (catión), capaz de combinarse fuertemente con los constituyentes celulares cargados negativamente como ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos de las células vivas.

En la figura 7 se muestra los cambios morfológicos en los hepatocitos sólo con la dieta HC, hepatocitos con la dieta CW o HC tratados con Cd por diferentes tiempos de exposición: 1, 3, 6, 12 y 24 h.

Se observa que sólo la dieta HC (fig 7A), induce cambios morfológicos a través del tiempo, siendo más relevante en los tiempos más largos de 12 y 24 h, donde se presenta una contracción celular y una disminución en las uniones entre células, así como un incremento en la condensación de núcleos y muerte celular. En los hepatocitos con dieta CW y tratados (fig 7B), se observa que el cadmio afecta notablemente la morfología celular desde las 3 h. A las 24 h, se aprecian células que han perdido la forma poliédrica, característica de éste tipo celular, así como sus uniones con las células vecinas y hay presencia de restos celulares en el medio y condensación nuclear.

Por otra parte, al combinar la dieta HC con el Cd (fig 7C), se perciben cambios en la morfología celular, desde las 6 h. A las 24 h, hay pérdida de la definición de la estructura celular, las células se contraen y nuevamente se pierden las uniones

celulares y los citoplasmas tienden a ser más alargados como característica de tendencia a la apoptosis.





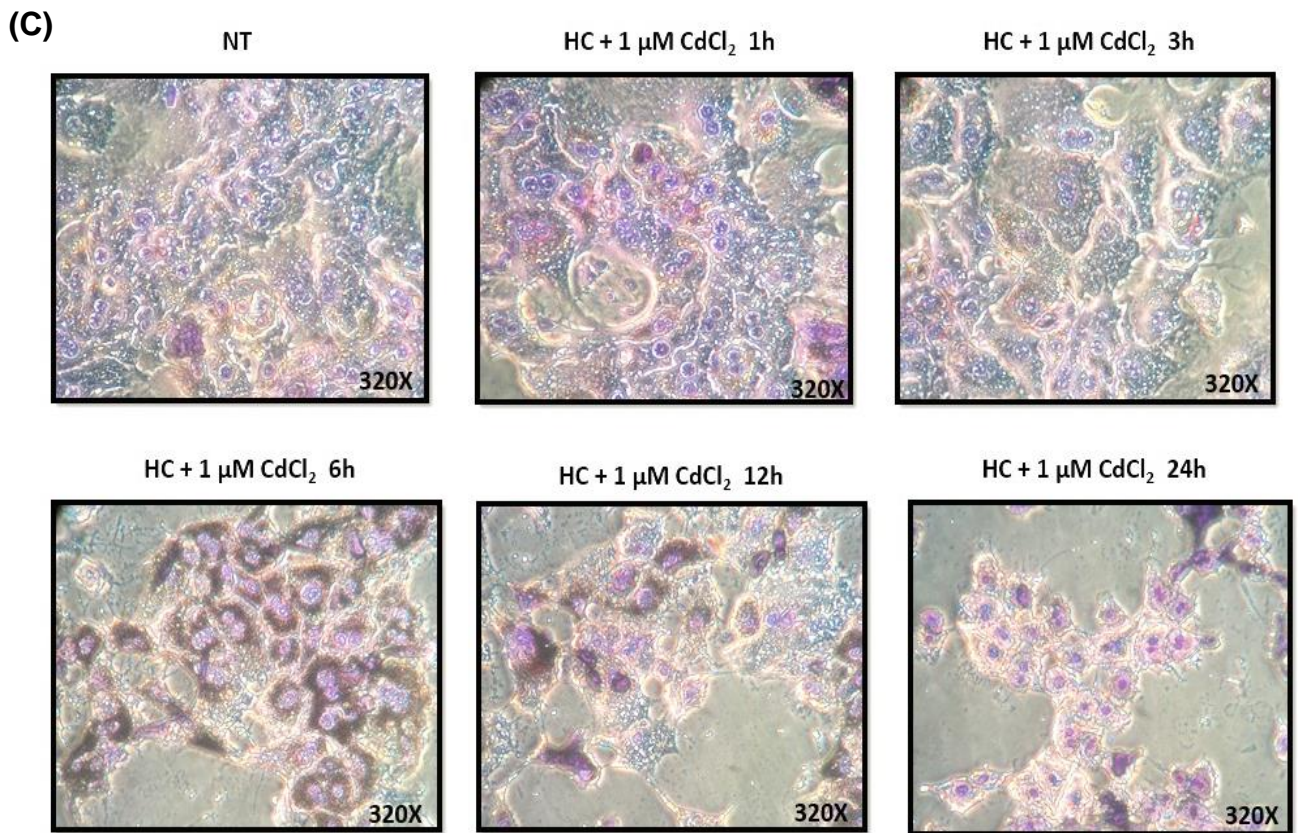


Figura 7 **Morfología de las células CW y HC con y sin CdCl<sub>2</sub>.** Se aprecian los cambios en cultivo primario de hepatocitos CW y HC con 1  $\mu\text{M}$  de CdCl<sub>2</sub> por diferentes tiempos. **(A)** Hepatocitos sólo con dieta HC. **(B)** Hepatocitos CW + CdCl<sub>2</sub>. **(C)** Hepatocitos HC + CdCl<sub>2</sub>. CW o HC no tratados (NT). Las imágenes representativas de cada experimento fueron tomadas con un microscopio de contraste de fase a un aumento de 320X.

#### 8.4 Determinación de generación de ERO

Se sabe que la presencia de Cd involucra un desequilibrio del estado redox celular y una sobreproducción de ERO, con la finalidad de evaluar este proceso, los hepatocitos con la dieta CW o HC, se trataron con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durante diferentes tiempos (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 y 24 h).

La formación intracelular de peróxidos se midió utilizando el 2', 7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) compuesto que es fácilmente transportado a través de la membrana plasmática hacia el interior celular, una vez allí, las esterasas intracelulares remueven los grupos acetato convirtiéndolo en 2',7'-diclorofluorescina, ésta reacción encierra al compuesto dentro de la célula donde puede reaccionar con los peróxidos intracelulares para formar 2',7'-diclorofluoresceína un compuesto fluorescente que puede medirse espectrofotométricamente, la fluorescencia registrada es directamente proporcional a la cantidad de peróxidos intracelulares.

En la figura 8, se muestra la generación de ERO en hepatocitos CW y HC tratados con Cd con respecto a los CW o HC no tratados. Se observa que en los hepatocitos con la dieta HC, se incrementa la producción de ERO hasta por 6 veces con respecto a los hepatocitos con la dieta CW no tratados. Cuando los hepatocitos con dieta CW son expuestos con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , se observa que el cadmio induce la producción de ERO con respecto al tiempo, aunque el pico más alto de producción se presentó a las 0.25 h con respecto a los hepatocitos CW no tratados. Después se observa una disminución significativa en la producción de ERO. En los ratones con la dieta HC y tratados con Cd, se observa que el cadmio es capaz de potenciar la producción de ERO con un aumento significativo a las 0.25 h, donde se presentó un pico máximo con

respecto a los hepatocitos CW o HC no tratados. Después se observa una ligera disminución en la producción de ERO pero significativa. Como control positivo de la técnica se utilizó 250  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



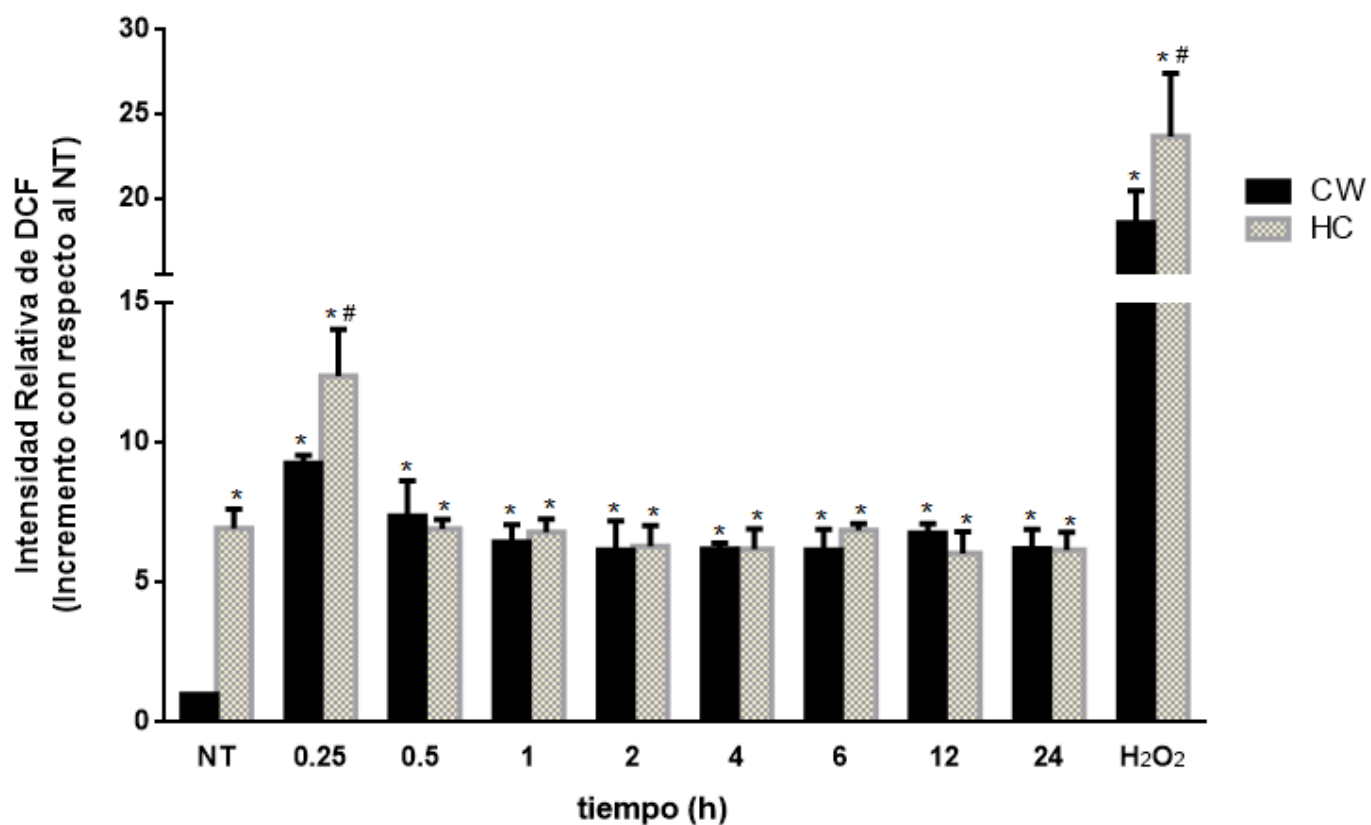


Figura 8 **Generación de ERO en hepatocitos CW y HC tratados con Cd.** Los hepatocitos fueron tratados por diferentes tiempos 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 y 24 h con 1  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>. La intensidad de fluorescencia fue detectada en un Multimode Detector. Cada barra expresa el valor promedio  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes (n=3). \* p<0.05 con respecto a los hepatocitos con dieta CW no tratados (NT). # p<0.05 con respecto a los hepatocitos con dieta HC no tratados (NT).

## 8.5 Análisis del contenido de proteínas oxidadas

Una vez demostrado que el cadmio incrementa la producción de ERO en los hepatocitos con la dieta CW o HC, el siguiente paso fue estudiar si los peróxidos o los radicales libres inducidos por el cadmio son capaces de inducir daño celular a través de la modificación de proteínas.

Para evaluar éste proceso, se determinó la presencia de proteínas oxidadas mediante un Oxyblot a través de un estuche comercial (Millipore Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El principio para la detección de proteínas oxidadas se basa en que cuando un radical libre oxida una proteína, ésta expone los grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) de las cadenas laterales en sitios muy específicos, éstos grupos se derivatizan (se producen derivados) con 2, 4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona) por una reacción con 2, 4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) que se incluye en el kit. Una vez que las muestras sufren ésta modificación se separan en un gel de poliacrilamida mediante electroforesis, seguida de un Western Blot. Finalmente se incuban con los anticuerpos específicos que reconocen la fracción DNP de las proteínas y se revela el resultado.

En la figura 9, se muestra los niveles de oxidación de proteínas en los hepatocitos con la dieta CW o HC expuestos a Cd con respecto a los CW o HC no tratados. Se observa que en los hepatocitos sólo con la dieta HC, hay un incrementando en la oxidación de proteínas, con respecto a los hepatocitos con la dieta CW no tratados. Cuando los hepatocitos con dieta CW son expuestos con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , se observa que el cadmio incrementa la oxidación de proteínas con respecto al tiempo de exposición. Se

encontró mayor daño a las 12 y 24 h, lo que corresponde con los resultados de la viabilidad y la morfología celular. En los ratones con la dieta HC y tratados con Cd, se aprecia un incremento en la oxidación de proteínas con respecto a los hepatocitos CW no tratados, sin embargo, se observa que el cadmio es capaz de potenciar esta oxidación en los tiempos más largos de 12 y 24 h con respecto a los hepatocitos HC no tratados.

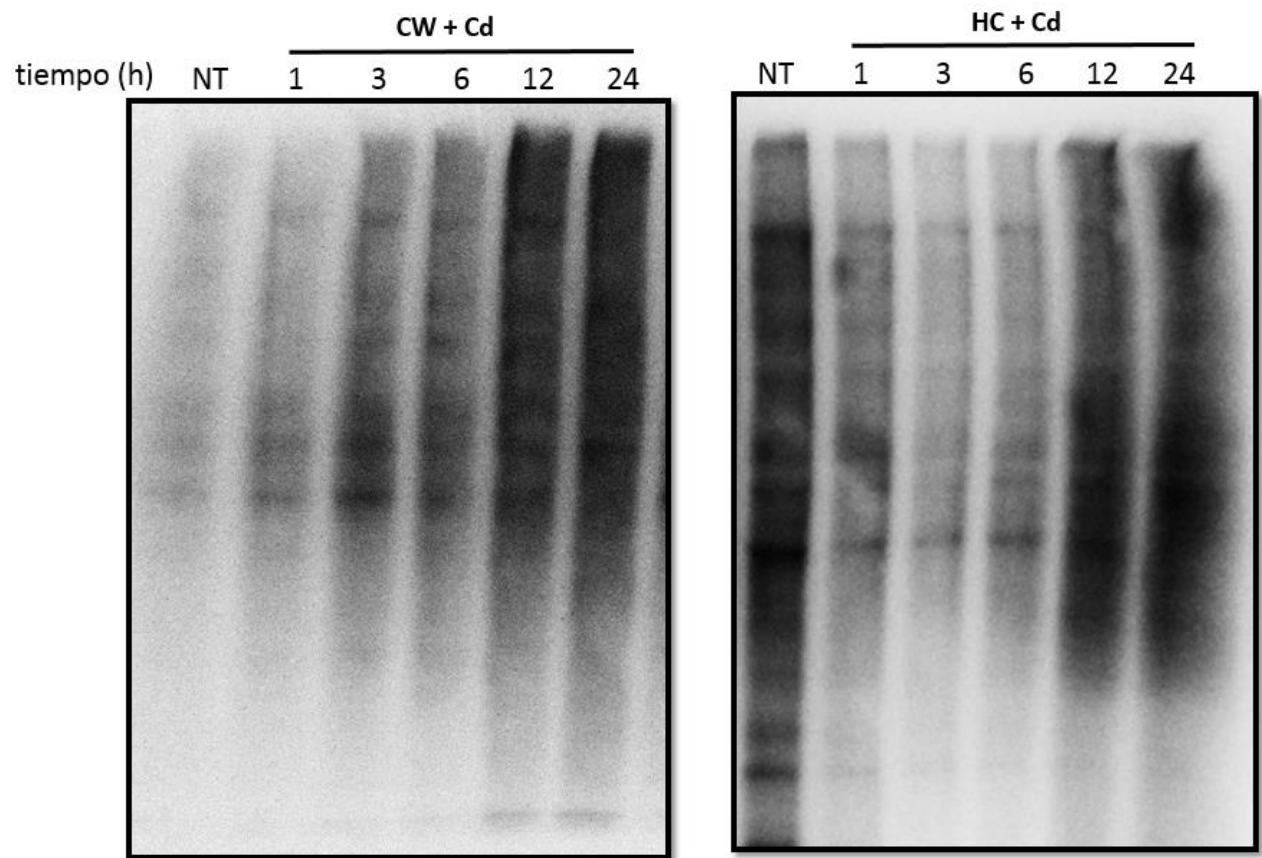


Figura 9 **Niveles de oxidación de proteínas.** Los hepatocitos de las dietas CW y HC se trataron con  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durante diferentes tiempos. Las proteínas de los lisados se derivatizaron con DNPH y se sometieron a Western Blot usando anticuerpos específicos contra DNP. Hepatocitos con dieta CW o con dieta HC no tratados (NT).

## 8.6 Contenido de enzimas antioxidantes

Con los resultados anteriores, observamos que el cadmio es capaz de modificar el estado redox de la célula, incrementando la producción de ERO y dañando las proteínas promoviendo su oxidación.

Por lo que ahora evaluamos cuál es la respuesta que desencadena el hepatocito ante ésta agresión oxidante y uno de los métodos más sencillos para éste fin es la determinación de la expresión de proteínas clave de la maquinaria antioxidante mediante Western blot.

El Western blot se basa en la separación de las macromoléculas, contenidas en los lisados obtenidos de las células después de cada tratamiento, en función de su peso molecular mediante geles de electroforesis, después se transfieren a una segunda matriz una membrana de nitrocelulosa o de polivinil difloruro (PVDF). Posteriormente, la membrana se bloquea para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo que se utilice. La membrana se incuba con el anticuerpo específico marcado con una enzima y finalmente, se añade un sustrato apropiado para la enzima generando un producto detectable como, un precipitado cromogénico o fluorogénico. La membrana se se trata con el kit Super-Signal West Pico Substrate (Pierce Biotechnology, USA) durante 5 min y se determina su densitometría en un Imaging System Gel Logic 1500 (Kodak).

La especificidad de la unión antígeno–anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de la mezcla compleja de varias proteínas.

### 8.6.1 Efecto del cadmio en la expresión de SOD-1

En la figura 10, se observa que en los hepatocitos con la dieta HC, se incrementa la expresión de la SOD-1 con respecto a los hepatocitos con la dieta CW no tratados. Cuando los hepatocitos con la dieta CW son expuestos con 1  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>, se observa que el cadmio disminuye significativamente la expresión de SOD-1 a partir de las 6 y hasta las 24h con respecto a los hepatocitos CW no tratados. En los ratones con la dieta HC y tratados con Cd, se aprecia una disminución significativa en la expresión de la SOD-1 a partir de las 12 h, siendo más relevante a las 24 h con respecto a los hepatocitos CW o HC no tratados, sugiriendo una contribución de ésta disminución de SOD-1 en el incremento de proteínas oxidadas y el daño celular observado en los tiempos largos de tratamiento con Cd.

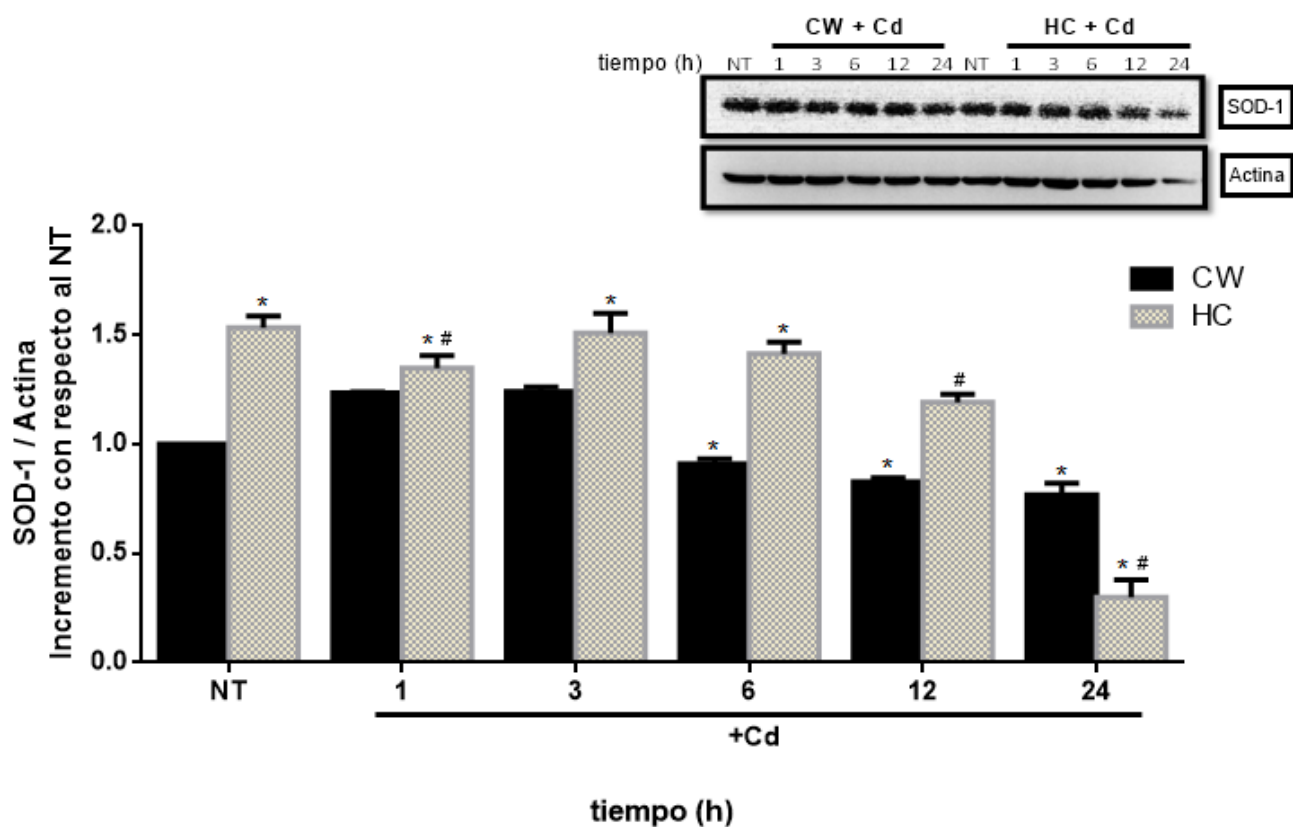


Figura 10 Expresión de SOD-1 en hepatocitos tratados con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . Las células se trataron con cadmio por diferentes tiempos y se evaluó la expresión mediante Western Blot con el anticuerpo específico para SOD-1. Cada barra expresa el valor promedio  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes ( $n=3$ ). \*  $p<0.05$  con respecto a los hepatocitos con dieta CW no tratados (NT). #  $p<0.05$  con respecto a los hepatocitos con dieta HC no tratados (NT).

### 8.6.2 Efecto del cadmio en la expresión de GPX 1/2

En la figura 11, se observa que en los hepatocitos con la dieta HC, se incrementa la expresión de la GPX 1/2 con respecto a los hepatocitos con la dieta CW no tratados. Cuando los hepatocitos con la dieta CW son expuestos con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , se observa que el cadmio disminuye significativamente la expresión de GPX 1/2 a partir de las 12 y hasta las 24h con respecto a los hepatocitos CW no tratados. En los ratones con la dieta HC y tratados con Cd, se aprecia un incremento significativo de un 60% con respecto al CW no tratado, en la expresión de GPX 1/2 con 1 h de tratamiento, sin embargo cae en función del tiempo, siendo más relevante a las 12 y 24 h con respecto a los hepatocitos CW o HC no tratado.



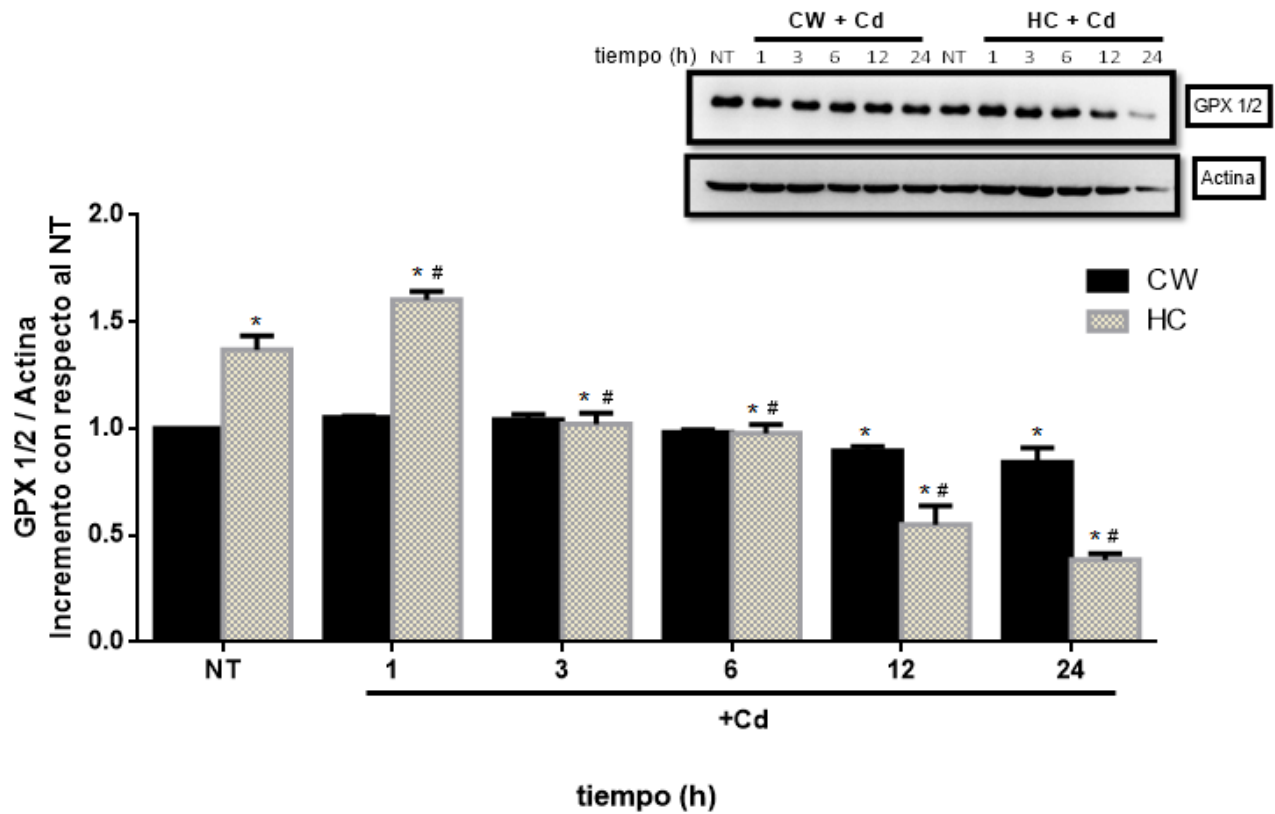


Figura 11 Expresión de GPX 1/2 en hepatocitos tratados con  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . Las células se trataron con cadmio por diferentes tiempos y se evaluó la expresión mediante Western Blot con el anticuerpo específico para GPX 1/2. Cada barra expresa el valor promedio  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). \*  $p < 0.05$  con respecto a los hepatocitos con dieta CW no tratados (NT). #  $p < 0.05$  con respecto a los hepatocitos con dieta HC no tratados (NT).

### 8.6.3 Efecto del cadmio en la expresión de Y-GCS

Para la determinación se siguió la técnica de Western blot con anticuerpos específicos para Y-GCS y actina como proteína de normalización. En la figura 12, se observa que en los hepatocitos con la dieta HC, se incrementa la expresión de la Y-GCS con respecto a los hepatocitos con la dieta CW no tratados. Cuando los hepatocitos con la dieta CW son expuestos con 1  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>, se observa que el cadmio disminuye significativamente la expresión de Y-GCS con respecto al tiempo con respecto a los hepatocitos CW no tratados. En los ratones con la dieta HC y tratados con Cd, se aprecia una disminución significativa en la expresión de GPX 1/2, siendo más relevante a las 12 y 24 h con respecto a los hepatocitos CW o HC no tratado.

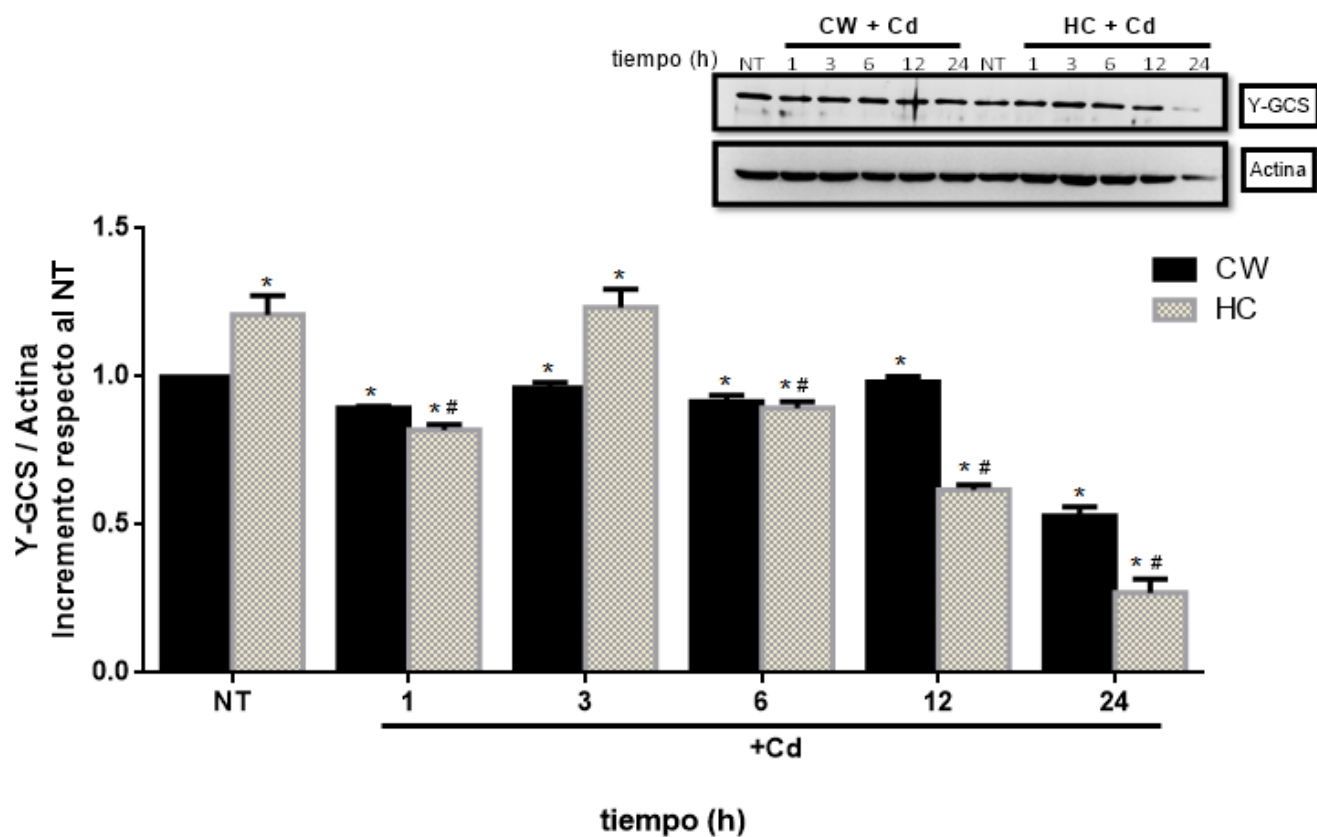


Figura 12 Expresión de  $\gamma$ -GCS en hepatocitos tratados con  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . Las células se trataron con cadmio por diferentes tiempos y se evaluó la expresión mediante Western Blot con el anticuerpo específico para  $\gamma$ -GCS. Cada barra expresa el valor promedio  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes ( $n=3$ ). \*  $p<0.05$  con respecto a los hepatocitos con dieta CW no tratados (NT). #  $p<0.05$  con respecto a los hepatocitos con dieta HC no tratados (NT).

#### 8.6.4 Efecto del cadmio en la expresión de HSP70

En la figura 13, se observa que en los hepatocitos con la dieta HC, no se presenta ningún cambio en la expresión de la HSP70 con respecto a los hepatocitos con la dieta CW no tratados. Cuando los hepatocitos con la dieta CW son expuestos con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , se observa que el cadmio incrementa la expresión de la HSP70 a partir de las 12 y 24 h con respecto a los hepatocitos CW no tratados. En los ratones con la dieta HC y tratados con Cd, se aprecia un incremento significativo en la expresión de HSP70 a las 6 y 12 h, sin embargo, cae drásticamente a las 24 h con respecto a los hepatocitos CW o HC no tratado.

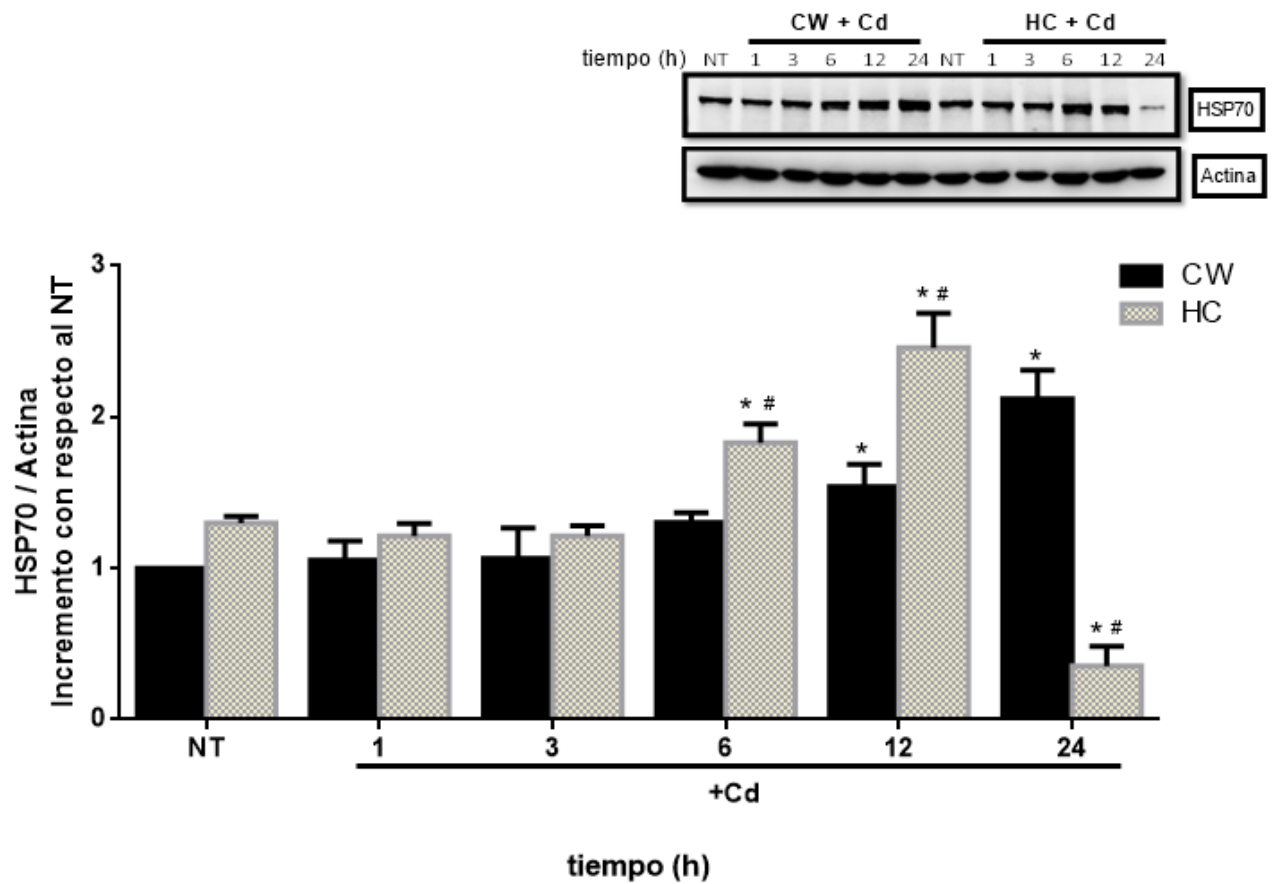


Figura 13 **Expresión de HSP70 en hepatocitos tratados con 1  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>.** Las células se trataron con cadmio por diferentes tiempos y se evaluó la expresión mediante Western Blot con el anticuerpo específico para HSP70. Cada barra expresa el valor promedio  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). \* p<0.05 con respecto a los hepatocitos con dieta CW no tratados (NT). # p<0.05 con respecto a los hepatocitos con dieta HC no tratados (NT).

### 8.7 Efecto del cadmio en el contenido de lípidos

Una de las formas en las que el cadmio puede promover el daño hepático es mediante la alteración del metabolismo de lípidos y para evaluar éste efecto los hepatocitos tanto de la dieta CW como de la dieta HC se sometieron a un tratamiento con  $\text{CdCl}_2$  durante 12 h. Posteriormente se realizó la técnica de incorporación de aceite rojo O para distinguir el contenido lipídico.

En la figura 14, se observa que los hepatocitos con la dieta HC presentan un incremento en los lípidos con respecto a los hepatocitos con dieta CW. Cuando los hepatocitos con la dieta CW son expuestos con  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por 12 h, se observa que el cadmio induce el incremento de lípidos con respecto a los hepatocitos CW no tratados. En los ratones con la dieta HC y tratados con Cd, se aprecia un incremento mayor en la presencia de lípidos con respecto a los hepatocitos CW o HC no tratados.

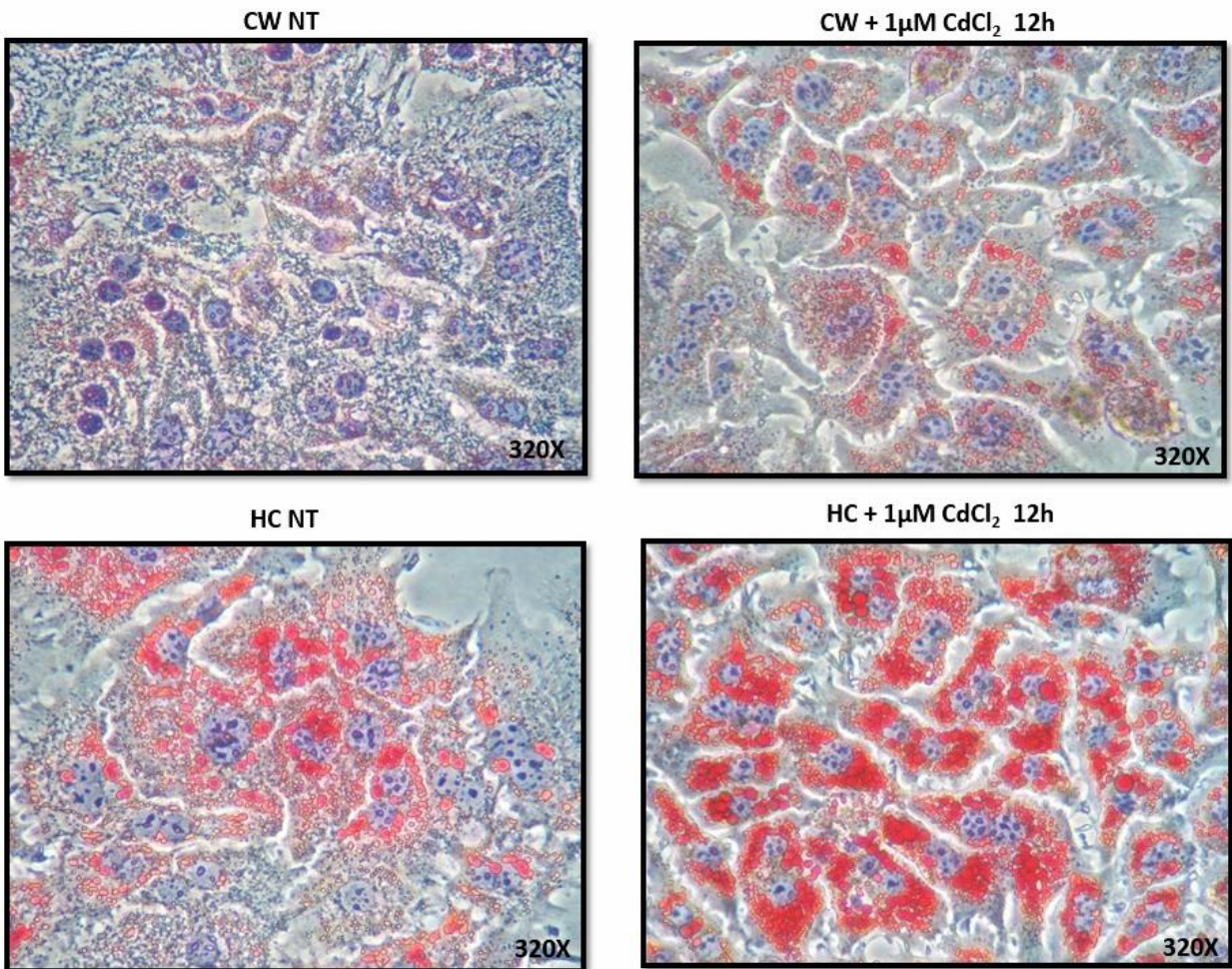


Figura 14 **Contenido de lípidos en hepatocitos CW y HC.** Los hepatocitos se trataron con 1 μM de CdCl<sub>2</sub> durante 12 h y posteriormente se realizó la técnica de incorporación de Aceite Rojo O para distinguir el contenido lipídico. Las fotografías representativas fueron tomadas con un microscopio con contraste de fases.

## 8.8 Efecto del trolox en el metabolismo de lípidos alterado por cadmio

Para comprobar que los efectos sobre el contenido lipídico observados en los hepatocitos se deben a una modificación dirigida por el estrés oxidante que promueve el cadmio, las células se pre-trataron con 100  $\mu\text{M}$  del antioxidante trolox durante 0.5 h. Posteriormente se les agregó 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por diferentes tiempos (1, 3, 6, 12 y 24 h). El trolox (2-ácido carboxílico-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromano) es un análogo soluble del  $\alpha$ -tocoferol, y es superior a éste por que puede incorporarse tanto en los compartimentos acuosos como en los lipídicos. Funciona como un atrapador de radicales libres y un inhibidor de la lipoperoxidación. El radical trolox fenoxil, resultado de la donación de un hidrógeno del trolox a un radical libre, es relativamente estable y puede regenerarse por ácido ascórbico.

En la figura 15, se observa que en los hepatocitos con dieta CW no tratados (NT) (fig 15A), muestran niveles basales de lípidos, mientras que en los hepatocitos con dieta HC no tratados (NT) (fig 15B), se incrementan considerablemente. Cuando los hepatocitos con dieta CW o HC son pre-tratados con el trolox, se observa que el antioxidante por sí solo, no tiene ningún efecto sobre la presencia de lípidos. Ahora, cuando los hepatocitos CW (fig 15A) son tratados con Cd por diferentes tiempos, se aprecia un incremento en el nivel de lípidos a partir de las 3 h, siendo más relevante a la 24 h, sin embargo el pre-tratamiento con el trolox, disminuye considerablemente los lípidos comparado con los hepatocitos CW tratados con Cd. Cuando los hepatocitos con dieta HC (fig 15B) son tratados con Cd, se observa que un incremento en el nivel de lípidos en función del tiempo de exposición, siendo más relevante a las 12 h y 24 h aunque en éste último tiempo ya se presenta pérdida en la morfología celular. Mientras

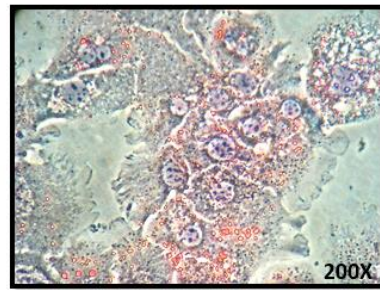
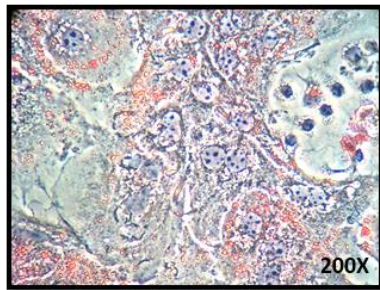


que en los hepatocitos HC pre-tratados con trolox se aprecia una disminución en los lípidos con respecto a los hepatocitos HC tratados.

# CW

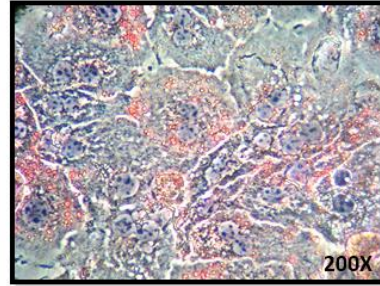
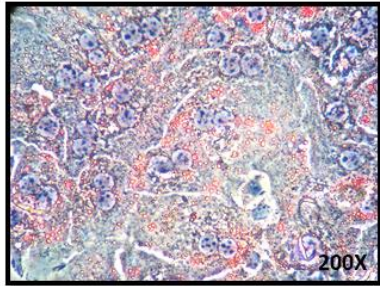
(A)

NT



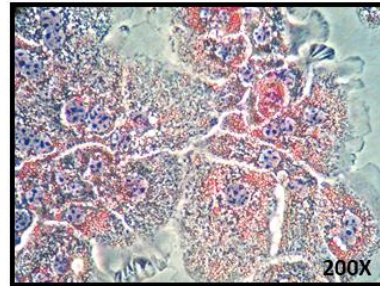
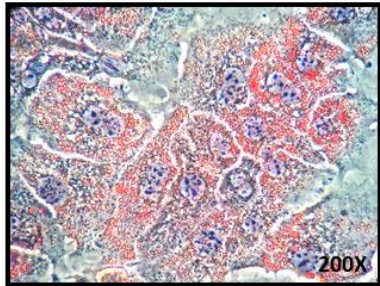
Trolox

1  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>  
1h



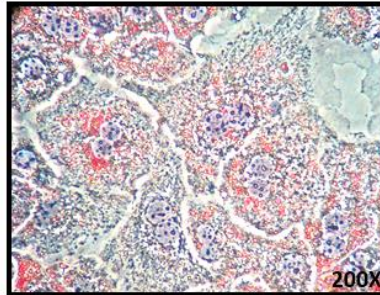
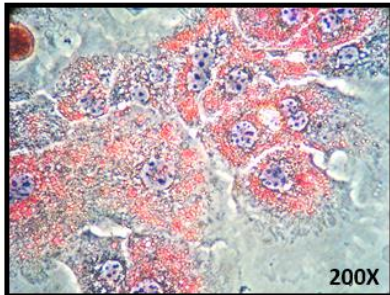
Trolox +  
1  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>  
1h

1  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>  
3h



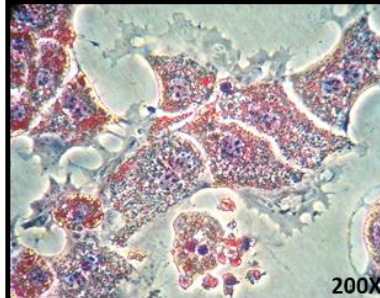
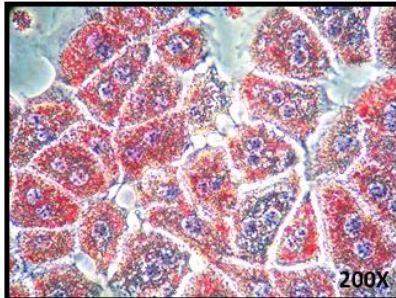
Trolox +  
1  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>  
3h

1  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>  
6h



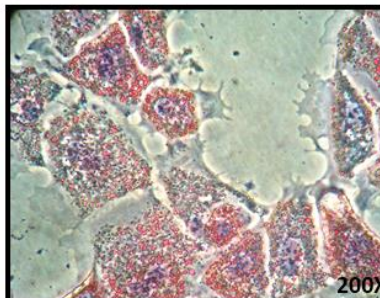
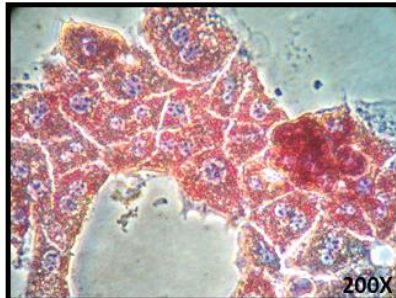
Trolox +  
1  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>  
6h

1  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>  
12h



Trolox +  
1  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>  
12h

1  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>  
24h



Trolox +  
1  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>  
24h



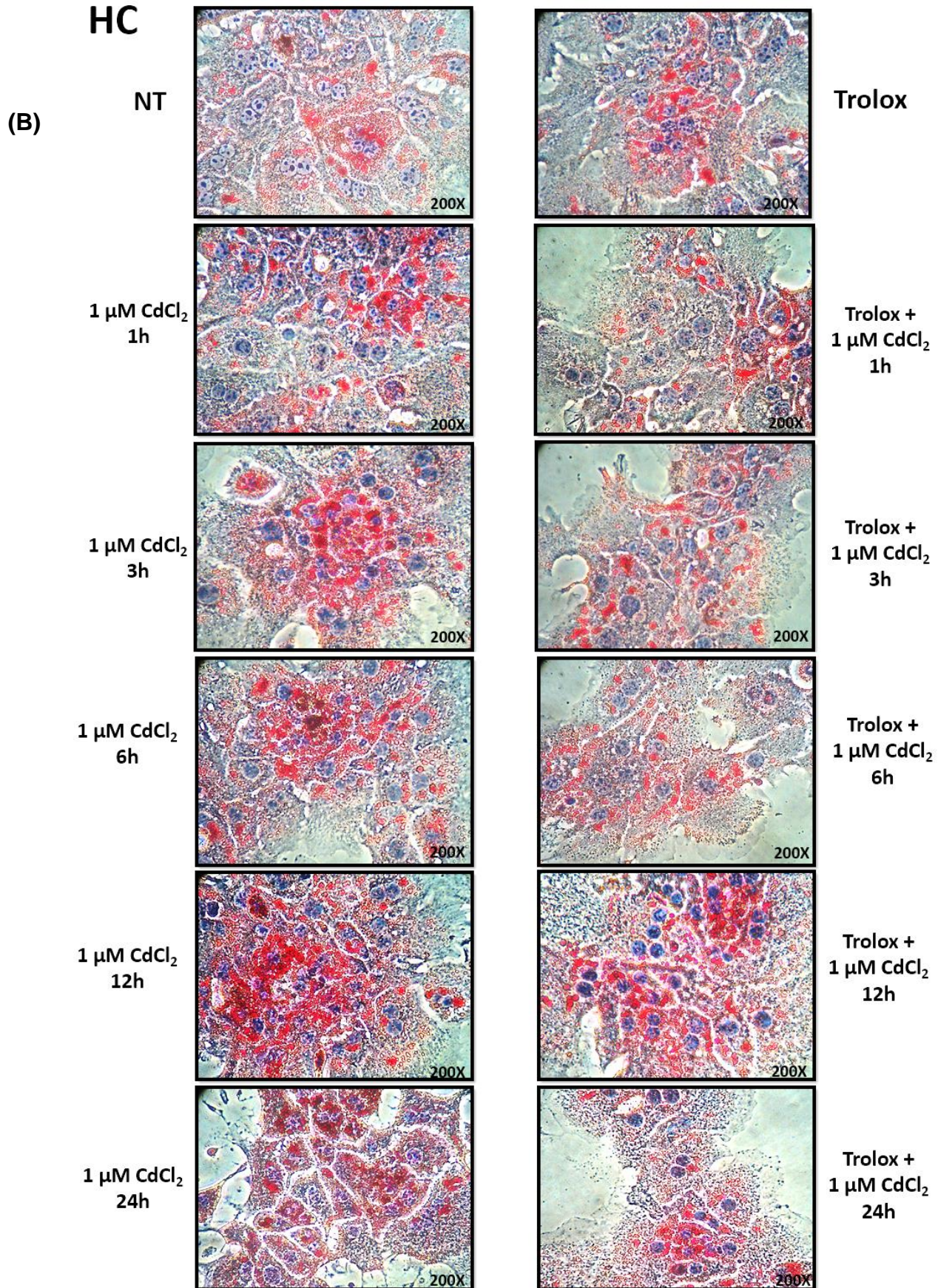


Figura 15 Contenido de lípidos en hepatocitos CW (A) o HC (B) pre-tratados con un antioxidante. Los hepatocitos fueron pre-tratados con trolox y luego con 1  $\mu\text{M}$  de CdCl<sub>2</sub> por diferentes tiempos. Las fotografías representativas fueron tomadas con un microscopio de contraste de fases.

## 8.9 Expresión de enzimas lipogénicas

Con los resultados obtenidos hasta ahora, sabemos que el cadmio promueve la alteración del metabolismo lipídico conduciendo a un aumento de lípidos en los hepatocitos, sin embargo, aún no podemos señalar específicamente el mecanismo mediante el cual sucede esto. No obstante, decidimos evaluar si el cadmio está favoreciendo el proceso lipogénico y para ello procedimos a determinar por Western Blot la expresión dos enzimas lipogénicas: la acetil-coenzima A carboxilasa (ACC) y la sintetasa de ácidos grasos (FASN).

### 8.9.1 Efecto del cadmio en la expresión de ACC

La ACC, es clave en el proceso lipogénico y los hepatocitos de la dieta CW y de la dieta HC se sometieron a un tratamiento con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por diferentes tiempos. Para la determinación se siguió la técnica de Western blot con anticuerpos específicos para ACC y actina como proteína de normalización.

En la figura 16, se observa que en los hepatocitos con la dieta HC, se incrementa la expresión de la ACC con respecto a los hepatocitos con la dieta CW no tratados. Cuando los hepatocitos con la dieta CW son expuestos con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , se observa que el cadmio incrementa significativamente la expresión de ACC a partir de las 3 h y cae drásticamente a las 24h con respecto a los hepatocitos CW no tratados. En los ratones con la dieta HC y tratados con Cd, se aprecia un incremento significativo en la expresión de ACC de manera dependiente del tiempo de exposición, sin embargo cae drásticamente a las 24 h con respecto a los hepatocitos CW o HC no tratado.

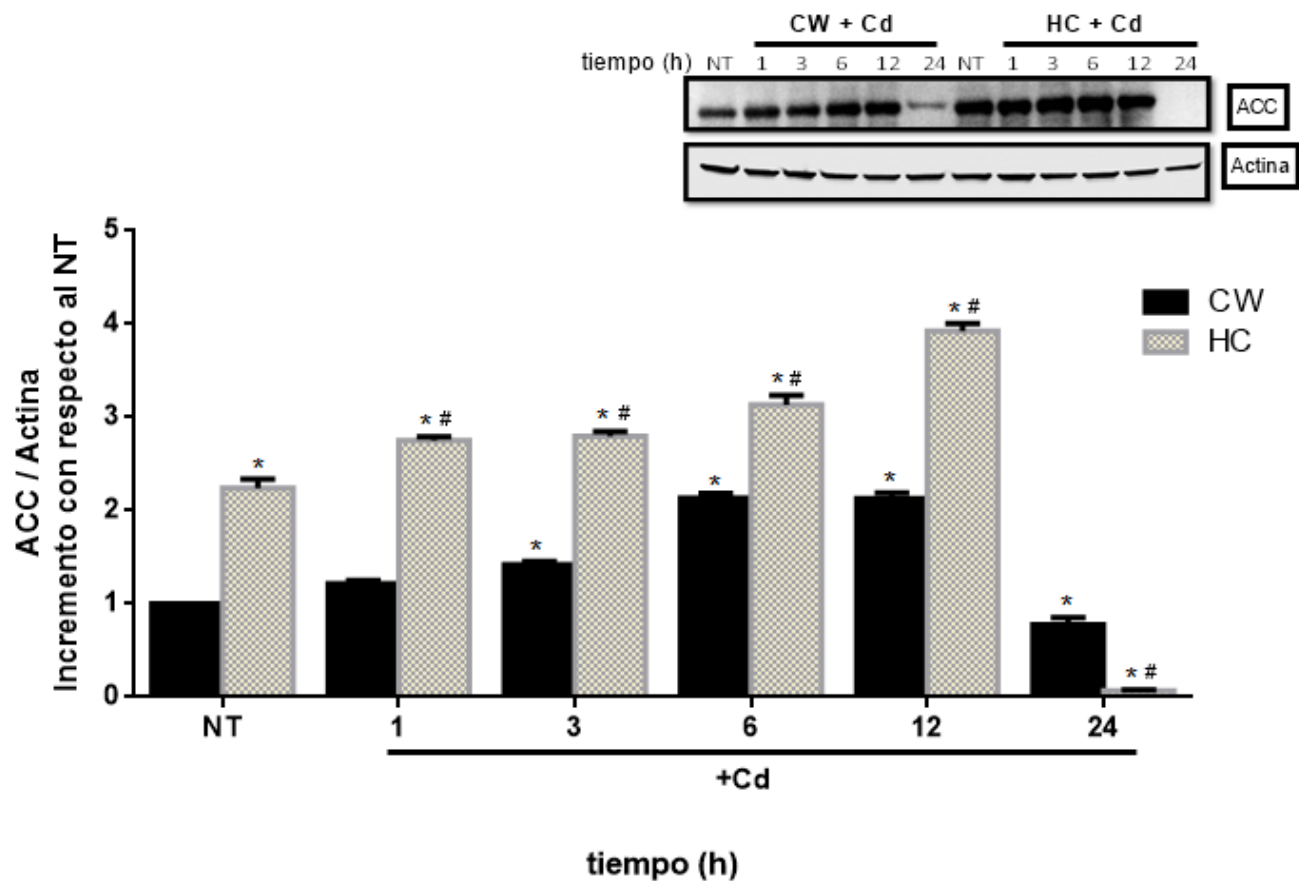


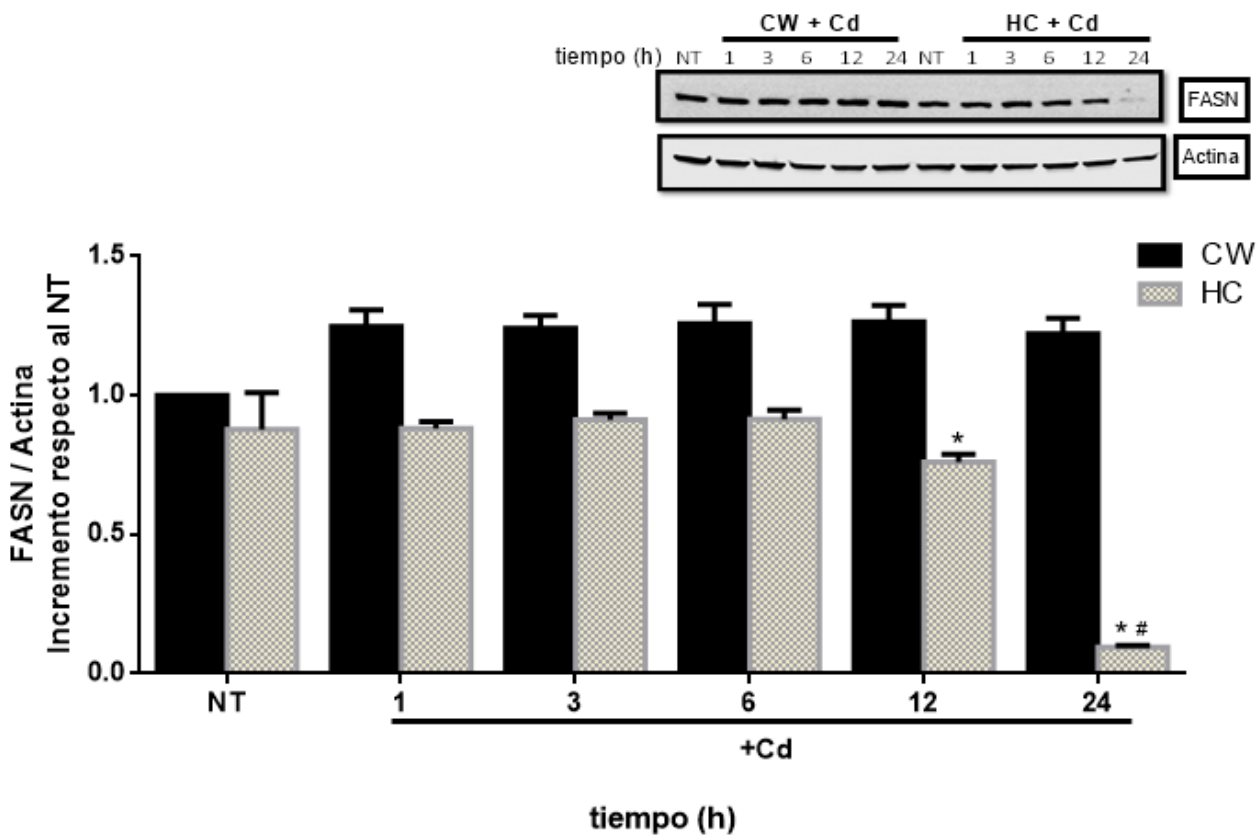
Figura 16 Expresión de ACC en hepatocitos tratados con 1  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>. Las células se trataron con cadmio por diferentes tiempos y se evaluó la expresión mediante Western Blot con el anticuerpo específico para ACC. Cada barra expresa el valor promedio  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). \* p<0.05 con respecto a los hepatocitos con dieta CW no tratados (NT). # p<0.05 con respecto a los hepatocitos con dieta HC no tratados (NT).



### 8.9.2 Efecto del Cadmio en la expresión de FASN

Otra enzima clave en el proceso lipogénico es la FASN.

En la figura 17, se observa que en los hepatocitos con la dieta HC, disminuye la expresión de FASN con respecto a los hepatocitos con la dieta CW no tratados, pero la disminución no es significativa. Cuando los hepatocitos con la dieta CW son expuestos con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , no se presentan cambios en la expresión de FASN con respecto a los hepatocitos CW no tratados. En los ratones con la dieta HC y tratados con Cd disminuye significativamente la expresión de FASN con respecto a los hepatocitos con la dieta CW no tratados a tiempos largos de exposición de 12 h y 24 h, sin embargo la diferencia entre el tratamiento con Cd y los hepatocitos con dieta HC no tratados cae drásticamente hasta las 24 h de exposición.



**Figura 17** Expresión de FASN en hepatocitos tratados con 1 μM de CdCl<sub>2</sub>. Las células se trataron con cadmio por diferentes tiempos y se evaluó la expresión mediante Western Blot con el anticuerpo específico para FASN. Cada barra expresa el valor promedio ± error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). \* p<0.05 con respecto a los hepatocitos con dieta CW no tratados (NT). # p<0.05 con respecto a los hepatocitos con dieta HC no tratados (NT).



### 8.9.3 Efecto del Cadmio en la expresión de SREBP1-c

Un factor de transcripción implicado en la regulación de las enzimas lipogénicas como la ACC y la FASN es el SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein).

En la figura 18, se observa que en los hepatocitos con la dieta HC, se incrementa significativamente la expresión del factor SREBP-1c en su forma activa, con respecto a los hepatocitos con la dieta CW no tratados. Cuando los hepatocitos con la dieta CW son expuestos con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , se observa que el cadmio incrementa significativamente la expresión de SREBP-1c a las 3 h y luego disminuye con el tiempo con respecto a los hepatocitos CW no tratados. En los hepatocitos de la dieta HC y tratados con Cd, se aprecia un incremento significativo en la expresión de SREBP-1c desde la hora de tratamiento y permanece hasta las 6 h, sin embargo disminuye significativamente a las 24 h con respecto a los hepatocitos CW o HC no tratado.

Así, se relaciona el incremento del factor de transcripción SREBP-1c en tiempos cortos, con el incremento de ACC en los tiempos posteriores de tratamiento con cadmio.

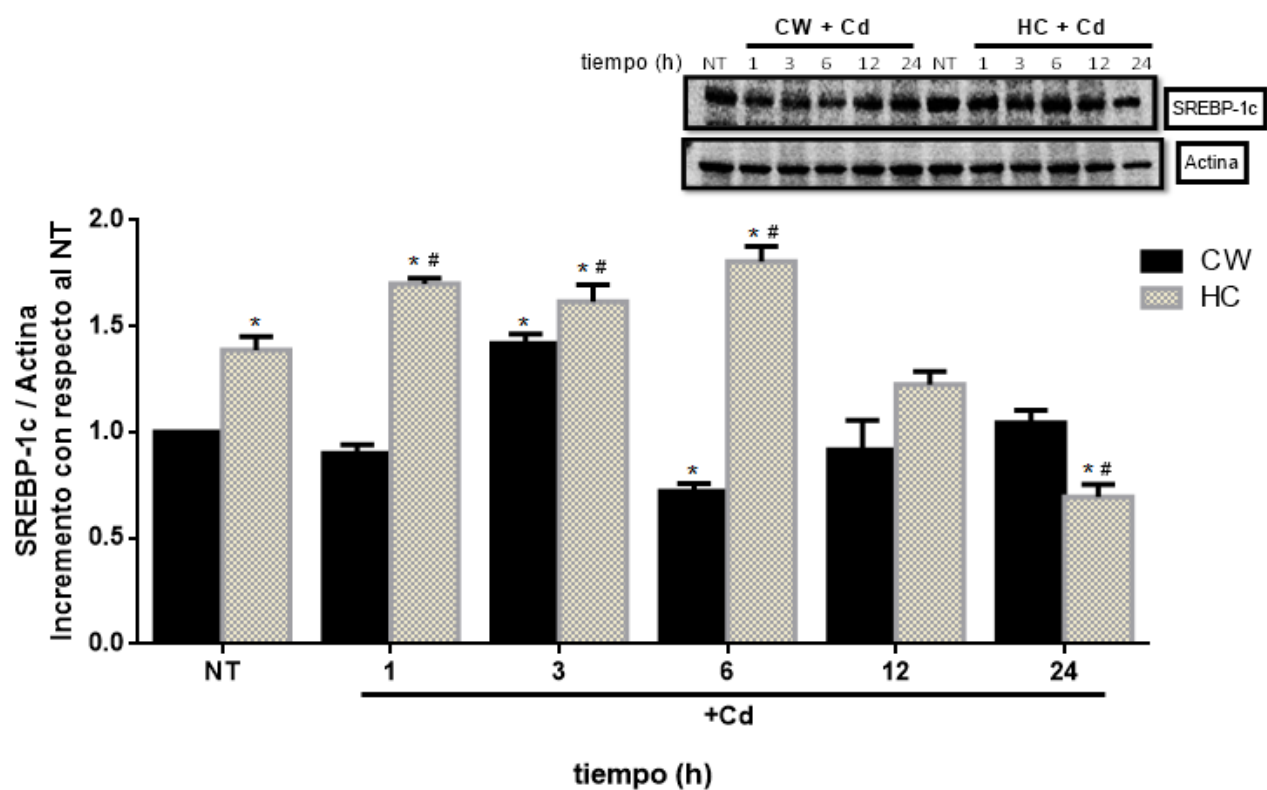


Figura 18 Expresión de SREBP-1c en hepatocitos tratados con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . Las células se trataron con cadmio por diferentes tiempos y se evaluó la expresión mediante Western Blot con el anticuerpo específico para SREBP-1c. Cada barra expresa el valor promedio  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3). \*  $p < 0.05$  con respecto a los hepatocitos con dieta CW no tratados (NT). #  $p < 0.05$  con respecto a los hepatocitos con dieta HC no tratados (NT).

## 9. Discusión

### 9.1 El modelo de esteatosis

El modelo de esteatosis inducida por una dieta hipercolesterolémica que se utilizó, es el reportado por Marí y colaboradores en el que los ratones alimentados con una dieta enriquecida con 2% de colesterol y suplementada con 0.5% de colato de sodio durante 2 días exhiben esteatosis microvesicular en muestras histológicas, así como un incremento en el colesterol total en hígado y plasma sin modificar la cantidad de triglicéridos. Sus resultados muestran que la acumulación de colesterol libre, juega un papel importante en el daño hepático al sensibilizar al órgano ante procesos de inflamación o disminuyendo su producción de glutatión.

En este proyecto, realizamos una tinción con aceite rojo O para evidenciar las diferencias en el contenido lipídico entre los hepatocitos aislados de ratones alimentados con una dieta balanceada (CW) y los aislados de ratones alimentados con una dieta enriquecida con colesterol (HC) durante 48 h, mediante ésta técnica logramos comprobar que éstos hepatocitos tienen más gotas lipídicas, esto como una característica de esteatosis inducida por dieta en el modelo celular propuesto.

La acumulación de colesterol hepático se ha relacionado con la sobre activación del receptor de lipoproteínas de muy baja densidad a través de la activación del factor SREBP-2, también se involucra una reducción en la transformación del colesterol en ácidos biliares y la represión de las vías canaliculares para la excreción de colesterol en la bilis. Cuando se elimina el colesterol de la dieta, se reduce la acumulación hepática del colesterol libre, sin embargo, incrementando el colesterol dietético se ha

observado que se exagera la acumulación de colesterol libre, conduciendo al daño celular y apoptosis procesos que estimulan el reclutamiento de macrófagos y la fibrosis hepática (Van Rooyen et al., 2011).

## 9.2 Viabilidad celular de hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

Durante nuestra investigación encontramos que únicamente una sobrecarga de colesterol durante 48 h en hepatocitos aislados, es capaz de disminuir la viabilidad hasta un 36.2% comparado con hepatocitos de ratones alimentados con una dieta balanceada.

Existen estudios que revelan que la sobrecarga de colesterol en una línea celular hepática humana normal (L02), induce estrés de retículo endoplásmico que activa la respuesta celular ante proteínas mal plegadas, proceso que en gran parte dirige a las células hacia apoptosis incrementado la expresión de la caspasa-3 activa (Li et al., 2009). Así, los estudios *in vitro* en hepatocitos de ratones alimentados con una dieta enriquecida con colesterol durante dos días, son un buen modelo que nos permite averiguar los efectos de la sobrecarga de colesterol en la sensibilización de las células ante una segunda agresión que pueda promover el estrés oxidante o dirigir hacia la muerte celular.

Entre los factores de riesgo que causan estrés oxidante y que representan un grave problema ambiental está la exposición a contaminantes y entre muchos se encuentran los metales pesados como plomo, zinc, selenio, arsénico, cobre y cadmio. Especialmente el cadmio es un metal que causa gran preocupación para la salud humana por sus múltiples usos comunes así como las cantidades presentes en el

ambiente que se han tornado una amenaza para el humano; recientemente se ha reportado que, a pesar de estar prohibido por la ley, existen concentraciones variadas de metales pesados en la industria cosmética que penetran en la piel mediante el contacto directo con ojos, cara y labios, aunque la exposición diaria se da en pequeñas cantidades puede ser acumulativa y así toxicidad sistémica (Bocca et al., 2014; Reglero et al., 2009).

Cuando expusimos hepatocitos de una dieta balanceada (CW) a diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  durante 6 h, encontramos una reducción significativa de la viabilidad dependiente de la concentración, siendo de sólo el 50% en la concentración más alta (5  $\mu\text{M}$ ). Mientras que, cuando tratamos a los hepatocitos con una sola concentración de 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durante diferentes tiempos también encontramos un impacto significativo del cadmio sobre la viabilidad, ésta vez dependiente del tiempo ubicando el daño más severo en tiempos más largos de exposición.

En células no cancerosas de hígado de humano (HL-7702), se ha observado que el cadmio disminuye significativamente la viabilidad e induce apoptosis interviniendo en la homeostasis de óxido/reducción, así incrementa la generación de ERO y la producción de malondialdehído (MDA) (An et al., 2014). Por otro lado, en cultivo primario de hepatocitos de pollo tratados con cadmio, se induce estrés de retículo endoplásmico que está relacionado con la alteración en la homeostasis del calcio que provoca el metal, sugiriendo éste como un mecanismo primario de toxicidad en el hígado (Shao et al., 2014).

En nuestro grupo de investigación se encontró que al exponer hepatocitos aislados a CdCl<sub>2</sub> durante 12 h, la viabilidad celular se ve disminuida en un 50% mientras que se incrementa la activación de p53 y de la proteína pro-apoptótica Bax (Martinez Flores et al., 2013a).

Ahora bien, cuando expusimos a los hepatocitos aislados de los ratones alimentados con una dieta rica en colesterol (HC) a diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> encontramos un impacto significativo del metal a las concentraciones más altas de 1, 2.5 y 5 µM.

Una vez que encontramos que 1 µM de CdCl<sub>2</sub> es suficiente para inducir cambios sobre la viabilidad celular, expusimos a los hepatocitos HC a esta concentración durante diferentes tiempos, encontrando un efecto significativo sobre la viabilidad a partir de las 4 h de tratamiento, esto es más tarde que en los hepatocitos CW, lo que sugiere que en tiempos cortos la dieta ya ha desplegado mecanismos de sobrevivencia que no permiten un efecto significativo del cadmio, sin embargo, en tiempos largos de exposición al metal la viabilidad de las células HC se ve mucho más afectadas teniendo sólo un 35% de células vivas a las 24 h, lo que apoya la hipótesis de que la sobrecarga de colesterol sensibiliza a la célula ante un segundo agresor sobre todo en tiempos largos de exposición.

### 9.3 Morfología celular de hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

Se sabe que la dieta enriquecida con colesterol hace a los hepatocitos más sensibles ante la exposición de moléculas pro-inflamatorias, como TNF, que induce muerte celular por apoptosis y por necrosis (Mari et al., 2006).

Nosotros encontramos que sólo la dieta HC es capaz de inducir cambios morfológicos en los hepatocitos a través del tiempo, el cultivo primario se tiñó con cristal violeta y observó por diferentes tiempos, percibiendo los cambios más drásticos a partir de las 6 h con dieta, donde los citoplasmas se contraen y se pierden las uniones con otras células, así en los tiempos más largos (12 h y 24 h) el daño celular es muy severo teniendo muy pocas células vivas que se ven más redondas y con el citoplasma muy deteriorado. Algunos autores sugieren que los triglicéridos en exceso incrementan el tamaño del hepatocito, con lo que pueden comprometer el flujo sanguíneo hepático al comprimir el espacio sinusoidal causando necrosis; al mismo tiempo, la acumulación de gotas lipídicas se ha asociado con un incremento en los marcadores de estrés del retículo endoplásmico que conduce a la muerte celular (Neuschwander-Tetri, 2010).

Al observar que el cadmio tiene efectos adversos sobre la viabilidad celular, nos preguntamos cómo el metal afecta la morfología de la célula para conducirla a la muerte, y encontramos que al exponer a los hepatocitos CW a cadmio por diferentes tiempos éstos son incapaces de manejar el estrés promovido por el metal a partir de las 3 h de exposición exhibiendo citoplasmas granulados y que comienzan a contraerse, así en tiempos más largos de exposición la muerte celular es alta, los núcleos están más pigmentados como respuesta a una posible condensación nuclear, las uniones celulares desaparecen, los hepatocitos han perdido por completo su forma e incluso a las 24 h pueden apreciarse restos celulares dispersos.

Entre los cambios morfológicos más notorios están los observados en la línea celular de carcinoma hepático humano Huh-7 expuesta a cadmio, donde se vio retracción

citoplasmática y condensación nuclear que precedieron a la pérdida total de la adhesión celular (Vergilio Cdos et al., 2013); mientras que en hepatocitos de ratas después de una dosis aguda de cadmio los cambios incluyen dilatación del retículo endoplásmico y pérdida de ribosomas, la necrosis hepatocelular se volvió evidente después de 10 o 12 h de exposición (Rikans et al., 2000). La citotoxicidad inducida por el cadmio también se ha vinculado con el daño mitocondrial, encontrando que el CdCl<sub>2</sub> disminuye el potencial de membrana mitocondrial e incrementa la expresión citosólica del citocromo C así como la activación de la caspasa-9, evidenciando la participación de la vía intrínseca de apoptosis dirigida por la mitocondria (Pal et al., 2011).

Mientras, los hepatocitos HC expuestos a CdCl<sub>2</sub> durante diferentes tiempos comienzan a mostrar cambios morfológicos hasta las 6 h de exposición, donde se observan citoplasmas granuloso y separación entre las células lo mismo que a las 12 h sólo que incrementa la muerte celular, sin embargo, a las 24 h de exposición el daño celular es más evidente, los citoplasmas se alargan perdiendo la forma característica del hepatocito y los núcleos parecen estar más condensados. Estos datos sugieren que la acumulación de lípidos en el hepatocito promueve mecanismos de sobrevivencia que impiden que el cadmio ejerza efectos inmediatos a tiempos cortos, pero ante una exposición prolongada, ésta misma acumulación hace a la célula más susceptible al estrés oxidante exacerbando el, el daño provocado por el cadmio.

#### 9.4 Producción de ERO en hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

Adicionalmente al estrés de retículo endoplásmico que provoca la dieta rica en colesterol, también interfiere en el funcionamiento mitocondrial, ya que en animales



alimentados con la dieta HC se ha visto que éste organelo incrementa su cantidad de colesterol total y estos niveles interfieren con las propiedades dinámicas de la membrana, disminuyendo su fluidez y su capacidad de transportar moléculas, así el glutatión mitocondrial por ejemplo, está selectivamente disminuido en estos animales (Mari et al., 2006). En esta investigación identificamos que la dieta HC es capaz de incrementar la producción de ERO hasta 6 veces en comparación con los hepatocitos CW no tratados.

Existen muchas anormalidades mitocondriales asociadas con la esteatosis, incluyendo lesiones estructurales, reducción del ADN mitocondrial así como de la actividad en los complejos de la cadena respiratoria y daño en la maquinaria necesaria para la  $\beta$ -oxidación, todo esto resulta un exceso de producción de ERO que promueve el estrés oxidante alterando el balance redox celular, crucial en la patogénesis de la esteatosis y su progreso hacia esteatohepatitis y fibrosis (Kucera et al., 2014).

Con el objetivo de evaluar el estado oxidante, expusimos a hepatocitos CW a 1  $\mu$ M de  $\text{CdCl}_2$  durante diferentes tiempos y observamos que el cadmio es capaz de incrementar la producción de ERO de manera dependiente del tiempo, teniendo el pico máximo a las 0.25 h de exposición pero manteniéndose significativo hasta las 24 h. Muchos estudios han demostrado que el Cd modula sus efectos tóxicos a través de la intervención en los mecanismos que controlan el estrés oxidante; la sobre producción de ERO puede dañar tejidos y células mediante la oxidación de lípidos y la alteración de la estructura y función de proteínas y ácidos nucleicos. Así, los efectos

hepatotóxicos del cadmio pueden atribuirse en parte a las alteraciones en el sistema de defensa antioxidante (Newairy et al., 2007).

Por otro lado, al exponer a hepatocitos HC a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durante diferentes tiempos, encontramos que a las 0.25 h el metal exacerba la producción de ERO hasta 6 veces más de lo que ya producía sólo la dieta, aunque posteriormente disminuye sigue siendo significativa con respecto a los CW no tratados.

Se piensa que el estrés oxidante incrementado puede ser una segunda agresión que participa en la progresión de esteatosis hacia esteatohepatitis, el aumento en la generación de radicales libres y otras especies altamente reactivas, resulta en la acumulación de grasa en el hígado que puede conducir nuevamente a la disfunción mitocondrial (Kucera et al., 2014), que puede promover el estrés oxidante.

#### 9.5 Oxidación de proteínas en hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

Siguiendo con el análisis del estado oxidante celular, evaluamos la incidencia de proteínas oxidadas para cada tratamiento, y encontramos que la dieta HC es suficiente para incrementar la presencia de proteínas oxidadas, lo que somete a los hepatocitos a un estrés inicial.

Estudios recientes indican que en animales alimentados con una dieta alta en grasa hay una disminución de nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ), coenzima involucrada en muchas reacciones de óxido/reducción, lo que conduce a una acumulación anormal de lípidos, aunque el mecanismo aún no está descrito (Zhang et al., 2014).

Cuando expusimos a los hepatocitos CW a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por diferentes tiempos encontramos que el cadmio incrementa la presencia de proteínas oxidadas de forma dependiente del tiempo, teniendo la mayor cantidad en los tiempos más largos de exposición (12 h y 24 h) donde tanto la viabilidad como la morfología se ven muy deterioradas. El cadmio es un catión divalente incapaz de generar radicales libres directamente, pero presenta una alta afinidad por los grupos tiol presentes, por ejemplo, en uno de los mayores y más abundantes antioxidantes de la célula: el glutatión (GSH), al mismo tiempo es uno de los blancos primordiales de los iones de cadmio libres, así el cadmio provoca una reducción considerable de las reservas de GSH dejando al hepatocito más sensible a las agresiones antioxidantes; de la misma manera aunque el cadmio no puede catalizar reacciones redox, se sabe que incrementa la concentración de iones hierro libres al reemplazarlos en varias proteínas, éstos iones pueden impulsar directamente la producción de radicales libres que son inestables y pueden reaccionar con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. (Cuypers et al., 2010).

En nuestro grupo de investigación se describió que el cadmio induce la fosforilación de STAT3 en el residuo de serina 727 que promueve la actividad de la HADPH oxidasa produciendo ROS, así se incrementa el estrés oxidante, pero también la producción de HSP70 como medida de sobrevivencia en células HepG2 (Souza et al., 2009).

En el mismo sentido, para seguir evaluando el estrés oxidante, expusimos a los hepatocitos HC a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por diferentes tiempos, y observamos que a diferencia de los hepatocitos sin dieta, el cadmio induce la presencia de proteínas oxidadas sólo

hasta los tiempos más largos de exposición (12 h y 24 h), lo que sugiere que el efecto del cadmio en tiempos cortos está amortiguado por el estrés que induce sólo la dieta, pero en una exposición prolongada al metal, el hepatocito con colesterol ya está sensibilizado por lo que no puede contrarrestar la oxidación de proteínas probablemente por deficiencias en la maquinaria antioxidante.

### 9.6 Expresión de enzimas antioxidantes en hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

La progresión de simple esteatosis hacia esteatohepatitis se ha visto como el resultado de lipotoxicidad hepática causada por un exceso de ácidos grasos, que puede inducir una producción excesiva de ERO con la consecuente disfunción celular y la muerte por apoptosis o necrosis; de hecho, los hepatocitos con sobrecarga de ácidos grasos (en particular saturados) activan una variedad de respuestas intracelulares resultando en estrés lipotóxico en mitocondria y retículo endoplásmico (Serviddio et al., 2013).

Así, observando que la dieta promueve la oxidación de proteínas, consideramos que la maquinaria antioxidante debe encontrarse afectada, entonces analizamos la expresión de algunas enzimas involucradas en la defensa antioxidante.

Está reportado que el hígado está dotado de mecanismos antioxidantes, incluyendo los químicos como GSH, vitaminas C y E, y enzimas como SOD, GPX, GST, peroxiredoxinas y tioredoxinas; sin embargo, se ha observado que en pacientes con esteatosis el contenido de GSH disminuye así como la actividad de SOD, mientras que en animales alimentados con una dieta alta en grasa se ha confirmado la reducción

del GSH hepático así como la actividad de GST, GPX y SOD aunque su expresión genética está elevada (Serviddio et al., 2013).

### 9.7 Expresión de SOD-1 en hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

Encontramos que la dieta HC es suficiente para elevar la expresión de SOD-1 en los hepatocitos, ésta enzima es un atrapador de radicales libres que protege contra el daño membranal causado por la lipoperoxidación. Estudios con la línea celular humana de hepatoblastoma HepG2 indican que cuando se induce esteatosis con una alta concentración de ácido oleico, la lipoperoxidación se incrementa así como la expresión de SOD-1 y de algunas proteínas pro-apoptóticas (Cui et al., 2010).

Mientras que, al exponer a los hepatocitos a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durante diferentes tiempos, observamos que el cadmio disminuye la expresión de SOD-1 de forma dependiente del tiempo, especialmente durante tiempos largos de 6 h, 12 h y 24 h lo que correlaciona con el incremento en las proteínas oxidadas y el deterioro en la viabilidad a tiempos largos de exposición al metal. Algunos autores reportan que las enzimas antioxidantes se afectan por el estrés que promueve el cadmio, la administración intraperitoneal de 0.4 mg Cd/kg de peso en ratas macho albinas durante 45 días inhibe la actividad de GPX y CAT en el hígado; de igual forma en la línea celular normal de hígado de rata, CRL-1439 después de 4 h de exposición de concentraciones altas de cadmio se disminuye la actividad de SOD, CAT y GPX (Nair et al., 2013).

Ahora, cuando expusimos a los hepatocitos HC a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durante diferentes tiempos, encontramos que si bien la expresión de SOD-1 se incrementa en comparación con las células CW, el cadmio provoca una disminución de ésta proteína

en los tiempos más largos de exposición y se hace más evidente a las 24 h, lo que nos lleva a pensar que la maquinaria antioxidante de las células HC sufre más daño en exposiciones prolongadas al cadmio, lo que de nueva cuenta soporta la hipótesis de que una dieta enriquecida con colesterol hace más susceptible al hepatocito ante una segunda agresión.

### 9.8 Expresión de GPX en hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

Continuando con la evaluación de la expresión de enzimas antioxidantes, encontramos que la dieta HC incrementa la expresión de GPX 1 y 2, pertenecientes a la familia de enzimas GPX's que se caracterizan por catalizar la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o hidroperóxidos orgánicos hacia agua o hacia los alcoholes correspondientes respectivamente, típicamente usan GSH como agente reductor.

Recientemente, se encontró que ratones alimentados con una dieta alta en grasa (compuesta de 45 % de calorías derivadas de grasa) hay un incremento significativo de triglicéridos en el hígado, así como una alteración en la capacidad redox evidenciada por un incremento en la actividad de GPX y una disminución en la concentración hepática de GSSG (Shearn et al., 2014).

Cuando expusimos a los hepatocitos CW a 1 µM de CdCl<sub>2</sub> durante diferentes tiempos, encontramos que la expresión de GPX se disminuye significativamente en tiempos largos de exposición (12 h y 24 h), lo que nuevamente indica una alteración en el estado redox promovida por el cadmio. Las evidencias actuales sugieren que la exposición a cadmio induce inestabilidad genómica a través de mecanismos multifactoriales, entre los más importantes están la intervención del cadmio con los

mecanismos de reparación del ADN, la generación de ERO, la disminución de las enzimas antioxidantes y la inducción de la apoptosis (Rani et al., 2014).

Siguiendo con la determinación de los efectos del cadmio, esta vez expusimos a los hepatocitos HC a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durante diferentes tiempos, y observamos que durante una exposición aguda (1 h) hay un incremento significativo de GPX tal vez como un primer mecanismo de defensa, sin embargo, a partir de las 3 h y hasta las 24 h la expresión se disminuye con respecto al tiempo, sugiriendo que la célula es incapaz de compensar el daño.

Estos datos sugieren que en tiempos cortos se desencadena un mecanismo de defensa que dirige a un incremento significativo en la expresión de éstas peroxidasas, sin embargo, ante la agresión del cadmio durante más tiempo la expresión de éstas proteínas se disminuye llegando a ser casi nula a las 24 h, esto puede indicar que si bien únicamente la dieta predispone a las células a una defensa antioxidante, una segunda agresión persistente, en este caso el cadmio, deteriora ésta respuesta conduciendo a la célula a un estrés oxidante progresivo que deriva en la muerte celular.

### 9.9 Expresión de $\gamma$ -GCS en hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

Continuando con el análisis del efecto del cadmio sobre el estado oxidante, determinamos la expresión de la  $\gamma$ -GCS que es la enzima limitante en la síntesis de glutatión, un tripéptido que se encuentra en concentraciones elevadas en las células y las protege contra agresiones oxidantes funcionando como agente reductor, además mantiene la estabilidad de las membranas (Chen et al., 2012).

Percibimos que la dieta HC es suficiente para inducir un incremento significativo en la expresión de ésta enzima, en comparación con los hepatocitos de la dieta CW. Existe una fuerte asociación entre la severidad de la esteatosis y el grado de estrés oxidante, la mayor defensa antioxidante del hígado es el glutatión y se ha visto que una dieta alta en grasa incrementa la expresión de genes involucrados en la síntesis de glutatión como la  $\gamma$ -GCS y la GST (Renaud et al., 2014).

Sin embargo, cuando expusimos a los hepatocitos CW al  $\text{CdCl}_2$  durante diferentes tiempos, observamos que el metal disminuye la expresión de la  $\gamma$ -GCS de manera dependiente del tiempo, teniendo la reducción más significativa en los tiempos más largos de exposición. De la misma forma, se ha observado que después de un tratamiento con  $10 \mu\text{M}$  de cadmio cultivo primario de astrocitos, es suficiente para causar el 90% de muerte celular en 18 h, encontrando los niveles intracelulares de GSH disminuidos lo que sugiere que los efectos tóxicos del cadmio en éstas células involucran una restricción en la síntesis de GSH (Im et al., 2006). Asimismo, al exponer a hepatocitos HC a cadmio  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por diferentes tiempos primero observamos que el metal promueve la disminución en la expresión de ésta proteína de forma dependiente del tiempo, siendo más evidente a las 24 h de exposición.

Por lo que nuevamente estos datos sugieren que el Cd suprime la respuesta antioxidante generada por la dieta alta en colesterol, incrementando el daño celular a medida que se incrementa el tiempo de exposición.



## 9.10 Expresión de HSP70 en hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

Las proteínas de choque térmico son de las más abundantes y estudiadas en los mamíferos, son componentes centrales del sistema chaperonas y de la catálisis del plegamiento de proteínas participando como auxiliares, pero se modula según las condiciones de estrés, se encuentran sobre-reguladas en estados oxidantes o de toxicidad o los cuales conducen a una acumulación de errores en el proceso de plegamiento (Urani et al., 2007).

Nosotros encontramos que sólo la dieta enriquecida con colesterol no induce ningún cambio en la expresión de ésta proteína, en experimentos independientes encontramos cierto incremento con respecto a la dieta balanceada, pero no resultó significativo. Se ha visto que la expresión del ARN mensajero de ésta proteína en hígado graso de ratas, inducido por una dieta rica en lípidos y baja en grasa, es hasta 1.6 veces más alta que en hígados normales, sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa (Inoue et al., 2006).

Por otro lado, al exponer a hepatocitos de la dieta CW a cadmio por diferentes tiempos, pudimos ver que el metal induce la expresión de ésta proteína en los tiempos más largos de exposición (12 h y 24 h), lo que corresponde con la característica de la proteína de estar sobre-regulada bajo condiciones de estrés.

En nuestro grupo de investigación, se encontró que con una dosis de 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  después de 3 h de exposición se incrementa la expresión de HSP70 (Souza et al., 2004) y posteriormente se identificó que ésta inducción está modulada por las cinasas

ERK y JNK, lo que confiere cierta protección celular contra el daño inducido por el cadmio (Escobar M. del et al., 2009).

Sin embargo, en los hepatocitos HC expuestos a CdCl<sub>2</sub> durante diferentes tiempos encontramos un incremento significativo en la expresión de HSP70 dirigida por el metal a las 6 h y 12 h de exposición, sugiriendo que este incremento se da antes en éstas células como un mecanismo emergente de sobrevivencia ante la sensibilización provocada por la dieta y el estrés oxidante que promueve el cadmio, aun así, esta respuesta celular resulta insuficiente en el tiempo más largo de exposición, encontrando una disminución casi total de la proteína lo que corresponde con la poca viabilidad celular y el gran daño a la morfología celular en éste mismo tiempo.

#### 9.11 Efectos en el contenido lipídico de hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

Si bien sabemos que el modelo de esteatosis inducida por la dieta enriquecida con colesterol promueve la acumulación de gotas lipídicas en los hepatocitos como una característica de ésta condición, decidimos evaluar el efecto del cadmio en el metabolismo de lípidos bajo éstas condiciones. Primero, únicamente la dieta HC induce una acumulación de lípidos como una respuesta inmediata de los hepatocitos ante la sobrecarga de colesterol, pero es sólo una medida temporal, ya que los ácidos grasos deben ser liberados en algún punto y si la célula es incapaz de manejarlos adecuadamente, éste almacenamiento puede funcionar como fuente de varios intermediarios que causen lipotoxicidad.

Encontramos que al exponer a los hepatocitos de la dieta balanceada a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durante 12 h, la cantidad de gotas lipídicas en los hepatocitos se incrementa considerablemente. Existen estudios que indican que el cadmio puede alterar el metabolismo lipídico contribuyendo al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, incluyendo la aterosclerosis. Se ha reportado que el Cd causa alteraciones en las concentraciones en suero y tejido de algunos compuestos lipídicos incluyendo el colesterol libre, ácidos grasos libres, triglicéridos y fosfolípidos, así como colesterol total y lipoproteínas, causando hipercolesterolemia e hiperlipidemia en varios modelos experimentales de exposición aguda, prolongada y crónica (Rogalska et al., 2009).

Mientras que, cuando expusimos a los hepatocitos de la dieta alta en colesterol a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durante 12 h, nuevamente observamos un incremento considerable en la cantidad de gotas lipídicas, lo que puede resultar muy perjudicial en éstos hepatocitos que inicialmente ya presentaban un incremento debido a la dieta.

Estos resultados sugieren que existe un mecanismo molecular mediante el cual el cadmio modifica el balance entre la síntesis, oxidación y transporte de lípidos en los hepatocitos, sin embargo no se conoce con exactitud, y podría ser un hallazgo que contribuya a especificar blancos terapéuticos para el control de la progresión del daño hepático en esteatosis.

#### 9.12 Efecto de Trolox en el contenido lipídico de hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

Si realmente el cadmio es capaz de modificar en algún aspecto el metabolismo de lípidos para conducir a su incremento, cuando perturbamos el efecto del cadmio al

intervenir el proceso con un antioxidante que impida el estrés que promueve el metal, el efecto debe reflejarse en el metabolismo lipídico.

Entonces, antes de exponer a los hepatocitos de ambas dietas a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durante diferentes tiempos, se pre-trataron con Trolox®, un antioxidante análogo del  $\alpha$ -tocoferol que es hidrosoluble. Lo que encontramos fue, primero que el antioxidante no tiene ningún efecto por sí mismo sobre la acumulación de lípidos ni en la dieta CW ni en la dieta HC.

Después, que el efecto del cadmio sobre la acumulación de lípidos es dependiente del tiempo, teniendo cambios significativos desde las 3 h de exposición y hasta las 24 h. Y finalmente, que el Trolox® fue capaz de contrarrestar en buena medida la acumulación de lípidos mediada por el cadmio en los hepatocitos de ambas dietas, lo que se vio reflejado en una disminución de la cantidad de gotas lipídicas en los hepatocitos pre-tratados comparados con los hepatocitos que sólo se expusieron a cadmio. Se ha reportado que el Trolox® es capaz de revertir la citotoxicidad inducida por el cadmio en células de la pituitaria anterior, apoyando que el estrés oxidante es el mecanismo mediante el cual el cadmio promueve daño celular (Poliandri et al., 2003). Nuestros resultados sugieren que como como lo planteamos, el cadmio está promoviendo un estrés oxidante en las células que de alguna forma contribuye a la alteración del metabolismo lipídico, conduciendo al incremento de grasas que puede dañar a los hepatocitos de una dieta balanceada, o agudizar la condición de esteatosis en hepatocitos de una dieta hipercolesterolémica.

### 9.13 Expresión de enzimas lipogénicas en hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

Se sabe muy poco acerca del mecanismo molecular mediante el cual el cadmio modifica el metabolismo lipídico, sin embargo, la lipogénesis se ha señalado como una fuerte posibilidad para explicar éste fenómeno, por ello, decidimos evaluar la expresión de dos proteínas fundamentales involucradas en éste proceso, la ACC y la FASN.

### 9.14 Expresión de ACC en hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

Las enzimas acetil-coenzima A carboxilasas 1 y 2 son reguladores principales del almacenamiento de lípidos, ACC 1 se localiza en el citosol y genera malonil-coenzima A para la lipogénesis *de novo*, mientras que la ACC 2 está unida a la membrana externa de la mitocondria pero también produce malonil-coenzima A.

En ésta investigación encontramos que la dieta HC es suficiente para inducir un incremento significativo en la expresión de la enzima ACC. Se sabe que ambas isoformas de ésta enzima son susceptibles a desregulación y que están comúnmente sobre-expresadas o sobre-activadas en diferentes fases de enfermedades asociadas con el hígado graso (Chow et al., 2014).

Ahora bien, al exponer a los hepatocitos de la dieta CW a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por diferentes tiempos observamos que el metal incrementa significativamente la expresión de ACC de manera dependiente del tiempo a partir de las 3 h y hasta las 12 h de exposición, mientras que en el tiempo más largo (24 h) la expresión disminuye, debido tal vez, al deterioro progresivo de las células dado por el cadmio en tiempos largos.

De igual forma, al exponer a los hepatocitos HC a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por diferentes tiempos identificamos que nuevamente el cadmio impulsa el incremento en la expresión de ACC de manera dependiente del tiempo desde 1 h hasta 12 h de exposición y se disminuye casi por completo en el tiempo más largo, lo que corresponde con la severidad del daño celular encontrado en éste tiempo.

Estos resultados nos sugieren que el cadmio está involucrado en la desregulación del metabolismo lipídico promoviendo la lipogénesis, lo que se refleja en el incremento de la expresión de una de las proteínas claves del proceso, la ACC.

#### 9.15 Expresión de FASN en hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

La FASN cataliza el paso final en la biosíntesis de ácidos grasos, por ello se cree que es la mayor determinante de la capacidad máxima hepática para generar ácidos grasos por lipogénesis *de novo*. Al evaluar la expresión de FASN en hepatocitos de la dieta HC encontramos una reducción significativa en su expresión, con respecto a los hepatocitos de la dieta CW.

No existen muchos estudios al respecto, pero se ha identificado que la expresión de FASN en presencia de esteatosis está regulada a un nivel transcripcional (Dorn et al., 2010), lo que sugiere que tal vez lo que se ve afecta en esteatosis es su actividad más que su expresión. Ahora, al exponer a los hepatocitos CW a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por diferentes tiempos no encontramos un efecto significativo en la expresión de FASN, lo que nos lleva nuevamente a pensar que tendría que analizarse la actividad enzimática. Posteriormente evaluamos la expresión de FASN en los hepatocitos de la dieta HC expuestos a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por diferentes tiempos, y encontramos una disminución

dependiente del tiempo con respecto a los hepatocitos CW no tratados, y una reducción significativa a las 24 h de exposición al cadmio con respecto a los hepatocitos HC no tratados.

Sin embargo, el hecho de no encontrar un incremento en la expresión de ésta enzima como lo esperábamos, no descarta del todo la participación del cadmio en la modulación de la lipogénesis, ya que por un lado tendría que analizarse la actividad enzimática, y también tendría que verificarse la participación la inflamación en la progresión del daño, ya que, interesantemente se ha encontrado que los niveles de expresión de ésta enzima no se afectan en muestras de humanos o en modelos murinos con esteatohepatitis no alcohólica (NASH), lo que sugiere que FASN no se afecta directamente cuando hay inflamación en presencia de esteatosis, lo que podría representar un marcador para el diagnóstico en etapas tempranas de la progresión del daño hepático, de esteatosis hacia esteatohepatitis (Dorn et al., 2010).

#### 9.16 Expresión de SREBP-1c en hepatocitos CW y HC expuestos a Cd

Los factores de transcripción SREBP son los reguladores de la expresión de genes lipogénicos incluyendo ACC y FASN, particularmente, la isoforma SREBP-1c activa todos los genes lipogénicos del hígado y se ha visto implicada en el desarrollo de la esteatosis hepática en modelos de roedores, por ésta razón decidimos evaluar su expresión en los hepatocitos de ambas dietas sometidos a un tratamiento con cadmio. Al evaluar a SREBP-1c en los hepatocitos de la dieta HC, encontramos que únicamente la dieta incrementa significativamente la expresión de éste factor de transcripción. Se ha reportado que la acumulación de lípidos en cultivo primario de

hepatocitos humanos promueve la expresión de SREBP-1c, del mismo modo que en líneas celulares, modelos murinos de esteatosis e hígados humanos con ésta condición (Dorn et al., 2010).

Por otro lado, al exponer a los hepatocitos CW a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por diferentes tiempos, observamos que se incrementa significativamente su expresión a las 3 h de tratamiento, y posteriormente a las 6 h disminuye, esto correlaciona con la inducción de ACC en tiempos más largos lo que promueve la lipogénesis.

Se ha visto que en ratas expuestas a cadmio durante 4 semanas se induce una acumulación renal de lípidos dirigida por una sobre-regulación de la expresión de SREBP-1 en la corteza renal, sin embargo, nuestros hallazgos en hígado son novedosos. De la misma forma, al exponer a los hepatocitos de la dieta HC a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por diferentes tiempos, hallamos que el metal induce la expresión de éste factor en tiempos cortos de exposición (1 h, 3 h, y 6 h) y en la exposición prolongada de 24 h, la expresión cae; nuevamente este resultado se empata con la inducción dependiente del tiempo observada en ACC y el daño sumamente significativo en tiempos largos de exposición al cadmio. Estos datos sugieren que el cadmio modula el incremento en el contenido lipídico a través de una señalización que promueve la expresión del factor de transcripción SREBP-1c y éste a su vez induce la expresión de ACC para desencadenar un evento lipogénico en los hepatocitos expuestos al metal y promover el daño celular, en mayor medida en presencia de esteatosis.



## 10. Conclusión

En nuestro grupo de investigación se ha comprobado que la esteatosis inducida por una dieta alta en colesterol induce estrés oxidante que promueve el daño celular y conlleva a la muerte, interviene en la reparación hepática, induce disfunción mitocondrial y exacerba las condiciones del hepatocarcinoma.

Al mismo tiempo, se ha comprobado que el cadmio es un metal que induce estrés oxidante e interviene en la maquinaria antioxidante de los hepatocitos dirigiendo a la muerte celular según la concentración y el tiempo de exposición.

Durante ésta investigación se analizó el efecto del cadmio en hepatocitos que ya presentaban esteatosis y encontramos que si bien, la dieta enriquecida con colesterol despliega una serie de respuestas celulares que contrarresten el daño impidiendo entonces un efecto inmediato del cadmio, una exposición prolongada al metal provoca daños severos como un incremento en el estrés oxidante a través de un sobreproducción de ERO y un aumento en la oxidación de proteínas, así como la disminución de las enzimas involucradas en la maquinaria antioxidante, al mismo tiempo el cadmio promueve la acumulación de lípidos lo que dirige a un incremento en el daño celular.

El estudio de las rutas moleculares por las cuales el cadmio potencia el daño que se genera en la esteatosis, resulta de gran relevancia para la identificación de blancos moleculares que permitan una acción terapéutica contra la progresión de este trastorno.

## 11. Referencias

**An, Z., Qi, Y., Huang, D., Gu, X., Tian, Y., Li, P., Li, H. and Zhang, Y.** (2014). EGCG inhibits Cd(2+)-induced apoptosis through scavenging ROS rather than chelating Cd(2+) in HL-7702 cells. *Toxicol Mech Methods* **24**, 259-67.

**Bailey, S. M., Mantena, S. K., Millender-Swain, T., Cakir, Y., Jhala, N. C., Chhieng, D., Pinkerton, K. E. and Ballinger, S. W.** (2009). Ethanol and tobacco smoke increase hepatic steatosis and hypoxia in the hypercholesterolemic apoE(-/-) mouse: implications for a "multihit" hypothesis of fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* **46**, 928-38.

**Bellentani, S., Marino, M. and Noone.** (2009). Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol* **8 Suppl 1**, S4-8.

**Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J. A. and Auguet, T.** (2014). Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol* **7**, 221-39.

**Bocca, B., Pino, A., Alimonti, A. and Forte, G.** (2014). Toxic metals contained in cosmetics: a status report. *Regul Toxicol Pharmacol* **68**, 447-67.

**Brown, M., Compton, S., Milburn, M., Lawton, K. and Cheatham, B.** (2013). Metabolomic signatures in lipid-loaded HepaRGs reveal pathways involved in steatotic progression. *Obesity (Silver Spring)*.

**Bucio, L., Souza, V., Albores, A., Sierra, A., Chavez, E., Carabez, A. and Gutierrez-Ruiz, M. C.** (1995). Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology* **102**, 285-99.

**Cui, W., Chen, S. L. and Hu, K. Q.** (2010). Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Am J Transl Res* **2**, 95-104.

**Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A. R., Munters, E., Artois, T. J. et al.** (2010). Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals* **23**, 927-40.

**Chen, Y., Krishan, M., Nebert, D. W. and Shertzer, H. G.** (2012). Glutathione-deficient mice are susceptible to TCDD-Induced hepatocellular toxicity but resistant to steatosis. *Chem Res Toxicol* **25**, 94-100.

**Chow, J. D., Lawrence, R. T., Healy, M. E., Dominy, J. E., Liao, J. A., Breen, D. S., Byrne, F. L., Kenwood, B. M., Lackner, C., Okutsu, S. et al.** (2014). Genetic inhibition of hepatic acetyl-CoA carboxylase activity increases liver fat and alters global protein acetylation. *Mol Metab* **3**, 419-31.

**Dorn, C., Riener, M. O., Kirovski, G., Saugspier, M., Steib, K., Weiss, T. S., Gabele, E., Kristiansen, G., Hartmann, A. and Hellerbrand, C.** (2010). Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Exp Pathol* **3**, 505-14.

**EFSA.** (2009). European Food Safety Authority, vol. 2013.

**El-Boshy, M. E., Risha, E. F., Abdelhamid, F. M., Mubarak, M. S. and Hadda, T. B.** (2014). Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. *J Trace Elem Med Biol*.

**ENSANUT.** (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, vol. 2012. México, Distrito Federal.: Gobierno Federal.

**Escobar M. del, C., Souza, V., Bucio, L., Hernandez, E., Gomez-Quiroz, L. E. and Gutierrez Ruiz, M. C.** (2009). MAPK activation is involved in cadmium-induced Hsp70 expression in HepG2 cells. *Toxicol Mech Methods* **19**, 503-9.

**Farkas, A., Erratico, C. and Vigano, L.** (2007). Assessment of the environmental significance of heavy metal pollution in surficial sediments of the River Po. *Chemosphere* **68**, 761-8.

**Feldstein, A. E., Canbay, A., Guicciardi, M. E., Higuchi, H., Bronk, S. F. and Gores, G. J.** (2003). Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J Hepatol* **39**, 978-83.

**Gobe, G., Crane, D. and R., N.** (2010). Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. *Toxicol Lett* **198**, 49-55.

**Gutiérrez-Ruiz, M. C., Domínguez, P. M., Rodríguez, G. S., Nuño, L. N., Licona, R. C. and L.E., G.-Q.** (2012). La dieta alta en colesterol altera el proceso reparador del factor de crecimiento de hepatocitos. *Gaceta Médica de México* **148**, 290-296.

**Hughes, C. M., McCullough, C. A., Bradbury, I., Boyde, C., Hume, D., Yuan, J., Quinn, F. and McDonough, S. M.** (2009). Acupuncture and reflexology for insomnia: a feasibility study. *Acupunct Med* **27**, 163-8.

**Im, J. Y., Paik, S. G. and Han, P. L.** (2006). Cadmium-induced astroglial death proceeds via glutathione depletion. *J Neurosci Res* **83**, 301-8.

**Inoue, H., Sameshima, N., Ishida, T., Tsuji, A., Kudo, K. and Ikeda, N.** (2006). Vulnerability of experimentally induced fatty liver to heat stress in rats. *J Gastroenterol* **41**, 55-61.

**Kao, C. H., Wang, S. J., Ting, C. T. and Chen, Y. T.** (1996). 'Reverse redistribution pattern' during myocardial perfusion imaging with 99Tcm-MIBI. *Nucl Med Commun* **17**, 397-9.

**Kiang, J. G.** (2004). Inducible heat shock protein 70 kD and inducible nitric oxide synthase in hemorrhage/resuscitation-induced injury. *Cell Res* **14**, 450-9.

**Kucera, O., Endlicher, R., Rousar, T., Lotkova, H., Garnol, T., Drahota, Z. and Cervinkova, Z.** (2014). The effect of tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes in vitro. *Oxid Med Cell Longev* **2014**, 752506.

**Larregle, E. V., Varas, S. M., Oliveros, L. B., Martinez, L. D., Anton, R., Marchevsky, E. and Gimenez, M. S.** (2008). Lipid metabolism in liver of rat exposed to cadmium. *Food Chem Toxicol* **46**, 1786-92.

**Lazo, M., Clark, J. M. and Noone.** (2008). The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis* **28**, 339-50.

**Li, Q., Liu, Z., Guo, J., Chen, J., Yang, P., Tian, J., Sun, J., Zong, Y. and Qu, S.** (2009). Cholesterol overloading leads to hepatic L02 cell damage through activation of the unfolded protein response. *Int J Mol Med* **24**, 459-64.

**Loomba, R., Sirlin, C. B., Schwimmer, J. B. and Lavine, J. E.** (2009). Advances in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **50**, 1282-93.

**Mari, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., Enrich, C., Fernandez-Checa, J. C. and Garcia-Ruiz, C.** (2006). Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* **4**, 185-98.

**Mari, M., Colell, A., Morales, A., von Montfort, C., Garcia-Ruiz, C. and Fernandez-Checa, J. C.** (2010). Redox control of liver function in health and disease. *Antioxid Redox Signal* **12**, 1295-331.

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

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

**Mizushima, T.** (2014). Protective role of HSP70 against various gastrointestinal diseases. *Curr Opin Pharmacol* **19C**, 1-5.

**Moulis, J. M. and Thevenod, F.** (2010). New perspectives in cadmium toxicity: an introduction. *Biomaterials* **23**, 763-8.

**Musso, G., Gambino, R. and Cassader, M.** (2010). Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update. *Obes Rev* **11**, 430-45.

**Nair, A. R., Degheselle, O., Smeets, K., Van Kerkhove, E. and Cuypers, A.** (2013). Cadmium-Induced Pathologies: Where Is the Oxidative Balance Lost (or Not)? *Int J Mol Sci* **14**, 6116-43.

**Neuschwander-Tetri, B. A.** (2010). Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* **52**, 774-88.

**Newairy, A. A., El-Sharakly, A. S., Badreldeen, M. M., Eweda, S. M. and Sheweita, S. A.** (2007). The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. *Toxicology* **242**, 23-30.

**Noguchi, Y., Young, J. D., Aleman, J. O., Hansen, M. E., Kelleher, J. K. and Stephanopoulos, G.** (2009). Effect of anaplerotic fluxes and amino acid availability on hepatic lipoapoptosis. *J Biol Chem* **284**, 33425-36.

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

**OMS.** (2013). Tabaco, vol. 2013.

**Pal, S., Pal, P. B., Das, J. and Sil, P. C.** (2011). Involvement of both intrinsic and extrinsic pathways in hepatoprotection of arjunolic acid against cadmium induced acute damage in vitro. *Toxicology* **283**, 129-39.

**Pendino, G. M., Mariano, A., Surace, P., Caserta, C. A., Fiorillo, M. T., Amante, A., Bruno, S., Mangano, C., Polito, I., Amato, F. et al.** (2005). Prevalence and etiology of altered liver tests: a population-based survey in a Mediterranean town. *Hepatology* **41**, 1151-9.

**Perichart-Perera, O., Balas-Nakash, M., Rodriguez-Cano, A., Munoz-Manrique, C., Monge-Urrea, A. and Vadillo-Ortega, F.** (2010). Correlates of dietary energy sources with cardiovascular disease risk markers in Mexican school-age children. *J Am Diet Assoc* **110**, 253-60.

**Poliandri, A. H., Cabilla, J. P., Velardez, M. O., Bodo, C. C. and Duvilanski, B. H.** (2003). Cadmium induces apoptosis in anterior pituitary cells that can be reversed by treatment with antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* **190**, 17-24.

**Prabu, S. M., Shagirtha, K. and Renugadevi, J.** (2010). Amelioration of cadmium-induced oxidative stress, impairment in lipids and plasma lipoproteins by the combined treatment with quercetin and alpha-tocopherol in rats. *J Food Sci* **75**, T132-40.

**Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasaiah, U., Gopas, J. and Nishigaki, I.** (2014). Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta* **436C**, 332-347.

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

**Reglero, M. M., Taggart, M. A., Monsalve-Gonzalez, L. and Mateo, R.** (2009). Heavy metal exposure in large game from a lead mining area: effects on oxidative stress and fatty acid composition in liver. *Environ Pollut* **157**, 1388-95.

**Renaud, H. J., Cui, J. Y., Lu, H. and Klaassen, C. D.** (2014). Effect of diet on expression of genes involved in lipid metabolism, oxidative stress, and inflammation in mouse liver-insights into mechanisms of hepatic steatosis. *PLoS One* **9**, e88584.

**Rikans, L. E., Yamano, T. and Noone.** (2000). Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol* **14**, 110-7.

**Rogalska, J., Brzoska, M. M., Roszczenko, A. and Moniuszko-Jakoniuk, J.** (2009). Enhanced zinc consumption prevents cadmium-induced alterations in lipid metabolism in male rats. *Chem Biol Interact* **177**, 142-52.

**Serviddio, G., Bellanti, F. and Vendemiale, G.** (2013). Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* **65**, 952-68.

**Shao, C. C., Li, N., Zhang, Z. W., Su, J., Li, S., Li, J. L. and Xu, S. W.** (2014). Cadmium supplement triggers endoplasmic reticulum stress response and cytotoxicity in primary chicken hepatocytes. *Ecotoxicol Environ Saf* **106**, 109-14.

**Shearn, C. T., Mercer, K. E., Orlicky, D. J., Hennings, L., Smathers-McCullough, R. L., Stiles, B. L., Ronis, M. J. and Petersen, D. R.** (2014). Short Term Feeding of a High Fat Diet Exerts an Additive Effect on Hepatocellular Damage and Steatosis in Liver-Specific PTEN Knockout Mice. *PLoS One* **9**, e96553.

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

**Souza, V., Escobar, M. C., Bucio, L., Hernandez, E., Gomez-Quiroz, L. E. and Gutierrez Ruiz, M. C.** (2009). NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced-STAT3 activation in HepG2 cells. *Toxicol Lett* **187**, 180-6.

**Souza, V., Escobar, M. C., Gomez-Quiroz, L., Bucio, L., Hernandez, E., Cossio, E. C. and Gutierrez-Ruiz, M. C.** (2004). Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology* **197**, 213-28.

**Stern, M. P. and Haffner, S. M.** (1991). Dyslipidemia in type II diabetes. Implications for therapeutic intervention. *Diabetes Care* **14**, 1144-59.

**Storelli, M. M.** (2009). Intake of essential minerals and metals via consumption of seafood from the Mediterranean Sea. *J Food Prot* **72**, 1116-20.

**Szuster-Ciesielska, A., Stachura, A., Slotwinska, M., Kaminska, T., Sniezko, R., Paduch, R., Abramczyk, D., Filar, J. and Kandefer-Szerszen, M.** (2000). The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* **145**, 159-71.

**Tellez-Avila, F. I., Sanchez-Avila, F., Garcia-Saenz-de-Sicilia, M., Chavez-Tapia, N. C., Franco-Guzman, A. M., Lopez-Arce, G., Cerda-Contreras, E. and Uribe, M.** (2008). Prevalence of metabolic syndrome, obesity and diabetes type 2 in cryptogenic cirrhosis. *World J Gastroenterol* **14**, 4771-5.

**Tipoe, G. L., Ho, C. T., Liong, E. C., Leung, T. M., Lau, T. Y., Fung, M. L. and Nanji, A. A.** (2009). Voluntary oral feeding of rats not requiring a very high fat diet is a clinically relevant animal model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Histol Histopathol* **24**, 1161-9.

**Urani, C., Melchiorretto, P., Canevali, C., Morazzoni, F. and Gribaldo, L.** (2007). Metallothionein and hsp70 expression in HepG2 cells after prolonged cadmium exposure. *Toxicol In Vitro* **21**, 314-9.

**Valdes-Arzate, A., Luna, A., Bucio, L., Licona, C., Clemens, D. L., Souza, V., Hernandez, E., Kershenobich, D., Gutierrez-Ruiz, M. C. and Gomez-Quiroz, L. E.** (2009). Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med* **47**, 424-30.

**Van Rooyen, D. M., Larter, C. Z., Haigh, W. G., Yeh, M. M., Ioannou, G., Kuver, R., Lee, S. P., Teoh, N. C. and Farrell, G. C.** (2011). Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **141**, 1393-403, 1403 e1-5.

**Vergilio Cdos, S., de Melo, E. J. and Noone.** (2013). Autophagy, apoptosis and organelle features during cell exposure to cadmium. *Biocell* **37**, 45-54.

**Yuan, H., Shyy, J. Y. and Martins-Green, M.** (2009a). Second-hand smoke stimulates lipid accumulation in the liver by modulating AMPK and SREBP-1. *J Hepatol* **51**, 535-47.

**Yuan, Y., Wang, K. and Tian, H.** (2009b). [A simulation study of the effects of ischemia on spiral waves in 2D human ventricular tissue]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* **26**, 1329-34.

**Zhang, Z. F., Fan, S. H., Yuan-Lin, Z., Lu, J., Wu, D. M., Shan, Q. and Hu, B.** (2014). Troxerutin improves hepatic lipid homeostasis by restoring NAD-depletion-mediated dysfunction of lipin 1 signaling in high-fat diet-treated mice. *Biochem Pharmacol.*