

## **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

### ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Evaluación Toxicológica *In Vitro* de los Efectos Producidos por Cadmio, Plomo, Cromo y Selenio en Células Renales y Hepáticas, a Concentraciones Encontradas en Tres Especies de Pingüino de la Península Antártica e Islas Asociadas

**Dña. Ana Meseguer Frutos**  
**2016**





UNIVERSIDAD DE MURCIA  
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Evaluación toxicológica *in vitro* de los efectos producidos por cadmio, plomo, cromo y selenio en células renales y hepáticas, a concentraciones encontradas en tres especies de pingüino de la península Antártica e Islas asociadas

Memoria presentada para optar al grado de doctor por

ANA MESEGUER FRUTOS

Directores:

Miguel Motas Guzmán (Universidad de Murcia)

Andrés Barbosa Alcón (EEZA y Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC)

2016





*Las células son seres vivos con una personalidad propia, sus gustos y sus fobias y, sobre todo, con una gran necesidad de consideración. En ningún caso hay que utilizarlas como objetos. Exigen que se les rodee de suavidad y de ternura, piden que se les escuche y que se sepa hablar con ellas.*

Dominique Lapierre, "Más grandes que el amor"



# Agradecimientos

Gracias en primer lugar a mis directores. A D. Miguel Motas Guzmán, por introducirme en el mundo de la toxicología hace ya diez años, por permitirme volver a él y disfrutarlo, por sus enseñanzas, la confianza depositada en mí y su ayuda. A D. Andrés Barbosa Alcón por su apoyo y por permitirme formar parte de este gran proyecto y poder rodearme de grandes profesionales. A mi tutora, D<sup>a</sup>. María Dolores Pérez Cárceles, por su apoyo y ayuda prestada en la gestión del doctorado.

Gracias a todo el personal de la sección de Cultivos de Tejidos del SAI, en especial a Toñi, Pepe, Juana, Pilar, Azucena y Vero. Gracias a Toñi, por sus enseñanzas, por su apoyo, por tener siempre una sonrisa cuando los cientos de usuarios la acosamos con preguntas, por enseñarme a tratar a las células con respecto, por aguantarme tantas horas y tratarme tan bien. Esta tesis no hubiese sido posible sin ti. A Pepe por su trabajo, por las horas perdidas en el citómetro en esos ensayos interminables, por su buen humor y su paciencia conmigo. A Juana, el alma del laboratorio, por su cariño demostrado cada día, por sus “broncas” didácticas, por su apoyo continuo e incondicional. A Pilar, Azucena (mi barbie mareos) y Vero, por enseñarme y darme material a horas intempestivas, por las risas y las locuras de Azucena. Muchísimas gracias, muchas horas entre las cuatro paredes de ese laboratorio, me habéis hecho sentir como en casa, gracias por enseñarme ese “mundo” que rodea a las células. Gracias a todos esos usuarios, Sergio, Patricia, Victoria, Antonio, Fran, Ana, Consuelo,... Sin horario cuando estamos en cultivos, por todos esos momentos en gran compañía.

Gracias a las Facultades de Biología y Veterinaria, por haberme acogido durante los años de Licenciatura y Doctorado, en especial al Departamento de Ciencias Sociosanitarias y los Programas de Doctorado “Medicina Legal y Toxicología” e “Integración y Modulación de Señales en Biomedicina”.

Gracias a los miembros del Departamento de Anatomía Patológica, en especial a D. Antonio Bernabé, por acercarme a la microscopía, por las horas empleadas en ello y por su amabilidad.

Gracias al personal de la Sección de Microscopía del SAI, en especial a D. María García García, por tener siempre una preferencia especial cuando esos grandes monstruos se rompían y no había manera de ver resultados.

Esta tesis me ha permitido conocer a grandes personas, que ya siempre formarán parte de mi vida. Gracias Sergio, por tu paciencia, por tus enseñanzas de estadística y por

*las risas que nos hemos echado juntos estos años. Gracias Joaquín, por sentarte a mi lado en el curso de cultivos, por las horas interminables ayudándome con esta tesis... Por tu apoyo continuo, por tu ayuda, por llenar esta tesis de música, por ser un compañero y un amigo.*

*Gracias Silvia, mi compañera de carrera y de vida. Gracias por estar siempre en los buenos y los malos momentos, para reír y para llorar... ¡Y lo que nos queda!*

*Gracias a mis amigas, Machuca, Angélica, Verónica, Miriam, Natalia, Cristina y María, por preguntar siempre como iba con “las celulicas y los pingüinos”, por siempre darme ánimos y por estar siempre que os necesito.*

*Gracias a mis padres, por inculcarme el espíritu de superación, por ser un ejemplo de lucha constante, por haberme enseñado los principios y valores que rigen mi vida, por apoyarme siempre. A mis hermanos, por cuidar y presumir de hermana durante estos treinta y tres años. A toda mi familia, a los que están y a los que faltan, por preguntarme siempre y mirarme raro cuando les explicaba en qué consistía esto de las células.*

*A mi Maya, por acurrucarse conmigo en el sofá, por ir a buscarme al despacho con ganas de juego y por alegrarme esos días tan largos.*

*Por último a ti Alfonso, mi compañero, mi amigo y mi otra mitad... Por aguantarme y aportarme la paciencia que no tengo. Por ayudarme a no decaer y levantarme cuando lo hago. Por fin... llegó el final.*

*“Solo intenta encontrar tu espacio... Cuando a tu alrededor, todo se estrecha”*

## Resumen:

La contaminación a escala global y local podría estar afectando a una de las hasta ahora consideradas últimas regiones prístinas en el mundo, la Antártida. En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación fueron detectadas diferentes concentraciones de metales en diferentes tejidos de tres especies de pingüinos de la Península Antártica e Islas asociadas (*Pygoscelis antarctica*, *Pygoscelis papua* y *Pygoscelis adeliae*), considerados especies clave para la monitorización de dichos contaminantes. En la presente tesis se ha llevado a cabo la evaluación *in vitro* de los efectos producidos por dichas concentraciones de cadmio, plomo, cromo y selenio en dos líneas celulares: VERO, de origen renal y AML12, de origen hepático. Para ello se ha evaluado la citotoxicidad basal y las respuestas celulares asociadas a dicha exposición mediante el estudio de su efecto sobre la viabilidad celular, cambios estructurales y ultraestructurales, modificaciones sobre las distintas fases del ciclo celular, el tipo de muerte celular predominante, el estrés oxidativo (ROS) y la expresión de diferentes genes relacionados con la protección celular contra la toxicidad de metales (metalotioneína), el estrés celular (Heat-Shock protein-70), el estrés oxidativo (catalasa) y apoptosis (bax).

Para evaluar la viabilidad celular se empleó la técnica colorimétrica del MTT, mediante espectrofotometría; para evaluar el efecto sobre el ciclo celular y el tipo de muerte celular se utilizaron los reactivos IP e IP/anexina respectivamente, mediante citometría de flujo; los cambios estructurales y ultraestructurales fueron observados mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión; el estrés celular fue estudiado mediante la sonda DCFHA-DA por citometría de flujo y finalmente, el estudio de expresión génica se llevó a cabo mediante qPCR.

El ensayo de viabilidad celular mediante MTT muestra que la concentración media de individuos adultos para el cadmio impide la viabilidad celular en la línea celular VERO y sólo permite el 2% en AML12; en el caso del plomo ninguna concentración estudiada afecta de forma acusada sobre la viabilidad celular; el cromo afecta a la viabilidad celular con un porcentaje superior al 70% y dicha viabilidad, disminuye de forma destacada debido a la concentración media hallada en individuos juveniles en VERO y con el selenio la viabilidad celular resulta drásticamente afectada, siendo el porcentaje de células vivas no superior al 4% en ninguno de los casos.

Los datos obtenidos sobre los efectos causados en las distintas fases del ciclo celular, muestran que el cadmio en líneas generales provoca en VERO la disminución de la fase G0/G1 y el aumento de la fase S, al igual que en las concentraciones más elevadas en AML12, la CE<sub>50</sub> en plomo, el cromo en todos los casos y para las concentraciones más elevadas de selenio (concentración media hallada en individuos adultos, juveniles y pollos). Mientras que concentraciones menos elevadas de cadmio en AML12 (CE<sub>50</sub>, concentración media hallada en juveniles y pollos) producen el aumento de la fase G0/G1 y concentraciones menores de plomo el aumento de la fase G2/M.

La concentración media hallada en adultos y juveniles de cadmio en VERO y la concentración media de adultos en AML12, CE<sub>50</sub> del plomo en AML12, concentración media de pollos para el cromo en AML12 y selenio para concentraciones medias de adultos, juveniles y pollos provocan que más del 50% de las células se encuentren en estado de apoptosis o necrosis. En líneas generales, la muerte celular por apoptosis predomina sobre la necrosis.

El estudio morfológico muestra que los rasgos más característicos en ambas líneas celulares son la formación de cuerpos de inclusión (plomo y cromo), fuerte vacuolización, condensación mitocondrial (para todos los elementos) y células con un alto grado de degeneración o necrosadas cuando son tratadas con cadmio o selenio.

Todas las concentraciones empleadas salvo para el cromo en AML12 (no se observan diferencias significativas) y la concentración media de adultos para el cadmio (se produce un aumento significativo) producen la disminución de las unidades de fluorescencia (DCFH-DA) debido a la destrucción del material genético y la incapacidad de la célula para producir ROS, por lo que en este ensayo, los valores obtenidos sugieren un papel de ROS como indicador de mortalidad más que de toxicidad.

Determinadas concentraciones de cadmio y selenio encontradas en hígado y riñón de las tres especies de pingüino, producen la sobreexpresión de genes relacionados con la protección y el estrés celular.

Los resultados obtenidos evidencian el posible riesgo toxicológico que la contaminación en la Antártida puede provocar a nivel celular sobre las poblaciones de *Pygoscelis antarctica*, *Pygoscelis papua* y *Pygoscelis adeliae* en hígado y riñón.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	
<b>I. Introducción y Objetivos</b> .....	1
I.1 Introducción.....	2
I.2 Objetivos.....	5
<b>II. Revisión bibliográfica</b> .....	7
II.1 La Antártida. El continente blanco.....	8
II.1.1 Un continente helado.....	8
II.1.2 Contaminación ambiental en la Antártida.....	10
II.1.3. Pingüinos Pigoscélidos: Bioindicadores.....	15
II.1.4. Islas Shetland del sur y península Antártica.....	18
II.2. Contaminantes objeto de estudio.....	22
II.2.1. Cadmio.....	22
II.2.2. Plomo.....	25
II.2.3. Cromo.....	28
II.2.4. Selenio.....	31
II.3. Métodos alternativos.....	34
II.3.1. Clasificación de los métodos alternativos.....	37
II.3.2. Técnicas <i>in vitro</i> .....	38
II.3.3. Cultivos celulares.....	38
II.3.3.1. Historia.....	39
II.3.3.2. Aplicaciones.....	40
II.3.3.3. Bases de los cultivos celulares animales.....	41
II.3.3.4. Cultivos primarios y líneas celulares.....	44
II.3.3.5. Cinética de crecimiento.....	45
II.3.3.6. Conservación de líneas celulares.....	46
II.3.4. Ventajas e inconvenientes de los ensayos <i>in vitro</i> .....	47
II.3.5. Justificación de los ensayos <i>in vitro</i> .....	49
II.3.6. Indicadores de toxicidad <i>in vitro</i> .....	49
II.3.6.1. Morfología celular y tisular.....	49
II.3.6.2. Viabilidad celular.....	50
II.3.6.3. Proliferación celular.....	50
II.3.6.4. Membranas celulares.....	50
II.4. Ensayos de citotoxicidad.....	51
II.4.1. Yoduro de propidio.....	51

II.4.2. Lactato deshidrogenasa (LDH).....	52
II.4.3. Test del rojo neutro (RN).....	52
II.4.4. Ensayo de enlazamiento al azul de kenacid.....	53
II.4.5. Resazurina.....	53
II.4.6. Cristal violeta.....	54
II.4.7. Ensayo cometa.....	54
II.4.8. Test mitocondrial del MTT.....	54
II.5. Estudio de las células en microscopio óptico invertido (contraste de fases y fluorescencia).....	55
II.6. Estudio de las células en microscopio electrónico de transmisión (MET).....	56
II.7. Citometría de flujo.....	57
II.7.1 Introducción.....	57
II.7.2. Fundamento.....	57
II.8. Apoptosis y necrosis.....	59
II.8.1.Características morfológicas.....	61
II.8.2. Características bioquímicas y bases genéticas.....	63
II.8.3. Vías de iniciación del proceso de apoptosis.....	64
II.8.4. Técnicas de detección de apoptosis.....	67
II.9. Ciclo celular.....	73
II.9.1. Ciclo celular y citometría de flujo.....	77
II.9.1.2. Grupos generales de fluorocromos.....	77
II.9.1.3. Estudio del ciclo celular y las aneuploidías.....	79
II.10. Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	80
II.10.1. Principales sondas empleadas en citometría de flujo para la detección del estrés oxidativo .....	83
II.10.1.1. 2,7- Diclorodifluorescein (DCFH).....	83
II.10.1.2. Dihidrorodamina 123.....	85
II.10.1.3. Dihidroetidio (HE).....	85
II.11. Expresión génica mediante PCR .....	86
II.11.1. Introducción.....	86
II.11.2. Fluorocromos empleados.....	88
II.11.3. Controles endógenos.....	88
II.11.4. Métodos de cuantificación.....	88
II.11.5. Genes objeto de estudio.....	89
II.12. Toxicidad y células en cultivo.....	90



II.12.1. Citotoxicidad.....	90
II.12.2. Genotoxicidad.....	97
II.12.3. Alteraciones morfológicas.....	102
II.12.4. Apoptosis.....	107
II.12.5. Estrés oxidativo.....	113
<b>III. Material y métodos.....</b>	<b>121</b>
III. 1.Introducción: Metales empleados.....	122
III. 2. Material de trabajo.....	123
III.2.1. Líneas celulares y medios de cultivo.....	123
III.2.2. Reactivos.....	124
III.2.2.1. Metales.....	124
III.2.2.2. Ensayo MTT.....	125
III.2.2.3. Viabilidad celular.....	125
III.2.2.4. Test de micoplasmas.....	126
III.2.2.5. Ciclo celular por citometría de flujo.....	126
III.2.2.6. Apoptosis por citometría de flujo y microscopio de fluorescencia....	126
III.2.2.7. Microscopio electrónico de transmisión.....	127
III.2.2.8. Ensayo estrés oxidativo por citometría de flujo.....	127
III.2.2.9. Expresión génica.....	127
III. 3. Metodología.....	127
III.3.1. Preparación del medio de cultivo completo para línea celular VERO....	128
III.3.2. Preparación del medio de cultivo completo para línea celular AML12...	129
III.3.3. Descongelación de líneas celulares.....	129
III.3.4. Mantenimiento del cultivo celular.....	130
III.3.4.1. Cambios de medio de cultivo.....	130
III.3.4.2. Pases o subcultivos.....	130
III.3.4.3. Recuento y estimación de viabilidad.....	131
III.3.5. Congelación de células.....	132
III.3.6. Detección de micoplasmas.....	133
III.3.7. Test de viabilidad y citotoxicidad celular (ensayo MTT).....	135
III.3.7.1. Curvas de crecimiento .....	135
III.3.7.2. Patrones.....	138
III.3.7.3. Medida de la osmolaridad.....	139
III.3.7.4. Exposición de las células a diferentes concentraciones de de tóxicos .....	140

III.3.8. Citometría de flujo .....	142
III.3.8.1. Análisis del contenido de ADN: Ciclo celular por citometría de flujo.....	142
III.3.8.2. Discriminación entre apoptosis y necrosis por citometría de flujo	143
III.3.9. Microscopía óptica de contraste de fases.....	145
III.3.10. Microscopía electrónica de transmisión.....	146
III.3.11. Microscopía de fluorescencia.....	148
III.3.12. Estrés oxidativo (ROS).....	149
III.3.13. Expresión génica.....	150
<b>IV. Resultados y Discusión.....</b>	<b>153</b>
IV.1. Caracterización de la línea celular.....	154
IV.2. Curvas de crecimiento.....	158
IV.3. Detección de micoplasmas.....	163
IV.4. Control de osmolaridad.....	166
IV.5. Curva dosis-respuesta.....	168
IV.5.1. Línea celular VERO.....	168
IV.5.1.1. Cadmio.....	168
IV.5.1.2. Plomo.....	170
IV.5.1.3 Cromo.....	171
IV.5.1.4. Selenio.....	172
IV.5.2. Línea celular AML12.....	174
IV.5.2.1. Cadmio.....	174
IV.5.2.2. Plomo.....	175
IV. 5.2.3. Cromo.....	177
IV. 5.2.4. Selenio.....	178
IV.6. Ciclo celular.....	190
IV. 6.1. Línea celular VERO.....	192
IV. 6.1.1. Control.....	194
IV.6.1.2. Cadmio.....	195
IV.6.1.3. Plomo.....	197
IV.6.1.4. Cromo.....	199
IV.6.1.5. Selenio.....	200
IV.6.2. Línea celular AML12.....	202
IV. 6.2.1. Control.....	204
IV.6.2.2. Cadmio.....	205

IV.6.2.3. Plomo.....	206
IV.6.2.4. Cromo.....	207
IV.6.2.5. Selenio.....	209
IV.7. Apoptosis: Citometría de flujo.....	211
I.V.7.1. Línea celular VERO.....	212
I.V.7.2. Línea celular AML12.....	218
IV.8. Estudio morfológico.....	228
IV.8.1. Línea celular VERO.....	228
IV.8.1.1. Microscopía óptica.....	228
IV.8.1.2. Microscopía electrónica.....	233
IV.8.2. Línea celular AML12.....	241
IV.8.2.1. Microscopía óptica.....	241
IV.8.2.2. Microscopía electrónica.....	246
IV.9. Producción de especies reactivas de oxígeno: citometría de flujo.....	255
IV.9.1. Línea celular VERO.....	256
IV.9.1.1. Cadmio.....	257
IV.9.1.2. Plomo.....	258
IV.9.1.3. Cromo.....	258
IV.9.1.4. Selenio.....	259
IV.9.2. Línea celular AML12.....	261
IV.9.2.1. Cadmio.....	262
IV.9.2.2. Plomo.....	264
IV.9.2.3. Cromo.....	264
IV.9.2.4. Selenio.....	265
IV.10. Expresión génica.....	266
IV.10.1. Línea celular VERO.....	266
IV.10.1.1 Cadmio.....	266
IV.10.1.2. Plomo.....	268
IV.10.2. Línea celular AML12.....	269
IV.10.2.1 Cadmio.....	269
IV.10.2.2. Plomo.....	271
IV.10.2.3. Cromo.....	272
IV.10.2.4. Selenio.....	274
<b>V. Conclusiones.....</b>	<b>277</b>
<b>VI. Abreviaturas.....</b>	<b>281</b>

<b>VII. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>287</b>
---	------------

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Superficie helada en el Polo Sur durante la estación de verano e invierno 2013-2014 .....	8
Figura 2. Pasaje Drake.....	9
Figura 3. Cima del Monte Erebus.....	10
Figura 4. Buque factoría chino Kai-Xin cerca del Estrecho de Bransfield, 2013	12
Figura 5. Pingüino barbijo.....	13
Figura 6. Mala gestión de residuos en isla Rey Jorge.....	14
Figura 7. Pingüinos Adelia (A), papúa (B) y Barbijo (C).	16
Figura 8. Pingüinos Adelia (A), papúa (B) y barbijo (C).....	17
Figura 9. Estación científica chilena Frei y detalle de su aeródromo (isla Rey Jorge) .....	19
Figura 10. Áreas de estudio.....	21
Figura 11. Curva de crecimiento: fases .....	46
Figura 12. Espectro de luz visible.....	56
Figura 13. Diferentes microscopios y sus características.....	56
Figura 14. Fundamentos del citómetro de flujo.....	58
Figura 15. Esquema general del funcionamiento de un citómetro de flujo.....	59
Figura 16. Características morfológicas de la muerte celular por apoptosis y necrosis.....	62
Figura 17. Representación esquemática de las vías de señalización celular de activación de apoptosis en una célula.....	67
Figura 18. Etapas del ciclo celular.....	75
Figura 19. Reacciones de oxidación mediadas por el radical en presencia de oxígeno, proteínas hemo y glutatión .....	84
Figura 20. Gráfica de amplificación de PCR.....	87
Figura 21. Fluorocromo SYBR Green.....	88
Figura 22. Cabina de flujo laminar vertical.....	128
Figura 23. Centrifugadora.....	130
Figura 24. Contador automático de células.....	132
Figura 25. Microscopio de contraste de fase y de fluorescencia.....	135
Figura 26. Placa de 96 pocillos.....	136
Figura 27. Lector de placas Fluostar Galaxy.....	138
Figura 28. Osmómetro.....	140
Figura 29. Placa tras 24 horas de incubación con MTT. B. Placa con DMSO	141
Figura 30. Citómetro EPICS XL.....	143

Figura 31. Microscopio July.....	146
Figura 32. Microscopio electrónico JEOL (JEM-1011).....	148
Figura 33. Curva patrón para la línea celular VERO.....	154
Figura 34. Ajuste lineal VERO.....	155
Figura 35. Curva patrón para la línea celular AML12.....	156
Figura 36. Ajuste exponencial línea celular AML12.....	156
Figura 37. Curvas de crecimiento con distintas inoculaciones para línea celular VERO.....	159
Figura 38. Curvas de crecimiento con distintas inoculaciones para línea celular VERO.....	161
Figura 39. Imagen de células VERO mediante el microscopio de contraste de fases.....	164
Figura 40. Imagen de células VERO mediante el microscopio de fluorescencia	164
Figura 41. Imagen de células AML12 mediante el microscopio de contraste de fases.....	165
Figura 42. Imagen de células AML12 mediante el microscopio de fluorescencia	165
Figura 43. Curva dosis-respuesta de la línea celular VERO tras la exposición a $CdCl_2$ .....	169
Figura 44. Curva dosis-respuesta de la línea celular VERO tras la exposición a $Pb(NO_3)_2$ .....	170
Figura 45. Curva dosis-respuesta de la línea celular VERO tras la exposición a $CrO_3$ .....	171
Figura 46. Curva dosis-respuesta de la línea celular VERO tras la exposición a $SeCl_4$ .....	173
Figura 47. Curva dosis-respuesta de la línea celular AML12 tras la exposición a $CdCl_2$ .....	174
Figura 48. Curva dosis-respuesta de la línea celular AML12 tras la exposición a $Pb(NO_3)_2$ .....	176
Figura 49. Curva dosis-respuesta de la línea celular AML12 tras la exposición a $CrO_3$ .....	177
Figura 50. Curva dosis-respuesta de la línea celular AML12 tras la exposición a $SeCl_4$ .....	179
Figura 51. Representación gráfica del estudio estadístico de ciclo celular para la línea celular VERO.....	193

Figura 52. A. Histograma correspondiente a la muestra control. B. Dot Plot del cultivo control de VERO representando la granulometría frente al tamaño. C. Dot Plot del cultivo control VERO representando el área frente a la amplitud del pico.	194
Figura 53. Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a $CE_{50}$ de $CdCl_2$ .....	197
Figura 54. Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a $CE_{50}$ de $Pb(NO_3)_2$ .....	198
Figura 55. Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a concentración media de individuos juveniles de $CrO_3$ .....	200
Figura 56. Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a la concentración media de individuos adultos de $Cl_4Se$ .....	201
Figura 57. Representación gráfica del estudio estadístico de ciclo celular para la línea celular AML12.....	203
Figura 58. A. Histograma correspondiente a la muestra control. B. Dot Plot del cultivo control de AML12 representando la granulometría frente al tamaño. C. Dot Plot del cultivo control AML12 representando el área frente a la amplitud del pico	204
Figura 59. Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a la concentración media de individuos adultos de $CdCl_2$ .....	206
Figura 60. Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a $CE_{50}$ de $Pb(NO_3)_2$ .....	207
Figura 61. Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a la concentración media de individuos adultos de $CrO_3$ .....	208
Figura 62. Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a $CE_{50}$ de $SeCl_4$ .....	209
Figura 63. Citometría de flujo para células VERO: control (A), concentración media de adultos de $CdCl_2$ (B), $CE_{50}$ de $Pb(NO_3)_2$ (C),concentración media de juveniles de $CrO_3$ (D) y concentración media de adultos $Cl_4Se$ (E).....	213
Figura 64. Representación gráfica del porcentaje de células en cada estado para los cuatro compuestos en células VERO.....	217
Figura 65. Citometría de flujo para células AML12: control (A), concentración media de adultos de $CdCl_2$ (B), $CE_{50}$ de $Pb(NO_3)_2$ (C),concentración media de juveniles de $CrO_3$ (D) y concentración media de pollos $Cl_4Se$ (E).....	219

Figura 66. Células AML12 positivas a IP/anexina sometidas a CE <sub>50</sub> de selenio	225
Figura 67. Representación gráfica del porcentaje de células en cada estado para los cuatro compuestos en células AML12.....	226
Figura 68. Control línea celular VERO (20X+1.5).....	229
Figura 69. Células sometidas a concentración media de cadmio de individuos juveniles. A. Células en división (anafase). B. Células con citoplasma condensado. C. Células degeneradas.....	230
Figura 70. Células sometidas a concentración media de plomo de pollo. A. Condensación y vacuolización citoplasmática. B. Célula en mitosis. C. Pérdida de límites celulares. D. Restos celulares .....	231
Figura 71. Células sometidas a la concentración media de cromo de pollos. A. Célula con citoplasma condensado y vacuolizado. B. Restos celulares.....	232
Figura 72. Células sometidas a concentración media de selenio en pollos.....	233
Figura 73. Control de línea celular VERO (5800X-9700X).....	234
Figura 74. Célula sometida a concentración media de cadmio de individuos adultos (3900X).....	236
Figura 75. Células sometidas a concentración máxima de plomo encontrada en individuos adultos (5800X). A. Mitocondria. B. Lisosoma secundario .....	239
Figura 76. Células sometidas a la concentración media de individuos adultos en cromo (9700X). Pueden observarse diferentes grados de degeneración en las mitocondrias.....	240
Figura 77. Célula VERO sometida a la CE <sub>50</sub> de selenio (5800X).....	241
Figura 78. Control línea celular AML12 (20X+1.5).....	242
Figura 79. Células sometidas a concentración media de plomo en pollos (20X+1.5).....	243
Figura 80. Células sometidas a la concentración de plomo en pollos (20X+1.5). Se pueden apreciar diferentes grados de vacuolización citoplasmática y degeneración celular.....	244
Figura 81. Células sometidas a la concentración media de cromo de individuos juveniles (20X+1.5). Pueden observarse los grandes espacios vacíos con prolongaciones citoplasmáticas y la condensación celular con pérdida de morfología típica epitelial.....	245
Figura 82. Células sometidas a la concentración media de selenio de individuos adultos (20X+1.5).A. Condensación nuclear. B. Célula muerta.....	246
Figura 83. Célula muestra control AML12 (13500X).....	247



Figura 84. A Células sometidas a concentración. A. Célula sometida a concentración media de cadmio de individuos adultos (5800X-13500X). B. Célula sometida a la CE50 de cadmio (2400X-9700X).....	248
Figura 85. Células sometidas a concentración media de plomo encontrada en individuos adultos (5800X-13500X). A. Inclusión lipídica. B. Lisosomas secundarios. C. Citoplasma muy vacuolizado.....	249
Figura 86. Células sometidas a CE50 de cromo (8000X).....	250
Figura 87. Célula sometida a CE50 de selenio (3400X-13500X).....	252
Figura 88. Representación gráfica del estudio estadístico de la producción de ROS para la línea celular VERO .....	256
Figura 89. Solapamiento de los histogramas para las concentraciones de selenio en la línea celular VERO.....	260
Figura 90. Representación gráfica del estudio estadístico de la producción de ROS para la línea celular AML12 .....	261
Figura 91. Solapamiento de los histogramas para las concentraciones de cadmio en la línea celular AML12.....	263
Figura 92. Expresión génica de células VERO expuestas a las concentraciones de Cd para los genes Mtt, Hsp13, Cat y Bax.....	268
Figura 93. Expresión génica de células VERO expuestas a las concentraciones de Pb para los genes Mtt, Hsp13, Cat y Bax.....	269
Figura 94. Expresión génica de células AML-12 expuestas a las concentraciones de Cd para los genes mtt, hspa, cat y bax.....	271
Figura 95. Expresión génica de células AML-12 expuestas a las concentraciones de Pb para los genes mtt, hspa, cat y bax.....	272
Figura 96. Expresión génica de células AML-12 expuestas a las concentraciones de Cr para los genes mtt, hspa, cat y bax.....	273
Figura 97. Expresión génica de células AML-12 expuestas a las concentraciones de Se para los genes mtt, hspa, cat y bax.....	274

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades del cadmio .....	22
Tabla 2. Propiedades del plomo .....	25
Tabla 3. Propiedades del cromo .....	29
Tabla 4. Propiedades del selenio .....	32
Tabla 5. Ventajas y limitaciones de los métodos alternativos.....	35
Tabla 6. Clasificación de los métodos experimentales alternativos.....	37
Tabla 7. Ventajas y limitaciones de los ensayos in vitro.....	47
Tabla 8. Comparación de características citomorfológicas de los procesos de muerte celular: apoptosis y necrosis.....	63
Tabla 9. Resumen de las principales técnicas y sus características más relevantes .....	73
Tabla 10. Resumen de las principales sondas empleadas .....	86
Tabla 11. Estudios de citotoxicidad realizados por diferentes autores .....	95
Tabla 12. Estudios de genotoxicidad realizados por diferentes autores .....	100
Tabla 13. Estudios morfológicos realizados por diferentes autores .....	106
Tabla 14. Estudios sobre apoptosis realizados por diferentes autores .....	112
Tabla 15. Diversos estudios de determinación de ROS realizados por diferentes autores .....	118
Tabla 16. Concentraciones máximas y mínimas encontradas en riñón y su equivalencia para las diferentes sales .....	122
Tabla 17. Concentraciones máximas y mínimas encontradas en hígado y su equivalencia para las diferentes sales .....	122
Tabla 18. Concentraciones medias en individuos adultos, juveniles y pollos. Niveles no detectables .....	123
Tabla 19. Longitudes de onda de anexina y yoduro de propidio .....	144
Tabla 20. Primers utilizados para el análisis de la expresión génica mediante qPCR para la línea celular AML12 (Sigma® y Quiagen®) .....	152
Tabla 21. Primers utilizados para el análisis de la expresión génica mediante qPCR para la línea celular VERO (Sigma®) .....	152
Tabla 22. Absorbancia según el número de células para la línea celular VERO .....	155
Tabla 23. Absorbancia según el número de células para línea celular AML12 ..	157
Tabla 24. Datos estadísticos de la curva patrón para ambas líneas celulares ..	157
Tabla 25. Absorbancia según las células inoculadas inicialmente y el tiempo de crecimiento para la línea celular VERO .....	160
Tabla 26. Absorbancia según las células inoculadas inicialmente y el tiempo de	

crecimiento para la línea celular AML12 .....	162
Tabla 27. Valores de osmolaridad para las preparaciones de la línea celular VERO .....	166
Tabla 28. Valores de osmolaridad para las preparaciones de la línea celular AML12 .....	167
Tabla 29. Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de CdCl <sub>2</sub> con respecto al grupo control en la línea celular VERO.....	169
Tabla 30. Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> con respecto al grupo control en la línea celular VERO	170
Tabla 31. Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de CrO <sub>3</sub> con respecto al grupo control en la línea celular VERO.....	172
Tabla 32. Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de SeCl <sub>4</sub> con respecto al grupo control en la línea celular VERO .....	173
Tabla 33. Valores que indican el ajuste entre la ecuación y los datos correspondientes a línea celular VERO .....	174
Tabla 34. Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de CdCl <sub>2</sub> con respecto al grupo control en la línea celular AML12 .....	175
Tabla 35. Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> con respecto al grupo control en la línea celular AML12	176
Tabla 36. Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de CrO <sub>3</sub> con respecto al grupo control en la línea celular AML12 .....	177
Tabla 37. Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de SeCl <sub>4</sub> con respecto al grupo control en la línea celular AML12 .....	179
Tabla 38. Valores que indican el ajuste entre la ecuación y los datos correspondientes a línea celular AML12 .....	180
Tabla 39. Concentraciones medias de individuos adultos, juveniles y pollos y CE <sub>50</sub> hallada en la línea celular VERO expuesta a las diferentes sales .....	181
Tabla 40. Concentraciones medias de individuos adultos, juveniles y pollos y CE <sub>50</sub> hallada en la línea celular AML12 expuesta a las diferentes sales .....	182
Tabla 41. Comparación de la CE <sub>50</sub> en cada línea celular con los cuatro metales	182
Tabla 42. Comparación de la CE <sub>50</sub> de cada metal en ambas líneas celulares ...	186
Tabla 43. % de viabilidad con respecto al control de las distintas concentraciones medias .....	187
Tabla 44. Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en la línea VERO	192
Tabla 45. Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular de la línea AML12	202
Tabla 46. Porcentajes de células por cuadrante en la línea celular VERO .....	212

Tabla 47. Porcentajes de células por cuadrante en la línea celular AML12 .....	218
Tabla 48. Comparación entre ambas líneas del estado celular tras la inoculación de CE <sub>50</sub> .....	227
Tabla 49. Tipo de muerte predominante según concentración.....	227
Tabla 50. Unidades de intensidad de fluorescencia media obtenida para cada línea celular .....	255
Tabla 51. Tabla resumen de resultados.....	275



**INTRODUCCIÓN Y  
OBJETIVOS**

### **I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

#### **I.1. INTRODUCCIÓN**

La Antártida ha sido considerada hasta hoy uno de los últimos territorios vírgenes del planeta. El Tratado Antártico es el acuerdo internacional firmado en 1959 que gobierna las actividades de este continente y declara a la Antártida como una reserva natural dedicada a la paz y a la investigación científica. Entre el desarrollo del Tratado Antártico se encuentra el Protocolo de Madrid que se firmó en 1991 y entró en vigor en 1998 y entre cuyos principales aspectos están la protección de la flora y la fauna. Con el objeto de proteger la vida autóctona de la Antártida, está prohibido matar, herir, manipular y molestar a los animales o dañar la vegetación (artículo 3). Sin embargo, se han publicado diferentes estudios que indican que el continente blanco, cada vez se está viendo más afectado por diversos factores diferentes de los considerados dentro de dicho artículo del Protocolo de Madrid, tales como la contaminación local y global, el cambio climático, impactos puntuales y el aumento del turismo (Bargagli, 2008; Barbosa *et al.*, 2012).

Cada uno de estos factores está influyendo negativamente en las condiciones ambientales y en la biodiversidad del continente. Así mismo, varios estudios evidenciaron la presencia de tóxicos en distintas poblaciones de pingüinos como el Fe, Zn, Cu, Mn, Cd, Hg, Ag, Co, Ni y Pb (Honda *et al.*, 1986; Szefer *et al.*, 1993). Posteriormente, estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, han puesto de manifiesto el incremento de los mismos en diferentes especies de pingüinos (*Pygoscelis antarctica* o pingüino barbijo, *Pygoscelis papua* o pingüino papúa, *Pygoscelis adeliae* o pingüino de Adelia (Jerez *et al.*, 2011, 2013a y 2013b).

Los pingüinos son útiles indicadores biológicos para la contaminación por metales pesados en el medio, debido a su amplia distribución y su posición elevada en la cadena trófica de dicho continente.

En dichos estudios previos, los niveles de Cd muestran que este metal tóxico se acumula principalmente en riñón e hígado en comparación con el resto de tejidos (músculo, hueso, contenido estomacal y pluma), siendo mayores las concentraciones sobre individuos adultos que sobre juveniles y pollos, llegando a alcanzar en especímenes adultos niveles superiores a umbrales tóxicos descritos en pájaros para

tejido renal (Furness, 1996; Larison *et al.*, 2000; Rodrigue *et al.*, 2007 y Stout *et al.*, 2002).

De la misma forma los datos obtenidos en dichos estudios previos muestran que el Se se acumula principalmente en hígado y riñón, siendo para el hígado niveles superiores al umbral de toxicidad establecido por Lemley (1993) en aves acuáticas.

Los niveles de Pb en los tejidos internos en estudios previos no han sido relevantes, pero si se ha observado una acumulación de este metal en plumas debido a su afinidad por las formaciones de calcio. A pesar de no encontrarse concentraciones significativas de dicho metal en tejidos blandos, la monitorización del plomo se ha empleado a menudo para evaluar la presencia de contaminación antropogénica en el entorno (Sun y Xie, 2011) debido a factores locales o fenómenos globales.

En lo referente al Cr, los resultados obtenidos por Jerez *et al.*, (2013a) parecen indicar un aumento en la concentración de dicho metal, ya que en estudios previos no se encontraron niveles detectables de dicho metal (Szefer *et al.*, 1993). Este posible aumento puede estar relacionado con el aumento de la presencia humana en algunas áreas de la Antártida, ya que dicho metal está asociado con el uso y contaminación por combustibles (Alam y Sadiq 1993; Caccia *et al.*, 2003).

Hasta hace algunos años el animal de laboratorio había sido la herramienta de trabajo con que contaba la ciencia para la investigación de los procesos y mecanismos fisiológicos, bioquímicos y toxicológicos.

La presión social ha motivado que la comunidad científica, se haya interesado en el constante desarrollo de nuevos métodos alternativos mucho más refinados, que emplean un menor número de animales en la investigación toxicológica y farmacológica de nuevas sustancias. En la mayoría de los casos proporcionan unos resultados equivalentes y a veces mejores a los obtenidos con animales de experimentación (caso de estudios sobre mecanismos de acción, a nivel celular, etc.). Los avances científicos-técnicos han influido en diversas disciplinas como la toxicología, incorporando nuevas técnicas que van desde el empleo del microscopio electrónico, hasta la manipulación genética de los animales de experimentación (NRC, 2007).

Las alternativas biológicas al uso de animales superiores vivos al uso de animales superiores vivos para el estudio de la toxicidad producida por compuestos químicos son muy variadas e incluye el uso de invertebrados, microorganismos, plantas, microalgas y preparaciones *in vitro*, siendo éstas últimas las que están experimentando en nuestros días un mayor desarrollo (Repetto, 1995). Dentro de los métodos *in vitro* se distinguen principalmente el cultivo de órganos, los explantes, los cultivos primarios, las líneas celulares y los sistemas libres de células.

Las líneas celulares establecidas representan un modelo alternativo que posibilita la obtención de resultados reproducibles. Las células inmortalizadas ofrecen gran homogeneidad y son de fácil mantenimiento y manipulación, lo que permite tener bajo control todas las condiciones de crecimiento del cultivo (temperatura, pH, humedad, composición del medio de cultivo) y realizar diseños experimentales muy versátiles que combinen la evaluación de grandes rangos de concentración de diferentes compuestos tóxicos (Austin y Mothersill, 2003; Barile, 2008; Peropadre, 2014).

Los estudios en los que se emplean células, suponen una aproximación de la respuesta a nivel de organismo completo. Así, los efectos tóxicos que se producirían en un animal completo, se transforman en alteraciones de las funciones celulares básicas (Walum, 1998). A pesar de que no puede realizarse una extrapolación directa entre los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* y los organismos completos, cada vez son más numerosos los estudios que muestran una buena correlación entre pruebas de citotoxicidad basal y valores de toxicidad aguda *in vivo* (Walum, 1998; ECVAM, 2002; Peropadre, 2014).

La mayoría de compuestos químicos reflejan su toxicidad a nivel basal, ya que en última instancia las alteraciones de las funciones celulares tienen su origen en interacciones inespecíficas del compuesto con las diferentes estructuras subcelulares (Ekwall, 1995; Eisenbrand *et al.*, 2002; Peropadre, 2014). Esta circunstancia sitúa a la citotoxicidad basal como punto de referencia esencial en los estudios de toxicidad.

En resumen, los modelos celulares *in vitro* empiezan a ser considerados una herramienta muy conveniente en la valoración toxicológica, capaz de proporcionar un conocimiento más exhaustivo de los efectos tóxicos de los xenobióticos a nivel sistémico, celular y molecular.



## I.2. OBJETIVOS

La presente tesis doctoral pretende analizar los efectos en cultivos celulares de riñón e hígado, de las concentraciones de determinados contaminantes encontrados en tres especies de pingüinos que cohabitan en la península Antártica e islas asociadas. Los objetivos concretos de este estudio se detallan a continuación:

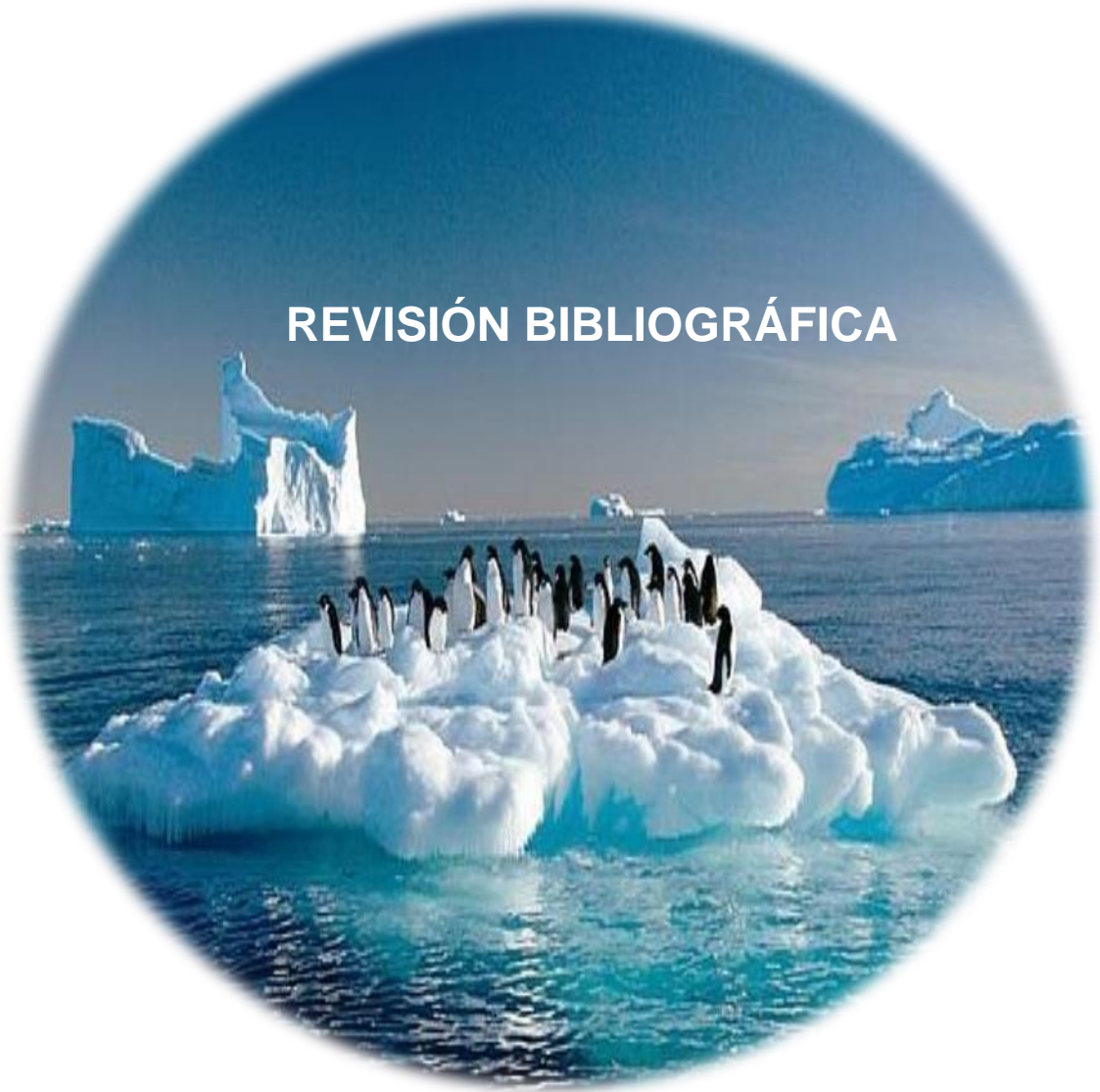
- Evaluar la viabilidad de las líneas celulares VERO y AML12 expuestas a concentraciones efectivas 50 ( $CE_{50}$ ) de cloruro de cadmio, nitrato de plomo, trióxido de cromo y tetracloruro de selenio mediante la técnica colorimétrica del MTT.
- Determinar las dosis que afectan a la viabilidad en cada línea celular y con cada tóxico, comparando esta afectación con la producida por las concentraciones medias de metales encontradas en tres especies de pingüino (*Pygoscelis antarctica* o pingüino barbijo, *Pygoscelis papua* o pingüino papúa y *Pygoscelis adeliae* o pingüino de Adelia).
- Evaluar las respuestas celulares resultantes de la exposición a concentraciones efectivas 50 ( $CE_{50}$ ) y concentraciones medias de individuos adultos, juveniles y pollos halladas en las tres especies de pingüino de cloruro de cadmio, nitrato de plomo, óxido de cromo (VI) y tetracloruro de selenio en ambas líneas celulares, estudiando cómo afectan a su ciclo celular y el tipo de muerte celular más representativa que experimentan mediante citometría de flujo.
- Analizar los cambios estructurales y ultraestructurales que presentan dichas líneas celulares, tras la exposición a las diferentes concentraciones de compuestos inorgánicos, abordando el estudio de los cambios morfológicos producidos por muerte celular.
- Evaluar la respuesta de estrés oxidativo por el incremento o disminución a nivel mitocondrial de especies reactivas de oxígeno ROS tras la exposición a concentraciones efectivas 50 ( $CE_{50}$ ) y concentraciones medias de individuos adultos, juveniles y pollos halladas en las diferentes poblaciones de pingüinos de los distintos compuestos inorgánicos utilizando citometría de flujo.

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

---

- Estudiar el efecto de los distintos tóxicos hallados en las diferentes poblaciones de pingüinos en la variación de la expresión de diferentes genes relacionados con la protección celular contra la toxicidad de metales pesados (metalotioneína), el estrés celular (Heat-shock protein-70), el estrés oxidativo (catalasa) y la apoptosis (Bcl-2 asociado a la proteína X) mediante qPCR.
- Validar la utilidad de los estudios *in vitro* para complementar los datos resultantes de los estudios *in vivo* realizados por nuestro grupo de investigación en la Antártida, poniendo en valor la biomonitorización realizada con pingüinos para evaluar el riesgo toxicológico de la exposición a estos contaminantes

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



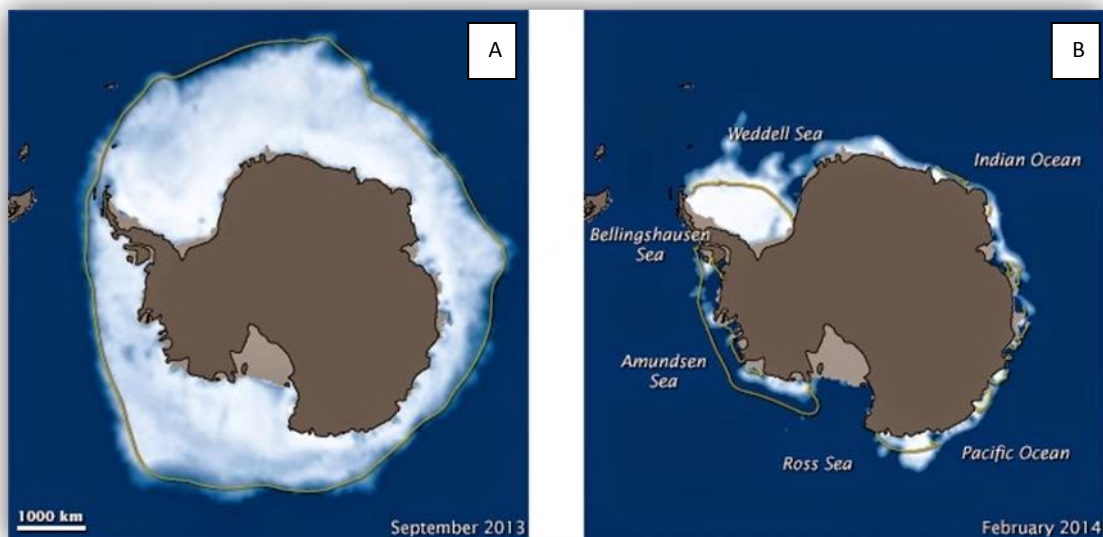
## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### II.1. LA ANTÁRTIDA: EL CONTINENTE BLANCO

#### II.1.1. UN CONTINENTE HELADO

El continente antártico tiene una forma casi circular, de la que sobresale la península Antártica en dirección sur-norte. Tiene un diámetro de unos 4500 km y una superficie de alrededor de 14 millones de km<sup>2</sup>; de esta, menos del 2 % se encuentra libre de hielo (Bargagli, 2008).

Prácticamente la totalidad del relieve antártico se encuentra bajo una gruesa cubierta de hielo, que llega a superar en algunas zonas los 4500 m de espesor. Durante el invierno el mar circundante se congela duplicando la superficie helada del continente. Los análisis llevados a cabo a través de satélites sobre la evolución del hielo marino indican respuestas heterogéneas frente a cambios climáticos recientes. En general la Antártida está experimentando un aumento en el espesor y extensión de hielo marino, mientras que en la península Antártica disminuye la cobertura helada, coincidiendo con un aumento de las temperaturas en esta última zona (Fig. 1), que parece ser la más afectada por el cambio global (Davis *et al.*, 2005; Newton, 2008; Steig *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Superficie helada en el Polo Sur durante la estación de verano e invierno 2013-2014. *Fuente: NASA.*

Es el continente más frío, más seco, más ventoso y con mayor altura media (más de 2.000 m sobre el nivel del mar) del planeta. Su tamaño es superior al de Australia y algo menor que el de América del Sur. Está separado de la última por el pasaje Drake (Fig. 2) o mar de Hoces, de casi 1.000 km, mientras que la distancia a África y a Australia es de 3.800 y 2.500 km, respectivamente. Es un continente rodeado por océanos, a diferencia del Ártico, que es, en esencia, un océano rodeado por continentes (Izaguirre y Mataloni, 2000).



**Figura 2.** Pasaje Drake

En la Antártida existen algunos volcanes activos, como en isla Decepción, en el sector septentrional de la península Antártica, o el Erebus (Fig. 3), de 3.794 m de altura, en la isla Ross (Antártida oriental), que domina la barrera de hielo de Ross. Se conocen más de 150 lagos ocultos bajo el hielo antártico, en algún caso a más de 3.600 m bajo la superficie, como el lago Vostok, que con unos 14.000 km<sup>2</sup> de extensión tiene un tamaño similar al del lago Maracaibo (Venezuela).



**Figura 3.** Cima del Monte Erebus. *Fuente: George Steinmetz, Corbis*

#### II.1.2. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN LA ANTÁRTIDA

El desarrollo económico e industrial del último siglo a nivel global, ha conllevado la liberación masiva al ambiente de multitud de contaminantes que han tenido repercusiones inesperadas y, en algunos casos, incontrolables. La persistencia y capacidad de dispersión de determinados compuestos y elementos químicos en el ambiente, así como su capacidad de introducción y acumulación en los sistemas biológicos, trae consigo la incorporación de nuevos términos a la actualidad científica e incluso social a nivel internacional tales como bioacumulación, biomagnificación o transporte de contaminantes a gran escala.

La Antártida ha sido considerada durante décadas como una de las pocas regiones prístinas del planeta, símbolo global de conservación, aislada por barreras naturales de masas de agua y corrientes atmosféricas procedentes de otras zonas. Pero esta idea de región totalmente impoluta empezó a ser cuestionada en la década de los 60, cuando Sladen *et al.* (1963), detectaron por primera vez el plaguicida DDT (diclorodifeniltricloroetano) y algunos de sus congéneres en muestras biológicas antárticas, aunque evidentemente nunca se habían utilizado plaguicidas en este continente. Desde entonces otros muchos contaminantes de naturaleza persistente han sido detectados en muestras procedentes de la Antártida (UNEP, 2002), evidenciando que ni siquiera la región más aislada del planeta estaba protegida de la contaminación y de su alcance global (Bargagli, 2008). Por ello, en los últimos años las

investigaciones sobre la abundancia y comportamiento de los contaminantes ambientales en los ecosistemas antárticos, han adquirido un gran interés para la comunidad científica internacional (Bargagli, 2005a; Smichowski *et al.*, 2006).

Por un lado, es importante investigar los niveles basales de elementos traza y otros contaminantes en áreas relativamente no contaminadas, como la Antártida, los cuales puedan ser tomados como valores basales de referencia global (Ancora *et al.*, 2002) a la hora de evaluar la presencia de contaminación en otros ecosistemas. Por otro, es fundamental tener en cuenta que el transporte de contaminantes persistentes (orgánicos e inorgánicos) emitidos en otras zonas del planeta, puede alcanzar y alcanza áreas tan remotas como la Antártida (Bargagli, 2008; Smichowski *et al.*, 2006).

La Antártida no es ajena por tanto a los contaminantes que el hombre ha emitido durante décadas, pero además en la actualidad, otros factores como el cambio climático o el creciente desarrollo urbanístico e industrial, así como el aumento poblacional de los países del hemisferio sur, pueden aumentar la deposición e impacto de la contaminación antropogénica en la Antártida (Bargagli, 2008).

A escala global, los impactos más importantes debidos a la presencia humana en la Antártida son (Rodríguez, 2012): la pérdida de suelos y ambientes vírgenes (Hughes *et al.*, 2011), las oscilaciones inducidas en poblaciones de fauna y flora por la caza histórica y la sobrepesca (Smith y Simpson 1987), las emisiones globales de CO<sub>2</sub> de los programas nacionales y turísticos (Farreny *et al.*, 2011), la contaminación acumulada derivada de infraestructuras, y el cambio en la biodiversidad terrestre y marina por introducción y extinción local de especies (Frenot *et al.*, 2005). También hay que tener en cuenta los impactos mundiales, entre los que destacan los efectos derivados del cambio climático que inciden en la Antártida (Vaughan *et al.*, 2003, Turner *et al.*, 2005, Turner *et al.*, 2009), así como pérdida de biodiversidad (Convey, 2006).

La contaminación en la Antártida no es solo un fenómeno global, sino que debe también ser considerada como una problemática local. Diferentes actividades, como actividades pesqueras, actividades turísticas, quema de combustibles para transportes y producción de energía, uso de pinturas y baterías, vertido o derrame de residuos sólidos y líquidos o incineración de residuos, entre otras, llevadas a cabo en el pasado y en el presente en el continente antártico y sus islas, pueden contribuir al aumento de la contaminación ambiental.



Tras el Año Geofísico Internacional (1957-58), las actividades humanas en la Antártida han ido en aumento causando problemas de contaminación (dos Santos *et al.*, 2005). Como atenuante, se debe considerar que los ecosistemas antárticos costeros son especialmente sensibles a las modificaciones antropogénicas, ya que la mayoría de las actividades e impactos humanos se concentran en estas zonas costeras libres de hielo en verano (aproximadamente un 2 % de la superficie total del continente).

Desde hace una década se empezaron a detectar aumentos en los niveles de contaminantes relacionados con las estaciones científicas y sus actividades asociadas, accidentes (Fig. 4), vertidos aislados e impactos del creciente turismo (Vodopivec y Curtosi, 1998). La mayor parte de esta actividad se concentra en la península Antártica y archipiélago de las Shetlands del Sur donde se encuentran la mayoría de las estaciones científicas y la mayoría de los lugares de visita turísticos (Lynch *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Buque factoría chino Kai-Xin cerca del Estrecho de Bransfield, 2013

*Fuente: Fuerza Aérea de Chile*

Algunas de las localizaciones de las cuales proceden los datos de compuestos tóxicos utilizados en esta tesis doctoral, han sido señaladas entre las zonas con mayor presión antropogénica de la Antártida. Por ejemplo solamente la isla Decepción, recibió 9959 turistas en la campaña 2013-2014 (IAATO, 2015); por Bahía Paraíso



pasaron 23156 turistas, mientras que en la isla Rey Jorge se encuentra la mayor concentración de estaciones científicas, además de ser también un sitio con gran afluencia de turistas.

Un estudio reciente, confirma una disminución significativa en la población reproductora de pingüinos barbijo en algunas de las colonias más grande de la Isla Decepción (Baily Head y Vapour Col), debida posiblemente al aumento de temperatura (3°C anualmente y 5°C en invierno) y al impacto negativo que podría estar ocasionando un aumento del turismo en la primera (Barbosa *et al.*, 2012; Lynch *et al.*, 2012).



**Figura 5.** Pingüino barbijo. *Fuente: IAATO, 2015*

Si bien en los últimos años, con la entrada en vigor del Protocolo de Protección Ambiental para el Tratado Antártico (Protocolo de Madrid, 1991), existe un marco más exigente para la regulación y control de las actividades humanas en la Antártida, durante décadas pasadas la gestión de los residuos (Fig. 6) y otras muchas acciones, fueron llevadas a cabo sin ninguna consideración para la salud ambiental de la región (Curtosi *et al.*, 2010).



**Figura 6.** Mala gestión de residuos en isla Rey Jorge

*Fuente: British Antarctic Survey (antarctica.ac.uk) y Gateway Antarctica (anta.canterbury.ac.nz)*

Otro factor a tener en cuenta es, que las zonas libres de hielo son los lugares más explotados por el ser humano pese a su escasez, ya que contienen grandes valores naturales y científicos por lo que son los lugares ocupados por los investigadores. Por otro lado, los barcos turísticos acumulan sus desembarcos en estos espacios ya que la biología terrestre muestra aquí su mayor riqueza. Así, las zonas libres de hielo contienen muchos de los valores naturales de la Antártida que a su vez son vulnerables a las perturbaciones (Pertierra y Hughes, 2013).

Los contaminantes ambientales que afectan a la Antártida, bien por su emisión a nivel local o bien porque alcanzan la región tras ser transportados a gran escala desde otros continentes, pueden dividirse en dos grandes grupos: los de naturaleza inorgánica (metales pesados – elementos traza) y los de naturaleza orgánica. Los compuestos inorgánicos tienen la característica de estar presentes de manera natural en los ecosistemas terrestres y acuáticos, y de ser en algunos casos esenciales en determinadas cantidades para la vida. Sin embargo, diversas actividades antropogénicas pueden emitirlos al ambiente en cantidades “no naturales”, provocando un desequilibrio en sus ciclos y potenciales efectos nocivos en los organismos (Jerez *et al.*, 2011).

La contaminación por metales pesados y otros elementos inorgánicos provoca gran preocupación a escala global, regional y local debido a la influencia que ejercen sobre la integridad funcional y estructural de los ecosistemas (Malik y Zeb, 2009). El estudio sobre su presencia y comportamiento en zonas antárticas con diferente

presión antrópica, puede contribuir a comprender la influencia real del hombre en la contaminación ambiental de la región. Aunque estos elementos se encuentran de manera natural también en la Antártida por las características geoquímicas de las distintas áreas (Andrade *et al.*, 2001; Sánchez-Hernández, 2000), diversas actividades antropogénicas desarrolladas *in situ* pueden emitir/verter estos contaminantes (vertidos accidentales, incineración de residuos, uso de combustibles fósiles, pinturas y barnices, etc.) (Claridge *et al.*, 1995; Curtosi *et al.*, 2010; Poblet *et al.*, 1997; dos Santos *et al.*, 2005; Vodopivec y Curtosi, 1998; Perez *et al.*, 2011, 2013a y 2013b). La contaminación local, junto con el transporte de estos elementos emitidos en Asia, África o el Sudamérica, conlleva un aumento de los niveles ambientales de estos elementos inorgánicos. En este sentido, son especialmente vulnerables las zonas de la Antártida más próximas a otros continentes y con una mayor presión humana (Tin *et al.*, 2009), como el extremo norte de la península Antártica y sus islas asociadas. Además ha sido descrito que algunos de los metales pesados más tóxicos que existen para los organismos, como Cd o Pb, tienden a acumularse y magnificarse en los ecosistemas antárticos (Bargagli, 2008 y Majer, 2012), lo cual puede verse agravado por un aumento “no natural” de estos niveles.

### II.1.3. PINGÜINOS PIGOSCÉLIDOS: BIOINDICADORES

En general, las aves acuáticas son consideradas útiles para la biomonitorización ambiental debido a su amplia distribución, su relativa facilidad de identificación y su papel como componente fundamental de los ecosistemas acuáticos, siendo especialmente sensibles a los cambios que se producen por la influencia humana en los hábitats que ocupan (Burger, 1993).

En concreto en el estudio de la contaminación ambiental, las aves acuáticas pueden acumular las formas biológicamente disponibles de los contaminantes y mostrar niveles varios órdenes de magnitud superiores a los niveles ambientales (Jerez *et al.*, 2011).

En la Antártida, las aves acuáticas son además los representantes más numerosos del grupo de los vertebrados. Entre ellas, los pingüinos han sido señalados como indicadores biológicos potenciales para el estudio de la contaminación, además de por sus características comunes a otras aves acuáticas (amplia distribución, poblaciones numerosas, posición alta en la cadena trófica, longevidad, relativa facilidad de muestreo y capacidad para integrar la contaminación a lo largo del tiempo

y el espacio; Burger y Gochfeld, 2004; Walsh, 1990), por presentar un nicho ecológico permanente, presentar poblaciones de distribución exclusivamente antártica y dominar en términos de biomasa la avifauna de la región (Boersma, 2008; Metcheva *et al.*, 2006; Smichowski *et al.*, 2006). Desde el punto de vista ecotoxicológico, son más interesantes para la monitorización de la contaminación ambiental antártica que otras aves marinas que migran largas distancias a otros continentes del hemisferio sur, como los petreles o los fulmares (Corsolini, 2009).

De las 17 especies de pingüinos que existen, 6 se distribuyen en la Antártida (*Aptenodytes forsteri* o pingüino emperador, *Aptenodytes patagonicus* o pingüino rey, *Pygoscelis antarctica* o pingüino barbijo, *Pygoscelis papua* o pingüino papúa, *Pygoscelis adeliae* o pingüino de Adelia y *Eudyptes chrysolophus* o pingüino macaroni).

En la zona de las islas de Shetland del Sur destaca la presencia de los pingüinos pigoscélidos pertenecientes a la familia *Spheniscidae* y al género *Pygoscelis*. Actualmente existen tres especies: *P. antarctica*, *P. papua* y *P. adeliae* en las que se analizará la toxicidad a nivel celular.



**Figura 7.** Pingüinos Adelia (A), papúa (B) y Barbijo (C). *Fuente: National Geographic*

Las tres especies poseen rangos distintos de distribución en la Antártida, pero conviven en algunas áreas. El pingüino de Adelia presenta una distribución exclusivamente antártica, formando colonias en las zonas costeras de prácticamente todo el continente e islas asociadas. El pingüino papúa nidifica en el extremo sur de Sudamérica, islas Malvinas, islas Georgia del Sur, islas Sandwich del Sur, islas Orcadas del Sur, islas Shetland del Sur y en varios puntos de la península Antártica (hasta los 64° de latitud sur). El pingüino barbijo se distribuye principalmente en las islas Sandwich del Sur, islas Orcadas del Sur, islas Shetlands del Sur y a lo largo de la parte norte de la península Antártica (Williams, 1995).



**Figura 8.** Pingüinos Adelia (A), papúa (B) y barbijo (C). Fuente: National Geographic y <https://carmenriverocolina.wordpress.com/2012/06/15/>

Pueden bucear a profundidades superiores a los 300 m y consumen sobre todo pescado, cefalópodos y crustáceos, aunque varía en función de su disponibilidad y abundancia (Pütz *et al.*, 2001; Rombolá *et al.*, 2004). Viven unos 20 años, aunque existen menciones de individuos que alcanzaron los 50. Sin embargo, y a pesar del cuidado de sus progenitores, la mortalidad de los pollos es generalmente alta en tierra, debido al frío, aplastamientos, falta de alimento, abandono o ataques de los



depredadores. Por el contrario, los pingüinos sanos adultos presentan una mortalidad elevada en el mar donde son atacados por varias especies, como las focas leopardo, los leones marinos o las orcas (Williams, 1995).

El pingüino papúa se caracteriza por presentar un parche blanco en la parte alta de la cabeza y el pico de color rojo. Los individuos adultos de pingüino papúa alcanzan una estatura de 70 a 80 cm. El pingüino barbijo mide unos 74 cm, y su principal rasgo distintivo es una línea negra en la parte inferior de la cabeza. Los pingüinos de Adelia son más pequeños, alcanzan un máximo de 70 cm de estatura, y presentan la cabeza totalmente de color negro y un anillo de color blanco característico alrededor de los ojos.

La reproducción de los pingüinos pigoscélidos tiene lugar durante los meses de octubre a febrero, aprovechando las zonas de costa libres de hielo y la abundancia de recursos marinos. Durante ese periodo establecen las parejas y forman las colonias, que abandonarán tras la época de cría. Las colonias pueden estar formadas por varios miles de parejas y distintas especies de pingüinos pueden compartir las zonas de establecimiento de colonias, como ocurre en la isla Rey Jorge, donde existen colonias mixtas, aunque las especies delimitan sus zonas de anidada por separado. Dentro de una misma especie, machos y hembras presentan altas tasas de fidelidad con respecto a los sitios de reproducción y con respecto a la pareja (Dubois *et al.*, 1998; Williams y Rodwell, 1992).

El acceso a un volumen de muestra representativo en la Antártida es complicado, fundamentalmente debido a que tanto el Tratado Antártico como el SCAR (Scientific Committee for Antarctic Research) recomiendan que no se lleve a cabo la recolección de individuos vivos, además los estándares éticos recomiendan el uso de métodos no-invasivos. Es por ello que se considera una herramienta de gran valor el uso de *técnicas in vitro*, que pueden aportar información complementaria sobre los efectos que los contaminantes están provocando en los principales biomonitores del continente Antártico.

### II.1.4. ISLAS SHETLAND DEL SUR Y PENÍNSULA ANTÁRTICA

Los datos de las especies estudiadas (*P. papua*, *P. antarctica* y *P. adeliae*) proceden de 6 islas asociadas a la península Antártica y una bahía de la península,

abarcando un área de más de 800 Km de largo (Fig. 10). El rango geográfico de la procedencia de datos se extiende de norte a sur desde la isla Rey Jorge (62°15'S 58°37'O) hasta isla Avian (67°46'S, 68°64'O) (Jeréz *et al.*, 2011).

Frente a la región más septentrional de la Península se encuentran las Islas Shetland del Sur formadas por las islas Smith, Low, Livingston, Snow, Decepción, Greenwich, Robert, Nelson, Rey Jorge, Elefante y Clarence (las mayores) así como multitud de islotes y archipiélagos asociados. En este conjunto de islas se encuentran ubicadas la mayoría de las estaciones científicas internacionales (Alemania, Argentina, Brasil, Bulgaria, China, Chile, Ecuador, España, Perú, Polonia, Reino Unido, Rusia y Uruguay (COMNAP, 2012).

La isla Rey Jorge es considerada una de las zonas con mayor presión antropogénica de la Antártida. Las actividades humanas se iniciaron en el siglo XIX, con la llegada de los cazadores de focas y ballenas. Hoy en día es uno de los destinos antárticos preferidos por los turistas a lo que se le suma la presión debida a las bases científicas (Kennicutt, 2009) y la presencia de un pequeño aeropuerto (Fig. 9).

En esta isla existen dos zonas ambas protegidas como Zonas de Especial Protección Antártica, punta Stranger y punta Barton. La población de pingüinos en punta Stranger es de 3764 parejas en el caso del pingüino papúa y de 3412 parejas en el caso del pingüino de Adelia (Carlini *et al.*, 2009) y la población de punta Barton es de 2900 parejas de pingüino barbijo (página web del Tratado Antártico).



**Figura 9.** Estación científica chilena Frei y detalle de su aeródromo (isla Rey Jorge)

*Fuente: macroantartic.blogspot.com y panoramio.com*

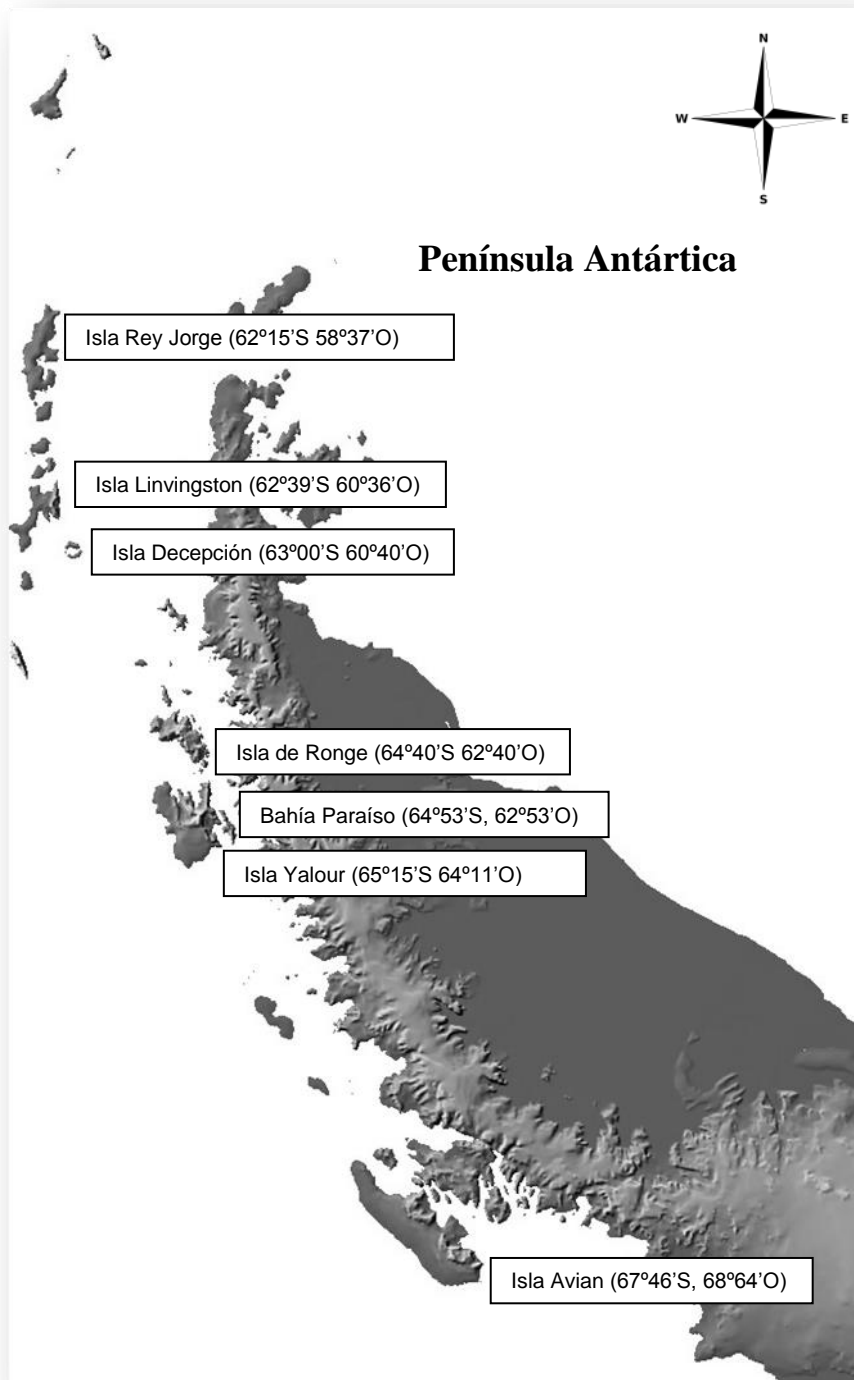
La isla Livingston, oficialmente descubierta por William Smith en 1819, forma parte de los primeros enclaves en ser colonizados por los foqueros pioneros (Smith y Simpson 1987). Actualmente presenta dos bases científicas de verano en funcionamiento (Juan Carlos I (España) y St. Kliment Ohridki (Bulgaria)) y un campamento permanente (el Refugio Internacional Byers mantenido por España), dos áreas protegidas, numerosos sitios arqueológicos y dos lugares turísticos con numerosos visitantes anuales (Isla Media Luna y Punta Hannah).

Punta Hannah es uno de los espacios más visitados, ha registrado un promedio entorno a 5000 visitantes en los últimos años según los informes anuales de la asociación de tour operadores (IAATO, 2015). La población de pingüino papúa y barbijo de punta Hannah es de 1885 parejas y 754 parejas respectivamente (Lynch *et al.*, 2008).

En la isla Decepción en la actualidad existen dos estaciones científicas de ocupación estival, entre ellas la estación científica española Gabriel de Castilla, así como ruinas de otras estaciones que fueron destruidas por la última erupción volcánica en 1967, cinco lugares de visita del turismo y dos áreas protegidas. En la actualidad soporta un fuerte tráfico de buques y cruceros. La pingüinera en isla Decepción es la de Vapour Col. que tiene una población estimada de 20000 parejas pingüino barbijo (Barbosa *et al.*, 1999).

Más al sur se encuentra punta George en la isla de Ronge. Situada en el estrecho de Gerlache es una zona donde ha aumentado significativamente el tráfico de cruceros de turistas en los últimos años (Lynch *et al.*, 2010). La población de pingüino barbijo en este punto es de 354 parejas (Lynch *et al.*, 2008) y la de pingüino papúa es de 2464 parejas (Lynch *et al.*, 2008). Bahía Paraíso es un enclave situado en la zona continental de la península Antártica donde se localizan dos bases de investigación, una chilena, González Videla y otra argentina, Almirante Brown. Al lado de la base chilena se encuentra una pingüinera de pingüino papúa cuya población es de 2122 parejas (Lynch *et al.*, 2008). Siguiendo hacia el sur, se sitúa la isla Yalour donde ya solo puede encontrarse al pingüino de Adelia. En las cercanías de esta isla se localiza la base ucraniana Vernadsky. La población de pingüino de Adelia en este punto es de 5558 parejas (Lynch *et al.*, 2008). En la isla Avian se encuentra el pingüino Adelia, su población es de 35600 parejas (Plan de Manejo del ASPA 117, página web del Tratado Antártico).





**Figura 10.** Áreas de estudio

## II.2. CONTAMINANTES OBJETO DE ESTUDIO

Los elementos químicos incluidos en el presente estudio han sido seleccionados en virtud del aumento experimentado en los últimos años según diferentes muestras obtenidas en estudios previos (Jerez *et al.*, 2011, 2013a y 2013b).

Se han incluido metales pesados (cadmio y plomo), ligeros (cromo) y un semi-metal (selenio). A continuación se describen algunas de sus propiedades, fuentes, usos, toxicocinética, mecanismo de acción y efectos.

### II.2.1. CADMIO

El cadmio (Cd), con número CAS 7440-43-9, es un metal pesado (Repetto y Sanz, 2008) que, según la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de Estados Unidos (Agency for Toxic substances and Disease Registry), se encuentra entre los metales con mayor incidencia sobre la salud. Fue descubierto por Friedrich Stromeyer en 1817. Es de color plateado, brillante, maleable y muy dúctil.

Es un elemento no esencial para los sistemas biológicos, que se encuentra presente como contaminante en los alimentos, agua o aire, siendo la ingestión y la inhalación las principales vías de exposición a cadmio (López-Artíguez y Repetto, 1995). Aunque existe controversia al respecto, diversos estudios han puesto de manifiesto que el cadmio experimenta fenómenos de bioacumulación y biomagnificación en las cadenas tróficas de diversos ecosistemas marinos, como los ecosistemas antárticos, acumulándose principalmente en peces, moluscos y crustáceos (Bargagli *et al.*, 1996; Bustamante *et al.*, 2003; Croteau *et al.*, 2005; Sánchez-Hernández, 2000). En medios ácidos aumenta su solubilidad y biodisponibilidad (Moreno-Graw, 2003). Algunas de las propiedades físicas y químicas del cadmio se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Propiedades del cadmio

<b>Número atómico</b>	48
<b>Peso molecular (g/mol)</b>	112,40
<b>Densidad (g/ml)</b>	8,64
<b>Punto de ebullición (°C)</b>	765
<b>Punto de fusión (°C)</b>	321,80

Con respecto a las fuentes naturales de cadmio, se debe tener en cuenta que es un elemento escaso en la corteza terrestre. Las menas de cadmio son difíciles de encontrar y suelen estar en pequeñas cantidades. Suele sustituir al zinc en sus minerales debido a su parecido químico, generalmente como sulfuros. Diversos estudios han puesto de manifiesto que, en concreto en la Antártida, diversos factores naturales podrían favorecer un enriquecimiento natural de cadmio en las cadenas tróficas de determinadas localizaciones, como el vulcanismo local, la surgencia de aguas profundas ricas en cadmio o fenómenos de bloom de algas (Bargagli *et al.*, 1996; Bustamante *et al.*, 2003; Deheyn *et al.*, 2005; Sánchez-Hernández, 2000).

Las fuentes antropogénicas que producen una mayor liberación de cadmio son las combustiones de aceites y carbones, así como las plantas incineradoras. Otras fuentes importantes de emisión relacionadas con los usos específicos que se hacen del cadmio son los fertilizantes obtenidos a partir de sedimentos o rocas ricas en cadmio, baterías y pilas eléctricas, revestimientos electrolíticos y pigmentos (ATSDR, 2008a; López-Artíguez y Repetto, 1995; Moreno-Graw, 2003). Se ha estimado que las fuentes antropogénicas de cadmio emiten a la atmósfera entre 3 y 10 veces más cantidad de este metal que las fuentes naturales (Waisberg *et al.*, 2003).

El cadmio puede absorberse por vía respiratoria y digestiva. Por vía respiratoria va a depender de la solubilidad y tamaño de las partículas (López-Artíguez y Repetto, 1995). Por ejemplo, tras la inhalación de partículas de óxido o sulfuro de cadmio, ambas insolubles en agua, las primeras son solubilizadas en el pulmón, mientras que las segundas son eliminadas por los macrófagos alveolares (Oberdörster, 1988). Los nitratos y cloruros tienen una mayor solubilidad (Moreno-Graw, 2003). Por vía oral también va a influir la solubilidad de los compuestos (López-Artíguez y Repetto, 1995). La absorción del cadmio tras la ingesta varía entre 1 y 7%, si bien dietas pobres en calcio, hierro y proteínas aumentan la absorción de cadmio (Klasing, 2005; López-Artíguez y Repetto, 1995). Tras la absorción, el cadmio es distribuido a través de la sangre unido a los eritrocitos, y se fija a la hemoglobina y la metalotioneína. La metalotioneína ejerce una acción protectora frente a la toxicidad del cadmio, el cual induce su producción. Al formarse el complejo cadmio-metalotioneína disminuye la toxicidad del metal. El zinc disminuye la absorción del cadmio, probablemente porque estimula la producción de metalotioneína. El cadmio es distribuido al hígado y posteriormente a otros órganos, entre los que destaca la acumulación en el riñón (30-60% de la carga corporal), donde tiene una vida media muy larga. Ha sido probado que el cadmio es tóxico para las células tubulares y los glomérulos perjudicando de

forma notable la función renal. Patológicamente, las lesiones consisten en necrosis inicial de las células tubulares y su degeneración, progresando en inflamación intersticial y fibrosis (Klaassen, 2008). La eliminación del cadmio ocurre principalmente por vía urinaria (López-Artíguez y Repetto, 1995; Vera-Sempere).

El cadmio es tóxico para un gran número de órganos y tejidos. Sin embargo, el principal órgano diana de la toxicidad del cadmio es el riñón (ATSDR, 2008a).

Una de las principales entradas del cadmio a la célula está dada por los canales de calcio, teniendo en cuenta que el  $\text{Cd}^{2+}$  y el calcio tienen un radio iónico similar, el metal puede introducirse libremente por esta vía a las células (Klaassen, 2008; Méndez-Armenta y Ríos, 2007; Flora, Mittal y Mehta, 2008; Nava-Ruiz y Méndez-Armenta, 2011). La alteración en la homeostasis del calcio intracelular lleva a la célula a una liberación del calcio mitocondrial y retículo endoplásmico; produciendo alteraciones en el metabolismo, interfiriendo con vías de señalización dependientes de calcio, con señales de transducción entre las células, daño a las membranas, bloqueo de canales dependientes de voltaje, regulación génica y bloqueo de la liberación de neurotransmisores (Méndez-Armenta y Ríos, 2007; Viarengo y Nicotera, 1991; Gutiérrez-Reyes, Albores y Rios, 1998). Uno de los mecanismos de toxicidad mas reportado por el cadmio es el incremento de lipoperoxidación (LPO) y generación de radicales libres en cerebro y otros órganos (Manca, Ricard, Trotter y Chevalier, 1991); estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que es capaz de incrementar la LPO por medio del aumento de radicales libres, además del radical superóxido, el radical hidroxilo y radicales del óxido nítrico que también pueden ser generados en diversos órganos y sistemas (Flora, Mittal y Mehta, 2008).

Los efectos ocasionados por una exposición aguda al cadmio son efectos locales: irritación en el tracto gastrointestinal, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal y sensación de ahogo. La inhalación de humos que contengan cadmio producen así mismo efectos locales de irritación a nivel pulmonar, pudiendo incluso ocasionar la muerte. La exposición crónica a cadmio por cualquier ruta da lugar a efectos adversos en el corazón, pulmones, huesos, gónadas y especialmente, en los riñones. A largo plazo, los principales efectos de la exposición a bajos niveles de cadmio se manifiestan en enfermedades obstructivas pulmonares crónicas, enfisema, degeneración de los túbulos renales y pérdida de funcionalidad de los riñones, hipertensión y alteraciones óseas. Éstas últimas están ocasionadas por la inhibición de la vitamina D que provoca el cadmio, que a su vez provoca un descenso en la

absorción de calcio y en la mineralización ósea (López-Artíguez y Repetto, 1995). Ésta fue la causa de uno de los casos más llamativos de intoxicación crónica por cadmio, que se produjo en Japón a mediados del siglo pasado, la denominada enfermedad “itai-itai” (Moreno-Graw, 2003). El cadmio es también un potente carcinógeno (Waisberg *et al.*, 2003).

### II.2.2. PLOMO

El plomo (Pb), con número CAS 7439-92-1, es el metal pesado (Repetto y Sanz, 2008) que, según la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de Estados Unidos (Agency for Toxic substances and Disease Registry), mayor incidencia tiene sobre la salud. Es de color gris, blando, dúctil y maleable, y ha sido usado desde tiempos prehistóricos.

El plomo es el tóxico más ubicuo y es detectable en prácticamente todas las fases del ambiente. Sin embargo, es un elemento no esencial que puede acumularse y alcanzar altas concentraciones en una gran variedad de organismos como moluscos, crustáceos, peces, aves, mamíferos y plantas. Se han medido valores elevados del factor de bioconcentración en diversos organismos acuáticos (Moreno-Graw, 2003). Algunas de las propiedades físicas y químicas del plomo se detallan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Propiedades del plomo

<b>Número atómico</b>	82
<b>Peso molecular (g/mol)</b>	207,19
<b>Densidad (g/ml)</b>	11,40
<b>Punto de ebullición (°C)</b>	1725
<b>Punto de fusión (°C)</b>	32,40

La principal fuente natural de plomo es la propia corteza terrestre donde, sin embargo, no es normal encontrarlo como metal. Es más común encontrarlo combinado con dos o más elementos para formar compuestos plomados. Las fuentes antropogénicas están directamente relacionadas con los usos que se realizan o se han realizado en el pasado del plomo. Durante años, la principal fuente de emisión de plomo a la atmósfera fue la combustión de gasolinas plomadas (compuestos orgánicos de plomo, como tetraetilo y tetrametilo de plomo), provocando diversidad de intoxicaciones sub-agudas en todo el mundo (Repetto y Sanz, 2008). Desde su prohibición como aditivo en las gasolinas, su emisión ha disminuido en los países

desarrollados, aunque esta tendencia no ha sido observada en la mayoría de países en desarrollo (Yu, 2001). Otra importante fuente de exposición fue durante años el uso de plomo en tuberías y tanques de agua, aunque en la actualidad se tiende a sustituirlo. Sin embargo, y debido a su persistencia, el plomo que se emitió por estos usos y se encuentra en los suelos, polvo o sistemas acuáticos, continúa siendo una importante fuente de exposición en la actualidad (Ahamed y Siddiqui, 2007). Además de como aditivo en las gasolinas y en las tuberías, el plomo también se emplea en baterías para automóviles, revestimiento de cables, cisternas, protección de materiales expuestos a la intemperie, materiales de construcción, fabricación de municiones, pigmentos para pinturas y barnices, fabricación de cristales, esmaltado de cerámica, soldadura de latas o antisépticos. Diversos procesos industriales también son potenciales fuentes de emisión de plomo, como la fundición, refinamiento, incineración, producción de energía, etc. (Yu, 2001). Todas estas emisiones de origen humano, que aumentaron fundamentalmente a partir de la Revolución Industrial, han provocado un aumento de la contaminación por plomo en diversos ecosistemas, incluyendo las remotas regiones polares (Sun y Xie, 2001; Yu, 2001).

El plomo es absorbido por los organismos por inhalación, ingestión y a través de la piel. Por vía respiratoria la absorción dependerá fundamentalmente del tamaño de las partículas y de la solubilidad del compuesto inhalado. Del mismo modo, la absorción por vía oral estará influenciada por la forma química del compuesto de plomo. Algunas sales, como el cloruro de  $Pb^{2+}$  o el sulfato, son extraordinariamente insolubles tanto en agua como en lípidos, por lo que presentan escaso riesgo tóxico. Sin embargo, otros compuestos, tanto inorgánicos (nitratos) como orgánicos (acetatos) resultan muy tóxicos. Dietas pobres en calcio, hierro o proteínas pueden aumentar la absorción de plomo. Por vía dérmica puede absorberse principalmente plomo en formas orgánicas (Moreno-Graw, 2003; Repetto y Sanz, 2008; Valdivia-Infantas, 2005). Los iones de plomo se transportan en la sangre dentro de los hematíes, unidos a los grupos aniónicos de la hemoglobina y de las proteínas del estroma. Luego se distribuyen a los tejidos blandos como hígado, riñón, médula ósea y SNC, que son los órganos diana de toxicidad. Posteriormente el plomo alcanza los huesos donde se almacena durante años, aunque no permanece irreversiblemente secuestrado. También presenta afinidad por otras formaciones cálcicas, como cabello, plumas o uñas (Lucky y Venugopal, 1977; O'Flaherty, 1998). A este modelo de distribución se le denomina modelo tri-compartimental del plomo. El plomo es capaz de atravesar las barreras fetoplacentaria y hematoencefálica (Ellenhorn y Barceloux, 1988; Repetto,

1995). La eliminación del plomo absorbido por el organismo se hace principalmente a través de la orina (Ellenhorn y Barceloux, 1988).

Los mecanismos de toxicidad de este elemento son dos. Por un lado, la sustitución de metales esenciales, como calcio, hierro, zinc o cobre. Por ejemplo, en el caso del calcio, por poseer un radio atómico similar, penetra por los canales de este elemento en las membranas celulares, principalmente del sistema nervioso, originando distintos síndromes como la encefalopatía (patológicamente se observa una pérdida de neuronas y un aumento de células gliales) (Goyer, 1990; Bellinger, 2005; ATSDR, 2005; Laraque y Trasande, 2005). También desplaza al calcio en las mitocondrias, produciendo déficit de ATP. Por otro lado, provoca la inhibición de numerosas enzimas, lo que da lugar a distintos trastornos según la enzima y su localización. Por ejemplo, por la inhibición de ATPasa, acetilcolinesterasa, adenilciclase, etc., disminuye la conductividad del impulso nervioso; o la inhibición de las enzimas implicadas en la síntesis del grupo hemo, que conduce a la acumulación de metabolitos intermedios tóxicos (Repetto y Sanz, 2008; Yu, 2001).

A nivel celular, el plomo ejerce sus efectos a través de su unión con grupos sulfhidrilos de proteínas, por competición con el calcio, inhibición de enzimas asociadas a membranas y alteración en el metabolismo de la vitamina D; el plomo altera el funcionamiento de la calmodulina, una proteína importante para la regulación intracelular del calcio (Nava-Ruíz y Méndez-Armenta, 2011). El plomo se almacena principalmente en la mitocondria produciendo daños en su metabolismo energético, induciendo la producción de radicales libres, inhibiendo la captura del calcio mitocondrial a la vez que favorece su liberación (Garza, Chávez, Vega y Soto, 2005). Este hecho provoca una apertura del poro mitocondrial con subsecuente liberación del citocromo c y posible activación de caspasas 9 y 3 favoreciendo la presencia de apoptosis (Flora *et al.*, 2008).

Los efectos producidos por una exposición aguda a plomo son vómitos, anorexia, debilidad, incoordinación, convulsiones y estupor, pudiendo provocar coma y muerte. La exposición crónica provoca efectos neurotóxicos y alteración en diversos órganos. Puede provocar anemia microcítica hipocrómica, neuropatía, hipertensión, alteraciones hepáticas o aumentar la predisposición a infecciones, entre otros (Soria *et al.*, 1995).

A nivel renal, la nefropatía producida por plomo es uno de los efectos más antiguos conocidos (Oliver, 1914). La nefrotoxicidad aguda del plomo se concentra en cambios funcionales y morfológicos en las células del túbulo proximal (Goyer y Rhyne, 1973). Los cambios funcionales se creen que están relacionados con la respiración mitocondrial y la fosforilación. En modelos experimentales y biopsias procedentes de niños con toxicidad producida por plomo, se observan cambios ultraestructurales en las mitocondrias consistentes en hinchazón y crestas mitocondriales distorsionadas (Klaassen, 2008). Un cambio microscópico característico es la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares. Al microscopio óptico se observan cuerpos densos, homogéneos y eosinófilos. Los cuerpos están formados por un compuesto plomo-proteína (Goyer *et al.*, 1970). Se trata de una proteína ácida que contiene gran cantidad de ácido aspártico y glutámico y poca cantidad de cisteína. Los cuerpos de inclusión son una forma de acumular grandes cantidades de plomo en un estado relativamente inerte, no tóxico. Los ratones que no tienen metalotioneína no pueden formar cuerpos de inclusión después de la exposición a plomo y son hipersensibles a sufrir nefropatías y carcinogénesis, lo que sugiere que la formación de los cuerpos de inclusión requieren como participante a la metalotioneína (Qu *et al.*, 2002; Waalkes *et al.*, 2004c). De hecho, la metalotioneína se encuentra en la superficie externa de los cuerpos de inclusión. Egle y Shelton demostraron que la proteína nuclear denominada p32/6.3 es el componente proteico más abundante en los cuerpos de inclusión. El plomo podría formarlos en el citoplasma de las células renales que crecen en cultivo y posteriormente migrar hacia el núcleo (McLachlin *et al.*, 1980).

En cuanto a la carcinogénesis inducida por el plomo se han propuesto varios mecanismos como la reparación regenerativa, la inhibición de la síntesis de ADN o su reparación, la generación de especies reactivas de oxígeno con daño oxidativo de ADN, la sustitución del plomo por el zinc en reguladores transcripcionales, la interacción con proteínas de unión al ADN y expresión de genes aberrantes (Silbergeld *et al.*, 2000; Qu *et al.*, 2002; Silbergeld, 2003).

### II.2.3. CROMO

El cromo (Cr), con número CAS 7440-47-3, es un metal ligero de transición (Repetto y Sanz, 2008) de aspecto gris acerado y brillante. Se atribuye su descubrimiento a Johann Gottlob Lehmann en los Urales en el año 1761, quien creyó haber encontrado una nueva forma de plomo.



El cromo trivalente ( $\text{Cr}^{3+}$ , se presenta en forma de sales) es un elemento esencial, que participa en la homeostasis de la glucosa como factor de tolerancia. Por el contrario, el cromo hexavalente ( $\text{Cr}^{6+}$ , se presenta en forma de dicromatos) es la forma de cromo más tóxica a nivel ambiental. Esta forma de cromo es emitida por diversas fuentes antropogénicas, y posee un gran potencial de oxidación, penetrando con facilidad en las membranas biológicas (Eisler, 1986; Repetto y Sanz, 2008; Soria *et al.*, 1995). Algunas de las propiedades físicas y químicas del cromo se detallan en la tabla 3.

**Tabla 3.** Propiedades del cromo

<b>Número atómico</b>	24
<b>Peso atómico</b>	56,996
<b>Densidad (g/ml)</b>	7,19
<b>Punto de ebullición (°C)</b>	2665
<b>Punto de fusión (°C)</b>	1875

El cromo puede ser emitido al ambiente por fuentes naturales, como la erosión de rocas y suelos que lo contienen o las erupciones volcánicas. Las incorporaciones naturales a los ambientes acuáticos ocurren fundamentalmente por deposición atmosférica y por aportes de la escorrentía (Kotas y Stasicka, 2000).

Desde el punto de vista de las fuentes y usos antropogénicos, el cromo se emplea en la fabricación de pigmentos de cromo, en el curtido del cuero, en la coloración mordiente y conservantes de madera, como anticorrosivo en sistemas de cocina, calderas y lodos de perforación en la industria petrolera, en los fertilizantes, en la industria del acero inoxidable, refinerías, procesamiento de sustancias químicas, galvanoplastia, metalurgia o cementeras; el uso de combustibles fósiles y la incineración de residuos también son fuentes de emisión de cromo (Kotas y Stasicka, 2000). Las emisiones se producen a la atmósfera, suelos y sistemas acuáticos (Eisler, 1986; Kimbrough *et al.*, 1999).

Muchas de las fuentes antropogénicas incorporan al ambiente cromo hexavalente, más tóxico que la forma trivalente. Por ejemplo, la industria metalúrgica, galvanoplastia o aplicación de pigmentos. Otras industrias, como la textil o la del cuero, si bien vierten en mayor medida cromo trivalente, éste reacciona en los vertidos aumentando la concentración de la forma hexavalente (Kotas y Stasicka, 2000).

La entrada de cromo al organismo puede ocurrir por vía respiratoria, oral o dérmica. La absorción por vía respiratoria aumenta al disminuir el tamaño de partícula. El  $\text{Cr}^{+6}$ , debido a su mayor capacidad de penetración en las membranas, se absorbe más fácil y rápidamente a nivel pulmonar con respecto al  $\text{Cr}^{+3}$ . Esto mismo ocurre por vía oral. La absorción gastrointestinal se ha estimado por debajo del 10% del cromo ingerido. El cromo también puede ser absorbido por vía dérmica. Dentro del organismo de nuevo el  $\text{Cr}^{6+}$  se distribuye con mayor facilidad. En general, la mayor acumulación se va a producir en hígado, riñón y hueso, éste último a largo plazo. La eliminación se produce fundamentalmente a nivel renal y biliar (ATSDR, 2008b; Soria *et al.*, 1995).

La permeabilidad que presentan las membranas biológicas frente al cromo hexavalente está muy relacionada con su mecanismo de acción tóxica. El cromo hexavalente entra en las células fácilmente, donde se reduce a cromo trivalente, que a su vez se oxida a cromo divalente. Éste último reacciona con numerosos macromoléculas intracelulares (Klaassen, 2008) y posee incluso mayor toxicidad que los compuestos de cromo hexavalente que, sin embargo, son carcinógenos. Además, en la reducción de  $\text{Cr}^{6+}$  a  $\text{Cr}^{3+}$ , se pasa por las formas de  $\text{Cr}^{5+}$  y  $\text{Cr}^{4+}$ , que también son reactivas y originan especies reactivas de oxígeno, muy activas en las moléculas biológicas (Repetto y Sanz, 2008; Soria *et al.*, 1995). Al daño producido en los componentes celulares y la generación de radicales libres, hay que añadir la formación de aductos de ADN (Zhitkovich, 2005), la inhibición de la síntesis de proteínas y la detención de la replicación del ADN (Klaassen, 2008). El cromo hexavalente también puede causar perturbaciones de la vía de señalización del p53, la detención del ciclo celular, apoptosis, la interferencia en la reparación tras daño en el ADN, y la transformación neoplásica (O'Brien *et al.*, 2003; Costa y Klein, 2006).

Los efectos producidos a nivel local son ulceraciones, dermatitis irritativa y alérgica, y neumoconiosis. A nivel crónico la exposición produce necrosis en los túbulos renales y en el hígado, ulceraciones, gastritis, trombocitopenia, shock cardiovascular y cáncer en el caso de cromo hexavalente (Repetto y Sanz, 2008; Soria *et al.*, 1995).

#### II.2.4. SELENIO

El selenio (Se), con número CAS 7782-49-2, es un semi-metal (Repetto y Sanz, 2008) cuya apariencia varía desde gris metálico hasta rojo cristalino. Fue descubierto por Berzelius y Gahn en Suiza en 1817.

El selenio es un elemento esencial que forma parte de distintos sistemas enzimáticos y proteínas, aunque la exposición a niveles elevados resulta tóxica (Burau, 1985; Vance *et al.*, 1998). Su esencialidad fue descubierta en 1975, cuando se estableció el papel del selenio en la enzima glutatión peroxidasa, responsable de la eliminación de peróxidos en el organismo, que impide la formación de radicales libres y los consecuentes daños tisulares (Burau, 1985; Moreno-Graw, 2003). También se ha señalado que el selenio a bajos niveles actúa como agente protector frente a la toxicidad de metales como cadmio, mercurio o cobre (Magos y Webb, 1980; Metcheva *et al.*, 2006; Norheim, 1987; Underwood *et al.*, 1977). Sin embargo, el rango entre los niveles óptimos y los niveles tóxicos del selenio es relativamente estrecho (Hall, 2007; Klaassen, 2008).

El selenio está sometido a fenómenos de bioconcentración y biomagnificación en los seres vivos, al ser transformado por plantas terrestres y acuáticas en formas orgánicas de selenio. Dichas formas, como selenocistina, selenocisteína, o selenometionina, tienen una mayor vida media y se incorporan más eficientemente a los tejidos de los distintos organismos, pudiendo ocasionar episodios de toxicidad en los niveles altos de las cadenas tróficas (Burau, 1985; Moreno-Graw, 2003; Vance *et al.*, 1998).

Las principales vías de exposición son por tanto la dieta y el agua. La inhalación puede ser una vía de exposición, pero a nivel ambiental es minoritaria. En concreto las aves están principalmente expuestas a selenio en forma de L-selenometionina a través de la dieta, si bien las aves acuáticas por su consumo de peces y crustáceos pueden también incorporar ciertas cantidades de L-selenocisteína (Spallholz y Hoffman, 2002).

Algunas de las propiedades físicas y químicas del selenio se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Propiedades del selenio

<b>Número atómico</b>	34
<b>Peso molecular (g/mol)</b>	78,96
<b>Densidad (g/ml)</b>	4,79
<b>Punto de ebullición (°C)</b>	685
<b>Punto de fusión (°C)</b>	221

Con respecto a las fuentes naturales de selenio, la erosión de rocas y suelos puede ocasionar ligeros aumentos de los niveles de selenio en agua o aire, o la incorporación de éste a las plantas. Se sospecha que las erupciones volcánicas pueden contribuir a un aumento de los niveles en el aire y suelos de las áreas adyacentes. Con respecto a las fuentes antropogénicas, al estar presente en la mayoría de menas de sulfuro, es generalmente un subproducto del tostado de la piritita de cobre. El selenio también se acumula en el sedimento de los fondos de los tanques electrolíticos del refinado hidro-metalúrgico del cobre. También se incorpora al aire como consecuencia de la combustión de carbón o petróleo. El anhídrido de selenio es liberado durante la calefacción de cobre, plomo y minerales de zinc (Bureau, 1985; Moreno-Graw, 2003).

El principal uso que el hombre hace del selenio es en la industria electrónica, como componente de células fotovoltaicas, células solares y fotocopiadoras. En forma de selenito y seleniato de cadmio se utiliza como pigmento de intenso color rojo, en la fabricación de cristal en color bronce (absorbe la radiación solar), pinturas y esmaltes. Los compuestos de selenio se emplean así mismo en la producción de aditivos alimentarios y champús anticaspa (Moreno-Graw, 2003).

La forma química de selenio afecta enormemente a la absorción de éste. El selenio y la mayoría de sus compuestos son insolubles y prácticamente no son absorbidos oralmente, mientras que los compuestos solubles de selenio, como el selenato y el selenito de sodio, son absorbidos con mayor facilidad (Hall, 2007). La forma química también influye en la distribución del selenio, cuya concentración en sangre va a depender de la cantidad ingerida. Niveles en sangre de 200-240 mg/ml son compatibles con un control homeostático. El selenio generalmente es utilizado para la síntesis de selenoproteínas, que se incorporan a los tejidos o son eliminadas. El mayor contenido de selenio en el organismo se concentra normalmente en riñón e

hígado, y en menor cantidad en otros órganos y tejidos como corazón, pulmón o músculo. El selenio se transfiere eficientemente a través de la barrera fetoplacentaria durante la gestación (Hall, 2007). El selenio se elimina principalmente por vía urinaria (Klaassen, 2008; Whanger, 2002).

Se han descrito tres mecanismos principales de acción tóxica para el selenio: por un lado la formación del radical  $\text{CH}_3\text{Se}^-$ , el cual o bien forma iones superóxido y provoca estrés oxidativo, o bien forma radicales libres que inhiben importantes enzimas y proteínas. Por otro lado, el exceso de selenocisteína inhibe el metabolismo de metilación del selenio, aumentando la concentración de metabolitos intermedios con efectos hepatotóxicos. Por último, también es posible que el exceso de selenio juegue un papel teratógeno en aves, a través de su interacción con la actividad de enzimas con grupos sulfhidrilo y proteínas estructurales (Spallholz y Hoffman, 2002).

Los efectos producidos por una exposición aguda a selenio afectarán en primer lugar a nivel pulmonar (congestión, disneas), tanto por vía oral como respiratoria, seguidos de efectos a nivel cardiovascular (hemorragias, edemas), hepático y renal. También puede afectar al SNC. Los síntomas por intoxicación crónica de selenio son la pérdida de vitalidad, decoloración en la piel, erupciones cutáneas y lesiones. Los órganos diana son el tracto respiratorio, hígado, riñones, sangre, piel y ojos (Soria *et al.*, 1995; Spallholz y Hoffman, 2002). Por último, el selenio puede producir pérdida de fertilidad y defectos congénitos y se considera embriotóxico y teratogénico en animales (WHO, 2011).

Por otro lado, el selenio previene los efectos tóxicos del cadmio y puede reducir los efectos tóxicos del metilmercurio.

### II.3. MÉTODOS ALTERNATIVOS

Los métodos alternativos son métodos que sin utilizar directamente animales, proporcionan una información semejante o complementaria a la obtenida con el animal de experimentación completo, suponiendo una disminución del número de animales o el empleo de procedimientos menos dolorosos.

La Directiva 2010/63/UE (deroga a la Directiva 86/609/CEE) establece como principio general la promoción e implementación del «principio de las tres erres», es decir el reemplazo, la reducción y el refinamiento de los procedimientos, fomentando el uso de métodos alternativos a la experimentación con animales vivos. En nuestro país, esta directiva entra en vigor a partir del Real Decreto 53/2013 (deroga el RD 1201/2005), por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

El libro de Rusell y Burch (1959) *The Principies of Human Experimental Technique*, fue el inicio de la búsqueda de nuevos métodos que permitieran un menor uso de animales de experimentación en la investigación básica y aplicada (Pérez, Díez y García, 1999).

Rusell y Burch establecieron el principio de las 3Rs: **refinamiento** de los procedimientos, de modo que disminuye el dolor o malestar de los animales, o bien aumenta su bienestar; **reducción** en el número de animales necesario o facilitar el **reemplazo** del uso de animales por sistemas que no requieren seres vivos, o bien emplear otras especies animales que sean inferiores en la escala filogenética animal.

Por lo tanto, el concepto de alternativas incluye todos los métodos o técnicas que pudieran: sustituir a los experimentos realizados con animales vertebrados como por ejemplo el uso de cultivo de tejidos, reducir el número de animales empleados en cada ensayo por medio del uso de estudios estadísticos, o mejorar los procedimientos ya existentes con el fin de aumentar el bienestar animal, disminuyendo el estrés y evitando el sufrimiento de los animales mediante el empleo de anestésicos. Como literalmente expresaron los autores del principio de las 3Rs: *Los más importantes experimentos científicos han sido siempre los más humanos y los más atractivos estéticamente, transmitiendo ese sentido de belleza y elegancia que es la esencia de la ciencia en su más alto concepto* (Rusell y Burch, 1957).

Aunque el RD 53/2013 establece que se utilizarán siempre que sea posible, en lugar de un procedimiento, métodos o estrategias de ensayo científicamente satisfactorios que no conlleven la utilización de animales vivos, los métodos alternativos presentan ciertas limitaciones que no les permiten aportar un nivel igual o superior al uso de animales de experimentación, pero si pueden ser métodos que nos permitan adquirir una información complementaria.

**Tabla 5.** Ventajas y limitaciones de los métodos alternativos (Zúñiga, Orellana y Tur, 2008)

Ventajas	Limitaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Las sustancias bioactivas actúan directamente sobre las dianas biológicas. Por tanto, apuntan información desde el punto de vista molecular</li> <li>▪ Se evita la interferencia de la respuesta total del organismo</li> <li>▪ Se obtienen resultados en tiempos muy cortos</li> <li>▪ Precisan una cantidad muy reducida del producto en estudio: ahorro del mismo</li> <li>▪ Requieren menor espacio y estructura de laboratorio</li> <li>▪ Drástica reducción de infraestructura y gasto de instalaciones de animales</li> <li>▪ Se puede usar material biológico humano, lo que supone una ventaja sin precedentes</li> <li>▪ Permite automatizar la investigación: robótica</li> <li>▪ Sustituyen una cantidad ingente de animales (Repetto, 1999)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ No se manifiesta la respuesta total del organismo</li> <li>▪ Se observa la bioacción solamente sobre el material empleado</li> <li>▪ No se observan los efectos secundarios</li> <li>▪ El metabolismo del producto puede ser diferente a cuando se administra al organismo completo</li> <li>▪ No sustituyen del todo a las pruebas <i>in vivo</i></li> </ul>

Posteriormente, como hemos indicado anteriormente, se añadió el concepto de **métodos complementarios** para referirse a aquellos procedimientos que aportan una información adicional en cualquier disciplina biomédica sin utilizar animales, pero no sustituyen a técnicas o modelos animales ya existentes.

El concepto de las 3Rs se ha aplicado en leyes, políticas y directrices de ámbito mundial y ha sido el punto focal de varios centros gubernamentales y universitarios (Zúñiga *et al*, 2008). En 1967 se creó en USA, *The United Action for*

*Animals* (UAA), para promover las alternativas y fundamentalmente, la sustitución de los métodos *in vivo*, y en 1969, se estableció en Inglaterra el *Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments* (FRAME).

En 1986, mediante la Directiva 86/609/CEE (derogada por la actual Directiva 2010/63/UE), la Unión Europea instó a sus estados miembros para que promocionaran la legislación en torno a las 3Rs, de forma que los experimentos debían utilizar el número mínimo de animales y causar el mínimo daño, sufrimiento, estrés o daños permanentes; no debiendo realizar un experimento si existe otro científicamente satisfactorio para obtener el resultado deseado. Posteriormente, se creó el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM). En nuestro país, la publicación del Real Decreto 53/2013, ha establecido la obligación del registro y aprobación de todos los procedimientos que conlleven el uso de animales y demanda de manera explícita el cumplimiento y la promoción del principio de las 3Rs.

Un método se considera una alternativa al animal cuando está validado, es decir, un proceso que demuestra la aplicabilidad y fiabilidad de un método desarrollado para alcanzar un objetivo concreto (Hartung *et al.*, 2004).

En la actualidad, una de las entidades que debemos señalar en nuestro país es la Red Española de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal (REMA), un foro de discusión para lograr un menor y más racional uso de los animales de experimentación, fomentando el desarrollo, validación y utilización de los métodos *in vitro*, con el fin de conseguir una mejor y eficaz aplicación de los principios de reducción, refinamiento y reemplazo del uso de animales en la experimentación.

También podemos destacar GTEMA/AETOX un grupo de trabajo de la Asociación Española de Toxicología especializado en métodos alternativos, cuyo objetivo es fomentar la cooperación y la coordinación de las actividades científicas para contribuir al desarrollo de nuevos métodos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*, que conduzcan al principio de las 3R's.



II.3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS

Desde el punto de vista práctico los métodos alternativos se pueden clasificar en diferentes apartados:

**Tabla 6.** Clasificación de los métodos experimentales alternativos  
(Repetto, del Peso, Salguero y Repetto, 1999)

<b>MÉTODOS EXPERIMENTALES ALTERNATIVOS</b>
<p><b>1. Evitar la repetición innecesaria de experimentos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Protocolo y estudios previos: Disponibilidad de la información, creación de bases de datos, homologación de ensayos y aceptación internacional de ensayos</li> </ul>
<p><b>2. Modelos computarizados de Predicción: <i>in silico</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fármaco-toxicocinética (PB-PK)</li> <li>- Cinética ambiental de compuestos químicos</li> <li>- Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR)</li> </ul>
<p><b>3. Mejoras en el diseño de estudios con animales:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción: número de animales usados</li> <li>- Refinamiento: minimización del dolor y angustia; nuevos modelos</li> </ul>
<p><b>4. Uso de organismos inferiores no protegidos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacterias, hongos, protozoos, algas, plantas, animales invertebrados</li> </ul>
<p><b>5. Vertebrados en etapas iniciales de desarrollo:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Huevos de peces, anfibios, reptiles y aves</li> </ul>
<p><b>6. Métodos <i>in vitro</i>:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Órganos: baños, perfusión, cultivo, cortes y órganos reconstituidos.</li> <li>- Explantes, reagregados celulares, micromasas y cocultivos</li> <li>- Cultivo primario de células dispersadas</li> <li>- Líneas celulares/ transgénesis/ células madre</li> <li>- Sistemas libres de células (proteínas, ácidos nucleicos,...)</li> </ul>
<p><b>7. Estrategias integradas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Integración de métodos <i>in silico</i>, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>. Flexibilidad en el proceso de toma de decisiones. Juicio experto</li> </ul>

### 8. Otros:

- Estudios en humanos: voluntarios, epidemiológicos y vigilancia
- Modelos en la enseñanza y formación: modelos mecánicos, sistemas audiovisuales y simulación por ordenador y de realidad virtual.

Dentro del amplio abanico de procedimientos alternativos posibles se encuentran las técnicas *in vitro*.

### II.3.2. TÉCNICAS *IN VITRO*

Históricamente, las células han sido los primeros sistemas experimentales *in vitro* utilizados para realizar la evaluación precoz de nuevos compuestos. La razón principal reside en la hipótesis de que cualquier fenómeno, o respuesta tóxica en un órgano o tejido, se debe a la suma de todos los efectos individuales producidos en cada una de las células. Inherente a esto, se encuentran los aspectos prácticos que representan el hecho de necesitar cantidades muy reducidas de producto, su rapidez de realización, y su coste relativamente ajustado (Zúñiga *et al.*, 2008).

### II.3.3. CULTIVOS CELULARES

Desde principios del siglo XX las técnicas de cultivos celulares han aportado un poderoso método analítico para el estudio de los fenómenos celulares. El hecho de conseguir que las células de un organismo vivo, sobrevivan y se multipliquen fuera de ese organismo, representa la posibilidad de conocimiento y, por tanto, de control, de los requerimientos y mecanismos que funcionan en el ser vivo.

Los ensayos con células de mamíferos han desempeñado un importante papel para identificar y caracterizar los potenciales efectos biológicos de los agentes químicos y físicos que rodean al hombre, tanto farmacológicos como tóxicos. Los métodos que emplean líneas inmortalizadas son los más generalizados en la actualidad al contar con condiciones de cultivo claramente descritas, conocer sus propiedades proliferativas e inclusive en algunos casos conocer los mecanismos que permitieron su transformación.

### II.3.3.1. Historia

La historia de los cultivos celulares comenzó hace más de 100 años, cuando Reclinhhausen en 1866, mantuvo vivas células sanguíneas de anfibio, pero fue la utilización de bloques de agar con plasma coagulado (soporte y alimento) el inicio del cultivo de células *in vitro* (Freshney, 2010). El desarrollo de cultivos celulares de vertebrados comenzó en 1885 cuando Wilhelm Roux cultivó células de embrión de pollo en solución salina durante algunos días, demostrando que las células embrionarias pueden sobrevivir fuera del cuerpo del animal de origen.

A principios del siglo XX, el interés por desarrollar los cultivos celulares fue promovido por la necesidad de entender los eventos fisiológicos normales. Adicionalmente, se vio la necesidad de utilizar técnicas de cultivo celular para estudiar el comportamiento de las células animales libres de la influencia sistémica, tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés.

El zoólogo estadounidense R.G. Harrison es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales. Este investigador fue el primero (1907) que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios; de esta manera pudo observar el crecimiento de los axones de los neuroblastos, y estableció que el axón se formaba por extensión a partir del cuerpo neuronal y no por fusión de una cadena de células, como se creía hasta entonces.

La importancia de los cultivos celulares, especialmente a gran escala, se volvió evidente con la necesidad de vacunas virales en los años 40. Cuando en 1949 se demostró que el virus de la polio podía ser cultivado en células humanas, no neuronales, comenzó un gran interés por desarrollar vacunas en este tipo de cultivos. La vacuna contra la polio, producida a partir de virus inactivado, se convirtió en el primer producto comercial originado en cultivos de células. Esta vacuna se obtuvo, gracias a los trabajos de John Fenders, Thomas H. Weller y Frederick C. Robins, quienes recibieron el premio nobel (1954), por su trabajo de crecimiento de virus en cultivos celulares.

Una serie de innovaciones como el desarrollo de medios de cultivo (Eagle, 1955), el uso de antibióticos, las técnicas de tripsinización para el pasaje de células (Moscona y Moscona, 1952) y la suplementación del medio con suero fetal bovino,

permitieron el desarrollo y aplicabilidad de los cultivos de células de origen vertebrado.

En 1952, Gey *et al.*, establecen la primera línea celular continua, las células HeLa, células extraídas a partir de un tumor de cuello del útero de una paciente afroamericana. El medio empleado era extremadamente complejo y poco definido: plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano.

En 1975, Kohler y Milstein establecen la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales. El establecimiento de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales les valió el Premio Nobel. En la década de 1980 se empiezan a conocer los mecanismos de la transformación y ya en los años noventa empezaron a producirse medicamentos a escala industrial en biorreactores. En 1998 se produce cartílago mediante ingeniería de tejidos y en 2007 se reprograman células adultas para convertirlas en células pluripotenciales inducidas.

### II.3.3.2. Aplicaciones

Los cultivos de células animales se utilizan hoy en día tanto para estudios básicos como para estudios aplicados (Freshney, 2010):

- Para diagnosticar enfermedades hereditarias, detectar anomalías en el embrión antes del nacimiento, y observación de anormalidades en los cromosomas.
- En el estudio del comportamiento de células malignas.
- En el diagnóstico de enfermedades infecciosas (producidas por bacterias o virus), genéticas, metabólicas y tumorales.
- Para el ensayo de drogas.
- Para multiplicar virus y micoplasmas para la obtención de vacunas.
- Para demostrar efectos tóxicos producidos por metales, compuestos orgánicos, antibióticos, cancerígenos, colorantes, aditivos alimentarios, plaguicidas, efectos de las radiaciones, nuevos biomateriales, etc.
- Para producir hormonas (insulina, hormona del crecimiento).
- Para obtener productos farmacéuticos y medicinales (vacunas de uso humano y veterinario, anticuerpos y proteínas para diagnóstico,...).
- Para la obtención y propagación de híbridos celulares (fusionar dos células diferentes para hacer estudios cromosómicos y obtener anticuerpos).

- En las técnicas de reproducción asistida (cultivo de ovocitos, cultivo de embriones, criopreservación de óvulos, espermatozoides y embriones).

Son muchas las perspectivas de futuro en las aplicaciones clínicas que pueden tener las tecnologías basadas en el cultivo y diferenciación de células madre (*Stem Cells*) como la cirugía reconstructiva, la regeneración de tejidos y órganos dañados, bancos de tejidos, terapia celular y terapia génica, bioingeniería, trasplantes autológicos, etc.

Actualmente, desde que se aprobó la nueva ley de reproducción asistida (2003) son varios los centros, como por ejemplo, el Centro de Medicina regenerativa de Barcelona (CMRB), los que tienen la misión de investigar con células madre embrionarias humanas y con diferentes modelos de animales para aumentar el conocimiento sobre los mecanismos básicos del desarrollo inicial y de la organogénesis, y sobre la aplicación de las líneas celulares derivadas de células madre (medicina regenerativa) a enfermedades con pérdida celular (enfermedades degenerativas).

#### II.3.3.3. Bases de los cultivos celulares animales

Para conseguir que las células de un determinado organismo puedan sobrevivir y multiplicarse fuera de él es necesario reproducir en el laboratorio las condiciones físicas, químicas, así como medios de defensa frente a las infecciones (Coecke *et al.*, 2005).

##### ➤ Necesidades nutritivas (Medios de cultivo. Suero)

En el animal, la sangre aporta los nutrientes y elimina los productos de desecho del metabolismo celular. En el laboratorio, el aporte de nutrientes se realiza añadiendo medio de cultivo y la eliminación de metabolitos mediante la renovación periódica del medio de cultivo.

Los nutrientes son prácticamente los mismos que necesita una célula dentro de su organismo: aminoácidos, purinas y pirimidinas, glúcidos, lípidos, vitaminas, coenzimas, sales, etc. Estas necesidades se cubren con los medios de cultivo, los cuales además de los elementos nutritivos, deben mantener las constantes físico-químicas (pH y osmolaridad) (Hartung *et al.*, 2002).

El medio de cultivo (medios sintéticos) asegura la supervivencia de las células, pero para que éstas se multipliquen y expresen diferentes funciones celulares, necesitan la adición de una cierta concentración de suero generalmente de origen bovino. En la actualidad existen medios definidos (*Serum-free media*) que no necesitan ser suplementados con suero, ya que incorporan en sus fórmulas factores de crecimiento.

En cuanto al suero aporta factores de adherencia y extensión, hormonas y factores estimulantes del crecimiento, proteínas transportadoras, aminoácidos, vitaminas, lípidos, glúcidos, minerales y elementos traza. Además tampona el medio de cultivo, inactiva enzimas proteolíticas y aumenta la viscosidad del medio, lo que origina un efecto protector en el trabajo de laboratorio (pipeteo, agitación, congelación,...).

Existen diferentes tipos de sueros, sin embargo, el más usado en la actualidad debido a sus características (pobre en anticuerpos, pobre en lípidos, rico en factores de crecimiento, etc) es FS (FBS, Foetal Bovine Serum; FCS, Foetal Calf Serum).

➤ Requerimientos físicos de las células en cultivo (Gil-Loyzaga, 2011; Freshney, 2010).

- pH. El pH fisiológico de cada animal varía entre 6,9-7,7. Para mantener un pH fisiológico *in vitro* se usan concentraciones de este rango en los medios de cultivo, así como incubadores con 5-10% de CO<sub>2</sub>. En los medios de cultivo se usan diferentes tampones como el bicarbonato, hepes o piruvato. Por la importancia que tiene la regulación del pH se suelen poner en el medio de cultivo indicadores (sustancias que cambian de color según el valor del pH) como es el caso del rojo fenol, que permite apreciar cualquier variación en el pH y evitar que las células se expongan durante largos periodos de tiempo a pH extremos.

- Concentración osmótica. La concentración osmótica depende de la concentración de iones, y es responsable del intercambio de agua y nutrientes entre la sangre y las células. La tolerancia es mayor en las células que crecen sobre una superficie que en las que lo hacen en suspensión. Para evitar aumentos de la concentración osmótica, por pérdida de agua en los medios de cultivo se usan incubadores que produzcan una humedad ambiental aproximada del 100%.

- Temperatura. La temperatura a la que crecen las células animales es la del organismo al que pertenecen, existiendo ligeras diferencias entre los distintos tejidos. En general, cualquier aumento de la temperatura propia del tejido suele ser letal. Por el contrario hay muchos tipos de células a las que una bajada de temperatura no les afecta en exceso, simplemente detienen su crecimiento.

- Sustrato. La naturaleza del soporte sobre el que crecen las células es muy importante, y viene dada por el tipo de células y el uso que se les vaya a dar. El poliestireno tratado (rayos, químicamente, arco eléctrico) es usado casi universalmente en la actualidad, aunque existen otros tipos de plásticos como PVC o el celofán.

### ➤ Protección de las células en cultivo

Las células en cultivo producen sustancias tóxicas procedentes de su metabolismo, por lo que el medio de cultivo ha de ser cambiado a menudo. En cultivos *in vitro* las células no están protegidas por el sistema inmune o por estructuras o mecanismos fisiológicos como ocurre en el organismo, por lo que es necesario recurrir a condiciones rigurosas de esterilidad para evitar la presencia en nuestro sistema de cultivo de cualquier agente extraño, no deseado como iones o moléculas, microorganismos u otros tipos celulares diferentes a los que queremos cultivar (uso de antibióticos, filtros, material estéril...) (Freshney, 2010).

En el caso de la contaminación biológica existen diferentes medidas de prevención que se deben de llevar a cabo:

- Sistemas de trabajo correcto: empleo de agua de calidad, seguimiento de GLP (Good Laboratory Practice) y GCCP (Guidance on Good Cell Culture Practice),....

- Controles de calidad (zona de trabajo, materiales, medios, reactivos,...).

- Uso estratégico de antibióticos (penicilina, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, tilosina, nistatina, etc) para evitar la contaminación por bacterias, micoplasmas y hongos.

Existen diferentes formas de detectar los contaminantes: cambios en el medio (pH y turbidez), observación al microscopio (morfología celular, movimientos,

alteraciones por aparición de vesículas, refringencia, adherencia) y métodos específicos para virus y micoplasmas.

En el caso de detectar contaminación en nuestro cultivo podemos destruir el cultivo o en el caso de ser irremplazable tratar de descontaminarlo (lavado diario con PBS y antibióticos a altas concentraciones, antibiograma o separación en gradientes de concentración).

### II.3.3.4. Cultivos primarios y líneas celulares

Los cultivos primarios son las células trasplantadas del tejido al frasco de laboratorio. Se puede obtener a partir de explantes primarios (fragmento de tejido o de órgano en el que las células de la periferia pueden proliferar por la superficie del soporte) o de suspensiones de células disgregadas. Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia. En esta etapa, las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene. Por eso, al cabo de un tiempo hay que trasladar las células a un nuevo soporte (subcultivo o pase).

Sin embargo, algunas de éstas mueren al cabo de un tiempo. Pocas veces se pueden mantener estos cultivos más de unas semanas. Cuando se consigue mantenerlas en cultivo indefinidamente dan lugar a una línea celular primaria obtenida a partir del primer subcultivo (Hartung *et al.*, 2002).

Normalmente, las líneas celulares tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar entre 20 y 100 generaciones. Superado ese límite, las células entran en una etapa que se denomina senescencia en la que pierden su capacidad de proliferar, por el acortamiento de los telómeros, y mueren. Sin embargo, algunas células (como las células de roedores y las células tumorales) evitan la senescencia y dan lugar a líneas celulares continuas, que crecen indefinidamente. Estas células pueden surgir de forma espontánea o inducida (infección vírica, transfección de ADN, exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos químicos) y son el resultado de un cambio genotípico denominado transformación, presentando, entre otras, la propiedad de división celular ilimitada.

Según su morfología, las líneas celulares de uso más frecuente pueden ser linfoides, epiteliales o fibroblásticas. Las células de tipo linfóide crecen generalmente



en suspensión, mientras que las células de tipo epitelial y las fibroblásticas necesitan crecer sobre un soporte sólido, adheridas a la superficie de los frascos de cultivo. Estos últimos tipos de líneas celulares (siempre que sean líneas celulares normales no tumorales) exhiben el fenómeno denominado inhibición por contacto, es decir, cesan de dividirse cuando ocupan toda la superficie de cultivo disponible (Iturralde y Coll, 1984).

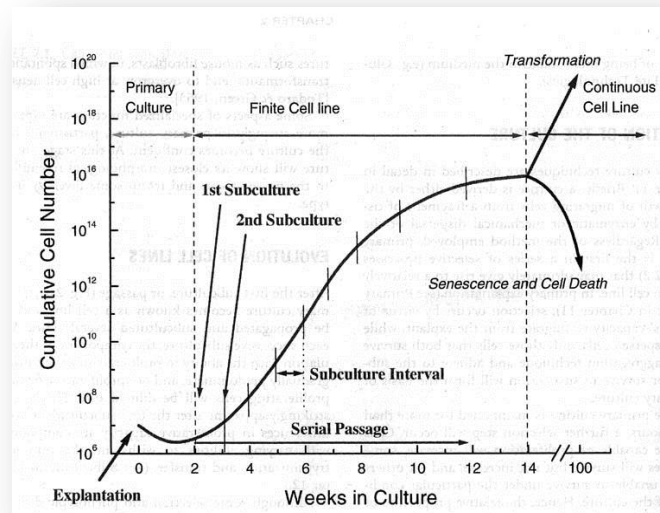
Las líneas de cultivo previamente establecidas pertenecen a células de origen animal que se han adaptado a vivir en cultivo por el proceso denominado transformación, que puede ocurrir espontáneamente o puede ser inducido por un compuesto químico, radiaciones o virus. Las células pasan a tener vida infinita convirtiéndose en una línea celular establecida. Por vida infinita se entiende la capacidad de éstas células de multiplicarse *in vitro* durante periodos prácticamente ilimitados. Las líneas celulares continuas o establecidas tienen la ventaja de suministrar gran cantidad homogénea de un solo tipo celular, siendo muy adecuada para estudios bioquímicos cuantitativos (Repetto y Repetto, 2009).

#### II.3.3.5. Cinética de crecimiento

Se ha establecido que el objetivo principal del cultivo de células animales y humanas es estandarizar e implementar procedimientos que permitan mantener y expandir una población de células de interés (Freshney, 2010), aplicando una rigurosa evaluación y monitoreo de dicho cultivo de manera constante y/o rutinaria. Esta valoración solo puede llevarse a cabo si se conoce el comportamiento normal de un cultivo de células animales y humanas. En este sentido, Phelan (1998) estableció que la evolución de un cultivo celular primario se puede clasificar en tres estados:

- Fase de latencia. Al comienzo del cultivo, las células se adhieren y extienden sobre el sustrato e inician su metabolismo. La duración varía entre horas y días según la línea celular y la densidad de células sembradas.
- Fase exponencial o logarítmica. Durante esta etapa las células crecen y sintetizan ADN. La población se duplica en poco tiempo. En esta fase se calcula el “doubling time” o “tiempo de duplicación” de la población.
- Fase estacionaria. Al final se alcanza un nivel máximo de población, determinado por la cantidad de nutrientes o por la densidad celular. Cuando las células contactan, se

inhibe la síntesis de ADN, por tanto las líneas celulares normales, como mantienen la inhibición por contacto, dejan de dividirse y pueden mantenerse vivas durante varios días, ya que no llegan a agotar los nutrientes del medio. Si no se cambia el medio, al final mueren. Por el contrario, las células transformadas, como carecen del fenómeno de inhibición por contacto, continúan dividiéndose, se amontonan, agotan los nutrientes y mueren.



**Figura 11.** Curva de crecimiento: fases  
(Freshney, 2010)

### II.3.3.6. Conservación de líneas celulares

Con el fin de minimizar la acumulación de alteraciones genéticas en las líneas celulares establecidas, así como evitar la senescencia y la transformación de cultivos primarios o, simplemente, la pérdida accidental de un cultivo celular por muerte o contaminación, es imprescindible recurrir a métodos de almacenamiento adecuados.

Las líneas celulares pueden mantenerse congeladas a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido y en determinadas condiciones. La descongelación rápida hace que se recuperen las células con más de un 50% de viabilidad celular.

II.3.4. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS ENSAYOS *IN VITRO*

Ya se han ido enunciando muchas de las ventajas de los métodos de experimentación *in vitro*, pero también presentan algunas limitaciones con respecto a los métodos *in vivo*.

**Tabla 7.** Ventajas y limitaciones de los ensayos *in vitro* (Zúñiga *et al.*, 2008; Rodríguez, Hernández y De Costa, 2001)

VENTAJAS	INCONVENIENTES
<b>Son ética y moralmente más aceptables que los ensayos <i>in vivo</i>, ya que no es necesario usar animales vertebrados o un número considerablemente menor.</b>	La necesidad de utilizar más de un método de ensayo.
<b>Utilizan material biológico homogéneo. Permiten además el uso de células vivas pudiéndose estudiar procesos metabólicos, fisiológicos y el desarrollo de procesos celulares o el efecto directo de determinadas sustancias sobre ellos.</b>	La carencia de las complejas interacciones existentes entre los distintos órganos de un ser íntegro, además de las dificultades encontradas para reproducir la arquitectura tisular tridimensional de los organismos superiores.
<b>Permite la experimentación con células humanas. Por lo que se pueden establecer modelos biológicos derivados de células humanas para predecir mejor la toxicidad en el hombre.</b>	La generalmente limitada duración de la actividad fisiológica, fundamentalmente de las células especializadas, y con ello, las dificultades existentes para detectar efectos retardados o crónicos.
<b>Permiten estudiar las acciones sobre una determinada población celular o fracción subcelular aislada en la que se presuponga la diana principal o secundaria evitando con ello las interferencias.</b>	La ausencia, en la mayoría de los modelos, de ciertos fenómenos cinéticos como la capacidad de activar y detoxicar compuestos químicos.
<b>Facilitan determinados estudios especializados, como los electrofisiológicos, transformación y eliminación de sustancias, etc.</b>	Las dificultades para aplicar sustancias poco solubles, volátiles, gaseosas o que se descomponen rápidamente o explotan en contacto con el medio de cultivo.
<b>Son más fácilmente objetivables y cuantificables que los ensayos <i>in vivo</i>, por poderse someter directamente a medición por técnicas fisicoquímicas.</b>	La posibilidad de obtener resultados erróneos debidos al ensayo en condiciones no adecuadas o cuando el compuesto las modifica por si mismo (cambios de pH, osmolaridad)
<b>Los resultados presentan mayor reproducibilidad que los métodos con animales, al consistir cada ensayo en unos pocos componentes, sistemas más</b>	La complejidad de la extrapolación, sobre todo cuando no se dispone de información sobre las concentraciones que producen efectos <i>in vivo</i> .

homogéneos, en condiciones controladas, sin interferencias de otros factores como el estrés animal, cambios estacionales, etc.
Posibilitan una mayor precisión en el control directo de la dosificación, es decir, la cantidad de xenobiótico en interacción con el órgano diana.
Permite el control absoluto del periodo de contacto con el producto evaluado, puesto que el compuesto puede aplicarse y retirarse a voluntad del investigador.
Facilitan del estudio de los mecanismos de acción, diferenciando la lesión primaria de las que se desencadenan a continuación, al ser posible interrumpir o modificar el proceso en cualquier momento. Además, reducen el periodo de latencia y facilitan el estudio cronológico de las acciones. Al ser modelos más simples, permiten estudiar las influencias cinéticas más fácilmente y con mayor profundidad.
Suponen un importante ahorro de tiempo al facilitar los resultados con mayor rapidez.
Tiene un coste económico bastante menor y precisan instalaciones menos complejas que las exigidas legalmente para realizar estudios con animales.
Requieren menores cantidades de los productos ensayados que los métodos <i>in vivo</i> . Ello es particularmente importante cuando se trata de sustancias recién sintetizadas o en periodo de prueba, o cuando se evalúan vertidos, residuos o tóxicos.

A pesar de tener algunas desventajas, los modelos *in vitro* se están convirtiendo en los procedimientos de elección utilizados de manera rutinaria en investigación básica.

Los procedimientos *in vitro* tienen entidad propia entre los métodos experimentales y proporcionan una información más profunda sobre los mecanismos de acción que la obtenida *in vivo*. De hecho, en muchas áreas de la biomedicina los

métodos *in vitro* se utilizan más ampliamente que los modelos animales porque aportan información científica más detallada (Gil-Loyzaga, 2011).

### II.3.5. JUSTIFICACIÓN DE LOS ENSAYOS *IN VITRO*

Las principales razones por las que los métodos de investigación *in vitro* deberían tender a sustituir en lo posible la experimentación animal son (Zúñiga *et al.*, 2008):

- *Morales y éticas*, ya que en la experimentación animal se somete a estrés y sufrimiento a seres vivos, capaces de percibir dolor.
- *Económicas*, debido al alto coste de ensayos con animales.
- *Científicas*, las experiencias con células permiten limitar o fraccionar los procesos fisiopatológicos, lo que favorece el entendimiento de las fases, incluso de la interacción molecular y la medición en términos cuantitativos de acciones y efectos, lo que, a su vez, hace posible la comparación objetiva de unas sustancias con otras.
- *Sociopolíticas*, debidas a la presión de diferentes grupos sociales que exigen la abolición de la experimentación animal apoyándose en motivos éticos.
- *Legales*, ya que la legislación europea y española establece: *No deberá realizarse un experimento si se dispone de otro método científicamente satisfactorio y contrastado que permita obtener las mismas conclusiones, sin implicar la utilización de animales* (Directiva del Consejo 86/609/CEE; R.D. 53/2013).

### II.3.6. INDICADORES DE TOXICIDAD *IN VITRO*

Para cuantificar la capacidad tóxica y los mecanismos por los que actúan los compuestos tóxicos se emplea una gran diversidad de determinaciones y ensayos.

Los principales indicadores utilizados en nuestro estudio son la morfología celular y tisular, la viabilidad celular, proliferación celular y alteraciones de las membranas celulares.

### II.3.6.1. Morfología celular y tisular

La afectación de la estructura celular suele evaluarse estudiando el tamaño y la forma celular; las uniones y mecanismos de contacto entre las células; el tamaño, forma e inclusiones del núcleo; el número, tamaño y forma de los nucléolos, así como sus inclusiones; y la presencia de vacuolas citoplásmicas. Para estudiar estos cambios se emplea: microscopio óptico invertido, que permite observar mediante contraste de fases la morfología de las células vivas y detectar gránulos citoplasmáticos, vacuolas y retracción, pérdida y necrosis celular; microscopio electrónico de barrido, que al mostrar tridimensionalmente la superficie celular, permite observar la adherencia y las alteraciones de la membrana incluso en órganos perfundidos y el microscopio electrónico de transmisión, que permite identificar ultraestructuralmente los cambios iniciales reversibles y los finales irreversibles que ocurren durante la necrosis celular (Gil-Loyzaga, 2011).

### II.3.6.2. Viabilidad celular

La distinción entre células vivas y muertas suele cuantificarse aprovechando la capacidad que sólo poseen las células vivas de excluir (eliminar tras la absorción) colorantes vitales como el azul de tripán. Por el contrario solo las células vivas absorben colorantes como el rojo neutro (fluorescente).

El grado de adhesión de las células a la superficie de cultivo es proporcional al estado de salud de las mismas. Puede evaluarse contando las células adheridas o despegadas, midiendo el intercambio celular tras marcaje isotópico o por tinción selectiva del ADN y evaluación fluorimétrica o por citometría de flujo.

### II.3.6.3. Proliferación celular

La capacidad de las células para multiplicarse en cultivos, es inhibida de forma muy sensible por la mayoría de los tóxicos (Repetto y Repetto, 2009). El incremento en el número de células puede evaluarse bien por el simple recuento directo en la monocapa o con un contador electrónico, que permite además determinar el volumen celular. También puede valorarse mediante métodos indirectos por cuantificación del incremento en el contenido total de ARN o ADN, proteínas, enzimas o colorantes vitales captados, por la capacidad de formación de clones o por alguno de los métodos ya citados.

#### II.3.6.4. Membranas celulares

Las membranas celulares pueden ser alteradas por los tóxicos de varias formas: composición y estabilidad, permeabilidad iónica y sistemas de transporte.

La interacción de diferentes tóxicos con los mecanismos de síntesis o degradación de lípidos o proteínas producen alteraciones, bien inespecíficas, o bien selectivas sobre algún tipo de componente determinado de las membranas celulares (Repetto y Repetto, 2009).

### II.4. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Los tests de citotoxicidad general están destinados a evaluar efectos sobre funciones vitales de las células, para los cuales las líneas celulares de distintos tejidos y de diferentes especies existentes comercialmente constituyen un modelo celular adecuado (Zúñiga *et al.*, 2008).

La evaluación de la citotoxicidad basal puede realizarse de distintas formas, conocidas como ensayos de viabilidad celular que se realizan normalmente tras un periodo de 72 horas o menos de exposición al tóxico y pueden ser descritos como ensayos a corto plazo o agudos (Bols, Dayeh, Lee y Schimer, 2005).

El daño celular causado por xenobióticos generalmente tiene como resultado la alteración de la permeabilidad de la membrana celular. Como consecuencia se produce el vertido hacia el exterior de enzimas citoplasmáticas. Los ensayos de viabilidad son muy utilizados como indicadores de citotoxicidad. Entre ellos, el test mitocondrial del MTT y el de captación de rojo neutro, son los más utilizados.

Para expresar la citotoxicidad de un compuesto se utilizan los índices de citotoxicidad conocidos como  $CI_{10}$  y  $CI_{50}$ , que hacen referencia a las concentraciones que causan un 10% y un 50% de muerte celular respectivamente (Zuñiga *et al.*, 2008).

#### II.4.1. YODURO DE PROPIDIO

Existen métodos que miden la capacidad de la membrana plasmática de excluir grandes moléculas voluminosas como los colorantes. Un ejemplo de ello es el

colorante fluorescente yoduro de propidio. Este colorante es impermeable a la membrana y generalmente excluido de células viables. Se utiliza para evaluar la viabilidad celular o del contenido de ADN mediante citometría de flujo o para visualizar el núcleo u otros orgánulos que contienen ADN mediante microscopía (Moore, Donahue, Bauer, Mather, 1998).

### II.4.2. LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

Existen métodos que miden la capacidad de la membrana plasmática de retener moléculas intracelulares (marcadoras), como la aparición en el medio de una enzima intracelular como la lactato deshidrogenasa (Bols *et al.*, 2005). La actividad de la LDH puede ser determinada mediante una reacción enzimática en la cual la LDH oxida el lactato dando piruvato, el cual reacciona luego con una sal de tetrazolio convirtiéndola en formazán. El incremento en la cantidad de formazán producido en el sobrenadante de cultivo se correlaciona directamente con el número de células muertas. El formazán es soluble en agua y puede ser detectado midiendo su absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro.

### II.4.3. TEST DEL ROJO NEUTRO (RN)

Se considera que un compuesto es citotóxico independientemente de su mecanismo de acción, si interfiere en el proceso de división y multiplicación celular. Ello conlleva a una reducción de la velocidad de crecimiento celular reflejándose en el número de células presentes en el cultivo. El grado de inhibición del crecimiento relacionado con la concentración del compuesto que se evalúa es un índice de toxicidad (Reinecke y Helling, 2002).

El rojo neutro es captado por las células (específicamente por los lisosomas y endosomas) y en la medida que la célula pierda viabilidad por la acción del compuesto que se evalúa, se libera al medio el colorante pues solo las células viables son capaces de retener el colorante en su interior. Seguidamente se determina la cantidad de rojo neutro que permanece después de la exposición dentro de la célula y se calcula la concentración que produce la inhibición del 50 % del crecimiento celular (Norton, 2000).

Los valores de absorbancia deben oscilar en un rango de 0,2 – 1,0 para dar una correlación adecuada entre el número de células presentes y la densidad óptica



observada (Doillon, Gagnon, Paradis y Koutsilieris, 2004). La mayoría de los autores plantean que se deben evaluar hasta 6 concentraciones del compuesto, alcanzando una concentración de 1000 µg/ml ó hasta el límite máximo de solubilidad del producto en el medio (Arencibia, Rosario y Curveco, 2009).

#### II.4.4. ENSAYO DE ENLAZAMIENTO AL AZUL DE KENACID

Mediante este ensayo se mide el cambio en el contenido de proteínas totales, lo cual constituye un reflejo de la proliferación celular (Lodish *et al.*, 2002). Si un compuesto es citotóxico a la célula debe afectar al menos uno o más procesos implicados en la proliferación celular como son: la síntesis del ADN, el funcionamiento adecuado de las organelas como mitocondrias, lisosomas, o producir una afectación de la integridad de la membrana o en la síntesis de proteínas (INVITOX, 1996). Al encontrarse afectado el crecimiento celular debe reducirse el número de células presentes en el cultivo tratado con respecto al control, por lo que la medida de la concentración de proteínas presentes en el cultivo constituye un índice de toxicidad. Por lo general se exponen las células al producto que se evalúa durante un tiempo o período de 72 horas y seguidamente se retira el producto y se exponen las células al colorante, el cual enlaza a las proteínas celulares. Por último se determina la cantidad de azul de kenacid retenido por las células y se cuantifica el porcentaje de inhibición del crecimiento celular (Vanesa, 2009; Arencibia, Rosario y Curveco, 2009). El período de exposición de la sustancia de ensayo varía entre 24 -72 horas.

#### II.4.5. RESAZURINA

La resazurina es un colorante no fluorescente de color azul que puede ser reducido a resofurina (rosado, altamente fluorescente), por oxidoreductasas que se encuentran principalmente en la mitocondria de células viables. La resofurina es excretada al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o la citotoxicidad de sustancias sobre células humanas, animales, bacterias e incluso hongos (Rolón, Vega, Escario y Gómez-Barrio, 2006; Zhang, Du y Zhang, 2004; Palomino, Martin, Camacho, Guerra, Swings, y Portaels, 2002). Este colorante es poco tóxico para las células y permite la continuidad de estudios en las mismas células, economizando tiempo y dinero, especialmente en cultivos primarios donde las células son muy escasas y preciadas. Es posible obtener una medida de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm y/o fluorescencia en 530 nm (excitación) y 590 nm

(emisión), ya que este colorante tiene propiedades tanto cromóforas como fluoróforas (Anoopkumar-Dukie *et al.*, 2005).

### II.4.6. CRISTAL VIOLETA

El cristal violeta, también conocido como violeta de genciana es un colorante utilizado como una tinción biológica general (Odewumi *et al.*, 2015). El protocolo del ensayo con cristal violeta se basa en el hecho de que las células requieren de una membrana celular intacta para establecer el apego y apoyar el proceso. Por lo tanto las células muertas quedan suspendidas en el medio y son retiradas con éste antes de realizar el ensayo. A continuación las células que quedan se lavan con PBS y posteriormente son fijadas (por lo que las células que quedan mueren) y teñidas con el colorante. Después se procede a su retirada y lavado posterior y solubilización con MeOH y acético. La viabilidad celular se evalúa mediante la medida de la absorbancia a 595nm y 690 nm en un lector de placas.

### II.4.7. ENSAYO COMETA

La electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa, ha sido desarrollado para la medición de sustancias tóxicas que inducen roturas en la cadena de ADN en células de mamífero (McKelvey-Martin *et al.*, 1993). Si las células expuestas se someten a electroforesis, los fragmentos de ADN migran fuera del núcleo y forman una cola detrás del núcleo. Esta cola semejante a un cometa puede ser visualizado con tinción fluorescente del ADN mediante bromuro de etidio. La longitud del cometa indica el grado de actividad genotóxica (Segner, 1998).

### II.4.8. TEST MITOCONDRIAL DEL MTT

El ensayo de MTT o (Mossmann, 1983; Denizot y Lang, 1986; Plumb, Milroy y Kaye, 1989) es un método colorimétrico sensible y cuantitativo con el que se puede medir viabilidad, proliferación y actividad celular. Dicho método fue desarrollado por Mosmann 1983 como (método) colorimétrico cuantitativo de microtitulación para la determinación de la supervivencia y capacidad de proliferación de células mamíferas

El ensayo de MTT se basa en la reducción de una sal de tetrazolio (MTT), soluble, de color amarillo en un producto insoluble de color azul (formazano). Esta reducción se realiza en el interior de las células vivas por la enzima mitocondrial

succinato deshidrogenasa. La cantidad de formazano producida es directamente proporcional al número de células y se mide por colorimetría.

La capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular y nos permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa (Jiménez, González, Fernández y López, 2007).

El hecho de que la enzima succinato-deshidrogenasa se encuentre ausente en el suero ha sido el responsable del desarrollo y amplio uso de esta técnica. Tiene la ventaja de que permite procesar gran cantidad de muestras rápidamente y con una gran precisión al realizar los ensayos en placas de 96 pocillos.

El MTT metabolizado a formazano forma cristales insolubles en agua que permanecen atrapados en el interior de las células y deben ser solubilizados con disolventes orgánicos antes de realizar la colorimetría.

El período de exposición de la sustancia de ensayo varia puede ser durante períodos cortos (1-2 h de tratamiento), o largos de 24 ó 72 h.

## **II.5. ESTUDIO DE LAS CÉLULAS EN MICROSCOPIO ÓPTICO INVERTIDO (CONTRASTE DE FASES Y FLUORESCENCIA)**

En un microscopio óptico invertido la fuente de luz está ubicada por encima de la platina y el principio de funcionamiento y formación de la imagen es el mismo que el del microscopio tradicional. Este tipo de microscopio permite observar células sin colorear aumentando el contraste entre partes claras y oscuras. Resulta especialmente útil para células vivas.

En el caso de la fluorescencia es un proceso de interacción entre la radiación y la materia en el cual un material absorbe radiación de una fuente específica y muy rápidamente emite luz cuya energía es menor (de mayor longitud de onda) que la de la radiación que ha absorbido. Los electrones son excitados a estados vibracionales y rotacionales más altos y cuando vuelven a su estado fundamental emiten la energía de excitación en forma de radiación. Los materiales que fluorescen lo hacen porque contienen estructuras con configuraciones moleculares particulares conocidas como

fluorocromos (molécula capaz de absorber fotones y emitir fotones de menor energía, es decir, mayor longitud de onda) (Szabo, 2000).

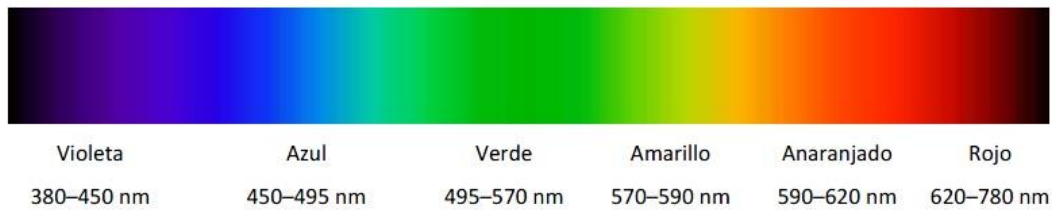


Figura 12. Espectro de luz visible

## II.6. ESTUDIO DE LAS CÉLULAS EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (MET)

Su fundamento es semejante al del microscopio óptico; utiliza como fuente de luz un haz de electrones en vez de rayos de luz. Con ellos se consigue una resolución de 0,2 nm, es decir, 100 veces mayor que con el microscopio óptico. El microscopio electrónico de transmisión es, en rasgos generales, similar al microscopio óptico pero de mayor tamaño e invertido. Para su uso, las muestra debe estar totalmente seca y ser extremadamente fina (50-100 nm de grosor), para que la radiación electrónica pueda atravesarla. Como consecuencia es imposible la observación de muestras *in vivo*. Mediante el MET podemos observar cómo afecta en tóxico a las estructuras internas de cada línea celular.

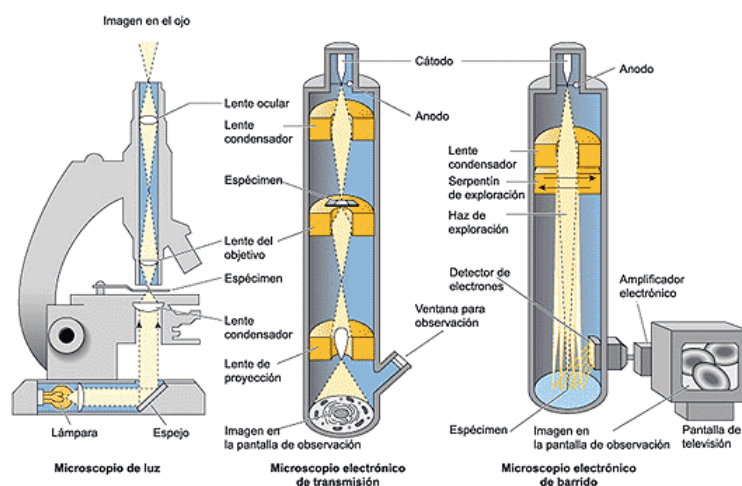


Figura 13. Diferentes microscopios y sus características (Gartner y Hiatt, 2002).

## II. 7. CITOMETRÍA DE FLUJO

### II.7.1 INTRODUCCIÓN

La técnica de la citometría de flujo (CMF) fue desarrollada en la década de los años sesenta, en los Estados Unidos y Alemania como un avance importante en la investigación de la biología celular (Shapiro, 1988).

La CMF es un método cuantitativo de análisis celular. Permite medir simultáneamente múltiples características físicas de una célula. Básicamente es un método analítico que permite la medida de emisión de fluorescencia y dispersión de la luz, producidas por la iluminación apropiada de las células o partículas microscópicas de una en una y arrastradas por un flujo portador, a medida que pasan frente a un sistema de detección. En algunos sistemas las células o partículas pueden ser separadas, de acuerdo a las propiedades que presentan.

La CMF aprovecha el desarrollo de un amplio número de moléculas fluorescentes, que se unen específicamente a moléculas celulares, se acumulan selectivamente en compartimentos celulares o que modifican sus propiedades a través de reacciones bioquímicas específicas. De esta forma, la CMF permite detectar y cuantificar estructuras y funciones de células individuales, partículas biológicas individuales o partículas biológicas aisladas, a elevada velocidad y siguiendo una aproximación multiparamétrica. Estas características la convierten en una técnica especialmente valiosa para caracterizar poblaciones celulares heterogéneas a través de un amplio rango de propiedades biológicas.

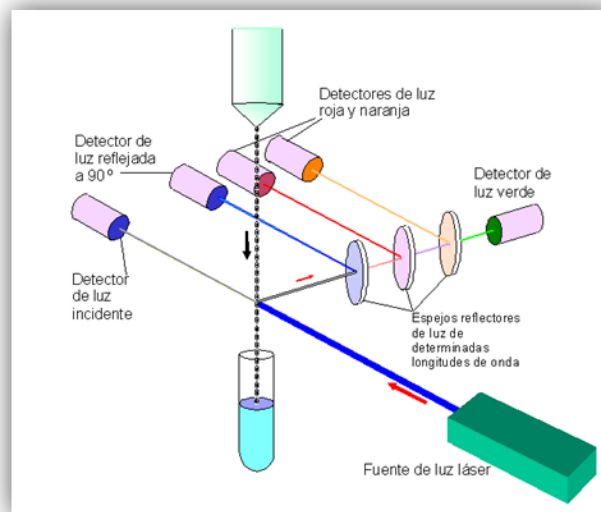
### II.7.2. FUNDAMENTO

El principio es hacer pasar células u otras partículas en suspensión, alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso.

La velocidad en que circulan las células es variable; lo hacen en un líquido isotónico que las transporta (PBS). Dicho líquido es atravesado por un láser. La interacción de la célula con el rayo de luz, genera señales luminosas que tras ser detectadas, se transforman en impulsos eléctricos, que se amplifican y se convierten en señales digitales, que se procesan por ordenador, de tal forma que podemos realizar el análisis de una célula en un tiempo de 10 a 40  $\mu$ seg.

La luz difractada al incidir el láser sobre una célula o partícula (fotones), será recogida mediante unos detectores, dándonos información del tamaño, de la granularidad y de la fluorescencia emitida por esa célula. Existe a su vez un soporte informático que nos va a permitir recoger, analizar y cuantificar los datos.

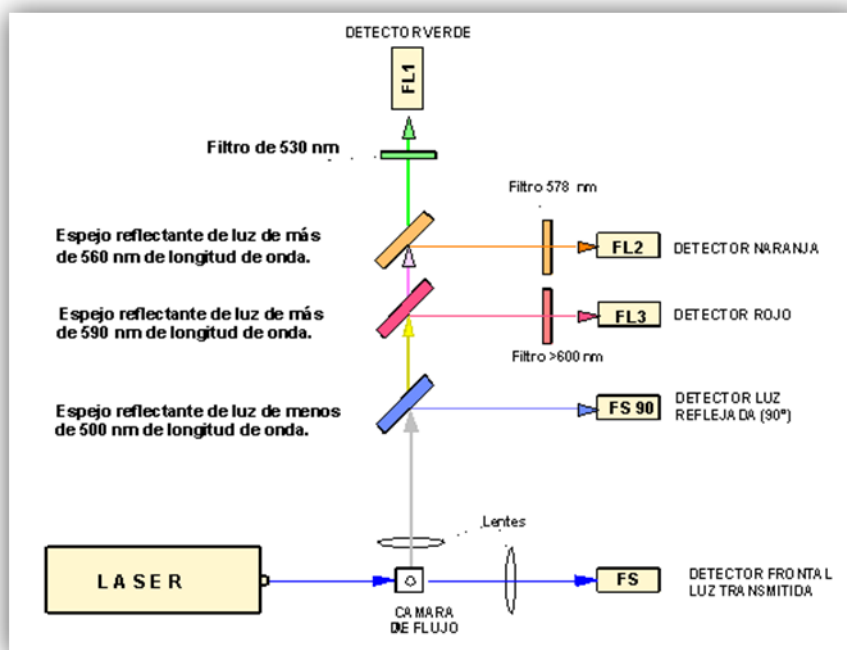
El haz del láser incide sobre la célula, saliendo de ella numerosos fotones a distintos ángulos. Los fotones que salen sin grandes desviaciones, entre 0 y  $10^\circ$  serán recogidos por el detector "Forward scatter" (parámetro FS) y nos dará información sobre el tamaño de la célula. Los que salen a  $90^\circ$  serán recogidos por otros detectores que nos darán idea de la fluorescencia y de la granularidad (Parámetro SSC).



**Figura 14.** Fundamentos del citómetro de flujo

(Fuente: [www.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic\\_en/Review/citometria\\_de\\_flujo.htm](http://www.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic_en/Review/citometria_de_flujo.htm))

Existe un sistema electrónico que convierte las señales ópticas en señales electrónicas proporcionales. Los fotones, llegan a los fotomultiplicadores, a los que se les aplica un voltaje, dan un impulso de corriente eléctrica y llega a los amplificadores que los transforman en una señal eléctrica, que se puede representar con un procesador de datos. Cada punto representa una célula y tiene unas coordenadas concretas.



**Figura 15.** Esquema general del funcionamiento de un citómetro de flujo  
(Fuente: [www.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic\\_en/Review/citometria\\_de\\_flujo.htm](http://www.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic_en/Review/citometria_de_flujo.htm))

## II. 8. APOPTOSIS Y NECROSIS

La apoptosis y la necrosis son parámetros biológicos que determinan el estado y posible utilización del cultivo, porque revelan condiciones específicas de la célula a nivel fisiológico, morfológico, bioquímico y genético que no pueden ser reconocidas de manera tan completa y clara por otros parámetros celulares.

La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes. La muerte celular, según criterios clásicos se puede dividir en una muerte que transcurre por mecanismos regulados, como la apoptosis, y la no regulada (necrosis) (Degterev y Yuan, 2008).

Durante la historia, la muerte celular fisiológica ha sido conocida por varios nombres. Pero no fue hasta 1972 cuando Kerr, Wyllie y Currie implantan el término «apoptosis», ampliamente utilizado en nuestros días, que evoca a la caída de las hojas desde los árboles en otoño o la de los pétalos de las flores. Durante los años 80 se describe la participación de la apoptosis en procesos patológicos y fisiológicos.

Durante los años 90 se vuelve uno de los principales tópicos de estudio dentro de la biología (Alfaro, García y Dueñas, 2000).

La muerte celular se puede producir por necrosis, cuando el daño es letal o se produce una muerte accidental. La necrosis (del griego nekros "muerte") es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo. Se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia (Lizarbe, 2007). Este tipo de muerte celular se puede producir debido a agentes nocivos, un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicos, por una infección o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune.

Esta forma de muerte celular se califica como un proceso desordenado, independiente de energía y violento, ya que las células se hinchan, se deterioran las estructuras celulares, y se paralizan funciones críticas para la vida. La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos (clara disfunción en las mitocondrias), dañando al tejido en el que se encuentra, lo que *in vivo* favorece la aparición de procesos inflamatorios (Alfaro *et al.*, 2000).

La apoptosis es un proceso que ocurre en los tejidos en condiciones fisiológicas normales (Kerr, Wyllie y Currie, 1972), que se puede presentar, ya sea porque el organismo requiere para su desarrollo de la muerte en particular de esa célula, o bien porque la célula sufrió un daño irreparable y muere en beneficio del organismo desempeñando un papel protector frente a posibles enfermedades (Alfaro *et al.*, 2000). Es un fenómeno fundamental en el desarrollo embrionario (Bellairs, 1961; Weil *et al.*, 1996) la metamorfosis (Kerr *et al.*, 1972; Goldsmith, 1966), el mantenimiento de la homeostasis tisular en el organismo adulto y regresión tumoral (Kerr y Searle, 1973), tanto en organismos vertebrados como invertebrados.

En el caso de la apoptosis, la célula muere por la activación de una serie de mecanismos que provocan que la célula no pierda la integridad de su membrana, y sólo va a presentar pérdida de dicha integridad hacia el final del proceso (Evan y Littlewood, 1998). Esto no se observa *in vivo* ya que las células apoptóticas son eliminadas por fagocitosis antes de perder la integridad de la membrana (Strange, Feng, Saurer, Burkhardt, Friis, 1992). En la apoptosis a diferencia de la necrosis, el



contenido celular no será liberado, sino encapsulado y luego removido en su totalidad por células limpiadoras (Campisi, 2003).

Debido a que la apoptosis requiere de la activación de genes para que se lleve a cabo este tipo de muerte celular, también ha recibido el nombre de muerte celular programada (MCP) (Schwartzman y Cidlowski, 1993). En las células *in vivo* no se produce inflamación ya que las células fagocitarias reconocen, captan y eliminan los cuerpos apoptóticos (Lizarbe, 2007).

### II.8.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

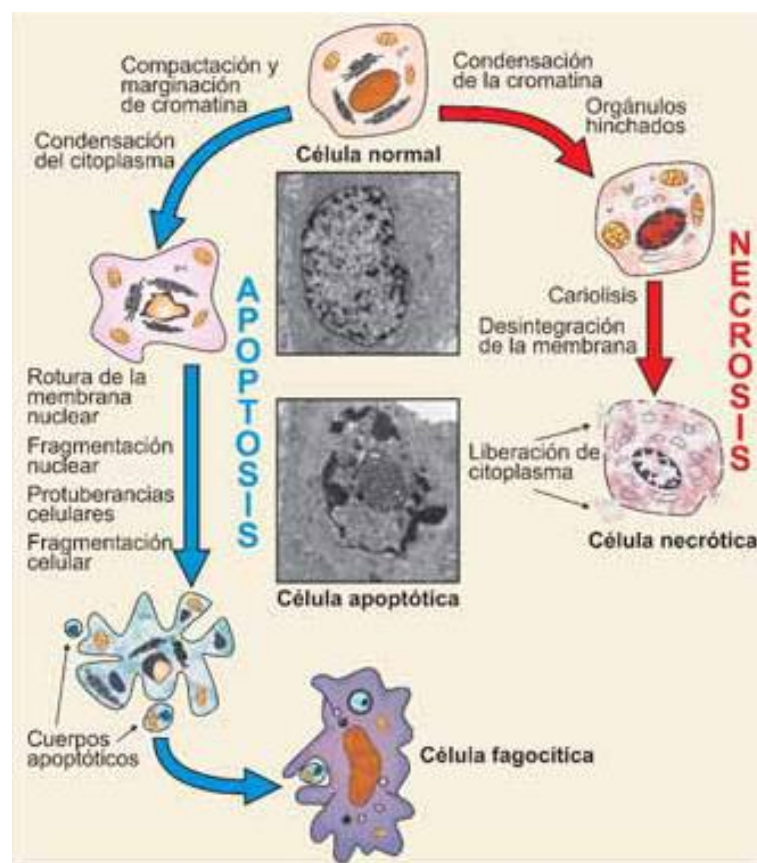
Los procesos apoptóticos se caracterizan por cambios morfológicos como:

- Pérdida de la unión celular y en la integridad de la membrana, así como cambios en la presencia de estructuras especializadas, como son las microvellosidades (Alfaro *et al.*, 2000).
- Aumento brusco de la densidad intracelular. El retículo endoplasmático se dilata, formándose vesículas que se fusionan con la membrana plasmática, eliminando su contenido al medio extracelular (Schwartzman y Cidlowski, 1993).
- Incremento moderado, pero sostenido, de la concentración de calcio libre citoplasmático ( $[Ca^{2+}]$ ). Sin embargo, en el proceso de necrosis, su aumento es drástico (Jordán, 2003).
- En la apoptosis temprana se mantiene la integridad de la membrana, por lo que continúa siendo permeable, pero se pueden observar cambios en la organización de la membrana citoplasmática; se produce la translocación de grupos glicanos a la superficie celular. Tal es el caso de la distribución de la fosfatidil serina, la cual es una molécula que se encuentra orientada hacia el interior de la célula (Van Engeland, Ramaekers, Schutte, Reutelingsperger, 1996). Estos grupos van a actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos, evitando la liberación del contenido celular y la posible reacción inflamatoria en células *in vivo* (Vermes, Haanen, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger, 1995; Bratton *et al.*, 1997; Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Elmore, 2007). Se ha descrito que este fenómeno es un biomarcador efectivo para la detección de una célula apoptótica (Vermes *et al.*, 1995; Bratton *et al.*, 1997; Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Arur *et*

*al.*, 2003; Pozarowski, Grabarek, Darzynkiewicz, 2003; Elmore, 2007; Mukhopadhyay *et al.*, 2007; Gasser, Hehl, Millward, 2009).

- Alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto. Como consecuencia aparece una deformación, resultado de la actividad de las proteasas, modificándose el transporte intracelular retrógrado de factores de crecimiento y de proteínas (Jordán, 2003).
- Conforme el proceso avanza se observa la condensación y posterior fragmentación de la cromatina, por acción de endonucleasas endógenas.

Los cuerpos apoptóticos quedan como restos celulares que finalmente se rompen (Fuji, Shiratsuchi, Manaka, Yonehara, Nakanishi, 2001). Esta fase terminal en células *in vitro* se llama necrosis secundaria (Wyllie, 1981) o aponecrosis (Formigli *et al.*, 2000).



**Figura16.** Características morfológicas de la muerte celular por apoptosis y necrosis (Lizarbe, 2007)

II.8.2. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y BASES GENÉTICAS

La característica bioquímica mas distintiva de este proceso es la alteración de la homeostasis celular, proceso muy regulado y el cual puede ser o no dependiente de energía (Searle, Kerr y Bishop 1982; Schulze-Osthoff, Ferrari, Los, Wesselborg y Peter, 1998; Zhang y Xu, 2002).

La degradación del ADN nuclear es un evento irreversible, siendo ésta una característica molecular del proceso apoptótico que lo diferencia del proceso de necrosis celular (Ferri y Kroemer, 2002; Rathmell y Thompson, 2002).

**Tabla 8.** Comparación de características citomorfológicas de los procesos de muerte celular: apoptosis y necrosis. (Elmore, 2007; Martínez, 2009).

Característica	Apoptosis	Necrosis
Tipo de muerte	Muerte fisiológica. Proceso regulado y controlado	Muerte no fisiológica. Proceso no regulado
Energía	Proceso energéticamente activo, que requiere la biosíntesis de proteínas. Degradación mediada por caspasas.	Proceso energéticamente pasivo.
Número de células	Células individuales o pequeños grupos de células	Generalmente grandes cantidades
Volumen celular	Encogimiento celular	Hinchamiento celular, citólisis
Efecto en integridad de membrana plasmática	Membrana celular intacta	Membrana celular comprometida
Efecto en citoplasma	Retenido en cuerpos apoptóticos	Liberado al espacio extracelular
Efecto en núcleo	Condensación de cromatina (Picnosis)	Fragmentación del núcleo y cromatina
Procesos de inflamación tisular	No hay presencia de inflamación en células <i>in vivo</i>	Inflamación usualmente presente en células <i>in vivo</i>
Finalización	Fagocitosis de cuerpos apoptóticos en células <i>in vivo</i>	Lisis celular y daño a las células vecinas en células <i>in vivo</i>

### II.8.3. VÍAS DE INICIACIÓN DEL PROCESO DE APOPTOSIS

Existen una serie de señales llamadas inductores que conducen a la célula a entrar en el proceso de apoptosis (Casadelvalle, 2006). Estas pueden ser externas a la célula o producidas por ella; una misma señal puede inducir muerte celular o proliferación (Chang, Chen, Urlacher y Lee, 2000; Columbié y Galdeta, 2002).

Algunos inductores como radiaciones ionizantes, sustancias químicas, virus, sustancias reactivas del oxígeno y algunos medicamentos actúan al unirse a receptores de membrana (Marchetti, Di Marco, Cifone, Migliorati y Riccardi, 2003; Vick, Cavalli, Isaacson, Gascoyne y Zucca, 2003; Uchide, Ohyama, Besso, Yuan y Yamakawa, 2002) y pueden activar directa o indirectamente alguno de los mecanismos efectores de la apoptosis.

Según Elmore (2007) la apoptosis se puede definir como: “un proceso coordinado, dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de cisteín proteasas denominadas ‘caspasas’ (en inglés: cysteinyl aspartate-specific proteases) y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula”.

Se ha comprobado que el tiempo en llevar a cabo este proceso depende del tipo de célula y las características de activación, pero el promedio es de 2 a 3 horas (Elmore, 2007). En un cultivo de células la activación de este proceso depende de múltiples factores que estimulan las vías de iniciación.

Huerta, Goulet, Huerta-Yépez y Livingston (2007) describe dos tipos principales de vía de iniciación apoptótica: extrínseca e intrínseca, Elmore (2007) reporta adicionalmente la vía mediada por el sistema Perforina / Granzima.

La vía de señalización extrínseca que inicia apoptosis se denominó así ya que involucra interacciones mediadas por receptores transmembranales (Elmore, 2007), se ha descrito que esta vía es iniciada por unión de: 1) el TNF (Factor de Necrosis Tumoral) ligando al TNF receptor; (2) el TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) a los receptores DR4 (Death Receptor-4) y DR5; o 3) el FasL (Fatty acid synthetase Ligand) al receptor FasR (Huerta *et al.*, 2007). Se conoce que estas asociaciones reclutan moléculas adaptadoras como FADD (eFas-Associated Death Domain) o TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain), las cuales activan

caspasas iniciadoras -8 y -10 y finalmente se da la activación de caspasas ejecutoras -3, -6 y -7, lo que culmina en un fenotipo celular apoptótico (Huerta *et al.*, 2007).

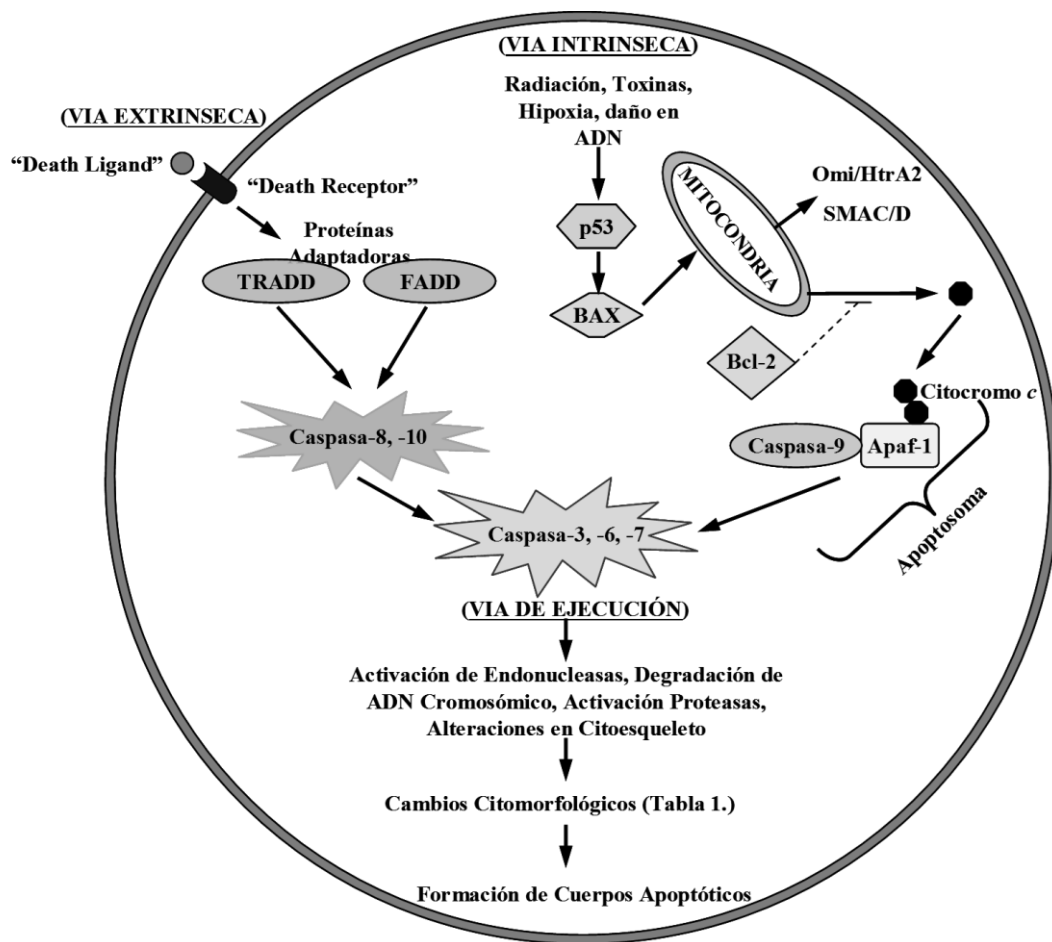
En la cascada de señalización intrínseca se ha reportado una serie de estímulos intracelulares, específicamente en la mitocondria, que causan cambios estructurales en la membrana mitocondrial, principalmente por la apertura de poros de transición y alteración en el potencial transmembranal, lo que conlleva una liberación hacia el citosol de sustancias pro-apoptóticas que en estado normal permanecen dentro del espacio intermembranal (Saelens *et al.*, 2004; Elmore, 2007). Estos componentes liberados han sido clasificados en dos grupos principales constituidos por: 1) Citocromo *c*, Smac/Diablo (Second mitochondrial activator of caspases / Direct IAP Binding protein with low PI) y la serín-proteasa HtrA2/Omi (High-temperature requirement) (Du, Fang, Li, Li y Wang, 2000; Garrido *et al.*, 2005; Elmore, 2007), estos impulsan la cascada apoptótica vía activación de caspasas. Se ha descubierto que la liberación de citocromo *c* activa la proteína Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) y la procaspasa-9, además de ATP, estableciendo un complejo proteico denominado “apoptosoma”, el cual activa la caspasa-3, iniciando la vía efectora de apoptosis (Chinnaiyan, 1999; Hill, Adrian, Duriez, Creagh y Martin, 2004; Huerta *et al.*, 2007 y Martínez, 2009), mientras que las proteínas Smac/Diablo y HtrA2/Omi promueven apoptosis por inhibición de IAP (inhibidores de proteínas apoptóticas) como cIAP1, cIAP2 y XIAP (Elmore, 2007; Huerta *et al.*, 2007); 2) factores inductores de apoptosis (AIF), endonucleasa G y la DNasa activada por caspasas (CAD). Estos últimos se liberan hacia el citosol, entran en el núcleo y fragmentan el ADN (Elmore, 2007). La importancia de la degradación de ADN por endonucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  radica en que generan fragmentos de 180 a 200 pares de bases (Bortner, Oldenburg y Cidlowski, 1995; Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Elmore, 2007), este patrón de fragmentos es altamente específico, y es un factor muy claro que diferencia este tipo de muerte celular programada con la necrosis, la cual no presenta patrón de degradación ni especificidad en los tamaños de los fragmentos (Martínez, 2009).

Actualmente se postula la existencia de una ruta alternativa de apoptosis independiente de caspasas, donde ocurren fallos a nivel de los cromosomas (delección o aneuploidía). Aunque el mecanismo por el cual se desencadena este tipo de muerte celular está todavía por descubrir, parece que los factores mitocondriales Endo G (endonuclease G), MAD (mitotic arrest-deficient), BUB (budding uninhibited by benzimidazole), MPS1 (monopolar spindle) están implicados en ella. No se sabe exactamente cómo estos factores mitocondriales se liberan de la mitocondria, pero sí

se sabe que es necesaria la permeabilización de la membrana mitocondrial externa para su salida y que este proceso está regulado por las proteínas de la familia Bcl-2 (Kitagawa y Niikura, 2008).

Actualmente se conoce que las proteínas reguladoras de los cambios estructurales en la membrana mitocondrial son de la familia Bcl-2, quienes a su vez son controladas por la proteína supresora de tumores p53. La presencia de Bcl-2 inhibe la salida del citocromo c desde el interior mitocondrial (Collins, Schandi, Young, Vesely y Willingham, 1997). Elmore (2007) reporta que las proteínas anti-apoptóticas incluyen Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, y algunas de las proteínas pro-apoptóticas incluyen Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, y Blk. Estas proteínas pueden eventualmente ser detectadas como un referente de gran confianza de activación del proceso apoptótico.

En resumen, la apoptosis o necrosis, parece estar relacionada con el estado de la membrana mitocondrial, lo que convierte a las mitocondrias en orgánulos fundamentales de la activación de los procesos de muerte celular (Suzuki *et al.*, 1999).



**Figura 17.** Representación esquemática de las vías de señalización celular de activación de apoptosis en una célula (Martínez, 2007)

En síntesis, hay clara evidencia que muestra que el mecanismo por el cual es regulada la apoptosis ofrece múltiples puntos claves para su detección efectiva *in vitro* (Martínez, 2009).

#### II.8.4. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE APOPTOSIS

Se ha evidenciado que las células en un ambiente *in vitro* se ven enfrentadas a múltiples agentes perjudiciales extrínsecos e intrínsecos, cuya acumulación resulta en daños a nivel estructural, funcional y fisiológico en los componentes celulares (Vicencio *et al.*, 2008). Los factores reportados que se identifican en el medio de cultivo de células animales que activan procesos de apoptosis son: estrés oxidativo, falta de nutrientes, grandes variaciones de temperatura, confluencia celular, exceso de utilización de enzimas proteolíticas (tripsina, dispasas, colagenasas, etc.), presencia

de agentes nocivos, contaminación del medio, tipo de células, entre otros (Dimri *et al.*, 1995; Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007).

Debido a que la apoptosis es un proceso dinámico, se presentarán diferentes características dependiendo del momento en el que se encuentre la célula. Esto permite disponer de diferentes marcadores de la apoptosis. Cabe considerar que no todos los marcadores están presentes en todas las células, ni todos los marcadores de apoptosis son exclusivos de este proceso. Por esto es importante considerar algunos aspectos de la apoptosis que ocurren tanto *in vivo*, como *in vitro*, tales como el momento en el que aparece un evento determinado, la duración de los procesos relacionados, así como el proceso de eliminación de la célula apoptótica por fagocitosis (Alfaro *et al.*, 2000).

Pozarowski, Grabarek y Darzynkiewicz (2003) han señalado que determinar el método adecuado para medir niveles de apoptosis en cultivo depende principalmente del tipo de células, las características posibles de inducción, las restricciones técnicas, entre otras condiciones.

A continuación se muestran algunas de las técnicas más ampliamente utilizadas:

### ➤ Alteraciones citomorfológicas

Por medio de la microscopía de luz (campo claro, fluorescencia) se pueden apreciar cambios en la organización celular, tales como la condensación de la cromatina o la aparición de cuerpos apoptóticos. La determinación de apoptosis puede realizarse en cortes de tejidos con una mezcla de hematoxilina/eosina. Sin embargo, solo puede detectar estados tardíos de apoptosis, además de ser un método altamente cualitativo y subjetivo (Elmore, 2007; Huertas *et al.*, 2007).

En cuanto a la microscopía electrónica alteraciones estructurales como cambios en las microvellosidades, núcleo electrodenso, fragmentación nuclear, membrana celular intacta, desorganización de organelos citoplasmáticos, vacuolas claramente alargadas y protuberancias irregulares (blebs) en la superficie celular (Elmore, 2007).



*In vivo* muchas veces no es posible detectar algunas de estas alteraciones, ya que las células son eliminadas por fagocitosis.

#### ➤ Electroforesis

Es sabido que durante el proceso de muerte celular por apoptosis se presenta la síntesis de endonucleasas que cortan el ADN a nivel internucleosomal, liberando nucleosomas los cuales se sabe que contienen alrededor de 200 pares de bases. Al realizar un corrimiento electroforético de extractos de ADN de células apoptóticas es posible observar la aparición de un patrón característico de ADN en escalera, mejor conocido como ladder de DNA, el cual contiene fragmentos discretos, múltiplos del tamaño de un nucleosoma que recuerdan la imagen de los peldaños de una escalera (Evan, Littlewood, 1998). Mediante este método es posible la distinción entre apoptosis y necrosis, ya que en esta última se observa un barrido en los geles.

El método más comúnmente utilizado es la extracción de ADN con fenol/cloroformo y su precipitación con etanol (Martín, Lennon, Bonham y Cotter, 1990). Este método presenta el inconveniente de que los fragmentos pequeños pueden perderse durante las extracciones, por esto se han desarrollado métodos en los que se eliminan los pasos de extracción y en los que lisados celulares son digeridos con RNAsas y proteinasa K para después realizar el corrimiento electroforético (Park y Patek, 1998). Otro método propuesto para no perder los fragmentos pequeños, e incluso enriquecer su contenido es el descrito por Daniel y colaboradores (Daniel *et al.*, 1999) en el que utilizan acarreadores minerales a los que se adsorben los fragmentos de ADN. Estos acarreadores permiten separar el ADN de la muestra y posteriormente se recupera al ADN del acarreador en volúmenes pequeños, por lo que las concentraciones de ADN obtenidas son adecuadas para realizar análisis electroforéticos.

#### ➤ Marcadores de ADN

El manual de pruebas moleculares de INVITROGEN™ (2009) reporta los siguientes marcadores de ADN para la evaluación de apoptosis por técnicas principalmente fluorométricas: YO-PRO-1, SYTO 13 y 16, Hoechst 33342 combinado con calceína AM y 7-aminoactinomicina D (7-ADD), naranja de acridina, diamidino fenil indol (DAPI), etidio mono-ácido y bromuro de etidio, además de 5 kits de ensayos para

detectar apoptosis a partir de combinaciones de los anteriores marcadores de ADN. Son utilizados en citometría de flujo.

### ➤ Ensayo ELISA

Otro método que se ha utilizado para medir la degradación internucleosomal es la detección de las proteínas presentes en los nucleosomas (histonas), en placas de 96 pozos mediante un anticuerpo acoplado con un enzima que genera una reacción colorida (Holian, Hamilton, Morandi, Brown y Li, 1998). Desafortunadamente en este método se cuantifica la presencia de nucleosomas en el sobrenadante de cultivos celulares, por lo que puede existir la incertidumbre del origen de dichos nucleosomas, ya que una célula necrótica también puede liberar ADN y nucleosomas al medio al presentarse la lisis celular.

### ➤ Técnica TUNEL (transferasa-mediated dUTP Nick end labeling)

Es un ensayo implementado para determinar los fragmentos de ADN cortados por la acción de endonucleasas por medio de una transferasa terminal (Gavrieli, Sherman y Ben-Sasson, 1992) que adiciona nucleótidos marcados al ADN en extremos 3' libres. Dichos nucleótidos pueden estar marcados con fluorescencia, o bien se pueden detectar por métodos de inmunohistoquímica. Durante la necrosis también se presenta degradación de ADN aunque ésta no presenta el patrón de degradación internucleosomal presente en la apoptosis, pero esto no es posible de distinguir por este método (Grasl-Kraupp *et al.*, 1995) por lo que se sugiere que se complemente con otra técnica, como puede ser la evaluación morfológica.

### ➤ Detección de la activación de caspasas

Las caspasas son una serie de cistein-proteasas que se encuentran en forma de zimógeno en todas las células (Thornberry y Lazebnik, 1998). La activación de la caspasa 3 se utiliza como marcador temprano de la apoptosis (Benjamin *et al.*, 1998), por ejemplo, si se aplica el sustrato de reconocimiento Z-DEVD-AFC a la caspasa-3 (efectora) (INVITROGEN™, 2009). Esta actividad puede ser determinada por varias técnicas como Western blot, Inmunoprecipitación e Inmunohistoquímica (Elmore, 2007).

➤ Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Este ensayo se basa en la detección del contenido de ADN en la célula. Al haber degradación del ADN se van a encontrar células que presentan un menor contenido de ADN, lo cual aparece en el histograma de la citometría por debajo de la región en la que se encuentran las células antes de la replicación del ADN (G0-G1), por lo que podrían estar en apoptosis (Telford, King y Fraker, 1991).

➤ Fragmentación de sustratos

Se puede medir el fraccionamiento de muchos sustratos implicados en la cascada de señalización celular, un ejemplo de ellos es la enzima Poli ADP-Ribosa (PARP), fraccionada en estadios apoptóticos tardíos por parte de la caspasa-3 (ejecutora) (Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Elmore, 2007). Se reporta que este sustrato es cortado en dos fragmentos de 89 y 24 kDa cada uno, que se pueden determinar por Western o inmunohistoquímicamente con el anticuerpo PARP-p89 (Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Huerta *et al.*, 2007), diferenciando apoptosis de necrosis.

➤ Ensayos mitocondriales

Se puede determinar la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), el estado de oxidorreducción, la actividad metabólica mitocondrial, la liberación de citocromo *c*, proteínas reguladoras pro o anti-apoptóticas, entre otros factores (Elmore, 2007). Se sabe que la pérdida de potencial transmembranal mitocondrial puede ser evaluada en citometría de flujo utilizando fluorocromos lipofílicos catiónicos permeables; los principales marcadores son Rodamina 123 o DiOC6 (3) y JC-1 (INVITROGEN™, 2009). Para detectar las proteínas liberadas hacia el citosol se emplean generalmente anticuerpos que garanticen su reconocimiento y observación. Existe una serie de kits que permiten esta determinación (INVITROGEN™, 2009).

➤ Evaluación de la simetría de la membrana celular

Como ya hemos indicado anteriormente, la fosfatidil serina (una molécula que se encuentra orientada hacia el interior de la célula) cuando una célula entra en el proceso de muerte por apoptosis, uno de los eventos tempranos es la exposición de fosfatidil serina hacia el exterior de la membrana celular. Debido a este cambio en la

simetría se han desarrollado métodos que permiten detectar la presencia de fosfatidil serina en el exterior de la membrana celular.

En la categoría de alteraciones membranales se reporta uno de los ensayos más importantes, el de anexina V conjugada con una gran variedad de fluorocromos: Alexa Fluor (350, 488, 568, 594 y 647), Fluoresceína (FITC), Verde de Oregon 488, R-Ficoeritrina, Aloficocianina y Pacific Blue (INVITROGEN™, 2009) para la detección de células apoptóticas. La anexina V (molécula que no es capaz de difundir a través de la membrana) es una proteína recombinante que se une específicamente a residuos de fosfatidilserina, los cuales se encuentran expuestos en la cara externa de la membrana plasmática, y es un biomarcador efectivo en células apoptóticas (Bratton *et al.*, 1997; Arur *et al.*, 2003; Pozarowski *et al.*, 2003; Vermes, Haanen, Steffens-Nakken y Reutelingsperger, 1995; Elmore, 2007; Martínez, 2009). La anexina V puede ser combinada con un marcador de ADN que no sea permeable a la membrana y que nos permita saber si la integridad de la membrana se ha perdido (Alfaro *et al.*, 2000), con el fin de distinguir células apoptóticas de necróticas.

Se ha evidenciado que la combinación de anexina V-FITC y el marcador catiónico yoduro de propidio (IP) puede garantizar esta diferenciación, registrando células no apoptóticas (anexina V-FICT negativo / IP negativo), células en apoptosis temprana (anexina V-FICT positivo / IP negativo) y células necróticas (anexina V-FICT positivo / IP positivo) (Pozarowski *et al.*, 2003; Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2007; Gasser, Hehl y Millward, 2009). Las muestras son analizadas en citometría de flujo brindando una cuantificación objetiva y rápida.

Esta técnica requiere de la utilización de células íntegras, por lo que su uso se recomienda para estudios *in vitro*, aunque también puede ser utilizada en análisis de apoptosis en muestras obtenidas para análisis citológicos, o bien para detectar apoptosis en sangre (Wals, Dewson, Wardlaw, Levi-Schaffer y Moqbel, 1998).

**Tabla 9.** Resumen de las principales técnicas y sus características más relevantes  
(Martínez, 2009)

Metodología	Discrimina necrosis		Cualitativo	Cuantitativo	Estadio que detecta	
	Sí	No			Temprano	Tardío
HE (hematoxilina/eosina)	X		X			X
TEM (microscopía de transferencia de electrones)	X		X			X
Fragmentación de ADN- Marcadores	X		X			X
Tunel		X	X	X		X
Activación de caspasas	X		X	X	X	X
Fragmentación de sustratos (ejemplo: PARP)	X		X			X
Anexina V-FITC + IP (ioduro de propidio)	X		X	X	X	X
Ensayos Mitocondriales	X		X	X	X	X

A pesar de que se han diseñado una gran variedad de técnicas dependientes de variables apoptóticas evidentes, no se ha establecido una única metodología que sea lo suficientemente específica a la hora de la determinación de los niveles de apoptosis *in vitro*.

## II.9. CICLO CELULAR

El ciclo celular es uno de los procesos celulares básicos para el crecimiento y proliferación normal de una célula, cuya regulación y progreso puede resultar alterada por xenobióticos que pueden desequilibrar la vía de transmisión, lo que se manifiesta como toxicidad al promover la proliferación celular, interrupción del ciclo celular, apoptosis o iniciación neoplásica (Repetto y Repetto, 2009).

Este ciclo consiste en la secuencia cíclica de procesos en la vida de una célula eucariota que conserva la capacidad de dividirse. Consta de dos periodos diferenciados: la interfase y la fase M o mitosis (Schreck, Rieber y Baeuerle, 1991).

La interfase es un periodo en el cual la célula se encuentra en constante crecimiento y se divide en 3 fases diferenciadas (Leonard, Harris y Shi, 2004):

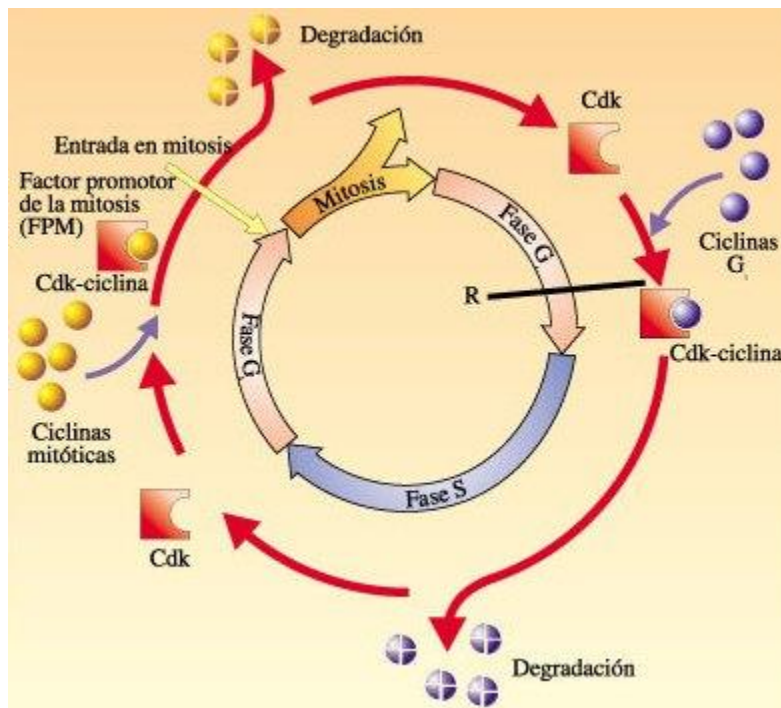
- Fase G1 (*Gap 1*): primer periodo de crecimiento tras la división. La célula aumenta de tamaño y sintetiza nuevo material citoplasmático, principalmente ARN y proteínas.
- Fase S o de Síntesis: en esta fase tiene lugar la replicación del ADN, necesaria para la división celular. Al finalizar este periodo, el núcleo de la célula contiene el doble de cromosomas y proteínas nucleares que al principio.
- Fase G2 (*Gap 2*): segundo período de crecimiento, en esta fase se continúan sintetizando ARN y proteínas, el final queda marcado por la aparición de cambios en la estructura celular, que se hacen visibles con el microscopio y que nos indican el principio de la mitosis o división celular.
- La fase M tiene lugar justo después de la fase G2. En este momento la célula deja de crecer y de producir proteínas, y comienza la división celular, que consta de dos eventos: *i*) la mitosis o división del núcleo y *ii*) la citoquinesis o división del citoplasma en dos células hijas. Existe otra fase conocida como Fase G0 o *Gap 0*, que es aquella en la que se encuentran las células que, en un momento dado, han dejado de dividirse, conocido como estado de quiescencia, bien de forma temporal o bien de forma permanente, por ejemplo en el caso de las neuronas.

Algunas de las características del ciclo celular, incluyendo el tiempo requerido para completar ciertos eventos, varían mucho de un tipo de célula a otro, inclusive en el mismo organismo. Sin embargo, la organización básica del ciclo es esencialmente la misma en todas las células eucariontes, de tal forma, que parecen utilizar una maquinaria con mecanismos de control similares para accionar y regular la mayoría de los eventos en el ciclo celular.

La transición de una fase a otra del ciclo celular es un proceso que se encuentra sujeta al estricto control que ejercen diversas proteínas, entre las que se encuentran las ciclinas, las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y los inhibidores de CDKs (CKIs) (van der Heuvel, 2005). Las CDKs son activadas por la unión a ciclinas, de modo que las oscilaciones en la actividad de estas kinasas se deben principalmente a cambios en la cantidad de ciclinas disponibles en la célula. Los niveles de ciclinas y por tanto la actividad de las CDKs, son dirigidos por un complejo

grupo de mecanismos que incluyen la transcripción regulada de los genes que codifican ciclinas y de la degradación proteolítica de éstas en etapas específicas del ciclo. Los niveles de CDKs permanecen constantes durante el ciclo celular, en contraste con las proteínas a las que se unen las ciclinas, cuya expresión aumenta y disminuye dependiendo de la fase del ciclo celular (Evans, Rosenthal, Youngblom, Distel y Hunt, 1983; Pines, 1995).

Hasta el momento se han identificado nueve CDKs, cinco de las cuales son activas durante el ciclo celular, y dieciséis ciclinas de la cuales algunas de ellas intervienen en el control del ciclo (Peng, Chou y Hsu, 1998). Cuando las CDKs se activan inician procesos de fosforilación en otras proteínas (Morgan, 1995; Pines 1995).



**Figura 18.** Etapas del ciclo celular

(Fuente: [www.fisicanet.com.ar/biologia/informacion\\_genetica/ap02\\_ciclo\\_celular.php](http://www.fisicanet.com.ar/biologia/informacion_genetica/ap02_ciclo_celular.php))

La progresión del ciclo celular se produce por la activación de varias ciclinas. Una vez se produce la citocinesis, las células entran en la fase G1. Para la entrada en la fase G1 es necesaria la unión de las ciclinas D1, D2 y D3 con las CDK4 y CDK6 y la ciclina E asociada a la CDK2 regula la progresión de la fase G1 a S (Ohtsubo, Theodoras, Schumacher, Roberts y Pagano, 1995). Durante la fase S es necesaria la

intervención del complejo ciclina ACDK2 (Girard, Fernández y Lamb, 1991; Walker y Maller, 1991). En la fase tardía de G2, la ciclina A se une a CDK1 y promueve la entrada de la célula en la fase M. La fase de mitosis es regulada por la ciclina B1 unida a CDK1. La degradación de la ciclina B asegura que se lleve a cabo la etapa de la mitosis. (Arellano y Moreno, 1997; Baker, Dawlaty, Galardy y van Deursen, 2007).

Cuando este sistema de control recibe una señal inhibitoria (por ejemplo de un CKI), tal como la que se genera cuando algún proceso del ciclo está incompleto, se ha producido algún daño en el ADN, o las condiciones no son viables para la división, el ciclo celular se bloquea en 2 puntos de transición o puntos de control (*checkpoints*) con el fin de proporcionar tiempo suficiente a la célula para reparar el ADN (Damia y Brogгинi, 2004; Kastan y Bartek, 2004; Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006):

El primer punto se presenta en G1/S en este momento se definen las condiciones adecuadas para la replicación, etapa que se denomina G1 *arrest*. Si existe un daño al ADN, los sistemas de reparación se activan retrasando la progresión del ciclo; si el daño es irreparable, se activan las vías apoptóticas. Esto impide la replicación de células que tienen daños en el material genético como mutaciones o rompimientos cromosómicos. El segundo punto se presenta en G2/M, donde se establece si el proceso de replicación del ADN fue exitoso y en caso negativo se desencadenan eventos para eliminar estas células (G2 *delay*). Cuando se activan los procesos de reparación del ADN durante la replicación, la fase se avanza muy lentamente, mientras que si se interfiere con los procesos mitóticos, suele presentarse una pausa en la metafase para prevenir una distribución asimétrica de los cromosomas. Para funcionar adecuadamente los puntos de control incluyen sensores de daño, como proteínas de la familia RAD, y traductores, las familias CHK cinasa. Las moléculas efectoras de los puntos de control difieren dependiendo de la etapa: en G1/S, la detención del ciclo celular depende principalmente de p53, que induce al inhibidor del ciclo celular p21; en G2/M, la detección del ciclo celular implica procesos dependientes e independientes de p53. No obstante, la prolongación del tránsito en el ciclo celular contribuye a la supresión del ciclo celular (Kumar, Abbas y Fausto, 2005).



### II.9.1. CICLO CELULAR Y CITOMETRÍA DE FLUJO

La medición del ADN ha sido una de las primeras y más empleadas aplicaciones de la citometría de flujo (Melamed, Mullaney y Shapiro, 1991; Barlogie, Spitzer y Hart, 1976).

El análisis de ciclo celular permite conocer la cantidad de ADN que hay en cada célula. Esto es útil porque permite conocer las células que han duplicado su ADN (doble intensidad de fluorescencia) o que tienen el ADN cromosómico fragmentado (ADN de pequeño tamaño) (Gómez, 1998).

Se dispone de muchos fluorocromos que se unen específicamente a las bases del ADN. La señal fluorescente es proporcional a la unión del fluorocromo al ácido nucleico que es de tipo estequiométrico. Los fluorocromos que se usan para la cuantificación de ADN por citometría de flujo se clasifican en función de su mecanismo de unión. Los intercalantes, como el bromuro de etidio, yoduro de propidio y naranja de acridina, se unen al material genético de doble cadena intercalándose entre las dos bases; los de unión preferente a las bases adenina-timina, como DAPI, DIPI y Hoescht y; por último, los de unión preferente a las bases citosina-guanina, como la mitramicina, olivomicina, y cromomicina (Gómez, 1998).

#### II.9.1.2. Grupos generales de fluorocromos

Se describen cuatro grupos básicos que tienen algunas diferencias, sobre todo en el espectro de absorción, lo que debe ser tenido en cuenta puesto la posibilidad de utilizarlos viene limitada por la fuente de iluminación del citómetro. Los fluorocromos más ampliamente utilizados en la cuantificación de ADN y estudio de las fases del ciclo celular son los siguientes (Langlois, 1989):

- Phenantidium son del tipo del bromuro de etidio e yoduro de propidio. Tienen especificidad por el ADN y ARN de doble cadena, de modo, que la muestra requiere de tratamiento con ARNasa si sólo se desea medir ADN (Ormerod, 1990). El espectro de excitación se encuentra en el azul/verde-rojo. Precisan de células muertas y fijadas puesto que no atraviesan membranas celulares íntegras. La intensidad de la señal y la especificidad de la unión se ve disminuida por la unión secundaria inespecífica a los grupos fosfato, incubación con proteasas, presencia de ADN en estructura Z y por el doble marcaje con bromodeoxiuridina. La tinción no se afecta por el pH del medio ni la

composición de bases. El yoduro de propidio, al no atravesar membranas íntegras, puede emplearse también para discriminar células viables de no viables (Sasaki, Dumas y Englemann, 1987).

- Bismenimidazoles y afines son del tipo Hoescht, DAPI y DIPI. Tienen elevada especificidad por el ADN y se unen a las bases adenina-timina. Su excitación se produce en el ultravioleta-azul. Pueden teñir células vivas puesto que son capaces de atravesar membranas celulares íntegras. Disminuye la intensidad y especificidad de la tinción el pH ácido (que aumenta la unión secundaria a los grupos fosfato), la concentración de colorante en exceso y la presencia de bromodeoxiuridina. El DAPI y DIPI se usan para hacer las bandas cromosómicas.

- Cromomicina y similares como la cromomicina A3, mitramicina y olivomicina. Se unen a las bases citosina-guanina del ADN. La excitación se produce en el espectro ultravioleta-azul/verde. Requieren del ion magnesio para la unión al ADN y pueden teñir células vivas. La tinción del ADN no se afecta por el pH. Se han usado en combinación con bismenimidazoles para realizar el cariotipo por citometría de flujo (Vitale, Manzoli, Maraldi y Papa, 1990; Gómez, 1998).

- Otros fluorocromos son la quinacrina (que es intercalante) y el naranja de acridina (unión al ADN y ARN bicatenario que, además, tiene la particularidad de que el espectro de emisión es diferente si está unido a ADN o a ARN). Hay una serie de factores que afectan a la unión del cromóforo al ADN (Langlois, 1989).

El tipo de muestra a analizar, dependiendo de la composición de bases del ADN, de la presencia de bases modificadas, como la bromodeoxiuridina o metilación y de la estructura del ADN, influyen en los resultados que se obtienen si se comparan tinciones con diferentes fluorocromos que tienen afinidad selectiva por determinadas bases. Una unión fuerte entre las proteínas cromosómicas y el ADN dificulta la incorporación del fluorocromo al material genético. Determinados fluorocromos no atraviesan la membrana citoplasmática, como el yoduro de propidio, y otros tienen tendencia a unirse a componentes intracelulares. La química, cinética y equilibrio de la unión depende de la concentración de sales y de la fuerza iónica del medio. La cromomicina necesita la presencia de magnesio en el medio para unirse al ADN y el pH ácido favorece la unión secundaria inespecífica del Hoescht. Para conseguir una tinción específica y correcta se requiere de especial cuidado en la concentración del fluorocromo y las condiciones y el tiempo de incubación.

## II.9.1.3. Estudio del ciclo celular y las aneuploidías

En el estudio del ciclo celular la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de fluorocromo que a su vez es proporcional a la cantidad de ADN de la célula (Hiddeman, Schumann y Andreeff, 1984). Hay cierta variación entre el resultado teórico y el obtenido debido a la variación biológica en la tinción y en la lectura, por ello, se define el **coeficiente de variación** (CV) que nos da una idea de la semejanza de los resultados obtenidos a la realidad y que hace necesario el empleo de programas informáticos para discriminar correctamente el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular.

A partir del histograma monoparamétrico de los canales de fluorescencia del cromóforo que se ha unido al ADN, para calcular la fase S se pueden emplear varios métodos informáticos: rectangular, lineal, polinomial, Gauss (Gray, Dolbeare, y Pallavicini, 1991).

El término aneuploidía, por citometría de flujo, significa la presencia de una población con un contenido en ADN diferente a un control de células semejantes y en igual fase del ciclo celular (Hiddeman *et al.*, 1984). El término de aneuploidía citométrica no es semejante al de aneuploidía citogenética y la ausencia de aneuploidía por citometría de flujo no excluye la presencia de alteraciones citogenéticas que no conlleven a un aumento de la cantidad total de ADN (translocaciones balanceadas, etc.) (Shackney *et al.*, 1990). Se define como **Índice de ADN** (ID) al cociente entre la moda del pico G0G1 de la población problema y la moda del pico G0G1 del control (en %). A partir de ahí, se define la siguiente terminología: diploide si ID igual 1, aneuploide si ID diferente de 1, hiperploide si ID superior a 1, hipoploide si ID inferior a 1, poliploide si ID es igual a 1.5, 2, 2.5, etc. y haploide si ID es igual a 0.5 (Riley y Mahin, 1989).

Un problema importante en la lectura de algunas muestras es la discriminación de dobletes que interfieren y aumentan, artefactualmente, la fase de mitosis (Gómez, 1998). La solución se debe buscar en el procedimiento técnico, en criterios de standardización y en soluciones citométricas del análisis de la señal (Rabinovitch, 1991). Hay citómetros que pueden mediante la señal de la altura, anchura y área del pico de fluorescencia discriminar entre células en G2M y dos células unidas en G0G1. Se define como criterio de aneuploidía la presencia de dos picos en canales diferentes de fluorescencia con dos poblaciones en la muestra (Hiddeman *et al.*, 1984). Se

acepta que el coeficiente de variación de la población aneuploide suele ser mayor que la euploide, de modo, que si se obtiene un histograma con dos picos y desconocemos cuál de ellos es el diploide se aceptará que se está ante la presencia de una población hiperploide o se escogerá como aneuploide el pico con un mayor coeficiente de variación. Ante un histograma dudoso se puede buscar la presencia de células en la región de G2M de la población problema dudosamente aneuploide, la existencia de proporcionalidad entre las fases de los ciclos celulares o comprobar la existencia de aneuploidía con diferentes técnicas (Gómez, 1998).

### **II.10. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)**

Durante el metabolismo aerobio se generan constantemente pequeñas cantidades de sustancias reactivas de oxígeno (ROS) como respuesta a estímulos externos e internos.

Estas especies de oxígeno citotóxico pueden clasificarse en 2 tipos: los radicales libres, como el radical superóxido ( $O_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) y las especies de oxígeno no radicales, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el oxígeno singlete ( $O^1$ ), que resulta una especie muy tóxica, el peroxinitrito (ONOO) y el ácido hipocloroso (HOCL) (Rybczynska, 1994).

Estas mínimas concentraciones de ROS pueden ser indispensables en muchos procesos, como el sistema de señales intracelulares (que está relacionado con otros procesos como la proliferación celular y la apoptosis), la transducción de señales, la neurotransmisión, la relajación del músculo liso, el peristaltismo, la agregación plaquetaria, la modulación de la presión arterial, el aprendizaje y la memoria, la producción de energía, la fagocitosis, la regulación del crecimiento celular, la señalización celular, la síntesis de compuestos biológicos importantes, la inmunidad y la defensa contra microorganismos (Gomes, Fernandes y Lima, 2005). Sin embargo, altas dosis o una eliminación inadecuada de ROS dan lugar a estrés oxidativo, que puede causar graves disfunciones metabólicas, el agotamiento de antioxidantes celulares, daño a macromoléculas biológicas y la creación de la lesión oxidativa que resulta en una reducción de la diferenciación, proliferación o la promoción de proceso de muerte celular (Pae *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003, Liu, Wu, Yu y Su, 2007; Abid-Essefi *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Bouaziz *et al.*, 2008; Ferrer, Juan-García, Font y Ruiz, 2009). Una de las consecuencias del estrés oxidativo es la peroxidación lipídica, cuya prevención es esencial en todos los organismos aerobios, ya que los productos

derivados de este proceso pueden interactuar con el ADN y son potencialmente mutagénicos. Los epóxidos formados pueden reaccionar espontáneamente con centros nucleofílicos en la célula o unirse a los ácidos nucleicos (ADN y ARN).

Aunque los ROS pueden provenir de diferentes organelas, las mitocondrias son consideradas las principales productoras de ROS. Éstas producen principalmente anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Kim, Minkler, Salomon, Anderson y Hoppel, 2011). Aproximadamente el 80% del anión superóxido es producido por las mitocondrias (Hemann, Velayutham y Zweier, 2011).

La producción de ROS celular puede verse aumentada por xenobióticos, por ejemplo, mediante la inhibición de transporte mitocondrial de electrones con posterior acumulación de intermediarios reactivos, mediante la inactivación de enzimas antioxidantes, o por el agotamiento de captadores de radicales.

Las especies reactivas de oxígeno están a menudo implicadas en la toxicidad producida por algunos metales como el cadmio (Liu, Kershaw y Klaassen, 1990; Liu y Jan, 2000; He, Chen y Ma, 2008; Liu, Qu y Kadiiska, 2009) en una gran variedad de cultivos celulares. Se ha sugerido que el mecanismo de toxicidad aguda del cadmio implica el agotamiento de glutatión y los grupos sulfhidrilo unidos a proteínas, lo que resulta en una mayor producción de ROS (ión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo) (Manca, Richard, van Tra y Chevalier, 1994; Bagchi *et al.*, 1997; Liu y Jan, 2000). El aumento de ROS producido por el cadmio a su vez produce la peroxidación lipídica ocasionando como consecuencia daño sobre el ADN.

El selenio también ha sido sugerido como un semimetal que puede causar daño en membranas y proteínas al producir ROS (Spallholz, Palace y Reid 2004). Spallholz y Hoffman (2002) sugiere que las especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñar un papel importante en la inducción de la toxicidad de selenio en las aves expuestas a altos niveles de selenio y también ha sido sugerida en sistemas de mamíferos (Lin y Spallholz, 1993; Albrecht, Pélissier y Boisset, 1994).

En sistemas de mamíferos, el metabolismo de compuestos catalíticos de selenio (por ejemplo, selenito) puede producir metabolitos intermediarios capaces de generar radicales libres (Spallholz, 1994). GSH, un ubicuo sulfhidrilo que contiene la célula, juega un papel importante en este proceso (Arteel y Sies, 2001). GSH reacciona con selenito y produce persulfuro de selenio altamente reactivo (Ganther,

1971) y radical tiol (Arteel y Sies, 2001). El primero puede producir anión superóxido ( $O_2^-$ ) de forma espontánea en presencia de oxígeno además, aniones de persulfuro de selenio también pueden reaccionar con GSH para producir hidrógeno seleniuro, y la conversión de seleniuro de hidrógeno por selenio elemental produce anión superóxido (Lin y Spallholz, 1993). Por otro lado, los radicales tiol pueden reaccionar con GSH para formar radicales de glutatión disulfuro (GSSG) (Arteel y Sies, 2001). El doble papel de GSH, tanto como un antioxidante y un pro-oxidante, se ha analizado en células de hepatoma humanas expuestas a selenito (Shen, Yang, Liu y Ong, 2000). Por lo tanto, la implicación de GSH en el metabolismo de selenio puede agotar su almacenamiento intracelular durante la exposición a selenio, produciéndose como resultado la pérdida de redox tiol celular. La acumulación de radicales libres puede oxidar las membranas celulares y macromoléculas, lo que resulta en la pérdida de la integridad estructural de la célula, y en última instancia conducir a la muerte celular (Weiller, Latta, Kresse, Lucas y Wendel, 2004). El selenio puede inducir la muerte mediada por apoptosis o necrosis (Shen *et al.*, 2000; Kelly, Havrilla, Brady, Abramo y Levin, 1998).

Para reducir al mínimo los efectos negativos de ROS, las células poseen una capacidad antioxidante como sistema de defensa, que utiliza mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Este sistema de defensa incluye enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión transferasa (GST), mientras que las defensas antioxidantes no enzimáticas incluyen glutatión, vitaminas E, C y A, los carotenos y ubiquinol10. Por lo tanto, si la producción de radical de oxígeno excede la capacidad antioxidante de la célula se produce el estrés oxidativo, es decir, el desequilibrio entre el componente celular pro-oxidante y los niveles de antioxidantes.

El estrés oxidativo resultante del aumento de la producción de ROS está implicado en una serie de procesos patológicos como la inflamación o carcinogenicidad, y contribuye a la toxicidad celular de un amplio espectro de xenobióticos. Un componente crítico del sistema de defensa antioxidante celular y en el mantenimiento del potencial redox celular es el tripéptido glutatión (GSH) (Jos, Cameán, Pflugmacher y Segner, 2009).

## II.10.1. PRINCIPALES SONDAS EMPLEADAS EN CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LA DETECCIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO

### II.10.1.1. 2,7- Diclorodifluoresceín (DCFH)

La sonda 2,7-Diclorodihidrofluoresceín diacetato (DCFH-DA), es de composición apolar y tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática. Una vez dentro es hidrolizada por esterasas de la célula a diclorofluoresceína (DCFH) que en presencia de especies reactivas de oxígeno, se convierte en su forma fluorescente (DCF) (Wang y Joseph, 1999; Halliwell y Whiteman, 2004). Este método es excepcionalmente sensible y proporciona una medida directa de estrés oxidativo en general que detecta oxidantes intracelulares (Ferrer *et al.*, 2009).

Anteriormente esta sonda se utilizaba como indicadora de la presencia de  $H_2O_2$ . Otros autores consideran DCFH una sonda sensible no solo para  $H_2O_2$  en presencia de peroxidasas celulares, sino también para la determinación de  $ONOO^-$  y  $OH^\bullet$ . Actualmente existen diversos estudios que indican que la transformación de DCFH a DCF está también mediada por diferentes procesos celulares (Kalyanaraman *et al.*, 2012).

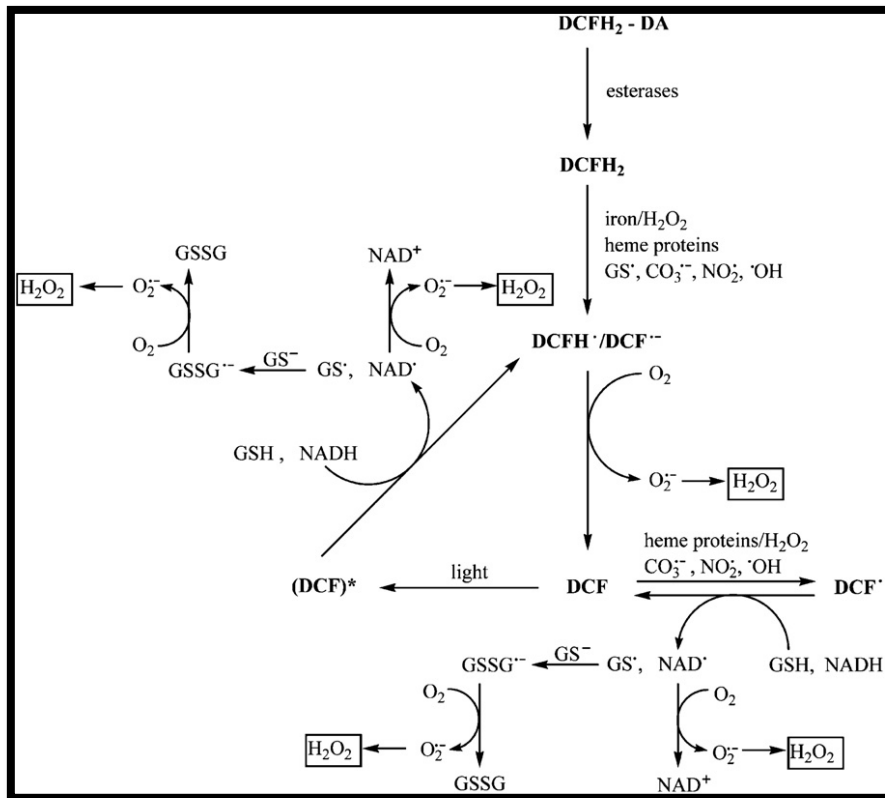
Estos incluyen los radicales hidroxilo ( $OH^\bullet$ ) formados a partir de la interacción de peroxidasas o proteínas del grupo hemo con  $H_2O_2$ ,  $NO_2$  formado a partir de la mieloperoxidasa /  $H_2O_2$  / sistema  $NO_2^-$ , ácido hipocloroso (HClO), y especies reactivas formadas a partir de la descomposición del peroxinitrito ( $ONOO^-$  /  $ONOOH$ ). La descomposición del peroxinitrito también forma radicales  $OH^\bullet$  y aniones de carbonato ( $CO_3^-$ ) en presencia de bicarbonato.

El radical intermediario,  $DCF^\bullet$ , formado a partir de la oxidación de un electrón de DCFH, reacciona rápidamente con  $O_2$  (para formar superóxido ( $O_2^-$ )). La dismutación de  $O_2^-$  produce a su vez  $H_2O_2$  lo que conduce a un aumento artificial de la oxidación de DCFH y por lo tanto a una amplificación de la fluorescencia de DCF (Folkes, Patel, Wardman y Wrona, 2009).

El citocromo C, una proteína hemo que es liberada por las mitocondrias al citosol durante la apoptosis, es capaz de oxidar DCFH directa o indirectamente a través de un mecanismo de tipo peroxidasa, formando DCF (Karlsson, Kurz, Brunk y Nilsson, 2010; Lawrence, Jones, Wardman y Burkitt, 2003). Metales con actividad

redox (por ejemplo,  $\text{Fe}^{2+}$ ) promueven la oxidación de DCFH en presencia de oxígeno o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Qian y Buettner, 1999).

Debido a la existencia de varias sustancias que interfieren con la formación de DCF, esta sonda, cuando se utiliza en sistemas celulares, tiene un mejor uso como un marcador de estrés oxidativo celular que como indicador de la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  u otro ROS (Jakubowski y Bartosz, 2000; Tarpey, Wink y Grisham, 2004). De hecho DCFH ha sido utilizado como un indicador de ruptura oxidativa en los macrófagos y neutrófilos (Caldefie-Chézet *et al.*, 2002) y también como una manera de estudiar la producción de sustancias oxidantes por la acción de estímulo múltiple en otros tipos de células (Silveira, Pereira-da-Silva, Juel y Hellstein, 2003).



**Figura 19.** Reacciones de oxidación mediadas por el radical en presencia de oxígeno, proteínas hemo y glutatión (Zielonka, Kalyanaraman, 2008)



### II.10.1.2. Dihidrorodamina 123

La DRh123 es el producto de la reducción del fluorocromo específico de mitocondrias Rodamina 123 (Rh123). Esta sonda difunde pasivamente a través de la mayoría de las membranas celulares y es oxidado a Rh123 cargado positivamente y que se encuentra en las mitocondrias.

Dihidrorrodamina (DHR) es la sonda más utilizada para la medición de  $\text{ONOO}^-$ . La oxidación DHR a rodamina está desencadenada por varios oxidantes (OH, los compuestos I y II, y  $\text{NO}_2$ ), similares a DCFH. Por lo tanto, la oxidación DHR a rodamina no es específica. La conversión de DHR a rodamina está mediada por un compuesto intermedio DHR radical. La oxidación de DHR está mediada por cogeneración  $\text{NO}$  y  $\text{O}_2$  y por oxidantes ( $\text{NO}_2$  y OH) formados a partir de la rápida y espontánea descomposición de  $\text{ONOO}^-$ , y la oxidación de DHR no está inducida directamente por  $\text{ONOO}^-$ . El radical intermedio, DHR, reacciona rápidamente con el oxígeno. Por lo tanto, DHR sólo se puede utilizar como un indicador no específico de formación intracelular de  $\text{ONOO}^-$  y HOCl (Kalyanaraman *et al.*, 2012).

### II.10.1.3. Dihidroetidio (HE)

El dihidroetidio se utiliza como una sonda fluorescente para la detección de superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) debido a su especificidad relativa para este tipo de ROS (Bindokas, Jordan, Lee y Miller, 1996; Benov, Sztejnberg y Fridovich, 1998; Barbacanne *et al.*, 2000; Walrand *et al.*, 2003).

El dihidroetidio (HE) se utiliza habitualmente para analizar la explosión oxidativa de los macrófagos, aunque también se ha observado que se oxida significativamente en leucocitos no activados, tal vez debido al desacople de la fosforilación oxidativa.

El HE citosólico fluoresce en el azul, pero una vez oxidado a etidio (E+), se intercala en el ADN celular y fluoresce en rojo. Se utiliza en conjunción con DCFH para diseccionar el estrés oxidativo.

Sin embargo, existen autores que han encontrado limitaciones en cuanto a su uso para detectar  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Tarpey, Wink y Grisham, 2004). En primer lugar, el citocromo C es capaz de oxidar HE, un aspecto importante en situaciones donde la principal fuente

de  $O_2^{\cdot-}$  es la mitocondria o en situaciones donde el citocromo c es liberado al citosol durante el proceso de apoptosis. Debido a la interconexión entre el estrés oxidativo y los procesos apoptóticos, sería difícil asumir que en estas situaciones la oxidación de HE a E+ se deba únicamente a la acción de  $O_2^{\cdot-}$ . En segundo lugar, el uso de altas concentraciones de HE puede producir un aumento de la fluorescencia independientemente de la producción de  $O_2^{\cdot-}$ , como resultado de la formación de E+ que excede la capacidad de unión de los ácidos nucleicos mitocondriales. También es importante destacar que HE puede ser oxidado por  $H_2O_2$  a través de peroxidasa no específica formando productos de oxidación fluorescentes (Murrant y Reid, 2001).

**Tabla 10.** Resumen de las principales sondas empleadas

Ensayo	Detección de ROS	Longitud de onda de excitación/emisión (nm)	Cambios en la fluorescencia producidos por los reactivos	Principales aplicaciones
HE	$O_2^{\cdot-}$	520/610	Fluorescencia roja (probablemente etidio)	Útil para controlar el estallido oxidativo en las células
DCFH	$H_2O_2$ , $OH^{\cdot}$ , $ROO^{\cdot}$	498/522	Forma fluorescente DCF	Útil como marcador de estrés oxidativo
DHR	$H_2O_2$ /HRP, $ClOH$	505/529	Producción de la fluorescencia rodamina 123	Detección en células de $H_2O_2$ , $ClOH$ y $ONOO^-$

## II.11. EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR

### II.11.1. INTRODUCCIÓN

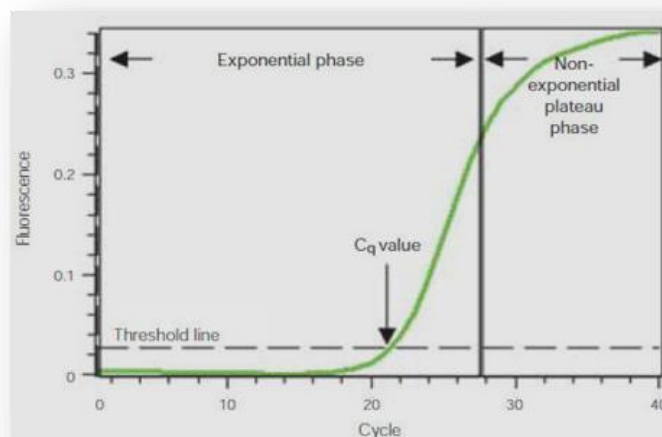
La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN de una muestra. Utilizando primers específicos de secuencia, es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN.

Cuando la PCR a tiempo real se combina con una reacción de retro-transcripción (RT), puede determinarse la cantidad de mRNA de una muestra mediante una cuantificación relativa. Dicha cuantificación se denomina relativa ya que se compara entre diferentes muestras o tratamientos la cantidad relativa o relación del

mRNA de un gen específico respecto a la cantidad de mRNA de un gen constitutivo (control endógeno).

Para la cuantificación, se mide en cada ciclo de PCR la cantidad de amplicón producido. La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos que se unen al amplicón de forma cuantitativa, de forma que a mayor producto mayor fluorescencia se emitirá. Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los softwares de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN/ADN iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores.

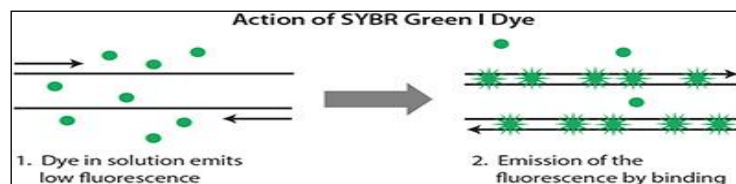
En una gráfica de amplificación de PCR a tiempo real, el eje vertical representa la cantidad de fluorescencia normalizada, y el eje horizontal el número de ciclos. La línea base se refiere a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia, y sólo se detecta la fluorescencia basal. *Threshold* es el umbral en el que se produce un cambio significativo en la fluorescencia, y el corte entre el Threshold y la curva de amplificación determina el Ct o ciclo umbral que se emplea para la cuantificación. El cálculo del Ct siempre se realiza en la fase exponencial de la curva.



**Figura 20.** Gráfica de amplificación de PCR

### II.11.2. FLUOROCROMOS EMPLEADOS

Un método muy utilizado es el emplear fluoróforos que se unen a ADN de doble cadena, como SYBR Green o Eva Green. El SYBR Green o el Eva Green se unen inespecíficamente al ADN de doble cadena y producen fluorescencia. Estos fluorocromos no son específicos ya que se unen a toda molécula de ADN de doble cadena, incluyendo los dímeros de primer. Otra alternativa, recomendada cuando hay problemas de especificidad, es el uso de sondas específicas fluorescentes, como las sondas de hidrólisis TaqMan-MGB o UPLs.



**Figura 21.** Fluorocromo SYBR Green

### II.11.3. CONTROLES ENDÓGENOS

La medida de la expresión génica por medio de PCR a tiempo real es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (control endógeno). Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen específico, o normalizar respecto a la diferente concentración de ARN total de las muestras, ya que si la cantidad de control endógeno varía es debido a cambios en la cantidad de ARN total empleada en la síntesis de cDNA, no a cambios en su expresión. Los genes más utilizados como controles endógenos son: rRNA 18S, GAPDH, beta-actina, TBP, HPRT, beta-2-microglobulina, entre otros.

### II.11.4. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

Existen principalmente dos métodos de cuantificación, dependiendo si la eficiencia de amplificación del gen objeto de estudio y el del gen de referencia son comparables. El método del  $\Delta\Delta C_t$  se comparan directamente los  $C_t$ s del gen testado y gen de referencia ( $\Delta C_t$ ) en cada muestra, y posteriormente se comparan los  $\Delta C_t$  de las muestras experimental con respecto a la muestra control, para aplicar dicho método es

necesario que las eficiencias de ambos genes sean similares. El otro método se basa en la utilización de una recta estándar a partir de cDNAs de concentraciones conocidas, y extrapolar la concentración del gen en la muestra experimental a partir del Ct obtenido, posteriormente se calcularía la relación entre la cantidad del gen testado y el gen de referencia, y se compararía dicha relación entre las muestras.

#### II.11.5. GENES OBJETO DE ESTUDIO

- Metalotioneína (Mta). Las metalotioneínas son algunas de las proteínas más importantes de protección de las células contra la toxicidad de metales pesados, especialmente Cd, Hg, Cu y Zn (Morcillo, Esteban y Cuesta, 2016). Son proteínas de bajo peso molecular, ricas en cisteína con alta capacidad de unión a metales y de regular los estados redox (Lazo *et al.*, 1995). Dona grupos tiol y neutraliza radicales libres en las situaciones en que ROS son elevados. (Thornalley y Vasak 1985; Lazo *et al.*, 1995).

- Heat shock protein 70 (Hsp). Es parte de un grupo de proteínas de distinto peso molecular (Hsp) encargadas de neutralizar situaciones de estrés celular. Se trata de chaperonas capaces de transportar proteínas a través de membranas, involucradas en los procesos de transcripción (Tiwari, Thakur y Shankar, 2015) y bajo circunstancias de estrés celular pueden agregar o desagregar proteínas, viéndose su expresión incrementada (Shevtsov y Multhoff, 2016). El descenso o inhibición de la proteína HSP70 o HSP90 es suficiente para sensibilizar una célula para la apoptosis (Lanneau *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2007; Neckers, Kern y Tsutsumi, 2007). Además, la interacción entre un péptido y una Hsp actúa en células presentadoras de antígeno del sistema inmune innato y facilita la maduración de células dendríticas, incrementa la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad I y II, induce la secreción de citoquinas y modula óxido nítrico (Shevtsov *et al.*, 2016).

- Bcl2 Associated Protein (Bax). Gen que transcribe a la proteína Bax (Bcl2 Associated Protein). Dicha proteína está involucrada en la apoptosis (pre-apoptótica) y establece un equilibrio con Bcl2 (pro-apoptótica, vía intrínseca) (Morcillo *et al.*, 2015). Las proteínas de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL malo, y Bax) constituyen componentes críticos para regular la activación de las vías intrínseca de apoptosis permitiendo la permeabilización de la membrana mitocondrial y la subsiguiente liberación del citocromo c (Danial y Korsmeyer, 2004). La translocación de Bax y Bad proteínas desde el citoplasma hacia las mitocondrias es crítica para ejecutar la muerte celular

apoptótica en respuesta al estrés oxidativo y daño en el ADN (Youle y Strasser, 2008). Además, BAX suprime la transformación oncogénica (Zong *et al.*, 2001).

- Catalasa (Cat). La producción de peróxido de oxígeno se realiza, principalmente, por la superóxido dismutasa y la reducción del mismo se lleva a cabo por acción de la enzima catalasa (Lushchak, 2011). La catalasa actúa como “scavenger” eliminando los radicales libres (reduciendo los ROS) e impidiendo la peroxidación de lípidos. Además, la catalasa inhibe la activación de la p53 (proteína que induce apoptosis). Así pues, la catalasa es uno de los antioxidantes enzimáticos más efectivos. Está presente en plantas, animales aeróbicos y anaeróbicos y se localiza en el peroxisoma celular. Transforma de forma muy efectiva el  $H_2O_2$  en  $H_2O+O_2$  siendo capaz una molécula de catalasa de transformar 6 millones de moléculas de  $H_2O_2$  por minuto. Un descenso significativo de su función se correlaciona con tumorigénesis. (Valko *et al.*, 2006).

### II.12. TOXICIDAD Y CÉLULAS EN CULTIVO

Los metales son objeto de estudio de numerosos estudios experimentales *in vitro*, ya sea para comprobar sus efectos toxicológicos en cultivos primarios, células sanguíneas o diferentes líneas celulares establecidas o como elementos de destrucción de líneas celulares tumorales.

#### II.12.1. CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad se refiere a los procesos adversos o interferencias con estructuras y/o propiedades esenciales para la supervivencia, la proliferación y/o la función celular, incluyendo la integridad de la membrana plasmática y del citoesqueleto, el metabolismo, la síntesis y degradación de constituyentes celulares, la regulación de iones y la división celular (Seibert *et al.*, 1996).

Existen diversos estudios donde se emplean células de origen renal o hepático para evaluar la citotoxicidad basal de diferentes metales (línea celular HK-2, Peraza, Carter y Gandolfi, 2003; líneas celulares VERO y BGM, (Romero, Gómez-Zapata, Luna y García-Fernández, 2004; línea celular PC12, Zhou *et al.*, 2014).

Fischer (1976) estudió la resistencia de fibroblastos L-A de ratón (L929) tras la exposición a plomo, mercurio y cadmio. Después de siete días de exposición muestra

que las  $DL_{50}$  son  $3 \cdot 10^{-4}$  M para el plomo,  $5 \cdot 10^{-5}$  M para el mercurio y  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M para el cadmio, mientras que sus  $Cl_{50}$  fueron de  $4 \cdot 10^{-5}$  M,  $1,3 \cdot 10^{-5}$  M y  $7,5 \cdot 10^{-6}$  M, respectivamente para cada metal, por lo que el cadmio presenta una mayor toxicidad para esta línea celular que el mercurio y el plomo.

Posteriormente, Skerb y Fischer (1984) estudiaron la toxicidad de cuatro metales (Ni, Pb, Mn, Hg y Cd) en dos líneas celulares humanas, HeLa y fibroblastos de embriones diploides además de en células de hámster chino V79 y en los fibroblastos L-A de ratón. Para HeLa y los fibroblastos humanos la  $DL_{50}$  sigue el siguiente rango de citotoxicidad:  $Ni^{2+} = Pb^{2+} < Mn^{2+} < Hg^{2+} < Cd^{2+}$ . Mientras que en las células L-A de ratón el níquel causa una mayor inhibición que los otros metales, salvo en el caso de cadmio.

También son numerosos los estudios de citotoxicidad realizados empleando líneas celulares de peces. Babich, Shopsis y Borenfreund (1986) compararon la  $CE_{50}$  para cadmio, zinc, cobre y níquel de dos líneas celulares, BF-2 (0,08, 0,19, 0,55 y 2 mM para cada metal respectivamente) y RTG-2 (0,18, 0,64, 1,45 y 10 mM) mediante el ensayo de rojo neutro, mostrando esta última una menor sensibilidad a los metales. Estudios más actuales (Morcillo, Esteban y Cuesta, 2016) han comparado la citotoxicidad de diferentes compuestos inorgánicos mediante diferentes métodos citotóxicos, estableciendo así un rango de toxicidad donde el metilmercurio presenta la mayor toxicidad (0,01 mM) seguido del arsénico, cadmio, mercurio y plomo y el siguiente rango de sensibilidad entre diferentes ensayos para evaluar la citotoxicidad: rojo neutro > MTT > Cristal violeta > LDH.

Otros autores también han identificado una mayor citotoxicidad del cadmio frente a otros metales como el plomo o el aluminio en líneas celulares de neuroblastoma humano IMR32 (Gotti, Cabrini, Sher y Clementi, 1987) o en las células de ovario de hámster chino (CHO) (Lin, Lee, Chen y Lin-Shiau, 1994). Sin embargo algunos autores muestran una mayor citotoxicidad para el mercurio frente al cadmio en células humanas del túbulo proximal (HPT) (Rodilla, Jenner y Hawksworth, 1998). Dentro de los compuestos formados por cadmio, existen estudios que muestran una  $CE_{50}$  mayor para el  $CdCl_2$  frente a  $CdSO_4$  a concentraciones entre  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  M en células de riñón del túbulo proximal de cerdo (LLC-PK1), midiendo la citotoxicidad mediante la captación de rojo neutro tras 24 horas de exposición a ambas sales (Barrouillet, Ohayon-Court, Dubus, L'Azou y Nguyen, 2001).

Determinados estudios comparan la citotoxicidad del cloruro de cadmio en diferentes líneas celulares. Así, Olabarrieta, L'Azou, Yuric, Cambar y Cajaraville (2001) evaluaron los efectos del cadmio en células LLC-PK1 (a concentraciones de cloruro de cadmio comprendidas entre 1-100  $\mu\text{M}$ ) y en hemocitos o células sanguíneas de mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) (a concentraciones de cloruro de cadmio comprendidas entre 10-2000  $\mu\text{M}$ ) comprobando tras 24 horas de exposición la viabilidad celular mediante  $\text{CL}_{50}$ . Para los hemocitos mediante la técnica de captación de rojo neutro tiene un valor de 750  $\mu\text{M}$  y para el ensayo de MTT un valor de 400  $\mu\text{M}$ . Para la línea celular LLC-PK1 mediante la captación de rojo neutro la  $\text{CL}_{50}$  alcanza un valor de 40  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  para el ensayo de MTT y 60  $\mu\text{M}$  para el ensayo de LDH deduciendo que los hemocitos muestran mayor resistencia al cadmio que la línea celular LLC-PK1.

Algunos autores han realizado estudios de citotoxicidad combinando diferentes metales. Keogh, Steffen y Siegers (1994) realizaron estudios de citotoxicidad en la línea epitelial intestinal (I-407) utilizando el procedimiento de captación del rojo neutro. Tras 48 de exposición a los tóxicos observaron el siguiente rango de citotoxicidad con respecto a la  $\text{DL}_{50}$ :  $\text{HgCl}_2$  (32  $\mu\text{M}$ ) >  $\text{CdCl}_2$  (53  $\mu\text{M}$ ) >  $\text{CuCl}_2$  (156  $\mu\text{M}$ ) >  $\text{Tl}_2\text{SO}_4$  (377  $\mu\text{M}$ ) >  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (1,99 mM). Cuando combinaron los dos metales de mayor toxicidad, no observaron efecto aditivo o sinérgico. Sin embargo, otros estudios revelan que la citotoxicidad puede aumentar al combinar metales como el cadmio y el plomo (Kaji *et al.*, 1995, Hernández-García *et al.*, 2014).

Algunos estudios incluyen diferentes tiempos de tratamiento. Bucio *et al.* (1995), estudia los efectos del cloruro de cadmio y el cloruro de mercurio en la línea celular WRL-68 (línea celular hepática humana) a 24 horas con una dosis de 0,5  $\mu\text{M}$  (tratamiento agudo), con una dosis de 5  $\mu\text{M}$  (alta dosis aguda) y durante 7 días con una dosis de 0,5  $\mu\text{M}$  (tratamiento crónico). El estudio de citotoxicidad muestra una mayor liberación de lactato deshidrogenasa para las células tratadas con cloruro de cadmio.

En estudios realizados en células de ratón se han encontrado  $\text{Cl}_{50}$  menores de  $10^{-5}$  mol/l para compuestos como el cloruro de cadmio y cloruro de mercurio e inferiores a  $10^{-4}$  mol/l para compuestos como el nitrato de plomo o el nitrato de cromo (Yamamoto, Honma y Sumita, 1998).



Romero *et al.* (2003, 2004), también han evaluado la citotoxicidad del cadmio y el plomo sobre líneas celulares de origen renal estableciendo así, mediante la técnica de captación de rojo neutro en la línea celular BGM para el cloruro de cadmio que la  $CE_{10}$  era de 0,062 mM, para el nitrato de plomo 1,38 mM y 1,04 mM para la línea celular Vero tras 24 horas de exposición a los diferentes metales pesados.

Zhang, Mu, Fu y Zhou (2007) compararon la citotoxicidad producida por el cloruro de cadmio en una línea celular de origen hepático (células de hepatoma humano, Bel-7402) y otra de origen renal (células epiteliales humanas del túbulo renal, HK-2) mediante el ensayo de rojo neutro tras 24 horas de exposición mostrando una mayor citotoxicidad en células renales ( $CI_{50}$   $1,35 \pm 0,21$   $\mu\text{g/ml}$ ) frente a las células hepáticas ( $CI_{50}$   $3,73 \pm 0,2$   $\mu\text{g/ml}$ ).

Recientemente se ha evaluado la toxicidad del cloruro de cadmio en células renales de carcinoma humano. Sinha, Pal y Sil (2014) establecen una  $CL_{50}$  de 20  $\mu\text{M}$  para la línea celular SK-RC-45 y de 50  $\mu\text{M}$  para la línea celular NKE tras 24 horas de exposición y mediante el ensayo de MTT.

Son menores los ensayos donde se emplean compuestos de cromo para evaluar su efecto citotóxico. Bagchi *et al.* (2002), realizaron un estudio comprobando los diferentes efectos que sales de cromo III y VI producían comprobando un aumento de especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica, fragmentación del ADN y muerte por apoptosis. Comprobaron que en macrófagos murinos diferentes concentraciones de dicromato de sodio (0,2, 0,4 y 0,6  $\mu\text{M}$ ) no producen ningún efecto tras 24 horas de tratamiento, sin embargo, observaron una disminución significativa dependiente de la concentración en la reducción de MTT. Wise, Wise y Little (2002) estudiaron la citotoxicidad del cromato de plomo y el cromato de sodio en cultivos primarios de fibroblastos bronquiales humanos, comprobando que ésta es dependiente de la dosis. La supervivencia relativa fue del 87, 46, 26, y 2% tras la exposición durante 24 horas a 0,1, 0,5, 1 y 5  $\text{g/cm}^2$  de cromato de plomo y de 74, 57, 13 y 0% tras la exposición durante 24 horas a 1, 2,5, 5 y 10  $\text{g/cm}^2$  de cromato de sodio.

Se han llevado a cabo estudios que comparan la toxicidad del cromo (VI) con otros compuestos. Uroz, Anadón y Capó (2008) compararon las  $CL_{50}$  en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de rata tras 24 horas de exposición a cloruro de cadmio, metilmercurio e hidrato de cromo (para las neuronas  $3,7 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$  y 5,34

$\cdot 10^{-6}$  M respectivamente para cada sal; para los astrocitos  $3,73 \cdot 10^{-5}$ ,  $1,46 \cdot 10^{-5}$ ,  $2,46 \cdot 10^{-5}$  M respectivamente para cada sal) mostrando los resultados una resistencia aproximadamente diez veces mayor de los astrocitos con respecto a las neuronas para los tres compuestos.

Sabaliauskas *et al.* (2011), estudiaron los efectos citotóxicos de materiales protésicos permanentes. Para ello evaluaron los efectos sobre fibroblastos humanos gingivales de una aleación de cromo-cobalto mediante el ensayo de MTT. Los resultados mostraron una disminución de la viabilidad tras 48 horas de exposición.

Los ensayos citotóxicos para compuestos de selenio se han realizado sobre todo en compuestos de naturaleza orgánica. Misra y Niyogi (2009) señalan la posible toxicidad del selenito de sodio en hepatocitos de peces (trucha arco iris) estableciendo una  $DL_{50}$  de  $587 \mu\text{M}$ . Casaril *et al.* (2015), muestra mediante el ensayo de MTT efectos citotóxicos a dosis de  $500 \mu\text{M}$  de PSAP (a-fenilselenil acetofenona) tras 24 y 48 horas.

También se presentan diferentes estudios donde se comprueban los efectos citotóxicos del selenio sobre diferentes líneas celulares de carcinoma humano. Así, Romano, Plano, Encío, Palop y Sanmartin (2015) estudia los efectos del selenocianato y diseleniuro sobre carcinoma de pulmón (HBT-54), leucemia linfocítica (CCRF-CEM), adenocarcinoma de mama (MCF-7) y adenocarcinoma de próstata (PC-3), siendo la primera menos sensible (sólo dos compuestos presentan  $CI_{50}$  inferiores a  $10 \mu\text{M}$ ), frente a las otras tres líneas celulares (17 compuestos, 18 compuestos y 19 compuestos respectivamente muestran niveles inferiores a  $10 \mu\text{M}$ ). Estudios recientes (Alcolea *et al.*, 2016) muestran  $CI_{50}$  inferiores a  $10 \mu\text{M}$  tras 72 horas de exposición a cuatro derivados diferentes de selenourea en seis líneas celulares de carcinoma humano (melanoma, 1205Lu; carcinoma de pulmón, A549; carcinoma de próstata, DU145; carcinoma colorrectal, HCT116; carcinoma epitelioide de páncreas, PANC- 1 y adenocarcinoma de páncreas, BxPC3).

Igualmente se han realizado estudios de citotoxicidad para comprobar el efecto reparador o protector de bajas dosis de selenio tras la exposición de diferentes células a tóxicos como el plomo o el cobre (McKelvey, Horgan y Murphy, 2015 y Zhu *et al.*, 2014).

El tóxico que mayor número de estudios presenta es el cadmio. Existen diversos estudios *in vitro* en relación a la exposición al humo del tabaco. Así, Song y Koh (2012) demuestran la reducción de la viabilidad dependiente de la dosis de cloruro de cadmio mostrando que la viabilidad celular fue de  $74,5 \pm 1,6\%$  en el grupo de control, el  $68,7 \pm 4,1\%$  a  $20 \mu\text{M}$  de cloruro de cadmio,  $55,9 \pm 3,3 \%$  en cloruro de cadmio a  $40 \mu\text{M}$ ,  $45,1 \pm 3,3 \%$  en  $60 \mu\text{M}$  cloruro de cadmio, el  $35,4 \pm 3,6 \%$  en  $80 \mu\text{M}$  de cloruro de cadmio, y el  $25,6 \pm 2,4\%$  en  $100 \mu\text{M}$  de cloruro de cadmio.

Estudios recientes (Skipper, Sims, Yedjou y Tchouwou, 2016) muestran mediante ensayo de MTT una  $DL_{50}$  de  $3,6 \mu\text{g/ml}$  tras la exposición durante 48 horas al cloruro de cadmio en células de carcinoma de hígado humano.

**Tabla 11.** Estudios de citotoxicidad realizados por diferentes autores

Autores	Elementos o compuestos	Células	Efectos
Fischer (1976)	Pb, Hg y Cd	Fibroblastos de ratón (L929)	Compara las $CE_{50}$ entre los tres elementos
Skreb y Fischer (1984)	Ni, Pb, Mn, Hg y Cd	Línea celular Hela, fibroblastos fetales humano, células de hámster chino V79 y fibroblastos de ratón L-	Establecen un orden de citotoxicidad
Babich <i>et al.</i> , 1986	Cd, Zn, Cu y Ni	Línea celular de alevín de morraja de oreja azul (BF-2) y de trucha de arcoiris (RTG-2)	La línea RTG-2 es menos sensible a los metales
Gotti <i>et al.</i> , 1987	Pb, Al y Cd	Neuroblastoma humano (IMR32)	Efectos neurotóxicos a largo plazo
Keogh <i>et al.</i> , 1994	$Pb(NO_3)_2$ y $HgCl_2$	Epitelio de intestino humano (I-407)	Comparan los efectos citotóxicos de $CE_{50}$ entre los dos metales
Lin <i>et al.</i> , 1994	Cd y Pb	Células de ovario de hámster chino (CHO)	Comparan los efectos citotóxicos de ambos metales
Bucio <i>et al.</i> , 1995	Cd y Hg	Células de hígado fetal humano (WRL-68)	Compara efectos citotóxicos entre ambos metales
Kaji <i>et al.</i> , 1995	Cd y Pb	Células de endotelio vascular de aorta bovina	La citotoxicidad del Cd aumenta debido al Pb
Lin <i>et al.</i> , 1995	$C_4H_6CdO_4$	Fibroblastos de embrión de rata (REF) y fibroblastos de piel humana (HFW)	Compara el efecto citotóxico de la misma sal en dos líneas celulares siendo superior en REF
Rodilla <i>et al.</i> , 1998	$CdCl_2$ , $HgCl_2$ , $ZnCl_2$ y $Bi(NO_3)_3$	HPT (células del túbulo proximal humano)	Establecen un orden de citotoxicidad entre ellos
Yamamoto <i>et al.</i> , 1998	43 sales de metales	Fibroblastos y células osteoblásticas de ratón	Su toxicidad depende del tipo de metal, de su concentración y su estado químico
Barrouillet <i>et al.</i> , 2001	$CdCl_2$ y $CdSO_4$	Línea celular derivada de células del túbulo proximal renal (LLC-	$CE_{50}$ mayor para el cloruro de cadmio

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

		PK1)	
Olabarrieta <i>et al.</i> , 2001	CdCl <sub>2</sub>	Línea celular derivada de células del túbulo proximal renal (LLC-PK1) y hemocitos o glóbulos de mejillones	Comparan la toxicidad del metal en ambas células y establecen que los hemocitos son más resistentes
Bagchi <i>et al.</i> , 2002	Na <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Macrófagos murinos (7774A.1)	Mediante ensayo de MTT disminución de succinato deshidrogenasa dependiente de la dosis
Wise <i>et al.</i> , 2002	PbCrO <sub>4</sub> y Na <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	Fibroblastos primarios bronquiales	Citotoxicidad dependiente de la dosis y daño cromosómico
Romero <i>et al.</i> , 2003	CdCl <sub>2</sub>	Línea celular BGM	Demuestra que dicha línea es susceptible a la actividad tóxica del cloruro de cadmio
Romero <i>et al.</i> , 2004	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Líneas BGM y VERO	Ambas líneas son susceptibles a la toxicidad del plomo
Zhang <i>et al.</i> , 2007	Acetaminofeno (AAP), mitomicina (MMC), CuCl <sub>2</sub> , fenacetina y CdCl <sub>2</sub>	Células de hepatoma humano (Bel-7402) y células epiteliales humanas del túbulo renal (HK-2)	Compara la citotoxicidad en ambas líneas celulares y con los distintos tóxicos
Uroz <i>et al.</i> , 2008	CdCl <sub>2</sub> , [CH <sub>3</sub> Hg] <sup>+</sup> y Cr(OH) <sub>3</sub>	Cultivos primarios de neuronas de rata y astrocitos	Compara las CL <sub>50</sub> de los tres compuestos tras 24 horas de exposición
Misra y Niyogi, 2009	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Cultivo primario de hepatocitos aislados de trucha de arco iris	Establecen la dosis letal tras 24 horas de exposición al tóxico
Romero <i>et al.</i> , 2009	Cd, Pb y Cd/Pb	Eritrocitos de ánade real	Establecen diferentes CE
Choi <i>et al.</i> , 2011	(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cd·H <sub>2</sub> O	Fibroblastos de pulmón humano	Establece la Cl <sub>50</sub> en 8,5 μM
Sabaliuskas <i>et al.</i> , 2011	Aleación de cromo-cobalto	Fibroblastos humanos gingivales	Efectos citotóxicos mediante ensayo de MTT a diferentes tiempo de incubación
Misra, Hamilton y Niyogi, 2012	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> Se	Hepatocitos aislados de trucha arco iris	Disminuye un 15% la viabilidad celular tras exposiciones superiores a 1000 μM.
Song y Koh, 2012	CdCl <sub>2</sub>	Células epiteliales del cristalino humano	Reducción de la viabilidad dependiente de la dosis
Saïdi <i>et al.</i> , 2013	Cd, Pb y Hg	FTO2B hígado de rata, HepG2 hepatoma humano y humana hepática WRL-68	Solamente el Cd presenta efectos citotóxicos según los tiempos de exposición
Hernández-García <i>et al.</i> , 2014	Cd, Pb y Cd/Pb	Eritrocitos de ratonero común	Establecen un rango de toxicidad
Sinha <i>et al.</i> , 2014	CdCl <sub>2</sub>	Células de carcinoma renal humano (SK-RC-45) y células normales humanas del túbulo proximal (NKE)	Compara efectos citotóxicos en ambas líneas
Casari <i>et al.</i> , 2015	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> OSe	Células de ovario de hámster chino	Efectos citotóxicos después de 48 y 72 horas
Romano <i>et al.</i> , 2015	Selenocianato y diseleniuro	Cinco líneas de carcinoma humano	Establecen Cl <sub>50</sub>
Alcolea <i>et al.</i> , 2016	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> Se	Seis líneas celulares de	Obtienen Cl <sub>50</sub> para

		cáncer humano	cuatro derivados de selenourea
Malhotra, 2016	Partículas de selenio y Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Línea celular fibroblastos embrionarios de ratón (NIH-3T3)	Test de viabilidad (MTT)
Morcillo <i>et al.</i> , 2016	Cd, Hg, MeHg, As y Pb	Línea celular de dorada (SAF-1)	Establece rangos de toxicidad entre los diferentes tóxicos y diferentes métodos de citotoxicidad
Skipper <i>et al.</i> , 2016	CdCl <sub>2</sub>	Carcinoma de hígado humano (HepG2)	Induce toxicidad de forma dependiente a la concentración

## II.12.2. GENOTOXICIDAD

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos. Existen diversos efectos provocados sobre el ADN. No obstante los principales son las aberraciones cromosómicas y cambios en el ciclo celular.

En cuanto al cadmio, Payette *et al.* (1995) determinaron como afecta en el ciclo celular, 72 horas después de la estimulación de la mitosis con concanavalina A (Con A) en linfocitos de bazo de ratón (C57BL/6). Los datos aportados por la citometría de flujo mostraron que dosis de 0,6  $\mu$ M aumentan el número de células en fase G0/G1, mientras que disminuyen el número de células en fase S y G2/M.

Meplán, Mann y Hainaut (1999) demostraron que el cadmio en células de cáncer de mama humano (MCF7) inhibe la unión de la proteína p53 al ADN. En este estudio estimulan la mitosis celular mediante irradiación gamma. Los errores en la replicación pueden generar células cancerígenas que la proteína p53 evita deteniendo el ciclo celular en las fases G1 y G2/M, pero cuando las células están expuestas a 20  $\mu$ M de cadmio, la proteína p53 deja de actuar. Por lo que estas observaciones indican que el cadmio en niveles subtóxicos deterioran la función de p53 mediante la inducción de cambios conformacionales en la proteína.

Posteriormente, Chao y Yang (2001) estudiaron la función de las kinasas ERK y MAPK en el ciclo celular de células de adenocarcinoma de pulmón humano (CL3) tratadas con cadmio. Tras el tratamiento durante 2 horas a 40  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> entre las 6 y las 24 horas después constataron que la fase G1 disminuyó, la fase G2 aumentó y no afectó significativamente a la fase S. Para comprobar si afectaba a la mitosis,

estudiaron el índice mitótico comprobando su aumento y la detección irreversible de la mitosis. También analizaron el efecto del cadmio en la progresión desde la fase G2 al resto de fases del ciclo celular mostrando que las células tratadas con 40  $\mu\text{M}$  durante la fase G2 se acumulaban en la fase M. Además observaron una alta población de células en fase sub-G1 22 horas después del tratamiento, lo que sugiere que el cadmio desencadena la apoptosis.

Como se comenta anteriormente, existen diferentes estudios relacionados con diferentes componentes del humo del tabaco. Mukherjee, Gupta, Kumar y Sikka (2004) realizaron un estudio para comprobar cómo el cadmio potencia la toxicidad inducida por el benzopireno (BP) en fibroblastos humanos. BP produce un aumento en los niveles celulares de la proteína p53 y ésta puede activar transcripcionalmente varios genes diana, como la ciclina inhibidora de quinasa p21, que causa la detención del ciclo celular en la fase G1. Cuando las células son tratadas durante dos horas con 0.5  $\mu\text{M}$  de BPDE (último metabolito carcinogénico de BP) aumenta el porcentaje de células en la fase G1 y disminuye el número de células en fase S y G2 (de 52 a 72% G1, de 32 a 23% S y de 17 a 5% G2). Pero cuando las células son también tratadas con  $\text{CdCl}_2$  durante 4h, los resultados vuelven a valores similares al control de forma dependiente con la dosis de cadmio (entre 20 y 80  $\mu\text{M}$ ). Por lo que los resultados manifiestan que niveles no citotóxicos de cadmio perjudican la inducción de la proteína p53, inhiben la transactivación de p21 y anula la detención del ciclo celular en la fase G1 de forma dependiente con la dosis.

Existen varios estudios que relacionan la exposición a cadmio con la detención del ciclo celular en la fase G1 y G2/M. Yang, Chiu, Lin y Lin (2004) estudiaron los efectos del cloruro de cadmio en células de ovario de hámster chino (CHO K1). Cultivaron las células con 0,1, 0,4, 1 o 4  $\mu\text{M}$  de cadmio para diversos intervalos de tiempo. No hubo diferencia en la tasa de crecimiento para las concentraciones inferiores a 0.4  $\mu\text{M}$  tras un plazo de 24 h. Sin embargo, si observaron una reducción dependiente de la dosis de la proliferación celular a concentraciones superiores a 0,4  $\mu\text{M}$ . Se observó la detención en G2/M cuando las células marcadas con BrdU fueron tratados con 1  $\mu\text{M}$  durante 8 horas, mientras que las células que recibieron 4  $\mu\text{M}$  se detuvieron en la fase S dentro de las 4 horas. El análisis del ciclo celular de las células tratadas durante 24 horas mostró que se produjo la detención en la fase G2/M sólo cuando las células recibieron de 0,8 a 2  $\mu\text{M}$  cadmio. A pesar de la aparición de G2/M

detención en el tratamiento Cd, sólo una proporción limitada de las células se bloquea en la fase M.

Kim, Kim, Johnson y Sharma (2005) estudiaron el efecto del cadmio sobre cultivos de macrófagos murinos (J7774A.1) constatando que una dosis de 20  $\mu\text{M}$  de cloruro de cadmio durante 24 horas de exposición induce ROS, ERK y el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina  $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$  lo que lleva a la detención del ciclo celular en la fase G2/M (15% con respecto al 4% del control) y a la muerte celular.

Xie y Shaikh (2006) estudiaron el efecto de concentraciones de hasta 20  $\mu\text{M}$  de cloruro de cadmio en células epiteliales del túbulo proximal de rata mostrando un incremento del número de células en la fase G2/M para concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{M}$ . Tras 12 horas de exposición el número de células había aumentado en un 71% y a las 24 horas se duplicó el número de células en dicha fase. Los autores muestran que este aumento se debió a un incremento de la proteína p53 y de los inhibidores de la quinasa p27 y p21 y una disminución de la expresión de las quinasas dependientes de ciclina CDK1 y CDK2.

Choi *et al.* (2011), estudia los efectos del acetato de cadmio sobre dos líneas celulares de fibroblastos del pulmón humano, WI38 (tipo salvaje para las proteínas p53 y retinoblastoma, Rb) y WI38-VA13 (p53 y Rb defectuosas). Los puntos clave para la progresión desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular incluye la familia de inhibidores CIP/KIP, la proteína supresora de tumores Rb y el factor de transcripción E2F1. Los complejos de ciclina E/CDK2 hacen que la Rb pase a un estado hiperfosforilado para liberar E2F1 que activa varios genes implicados en la progresión hacia la fase S (Arroyo y Raychaudhuri, 1992; Kato Matsushime, Hiebert, Ewen, Sherr, 2003). Este estudio demuestra que el cadmio disminuye la cantidad de CDK2 y E2F1 y suprime la fosforilación de Rb, provocando la detención del ciclo celular en la fase G1.

En lo relativo al selenio, Tapiero, Townsend y Tew (2003) compara los efectos de diferentes compuestos químicos de selenio indicando que dosis altas de selenito en células de piel de ratón y en queratinocitos humanos primarios pueden causar la fragmentación del ADN, disminuir la síntesis de ADN, la inhibición del crecimiento celular, la síntesis de ADN, bloquear el ciclo celular en la fase S/G2 y muerte celular por necrosis. Sin embargo, el metilselenocianato o metilselenocisteína produce el

bloqueo del ciclo celular en la fase G1 y la muerte celular se produce principalmente por apoptosis.

También se han llevado a cabo estudios donde se combinan diferentes sales. Xiao, Huang, Wang y Li (2008) realizaron un estudio para comprobar los efectos del selenio y el zinc sobre células de cáncer esofágico humano (Eca 109). El selenio a una concentración de 0,3 µg/ml causa la detención del ciclo celular en la fase G1, pero no de forma estadísticamente significativa; 3,5 µg/ml de zinc también produce el aumento del número de células en fase G1. Cuando ambas sales se combinan se produce un efecto sinérgico causando una detención significativa del ciclo celular en la fase G1 y promueven la apoptosis.

En estudios recientes, Gadhia, O'Brien y Barile (2015) estudiaron el efecto del cloruro de cadmio a una concentración de 10 µM con diferentes tiempos de exposición en células madre pluripotentes embrionarias de ratón (ES-D3, CRL-1934). Los resultados muestran una disminución del porcentaje de las células en fase G0/G1 tras 1, 24 y 48 horas y un aumento de las células en fase G2/M y disminución en fase S para 1 y 48 horas. Lo que demuestra que el cadmio podría afectar inicialmente a la síntesis de ADN.

**Tabla 12.** Estudios de genotoxicidad realizados por diferentes autores

Autores	Elementos o compuestos	Células	Efectos
Paton y Allison, 1972	Sales de arsénico, cadmio, cobalto, níquel, berilio, selenio y vanadio	Leucocitos humanos	Reducción del índice mitótico
Obe, Beek y Dudin, 1975	Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Leucocitos humanos	Aberraciones cromosómicas, defectos de espiralización y aparición de micronúcleos
Rohr y Bauchinger, 1976	CdSO <sub>4</sub>	Línea celular de hámster chino (Hy)	A altas concentraciones se produce reducción del índice mitótico, adhesividad y picnosis de cromosomas
Umeda y Nishimura, 1979	Cr, Mn y Ni	Células de mamífero en cultivo	Aberraciones cromosómicas
Gasiorek y Bauchinger, 1981	Cd	Linfocitos humanos	Aberraciones cromosómicas
Lakkad <i>et al.</i> , 1986	Cd y Pb	Células CHO	Disminución del índice mitótico e intercambio de cromátidas hermanas
Nocentini, 1987	Cd	Fibroblastos diploides humanos y células de riñón de mono verde africano (CV-1)	Inhibe la replicación del ADN
Lin <i>et al.</i> , 1994	Cd	Células de ovario de hámster chino (CHO)	Aberraciones cromosómicas
Payette <i>et al.</i> , 1995	Cd	Linfocitos de bazo de ratón (C57BL/6)	Aumenta el número de células en fase G0/G1 y disminuye en S



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

			y G2/M
Méplan <i>et al.</i> , 1999	Cd	Células humanas de cáncer de mama (MCF-C)	Impide que la proteína p53 detenga el ciclo celular en las fases G1 y G2/M.
Singh <i>et al.</i> , 1999	PbCrO <sub>4</sub> y Na <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	Células normales de pulmón humano (HSAE)	Formación de aductos de Cr-ADN y Pb-ADN
Bagchi <i>et al.</i> , 2000	Na <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> y CdCl <sub>2</sub>	Células de leucemia mielógena crónica humana (K562)	A una concentración de 12.5 μM de ambos compuestos produce un aumento de las fases S y G2/M.
Biswas, Talukder y Sharma, 2000	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> y Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	Linfocitos de sangre periférica humana	Aberraciones cromosómicas y reducción de la división celular
Chao y Yang, 2001	CdCl <sub>2</sub>	Células de adenocarcinoma de pulmón humano	Provoca la detención mitótica sin afectar a la progresión de G2 a la mitosis
García-Rodríguez, López-Santiago y Altamirano-Lozano, 2001	CrO <sub>3</sub>	Eritrocitos de ratón	Aberraciones cromosómicas y micronúcleos
Tapiero, Townsend y Tew, 2003	Se	Células de piel de ratón y queratinocitos humanos primarios	Bloqueo del ciclo celular en una fase determinada
Mukherjee <i>et al.</i> , 2004	CdCl <sub>2</sub>	Fibroblastos humanos	Anula la detención del ciclo celular en la fase G1 tras su tratamiento con benzopirenos
Yang <i>et al.</i> , 2004	CdCl <sub>2</sub>	Células de ovario de hámster chino (CHO K1)	Detención del ciclo celular en la fase G2/M
Kim <i>et al.</i> , 2005	CdCl <sub>2</sub>	Cultivos de macrófagos murinos	Detención del ciclo celular en la fase G2/M
Cemeli, Marcos y Anderson, 2006	Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> y H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Linfocitos de sangre entera y en la línea celular linfoblastoide TK6	Aumentan el número de micronúcleos
Xie y Shaikh, 2006	CdCl <sub>2</sub>	Células epiteliales del túbulo renal de rata (NRK-52E)	Detención del ciclo celular en la fase G2/M
Xiao <i>et al.</i> , 2008	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> y ZnSO <sub>4</sub>	Células de cáncer de esófago humano (Eca 109)	Detienen el ciclo celular en la fase S.
Nava-Hernández <i>et al.</i> , 2009	Pb, Cd y As	Cultivos primarios de espermatozoides de rata	Daño en el ADN (longitud de la cadena) tras la exposición crónica a dichos metales
Choi <i>et al.</i> , 2011	(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cd·H <sub>2</sub> O	Fibroblastos de pulmón humano	Detención del ciclo en la fase G1
Gadhia, O'Brien y Barile, 2015	Cd	Células madre pluripotentes embrionarias de ratón (ES-D3)	Cambios en los porcentajes de células en distintas fases del ciclo celular según el tiempo de exposición

### II.12.3. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS

Los cambios estructurales y ultraestructurales asociados a la exposición de metales pesados tienen un gran interés en los ensayos *in vitro* ya que pueden relacionarse con diferentes tipos de muerte celular (necrosis o apoptosis).

Muchos grupos de investigación han asociado cambios morfológicos y ultraestructurales en células renales y hepáticas cuando están intoxicadas con metales pesados (Pfaller, Gstraunthaler y Willinger, 1990; Hoffmann, Cook, di Luzio y Coover, 1975; Bhatnagar, Vrablic y Yamashiro, 1982).

Ord, Bouffler y Chibber (1988) indican que en fibroblastos de ciervo generalmente, el daño de la membrana celular es la primera muestra de la acción adversa del cadmio, en particular cuando la exposición al cadmio es de forma continuada, las células pueden tolerar pérdidas de la extensión de la membrana, la distorsión mitocondrial y daños en el aparato de Golgi. El punto de inflexión en el que el cadmio se convirtió en letal, en general se caracterizó por una cascada de eventos que incluía el daño de componentes tanto citoplasmáticos como nucleares.

Hazen-Martin, Sens, Blackburn y Sens (1989) exponen en un primer artículo como concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  comprendidas entre 2-10  $\mu\text{g/ml}$  causan la disminución del número de células de forma irreversible y concentraciones entre 0,5-1  $\mu\text{g/ml}$  muestran una recuperación parcial del número de células y morfología similar a la muestra control en células renales. En un estudio posterior indican que a una concentración de 0,05  $\mu\text{g/ml}$  las uniones estrechas, los orgánulos y la formación de cuerpos mieloides parecen intactos; a una concentración de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  se produce una disminución en el número de microvellosidades y la inhibición en la formación de cuerpos mieloides; cuando la concentración aumenta hasta 0,5  $\mu\text{g/ml}$  se produce además de los efectos anteriores, la condensación de la cromatina nuclear mostrando también escasas microvellosidades.

Rehm y Waalkes (1990) estudiaron los efectos del cloruro de cadmio sobre ratones, ratas y hámsters sirios administrándoles dosis comprendidas entre 30-50  $\mu\text{M/Kg}$  mostrando no presentar cambios en ratones ni ratas. Sin embargo, las células renales si se ven afectadas tras 16 horas de ser tratados constatando los efectos posteriormente indicados en la tabla 13.

Matsuura, Takasugi, Kunifuji, Horie y Kuroiwa (1991) realizaron un estudio *in vivo* donde inyectaban 0,8, 1,5 y 3 mg CdCl<sub>2</sub>/Kg de peso corporal en rata wistar tres veces por semana durante tres semanas. Los estudios histológicos mostraron que en las células renales con dosis crecientes de cadmio aumentan el tamaño de los núcleos y nucléolos al microscopio óptico. A dosis mayores observaron una condensación de la cromatina y degeneración vacuolar. Al microscopio electrónico los gránulos de pericromatina del núcleo aumentaron, especialmente en los grupos de ratas que habían sido tratadas con 0,8 y 1,5 mg de CdCl<sub>2</sub>. Al aumentar estas dosis, se producía el aumento de los nucléolos en forma de anillo. En los grupos tratados con 3 mg de CdCl<sub>2</sub>, los nucléolos contienen gránulos densos, en el citoplasma aumenta el número de lisosomas, los cuerpos de mielina, las mitocondrias en forma de anillo y las vesículas. Los cambios finales fueron la degeneración celular y necrosis.

Condrón, Schroen y Marshall (1994) realizaron un estudio con ratas Sprague Dawley a las que inyectaron 2 mg/Kg de CdCl<sub>2</sub> o añadieron al agua 100 µg/ml durante 39 semanas. Encontraron que la concentración de rata en riñón se encontraba entre 45 y 102 µg/g de peso húmedo. Al microscopio electrónico observaron pérdida de microvellosidades, disminución en la cantidad de lisosomas, núcleos distorsionados y células necróticas.

Lyons-Alcantara *et al.* (1998), estudiaron los efectos del Cd<sup>+2</sup> tras 48 horas de tratamiento en células de la epidermis de trucha arcoíris. Al microscopio óptico con una concentración de 10 µM solo aparecían alteradas algunas células mostrando la contracción y separación del núcleo y cuerpos apoptóticos. Cuando la concentración fue de 50 µM apareció condensación celular, citoplasma nebuloso, fragmentación nuclear y cuerpos apoptóticos. Con concentraciones superiores, las células muestran características propias de la muerte celular por necrosis. Al microscopio electrónico las células mostraban evidencias de apoptosis y material fagocitado. Otras células tenían núcleos irregulares y gotitas de lípidos. Las conexiones entre las células se distorsionaron y las células presentaban depósitos de mielina.

Romero *et al.* (2003), estudiaron los cambios morfológicos experimentados en una línea celular de riñón de mono verde africano (BGM) tras la exposición a dosis subcitotóxicas equivalentes a la CE<sub>10</sub> (0,062 mM tras 24 horas) de CdCl<sub>2</sub>. Observaron algunas células con el citoplasma reducido a una delgada capa alrededor del núcleo, una disminución del número de microvellosidades o ausencia, vacuolización del

citoplasma, condensación y deformidad de las mitocondrias, disminución del número de orgánulos citoplasmáticos, aumento del número de lisosomas, vacuolas autofágicas y figuras de mielina. Ocasionalmente apreciaron cuerpos de inclusión en el citoplasma y el núcleo celular o núcleos fragmentados con cromatina condensada, aunque por lo general, el núcleo y los nucléolos eran similares al control.

Como se puede valorar, las mitocondrias son uno de los orgánulos más afectados a nivel estructural por metales pesados en células epiteliales del túbulo proximal renal (Peraza *et al.*, 2003; Thevenod, 2003). También suele aparecer un aumento en el número de vacuolas citoplasmáticas en células renales tratadas con metales (líneas celulares LLC-PK1 y MDCK; Zimmerhackl, Momm, Wiegele y Brandis, 1998).

Existen numerosos estudios que muestran la acumulación de diferentes metales como el plomo y el cadmio en el núcleo celular (Cherian y Nordberg, 1983). Hamada, Tanimoto, Iwai, Fujiwara y Sasaguri (1994) para demostrar la presencia del cadmio en la célula usaron 8-hidroxiquinolina (emite fluorescencia de color verde amarillento) en cultivos primarios de células tubulares renales de Beagle. Comprobaron que dicho compuesto apareció en el citoplasma a los 30 minutos y en el núcleo a los 60-90 minutos tras la exposición a 100 mM de CdCl<sub>2</sub>.

Tang, Yan, Hu, Liang y Shen (1996) estudian las alteraciones morfológicas que produce el acetato de plomo sobre cultivos primarios de astrocitos y células de Schwann. En los astrocitos, no observaron efectos citotóxicos con concentraciones de 1 µg/ml durante cuatro días. A concentraciones de 10 µg/ml observaron un aumento de la densidad lisosomal, inclusiones nucleares y dilatación del RE y con 100 µg/ml además de los anteriores efectos, observan hinchazón mitocondrial, aumento del número de cuerpos mieloides en el citoplasma y el número de vacuolas junto a la membrana citoplasmática. En las células Schwann, con una concentración de 1 µg/ml durante un día observaron hinchazón mitocondrial y del RE, vacuolización y numerosos cuerpos mieloides en el citoplasma celular.

Blankenship *et al.* (1997), estudia las alteraciones morfológicas que presenta la línea celular CHO-AA8 (células de ovario de hámster chino) tras la exposición a 350 µM de cromato de plomo. 24 horas después del tratamiento observaron partículas de plomo en las vacuolas citoplasmáticas y muchas células con morfología redondeada y

núcleo de apariencia normal. 36 horas después del tratamiento, las células muestran la morfología apoptótica clásica que incluye marginación de la cromatina, condensación del citoplasma y vacuolización con membranas plasmáticas intactas.

Singh *et al.* (1999) realizaron un estudio relacionando el cromato de plomo y el cromato de sodio como posibles causantes del cáncer de pulmón. Para llevar a cabo dicho estudio, utilizaron células epiteliales de pulmón humano (HSAE) y diferentes concentraciones de cromato de plomo (0,4, 0,8, 1, 2 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  durante una exposición de 24 horas) y de cromato de sodio (5 y 10  $\mu\text{M}$  durante 24 horas y 50 y 100  $\mu\text{M}$  durante 2 horas). El cromato de plomo provocó cuerpos electrodensos oscuros, refringentes, angulares y dentados en vacuolas citoplasmáticas y también se observaron cuerpos de inclusión de plomo (LIB) en el citoplasma y el núcleo. Tras la exposición al cromato de sodio no observaron LIB, por lo tanto atribuyen la formación de LIB al cromato de plomo en células (HSAE). También apreciaban una red perinuclear de tonofilamentos de citoqueratina característicos de células epiteliales. Las muestras tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de cromato de sodio durante dos horas mostraban grumos de cromatina, incremento de la densidad citoplasmática, membranas intactas con formación de cuerpos apoptóticos y células necróticas.

Un estudio posterior (Holmes *et al.*, 2005) indica que tras la exposición de células pulmonares humanas (WTHBF-6) a 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de cromato de plomo durante 24 horas, el 29% de las células presentaba partículas de plomo internalizadas en las vacuolas citoplasmáticas.

Romero *et al.* (2004), estudiaron los cambios morfológicos producidos en las líneas de origen renal BGM y VERO tras la exposición durante 24 horas a dosis subcitotóxicas de nitrato de plomo equivalentes a  $\text{CE}_{10}$  (1,38 mM y 1,04 mM, respectivamente). En ambas líneas celulares, la característica más relevante fue la presencia de grupos electrodensos, a menudo localizados cerca del núcleo. Estos cuerpos de inclusión (en ocasiones en forma de anillo) se observaron como depósitos granulares libres en la matriz citoplasmática o secuestrados en los lisosomas. También aparecían de forma esporádica, cuerpos de inclusión intranucleares. Las figuras de mielina cercanas a estos cuerpos eran más frecuentes en las células BGM que VERO. Las mitocondrias aparecían con crestas menos definidas y observaron un ligero aumento en el número de fagolisosomas con respecto a las células control.

Nagy *et al.* (2015) realizaron un estudio utilizando diferentes compuestos de selenio sobre queratinocitos de humanos (HaCaT). Cuando las células fueron tratadas con 1ppm de nanoSe se observan una inhibición celular. Después de 60 minutos de exposición se parecía un alargamiento celular relacionado con apoptosis celular. A partir de 10 horas con una concentración de 5 ppm se produce la desintegración completa de la morfología celular.

Existen diversos estudios donde también se evalúan los efectos de distintos metales a nivel morfológico sobre líneas celulares de origen hepático. Bucio *et al.*, 1995 como se menciona anteriormente, estudia la citotoxicidad del cadmio y el mercurio sobre una línea celular hepática fetal humana (WRL-68) constatando que ambos metales producen alteraciones en diferentes grados, principalmente se observan cambios en las mitocondrias y el RER.

**Tabla 13.** Estudios morfológicos realizados por diferentes autores

Autores	Elementos o compuestos	Células	Efectos
Wielgus-Serafińska, Zawadzka y Falkus, 1980	Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Hepatocitos de rata	Cambios en la configuración de las mitocondrias
Mahaffey, Capar, Gladen y Fowler, 1981	Pb	Células renales de rata macho	Cuerpos de inclusión nucleares e hinchazón mitocondrial
Ord <i>et al.</i> , 1988	Cd	Línea celular de fibroblasto de ciervo	Provoca alteración de la membrana plasmática, mitocondrias, RE, aparato de Golgi, ribosomas, nucléolos y cromatina.
Hazen-Martin <i>et al.</i> , 1989	CdCl <sub>2</sub>	Células del túbulo proximal de riñón humano	Condensación de la cromatina nuclear, pérdida de microvellosidades, desorganización de interdigitación membrana lateral, disminución de la captación de los antibióticos aminoglucósidos como se evidencia por la disminución del número de cuerpos mieloides en estas células.
Rehm y Waalkes, 1990	CdCl <sub>2</sub>	Células renales de hámsters sirios (Cr:RGH)	Vesiculación citoplasmática, dilatación del retículo endoplasmático, hinchazón de las mitocondrias seguida rápidamente por la ampliación de vacuolas, cambios nucleares, y la desintegración celular.
Matsuura <i>et al.</i> , 1991	Cd	Células del tubo proximal de rata Wistar	Condensación de la cromatina y degeneración vacuolar, segregación nucleolar, aumento de lisosomas, mitocondrias en forma de anillo, cuerpos de mielina y vesiculación
Condrón <i>et al.</i> , 1994	Cd	Células de riñón de rata	Aparición de cadmio en el núcleo y en los lisosomas y disminución de las microvellosidades
Hamada <i>et al.</i> , 1994	Cd	Cultivos primarios de células del tubo proximal de perro	El Cd alcanza y afecta rápidamente al núcleo y al metabolismo citoplasmático

Bucio <i>et al.</i> , 1995	Cd y Hg	Línea celular hepática humana fetal (WRL-68)	Disminución de mitocondrias y deformidades, RER desorganizado, aumento de cuerpos residuales electrodensos y vacuolización y desorganización de la cromatina
Tang <i>et al.</i> , 1996	Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Cultivos primarios de astrocitos y células Schwann	En astrocitos aumento de la densidad lisosomal, ampliación del RER y presencia de inclusiones nucleares. En células Schwann hinchazón mitocondrial y del RE y numerosos cuerpos mieloides.
Blankenship <i>et al.</i> , 1997	PbCrO <sub>4</sub> y Na <sub>2</sub> Cro <sub>4</sub>	Células de ovario de hámster chino (CHO-AA8)	Cambios morfológicos producidos por apoptosis (marginación de la cromatina, condensación citoplasmática y vacuolización)
Lyons-Alcantara <i>et al.</i> , 1998	Cd	Células epidérmicas cultivadas de explantes de piel de la trucha arco iris	Núcleos irregulares, vesículas de lípidos, conexiones entre células distorsionadas, aparición de depósitos de mielina y microsurcos superficiales.
Singh <i>et al.</i> , 1999	PbCrO <sub>4</sub> y Na <sub>2</sub> Cro <sub>4</sub>	Células normales de pulmón humano (HSAE)	Cuerpos de inclusión intranucleares
Qu <i>et al.</i> , 2002	Pb	Fibroblastos de ratón MT( no tienen formas del gen de la metalotioneína) y WT (salvajes)	Las células procedentes de los ratones MT son más sensibles a la citotoxicidad del plomo y no presentan cuerpos de inclusión, a diferencia de los ratones WT.
Romero <i>et al.</i> , 2003	CdCl <sub>2</sub>	Línea celular BGM	Citoplasma reducido, escasas microvellosidades, vacuolización, condensación y deformación de mitocondrias, aumento de lisosomas y vacuolas autofágicas, aparición de figuras de mielina y cuerpos de inclusión intranucleares.
Romero <i>et al.</i> , 2004	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	BGM y VERO	Grupos electrodensos cerca del núcleo, depósitos granulares en el citoplasma o lisosomas, cuerpos de inclusión intranucleares, figuras de mielina, ligero aumento de fagolisosomas y menor definición en las mitocondrias.
Holmes <i>et al.</i> , 2005	PbCrO <sub>4</sub>	Células de pulmón humano	Presencia de cromato de plomo en vacuolas.
Song y Koh, 2012	CdCl <sub>2</sub>	Células epiteliales del cristalino humano	A una concentración de 80 μM se observa al microscopio óptico un aumento del daño celular y de células muertas.
Nagy <i>et al.</i> , 2015	Nanopartículas de Selenio	Queratinocitos de varón (HaCaT)	Desintegración morfológica de las células

#### II.12.4. APOPTOSIS

Existen diferentes artículos científicos donde los autores observan rasgos morfológicos característicos de las células apoptóticas o necróticas en células renales dependiendo de la dosis de metal utilizado (LLC-PK1; Duncan-Achanzar *et al.*, 1996). También existen estudios donde la apoptosis se observa en hepatocitos (condensación de la cromatina y mitocondrias condensadas, Angermüller, Künstle

yTiegs, 1998). Anteriormente, los estudios ultraestructurales de efectos provocados por apoptosis se centraban en alteraciones nucleares y contracción celular (Kerr, Wyllie y Currie, 1972). Actualmente existen diferentes estudios donde se aprecian cambios en otros orgánulos como las mitocondrias (Carranza-Rosales, Said-Fernández, Sepúlveda-Saavedra, Cruz-Vega y Gandolfi, 2005).

Según Van Cruchten y Van Den Broeck (2002) la apoptosis se caracteriza por encogimiento celular, la condensación y marginación de la cromatina y perturbación de la membrana plasmática y con el tiempo ruptura de la célula en cuerpos apoptóticos; mientras que el término necrosis se refiere a las alteraciones morfológicas que aparecen después de la muerte celular. La apoptosis es por lo tanto un proceso pre-mortal, mientras que la necrosis es una condición post-mortal. Las caspasas son responsables de los cambios morfológicos característicos observados durante la apoptosis.

Otros autores (Trump, Berezsky, Chang y Phelps, 1997; Bodey, Bodey y Kaiser, 1998) señalan que los primeros cambios en la apoptosis implican encogimiento celular, la contracción citosólica, más marcada aglutinación cromática, bulosidad citoplasmática, en ocasiones RE hinchado, y mitocondrias normales o condensadas. El proceso continua con bulosidad de la membrana citoplasmática y fragmentación del núcleo. Después la célula se fragmenta formando cuerpos apoptóticos (Kataoka y Tsuruo, 1996). Tras la muerte celular, las células sufren cambios postmortem (necrosis). *In vivo* las células y/o los fragmentos son a menudo fagocitados antes de su muerte por los macrófagos o células parenquimatosas adyacentes.

El Azzouzi *et al.* (1994), estudiaron los efectos tóxicos producidos por bajas y altas concentraciones de cadmio en linfocitos T humanos (CEM-C12). Mostraron que la muerte celular tras un tratamiento con 4  $\mu\text{M}$  de cadmio estaba precedida por condensación de la cromatina y fragmentación del ADN, dicha fragmentación se hacía máxima a concentraciones entre 8-10  $\mu\text{M}$ . Cuando expusieron las células a concentraciones superiores a 50  $\mu\text{M}$  de cadmio no observaron los cambios morfológicos anteriores. Lo que demostró que en las células CEM-C12, el cadmio a bajas concentraciones produce muerte celular por apoptosis y a altas concentraciones por necrosis.

Hamada *et al.* (1996) estudiaron la toxicidad provocada por el cloruro de cadmio en células de riñón humanas (293) mediante microscopía electrónica y ensayo



ELISA. Dicho ensayo evidenció la muerte celular por apoptosis tras 48 horas de exposición a concentraciones entre 12,5 y 37,5  $\mu\text{M}$ . sin embargo, disminuye para concentraciones superiores a 37,5  $\mu\text{M}$ . En el microscopio electrónico las células mostraban los rasgos característicos de la apoptosis; cromatina periférica agregada, núcleo buloso y conservación del sistema membranoso.

Oberto, Marks, Evans y Guidotti (1996) determinaron el principal tipo de muerte celular en células de cerebelo de rata (recién nacidas) para bajas concentraciones de  $\text{Pb}^{+2}$ . Una concentración de 1  $\mu\text{M}$  ( $\text{CE}_{50}$  aproximada de 10  $\mu\text{M}$ ) promueve la apoptosis neuronal caracterizada por encogimiento celular, condensación de la cromatina, bioquímicamente por la fragmentación del ADN internucleosomal y funcionalmente por la dependencia de la nueva síntesis de macromoléculas (cicloheximida y actinomicina).

Blankenship *et al.* (1997), estudiaron los efectos producidos por el cromato de plomo y el cromato de sodio en células de ovario de hámster chino (CHO-AA). Por electroforesis las células muestran fragmentación del ADN internucleosomal tras 24 horas de tratamiento con 350 o 750  $\mu\text{M}$  de cromato de plomo. Tras 48 horas recuperaron poca cantidad de ADN. En el caso del cromato de sodio tras el tratamiento con dosis de 5 o 10  $\mu\text{M}$  se aprecia fragmentación tras 24 horas y es claramente evidente tras 48 horas. Ambos tratamientos produjeron aductos de Cr-ADN que se incrementaron con la dosis. Los efectos apoptóticos a nivel morfológico se describen en el epígrafe anterior.

Wei *et al.* (2001), estudiaron los efectos del  $\text{SeO}_2$  en una línea celular normal hepática humana (HL-7702) y en una línea de hepatoma humano (SMMC-7721) tras 48 horas de tratamiento con una concentración de 30  $\mu\text{M}$ . A nivel morfológico las células mostraban características propias de la apoptosis con membrana nebulosa, cromatina condensada, fragmentación del núcleo y cuerpos apoptóticos. Mediante electroforesis se aprecia fragmentación del ADN. Por citometría de flujo se determinó un 68% de muerte por apoptosis en la línea HL-7702 y un 50% para la línea SMMC-7721.

Pathak y Khandelwal (2006) expusieron linfocitos esplénicos de ratón a 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  de cadmio durante 1, 1,5, 3, 6 y 18 horas. A las 6 horas ya detectaron la fragmentación del ADN y un aumento de las células apoptóticas. Con una

concentración de 50  $\mu\text{M}$  (1,5 horas) detectaron la disminución del potencial de membrana y la activación de la caspasa 3 (marcadores de las primeras etapas de la apoptosis). Mediante citometría de flujo (ensayo anexina/IP) el número de células apoptóticas aumentó de forma dependiente con la dosis. Con una concentración de 50  $\mu\text{M}$  las células apoptóticas aumentaron desde 5,1% (control) hasta 69,1% a las 18 horas de exposición.

Oh y Lim (2006), observaron como el cadmio en células HepG2 producía ROS que activaba la apoptosis tras la unión de ligandos a receptores de muerte celular presentes en la superficie celular (Fas) y por la activación de Bax. Por la técnica de TURNEL detectaron la fragmentación del ADN, rasgo característico de apoptosis, con concentraciones superiores a 8  $\mu\text{M}$  ( $\text{CI}_{50}$  de 15  $\mu\text{M}$ ). Después de 24 horas de exposición detectaron a 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$  la activación de caspasa 8 (vía extrínseca), caspasa 9 (vía intrínseca) y caspasa 3 (vía de ejecución).

Chen y Shaikh (2009) estudiaron el efecto apoptótico del  $\text{CdCl}_2$  en una línea celular de riñón de rata comprobando por citometría de flujo que el porcentaje de células apoptóticas aumentaba con el tiempo de tratamiento y la concentración, siendo de un 60% con una dosis de 20  $\mu\text{M}$  tras 24 horas.

Son *et al.* (2010), comprobaron que los resultados obtenidos por su estudio tras el tratamiento con 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de cromato de sodio de células de epidermis de ratón (JB6Cl41) mostraban un aumento de las células en la fase G1 del ciclo celular, lo que identificaron con células apoptóticas. Además cuando las células fueron expuestas a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  el 40% de la población mostró por citometría de flujo fluorescencia para anexina frente a una baja cantidad de yoduro de propidio.

Banu *et al.* (2011), estudiaron los efectos del dicromato de potasio en cultivos primarios de células granulosas de ovario de rata. Tras un tratamiento con una concentración de 10  $\mu\text{M}$  durante 12 o 24 horas encontraron las siguientes evidencias de muerte celular por apoptosis: fragmentación del ADN y aumento de la apoptosis de forma dependiente con el tiempo (12 horas 25% de apoptosis y 24 horas 50% de apoptosis); aumento de la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citosol; infraexpresión de Bcl-2, Bcl-XL, HSP70, HSP90 (genes anti-apoptóticos); supraexpresión de BAX, BAD (genes pro-apoptóticos); translocación de Bcl-2, Bcl-XL, BAX, BAD, HSP70 y HSP90 a la mitocondria y activación de caspasa-3 y PARP.

Delgado, Vera y Arenas (2013) evidenciaron diferentes efectos del  $\text{Cr}^{+6}$  en hepatocitos de rata. La proteína p53 se evidenció a partir de una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de cromo (VI) incrementándose esta expresión a mayor concentración del metal y se observó la fragmentación del ADN a partir de concentraciones de 20  $\mu\text{M}$  de cromo (VI) de forma dependiente con la concentración (10, 20, 50 y 100  $\mu\text{M}$  durante 24 horas).

Guo *et al.* (2014), demostraron que la concentración óptima que induce apoptosis en células de feocromocitoma de rata (PC12) se encuentra en torno a 10  $\mu\text{M}$  confirmado por los niveles de expresión de los genes Bax y Bcl-2, pudiendo las células afectadas propagar daños a las células vecinas. El análisis por citometría de flujo reveló que el porcentaje de apoptosis en la población de células PC12 sin tratar era de  $0.40\% \pm 0.46\%$ , siendo significativamente más altos los porcentajes después del tratamiento con 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  de acetato de plomo ( $1,33\% \pm 0,42\%$ ,  $5,40\% \pm 0,51\%$ ,  $38,33\% \pm 3,06\%$  y  $46,67\% \pm 4,51\%$ , respectivamente). Los porcentajes de apoptosis en los grupos de 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  no eran significativamente diferentes. Sin embargo,  $18,67\% \pm 2,08\%$  de las células murieron en la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , mientras que un menor porcentaje de células ( $9,97\% \pm 1,95\%$ ) murieron en el grupo de 10  $\mu\text{M}$ . Los porcentajes de apoptosis y células muertas en el grupo de 10  $\mu\text{M}$  fueron de  $48,3\% \pm 4,59\%$ , mientras que se elevó significativamente a  $65,33\% \pm 4,62\%$  en el grupo de 100  $\mu\text{M}$ .

Baroni *et al.* (2015), señalaron los efectos del Cd sobre células epiteliales de bronquio humano (BEAS-2B) manifestando que una concentración de 10  $\mu\text{M}$  no mostraba diferencias significativas con respecto a la población control cuando estudiaron los efectos apoptóticos mediante citometría de flujo (ensayo anexina/IP). Sin embargo, una concentración de 20  $\mu\text{M}$  provocó una disminución del 33% de la viabilidad, un aumento del 52% de apoptosis temprana, un aumento de 30% de apoptosis tardía y un aumento de necrosis del 25%.

Recientemente Skipper, Sims, Yedjou y Tchounwou (2016) determinaron el porcentaje de apoptosis mediante citometría de flujo (ensayo anexina-V/IP) en células de cáncer hepático con diferentes dosis de cloruro de cadmio tras 48 horas de tratamiento. Los resultados mostraron que el % de apoptosis aumentaba de forma dependiente con la concentración, manifestando un aumento gradual de células

positivas a anexina (para 0  $\mu\text{g/ml}$ ,  $10,3\pm 3,2\%$  de anexina/IP; 1  $\mu\text{g/ml}$ ,  $14,4\pm 5,6\%$ ; 2  $\mu\text{g/ml}$ ,  $21,4\pm 4,6\%$ ; 3  $\mu\text{g/ml}$ ,  $30,5\pm 2,8\%$ ; 4  $\mu\text{g/ml}$ ,  $43,2\pm 7,5\%$  y 5  $\mu\text{g/ml}$ ,  $52,5\pm 9,4\%$ ).

En la siguiente tabla se recogen algunos de los estudios realizados sobre metales y sus efectos apoptóticos.

**Tabla 14.** Estudios sobre apoptosis realizados por diferentes autores

Autores	Elementos o compuestos	Células	Efectos
El Azzouzi <i>et al.</i> , 1994	Cd	Células humanas CEM-C12	Dosis bajas muerte por apoptosis y dosis altas muerte por necrosis
Matsuoka y Call, 1995	$\text{CdCl}_2$	Línea celular LLC-PK1	Disminución de la viabilidad y fragmentación del ADN
Rajaram, Nair y Ramasari, 1995	Complejos de cromo III y $\text{K}_2\text{CrO}_7$	Linfocitos humanos	Condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo
Schedle <i>et al.</i> , 1995	Ag, Au, Co, Cr, Cu, Ga, In, Mo, Ni, Pd, Pt, Sn y Zn	Fibroblastos L-929, fibroblastos humanos gingivales y células cebadas de tejido humano	Efectos citopatógenos: aparece necrosis y no apoptosis
Hamada <i>et al.</i> , 1996	$\text{CdCl}_2$	Células transformadas de riñón humano (293)	Estudio de apoptosis por MET (cromatina periférica agregada y bulosidad y fragmentación nuclear), electroforesis y ensayo ELISA
Oberto <i>et al.</i> , 1996	$\text{Pb}^{+2}$	Células de cerebelo de rata	Bajas dosis de plomo provocan efectos apoptóticos (condensación de la cromatina, fragmentación del ADN,...)
Blankenship <i>et al.</i> , 1997	$\text{PbCrO}_4$ y $\text{Na}_2\text{CrO}_4$	Células de ovario de hámster chino (CHO-AA8)	Morfología apoptótica y fragmentación del ADN internucleosomal
Ishido, Homma-Takeda, Tohyama y Suzuki, 1998	$\text{CdCl}_2$	Células epiteliales renales LLC-PK1	Fragmentación del ADN presente 12 horas después de la inyección de 0.15 mg/kg de Cd-metalotioneína y condensación de la cromatina
Singh <i>et al.</i> , 1999	$\text{PbCrO}_7$ y $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Células normales de pulmón humano (HSAE)	Sugieren la apoptosis como mecanismo de eliminación de células con ADN dañado por Cr o Pb.
Wei <i>et al.</i> , 2001	$\text{SeO}_2$	Líneas celulares hepáticas humanas (HL-7702 y SMMC-7721)	Apoptosis tras 48 horas de tratamiento
Vasant <i>et al.</i> , 2003	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Linfocitos de sangre periférica humana	Activación de vías de apoptosis: activa las proteínas p56 <sup>lck</sup> , p59 <sup>lyn</sup>

			y p56/53 <sup>lyn</sup> que activan a su vez la caspasa-3
Oh, Lee y Lim, 2006	Cd (Ac) <sub>2</sub>	Fibroblastos epiteliales de pulmón (WI 38)	Fragmentación del ADN y condensación de la cromatina (ensayo de TUNEL)
Oh y Lim, 2006	Cd	Células hepáticas HepG2	Activación de apoptosis mediante vía extrínseca e intrínseca
Pathak y Khandelwal, 2006	Cd	Linfocitos de ratón	Inducción de apoptosis por producción de ROS
Rooprai <i>et al.</i> , 2007	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Células de glioma humano (IPSB-18)	Apoptosis por citometría de flujo por aumento de la fase G1 con un tratamiento de 10 µg/ml durante 24 horas
Chen y Shaikh, 2009	CdCl <sub>2</sub>	Células de riñón de rata (NRK-52E)	Aumento de la apoptosis con la concentración y el tiempo de exposición
Son <i>et al.</i> , 2010	Na <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Línea celular de epidermis de ratón (JB6Cl41)	Predominio de apoptosis como tipo de muerte celular
Xie <i>et al.</i> , 2010	CdCl <sub>2</sub>	Células de hígado humano HL-7702, normales y células tumorales Raji	Aumento de la concentración de Ca intracelular
Banu <i>et al.</i> , 2011	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Cultivos primarios de células de la granulosa de ratas	Ensayo de TUNEL apoptosis por fragmentación celular
Delgado, Vera y Arenas, 2013	Cr (VI)	Hepatocitos murinos	Incremento de la expresión de la proteína p53 e inducción de muerte celular por apoptosis
Guo <i>et al.</i> , 2014	Acetato de plomo	Células de feocromocitoma de rata (PC12)	Generación de ROS intracelular y colapso del potencial de membrana mitocondrial
Baroni <i>et al.</i> , 2015	Cd	Células epiteliales de bronquio humano (BEAS-2B)	Producción de apoptosis por citometría de flujo (ensayo anexina/IP)
Skipper <i>et al.</i> , 2016	CdCl <sub>2</sub>	Células de cáncer de hígado humano (HepG2)	ROS produce genotoxicidad, citotoxicidad y apoptosis

## II.12.5. ESTRÉS OXIDATIVO

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden estar implicadas en distintos procesos celulares: producidas por la irradiación con rayos UV, X o gamma; productos de reacciones catalizadas por metales; contaminantes atmosféricos; producidos por neutrófilos o macrófagos durante la inflamación; subproductos de las reacciones en las cadenas de transporte de las mitocondrias y otros mecanismos (Cadenas, 1989).

El cadmio en sí es incapaz de generar radicales libres directamente, sin embargo, si se ha demostrado la generación indirecta de diversos radicales como superóxido, óxido nítrico e hidroxilo (Galán *et al.*, 2001). Algunos ensayos también confirmaron la generación de peróxido de hidrógeno, que a su vez puede ser una fuente importante de radicales a través de reacciones Fenton (Watanabe, Henmi, Ogawa y Suzuki, 2003). Hace algunos años se presentó un mecanismo para explicar el papel indirecto del cadmio en la generación de radicales libres, que proponía que el cadmio puede reemplazar el hierro y el cobre en diversas proteínas citoplasmáticas y de membrana (por ejemplo, ferritina, apoferritina), aumentando así la cantidad de iones de cobre y hierro libres que producen por reacciones Fenton estrés oxidativo (Price, Joshi y Ferritin, 1983; Casalino, Sblano y Landriscina, 1997). Similares hallazgos han sido presentados posteriormente (Watjen y Beyersmann, 2004).

Yang, Shen, Shen, Zhuang y Ong (1997) mostraron un aumento en la producción de ROS de forma dependiente con la concentración de cadmio en fibroblastos fetales de pulmón (MRC-5). Con 30 minutos de tratamiento la intensidad de la fluorescencia (DCFH-DA por citometría de flujo) en células tratadas era significativamente superior a las células control. Tras 4 horas de exposición al tóxico (35  $\mu\text{M}$  de cadmio) se observa un aumento de la absorbancia próximo al 100%. Posteriormente comprobaron que cuando las células eran tratadas con catalasa, la absorbancia era significativamente menor que en las células control.

Yang, Chiu, Lin y Lin (2004) investigaron la correlación entre la producción de ROS y la detección del ciclo celular en la fase G2/M tras introducir dos concentraciones de cadmio (1 o 4 mM) en células CHO-K1 midiendo los niveles de ROS por citometría de flujo (DCFH-DA). ROS aumentó notablemente a las 8 h tras recibir 4  $\mu\text{M}$ , y aumentó aún más con el tiempo. Sin embargo, el nivel de ROS en células tratadas con 1  $\mu\text{M}$  no aumentó hasta 24 h después. También añadieron a las células antioxidantes, tales como BHA (butilado hidroxianisol), manitol o catalasa, junto con 1  $\mu\text{M}$  de Cd durante 24 h. Los niveles de ROS se redujeron significativamente por los tratamientos aunque la catalasa no era tan eficaz como los otros dos antioxidantes. Sin embargo, la reducción de ROS no evitó la detección del ciclo celular en la fase G2/M demostrándose de esta forma que la presencia de ROS no está asociada con la detención del ciclo celular.

Oh, Lee y Lim (2004) comprobaron la producción de ROS en fibroblastos de pulmón (WI 38) tras la exposición a 40  $\mu\text{M}$  de cadmio durante diferentes tiempos mostrando un aumento a partir de 6 horas de exposición, una concentración máxima a las 24 horas y un descenso tras 36 horas. También relacionaron la producción de ROS con una disminución del potencial de membrana mitocondrial.

Oh y Lim (2006) para determinar el papel de ROS en la inducción de apoptosis producida por el cadmio expusieron las células HepG2 a 16  $\mu\text{M}$  de cadmio durante 0,5, 1, 1,5, 3, 6, 12 y 24 horas por citometría de flujo utilizando DCFH-DA observando un aumento en la producción de ROS a partir de 0,5 horas, alcanzando su punto máximo a 3 horas y cayendo por debajo del control a las 24 horas.

Pathak y Khandelwal (2006) estudiaron la producción de ROS y la inducción de apoptosis en linfocitos de ratón con diferentes concentraciones de cadmio. Tras 1 hora a concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{M}$  detectaron un aumento significativo de ROS que se mantiene hasta las 6 horas y anterior a la disminución del potencial de membrana, por lo que sugiere la participación de ROS como causante del daño de la membrana mitocondrial (marcador de apoptosis). Sin embargo a las 18 horas, cuando causa un daño drástico sobre el ADN, la fluorescencia medida por citometría de flujo (DCFH-DA) disminuyó.

Chen y Shaikh (2009) observaron un aumento de la producción de ROS dependiente de la concentración. Introdujeron concentraciones entre 5 y 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  en una línea celular de riñón de rata (NRK-52E) durante 5 horas observando un aumento de la producción de hasta 2,9 veces para 20  $\mu\text{M}$ . Zhang *et al.* (2015) comprobaron el efecto de puntos cuánticos de telururo de cadmio (TeCD QDs) en células hepáticas de ratón (AML12). De la misma forma, observaron también un aumento de la generación de ROS de manera dependiente con la concentración, mostrando un aumento de la fluorescencia (DCFH-DA) que se hace máximo a una concentración de 40 mg/ml tras 24 horas de exposición (13 veces superior al control).

Curcic *et al.* (2014), comprobaron el efecto en la producción de ROS en una línea celular de carcinoma de colon humano (SW 480) tras 72 horas de exposición a cadmio, comprobando que la concentración más baja (22,67  $\mu\text{M}$ ) mostraba niveles ligeramente inferiores al control mientras que la concentración más alta (134  $\mu\text{M}$ ) incrementaba los niveles de ROS un 30% con respecto al control.

Skipper *et al.* (2016), para medir la producción de ROS emplearon un ensayo de hidroxidación lipídica mostrando un aumento de los niveles de hidroperóxido, un producto principal de la degradación de fosfolípidos y glicolípidos insaturados.

Al igual que en otros metales, tales como el arsénico, el cadmio y el mercurio, el plomo daña los componentes celulares produciendo estrés oxidativo (Jomova y Valko, 2011). El efecto patogénico del plomo es multifactorial ya que interrumpe directamente la actividad de las enzimas, inhibe la absorción de minerales importantes y desactiva las reservas sulfhidrilo antioxidantes (Patrick, 2006). El daño mediante radicales libres inducidos por el plomo se produce mediante dos mecanismos independientes pero relacionados (Ercal, Gurer-Orhan y Aykin-Burns, 2001). El primero consiste en la formación directa de oxígeno, como el oxígeno singlete, peróxidos e hidroperóxidos de hidrógeno y el segundo mecanismo provoca el agotamiento de la reserva antioxidante celular. Existen interrelaciones entre estos dos mecanismos por los que el aumento de ROS por un lado, conduce simultáneamente a la depleción de grupos antioxidantes por el otro (Gurer y Ercal, 2000).

Igual que en el caso del cadmio, existen estudios que muestran un aumento significativo de la fluorescencia (DCFH-DA por citometría de flujo) después de tratamientos con plomo. Li *et al.*, (2016) comprobaron que en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) una concentración de 125  $\mu\text{M}$  de acetato de plomo provocaba un aumento en la producción de ROS (medido con DCFH-DA por citometría de flujo) de una forma dependiente hasta las 8 horas (1,6 veces con respecto al control) y un descenso entre las 8 horas y las 24 horas.

Su *et al.* (2016) corroboraron el efecto que provocaba una concentración de 30  $\mu\text{M}$  de acetato de plomo tras 24 horas en células PC12 provocando el aumento de la fluorescencia y por tanto de ROS (1,5 veces) con respecto al control. Anteriormente, Penugonda *et al.*, (2006) demostraron efectos similares en dicha línea celular con una concentración de 100  $\mu\text{M}$ .

El cromo es absorbido por la célula mediante fagocitosis. Una vez dentro de la célula los cromatos pueden generar ROS (Liu y Shi, 2001) causando una gran variedad de lesiones en el ADN, que incluyen aductos de Cr-ADN, enlaces cruzados entre proteínas y ADN, entrecruzamientos de ADN-ADN y daño oxidativo. Dentro de la célula, el glutatión forma rápidamente un complejo con el Cr (VI) seguida de una lenta



reducción para producir Cr (V) que puede alterar la conformación del ADN. Una vez formado el Cr (V) puede reaccionar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la reacción de Fenton formando un radical hidroxilo capaz de producir daño sobre el ADN (Kasprzak, 2002).

Ciapetti *et al.* (1998) realizaron un estudio para comprobar la producción de ROS por varios metales (Cr, Co, Ni, Ti, Al, V y Mo) utilizados en dispositivos ortopédicos mediante citometría de flujo (DCFH-DA). Los resultados para el Cr, Ni y Ti no diferían con respecto al control.

Pourahmad, O'Brien, Jokar y Daraei (2003) estudiaron la citotoxicidad y la producción de ROS para diferentes metales en cultivos primarios de hepatocitos de rata. Para el caso del CdCl<sub>2</sub> tras la introducción de 20 μM (DL<sub>50</sub>) produjo una absorbancia (CDFH-DA por espectrofotometría) de 322±11 unidades de intensidad de fluorescencia tras 15 minutos de exposición y de 412±9 tras dos horas. Mientras que para el caso del K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> tras la introducción de 1mM (DL<sub>50</sub>), la absorbancia fue de 508±7 tras 15 minutos y de 502±6 tras 2 horas, siendo todas superiores a la muestra control (78±5). Los autores también indican que la formación de ROS se produce en los lisosomas para el cromo, mientras que para el cadmio se produce en las mitocondrias.

Vasant, Rajaram y Ramasami (2003) observaron un aumento dependiente con el tiempo en la fluorescencia (DCFH-DA por citometría de flujo) tras el tratamiento de linfocitos humanos. Tras un periodo de 3 horas con una concentración de 5 μM de dicromato de potasio, la fluorescencia alcanza un 95% con respecto al 30% del control. De igual forma, Son *et al.*, (2010) tras el tratamiento con 1, 5 y 10 μM con cromato de sodio de células de epidermis de ratón mostraron un aumento de la fluorescencia dependiente del tiempo.

La toxicidad de metales pesados como mercurio, plomo, cadmio, plata y otros metales potencialmente tóxicos, tales como hierro y cobre, junto con los no metales arsénico y selenio, comparten en parte al menos una interacción común en los sistemas biológicos, la generación del anión superóxido (Stohs y Bagchi, 1995; Spalholz y Hoffman, 2002). Esto es la causa común del inicio del proceso de toxicidad debido a la interacción con grupos tioles en los mamíferos (Klaassen, 2008) y en las aves (Hoffman y Heinz, 1998). La reacción con tioles podría alterar la actividad

de diferentes enzimas esenciales que contienen grupos sulfhidrilo, así como proteínas estructurales dentro del organismo. Sin embargo, en la reacción con tioles estos elementos también parecen generar radicales libres, superóxido inicialmente y precipitar la generación de otras especies reactivas de oxígeno (Xu, Feng y Yi, 1991 y Spallholz, 1994). De los elementos mencionados anteriormente, el selenio es el más tóxico para los sistemas vivos, dependiendo de la forma química ingerido (Stewart, Neldner, Spallholz y Pence, 1999). El selenio, clasificado como un no metal tiene exquisitas propiedades metálicas que pueden sufrir reacciones redox fáciles con tioles. En esto radica la explicación general de la toxicidad del selenio. Es un catalizador oxidante de primera orden en el estado de oxidación de seleniuro capaz de oxidar continuamente tioles tales como glutatión (GSH) y reducir el oxígeno produciendo el radical libre, superóxido (Xu *et al.*, 1991).

Misra y Niyogi (2009) comprobaron la producción de ROS provocada por el selenito de sodio a diferentes concentraciones en cultivos primarios de hepatocitos de trucha arcoíris mostrando que la intensidad de la fluorescencia (DCFH-DA por microscopía confocal) aumenta de forma dependiente con la concentración hasta 100  $\mu\text{M}$  (50  $\mu\text{M}$ , 1,2 veces superior al control y 100  $\mu\text{M}$ , 1,3 veces).

Jamwal, Naderi y Niyogi (2016) comprobaron como el selenio a bajas concentraciones en forma de selenito o selenometionéina (25  $\mu\text{M}$ ) induce una disminución del estrés oxidativo provocado por el cloruro de cadmio produciendo un aumento de la respuesta antioxidante celular. Sin embargo, concentraciones de selenio superiores ( $\geq 50 \mu\text{M}$ ) no tenían ningún efecto protector frente al cadmio.

**Tabla 15.** Diversos estudios de determinación de ROS realizados por diferentes autores

Autores	Elementos o compuestos	Células	Efectos
Yang <i>et al.</i> , 1997	Cadmio	Fibroblastos de pulmón fetal humano (MRC-5 células)	Producción de ROS y efecto protector de la catalasa provocando una disminución de la absorbancia
Ciapetti <i>et al.</i> , 1998	Cr	Leucocitos polimorfonucleares (PMNs)	No observaron diferencias con respecto al control en la producción de ROS
Bagchi, Bagchi y Stohs, 2001	$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Células de leucemia mielógena crónica humana (K562) y macrófagos murinos (J774A)	El Cr induce la producción de ROS, daño tisular y daño oxidativo del ADN
Bagchi, Stohs, Downs, Bagchi y	Cr	Células K562 y J774A	Incremento de la producción de ROS, peroxidación lipídica,

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Preuss, 2002			fragmentación del ADN y apoptosis
Pourahmad <i>et al.</i> , 2003	CdCl <sub>2</sub> y K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Hepatocitos de rata	Producción de ROS dependiente de la concentración
Vasant, Rajaram y Ramasami, 2003	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Linfocitos humanos	Producción de ROS dependiente de la concentración
Oh, Lee y Lim, 2004	Cd	Fibroblastos epiteliales de pulmón	Máxima producción de ROS tras 24 horas de exposición
Yang <i>et al.</i> , 2004	Cd	Células de ovario de hámster chino (CHO K1)	Correlación entre la producción de ROS y la detección del ciclo celular en la fase G2/M
Quintanar-Escorza, González-Martínez, del Pilar y Calderón-Salinas, 2010	Pb	Eritrocitos humanos	Incremento del calcio intracelular libre, aumento del daño oxidativo y disminuye la actividad de la ATPasa
Oh y Lim, 2006	Cd	Células hepáticas HepG2	La generación de ROS produce apoptosis
Penugonda <i>et al.</i> , 2006	Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Línea celular de feocromocitoma de la médula suprarrenal de rata (PC12)	Protección de NACA (derivado de la N-acetilcisteína amida) frente a la producción de ROS provocada por Pb
Pathak y Khandelwal, 2006	Cd	Linfocitos de ratón	La generación de ROS produce apoptosis
Misra y Niyogi, 2009	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Hepatocitos de trucha arcoíris	Aumento de la producción de ROS de forma dependiente con la concentración
Zhang <i>et al.</i> , 2015	Teleruro de cadmio mediante puntos cuánticos	Células de hígado de ratón (AML12)	Aumento de la concentración de ROS dependiente de la concentración de Cd
Jamwal, Naderi y Niyogi, 2016	CdCl <sub>2</sub>	Cultivos primarios de hepatocitos de trucha arco iris	A bajas concentraciones SeO <sub>3</sub> y SeMet disminuye la producción de ROS provocada por el Cd
Li <i>et al.</i> , 2016	Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Neuroblastoma humano (SH-SY5Y)	Efecto protector de la enzima hemo oxigenasa-1 (HO-1) frente al estrés oxidativo provocado por Pb
Skipper <i>et al.</i> , 2016	CdCl <sub>2</sub>	Células de cáncer de hígado humano (HepG2)	Aumento de niveles de hidroperóxido
Su <i>et al.</i> , 2016	Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Células PC12	Efecto protector de la genisteína (isoflavonoides derivados de la soja) contra la producción de ROS provocada por Pb





## MATERIALES Y MÉTODOS

**III. MATERIALES Y MÉTODOS****III. 1. INTRODUCCIÓN: METALES EMPLEADOS**

Los metales tóxicos cuyos efectos hemos analizado a nivel celular son el cadmio, el plomo, el cromo y el selenio.

Las concentraciones utilizadas proceden de mediciones obtenidas a partir de individuos adultos (12), juveniles (5) y pollos (15) de *Pygoscelis antarctica* o pingüino barbijo, *Pygoscelis papua* o pingüino papúa y *Pygoscelis adeliae* o pingüino de Adelia. Dichas concentraciones en riñón oscilan entre 387,756 ppm – 0,036 ppm para el cadmio, 0,328 ppm- 0,001 ppm para el plomo, 98,821 ppm – 2,626 ppm para el selenio y 1,387 ppm – 0,102 ppm para el cromo. Para hígado las concentraciones oscilan entre 40,012 ppm – 0,002 ppm para el cadmio, 0,207 ppm – 0,001 ppm de plomo, 0,755 ppm – 0,073 ppm para el cromo y 32,875 ppm – 2,509 ppm de selenio. Dichas concentraciones fueron transformadas a concentraciones milimolares (mM) e introducidas en cultivo celular en una concentración entre 100-10 mM y 0,001 mM, utilizando cloruro de cadmio, nitrato de plomo, trióxido de cromo y tetracloruro de selenio.

**Tabla 16.** Concentraciones máximas y mínimas encontradas en riñón y su equivalencia para las diferentes sales.

Concentraciones en riñón (ppm)		Concentraciones sales en línea celular VERO (mM)	
Máxima	Mínima	Máxima	Mínima
Cadmio		Cloruro de cadmio	
387,756	0,036	3,45	$3,2 \cdot 10^{-4}$
Plomo		Nitrato de plomo	
0,328	0,001	$1,58 \cdot 10^{-3}$	$4,826 \cdot 10^{-6}$
Cromo		Óxido de cromo (VI)	
1,387	0,102	0,026	$1,96 \cdot 10^{-3}$
Selenio		Cloruro de selenio (IV)	
98,821	2,626	1,25	$3,325 \cdot 10^{-2}$

**Tabla 17.** Concentraciones máximas y mínimas encontradas en hígado y su equivalencia para las diferentes sales.

Concentraciones en hígado (ppm)		Concentraciones sales en línea celular AML12 (mM)	
Máxima	Mínima	Máxima	Mínima
Cadmio		Cloruro de cadmio	
40,012	0,002	0,355	$1,779 \cdot 10^{-5}$
Plomo		Nitrato de plomo	
0,207	0,001	$9,99 \cdot 10^{-4}$	$4,826 \cdot 10^{-6}$
Cromo		Óxido de cromo (VI)	
2,555	0,073	0,049	$1,4 \cdot 10^{-4}$
Selenio		Cloruro de selenio (IV)	
32,875	2,509	0,416	0,031

**Tabla 18.** Concentraciones medias en individuos adultos, juveniles y pollos. \* Niveles no detectables.

	Concentraciones medias			
	Riñón (ppm)	Hígado (ppm)	Línea celular VERO (mM)	Línea celular AML12 (mM)
	Cadmio		Cloruro de cadmio	
Adultos	154,074	13,511	1,37	0,12
Juveniles	1,368	0,355	0,012	$3,15 \cdot 10^{-3}$
Pollos	0,312	0,082	0,0027	$7,3 \cdot 10^{-4}$
	Plomo		Nitrato de plomo	
Adultos	0,151	0,085	$7,24 \cdot 10^{-4}$	$4,34 \cdot 10^{-4}$
Juveniles	*	*	*	*
Pollos	0,095	0,113	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$5,76 \cdot 10^{-4}$
	Cromo		Óxido de cromo (VI)	
Adultos	0,259	0,3	0,005	0,006
Juveniles	0,526	0,407	0,1	$8,2 \cdot 10^{-3}$
Pollos	0,390	0,470	0,0075	$9,5 \cdot 10^{-3}$
	Selenio		Cloruro de selenio (IV)	
Adultos	35,511	10,127	0,45	0,09
Juveniles	11,572	10,189	0,145	0,09
Pollos	7,799	7,299	0,098	0,064

### III. 2. MATERIAL DE TRABAJO

Todos los ensayos experimentales se llevaron a cabo en la Sección de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Murcia (Servicio de Apoyo a la Investigación, SAI edificio del Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales, SACE).

#### III.2.1. LÍNEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO

Entre las líneas celulares más utilizadas se encuentran las células de riñón de mono verde africano, VERO (Acevedo Fernández *et al.*, 2013). En este estudio se ha añadido también una segunda línea de origen hepático, AML12, para poder evaluar la citotoxicidad de las concentraciones encontradas en hígado.

Por lo tanto, las líneas utilizadas en el presente estudio son hepatocitos y células epiteliales de riñón, procedentes de mamíferos. No se pudo trabajar con células procedentes de pingüinos, ya que éstos están en peligro de extinción y por tanto no se pueden destinar a investigación. Por otro lado tampoco existen líneas celulares estables hepáticas o renales de aves, ya que en la colección americana (ATCC) solo hay mioblastos de fibrosarcoma de codorniz japonesa, mientras que en la colección europea (ECACC) no hay células de aves, siendo estas dos las colecciones más importantes y de referencia. Además tampoco se han encontrado células aviares en Interlab cell line collection (ICLC), en Cell Bank Australia y ThermoFisher Scientific.

Cuando las células se adaptan a un ambiente *in vitro*, éstas sufren modificaciones con respecto a su estado *in vivo*, por lo que un ensayo *in vitro* nunca reproducirá al 100% las condiciones *in vivo*, aunque sí muestra resultados a nivel celular muy extrapolables a una situación *in vivo* (Freshney, 2010). Por otro lado, la estructura y función hepática en aves y mamíferos es prácticamente idéntica, realizando los hepatocitos las mismas funciones y presentando las mismas características citológicas (Lumeij, 1994). Con respecto a las células renales, si bien los riñones aviares presentan algunas nefronas con peculiaridades que difieren de los mamíferos (nefronas reptilianas), también presentan nefronas con estructura idéntica a éstos (nefronas mamífero), siendo las células epiteliales presentes en corteza y médula renal muy similares a las de mamíferos (Lumeij, 1994b; Latimer y Rakich, 2007).

Teniendo en cuenta las similitudes celulares entre este tipo de células de aves y mamíferos, así como las posibles adaptaciones a un ambiente *in vitro*, decidimos utilizar las líneas estables AML12 y VERO ya caracterizadas y presentes en el Servicio de Cultivos Celulares de la Universidad de Murcia.

Las líneas celulares empleadas han sido adquiridas de colecciones acreditadas a nivel internacional (ATCC). Para nuestro estudio hemos utilizado dos tipos de líneas celulares:

- Vero (ATCC<sup>®</sup> CCL-81<sup>™</sup>). Dicha línea celular es de morfología fibroblástica procedente de riñón de *Chlorocebus sabeaus* (mono verde africano). Fue obtenida en 1962 por Yasumura y Kawakita en la Universidad de Chiba (Japón), empleada en multitud de estudios de cultivos celulares *in vitro*. El medio de cultivo utilizado fue DMEM (DULBECCO MEM).

- AML12 (ATCC<sup>®</sup> CRL-2254<sup>™</sup>). Es una línea de hepatocitos no transformada con morfología epitelial, que procede de hígados de ratones transgénicos (*Mus musculus*) establecida en 1993 por Wu, Merlino y Fausto. El medio de cultivo empleado es una mezcla de DMEM y F-12 (1:1).

### III.2.2. REACTIVOS

#### III.2.2.1. Metales

Los cultivos fueron tratados con los siguientes compuestos:



- Cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) en forma de sal fina de color blanco, siendo su peso molecular 183,32 g/mol (Sigma-Aldrich®).
- Nitrato de plomo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) en forma de sal fina de mayor tamaño de grano, siendo su peso molecular 331,21 g/mol (Panreac Applichem®).
- Óxido de cromo (VI) ( $\text{CrO}_3$ ) en forma de láminas cuarteadas de color cobrizo y con una masa molecular de 100,01 g/mol (Merck KGaA®).
- Cloruro de selenio (IV) ( $\text{SeCl}_4$ ) en forma de sal de color amarillento y con un peso molecular de 78,96 g/mol (Sigma-Aldrich®).

Para que no se produzca la precipitación de las sales, se diluyen con agua purificada y estéril (MilliQ), obteniéndose las concentraciones de ensayo diluidas en el medio de cultivo suplementado con suero SFB. Dicha disolución se lleva a cabo 24 horas antes del inicio del ensayo citotóxico, manteniéndola previamente a 4°C.

#### III.2.2.2. Ensayo MTT

Para evaluar la citotoxicidad por colorimetría se utilizaron los siguientes reactivos:

- MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma-USA) con una concentración de 5mg/ml. Se presenta en forma de polvo amarillento con un peso molecular de 414,3 g/mol. Se mantiene almacenado a 4°C en condiciones de oscuridad. Para su utilización en los diferentes ensayos se preparó en DMEM o DMEM/F-12 (sin rojo fenol porque causaría interferencias en la lectura) junto con glutamina 2mM y piruvato. Después se filtra con un filtro 0,22  $\mu\text{m}$  para esterilizar o eliminar los residuos insolubles. Esta dilución se mantiene a 4°C en oscuridad hasta su uso.
- DMSO (dimetilsulfóxido) (Serva-Alemania) con un peso molecular de 78,13 g/mol y densidad de 1,1 g/l. Se conserva a temperatura ambiente.

#### III.2.2.3. Viabilidad celular

Para comprobar la viabilidad celular mediante un contador automático se empleó:

- Azul de tripán. El azul Tripano (Sigma) es un colorante vital que tiñe las células muertas, mientras que es excluido totalmente de células vivas. Esta cualidad es la base de este método colorimétrico cuantitativo, que permite medir tanto la viabilidad como la densidad celular.

### III.2.2.4. Test de micoplasmas

Para realizar el test de micoplasmas se utilizaron los siguientes reactivos:

- Fijador de Carnoy (metanol absoluto: ácido acético glacial 3:1).
- Solución colorante Hoechst 33258: bis-benzimidazol entre 0,05 y 0,5  $\mu\text{g/ml}$  en solución de Hank (preparamos una solución 10x del colorante y se diluye 1x en Hank's cuando se va a realizar la tinción). El colorante Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) es capaz de teñir el ADN de células vivas puesto que es permeable a la membrana celular y tiñe el ADN intercalándose en las regiones ricas en adenina y timina.

### III.2.2.5. Ciclo celular por citometría de flujo

Para medir las variaciones en el ciclo celular de las células se utilizaron los siguientes reactivos:

- Ioduro de propidio (IP) ( $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{I}_2$ ): Fluorocromo utilizado para medir la muestra. Detecta la presencia de células necróticas.
- ARNasa: Sirve para eliminar el ARN de doble cadena del citoplasma, evitando las interferencias en la medición.

### III.2.2.6. Apoptosis por citometría de flujo y microscopio de fluorescencia

Para analizar si las diferentes concentraciones en los distintos tóxicos producen necrosis o apoptosis se empleó un kit de anexina (Annexin-V-Fluos satining kit, Roche<sup>®</sup>) que contiene:

- Annexin-V-Fluoresceína (110 $\mu\text{l}$ ).
- Ioduro de propidio (150  $\mu\text{l}$ ).
- Hepes (50 ml).

### III.2.2.7. Microscopio electrónico de transmisión

Para llevar a cabo el estudio morfológico de las células en microscopio electrónico fueron necesarios los siguientes productos:

- Glutaraldehído para la fijación y tetróxido de osmio para la postfijación de las células.
- Acetato de uranilo. Este compuesto estabiliza el material nuclear y los fosfolípidos y aumenta el contraste.
- Alcohol y óxido de propileno para deshidratar la muestra.
- Resina epoxídica para la inclusión o impregnación.
- Citrato de plomo.

### III.2.2.8. Ensayo estrés oxidativo por citometría de flujo

Para analizar la cantidad de especies reactivas de oxígeno producida por los diferentes tóxicos empleamos la sonda 2,7-Diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) que en presencia de ROS se oxida a 2,7-Diclorofluoresceína (DCF) emitiendo fluorescencia en FL-1.

### III.2.2.9. Expresión génica

- Realizar la extracción de ARN: Kit de Qiagen RNeasy purification kit<sup>®</sup>.
- Determinar concentración y pureza de ARN: espectrofotómetro nanodrop2000 thermofisher.
- Retrotranscripción (ARN-ADNc): kit iScript CDNA synthesis BioRad<sup>®</sup>.
- PCR: termociclador de tiempo real BioRad IQ5, Kit mix SyBR Green Takara<sup>®</sup> y primers.
- Análisis de datos: técnica  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## III.3. METODOLOGÍA

Nuestro trabajo se centra en el estudio de la viabilidad celular tras la exposición al compuesto mediante el ensayo de MTT, observar los cambios que experimentan las células a nivel morfológico mediante su estudio con microscopio óptico y electrónico, la diferenciación entre células necróticas o apoptóticas mediante los cambios que

experimentan las células en su membrana (anexina/ioduro de propidio), los cambios producidos en el ciclo celular, la variabilidad en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un estudio de la expresión génica experimentada en ambas líneas celulares tras su exposición a los diferentes tóxicos.

Durante todo el estudio las líneas celulares se someten a diferentes procesos, de forma que podamos disponer en todo momento del material necesario para dicho estudio.

Antes de iniciar cualquier operación se acondiciona el puesto de trabajo (cabina de flujo laminar) mediante su limpieza con alcohol etílico 70% y flujo continuo de aire durante 15 minutos. Todo el material necesario para el procedimiento se introduce en la cabina previamente limpiada con etanol (70%).



**Figura 22.** Cabina de flujo laminar vertical.

### III.3.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO COMPLETO PARA LÍNEA CELULAR VERO

Para llevar a cabo este paso seguimos las recomendaciones del órgano institucional del que proceden las líneas celulares y la información procedente de experiencias previas.

En primer lugar es necesario añadir al medio base DMEM, suero fetal bovino (FSC 10% v/v) y glutamina 2 mM. Una vez formado el medio de cultivo para evitar la proliferación de bacterias se añade penicilina (100U/ml) y estreptomicina (100 µl/ml).

### III.3.2. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO COMPLETO PARA LÍNEA CELULAR AML12

Para comenzar se prepara una mezcla de medio de cultivo DMEM y medio de cultivo F-12 HAM (1:1) con glutamina 2,5 mM, HEPES 15mM y piruvato 0,5 mM.

Después se suplementa con FSC (10%), 5 µg/ml de insulina, 5 µg/ml de transferrina, 5 ng/ml de selenio, y 40 ng/ml de dexametasona. Al igual que en el caso anterior también se añade penicilina (100U/ml) y estreptomina (100 µl/ml).

### III.3.3. DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Para proceder a la descongelación se extrae el criotubo del depósito de nitrógeno líquido y de forma inmediata se introduce en un baño térmico a 37°C. Una vez que su contenido se encuentra en estado líquido (3-4 minutos) para diluir el DMSO introducimos la suspensión celular en un tubo de centrifuga de 15 ml junto con 9 ml de medio de cultivo. A continuación se centrifuga (200 xg para la línea celular VERO y 125xg para la línea celular AML12) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después eliminamos el sobrenadante decantando el tubo de centrifuga y se resuspenden las células con 2-3 ml de medio de cultivo fresco. Para completar el proceso tomamos una alícuota (100µl) y se lleva a un vial donde se adiciona la misma cantidad de azul de tripán (dilución 1:1). Para terminar homogeneizamos la mezcla e introducimos 10 µl en una cámara de recuento automático para comprobar el porcentaje de células vivas mediante un contador automático.



**Figura 23.** Centrifugadora

Una vez obtenida la viabilidad celular se procede a la siembra de  $2 \times 10^6$  células en un frasco de  $75 \text{ cm}^2$  (8ml de medio de cultivo fresco y 2ml de la suspensión celular). Después se introducen en un incubador con 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ .

### III.3.4. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR

#### III.3.4.1. Cambios de medio de cultivo

Esta operación se efectúa 48 horas tras la descongelación y siembra y cuando el cultivo esté en un estado de confluencia inferior al 90-95%. Para realizar esta operación de forma correcta decantamos el contenido del frasco de cultivo. Inmediatamente añadiremos 10 ml de medio de cultivo fresco, agitamos suavemente y se observa el estado del cultivo a través del microscopio óptico.

#### III.3.4.2. Pases o subcultivos

Una vez que los cultivos estén cerca del 100% de la confluencia en monocapa procederemos a la recogida de células para utilizarlas, bien con el objetivo de aumentar la población de células (cultivo masivo), o bien para la realización de los ensayos.

Eliminamos el medio de cultivo de la misma forma que en el apartado anterior para lo cual utilizamos una pipeta de 10 ml, aspirando el medio sin tocar la superficie de crecimiento de las células.

A continuación aplicamos un tratamiento enzimático para romper las uniones de las células entre sí y entre éstas y la superficie de cultivo. Para ello se enjuaga el frasco con 3ml de una combinación de tripsina-EDTA (concentración 0,25%-0,1%) y los deseamos de forma que eliminemos los restos de medio de cultivo que hayan podido quedar. A continuación introducimos la misma cantidad de tripsina-EDTA y para facilitar la dispersión celular introducimos el frasco de cultivo en un incubador a 37°C durante 5 minutos. Una vez comprobado el estado del cultivo en el microscopio óptico recogemos la totalidad del contenido del frasco de cultivo mediante una pipeta Pasteur, pasándolo a un tubo de centrifuga, y añadiendo al mismo 6ml de medio de cultivo fresco. Seguidamente centrifugaremos (200xg para línea celular VERO y 125xg para línea celular AML12) a temperatura ambiente durante 10 minutos. En la cabina de flujo eliminamos el sobrenadante y resuspendemos el sedimento en 3ml de medio de cultivo fresco.

#### III.3.4.3. Recuento y estimación de viabilidad

Agitamos la suspensión celular que se encuentra en el tubo de centrifuga de 50 ml y a continuación tomamos una alícuota (100µl) y la llevamos a un tubo Eppendorf adicionando otros 100 µl de azul de tripán. Homogeneizamos la mezcla y con una micropipeta tomamos 10 µl de la mezcla y llenamos la cámara de recuento automático. Para finalizar, comprobamos el porcentaje de células vivas en un contador automático. Podemos seleccionar la opción “ver imagen” para detectar si existen agregados que puedan alterar el resultado del recuento.

Posteriormente añadimos medio de cultivo a un frasco de 75cm<sup>2</sup> y sembramos diferentes densidades de células, de acuerdo con la ficha técnica de la línea celular.



**Figura 24.** Contador automático de células

### III.3.5. CONGELACIÓN DE CÉLULAS

Este proceso se realiza con ambas líneas celulares con la finalidad de tener un stock propio de células para realizar los distintos ensayos citotóxicos.

Utilizamos un cultivo que se encuentre a un 80% de confluencia, asegurándose de que la viabilidad celular es mayor de un 85%.

Ajustamos nuestra concentración de células a entre  $1 \cdot 10^6$  y  $2 \cdot 10^6$  células/ml.

A continuación, preparamos el medio de congelación; como tenemos 3ml de suspensión celular preparamos una solución de 3 ml con medio de cultivo fresco, suero (FSC) al 40% y DMSO al 20%. Para ello, en un tubo de centrifuga de 15 ml introducimos 1,2 ml de medio, 1,2 ml de suero y 0,6 ml de DMSO.

Después mezclamos el medio de congelación con las células en una proporción 1:1, de este modo las células quedan en una concentración  $1 \cdot 10^6$  células/ml, el SBF al 20% y el DMSO al 10%.

Para finalizar llenamos cada criotubo con 1ml de la suspensión anterior obteniendo 6 criotubos/línea celular.



Completamos el proceso colocando los criotubos en un recipiente de metacrilato o poliestireno con alcohol isopropílico a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Estos recipientes garantizan una velocidad de congelación entre 1 y  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Al día siguiente lo trasladamos a un depósito de almacenamiento con nitrógeno líquido.

### III.3.6. DETECCIÓN DE MICOPLASMAS

Mientras que las infecciones bacterianas y fúngicas de los cultivos son relativamente fáciles de detectar, prevenir y tratar, la contaminación por micoplasmas representa un problema mucho mayor en términos de incidencia, detección, prevención, erradicación y efectos. Se ha estimado que entre el 5 y el 35% de los cultivos celulares actualmente en uso están infectados por micoplasmas.

Los micoplasmas pertenecen a la clase *mollicutes*, que actualmente está dividido en tres órdenes (*Mycoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales*). El género micoplasma comprende más de 100 especies conocidas que se subdividen en una multitud de cepas. Se puede considerar que los micoplasmas en los cultivos celulares son parásitos extracelulares generalmente unidos a la superficie externa de la membrana celular. Los micoplasmas tienen un tamaño inferior a 0,2 micras y carecen de pared celular de modo que los antibióticos que interfieren en la formación de mureina de las paredes celulares bacteriana no son eficaces en las concentraciones estándar en las que se utiliza.

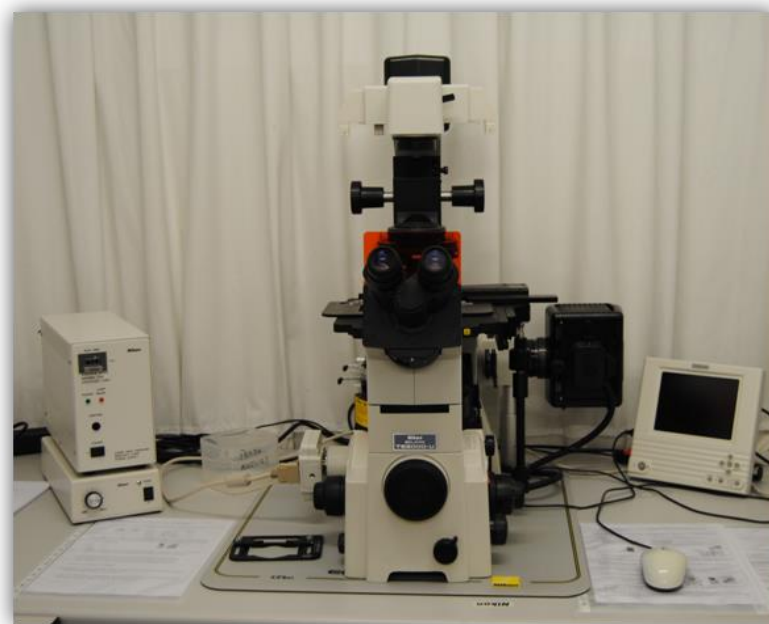
Los efectos de la contaminación por micoplasma en las líneas celulares pueden ser muy amplios y con frecuencia se subestiman, lo que lleva a una variedad de problemas. Estos pueden incluir, entre otros:

- Alteración de la velocidad de crecimiento y, por tanto de la curva de crecimiento de la línea celular
- La inducción de cambios morfológicos
- Aberraciones cromosómicas
- Alteración del metabolismo celular
- Disminución de la viabilidad en la reanimación de la línea celular al descongelarla.

La detección de micoplasmas es un proceso de suma importancia que debe realizarse de forma periódica en cada una de las líneas celulares, ya que su presencia puede modificar o invalidar los resultados de nuestros ensayos.

Para la realización de este test se ha utilizado una placa de cuatro pocillos, de forma que permite a las células tener un citoplasma extendido en el momento de la tinción. Antes de llevar a cabo la tinción selectiva de ADN se siembran 5.000 células por pocillo y se incuban durante 24-48 horas (37°C, 90% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>) en el medio de cultivo correspondiente a cada línea celular. Después del crecimiento de las células llevamos a cabo el siguiente protocolo:

1. Retiramos la mitad del medio de cultivo de cada pocillo, aproximadamente 0,5 ml.
2. Fijamos las células durante 5 minutos añadiendo a cada pocillo 0,5 ml de fijador Carnoy sobre el medio de cultivo que hemos dejado en cada pocillo.
3. Retiramos todo el contenido con una pipeta Pasteur.
4. De nuevo añadimos 0,5 ml de fijador Carnoy y lo dejamos actuar durante 10 minutos.
5. Retiramos el fijador y dejamos secar al aire durante aproximadamente 60 minutos.
6. Añadimos de 0,5 a 1ml de colorante a cada pocillo e incubamos a 22-25°C durante 30 minutos en oscuridad.
7. Retiramos la solución colorante y lavamos 3 veces con agua destilada. Dejamos secar al aire el agua sobrante, protegido de la luz.
8. Finalmente observamos cada pocillo al microscopio de fluorescencia a 400 aumentos.



**Figura 25.** Microscopio de contraste de fase y de fluorescencia

### III.3.7. TEST DE VIABILIDAD Y CITOTÓXICIDAD CELULAR (ENSAYO DE MTT)

Debido a la fiabilidad que proporciona y la abundancia de ensayos llevados a cabo a partir de él, el ensayo elegido para medir la viabilidad celular en nuestro estudio es el ensayo de reducción del MTT (Berridge, Tan, McCoy y Wang, 1996).

#### III.3.7.1. Curvas de crecimiento

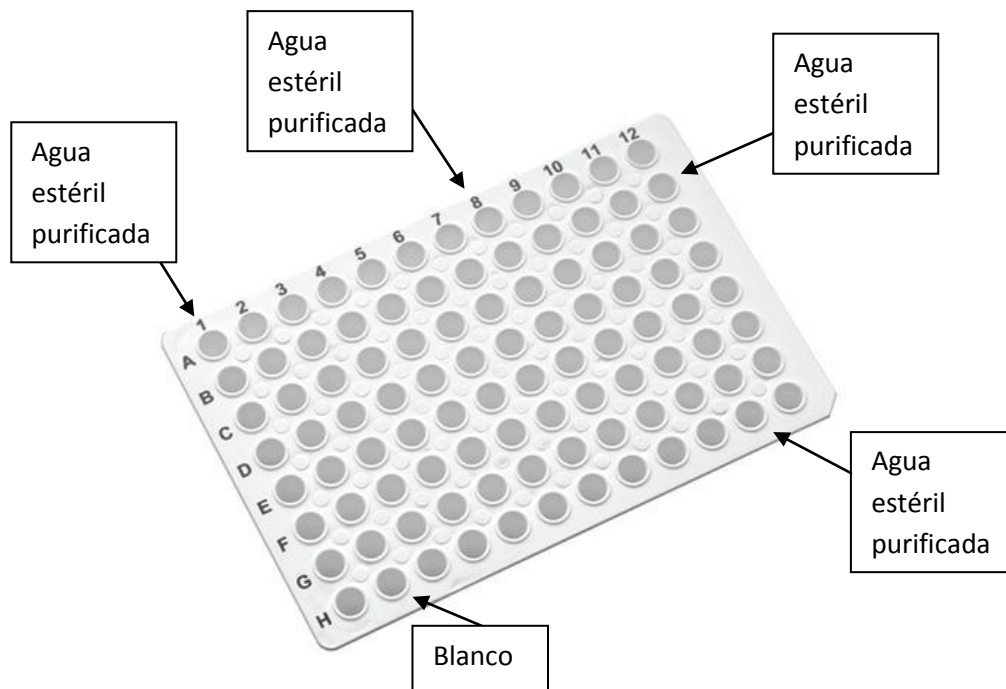
Resulta imprescindible conocer la cinética de crecimiento de cada línea celular para evaluar cual es el momento más adecuado para realizar los tratamientos con los diferentes tóxicos.

Las células se recogen de frascos de cultivo próximos a la confluencia. Después se realiza la siembra en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano para cultivos *in vitro*, utilizando cinco inoculaciones diferentes para la línea celular VERO: 20.000 células/cm<sup>2</sup> (6.400 células/pocillos), 10.000 células/cm<sup>2</sup> (3.200 células/pocillo), 5.000 células/cm<sup>2</sup> (1.600 células/pocillo), 2.500 células/cm<sup>2</sup> (800 células/pocillo) y 1.250 células/cm<sup>2</sup> (400 células/pocillo) suspendidas en 200 µl de medio de cultivo (sin rojo fenol) con un 10% de FSC, glutamina 2mM, penicilina (100/ml), estreptomina (100µg/ml) y piruvato. En el caso de la línea celular AML12 se

## MATERIALES Y MÉTODOS

utilizaron las siguientes inoculaciones: 80.000 células/cm<sup>2</sup> (25.600 células/pocillo), 40.000 células/cm<sup>2</sup> (12.800 células/pocillo), 20.000 células/cm<sup>2</sup> (6.400 células/pocillos), 10.000 células/cm<sup>2</sup> (3200 células/pocillo) y 5000 células/cm<sup>2</sup> (1.600 células/pocillo).

Se preparan 4 placas idénticas para poder observar los efectos del crecimiento de las diferentes densidades celulares a las 24, 48, 72 y 96 horas.



**Figura 26.** Placa de 96 pocillos

Con el fin de eliminar los efectos de la evaporación, los pocillos más externos se rellenan con 200 µl de agua purificada estéril. Sin efectuar cambio de medio, las placas se mantienen en un incubador a 37<sup>0</sup>C, 90% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>.

En la placa cada columna de 6 pocillos en la línea celular Vero contiene:

- Columna 1: agua estéril purificada.
- Columna 2 (Blanco): medio de cultivo sin células.
- Columna 3: medio de cultivo con una densidad de 6.400 células/pocillo.
- Columna 4: medio de cultivo con una densidad de 3.200 células/pocillo.
- Columna 5: medio de cultivo con una densidad de 1.600 células/pocillo.

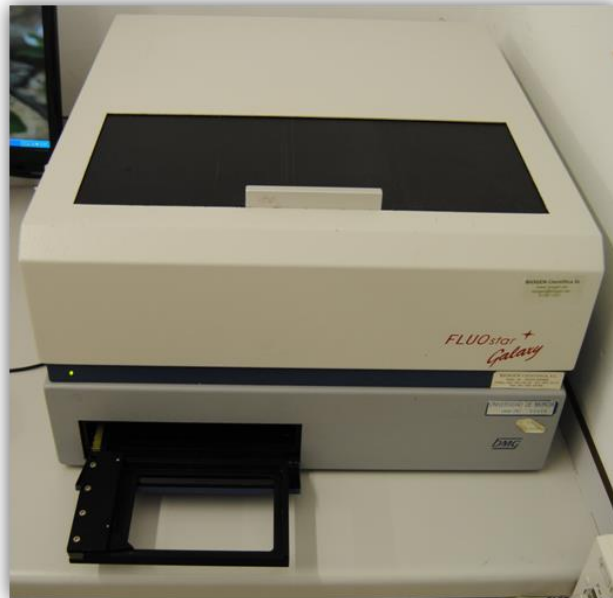
- Columna 6: medio de cultivo con una densidad de 800 células/pocillo.
- Columna 7: medio de cultivo con una densidad de 400 células/pocillo.
- Columna 8: agua estéril purificada.
- Fila A: agua estéril purificada.
- Fila G: agua estéril purificada.

En la línea celular AML12 se lleva a cabo el mismo procedimiento, pero con las inoculaciones comentadas anteriormente.

Cada 24 horas procedíamos a la evaluación del crecimiento de las células utilizando el ensayo de MTT.

Cada día se utiliza una placa para realizar el mismo procedimiento:

- Cambio de medio: en cada pocillo el medio de cultivo se reemplaza por 200  $\mu$ l de medio fresco (este medio contiene únicamente piruvato y glutamina de forma que no produzcan interferencias en el ensayo).
- Adicionamos 50  $\mu$ l de MTT (5mg/ml quedando finalmente una dilución de 1mg/ml en cada pocillo).
- Incubación durante 4 horas (37°C, 90% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>).
- Eliminación del reactivo no metabolizado.
- Introducción de 100  $\mu$ l de DMSO a cada pocillo para extraer el colorante de las células.
- Homogeneización del colorante en los pocillos mediante un agitador de placas durante 5 minutos y en condiciones de oscuridad.
- Lectura de placas en un espectrofotómetro Multiskan MCC/340P, utilizando un sistema de doble longitud de onda (570/690 nm) para registrar los resultados. El programa se ajusta para poder eliminar la absorción de fondo detectada en la segunda columna (blanco).



**Figura 27.** Lector de placas Fluostar Galaxy

#### III.3.7.2. Patrones

Se llevo a cabo la correspondiente placa patrón para determinar la relación existente entre el número de células y la intensidad colorimétrica de ambas líneas celulares. Tras comprobar que las células se han adherido a la superficie de la placa de 96 pocillos (alrededor de 3 horas después de la siembra) se realizó la técnica de MTT con un rango de células correspondiente entre 800 células/pocillo y 200.000 células/pocillo.

En la placa cada columna de 6 pocillos contiene:

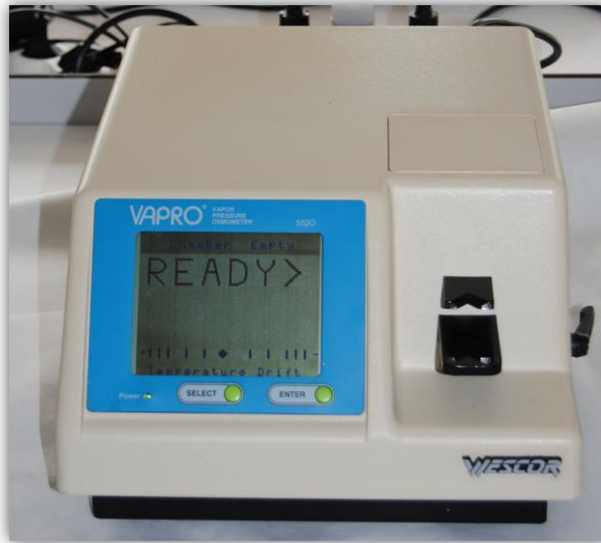
- Columna 1: agua estéril purificada.
- Columna 2 (Blanco): medio de cultivo sin células.
- Columna 3: medio de cultivo con una densidad de 200.000 células/pocillo.
- Columna 4: medio de cultivo con una densidad de 100.000 células/pocillo.
- Columna 5: medio de cultivo con una densidad de 51.200 células/pocillo.
- Columna 6: medio de cultivo con una densidad de 25.600 células/pocillo.
- Columna 7: medio de cultivo con una densidad de 12.800 células/pocillo.

- Columna 8: medio de cultivo con una densidad de 6.400 células/pocillo.
- Columna 9: medio de cultivo con una densidad de 3.200 células/pocillo.
- Columna 10: medio de cultivo con una densidad de 1.600 células/pocillo.
- Columna 11: medio de cultivo con una densidad de 800 células/pocillo.
- Columna 12: agua estéril purificada.
- Fila A: agua estéril purificada.
- Fila G: agua estéril purificada.

A continuación se lleva a cabo el mismo proceso que en el apartado anterior, es decir, un ensayo con MTT.

### III.3.7.3. Medida de la osmolaridad

La alteración de la osmolaridad es un factor de estrés celular que afecta el balance iónico e hídrico. Cuando añadimos sales al medio de cultivo celular para evaluar sus efectos, éstos pueden quedar ocultos si dichas sales producen un aumento o una disminución de la presión osmótica. Para comprobar que no existen efectos perjudiciales como consecuencia de la modificación de la presión y no por la presencia de los metales, comprobamos la osmolaridad de los medio de cultivo y de éstos con las diferentes concentraciones de metales. Para procesar las muestras utilizamos un osmómetro (Knauer) previamente calibrado; medimos la osmolaridad del blanco (únicamente medio de cultivo suplementado con suero), de los controles (medio de cultivo con 10% de Milli-Q) y las muestras con la concentración máxima y mínima de cada metal (medio de cultivo y 10% de agua purificada con la sal del metal correspondiente disuelta).



**Figura 28.** Osmómetro

### III.3.7.4. Exposición de las células a diferentes concentraciones de tóxicos

La respuesta celular, en referencia a la viabilidad celular tras la exposición a diferentes metales ha sido evaluada usando la técnica colorimétrica de MTT para cultivo con crecimiento en monocapa. El rango de concentraciones se fue acotando a través de sucesivos ensayos dependiendo de sus efectos en ambas líneas celulares.

Las células obtenidas a partir de cultivos próximos a la confluencia son tripsinizadas, centrifugadas, resuspendidas y contabilizadas. Una vez conocida la cantidad de células de las cuales disponemos, se procede a la siembra en placas de 96 pocillos con una densidad de 3.200 células por pocillo para el caso de la línea celular Vero y 12.800 células por pocillo para la línea AML12 en 180  $\mu$ l de medio (sin rojo fenol) con FSC al 10%, y dejando los bordes de la placa con agua Milli-Q para evitar procesos de evaporación.

Las placas se mantienen en incubación (37°C, 90% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>) durante 48 horas, tiempo en el que las células se encuentran en su fase de latencia. Tras este periodo, cuando las células comienzan su fase exponencial, se añaden las sales disueltas de los metales cuyos efectos queremos evaluar.

Cada una de las concentraciones utilizadas se incorpora a las placas por sextuplicado (6 pocillos para cada concentración) diluidas en agua purificada estéril,

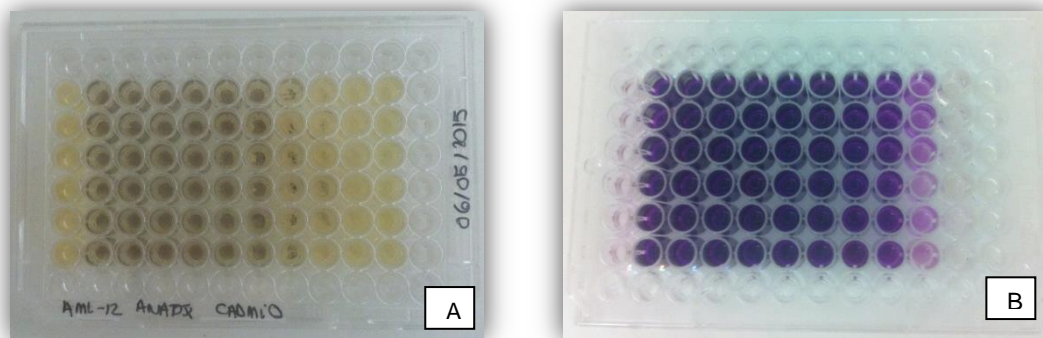


en un volumen total de 20  $\mu\text{l}$ . La concentración utilizada será 10 veces superior a aquella cuyo efecto citotóxico queremos evaluar, ya que el medio de cultivo con el que inicialmente se había efectuado la siembra permanece en los pocillos.

Cada una de las placas queda estructurada de la siguiente forma: la primera columna corresponde al blanco (para eliminar la absorbancia de fondo en la lectura), la cual solo contiene 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo; la segunda corresponden al control, la cual contiene 180  $\mu\text{l}$  medio y 20  $\mu\text{l}$  de agua Milli-Q; desde la tercera columna hasta la undécima corresponden a los pocillos que contienen las concentraciones a evaluar de las distintas sales, partiendo siempre de la concentración más diluida a la más concentrada; la última columna y las filas A y G contienen únicamente agua purificada estéril.

En estas condiciones, las placas permanecían en incubación durante 24 horas.

Una vez comprobado el estado de las células a nivel microscópico se procede a la coloración de las mismas mediante la técnica de MTT: retirada del medio, adición de 200  $\mu\text{l}$  de medio (únicamente con glutamina y piruvato) y 50  $\mu\text{l}$  de MTT por pocillo, incubación durante 4 horas.



**Figura 29.** A. Placa tras 24 horas de incubación con MTT. B. Placa con DMSO.

Tras las 4 horas se procede a la eliminación del reactivo no incorporado a las células, extracción del colorante de las células mediante la adición de 100  $\mu\text{l}$  de DMSO por pocillo, agitación de las células y lectura de cada placa en un espectrofotómetro (Omega) a una longitud de onda de 570/690 nm.

Para eliminar de colorante absorbido en cada placa, el lector es programado para que reste a cada pocillo la lectura correspondiente a los pocillos en blanco.

### III.3.8. CITOMETRÍA DE FLUJO

#### III.3.8.1. Análisis del contenido de ADN: Ciclo celular por citometría de flujo

La cuantificación del contenido de ADN de las células por citometría de flujo permite determinar la distribución de una población celular a lo largo de las distintas fases del ciclo celular. Las células, en función de la fase del ciclo en la que se encuentren, pueden tener la dotación cromosómica normal ( $2n$ ) cuando están en fase G0/G1, doble ( $4n$ ) cuando están a punto de dividirse en la fase G2/M, o bien, una cantidad de ADN intermedia cuando están en la fase S (síntesis de ADN previa a la mitosis).

Para el análisis del contenido de ADN celular, las células se resuspendieron a una concentración de  $0,5-1 \times 10^6$  células/ml en PBS. Para fijar las células se tomaron 200  $\mu$ l de la suspensión celular a la que se le añadieron 2 ml de una mezcla de etanol: PBS frío (70%:30%) y se mantuvieron durante 30 minutos a 4° C. Las células se centrifugaron 10 minutos a 200xg para el caso de la línea celular Vero y durante 8 minutos a 125xg para la línea celular AML12.

Posteriormente se descartó el sobrenadante, resuspendiendo las células en 800  $\mu$ l de PBS al que se añadieron 100  $\mu$ l de una disolución de RNAsa 1 mg/ml y 100  $\mu$ l de IP (400  $\mu$ g/mL, Sigma). Tras la adición de la RNAsa y el IP, las células se incubaron a 37° C durante 30 minutos y se analizaron en el citómetro de flujo FACScalibur mediante el programa informático CellQuest.

El citómetro de flujo selecciona las células en poblaciones en función de su contenido en ADN, dando lugar a un histograma en el que se representa la cantidad de ADN de la célula frente al número de células de cada población. El análisis de las distintas fases del ciclo celular se realizó con el software CellQuestPro cuantificando el perfil de las distintas fases del ciclo celular para cada tipo de muestra.



**Figura 30.** Citómetro EPICS XL.

#### III.3.8.2. Discriminación entre apoptosis y necrosis por citometría de flujo

En nuestro caso, mediante la combinación de anexina V-FITC y el marcador catiónico yoduro de propidio (IP) distinguiremos diferencias entre células apoptóticas y necróticas debido a alteraciones en la composición de la membrana. Como el objetivo de nuestro estudio es diferenciar en qué medida las líneas celulares empleadas se ven afectadas por apoptosis o necrosis tras la exposición a los diferentes tóxicos, este último método es el que consideramos más idóneo (complementado con otros como la microscopia electrónica y de fluorescencia) y el que hemos empleado en nuestro estudio.

Se basa en el principio de que las células normales son de naturaleza hidrófoba, ya que expresan fosfatidilserina en la membrana interna (lado que mira hacia el citoplasma) y cuando las células sufren apoptosis la membrana interna voltea para convertirse en membrana externa, exponiendo así fosfatidilserina. La fosfatidilserina expuesta es detectada por Anexina V. El yoduro de propidio tiñe las células necróticas que tienen el contenido de ADN dañado ayudando a diferenciar las células apoptóticas de necróticas.

**Tabla 19.** Longitudes de onda de anexina y yoduro de propidio.

	<b>Fluoresceína</b>	<b>Yoduro de propidio</b>
<b>Excitación</b>	488 nm	400-540 nm
<b>Emisión</b>	518 nm	617 nm

La apoptosis y/o necrosis se evaluó mediante citometría de flujo utilizando como reactivos un kit de anexina-V-fluos (Roche®). Dicho kit contiene: 110 µl de anexina, 150 µl de IP y 50 ml de tampón buffer. Como dosis de tóxicos se emplearon las CE<sub>50</sub> de cada tóxico, las medias obtenidas de las tres especies de pingüinos adultos, la concentración más alta para el plomo, y las medias obtenidas para juveniles y pollos.

Se utilizan placas de 6 pocillos y en cada pocillo se siembran las células con una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> para la línea celular VERO y de 40.000 células/cm<sup>2</sup> para la línea celular AML12, por lo que en total se cultivan en cada pocillo 95.000 células para VERO y 380.000 células para AML12. Las células se mantienen en incubación durante 48 horas. En cada pocillo se introduce la cantidad necesaria de suspensión celular y medio de cultivo hasta un volumen de 2,7 ml.

Después se añade a los pocillos control 300 µl de agua, y a cada uno de los pocillos restantes la misma cantidad de tóxico en la concentración requerida, es decir, su CE<sub>50</sub>, su concentración media o su concentración máxima para el caso del plomo, es decir, el 10% de tóxico.

Como control positivo, para detectar que en nuestras células se aprecia la aparición de apoptosis se emplea camptotecina (interacciona con la enzima topoisomerasa I alterando el proceso normal del ciclo celular y provocando apoptosis) en una concentración de 4µg/ml y se mantiene en incubación durante 24 horas.

El efecto provocado por los tóxicos se evalúa a las 24 horas. Una vez pasado este tiempo se observan las células al microscopio óptico. A continuación se procede a recoger el medio en tubos Falcon de 15 ml. Posteriormente se añade 1ml de tripsina (0,25 % y 0,02% EDTA) a cada pocillo. Se mantiene en incubación durante 4-5 minutos y después se neutraliza la tripsina con 1 ml de medio de cultivo. Se retira la mezcla y se introduce en los tubos Falcon de 15 ml para centrifugar durante 10-8 minutos a 200-125 xg en el caso de la línea celular VERO o AML12, respectivamente.

En este momento se prepara la solución de anexina/IP. Se añade 20 µl de anexina y 20 µl IP a 1 ml de incubation buffer obteniéndose una cantidad suficiente para diez muestras.

Una vez centrifugadas las células, se retira el sobrenadante y se añade a cada Falcon 500 µl de PBS para eliminar los posibles restos celulares y proteínas del medio que puedan interferir y se pasan a viales. A continuación se utiliza una microcentrífuga (Beckman Microfuga®) a 200xg durante 5 minutos. Una vez acabado este proceso se elimina el sobrenadante y el pellet celular se resuspende en el preparado de anexina/IP en las muestras que hayan contenido tóxico y en el control. Para saber donde se localiza la población celular se prepara también dos muestras, una que contiene únicamente IP (necrosis) y otra que solo contiene anexina (apoptosis temprana). Se mantienen a 15-25°C durante 15 minutos en condiciones de oscuridad.

Transcurrido este tiempo se añaden 0,5 ml de incubation buffer y se pasan a tubos de polipropileno de 5 ml (deltalab) para proceder a su análisis en el citómetro EPICS XL (Expo32 ADC, Beckman Coulter).

### III.3.9. MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASES

En nuestro estudio ha sido utilizado el microscopio óptico de contraste de fases para observar los cultivos celulares (células vivas) y monitorear actividades (crecimiento y comportamiento). Mediante el uso del microscopio July se realizó una película mediante la secuenciación de fotos tomadas cada 5 minutos durante 24 horas para observar el efecto de la concentración media de selenio en adultos.



**Figura 31.** Microscopio July.

### III.3.10. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Una vez que hemos delimitado las concentraciones milimolares para las cuales tienen efecto los compuestos ensayados, se reprodujeron los ensayos en frascos de 25cm<sup>2</sup>. Las concentraciones estudiadas corresponden a las CE<sub>50</sub> obtenidas a partir de las curvas dosis-respuestas mediante el programa informático SigmaPlot 11.0.

Tras finalizar la exposición a los tóxicos (24 horas) y en los grupos control con la adición de agua purificada estéril, las muestras son tripsinizadas y recogidas en tubos de centrifuga de 15ml. Una vez centrifugadas a 200 xg (10 minutos) para la línea celular VERO y a 125 xg (8 minutos) para la línea celular AML12 se elimina el sobrenadante y se realiza una primera fijación con glutaraldehído al 3% (fijador no coagulativo que forma enlaces intra e intermoleculares y cambia la forma del citoplasma a gel) en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,2-7,4) manteniéndose a una temperatura de 4°C durante una hora. La finalidad de la fijación es conservar las células de forma que muestren el mayor parecido posible a su estado *in vivo*, aumentar la dureza para facilitar el corte fino y evitar la autólisis y degeneración post mortem.

Después las muestras pasan a tampón cacodilato 0,1 M y sacarosa al 8% durante toda la noche.

Se procede a la postfijación con ácido ósmico al 1% a 4°C durante dos horas y 30 minutos. El ácido ósmico es un fijador secundario que reacciona con lípidos y se reduce (color negro).

A continuación, cada muestra se lava en tampón cacodilato con sacarosa durante 12 horas y es contrastada con acetato de uranilo al 4,8% en tampón veronal 0,1 M (pH 7,2-7,4) a 4°C durante dos horas. El acetato de uranilo estabiliza el material nuclear y los fosfolípidos y aumenta el contraste.

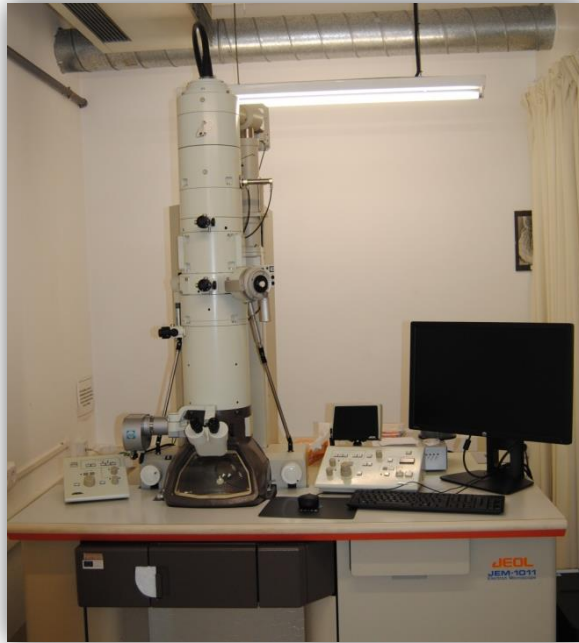
La deshidratación se realiza con alcoholes a temperatura ambiente y de forma gradual (30, 50, 70 y 90%) durante 10 minutos para cada alcohol. Su finalidad es eliminar y/o desplazar el agua y evitar deformaciones.

Durante dos periodos de 10 minutos, las muestras permanecen en alcohol absoluto con sulfato de cobre pasando después a óxido de propileno durante dos periodos de 15 minutos. El óxido de propileno es un líquido de transición miscible ya que la resina final no se suele disolver en alcohol.

La impregnación se llevó a cabo mediante pases sucesivos en resina epon y óxido de propileno a distintas proporciones (1/2, durante 45 minutos; 1/1 y 2/1 durante dos horas cada uno), terminando con epon puro durante toda la noche.

Los bloques se realizaron mediante la introducción de la muestra y la resina sintética (epon 812, DDSA, MNA y DMP30) en cápsulas de gelatina, dejándolas 48 horas para que solidifique en una estufa a 70°C.

Para seleccionar las zonas de interés, se realizan cortes semifinos teñidos con azul de toluidina. Después se obtienen cortes ultrafinos de aproximadamente 50-70 nm de grosor con un ultramicrotomo (LEICA UC6) que fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y observadas en un microscopio (Philips Ternay o Jeol 1011 con una aceleración de 80Kv) con una cámara digital acoplada para la captación de imágenes.



**Figura 32.** Microscopio electrónico JEOL (JEM-1011).

### III.3.11. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

El microscopio de fluorescencia se utilizó para confirmar la presencia de células necróticas y apoptóticas tras el tratamiento con las diferentes sales.

De la misma forma que utilizamos como reactivos un kit de annexina-V-fluos (Roche®) para evaluar los efectos de necrosis/apoptosis por citometría de flujo, usamos el mismo kit para la fluorescencia.

Se utilizan placas de 4 pocillos y en cada pocillo se siembran las células con una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> para la línea celular VERO y de 40.000 células/cm<sup>2</sup> para la línea celular AML12, por lo que en total se cultivan en cada pocillo 18.000 células para VERO y 72.000 células para AML12. Las células se mantienen en incubación durante 48 horas. En cada pocillo se introduce la cantidad necesaria de suspensión celular y medio de cultivo hasta un volumen de 900 µl.

Después se añade a los pocillos control 100 µl de agua, y a cada uno de los pocillos restantes la misma cantidad de tóxico en la concentración requerida (10% de tóxico).



El efecto provocado por los tóxicos se evalúa a las 24 horas. Una vez pasado este tiempo se eliminan los bordes de los pocillos y sobre cada uno se añaden 100  $\mu$ l de la solución anexina/IP. Después se mantiene en incubación y tapado durante aproximadamente 20 minutos. Finalmente se observa el portaobjetos mediante un microscopio de contraste de fase con una cámara de fluorescencia acoplada.

### III.3.12. ESTRÉS OXIDATIVO (ROS)

Para medir las variaciones en el estrés oxidativo causado por los diferentes compuestos se empleó la sonda 2,7- Diclorodihidroxi fluoresceína (DCFH-DA). Dicha sonda es de composición apolar y tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática. Una vez dentro es hidrolizada por esterasas de la célula a diclorofluoresceína (DCFH) que en presencia de especies reactivas de oxígeno, se convierte en su forma fluorescente (DCF) (Wang y Joseph, 1999; Halliwell y Whiteman, 2004). Este método es excepcionalmente sensible y proporciona una medida directa de estrés oxidativo en general, que detecta oxidantes intracelulares (Ferrer *et al.*, 2009).

El ensayo comienza con el uso de placas de 6 pocillos donde en cada pocillo se siembran las células con una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> para la línea celular VERO y de 40.000 células/cm<sup>2</sup> para la línea celular AML12, por lo que en total se cultivan en cada pocillo 95.000 células para VERO y 380.000 células para AML12. Las células se mantienen en incubación durante 48 horas. En cada pocillo se introduce la cantidad necesaria de suspensión celular y medio de cultivo hasta un volumen de 2,7 ml.

Después se añade a los pocillos control 300  $\mu$ l de agua Milli-Q, y a cada uno de los pocillos restantes la misma cantidad de tóxico en la concentración requerida, es decir, su concentración media de adultos, juveniles y pollos para el cadmio, el plomo, el cromo y el selenio (10% de tóxico).

El efecto provocado por los tóxicos se evalúa a las 24 horas. Una vez pasado este tiempo se observan las células al microscopio óptico. A continuación se procede a recoger el medio en tubos Falcon de 15 ml. Posteriormente se añade 1ml de tripsina (0,25 % y 0,02% EDTA) a cada pocillo. Se mantiene en incubación durante 4-5 minutos y después se neutraliza la tripsina con 1 ml de medio de cultivo. Se retira la

mezcla y se introduce en los tubos Falcon de 15 ml para centrifugar durante 10-8 minutos a 200-125 xg en el caso de la línea celular VERO o AML12, respectivamente.

A continuación, se elimina el sobrenadante y resuspenden las células en 1ml de PBS para proceder al lavado de la muestra y se vuelve a centrifugar durante 10-8 minutos. Después se elimina el sobrenadante y se añade 975  $\mu$ l de PBS y 25  $\mu$ l de DCFH-DA (a partir de una disolución stock 1mM en PBS, con 1,74% de EtOH) a cada muestra incluyendo el control (excepto el blanco que no mostrará fluorescencia al analizarlo en el citómetro). Se mantienen las muestras en incubación durante 20-30 minutos en condiciones de oscuridad. Posteriormente se centrifuga durante 5 minutos y se elimina el sobrenadante, se añade 1 ml de PBS y se traspara la muestra a tubos de polipropileno de 5 ml (deltalab<sup>®</sup>). El aumento o disminución de la fluorescencia de las muestras con respecto al control fue medido utilizando el citómetro de flujo FACScalibur mediante el programa informático CellQuest.

Una vez obtenidos las distintas medidas de fluorescencia para cada muestra problema, los resultados son analizados mediante el programa informático FlowJo.

### III.3.13. EXPRESIÓN GÉNICA

Se ha estudiado el efecto producido por las distintas concentraciones de los tóxicos en estudio sobre la apoptosis, estrés oxidativo, protección celular y estrés celular. Como gen indicador de apoptosis se estudió la variación en la expresión génica del gen Bcl-2 associated x protein (*Bax*), como indicador de estrés oxidativo se analizó el gen catalasa (*Cat*), como indicador de protección celular se estudió la metalotioneina (*Mt1*) y por último para comprobar el efecto de los tóxicos sobre el estrés celular se utilizó el gen Heat Shock protein 70 (*Hspa 13*).

Se realizó un cultivo de las líneas celulares AML12 y VERO a una confluencia de 40.000 células/cm<sup>2</sup> y 10.000 células/cm<sup>2</sup> respectivamente, en placas de 12 pocillos. Se emplea un grupo blanco, un grupo control y tratamientos de las diferentes concentraciones de los distintos tóxicos en estudio. Las células se mantuvieron durante 24 horas con cada concentración tóxica en un incubador a 37°C (5% CO<sub>2</sub>, humedad 95%).

Trascurridas las 24 horas se realizó la extracción del ARN de las células para cada una de las condiciones en estudio utilizando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen®) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y realizando una incubación con DNasa (Qiagen®). Trascurridas las 24 horas, se eliminó el sobrenadante de los cultivos celulares y se tratan las células con un buffer de lisis. Posteriormente, el lisado celular pasa por un filtro con sales de sílice que retiene a los ácidos nucleicos y se someten a varios pases de limpieza. A continuación, se procedió a realizar una digestión con ADNasa para eliminar los restos de ADN y se vuelve a producir un proceso de lavado y limpieza con buffers. El proceso terminó mediante la adición de agua que provoca que los ácidos nucleicos se despeguen del filtro y se eliminen con el agua, obteniendo una solución de ARN.

Posteriormente se realizó la cuantificación y determinación de la pureza del ARN extraído utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermofisher®). Las muestras (de suficiente cantidad y calidad) fueron normalizadas a 500 ng de ARN y se procedió a realizar una retrotranscripción del ARN mensajero empleando el kit iScript cDNA (BioRad®) mediante el siguiente protocolo: unión de primers 5 minutos a 25°C, transcripción inversa 20 minutos a 46°C, inactivación de transcripción inversa 1 minuto a 95°C, las muestras de ADN complementario pueden almacenarse a temperaturas de congelación o refrigeración, durante tiempos más cortos.

Se realizó la cuantificación del ADN complementario para cada gen mediante una qPCR usando el termociclador IQ5 (BioRad®). La reacción de PCR se llevó a cabo empleando el Mix "SYBR Green Master Mix: SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) de la casa comercial Takara® basado en SYBR Green y los primers indicados en las tablas 20 y 21.

El análisis de la expresión de los diferentes genes se realizó utilizando al gen Gapdh como gen control y mediante la técnica de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

**Tabla 20.** Primers utilizados para el análisis de la expresión génica mediante qPCR para la línea celular AML12 (Sigma® y Quiagen®)

Nombre del gen	Abreviatura	Secuencia (5'-3')
<b>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</b>	<i>Gapdh</i>	"QuantiTect Primer Assay. Mm_Gapdh_3" (Qiagen®)
<b>Bcl-2 associated X protein</b>	<i>Bax</i>	CCTTTTTGCTACAGGGTTTC ATATTGCTGTCCAGTTCATC
<b>Catalasa</b>	<i>Cat</i>	CTCCATCAGGTTTCTTTCTTG CAACAGGCAAGTTTTTGATG
<b>Metalotioneína-1</b>	<i>Mt1</i>	TCCAACGACTATAAAGAGGG CGGAGTAAGTGAGGAGAAG
<b>Heat shock protein 70</b>	<i>Hspa13</i>	CGATGTCTGGATTTCTAACC CTCTGATTGAAGTCTTGCC

**Tabla 21.** Primers utilizados para el análisis de la expresión génica mediante qPCR para la línea celular VERO (Sigma®)

Nombre del gen	Abreviatura	Secuencia (5'-3')
<b>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</b>	<i>Gapdh</i>	CGACCACTTTGTCAAGCTCA GTGAGGGCCTCTCTCTTCCT
<b>Bcl-2 associated X protein</b>	<i>Bax</i>	GGGGACGAACTGGACAGTAA CCTTGGTACACAGGGCCTTA
<b>Catalasa</b>	<i>Cat</i>	TCTGGGACTTCTGGAGCCTA TTTGCAATAAACCGCCTTTC
<b>Metalotioneína-1</b>	<i>Mtx1</i>	GAAGTGACCCGGAAGTGGTA CGGTACAGCTCCTTTCTCCAG
<b>Heat shock protein 70</b>	<i>Hspa13</i>	CACAGGGACCAGGAAAGAAA CACAGGGACCAGGAAAGAAA



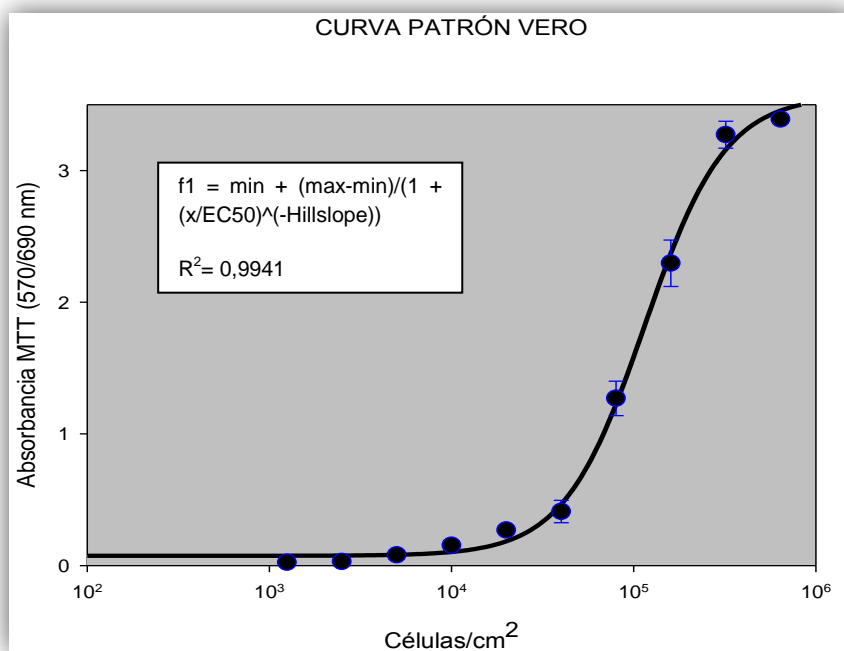
**RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN**

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1. CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR

La proporcionalidad entre la intensidad colorimétrica y el número de células para el rango de concentración establecido, presenta una relación de tipo sigmoideal para ambas líneas celulares. Para determinar los límites de sensibilidad se realiza un ajuste lineal de nuestros valores para la línea celular VERO y un ajuste exponencial para la línea celular AML12.

Cada punto representado en las rectas corresponde a la media de 6 medidas independientes. En las siguientes gráficas se representan las curvas patrón para cada línea celular y sus correspondientes rectas de regresión.



**Figura 33.** Curva patrón para la línea celular VERO.

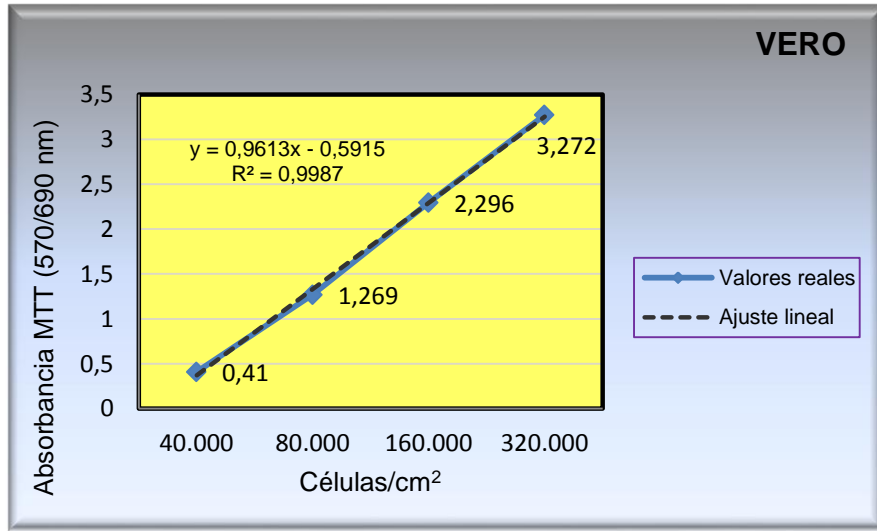


Figura 34. Ajuste lineal VERO

Tabla 22. Absorbancia según el número de células para la línea celular VERO

Número de células/cm <sup>2</sup>	Absorbancia media	Desviación estándar	Máxima	Mínima
1.250	0,024	0,007	0,039	0,018
2.500	0,03	0,004	0,036	0,025
5.000	0,081	0,008	0,093	0,072
10.000	0,154	0,02	0,18	0,134
20.000	0,27	0,03	0,317	0,23
40.000	0,41	0,08	0,553	0,318
80.000	1,269	0,1	1,421	1,062
160.000	2,296	0,2	2,559	2,024
320.000	3,272	0,1	3,419	3,146
640.000	3,389	0,02	3,411	3,367

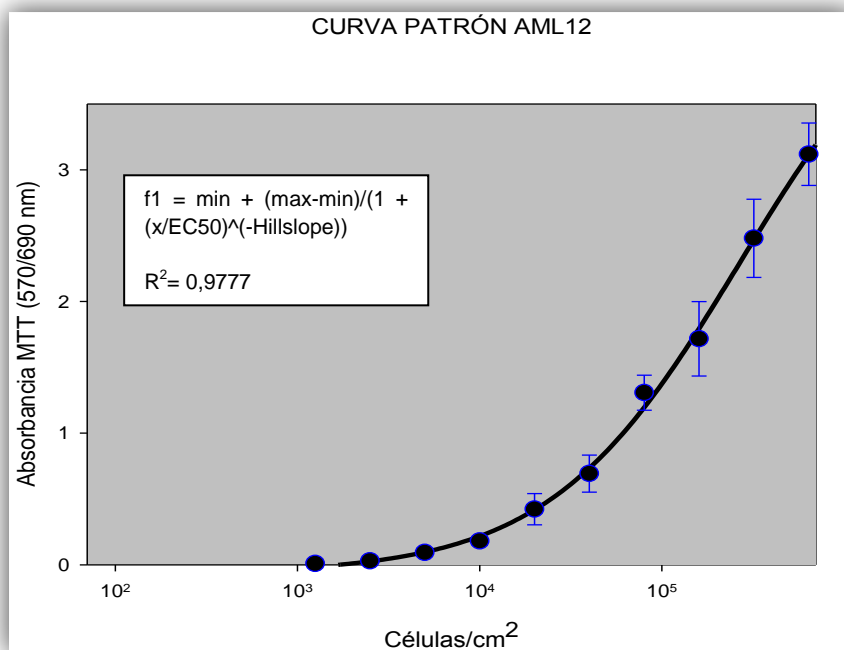


Figura 35. Curva patrón para la línea celular AML12

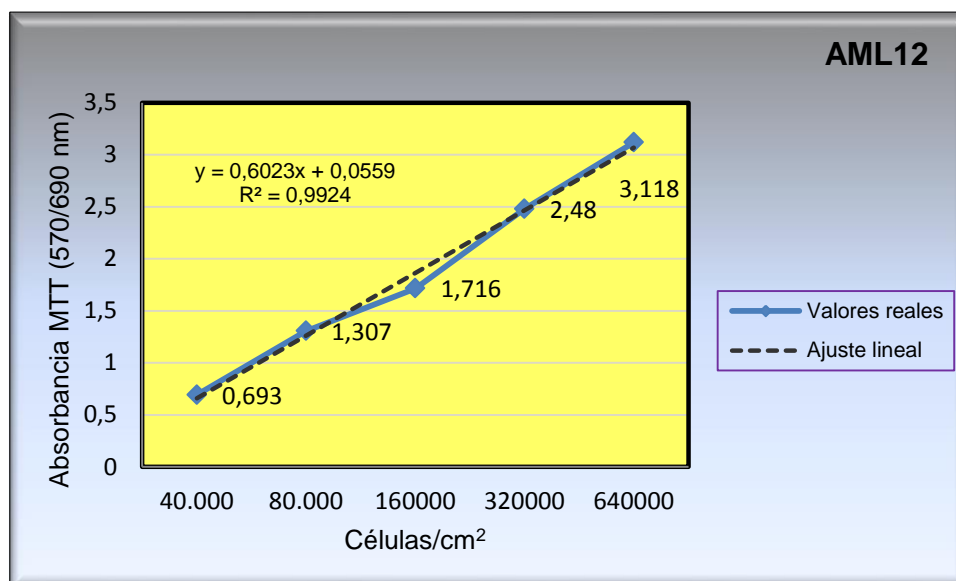


Figura 36. Ajuste exponencial línea celular AML12



**Tabla 23.** Absorbancia según el número de células para línea celular AML12

Número de células/cm <sup>2</sup>	Absorbancia media	Desviación estándar	Máxima	Mínima
1.250	0,009	0,006	0,02	0,004
2.500	0,03	0,008	0,04	0,02
5.000	0,094	0,017	0,117	0,74
10.000	0,18	0,033	0,22	0,14
20.000	0,422	0,1	0,569	0,264
40.000	0,693	0,1	0,866	0,512
80.000	1,307	0,1	1,488	1,155
160.000	1,716	0,3	1,931	1,4
320.000	2,48	0,3	2,8	2
640.000	3,118	0,2	3,22	2,64

En la tabla 24 pueden apreciarse los diferentes parámetros estadísticos que indican la bondad del ajuste.

	Coefficiente de determinación (R <sup>2</sup> )	Coefficiente de correlación (R)	Ajuste de R <sup>2</sup>	Error estándar
VERO	0,9941	0,9971	0,9938	0,1031
AML12	0,9777	0,9888	0,9765	0,1647

**Tabla 24.** Datos estadísticos de la curva patrón para ambas líneas celulares

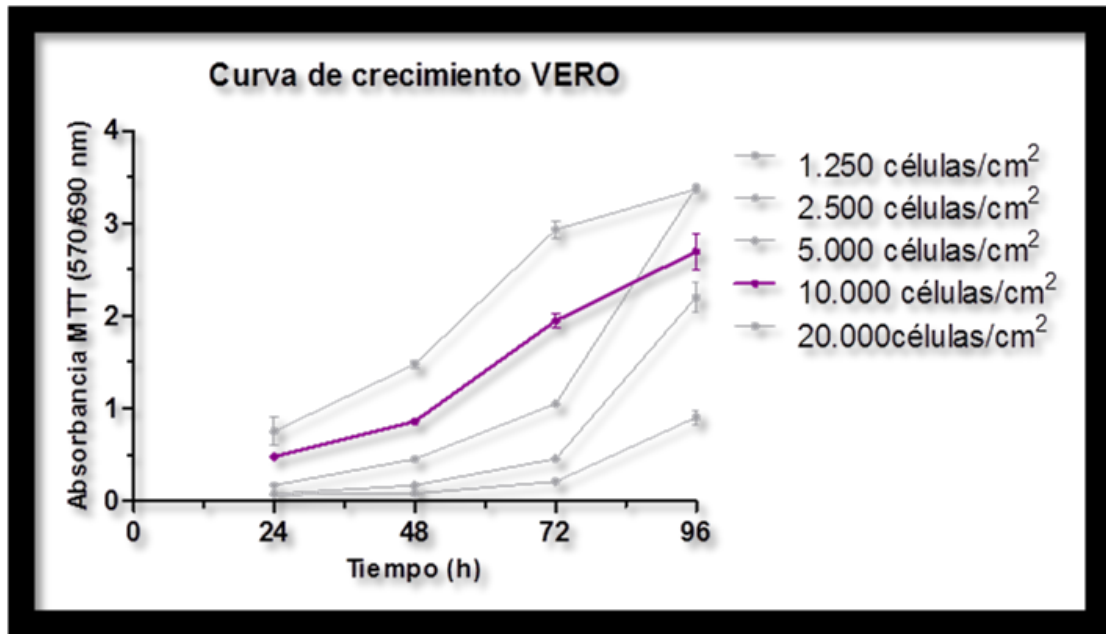
Las curvas patrón son de gran importancia para caracterizar cada línea celular y para diseñar la estrategia experimental. La técnica colorimétrica del MTT ha sido ampliamente utilizada en multitud de estudios (Song y Koh, 2012; Sinha, Pal y Sil, 2014; Skipper *et al.*, 2016). En nuestro estudio se observó una buena correlación entre el número de células y la absorbancia medida, demostrando ser adecuada para estimar la viabilidad celular tras la exposición a diferentes compuestos tóxicos. Para ambas líneas celulares el límite de sensibilidad es alto, es decir, el rango en el que la absorbancia es proporcional al número de células. La pendiente de la recta patrón de las células VERO es ligeramente superior a la de la línea celular AML12. Si bien ambas líneas celulares presentan una relación absorbancia/número de células muy similar, esta relación es ligeramente superior para VERO. Esta pequeña diferencia

puede deberse a la cantidad de mitocondrias disponibles en ambas líneas celulares o a la actividad enzimática. Un mayor número de mitocondrias o de enzimas succinato-deshidrogenasa (transforma MTT en formazán) produciría una mayor absorbancia, siendo la cantidad de células vivas proporcional a la cantidad de formazán producido. Con el microscopio electrónico ambas líneas mostraron una cantidad suficiente de mitocondrias, aunque eran más visibles en el caso de la línea celular VERO. Mediante el estudio posterior de ROS, verificamos que las unidades de fluorescencia (indica presencia de ROS mediante sonda DCFHA-DA) en la línea celular VERO para la muestra control es muy superior al de AML12. Aunque los ROS pueden provenir de diferentes organelas, las mitocondrias son consideradas las principales productoras de ROS. Éstas producen principalmente anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Hoppel, Kim, Minkler y Paul, 2011). Aproximadamente el 80% del anión superóxido es producido por las mitocondrias (Hemann, Velayutham y Zweier, 2011).

### IV. 2. CURVAS DE CRECIMIENTO

Las curvas de crecimiento se determinan para conocer la densidad inicial y el momento de adición del agente. Este debe ser tal que el cultivo control se encuentre todavía en crecimiento exponencial en el momento de realizar la medida, ya que los resultados se expresan como % del control.

De la misma forma que en las curvas patrón, las curvas de crecimiento se establecen usando como técnica colorimétrica el ensayo de MTT, donde cada punto corresponde a la media de seis valores. Los datos aportados por las curvas de crecimiento se analizaron usando el programa informático GraphPad Prism 5.



**Figura 37.** Curvas de crecimiento con distintas inoculaciones para línea celular VERO

Al comparar las diferentes curvas de crecimiento dependiendo de las células inoculadas, comprobamos que para la línea celular VERO los inóculos de 1.250, 2.500 y 5.000 células/cm<sup>2</sup> presentan una fase de latencia alargada donde no se observan cambios significativos en los niveles de absorbancia, observándose un ligero crecimiento más marcado para la inoculación de 5.000 células/cm<sup>2</sup>; sin embargo, esta primera fase si es más pronunciada para las inoculaciones de 10.000 y 20.000 células/cm<sup>2</sup>, donde las células se adaptan al medio de cultivo y comienzan a dividirse.

En la fase exponencial no se aprecian variaciones en la pendiente de las curvas pertenecientes a las inoculaciones de 1.250 y 2.500 células/cm<sup>2</sup>; en el caso de la curva de 5.000 células/cm<sup>2</sup> presenta una fase exponencial con principio menos acentuado entre las 48-72 horas, y en el caso de las curvas pertenecientes a la inoculación de 10.000 y 20.000 células/cm<sup>2</sup> se observa una fase exponencial más prolongada en el tiempo para el caso de 10.000 células/cm<sup>2</sup> entre las 48 y 96 horas y la curva de 20.000 células comienza a estabilizarse a partir de las 72 horas.

En ninguna de las curvas se observa de forma clara una fase de estacionamiento, pero si comienza a observarse el inicio de dicha fase con valores entre 3-3,5 de absorbancia a partir de las 96 horas, debido a la escasez de nutrientes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las siguientes tablas (tablas 25 y 26) se indican los valores medios de absorbancia (6 valores) desde la siembra de las células hasta transcurrir 24 horas de exposición a los distintos tóxicos.

**Tabla 25.** Absorbancia según las células inoculadas inicialmente y el tiempo de crecimiento para la línea celular VERO

Inoculación 1.250 células/cm <sup>2</sup>				
Tiempo (h)	Absorbancia media	Desviación estándar	Máxima	Mínima
24	0,073	0,0127	0,09	0,054
48	0,081	0,014	0,101	0,06
72	0,212	0,0353	0,243	0,145
96	0,91	0,2	1,26	0,73

Inoculación 2.500 células/cm <sup>2</sup>				
Tiempo (h)	Absorbancia media	Desviación estándar	Máxima	Mínima
24	0,077	0,0194	0,114	0,061
48	0,17	0,0194	0,197	0,139
72	0,46	0,4835	0,513	0,396
96	2,2	0,4	2,74	1,82

Inoculación 5.000 células/cm <sup>2</sup>				
Tiempo (h)	Absorbancia media	Desviación estándar	Máxima	Mínima
24	0,173	0,015	0,197	0,158
48	0,456	0,0246	0,504	0,434
72	1,05	0,0847	1,155	0,899
96	3,39	0,0359	3,41	3,32

Inoculación 10.000 células/cm <sup>2</sup>				
Tiempo (h)	Absorbancia media	Desviación estándar	Máxima	Mínima
24	0,481	0,0372	0,528	0,422
48	0,898	0,0987	0,906	0,811
72	1,948	0,2	2,161	1,91
96	2,69	0,4	3,27	2,14

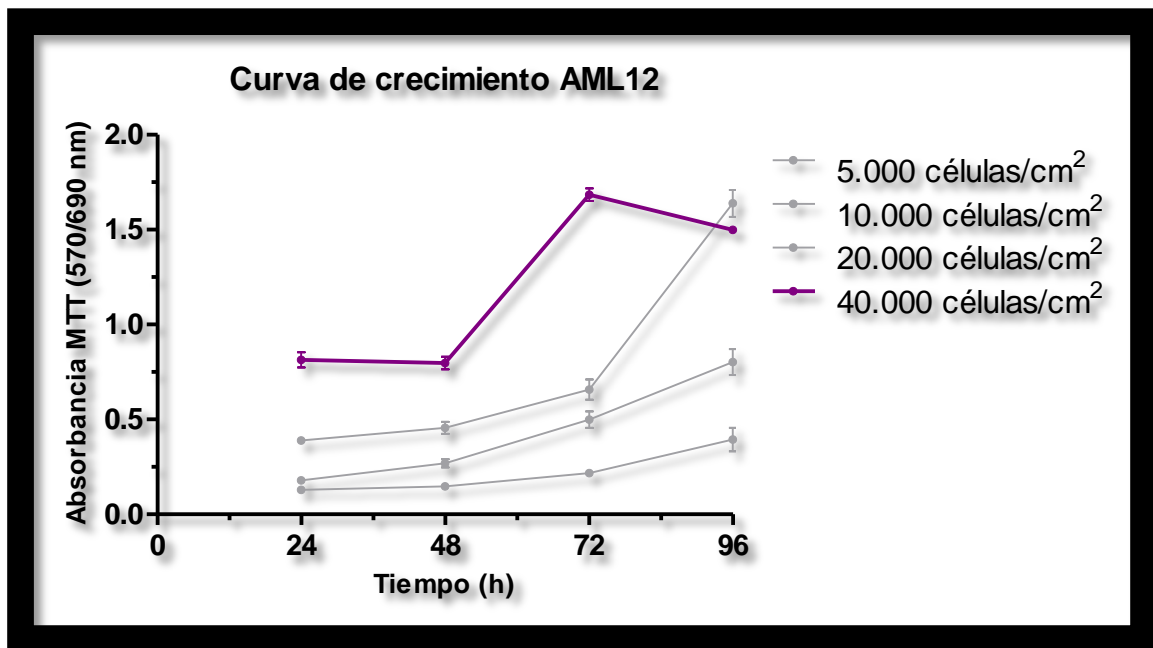
  

Inoculación 20.000 células/cm <sup>2</sup>				
Tiempo (h)	Absorbancia media	Desviación estándar	Máxima	Mínima
24	0,755	0,4	0,688	0,571
48	1,479	0,1	1,572	1,336
72	2,931	0,2	3,197	2,647
96	3,37	0,0317	3,4	3,31

En el caso de la línea celular AML12 se observan mayores diferencias al comparar las diferentes curvas correspondientes a las distintas células inoculadas. Para las cuatro inoculaciones utilizadas se observa claramente la fase de latencia donde la población se mantiene constante durante las primeras 48 horas.

En cuanto a la fase logarítmica, en la inoculación de 5.000 células/cm<sup>2</sup> el crecimiento es muy leve y aumenta escasamente en la inoculación de 10.000 células/cm<sup>2</sup>. En el caso de la curva de 20.000 células/cm<sup>2</sup> se observa un principio menos acentuado entre las 48 y 72 horas y un claro crecimiento exponencial a partir de 72 horas. En el caso de la curva de 40.000 células/cm<sup>2</sup> queda patente el crecimiento exponencial de las células entre las 48 y 72 horas.

Con respecto a la fase estacionaria es visible en la curva correspondiente a la inoculación de 40.000 células/cm<sup>2</sup> a partir de las 72 horas, sin embargo está ausente en el resto de inoculaciones.



**Figura 38.** Curvas de crecimiento con distintas inoculaciones para línea celular VERO

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 26.** Absorbancia según las células inoculadas inicialmente y el tiempo de crecimiento para la línea celular AML12

Inoculación 5.000 células/cm <sup>2</sup>				
Tiempo (h)	Absorbancia media	Desviación estándar	Máxima	Mínima
24	0,1285	0,015	0,1429	0,1115
48	0,1470	0,03	0,1877	0,1227
72	0,2180	0,007	0,23	0,2026
96	0,4000	0,17	0,5360	0,1995

Inoculación 10.000 células/cm <sup>2</sup>				
Tiempo (h)	Absorbancia media	Desviación estándar	Máxima	Mínima
24	0,1788	0,04	0,2156	0,132
48	0,269	0,06	0,3218	0,2056
72	0,4995	0,14	0,6194	0,3218
96	0,8019	0,18	0,9905	0,6215

Inoculación 20.000 células/cm <sup>2</sup>				
Tiempo (h)	Absorbancia media	Desviación estándar	Máxima	Mínima
24	0,3895	0,05	0,4464	0,3474
48	0,4562	0,08	0,552	0,3909
72	0,6575	0,15	0,767	0,4543
96	1,6387	0,18	1,8317	1,4606

Inoculación 40.000 células/cm <sup>2</sup>				
Tiempo (h)	Absorbancia media	Desviación estándar	Máxima	Mínima
24	0,7681	0,11	0,9282	0,7067
48	0,7978	0,07	0,8812	0,7265
72	1,684	0,09	1,747	1,5615
96	1,5	0,06	1,5784	1,4610

Para elegir la densidad celular inicial, se tiene en cuenta que sea un número de células suficientemente bajo, para obtener una fase de crecimiento bien definida y lo más amplia posible y un número de células suficientemente elevada para que una vez que se adicione el compuesto tóxico en dicha fase exponencial, la inhibición de la viabilidad pueda ser detectada mediante la técnica colorimétrica del MTT.

Después de comparar los valores obtenidos en las curvas patrón y las curvas de crecimiento, concluimos que las inoculaciones idóneas para realizar el ensayo de citotoxicidad para los diferentes compuestos tóxicos durante un periodo de 24 horas, son las inoculaciones de 10.000 y 40.000 células/cm<sup>2</sup> para las líneas celulares VERO y AML12, respectivamente. Esta diferencia es debida a que dichas líneas celulares demuestran una cinética de crecimiento celular con respecto al tiempo desigual.

Las características de crecimiento exponencial encontradas en ambas líneas celulares y la capacidad de respuesta evaluable mediante la técnica de MTT, hacen

que puedan ser consideradas como adecuadas para la monitorización de la acción de los distintos productos tóxicos empleados en este estudio *in vitro*. Asimismo, la idoneidad de la línea celular VERO, viene precedida por la multitud de estudios existentes sobre su uso (ATCC®). En el caso de la línea celular AML12, su manipulación ha sido más compleja, ya que no presentaba la misma capacidad de adhesión a la superficie de cultivo que la línea de origen renal.

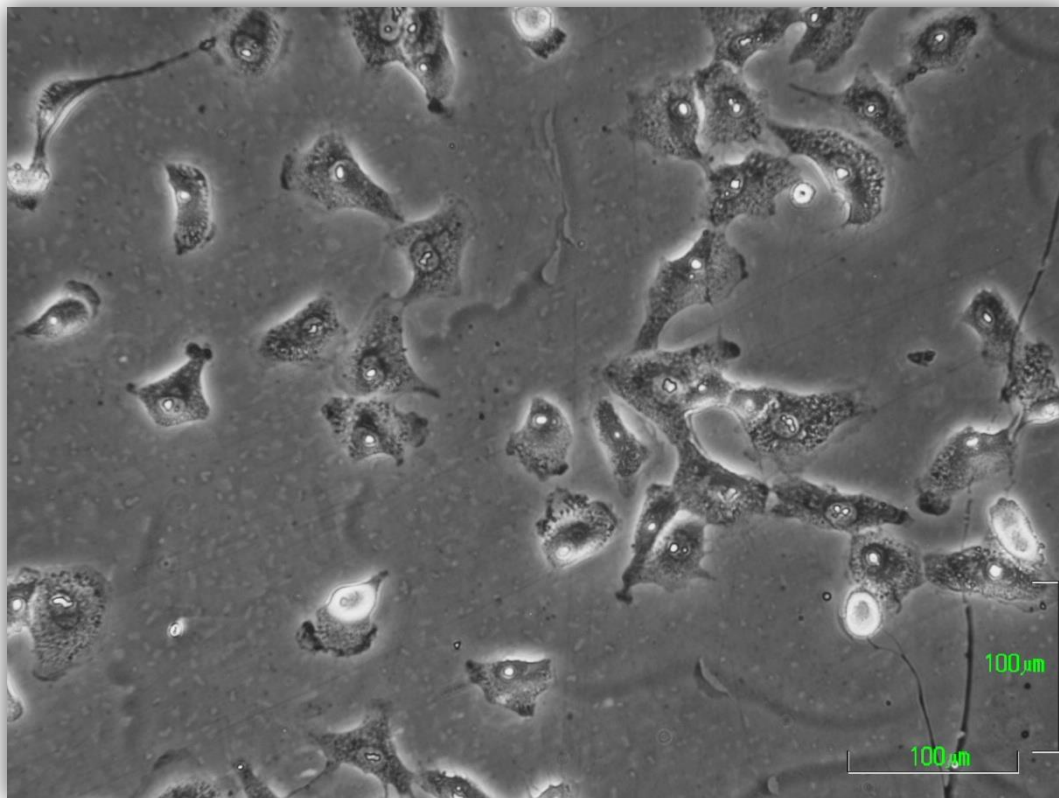
### IV.3. DETECCIÓN DE MICOPLASMAS

Tanto la línea celular VERO como la línea celular AML12 fueron procesadas antes, durante y después de llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad utilizando el ensayo de tinción de ADN con el colorante Hoechst 33258.

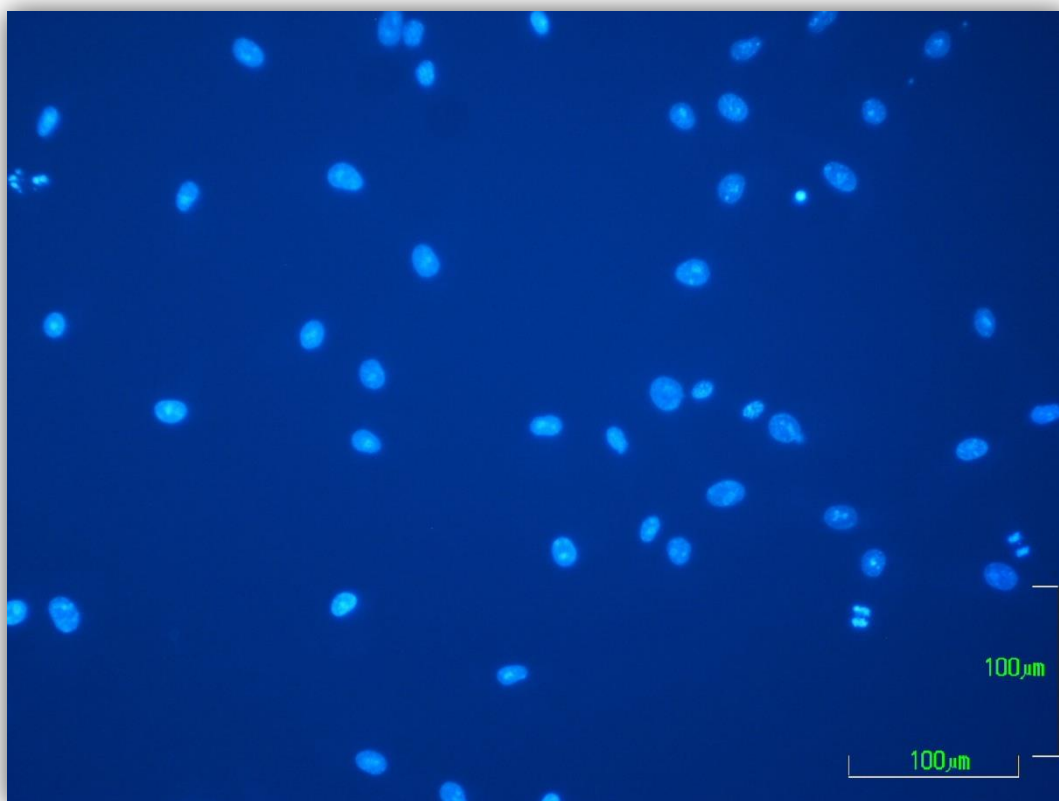
Para demostrar la ausencia de micoplasmas comparamos el mismo campo del microscopio con fluorescencia y contraste de fases, comprobando la integridad y extensión del citoplasma.

En ambas líneas celulares se aprecian núcleos intensamente teñidos y no se observa fluorescencia extranuclear, es decir, no presentan puntos uniformes de pequeño tamaño (micoplasmas) en el citoplasma ni entre las células. En el caso de la línea celular VERO se visualizan también grumos distribuidos de forma irregular en el interior del núcleo que corresponden a material genético (nucléolo).

Este hecho quedó además ratificado tras el uso del microscopio electrónico de transmisión.

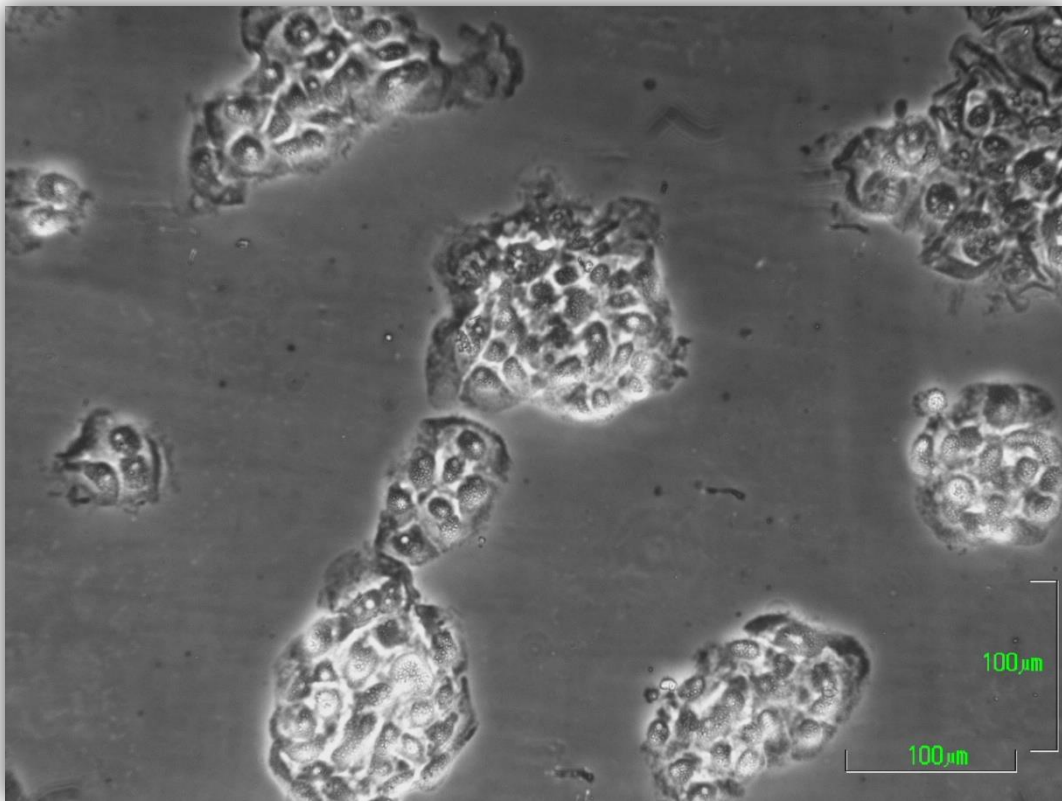


**Figura 39.** Imagen de células VERO mediante el microscopio de contraste de fases

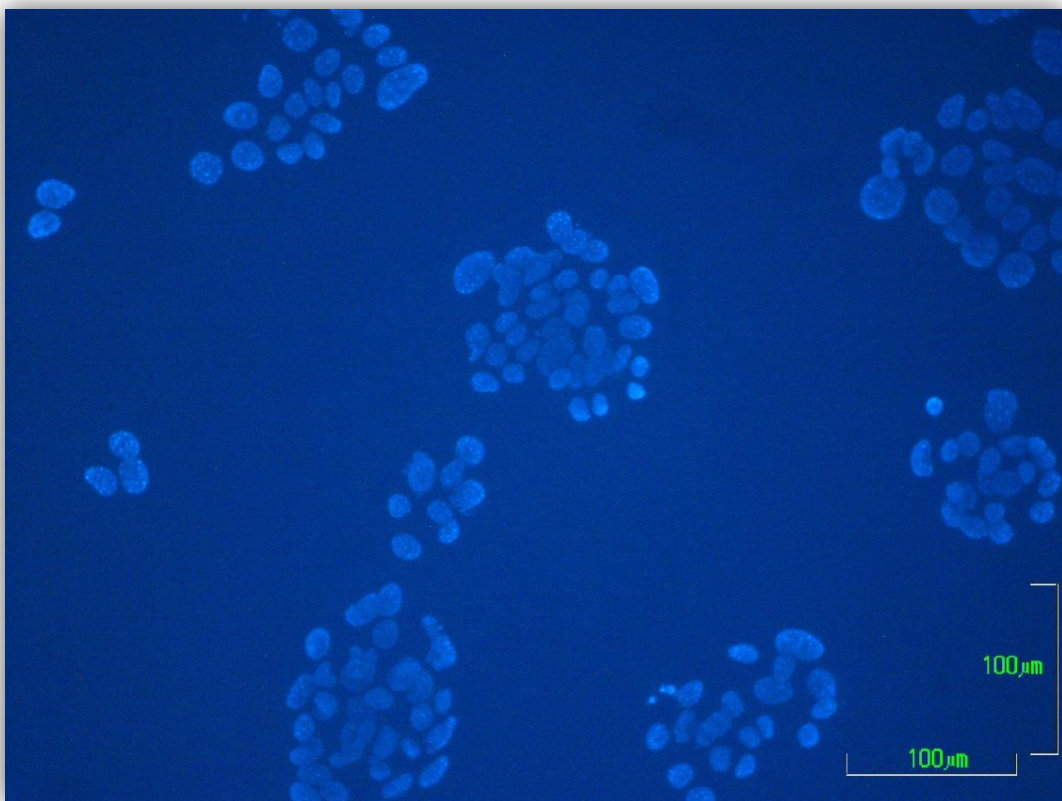


**Figura 40.** Imagen de células VERO mediante el microscopio de fluorescencia





**Figura 41.** Imagen de células AML12 mediante el microscopio de contraste de fases



**Figura 42.** Imagen de células AML12 mediante el microscopio de fluorescencia

IV. 4. CONTROL DE OSMOLARIDAD

La medida de la osmolaridad se realizó en medio de cultivo DMEM y DMEM/F12 (para las líneas celulares VERO y AML12, respectivamente) (100%), en medio de cultivo y agua Milli-Q (90%-10%) y en medio de cultivo conteniendo cloruro de cadmio, nitrato de plomo, óxido de cromo (VI) o cloruro de selenio (IV) previamente diluidas con agua Milli-Q (90%-10%).

En las siguientes tablas se pueden observar los resultados obtenidos tras las mediciones de osmolaridad.

**Tabla 27.** Valores de osmolaridad para las preparaciones de la línea celular VERO

<b>Osmolaridad en medios de línea celular VERO (mmol/kg)</b>				
<b>Medio de cultivo (100%)</b>				<b>299 mmol/kg</b>
<b>Medio de cultivo/Agua Milli-Q (90%-10%)</b>				<b>265 mmol/kg</b>
<b>Concentraciones (mM)</b>	<b>CdCl<sub>2</sub></b>	<b>Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>CrO<sub>3</sub></b>	<b>SeCl<sub>4</sub></b>
<b>0,0001</b>	264	*		291
<b>0,0005</b>	262	*		277
<b>0,001</b>	260	*		270
<b>0,0025</b>	*	*		276
<b>0,005</b>	270	*		272
<b>0,01</b>	263	*		269
<b>0,025</b>	264	*		*
<b>0,05</b>	267	269		269
<b>0,1</b>	267	268		268
<b>0,5</b>	265	268		272
<b>1</b>	*	270	260	*
<b>1,5</b>	*	270	*	*
<b>1,75</b>	*	271	*	*
<b>2</b>	*	271	*	*
<b>2,5</b>	*	273	*	*
<b>3</b>	*	273	*	*

**Tabla 28.** Valores de osmolaridad para las preparaciones de la línea celular AML12

<b>Osmolaridad en medios de línea celular AML12 (mmol/kg)</b>				
<b>Medio de cultivo (100%)</b>				<b>316 mmol/kg</b>
<b>Medio de cultivo/Agua Milli-Q (90%-10%)</b>				<b>279 mmol/kg</b>
<b>Concentraciones (mM)</b>	<b>CdCl<sub>2</sub></b>	<b>Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>CrO<sub>3</sub></b>	<b>SeCl<sub>4</sub></b>
0,00001	*	*	280	*
0,00005	*	*	280	*
0,0001	277	*	*	*
0,0005	278	*	281	*
0,001	272	*	281	271
0,0025	*	*	*	279
0,005	273	*	281	282
0,01	270	*	281	278
0,025	*	*	278	278
0,05	278	*	281	278
0,1	271	*	278	282
0,5	270	287	*	283
1	271	280	*	281
1,5	*	280	*	*
2	*	283	*	*
2,5	*	283	*	*
3	*	285	*	*
4	*	285	*	*

Al comparar los valores de osmolaridad obtenidos con el medio de cultivo y las diferentes sales disueltas con respecto al control, se observa que no presentan una diferencia superior al 9,8% y salvo alguna excepción (valor 291 mmol/kg en SeCl<sub>4</sub>) existe una osmolaridad similar entre los medios control (90% medio-10% Milli-Q) y los medios que llevan diluido el metal.

Con respecto a las diferencias encontradas entre ambas líneas celulares, los valores de osmolaridad son ligeramente superiores en AML12. Este hecho se debe a la diferencia en la composición de los medios de cultivos de ambas líneas.

Consecuentemente no fue necesario realizar un control de osmolaridad en los ensayos de citotoxicidad para ninguna de las dos líneas celulares.

### IV.5. CURVA DOSIS-RESPUESTA

El análisis estadístico de los resultados obtenidos para cada línea celular mediante el ensayo de MTT se llevó a cabo mediante el programa informático SigmaPlot 11.0. Los datos de todos los metales se ajustan a una regresión no lineal, concretamente a una curva logística de cuatro parámetros:

$$Y = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + \left(\frac{x}{CE_{50}}\right)^{-Hillslope}}$$

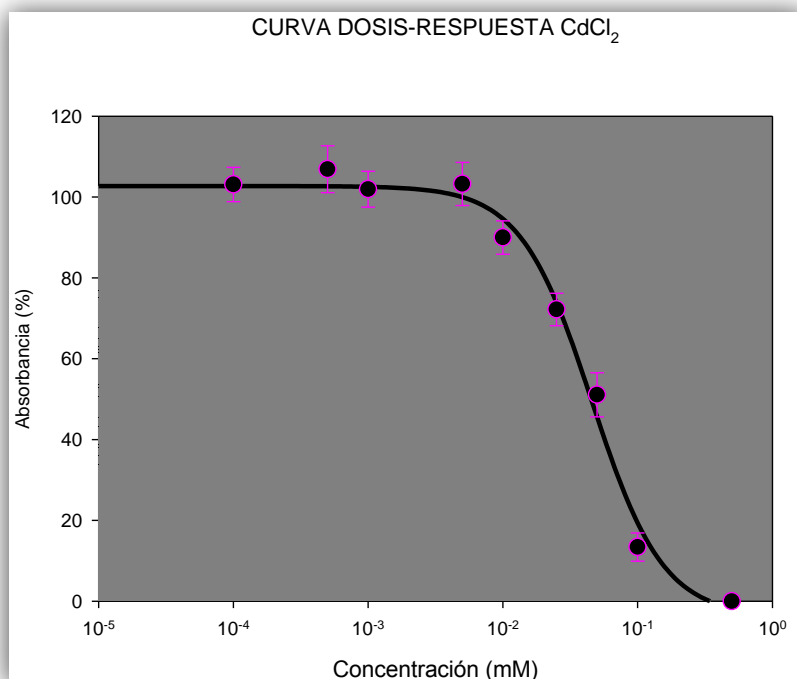
Cada punto representado en las rectas corresponde a la media de 6 medidas independientes. En las siguientes gráficas se representan las curvas dosis-respuesta para cada línea celular y cada metal.

#### IV.5.1. LÍNEA CELULAR VERO

##### IV.5.1.1. Cadmio

Tras sucesivos ensayos acotamos el rango de dosis de CdCl<sub>2</sub> en las siguientes concentraciones: 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1 y 0,5 mM. Concentraciones superiores provocan el precipitado de sales en el medio de cultivo y los datos de las medidas del lector de placas no resultan fiables.

En la siguiente imagen se pueden observar la supervivencia del cultivo utilizando como medida colorimétrica el ensayo de MTT.



**Figura 43.** Curva dosis-respuesta de la línea celular VERO tras la exposición a CdCl<sub>2</sub>

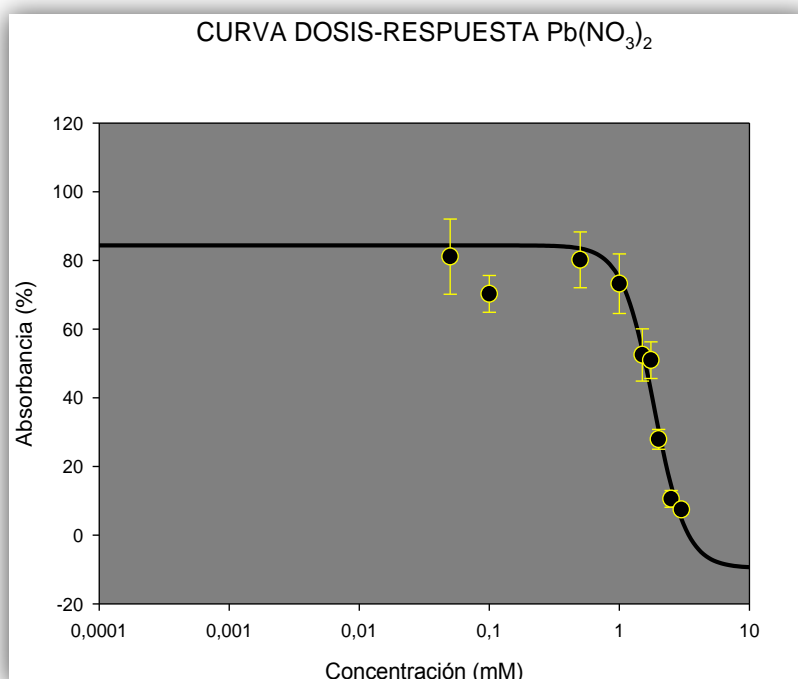
**Tabla 29.** Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de CdCl<sub>2</sub> con respecto al grupo control en la línea celular VERO

Concentraciones (mM)	Porcentaje medio	Desviación estándar	Máxima	Mínima
0,0001	103,08	4,25	108,77	97,19
0.0005	106,87	5,79	116,14	100,35
0,001	101,92	4,42	104,91	95,43
0,005	103,22	5,34	107,37	99,29
0,01	89,96	4,13	93,33	82,80
0,025	72,16	4,01	76,49	65,96
0,05	51,02	5,45	58,59	44,56
0,1	13,40	3,49	18,24	9,82
0,5	0	0	0	0

IV.5.1.2. Plomo

Con respecto al  $Pb(NO_3)_2$  las concentraciones utilizadas fueron más elevadas, puesto que en ensayos previos se comprobó que concentraciones inferiores no causaban efectos significativos sobre las células. Las concentraciones a ensayar fueron las siguientes: 0,05, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 1,75, 2, 2,5 y 3 mM.

En la siguiente gráfica se pueden advertir el tanto por ciento de células que sobreviven para cada concentración.



**Figura 44.** Curva dosis-respuesta de la línea celular VERO tras la exposición a  $Pb(NO_3)_2$

**Tabla 30.** Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de  $Pb(NO_3)_2$  con respecto al grupo control en la línea celular VERO

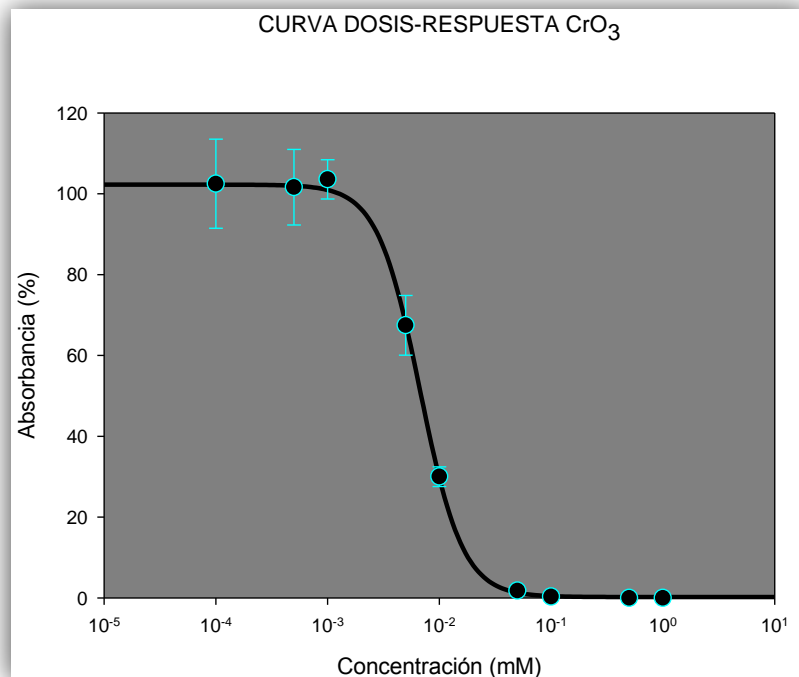
Concentraciones (mM)	Porcentaje medio	Desviación estándar	Máxima	Mínima
0,05	81,11	10,94	95,22	67,04
0,1	82,15	5,34	77,20	64,20
0,5	80,16	8,12	87,63	67,69
1	73,21	8,66	88,28	64,30

1,5	52,48	7,6	64,35	44,57
1,75	50,95	5,35	55,75	43,36
2	27,90	2,88	30,60	23,48
2,5	10,56	2,46	15,02	7,89
3	7,43	1,36	9,10	6,83

#### IV.5.1.3 Cromo

El rango de concentraciones empleado para realizar el ensayo de citotoxicidad en la línea celular VERO expuesta a  $\text{CrO}_3$  fue el siguiente: 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 y 1 mM.

En la figura 45 queda representada la viabilidad celular en términos de absorbancia con respecto al control.



**Figura 45.** Curva dosis-respuesta de la línea celular VERO tras la exposición a  $\text{CrO}_3$

**Tabla 31.** Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de CrO<sub>3</sub> con respecto al grupo control en la línea celular VERO

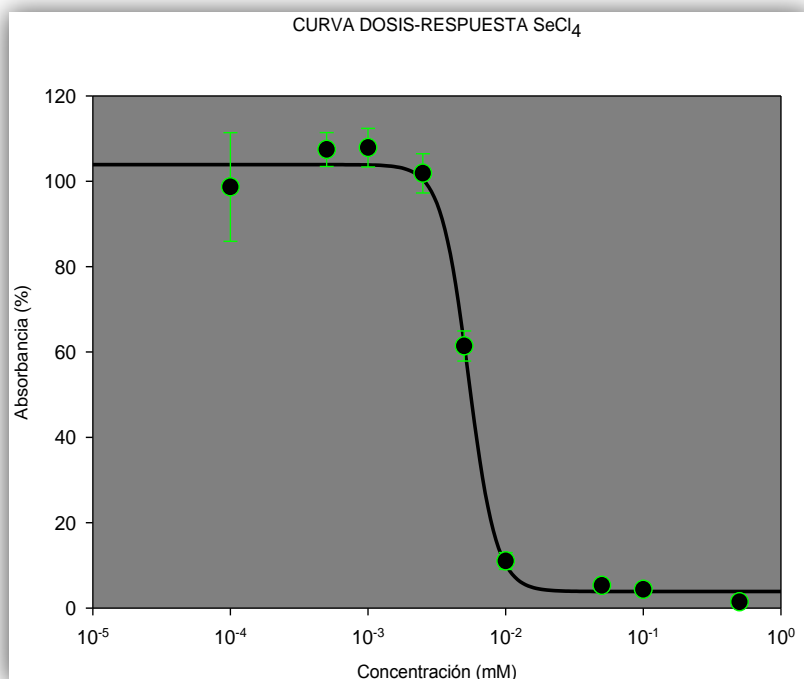
Concentraciones (mM)	Porcentaje medio	Desviación estándar	Máxima	Mínima
0,0001	102,48	10,06	116,28	93,95
0,0005	101,63	8,55	107,90	97,20
0,001	103,57	4,43	109,30	95,34
0,005	67,44	6,74	79,53	58,60
0,01	30	2,22	33,49	26,51
0,05	1,79	0,62	2,79	0,93
0,1	0,29	0,34	0,93	0
0,5	0	0	0	0
1	0	0	0	0

#### IV.5.1.4. Selenio

El ensayo de citotoxicidad en la línea celular VERO expuesta a SeCl<sub>4</sub> presenta un rango de concentraciones similares a los compuestos anteriores: 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1 y 0,5 mM.

En la siguiente figura se puede observar la correlación entre la absorbancia y el rango de concentraciones de SeCl<sub>4</sub> en la línea celular VERO.





**Figura 46.** Curva dosis-respuesta de la línea celular VERO tras la exposición a  $\text{SeCl}_4$

**Tabla 32.** Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de  $\text{CrO}_3$  con respecto al grupo control en la línea celular VERO

Concentraciones (mM)	Porcentaje medio	Desviación estándar	Máxima	Mínima
0,0001	98,66	11,01	111,32	86,50
0,0005	107,43	3,44	110,85	102,40
0,001	107,88	4,12	114,56	102,52
0,0025	101,85	4,11	107,65	97,12
0,005	61,40	3,22	65,67	56,08
0,01	11,02	1,80	13,85	9,04
0,05	5,27	1,19	7,68	4,18
0,1	4,34	0,66	5,45	3,35
0,5	1,43	0,49	2,29	0,79

En la siguiente tabla se puede comprobar que la ecuación empleada se ajusta de forma adecuada a los datos.

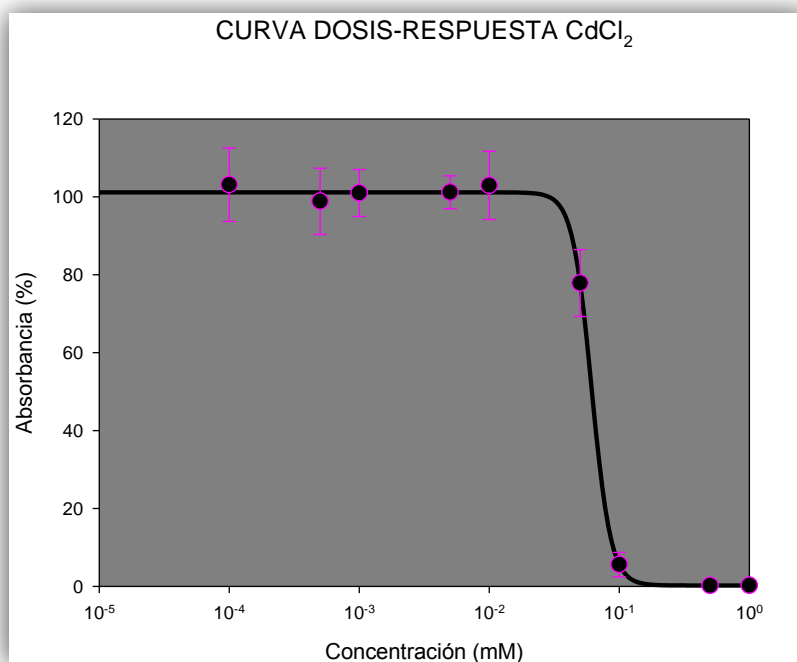
**Tabla 33.** Valores que indican el ajuste entre la ecuación y los datos correspondientes a línea celular VERO

Línea celular VERO				
	Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	Coefficiente de correlación (R)	Ajuste de $R^2$	Error estándar
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	0,9817	0,9908	0,9806	5,3677
<b>Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	0,9143	0,9562	0,91	9,6755
<b>CrO<sub>3</sub></b>	0,9940	0,9880	0,9874	5,2530
<b>SeCl<sub>4</sub></b>	0,9897	0,9948	0,9890	4,9038

#### IV.5.2. LÍNEA CELULAR AML12

##### IV.5.2.1. Cadmio

El rango en el cual mostraba su efecto el CdCl<sub>2</sub> usando la técnica del MTT fue el siguiente: 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 y 1 mM. Los valores empleados son similares a los utilizados con la línea celular VERO. En la figura 47 se puede observar la relación obtenida entre la absorbancia y las concentraciones seleccionadas.



**Figura 47.** Curva dosis-respuesta de la línea celular AML12 tras la exposición a CdCl<sub>2</sub>

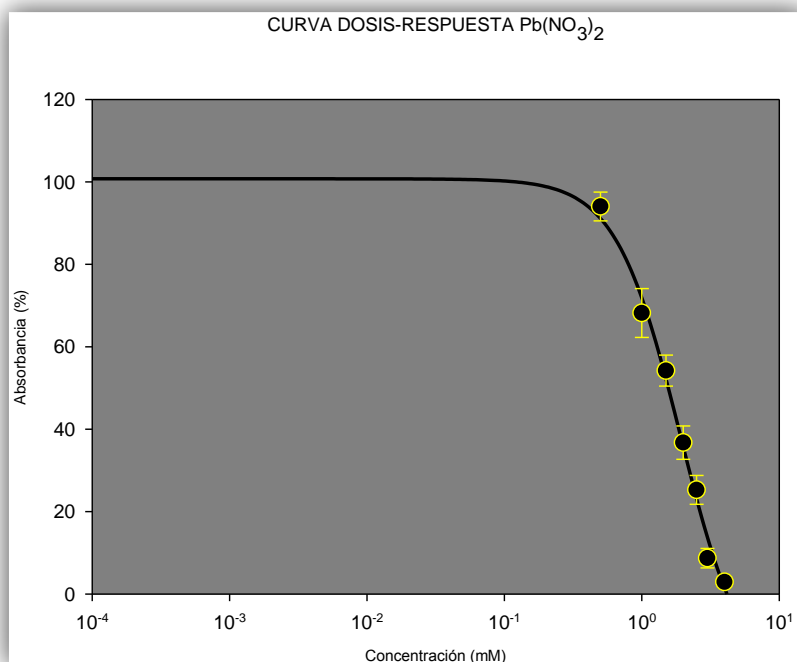
En el caso de las células AML12 expuesta a  $\text{CdCl}_2$  se observa como los datos comprendidos entre 0,0001 y 0,01 mM presentan valores similares de absorbancia, por lo que no se ven afectadas significativamente por el tóxico en este rango.

**Tabla 34.** Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de  $\text{CdCl}_2$  con respecto al grupo control en la línea celular AML12

Concentraciones (mM)	Porcentaje medio	Desviación estándar	Máxima	Mínima
0,0001	103,12	9,41	115,78	93,55
0,0005	98,85	8,50	106,80	85,90
0,001	100,98	6,01	108,67	93,97
0,005	101,17	4,22	105,73	95,42
0,01	102,93	8,75	111,80	91,14
0,05	77,86	8,59	90,42	71,69
0,1	5,60	3,13	10,54	4,70
0,5	0,21	0,46	1,14	0
1	0,25	0,32	0,78	0

#### IV.5.2.2. Plomo

Las concentraciones empleadas para el  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  son más elevadas que el resto de compuestos, ya que los efectos citotóxicos de esta sal se aprecian a concentraciones mayores: 0'5, 1, 1'5, 2, 2'5, 3, y 4 mM. Como muestra la gráfica de la curva dosis-respuesta (Fig. 48), no se han podido evaluar dosis superiores a 4 mM que provocarían la pérdida de viabilidad total de las células, debido a que concentraciones superiores provocan el precipitado de las sales del medio al entrar en contacto con el tóxico.



**Figura 48.** Curva dosis-respuesta de la línea celular AML12 tras la exposición a  $Pb(NO_3)_2$

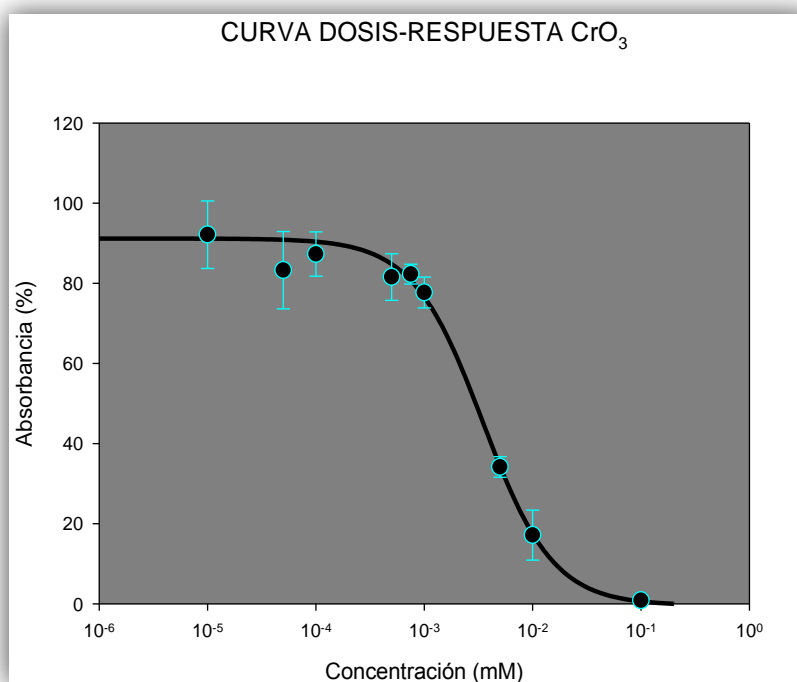
En la tabla 35 se pueden apreciar los valores de absorbancia (%) obtenidos para las distintas concentraciones empleadas para realizar la curva de dosis-respuesta para la línea celular AML12 expuesta a  $Pb(NO_3)_2$ .

**Tabla 35.** Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de  $Pb(NO_3)_2$  con respecto al grupo control en la línea celular AML12

Concentraciones (mM)	Porcentaje medio	Desviación estándar	Máxima	Mínima
0,5	94,04	3,49	95,97	89,73
1	68,18	5,91	76,46	61,35
1,5	54,21	3,76	60,47	51,42
2	36,72	4,05	42,75	32,24
2,5	25,28	3,50	30,49	21,36
3	8,70	2,37	12,50	6,40
4	2,93	0,92	3,37	1,75

## IV. 5.2.3. Cromo

En esta línea celular las concentraciones de  $\text{CrO}_3$  que delimitan la viabilidad o la muerte de la totalidad del cultivo tras 24 horas de exposición estaba comprendida entre  $10^{-5}$  y 0,1 mM, con concentraciones intermedias de  $5 \cdot 10^{-5}$ , 0,0001, 0,0005, 0,00075, 0,001, 0,005 y 0,01 mM. La curva obtenida representando la supervivencia en términos de absorbancia queda representada en la figura 49.



**Figura 49.** Curva dosis-respuesta de la línea celular AML12 tras la exposición a  $\text{CrO}_3$

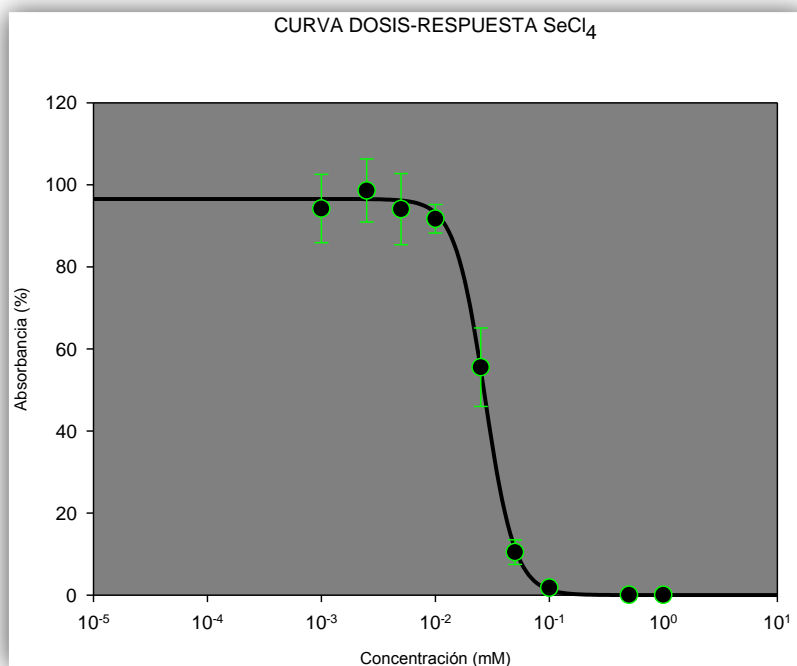
Al contrario que con el  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  las concentraciones utilizadas para el  $\text{CrO}_3$  son menores debido a que este compuesto causa un mayor efecto citotóxico sobre esta línea celular de origen hepático como se puede observar en la tabla 36.

**Tabla 36.** Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de CrO<sub>3</sub> con respecto al grupo control en la línea celular AML12

Concentraciones (mM)	Porcentaje medio	Desviación estándar	Máxima	Mínima
10 <sup>-9</sup>	92,13	8,43	99,60	78,76
5·10 <sup>-5</sup>	83,27	9,65	98,74	70
0,0001	87,30	5,51	94,16	81,83
0,0005	81,57	5,80	89,07	76,65
0,00075	82,28	2,48	85,45	79,11
0,001	77,69	3,85	84,55	74,38
0,005	34,16	2,57	37,09	30,15
0,01	17,15	6,23	18,06	7,50
0,1	0,85	0,09	0,97	0,76

#### IV.5.2.4. Selenio

Tras los sucesivos ensayos realizados previamente, el rango de concentraciones de SeCl<sub>4</sub> utilizado para llevar a cabo el ensayo de citotoxicidad mediante la técnica colorimétrica de MTT fue el siguiente: 0,001, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,5 y 1 mM. La curva obtenida queda representada en la figura 50.



**Figura 50.** Curva dosis-respuesta de la línea celular AML12 tras la exposición a SeCl<sub>4</sub>

Como se puede apreciar en la tabla 37, los valores mínimos de concentraciones empleados son levemente superiores a los de CdCl<sub>2</sub> y CrO<sub>3</sub> y los máximos son inferiores a los empleados para el Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

**Tabla 37.** Porcentajes de células vivas en función de las concentraciones utilizadas de SeCl<sub>4</sub> con respecto al grupo control en la línea celular AML12.

Concentraciones (mM)	Porcentaje medio	Desviación estándar	Máxima	Mínima
0,001	94,23	8,33	105,52	82,45
0,0025	98,62	7,69	108,80	90,31
0,005	94,08	8,68	108,54	86,14
0,01	91,73	3,48	97,03	87,70
0,025	55,55	9,56	69,06	40,62
0,05	10,49	2,99	15,20	8,54
0,1	1,78	0,93	3,33	0,83
0,5	0,07	0,11	0,26	0
1	0,06	0,09	0,20	0

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros empleados para medir la bondad del ajuste muestran unos valores adecuados, como queda reflejado en la siguiente tabla.

**Tabla 38.** Valores que indican el ajuste entre la ecuación y los datos correspondientes a línea celular AML12

Línea celular AML12				
	Coeficiente de determinación ( $R^2$ )	Coeficiente de correlación (R)	Ajuste de $R^2$	Error estándar
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	0,9866	0,9933	0,9858	5,5776
<b>Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	0,9856	0,9928	0,9845	4,2415
<b>CrO<sub>3</sub></b>	0,9652	0,9824	0,9630	6,6199
<b>SeCl<sub>4</sub></b>	0,9856	0,9928	0,9848	5,4865

Una vez obtenidos los valores de concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) a partir del programa informático SigmaPlot 11.0 sobre ambas líneas celulares expuestas a los cuatro compuestos, obtenemos las siguientes observaciones:

- Para el cadmio, evaluando la población de individuos adultos, el 75% superan la  $CE_{50}$  (tabla 39). Las concentraciones medias obtenidas a partir de tejido renal de pingüinos adultos en estudios previos (Jerez *et al.*, 2013a) superan la  $CE_{50}$  para este compuesto en la línea celular VERO de origen renal. Sin embargo, ninguno de los individuos juveniles o pollos presentan niveles superiores a la  $CE_{50}$  (Jerez *et al.*, 2013a y 2013b).
- En el caso del plomo, las concentraciones medias obtenidas a partir de individuos adultos y pollos, no superan la  $CE_{50}$  para este compuesto (tabla 39). Ninguno de los ejemplares adultos, juveniles o pollos superan la  $CE_{50}$  para este compuesto y la concentración máxima encontrada sólo representa el 0,085% de la  $CE_{50}$ .
- En cuanto al cromo encontramos más diferencias (tabla 39); las concentraciones encontradas en adultos y pollos son similares a la  $CE_{50}$  para este compuesto; el 11,11% de los individuos adultos superan esta concentración y entre los pollos 4 ejemplares tienen concentraciones superiores a la  $CE_{50}$  (26,7%). No obstante, las medias encontradas en



ejemplares juveniles superan la  $CE_{50}$  ampliamente (el 60% de los ejemplares juveniles).

- En lo relativo al selenio, todas las concentraciones halladas en individuos adultos, juveniles y pollos superan de forma acusada la  $CE_{50}$  para este compuesto, por lo que podría existir un efecto elevado a nivel citotóxico en dichos ejemplares (tabla 39).

**Tabla 39.** Concentraciones medias de individuos adultos, juveniles y pollos y  $CE_{50}$  hallada en la línea celular VERO expuesta a las diferentes sales (\* niveles no detectables)

LÍNEA CELULAR VERO	Tóxico	Media adultos (mM)	Media juveniles (mM)	Media pollos (mM)	$CE_{50}$ (mM)
	CdCl <sub>2</sub>	1,37	0,012	0,0027	0,0457±0,0024
Pb (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,000724	*	0,00045	1,8493±0,1848	
CrO <sub>3</sub>	0,005	0,1	0,0075	0,0067±0,0002	
SeCl <sub>4</sub>	0,45	0,145	0,098	0,0054±0,0001	

Al comparar las concentraciones obtenidas a partir de tejido hepático de pingüinos adultos, juveniles y pollos con la  $CE_{50}$  obtenida para la línea celular AML12 de origen hepático expuesta a los diferentes compuestos, obtenemos las siguientes observaciones:

- En lo referente al cadmio, en los individuos adultos el 41,7% de los ejemplares superan la  $CE_{50}$  y la media de las concentraciones de cadmio en adultos suponen el doble con respecto a la  $CE_{50}$ , por lo que produciría un efecto tóxico sobre la célula. Sin embargo, las concentraciones de ejemplares juveniles y pollos son ampliamente inferiores (tabla 40).
- Del mismo modo que en la línea celular VERO, las concentraciones de plomo en individuos adultos y pollos están muy por debajo de la  $CE_{50}$  para el nitrato de plomo. La concentración máxima solo representa el 0,047% de la  $CE_{50}$  de nitrato de plomo para las células AML12 (tabla 40).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- En el caso del cromo, el 83,4% de los ejemplares adultos superan la  $CE_{50}$ ; en juveniles 3 de 5 individuos está por debajo de este valor y en cuanto a los pollos, el 53,4% superan el valor de la  $CE_{50}$  obtenida para el óxido de cromo (VI), para el cual la célula tiene un rango de supervivencia bajo (tabla 40).
- Por último en lo referente al selenio las concentraciones de adultos, juveniles y pollos son similares y superan moderadamente el valor de la  $CE_{50}$  de las células AML12 para el cloruro de selenio (IV) (tabla 40).

**Tabla 40.** Concentraciones medias de individuos adultos, juveniles y pollos y  $CE_{50}$  hallada en la línea celular AML12 expuesta a las diferentes sales (\*niveles no detectables)

LÍNEA CELULAR AML12	Tóxico	Media adultos (mM)	Media juveniles (mM)	Media pollos (mM)	$CE_{50}$ (mM)
	CdCl <sub>2</sub>	0,12	0,00315	0,00073	0,0613±0,0022
Pb (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,000434	*	0,000576	1,9058±0,1495	
CrO <sub>3</sub>	0,006	0,0082	0,0095	0,0035±0,0003	
SeCl <sub>4</sub>	0,09	0,09	0,064	0,0272±0,0008	

En ambas líneas celulares los compuestos que presentan mayores  $CE_{50}$  son el Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> seguido por el CdCl<sub>2</sub>. En el caso de la línea celular VERO el compuesto que tiene una menor  $CE_{50}$  es el SeCl<sub>4</sub>, por lo que sería el compuesto más tóxico para tejido renal. Sin embargo, en el caso de la línea celular AML12, el compuesto con menor  $CE_{50}$  es el CrO<sub>3</sub>, y por lo tanto la sal más potencialmente tóxica para tejido hepático (tabla 41).

**Tabla 41.** Comparación de la  $CE_{50}$  en cada línea celular con los cuatro metales.

$CE_{50}$	
Línea celular VERO	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> > CdCl <sub>2</sub> > CrO <sub>3</sub> > SeCl <sub>4</sub>
Línea celular AML12	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> > CdCl <sub>2</sub> > SeCl <sub>4</sub> > CrO <sub>3</sub>

Si comparamos los valores de  $CE_{50}$  de cada metal en ambas líneas celulares encontramos los siguientes resultados (tablas 39, 40 y 42):

- En el  $CdCl_2$  el valor también es mayor para la línea AML12 (25%).
- En el  $Pb(NO_3)_2$  el valor es levemente mayor para la línea AML12 (3%).
- En el  $CrO_3$  el valor es mayor para la línea celular VERO, concretamente el doble que para AML12 (50%).
- En el  $SeCl_4$  existe mucha más diferencia entre ambas líneas celulares, siendo muy superior el valor de  $CE_{50}$  para la línea AML12 con respecto a la línea VERO (80%).

Resultados similares pueden encontrarse en otros autores. Fischer (1972) estudió el efecto que provocaba el cadmio, plomo y mercurio sobre fibroblastos de ratón (L925) comprobando que las  $CI_{50}$  seguían el siguiente orden  $Pb$  (0,04 mM) >  $Hg$  (0,013 mM) >  $Cd$  (0,0075 mM). Dichas concentraciones son inferiores a las halladas en nuestro estudio (tablas 39 y 40). Esta diferencia puede estar causada por el origen de cada línea celular, siendo los fibroblastos más sensibles a estos metales. Aunque de la misma forma que en nuestro trabajo, se observa que el cadmio es más tóxico que el plomo. En años posteriores Skerb y Fischer (1984) también observaron el mismo patrón en células HeLa y en la línea celular de hámster chino (V79), donde el cadmio provocaba una toxicidad más aguda.

Como se ha comentado anteriormente, el cadmio es el metal con más referencias encontradas a nivel celular. Existen diferentes estudios que muestran su efecto en líneas celulares de peces (Babich *et al.*, 1986; Bayoumi *et al.*, 1999). Estos estudios también muestran una mayor sensibilidad celular al cadmio frente al plomo. Morcillo *et al.*, 2016 detectaron el siguiente patrón de toxicidad para el valor de  $CE_{50}$  mediante MTT tras 24 horas de exposición en fibroblastos de dorada (SAF-1):  $MeHg$  (0,018 mM) <  $As$  (0,03 mM) <  $Cd$  (0,1 mM) <  $Hg$  (0,3 mM) <  $Pb$  (3,4 mM). Estos valores son superiores a los hallados en nuestro estudio, por lo que las células de origen renal y hepático de mono y ratón, podrían ser más sensibles a dichos compuestos que las de peces.

Dentro de los compuestos formados por cadmio, existen estudio que muestran una  $CE_{50}$  mayor para el  $CdCl_2$  frente a  $CdSO_4$  a concentraciones entre  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  M en células de riñón del túbulo proximal de cerdo (LLC-PK1), midiendo la citotoxicidad mediante la captación de rojo neutro tras 24 horas de exposición a ambas sales

(Barrouillet *et al.*, 2001). Por lo tanto, también hay que tener en cuenta las posibles diferencias encontradas dependiendo de la fórmula química del metal.

Existen diferentes estudios que muestran  $CE_{50}$  similares a las halladas en el presente trabajo (0,0457 mM para cadmio y 1,9043 mM para plomo, en el caso de la línea VERO y 0,0613 mM para cadmio y 1,9058 mM para plomo, en el caso de la línea AML12). Keogh *et al.* (1994), comprobaron mediante la técnica de rojo neutro (RN) que tras 48 horas de exposición a cloruro de cadmio y nitrato de plomo en una línea celular epitelial intestinal (I-407), las  $CL_{50}$  fueron de 0,053 y 1,99 mM, respectivamente.

Romero (1998) comprobó que las líneas de origen renal BGM y VERO mostraban una  $CE_{50}$  para el cloruro de cadmio de 0,084 y 0,066 mM mediante MTT y de 0,079 y 0,062 mM mediante la técnica de RN. Mientras que para el nitrato de plomo los valores que obtuvo fueron de 1,77 y 1,89 mM mediante MTT y de 1,9 y 1,73 mM mediante RN. Estos valores muestran una diferencia menor del 1% con respecto a la  $CE_{50}$  hallada en el presente estudio (1,9043 y 1,9058 mM para el nitrato de plomo en células VERO y AML12 respectivamente).

Olabarrieta *et al.* (2001), comprobaron que la línea celular LLC-PK1 (células epiteliales renales de cerdo) muestra una  $CL_{50}$  de 0,05 mM de cloruro de cadmio tras 24 horas de exposición mediante MTT, frente a 0,0457 y 0,0613 mM halladas en VERO y AML12.

Estudios recientes elaborados por Sinha *et al.* (2014), establecen una  $CL_{50}$  de 0,02 y 0,05 mM de cloruro de cadmio para dos líneas celulares SK-RC-45 (células renales de carcinoma humano) y NKE (células renales normales). Esta última línea celular presenta una  $CE_{50}$  similar a la encontrada por este trabajo en VERO. La diferencia con la línea celular SK-RC-45 puede hallarse en su origen carcinogénico.

En lo referente al cromo y al selenio son mucho menores las referencias encontradas con respecto a su citotoxicidad a nivel *in vitro*. Uroz *et al.* (2008), señalaron que la  $CE_{50}$  para el hidrato de cromo en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de rata fueron de 0,00534 mM y 0,0246 mM respectivamente, mostrando la primer tipo celular una diferencia con respecto a nuestras líneas celulares de alrededor de 0,001 mM. Estas diferencias pueden ser consecuencia del tipo de línea celular empleada y del tipo de compuesto químico de cromo usado. Como en diversos estudios mencionados anteriormente (Bagchi *et al.*, 2002; Wise *et al.*, 2002), el cromo

causa una disminución de la viabilidad dependiente de la concentración de metal empleada, mostrando en el presente estudio un porcentaje de viabilidad para juveniles < pollos < adultos para la línea celular VERO y pollos < juveniles < adultos para la línea celular AML12 (tabla 43).

Como indicamos anteriormente, los ensayos citotóxicos para compuestos de selenio se han realizado sobre todo en compuestos de naturaleza orgánica. Misra y Niyogi (2009) señalan la posible toxicidad del selenito de sodio en hepatocitos de peces (trucha arco iris) estableciendo una  $DL_{50}$  de 587  $\mu\text{M}$ . Esta dosis es muy superior a las halladas en este estudio para VERO y AML12 (5,4 y 27,2  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Esto podría deberse, como hemos indicado anteriormente, al origen de la línea celular (peces muestra mayor resistencia a los compuestos tóxicos) y a la naturaleza del compuesto empleado. Casaril *et al.* (2015), muestra mediante el ensayo de MTT efectos citotóxicos a dosis de 500  $\mu\text{M}$  de PSAP ( $\alpha$ -fenilselenil acetofenona) tras 24 y 48 horas en células de ovario de hámster chino. En nuestro estudio la pérdida de viabilidad es evidente a concentraciones menores.

También se presentan diferentes estudios donde se comprueban los efectos citotóxicos del selenio sobre diferentes líneas celulares de carcinoma humano. Así, Romano *et al.* (2015), estudia los efectos del selenocianato y diseleniuro sobre carcinoma de pulmón (HBT-54), leucemia linfocítica (CCRF-CEM), adenocarcinoma de mama (MCF-7) y adenocarcinoma de próstata (PC-3), siendo la primera menos sensible (sólo dos compuestos presentan  $GI_{50}$  inferiores a 10  $\mu\text{M}$ ), frente a las otras tres líneas celulares (17 compuestos, 18 compuestos y 19 compuestos respectivamente muestran niveles inferiores a 10  $\mu\text{M}$ ). Estudios recientes (Alcolea *et al.*, 2016) muestran  $CI_{50}$  inferiores a 10  $\mu\text{M}$  tras 72 horas de exposición a cuatro derivados diferentes de selenourea en seis líneas celulares de carcinoma humano (melanoma, 1205Lu; carcinoma de pulmón, A549; carcinoma de próstata, DU145; carcinoma colorrectal, HCT116; carcinoma epitelioide de páncreas, PANC- 1 y adenocarcinoma de páncreas, BxPC3). Estas concentraciones son mayores en comparación con la  $CE_{50}$  de VERO, pero superiores a la de AML12. Esto puede ser consecuencia, como hemos indicado anteriormente a la naturaleza cancerígena de dichas líneas celulares y al origen orgánico de los compuestos empleados.

**Tabla 42.** Comparación de la CE<sub>50</sub> de cada metal en ambas líneas celulares.

CE <sub>50</sub>	
Cadmio	AML12>VERO
Plomo	AML12>VERO
Cromo	VERO>AML12
Selenio	AML12>VERO

Los datos mostrados en la tabla 44 indican que todos los compuestos estudiados, salvo el cromo afectan en un mayor grado sobre la viabilidad de la línea celular de origen renal (VERO) en comparación con la línea celular de origen hepático (AML12). Zhang *et al.*, (2007) también comprobaron que el cloruro de cadmio tenía un índice mayor de citotoxicidad en la línea celular de origen renal (HK-2) frente a otra de origen hepático (Bel-7402) mediante la técnica del RN (los valores de CI<sub>50</sub> para HK-2 y Bel-7402 fueron de 1,35±0,21 y 3,73±0,2 µg/ml, respectivamente). Esto podría extrapolarse a otros compuestos tóxicos (metales o semimetales) que serían potencialmente más tóxicos para las células de origen renal que para las de origen hepático. Sería necesario llevar a cabo nuevos estudios que comparasen CE<sub>50</sub> de diferentes compuestos en distintas líneas celulares.

En lo referente al cromo, la bibliografía consultada indica que sus compuestos se distribuyen por todo el cuerpo, especialmente en el hígado, bazo y riñón. La ingestión accidental de dosis altas de cromo hexavalente puede causar insuficiencia renal aguda debido a necrosis tubular aguda o fallo hepático. Los resultados obtenidos a partir de este estudio muestran una CE<sub>50</sub> menor en las células hepáticas y por lo tanto una mayor citotoxicidad que sobre la línea celular VERO. El cromo actúa sobre el NADH y modifica la respiración celular que tiene lugar en las mitocondrias generando estrés oxidativo (Ryberg y Alexander, 1990). Estudios recientes (Kury, Milczarck y Debski, 2014) constatan que también afecta al transporte transmembrana de los ácidos grasos en las mitocondrias. El elevado número de mitocondrias en células metabólicamente activas como los hepatocitos (Bruce *et al.*, 1994) podía explicar su mayor citotoxicidad en la línea celular AML12, por lo que esta diferencia podrían ser consecuencia del origen de las líneas celulares, que puede condicionar la respuesta a la acción de los compuestos tóxicos constatado mediante sistemas *in vivo* (Soria *et al.*, 1995). Sería necesario realizar estudios posteriores en diferentes líneas celulares de origen renal y hepático para poder comparar nuestros resultados.

**Tabla 43.** % de viabilidad con respecto al control de las distintas concentraciones medias. (\* Concentración mayor al límite superior del rango de concentraciones empleadas en el estudio estadístico. \*\* Valores similares al control. \*\*\* Concentración menor al límite inferior del rango de concentraciones empleadas en el estudio estadístico).

		<b>Cd</b>	<b>Pb</b>	<b>Cr</b>	<b>Se</b>
<b>VERO</b>	Adultos	*	***	67.91	3.8868
	Juveniles	99.54	-	0.439	3.88686
	Pollos	**	***	44.923	3.88714
<b>AML12</b>	Adultos	2.1247	***	29.875	0.786711
	Juveniles	**	-	22.1892	0.786711
	Pollos	**	***	19.0445	2.15194

La concentración media hallada en individuos adultos para el cadmio (1,37 mM) es muy superior a la concentración más alta empleada por el método estadístico para calcular la CE<sub>50</sub> (0,5 mM) en la línea celular VERO, no pudiéndose incluir dentro del rango de concentraciones porque se produce el precipitado de la sal. Esta concentración causa un efecto significativo sobre la viabilidad celular de VERO ya que cuando inoculamos una concentración de 0,5 mM, el porcentaje con respecto al control es 0 (Fig. 43). Este hecho queda patente con los resultados obtenidos por microscopía óptica y electrónica, donde las células tratadas con dicha concentración se muestran con un alto grado de degeneración o necrosis (Fig. 69 y 74) y con los resultados obtenidos por citometría donde provoca el 98,6% de células necrosadas o apoptóticas en fase tardía (positivas para anexina e IP, por lo tanto necróticas pero previamente apoptóticas) (Fig. 64 y tabla 46). Tanto la concentración hallada en juveniles (0,012 mM) como en pollos (0,0027 mM) presentan un % de viabilidad similar a las muestras control (100%) (tabla 43). De igual forma ocurre cuando se observan las células con el microscopio óptico; las células tratadas con la concentración juvenil muestran un cambio en su morfología (hecho que concuerda con los datos de citometría donde el 53,3% están en fase inicial de apoptosis), pero son escasas las células no viables, mientras que en el caso de las tratadas con la media de pollos no se ven afectadas (99,5% de las células son viables por citometría de flujo) (Fig. 64 y tabla 46).

En el caso de las concentraciones de plomo, ninguna de ellas se encuentra dentro del rango de concentraciones incluidas para obtener la curva dosis-respuesta (Fig. 44). La primera concentración (0,05 mM) que muestra poder causar una disminución en la viabilidad celular, es muy superior a las encontradas en individuos

adultos y pollos (0,724 y 4,5  $\mu\text{M}$ ). Con el microscopio electrónico se puede observar que el plomo es el metal que menos afecta a nivel ultraestructural y mediante citometría más del 99% de las células son viables (Fig. 64 y 70 y tabla 46).

Las concentraciones halladas para el cromo afectan al porcentaje de viabilidad de forma dependiente con la concentración media hallada para los individuos adultos, juveniles y pollos, siendo muy acusada para la concentración de juveniles (0,1 mM) que afectan casi al 100% de la población (tabla 43). Estos resultados concuerdan con los observados en microscopia óptica (Fig.71) y quedan verificados mediante el ensayo de anexina/IP donde el 30% de la población presenta muerte celular por necrosis, no mediada por apoptosis (Fig. 64 y Tabla 46).

Por último en lo referente al selenio, todas las concentraciones producen una disminución similar en el porcentaje de viabilidad muy próximo al 100% (tabla 43). De igual forma que para la concentración de cadmio hallada en adultos, las células se encuentran en un alto grado de degeneración celular cuando se observan mediante microscopía (Fig. 72 y 77) y mediante el ensayo de anexina/IP, donde más del 90% de las células se encuentran dentro del tercer y cuarto cuadrante (Fig. 63 y 64 y tabla 46).

En cuanto a la línea celular AML12, la concentración de adultos para el cadmio (0,12 mM) afecta de forma elevada sobre su viabilidad mientras que las concentraciones de juveniles (3,15  $\mu\text{M}$ ) y pollos (0,73  $\mu\text{M}$ ) son similares a las muestras control con el 100% de las células viables (tabla 43). Con el microscopio electrónico se observan células con necrosis (Fig. 84), mientras que las células expuestas a las concentraciones encontradas en juveniles y pollos (Jerez *et al.*, 2013a y 2013b), el microscopio óptico muestra una disminución de la cohesión entre células y mayor número de vacuolas, pero no restos celulares (Fig. 79). Estos datos coinciden con los de citometría donde la concentración para adultos provoca el 96% de necrosis o apoptosis tardía, mientras que para juveniles y pollos más del 90% son células viables (Fig. 67 y tabla 47).

En el caso del plomo, todas las concentraciones son inferiores a la concentración más baja empleada para el análisis estadístico (0,5 mM) (Fig. 48). Por lo que estas concentraciones, no producirían cambios destacables sobre la viabilidad celular. Si bien mediante el microscopio óptico o por citometría de flujo se pueden



apreciar algunas células degeneradas, pero no resulta el rasgo predominante (Fig. 67 y 80, tabla 47).

Para el cromo, las tres concentraciones se encuentran en un rango de porcentaje de viabilidad similares entre ellas, no siendo superior la diferencia al 10% (tabla 43). Con el microscopio óptico se aprecian grandes espacios vacíos (Fig. 81) y con el electrónico aparecen células con diferentes grados de degeneración (Fig. 87). Los resultados de citometría muestran también un alto porcentaje de muerte celular (Fig. 67 y tabla 47). Para finalizar el selenio muestra valores inferiores a los obtenidos para la línea celular VERO y similares a los encontrados en dicha línea celular para el cromo (juveniles) (tabla 43).

Como hemos indicado antes, junto con el cadmio, mediante el microscopio electrónico el selenio produce los cambios más drásticos a nivel ultraestructural (Fig. 87), apareciendo células en fase de necrosis avanzada con rotura de la membrana plasmática y morfología alargada. También presentan alta mortandad evidenciada por citometría de flujo (Fig. 67 y tabla 46).

### IV.6. CICLO CELULAR

Se ha realizado un estudio sobre el contenido celular de ADN en los cultivos de ambas líneas celulares, con el propósito de aportar datos a la caracterización tanto de ambas líneas celulares sin exposición a cadmio, plomo, cromo y selenio (controles) como de los cultivos expuestos a los cuatro elementos tóxicos. Para ello, tanto los cultivos controles como los tratados fueron sembrados simultáneamente partiendo del mismo frasco de cultivo. Una vez transcurrido el tiempo de crecimiento y de exposición, los porcentajes de células en cada fase del ciclo se analizaron mediante citometría de flujo a partir del software CellQuestPro y analizándose los resultados mediante el programa ModFit LT V2.0 (Pmac).

Mediante citometría de flujo puede analizarse la cantidad de ADN de cada una de las células de una población. En aquellas poblaciones celulares en crecimiento, puede establecerse una relación entre el contenido relativo de ADN de cada célula y la fase del ciclo celular en la que se encuentra. De esta forma puede obtenerse información sobre la capacidad proliferativa de una población celular.

Se clasifican las células en tres grupos:

- ✓ Células con una cantidad  $2n$  de ADN, que en una población en crecimiento coincidiría con las situadas en las fases G0 y G1 del ciclo celular.
- ✓ Células con una cantidad entre  $2n$  y  $4n$  de ADN, que en una población en crecimiento coincidiría con las situadas en la fase S del ciclo celular, es decir, células que se encuentran replicando del ADN.
- ✓ Células con una cantidad  $4n$  de ADN, que en una población en crecimiento coincidiría con las situadas en las fases G2 y M del ciclo celular.

Los datos correspondientes al análisis quedan reflejados en distintos tipos de gráficas:

- Histogramas, donde se representa el número de células frente a la fluorescencia emitida con respecto a las partículas analizadas (FL2-A). La fluorescencia emitida por el fluorocromo IP (excitación a 488nm y emisión a 639 nm) es proporcional a la cantidad de ADN.
  
- Gráfica de puntos (Dot Plot). En este tipo de gráfico cada punto representa una célula. En ellos se pueden representar dos datos cualesquiera uno frente a otro en un eje cartesiano: en un tipo se analiza la granulometría (SSC-H) con respecto al tamaño celular (FSC-H), de esta forma seleccionamos nuestra población objeto de estudio descartando los debrís (restos celulares); y por otro lado representamos el área del pico (FL2-A) con respecto a la amplitud del pico (FL2-W), permitiéndonos descartar los agregados celulares y las células polinucleadas.

Con respecto a algunos datos estadísticos que representa el programa ModFit LTV2.0 tienen el siguiente significado:

- CV, significativamente afecta a la exactitud de los cálculos de la fase S. Debe ser menor de 8%. Solo alcanzó valores entorno a 9% en muestras de selenio en VERO.
  
- RCS, es una medida de cómo nuestro modelo describe los datos observados. Se sugiere que los valores no sean muy superiores a 5. Este valor solo fue superado en muestras de selenio para adultos y juveniles (las concentraciones más elevadas).
  
- G2/G1, indica la relación existente entre el contenido tetraploide y diploide de ADN en la población celular analizada. Debe ser próximo a 2. Los valores tomados en nuestros ensayos oscilaron entre 1,98 y 2. Esto nos indica que las poblaciones tenían un material genético lo suficientemente homogéneo.

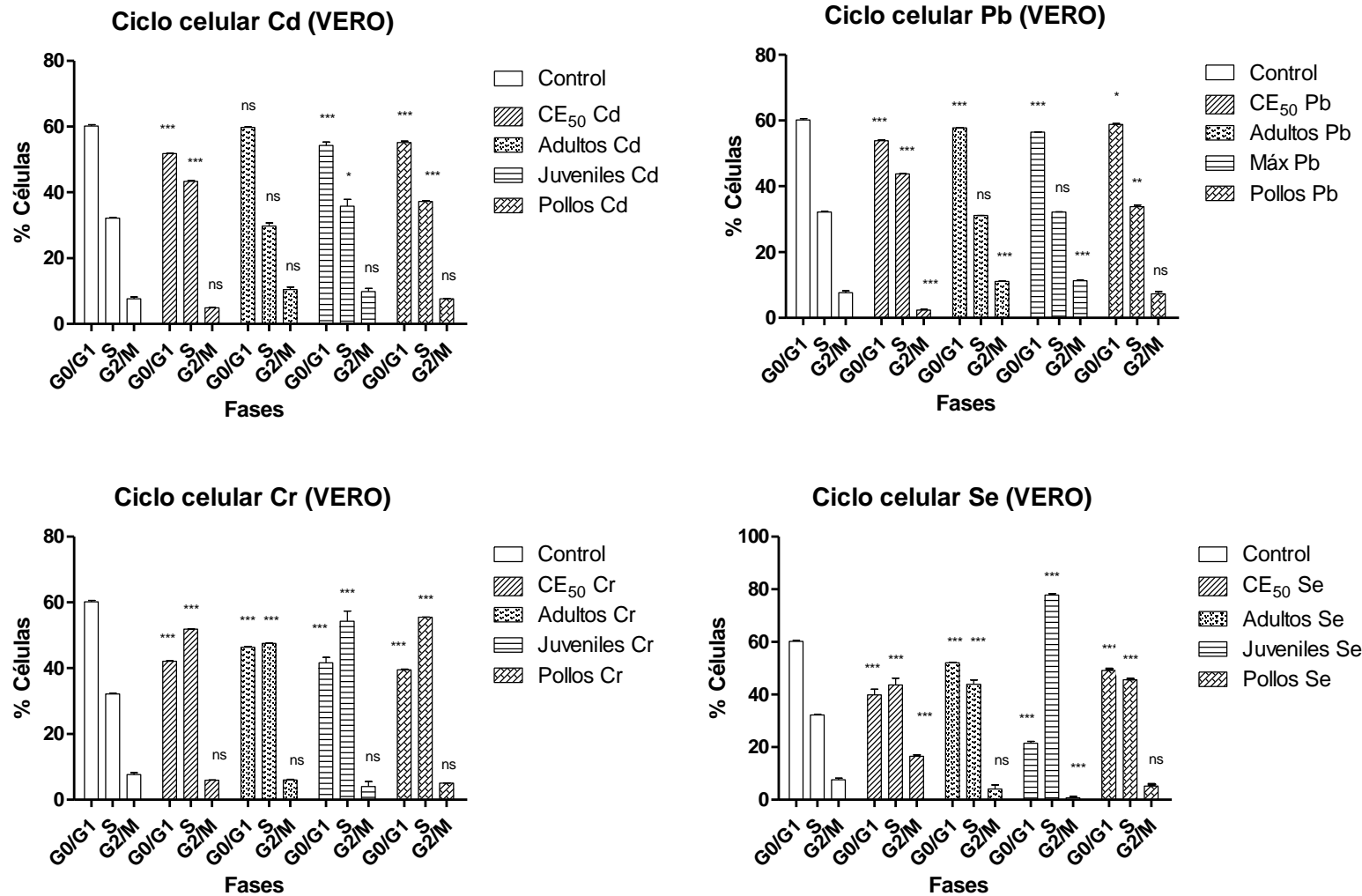
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV. 6.1. LÍNEA CELULAR VERO

En las siguientes tablas y gráficas se pueden observar los resultados obtenidos tras el análisis estadístico de los tres ensayos independientes realizados para cada una de las condiciones para la línea celular VERO:

**Tabla 44.** Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en la línea VERO (media y error estándar).

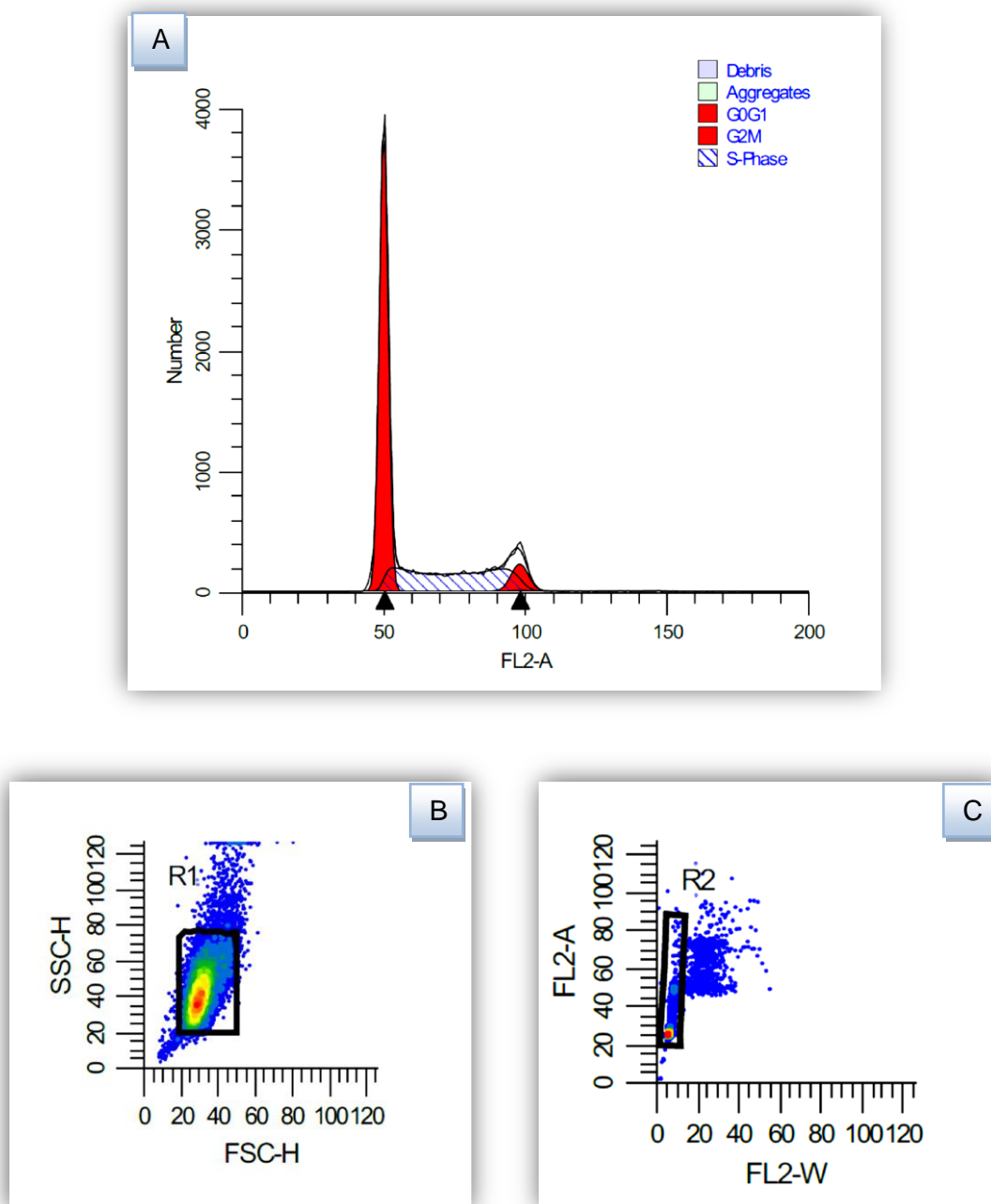
VERO	G0/G1	S	G2/M
Control	60,19±0,4	32,17±0,19	7,62±0,55
CE <sub>50</sub> Cd	51,73±0,2	43,39±0,26	4,88±0,07
Adultos Cd	59,79±0,13	29,79±0,29	10,42±0,83
Juveniles Cd	54,32±0,98	35,86±2	9,82±1,02
Pollo Cd	55,16±0,37	37,21±0,29	7,63±0,08
CE <sub>50</sub> Pb	53,81±0,19	43,8±0,05	2,39±0,18
Adultos Pb	57,76±0,09	31,11±0,08	11,12±0,07
Máxima Pb	56,47±0,08	32,19±0,76	11,33±0,07
Pollos Pb	58,85±0,22	33,85±0,45	7,30±0,64
CE <sub>50</sub> Cr	42,13±0,13	51,92±0,06	5,95±0,09
Adultos Cr	46,39±0,21	47,59±0,06	6,03±0,23
Juveniles Cr	41,65±1,67	55,33±3,04	4,02±1,48
Pollos Cr	39,47±0,22	55,52±0,32	5±0,1
CE <sub>50</sub> Se	39,9±2,13	43,59±2,65	16,5±0,54
Adultos Se	52,03±0,2	43,9±1,61	4,07±1,56
Juveniles Se	21,44±0,79	77,82±0,45	0,74±0,43
Pollos Se	49,13±0,58	45,65±0,26	5,22±0,63



**Figura 51.** Representación gráfica del estudio estadístico de ciclo celular para la línea celular VERO (Two-way RM ANOVA; \*\*\* p< 0.001, \*\* p< 0.01, \* p< 0.05 y ns p> 0.05).

IV. 6.1.1. Control

En líneas generales, la línea celular VERO presenta un 60% de sus células en fase G0/G1, un 32% en fase S y un 8% en fase G2/M (Fig. 51 y tabla 44). Las muestras control de dicha línea celular muestran un porcentaje medio de debris de 0.1% y un 0.27 % de agregados.



**Figura 52.** A. Histograma correspondiente a la muestra control. B. Dot Plot del cultivo control de VERO representando la granulometría frente al tamaño. C. Dot Plot del cultivo control VERO representando el área frente a la amplitud del pico.

## IV.6.1.2. Cadmio

Dependiendo del tipo de concentración y de de la fase del ciclo celular encontramos distintos grados de significancia respecto a las muestras control (Fig. 51). En ninguna de las concentraciones ensayadas encontramos diferencias significativas para la fase G2/M. En la  $CE_{50}$  del cadmio (0,0457 mM) se encuentran diferencias significativas con un grado de significancia del 99,9% en las fases G0/G1 y S con respecto al control. Con respecto a la concentración media hallada en adultos (1,37 mM), no se presentan diferencias significativas. En cuanto a la concentración media hallada en individuos juveniles (0,012 mM) se aprecian diferencias significativas para ambas fases con diferentes grados de significancia ( $p < 0.001$  para la fase G0/G1 y  $p < 0.05$  para la fase S). Para finalizar, en la concentración media de pollos (0,0027 mM) percibimos diferencias con un grado de significancia del 99,9% para la fase G0/G1 y la fase S. Para todas las concentraciones de cadmio la fase G0/G1 disminuye (tabla 44) y salvo en el caso de individuos adultos, donde no hallamos diferencias significativas, la fase S aumenta, sobre todo de forma acusada para la  $CE_{50}$ , lo que sugiere que el cadmio podría estar provocando la detección del ciclo celular en la fase S; los valores se mantienen iguales o bien aumentan de forma no significativa para el caso de la fase G2/M.

Meplán *et al.* (1999), indicaron que el cadmio en células cancerígenas de mama deteriora la función de la proteína p53, que cuando hay errores provoca la detección del ciclo celular en la fase G1 y G2/M. Esto podría explicar el bloqueo de las células en la fase S a altas concentraciones de cadmio, lo que impediría a las células continuar sintetizando ARN y proteínas y la posterior división celular. Mukherjee *et al.* (2004), también relacionaron la inhibición de la proteína p53 debida a cadmio. Realizaron un estudio para comprobar la toxicidad inducida por el benzopireno (BP) en fibroblastos humanos. BP produce un aumento en los niveles celulares de la proteína p53 y ésta puede activar transcripcionalmente varios genes diana, como la ciclina inhibidora de quinasa p21, que causa la detección del ciclo celular en la fase G1. Cuando las células son tratadas durante dos horas con 0,5  $\mu$ M de BPDE (último metabolito carcinogénico de BP) aumenta el porcentaje de células en la fase G1 y disminuye el número de células en fase S y G2. Pero cuando las células son también tratadas con  $CdCl_2$ , los resultados vuelven a valores similares al control de forma dependiente con la dosis de cadmio (entre 20 y 80  $\mu$ M). Por lo que los resultados manifiestan que el cadmio perjudica la inducción de la proteína p53, inhiben la

transactivación de p21 y anula la detección del ciclo celular en la fase G1 de forma dependiente con la dosis, provocando su acumulación en la fase S.

Xie y Shaikh (2006) estudiaron el efecto de concentraciones de hasta 20  $\mu\text{M}$  de cloruro de cadmio en células epiteliales del túbulo proximal de rata, mostrando un incremento del número de células en la fase G2/M para concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{M}$ . Tras 12 horas de exposición el número de células había aumentando en un 71% y a las 24 horas se duplicó el número de células en dicha fase. Los autores muestran que este aumento se debió a un incremento de la proteína p53 y de los inhibidores de la quinasa p27 y p21 y una disminución de la expresión de las kinasas dependientes de ciclina CDK1 y CDK2.

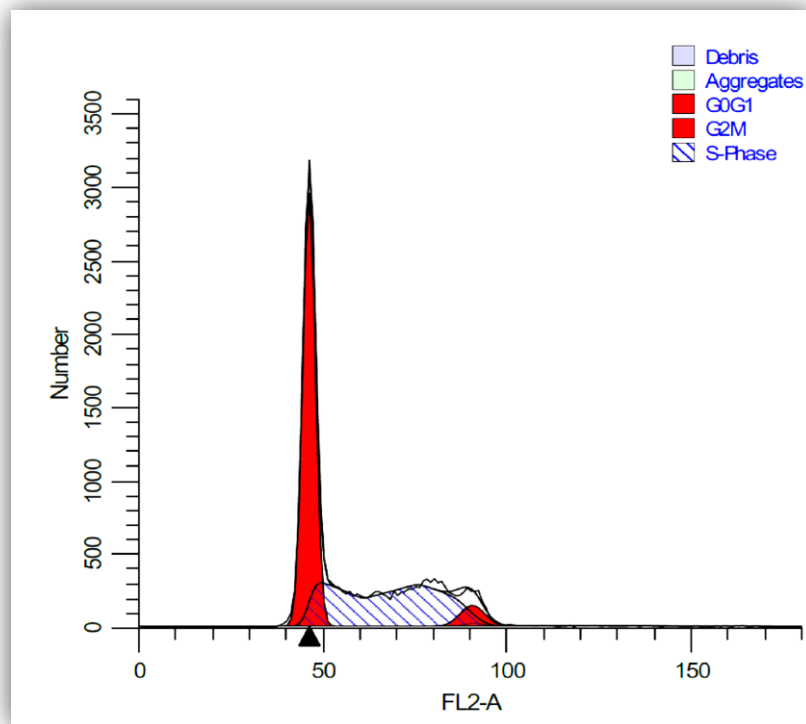
En estudios recientes, Gadhia *et al.* (2015), estudiaron el efecto del cloruro de cadmio a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  con diferentes tiempos de exposición en células madre pluripotentes embrionarias de ratón (ES-D3, CRL-1934). Los resultados muestran una disminución del porcentaje de las células en fase G0/G1 tras 1, 24 y 48 horas y un aumento de las células en fase G2/M y disminución en fase S para 1 y 48 horas. Lo que demuestra que el cadmio podría afectar inicialmente a la síntesis de ADN.

En el presente estudio una concentración similar (12  $\mu\text{M}$ , juveniles) en células VERO (también de origen renal) provoca de la misma forma un aumento del porcentaje de células en fase G2/M y disminución de las fases G0/G1 y S, aunque no de forma acusada.

Estos resultados podrían indicar que concentraciones bajas de cadmio podrían inhibir la progresión del ciclo celular por un bloqueo en la fase G0/G1, mientras que altas concentraciones provocarían la parada del ciclo celular en la fase S.

Las diferencias encontradas entre los diferentes autores pueden estar causadas principalmente por la concentración de metal utilizada y la naturaleza de la línea celular empleada.





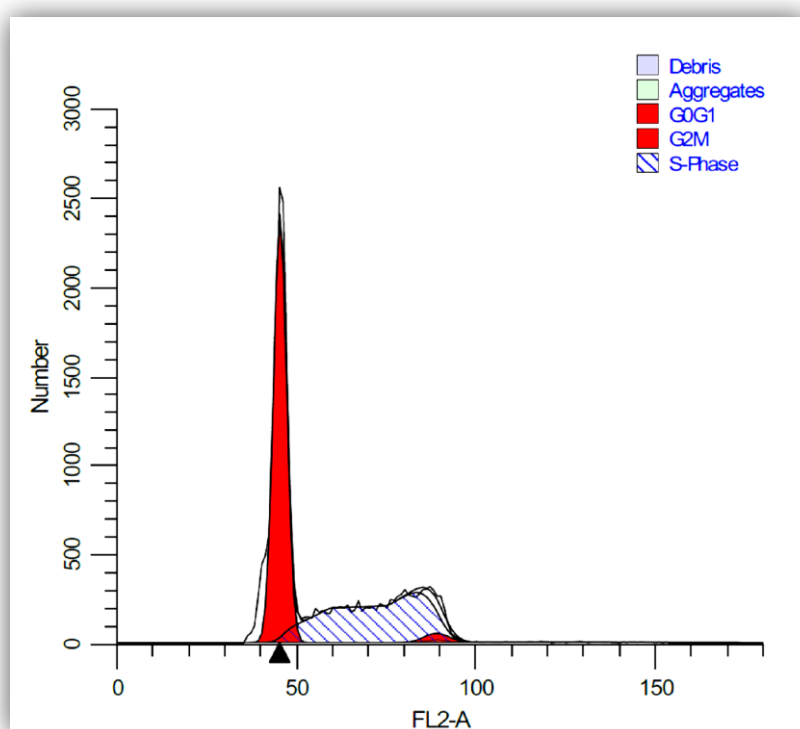
**Figura 53.** Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a  $CE_{50}$  de  $CdCl_2$

#### IV.6.1.3. Plomo

En el caso de la  $CE_{50}$  del Pb (1,9043 mM, muy superior a la media de individuos adultos, máxima y media de pollos) se aprecian diferencias significativas para las tres fases del ciclo celular ( $p < 0.001$ ) (Fig. 51). Con respecto a la concentración media de individuos adultos (0,724  $\mu M$ ) y la máxima (1,58  $\mu M$ ) concentración hallada, presentan diferencias significativas con un grado de significancia del 99,9% para las fases G0/G1 y G2/M, mientras que no se encuentran diferencias significativas con respecto a la fase S. Con respecto a la concentración media de pollos (0,45  $\mu M$ ) percibimos diferencias significativas con diferentes grados para la fase G0/G1 (95%) y fase S (99%) y no hay diferencias significativas para la fase G2/M. Todas las concentraciones halladas causan una disminución del porcentaje de células en la fase G0/G1 (tabla 44). Estos resultados podrían indicar que una concentración elevada de plomo causa la detección del ciclo celular en la fase S (aumento acusado del porcentaje para la  $CE_{50}$ ), mientras que concentraciones no tóxicas muy por debajo de la  $CE_{50}$  causan un ligero aumento de la fase G2/M.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En rasgos generales la fase G0/G1 disminuye (tabla 44). En las concentraciones más elevadas ( $CE_{50}$  para ambas líneas) la fase S aumenta, mientras que para el resto de concentraciones o se produce una ligera disminución o no hay diferencias significativas. En cuanto a la fase G2/M en las células VERO se produce una disminución del porcentaje de células para la  $CE_{50}$ , ya que ésta elevada concentración provoca el bloqueo del ciclo celular en la fase S, es decir, produce un efecto antimitótico. Según Maxwell *et al.* (1986) y Dominguez *et al.* (1995), los factores implicados en la acción antimitótica del plomo son la concentración del metal, el tiempo de exposición y la edad del cultivo. Las concentraciones más bajas en ambas líneas celulares si producen un aumento del porcentaje de células en fase G2/M, ya que disminuye ligeramente S o se mantiene con porcentajes similares. Esto indicaría que el plomo en concentraciones bajas (superiores a  $0,5 \mu\text{M}$  e inferiores a  $1,5 \mu\text{M}$ ) provocaría un aumento del índice mitótico (Lin *et al.*, 1994). Los factores anteriormente mencionados, condicionarían una diferente producción de radicales libres y ROS, estimulando o inhibiendo de esta manera la mitosis.



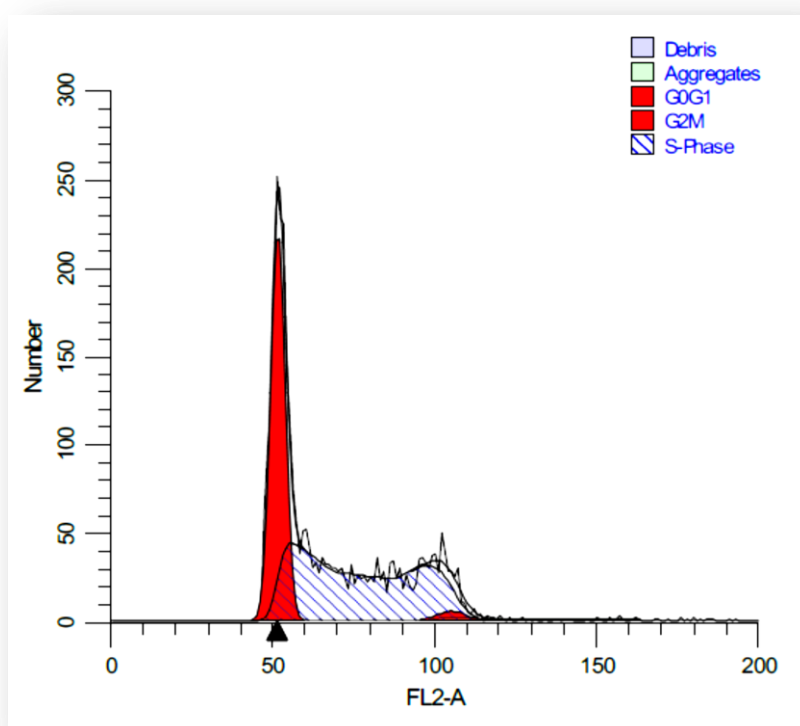
**Figura 54.** Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a  $CE_{50}$  de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

## IV.6.1.4. Cromo

Todas las concentraciones ensayadas para el cromo causan diferencias significativas con un grado de significancia del 99,9% para las fases G0/G1 y S, mientras que no se aprecian diferencias significativas para la fase G2/M (Fig. 51). Todas las concentraciones provocan una disminución acusada del porcentaje de células en la fase G0/G1 y menos destacado de la fase G2/M (no superior al 3,5%), mientras que se aprecia un aumento significativo de la fase S, sobre todo para las concentraciones más altas (juveniles y pollos). Esto podría indicar que el cromo provoca la detección del ciclo celular en la fase S.

Bagchi *et al.* (2000), comprobaron efectos similares mostrando un aumento de la fase S en células de leucemia mielógena crónica humana (K562) tras ser tratadas con 12,5  $\mu\text{M}$  de cromato.

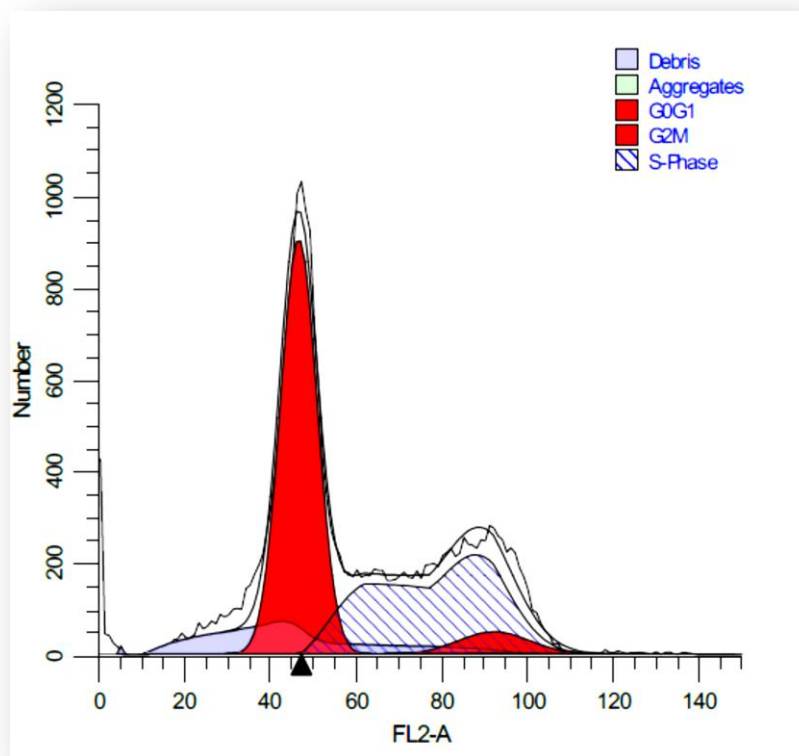
Se ha establecido que los compuestos de Cr (VI) son capaces de atravesar la membrana celular y entrar a la célula a través de los canales aniónicos, donde agentes como el ascorbato, el glutatión y la cisteína lo reducen a cromo pentavalente (Cr V), Cr (IV) y Cr (III) (Shi y Dalal, 1992; Zhitkovich, Quievryn, Messer y Motylevich, 2002). Durante la reducción intracelular del Cr (VI) se generan ROS y radicales libres que al interactuar con el ADN pueden inducir lesiones genéticas estructurales (Shi y Dalal, 1992; O'Brien *et al.*, 2003). El daño del material genético inducido por Cr (VI) también puede presentar efectos sobre la replicación y la transcripción del ADN, desregularizar los puntos de control en el ciclo celular y afectar los mecanismos de reparación del ADN (Zhitkovich *et al.*, 2002; ATSDR, 2012). De ahí que se sugiera que los cambios producidos en el ciclo celular observados en el presente estudio pudiera estar relacionado con la reducción intracelular de Cr (VI) a Cr (III) y la generación de ROS y radicales libres. Esto podría indicar que el cromo provoca el bloqueo del ciclo celular en la fase S y G2/M del ciclo, provocando que el daño del ADN producido por el cromo impida que la célula pueda dividirse, o impidiendo que las células puedan crecer tras la división celular y sintetizar nuevo material citoplasmático.



**Figura 55.** Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a concentración media de individuos juveniles de  $\text{CrO}_3$

#### IV.6.1.5. Selenio

En el caso del selenio encontramos diferencias significativas con respecto a las fases G0/G1 y S para todas las concentraciones ( $p < 0.001$ ) y para la fase G2/M salvo para las concentraciones de individuos adultos y pollos (Fig. 51). Todas las concentraciones halladas en individuos adultos, juveniles y pollos provocan una disminución del porcentaje de células en fase G0/G1 y G2/M y un aumento de la fase S (siendo muy acusado para el caso de individuos juveniles), mientras que la  $\text{CE}_{50}$  (inferior al resto de concentraciones) provoca un aumento de la fase S y de la fase G2/M. Esto indica que las concentraciones medias halladas causarían la detección del ciclo celular en la fase S.



**Figura 56.** Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a la concentración media de individuos adultos de  $Cl_4Se$

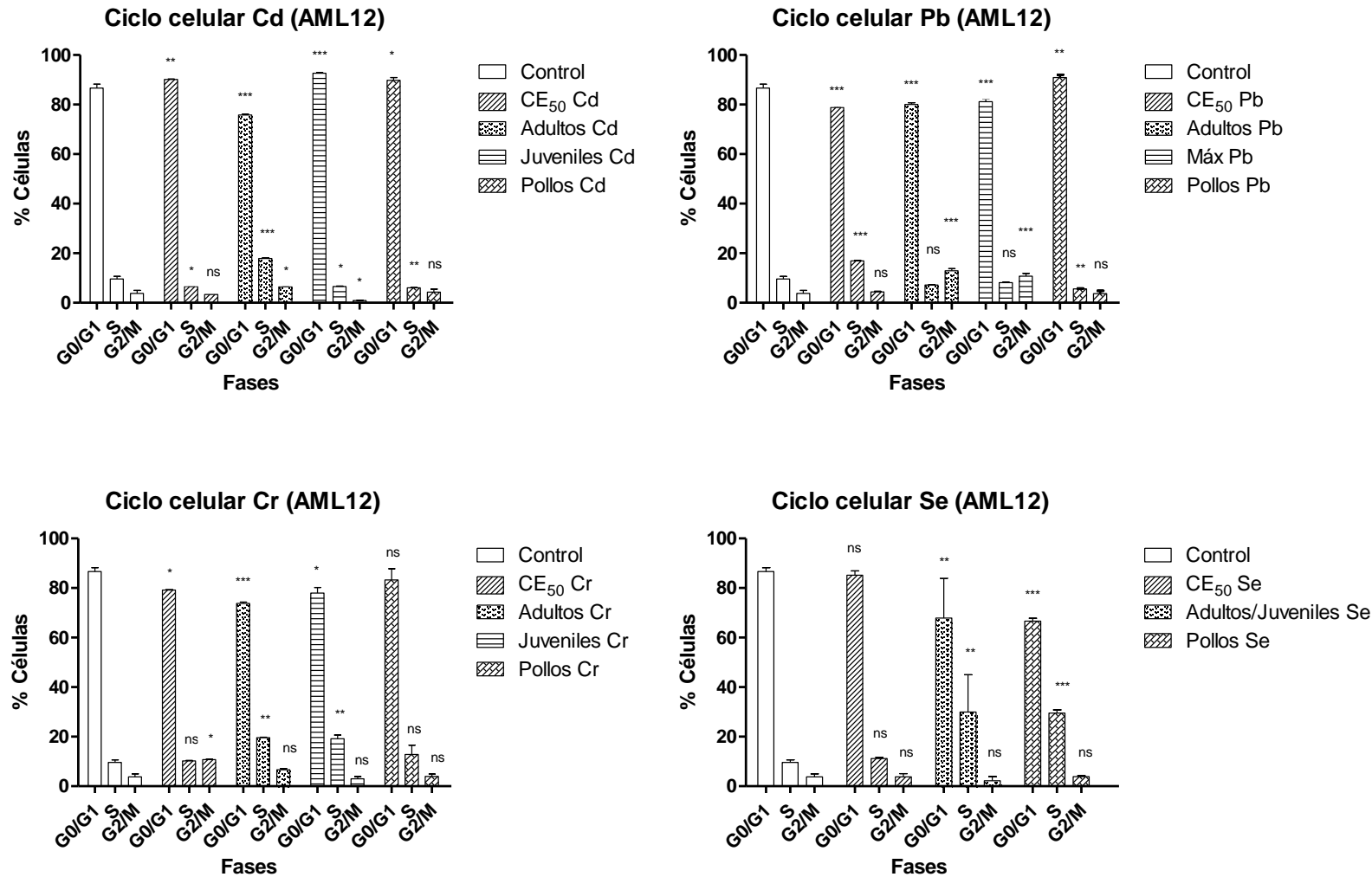
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV. 6.2. LÍNEA CELULAR AML12

En las siguientes tablas y gráficas se pueden observar los resultados obtenidos tras el análisis estadístico de los tres ensayos independientes realizados para cada una de las condiciones para la línea celular AML12:

**Tabla 45.** Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular de la línea AML12 (media y error estándar).

AML12	G0/G1	S	G2/M
Control	86,63±1,61	9,57±1,1	3,80±1,92
CE <sub>50</sub> Cd	90,15±0,12	6,55±0,13	3,31±0,02
Adultos Cd	75,68±0,4	17,89±0,29	6,43±0,42
Juveniles Cd	92,64±0,13	6,05±0,17	0,85±0,12
Pollo Cd	89,73±1,14	6,00±0,15	4,26±1,18
CE <sub>50</sub> Pb	78,76±0,50	16,90±0,23	4,34±0,27
Adultos Pb	80±0,73	7,1±0,16	12,90±0,89
Máxima Pb	81,14±1,14	8,16±0,09	10,70±1,14
Pollos Pb	90,84±1,20	5,56±0,14	3,61±1,20
CE <sub>50</sub> Cr	79,13±0,35	10,18±0,19	10,69±0,15
Adultos Cr	73,81±0,50	19,55±0,14	6,64±0,37
Juveniles Cr	77,96±2,28	19,10±1,49	2,94±0,90
Pollos Cr	83,21±4,57	12,81±3,74	3,98±0,88
CE <sub>50</sub> Se	89,15±1,69	11,13±0,39	3,71±1,29
Adultos Se	67,89±16,05	29,94±1,31	2,17±1,72
Juveniles Se	67,89±16,05	29,94±1,31	2,17±1,72
Pollos Se	66,61±1,03	29,49±1,31	3,86±0,35

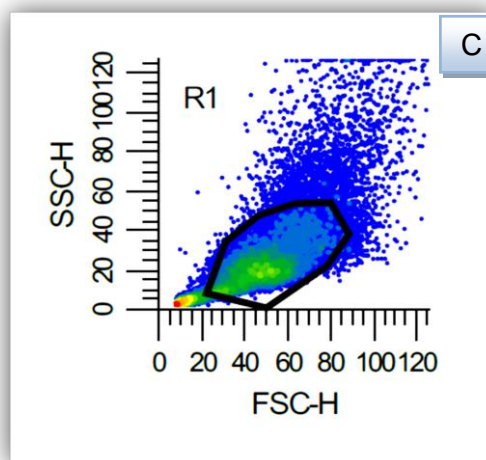
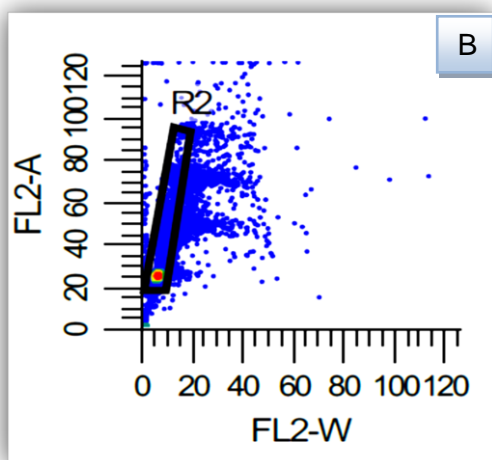
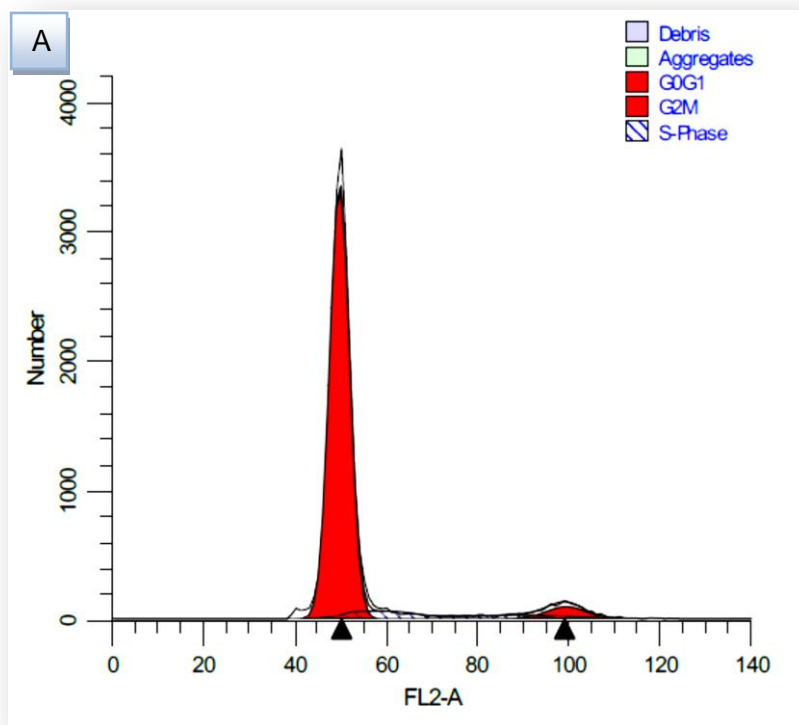


**Figura 57.** Representación gráfica del estudio estadístico de ciclo celular para la línea celular AML12 (Two-way RM ANOVA; \*\*\* p< 0.001, \*\* p< 0.01, \* p< 0.05 y ns p> 0.05).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.6.2.1. Control

En líneas generales, la línea celular AML12 presenta un 87% de sus células en fase G0/G1, un 9,6% en fase S y un 4% en fase G2/M (Fig. 57 y Tabla 45). Las muestras control de dicha línea celular muestran un porcentaje medio de debris de 0.06% y un 3.14% de agregados.





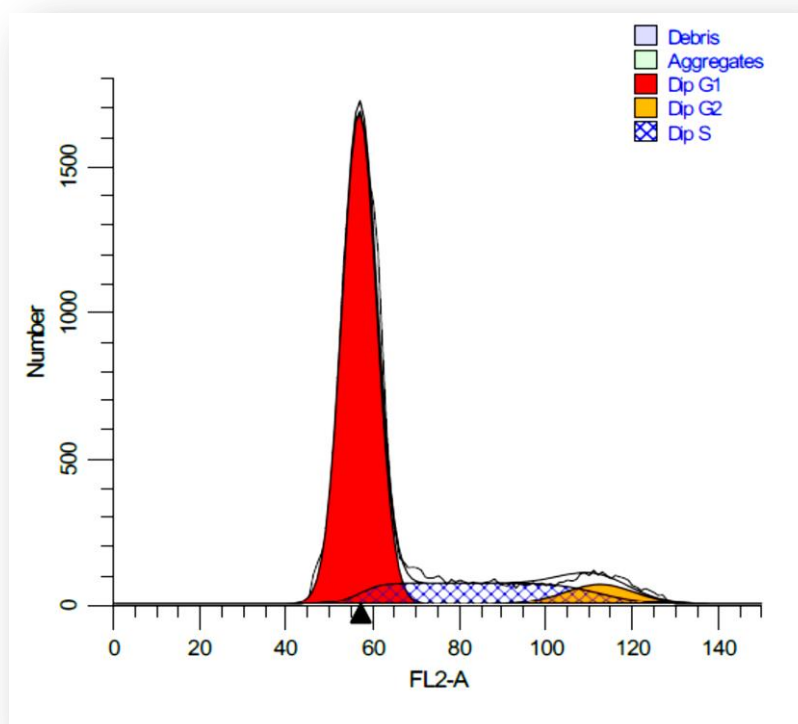
**Figura 58.** A. Histograma correspondiente a la muestra control. B. Dot Plot del cultivo control de AML12 representando la granulometría frente al tamaño. C. Dot Plot del cultivo control AML12 representando el área frente a la amplitud del pico.

#### IV.6.2.2. Cadmio

En el caso del cadmio encontramos diferencias significativas para todas las concentraciones estudiadas (Fig. 57). Para la  $CE_{50}$  (0,0613 mM) hallamos diferentes grados de significancia para cada fase del ciclo celular ( $p < 0.01$  en G0/G1,  $p < 0.05$  en S y  $p > 0.5$  para la fase G2/M). Para la concentración más alta perteneciente a la media de los individuos adultos (0,12 mM), presentan diferencias significativas con un grado de significancia del 99,9% en la fase G0/G1 y S y del 99% para la fase G2/M. En cuanto a la concentración de individuos juveniles (3,15  $\mu$ M), produce diferencias significativas tanto en la fase G0/G1 ( $p < 0.001$ ) como en las fases S y G2/M ( $p < 0.01$ ). En lo referente a la concentración menos elevada perteneciente a la media de los pollos (0,73  $\mu$ M), provoca diferencias significativas para la fase G0/G1 ( $p < 0.05$ ) y en la fase S ( $p < 0.01$ ). Todas las concentraciones salvo la de adultos provocan un aumento del porcentaje de las células en fase G0/G1 (tabla 45), mientras que la concentración de adultos provoca una disminución del porcentaje de células en fase G0/G1 y un aumento en las fases S (de forma acusada) y G2/M.

Payette *et al.* (1995), que determinaron como afectaba el cadmio al ciclo celular de linfocitos de bazo de ratón 72 horas después de su estimulación con concanavalina A. A una concentración de 0,6  $\mu$ M comprobaron que se producía un aumento del porcentaje de células en fase G0/G1 y una disminución en las fases S y G2/M. En la línea celular AML12 (de origen hepático) se produce un aumento del porcentaje de células en la fase G0/G1, salvo en la concentración media de individuos adultos (concentración más elevada, 0,12 mM). Choi *et al.* (2011), estudia los efectos del acetato de cadmio sobre dos líneas celulares de fibroblastos del pulmón humano. Este estudio demuestra que el cadmio disminuye la cantidad de CDK2 y E2F1 y suprime la fosforilación de Rb (implicados en la progresión de G1 a S), provocando la detención del ciclo celular en la fase G1.

Estos resultados podrían indicar que bajas concentraciones de cadmio en células hepáticas provocan la parada del ciclo celular en la fase G0/G1 y concentraciones muy elevadas la parada del ciclo celular en la fase S y G2/M.

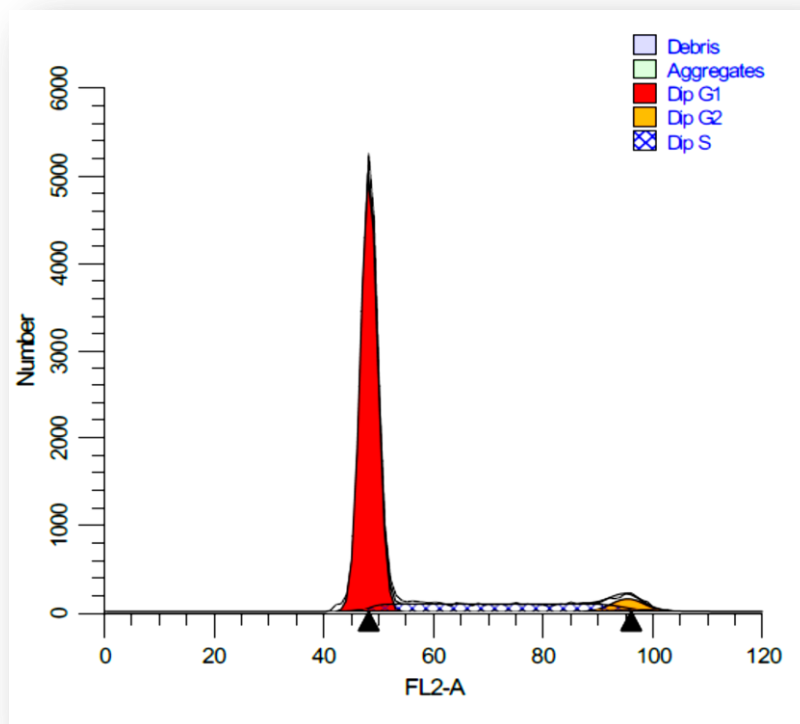


**Figura 59.** Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a la concentración media de individuos adultos de CdCl<sub>2</sub>

#### IV.6.2.3. Plomo

Todas las concentraciones ensayadas presentan diferencias significativas para la fase G0/G1 con respecto al control (Fig. 57). La CE<sub>50</sub> (1,9058 mM) y la concentración media hallada en pollos (0,567 μM) producen diferencias significativas en la fase S, mientras que la concentración media de individuos adultos y la máxima concentración hallada provocan diferencias significativas con un grado de significancia del 99,9% en la fase G2/M. La concentración más elevada perteneciente a la CE<sub>50</sub> provoca una disminución del porcentaje de células en fase G0/G1 y un aumento en las fases S y G2/M, mientras que el resto de concentraciones, muy por debajo de la CE<sub>50</sub>, provocan la disminución de la fase G0/G1 (salvo la concentración de pollos) (tabla 45), una leve disminución de la fase S y el aumento o mantenimiento del porcentaje de células en fase G2/M. Estos resultados podrían indicar que una elevada concentración de plomo provoca la detección del ciclo celular en la fase S, mientras que el resto de concentraciones inferiores provocarían su detección en la fase G2/M.

Como ya se ha indicado anteriormente, estos resultados coinciden con los encontrados en la línea celular VERO. Este aumento que aparece en el porcentaje de células en la fase G2/M a bajas concentraciones también ha sido encontrado por otros autores para el caso del cadmio. Chao y Yang (2001) estudiaron la función de las kinasas ERK y MAPK en el ciclo celular de células de adenocarcinoma de pulmón humano (CL3) tratadas con cadmio. Tras el tratamiento durante 2 horas a  $40 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  entre las 6 y las 24 horas después constataron que la fase G1 disminuyó, la fase G2 aumentó y no afectó significativamente a la fase S. Para comprobar si afectaba a la mitosis, estudiaron el índice mitótico comprobando su aumento y la detección irreversible de la mitosis.



**Figura 60.** Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a  $\text{CE}_{50}$  de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)$

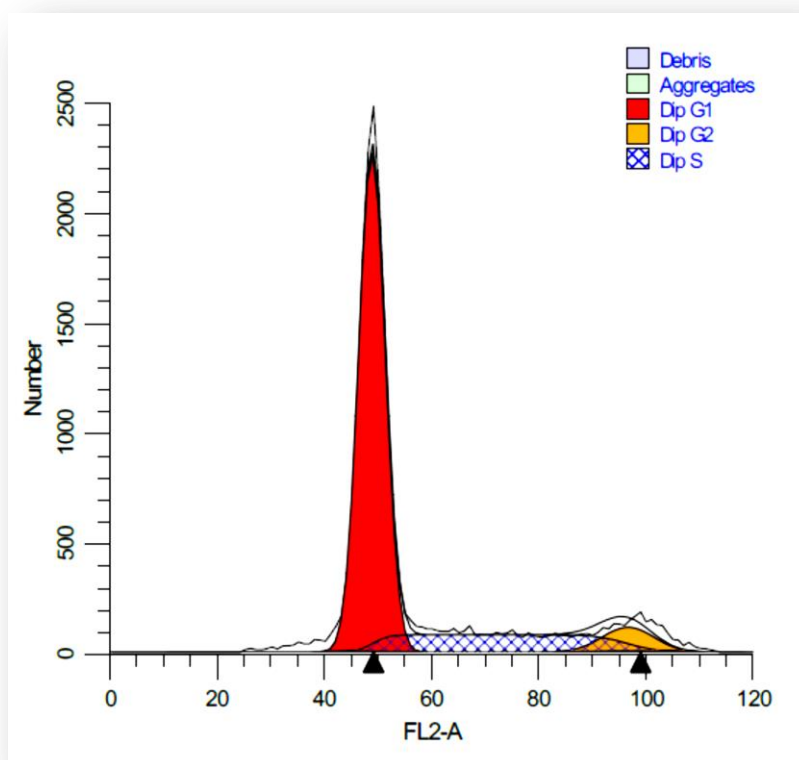
#### IV.6.2.4. Cromo

En el caso del cromo encontramos diferencias significativas para la fase G0/G1 con respecto al control en la  $\text{CE}_{50}$  ( $3,6 \mu\text{M}$ ), adultos ( $6 \mu\text{M}$ ) y juveniles ( $8,2 \mu\text{M}$ ) y en la fase S para las concentraciones medias halladas en individuos adultos y juveniles (Fig.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

57). Todas las concentraciones ensayadas provocan una disminución del porcentaje de células en la fase G0/G1 con respecto al control y un aumento de la fase S (acusado) y de la fase G2/M salvo para la concentración media de juveniles que provoca una ligera disminución (0,8%) no considerada relevante (tabla 45). Esto podría indicar que como otros resultados observados en el resto de metales, el cromo provocaría la detección del ciclo celular en la fase S en células de origen hepático.

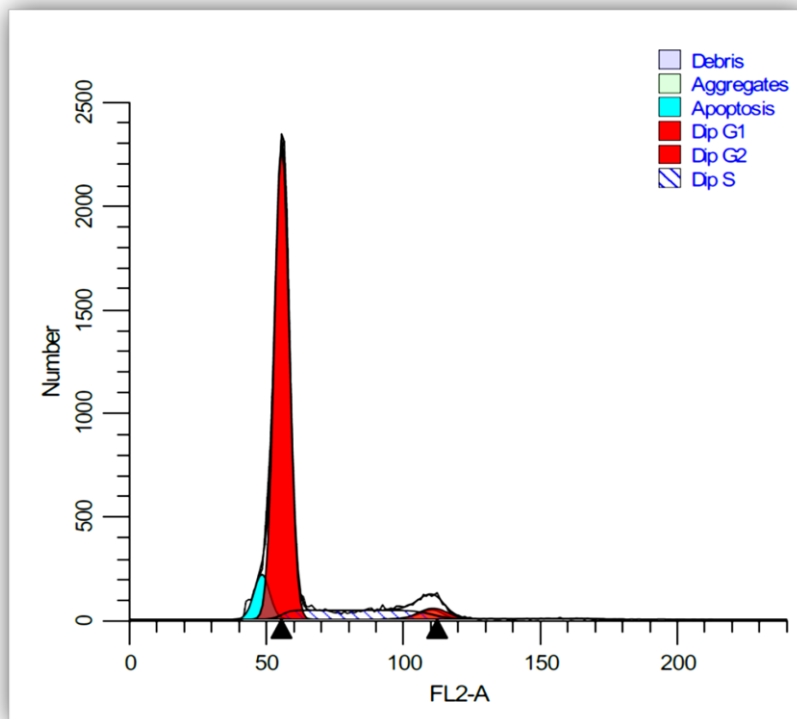
Bagchi *et al.* (2000), también observan un aumento de la fase S y de la fase G2/M en células de leucemia mielógena crónica humana tratadas con cromato, coincidiendo con los datos obtenidos en las células AML12 tratadas con diferentes concentraciones de cromo, donde se apreciaba un aumento del porcentaje de células en fase S y en la fase G2/M.



**Figura 61.** Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a la concentración media de individuos adultos de  $\text{CrO}_3$

IV.6.2.5. Selenio

La concentración más elevada perteneciente a la media de individuos adultos y juveniles (0,13 mM), presenta diferencias significativas para la fase G0/G1 y S con respecto al control ( $p < 0.01$ ). La concentración más baja perteneciente a la  $CE_{50}$  (0,0272 mM) no presenta diferencias significativas, mientras que la concentración media hallada en pollos (0,0931 mM) muestra diferencias significativas con un grado de significancia del 99,9% en la fase G0/G1 (Fig. 57). Todas las concentraciones (excepto para la menor concentración en la fase G0/G1) provocan una disminución del porcentaje de células en fase G0/G1 y de la fase G2/M (Tabla 45). Esto causa el aumento del porcentaje de células en fase S, de forma acusada (20%) para las concentraciones más elevadas (adultos, juveniles y pollos), lo que podría indicar que el selenio induce la detección del ciclo celular en la fase S.



**Figura 62.** Histograma correspondiente al análisis del ciclo celular en la población expuesta a  $CE_{50}$  de  $SeCl_4$

Con respecto al selenio, en ambas líneas celulares se observa una disminución del porcentaje en células G0/G1, un aumento acusado en la fase S y una disminución

de la fase G2/M (Fig. 51 y 57). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Tapiero *et al.* (2003), que comparan los efectos de diferentes compuestos químicos de selenio, indicando que dosis altas de selenito en células de piel de ratón y en queratinocitos humanos primarios pueden causar la fragmentación del ADN, disminuir la síntesis de ADN, la inhibición del crecimiento celular, la síntesis de ADN, bloquear el ciclo celular en la fase S/G2 y muerte celular por necrosis. Esto indicaría que el selenio impediría el paso de las células a la fase G2/M y por consiguiente disminuye la formación de nuevas células afectando a la viabilidad celular.

Estos efectos provocados por el selenio podrían estar relacionados con el punto de control G2/M, el cual permite que si un daño celular se produce durante la fase G2 la célula es capaz de iniciar una detención del ciclo de forma dependiente o independiente de p53. En este punto de control interviene la fosfatasa CDC25 encargada de desfosforilar el complejo Factor de Promoción de la Mitosis (MPF, *mitosis promotor factor*). Este MPF activa las CDKs relacionadas con la ciclina B (asegura que se lleve a cabo la mitosis), en respuesta a condiciones ambientales favorables para la célula, permitiendo que la célula comience con la replicación del ADN.

Otros autores también señalan que determinados compuestos de selenio producen daño cromosómico a dosis altas y de forma dependiente con la concentración. Biswas *et al.* (2000), estudiaron el efecto del selenito y selenato de sodio en linfocitos humanos constatando que producían la inhibición de la división celular y anomalías cromosómicas. Ambos compuestos pueden producir radicales libres y el daño del ADN (Shamberger, 1985). Por lo tanto, la causa de que el selenio bloquee el paso de células de la fase S a la fase G2/M podría ser el daño producido sobre el ADN durante la replicación en la fase S.

Las diferentes discrepancias encontradas por los diferentes autores nos indican que los distintos bloqueos provocados por compuestos tóxicos en el ciclo celular, dependen de la naturaleza química del compuesto, las concentraciones, el origen de las líneas celulares y su carácter cancerígeno o normal. Nuevos estudios podrían realizarse, empleando diferentes líneas celulares comparando resultados obtenidos mediante el estudio del ciclo celular por citometría de flujo y la expresión de los genes implicados en el progreso de dicho ciclo celular por PCR.

#### IV.7. APOPTOSIS

La pérdida de la asimetría de membrana es un fenómeno que parece ser universal en el proceso apoptótico. Por tanto, las células que están sufriendo apoptosis se pueden detectar marcando las células con anexina V-FITC. Esta se une a los restos de fosfatidilserina expuestos al exterior por la pérdida de asimetría de su membrana. Para distinguir las células de una situación necrótica se tiñen también con IP, el cual entrará en las células que hayan perdido la integridad, tal y como ocurre en las células necróticas. A su vez, hay que destacar que también quedan marcadas con IP las células con necrosis secundaria. Esto es, una vez que las células en cultivo han sufrido apoptosis y dado que no existen macrófagos capaces de fagocitar estas células o cuerpos apoptóticos, éstas van a sufrir una necrosis que se conoce como necrosis secundaria al proceso apoptótico, aunque no haya sido un proceso de necrosis la primera causa de muerte.

Hemos cuantificado el proceso de apoptosis y necrosis para los cuatro compuestos tras 24 horas, en ambas líneas celulares. Los resultados obtenidos por citometría de flujo representados en las figuras se muestran en gráficas de puntos (Dot Plot) divididas en cuatro cuadrantes en los cuales en el eje X aparece la fluorescencia de la anexina V-FITC y en el eje Y la fluorescencia correspondiente a IP, según el cuadrante habrá (Vermes *et al.*, 1995):

- Cuadrante inferior izquierdo: células viables, no se unen a anexina y excluyen el IP.
- Cuadrante inferior derecho: células en apoptosis temprana, se unen a anexina y excluyen IP.
- Cuadrante superior derecho: células en apoptosis tardía, unen anexina e incorporan IP, es decir, células que alcanzan la necrosis previa apoptosis.
- Cuadrante superior izquierdo, células necróticas o necrosis secundaria, incorporan IP.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### I.V.7.1. LÍNEA CELULAR VERO

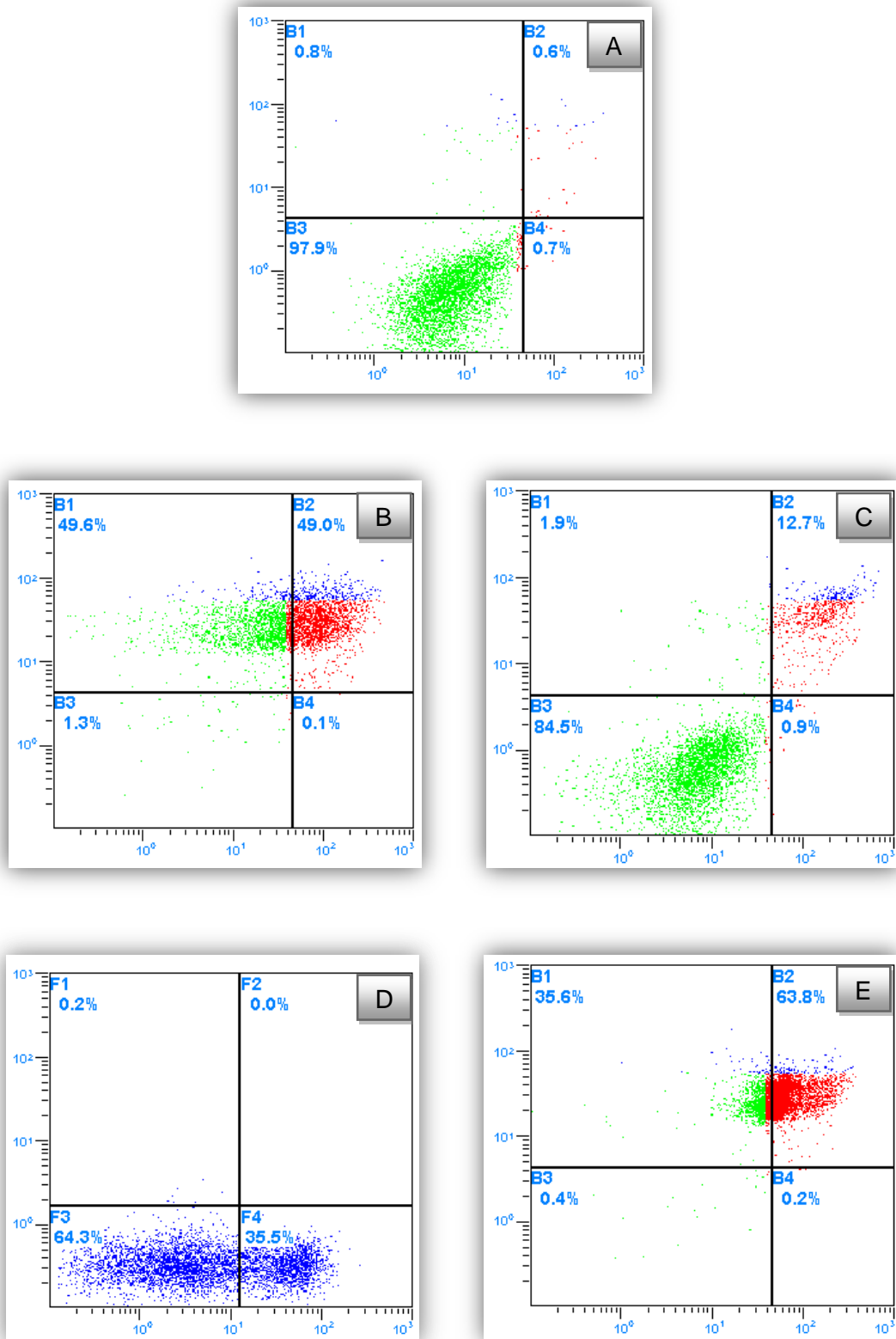
En la siguiente tabla se puede observar el porcentaje de células encontrado para cada cuadrante en las distintas concentraciones de cadmio, plomo, cromo y selenio en la línea celular VERO.

**Tabla 46.** Porcentajes de células por cuadrante en la línea celular VERO

Elementos	Concentraciones	Viables	Apoptosis temprana	Apoptosis tardía	Necrosis
Cadmio	CE <sub>50</sub>	83	1,6	11,9	3,6
	Adultos	1,3	0,1	49	49,6
	Juveniles	46,7	53	0	0
	Pollos	99,5	0,4	0	0,1
Plomo	CE <sub>50</sub>	84,5	0,9	12,7	1,9
	Adultos	97,3	0,9	1,3	0,5
	Máxima	95,8	1,1	2,4	0,7
	Pollos	99,3	0,2	0	0,4
Cromo	CE <sub>50</sub>	91,3	4,3	3,9	0,9
	Adultos	94,6	2,5	2,6	0,4
	Juveniles	64,3	35,5	0	0,2
	Pollos	99,3	0,3	0	0,4
Selenio	CE <sub>50</sub>	39,8	1,4	32,2	26,6
	Adultos	0,4	0,2	63,8	35,6
	Juveniles	1,8	0,1	1,5	96,5
	Pollos	2	0,1	1,3	96,6

En la siguiente imagen se pueden observar diferentes Dop PLOT donde se muestran los resultados obtenidos por citometría de flujo para el cultivo control y los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de metales en células VERO.





**Figura 63.** Citometría de flujo para células VERO: control (A), concentración media de adultos de CdCl<sub>2</sub>(B), CE<sub>50</sub> de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (C), concentración media de juveniles de CrO<sub>3</sub> (D) y concentración media de adultos Cl<sub>4</sub>Se(E).

Si comparamos los cuatro compuestos es evidente que el compuesto que provoca mayor porcentaje de muerte celular es el selenio, seguido por el cadmio, el cromo y por último el plomo (tabla 46). Estos datos concuerdan con los obtenidos por microscopía óptica y electrónica donde las células con mayor grado de degeneración aparecían en células tratadas con selenio y cadmio.

En el caso del **cadmio**, la concentración de adultos (1,37 mM) es la que causa una mayor cantidad de muerte celular presentando el mayor porcentaje de células muertas por necrosis y por apoptosis tardía (89,6%) (Fig. 63), seguida por la  $CE_{50}$  (45,7  $\mu$ M/15,5%) (Tabla 46 y Fig. 64). La concentración que muestra mayor cantidad de células en apoptosis temprana es la concentración media de individuos juveniles (12  $\mu$ M), mientras que la hallada en pollos (2,7  $\mu$ M) no afecta a la viabilidad celular. La concentración encontrada en individuos adultos, presenta el mismo porcentaje de células necróticas que células necróticas previa apoptosis (49-49,6%), sin embargo en la concentración de individuos juveniles, es elevado el porcentaje de células en apoptosis temprana (53%) y no presentan células necróticas. Esto podría indicar que concentraciones subcitotóxicas de cadmio podrían provocar muerte celular por apoptosis en células de origen renal.

Resultados similares encontraron El Azzouzi *et al.* (1994), en linfocitos T humanos. Mostraron que la muerte celular tras un tratamiento con 4  $\mu$ M de cadmio estaba precedida por condensación de la cromatina y fragmentación del ADN, dicha fragmentación se hacía máxima a concentraciones entre 8-10  $\mu$ M. En nuestro estudio en células VERO, la concentración media de individuos juveniles (12  $\mu$ M), provocaba un alto porcentaje de células en apoptosis temprana. Cuando expusieron las células a concentraciones superiores a 50  $\mu$ M de cadmio no observaron los cambios morfológicos anteriores. Lo que demostró que en las células CEM-C12, el cadmio a bajas concentraciones produce muerte celular por apoptosis y a altas concentraciones por necrosis. Como hemos indicado anteriormente en nuestro estudio concentraciones elevadas, no presentan una muerte celular en concreto, pues el porcentaje de células necróticas y apoptóticas es similar (tabla 46).

Otros estudios sobre la toxicidad provocada por el cloruro de cadmio en células de riñón humanas (Hamada *et al.*, 1996), evidencian la muerte celular por apoptosis tras 48 horas de exposición a concentraciones entre 12,5 y 37,5  $\mu$ M. Sin embargo, disminuye para concentraciones superiores a 37,5  $\mu$ M. Chen y Shaikh

(2009) estudiaron el efecto apoptótico del  $\text{CdCl}_2$  en una línea celular de riñón de rata comprobando por citometría de flujo que el porcentaje de células apoptóticas aumentaba con el tiempo de tratamiento y la concentración, siendo de un 60% con una dosis de 20  $\mu\text{M}$  tras 24 horas. Esto concuerda con nuestros resultados donde concentraciones de 12  $\mu\text{M}$  (juveniles) tienen un elevado porcentaje de células apoptóticas (53%) y no presentan necrosis, mientras que en la  $\text{CE}_{50}$  (45,7  $\mu\text{M}$ ) comienza a disminuir dicho porcentaje (13,5%) y a aparecer muerte celular por necrosis (3,6%).

Con respecto al **plomo**, ninguna concentración afecta de forma acusada a las células, siendo el porcentaje de células viables superior al 80% (tabla 46). La concentración que presenta un mayor porcentaje de células muertas por necrosis y apoptosis tardía (14,6%) es la  $\text{CE}_{50}$  (1,9043 mM) (Fig. 63). Estos datos concuerdan con el ensayo citotóxico, ya que dicha concentración es muy superior al resto. El porcentaje de células en apoptosis temprana es escaso y no hay diferencias superiores al 1% entre las distintas concentraciones. El porcentaje de células en apoptosis tardía es superior al de necrosis, por lo que podría predominar la muerte celular por apoptosis, aunque la diferencia no supera el 11% (tabla 46 y Fig. 64).

En estudios con células de diferente origen (células de cerebelo de rata) Oberto *et al.* (1996), determinaron que el principal tipo de muerte celular para bajas concentraciones de  $\text{Pb}^{+2}$  era la apoptosis a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  ( $\text{CE}_{50}$  aproximada de 10  $\mu\text{M}$ ). En nuestro estudio, a pesar de que las concentraciones estudiadas no afectan de forma acusada a la viabilidad, el porcentaje de células apoptóticas es superior al de necróticas.

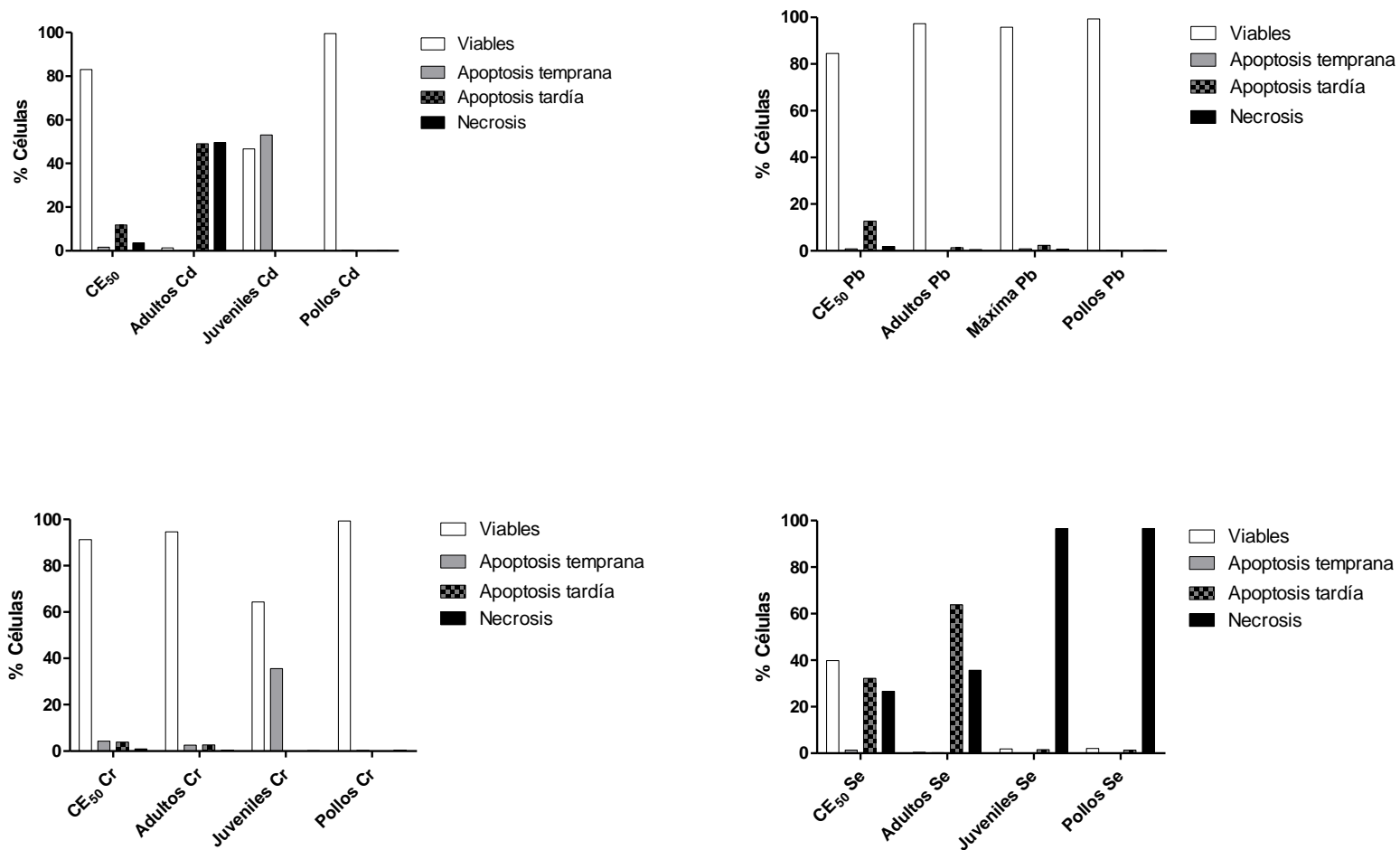
En cuanto al **romo**, la concentración más alta, perteneciente a la media de los individuos juveniles (0,1 mM), provoca un 35,5% de células en estado de apoptosis temprana (Fig. 63). El resto de concentraciones no afectan de forma acusada a la viabilidad celular, pero el porcentaje de células en estado de apoptosis siempre es superior al de necrosis (tabla 46 y Fig. 64).

En estudios con compuestos tóxicos de distinta composición al óxido de cromo (pero con el mismo estado de oxidación), Blankenship *et al.* (1997), comprobaron los efectos producidos por el cromato de plomo y el cromato de sodio en células de ovario de hámster chino (CHO-AA). Por electroforesis las células muestran fragmentación del

ADN internucleosomal tras 24 horas de tratamiento con 350 o 750  $\mu\text{M}$  de cromato de plomo. Tras 48 horas recuperaron poca cantidad de ADN. En el caso del cromato de sodio tras el tratamiento con dosis de 5 o 10  $\mu\text{M}$ , se aprecia fragmentación tras 24 horas y es claramente evidente tras 48 horas. La fragmentación del ADN internucleosomal se interpreta como un signo claro de apoptosis. En nuestro trabajo, la concentración más alta de cromo en células VERO (100  $\mu\text{M}$ ) también provoca el mayor porcentaje de células apoptóticas (35,5%), siendo la muerte predominante para todas las concentraciones. En el estudio microscópico también era evidente la condensación de la cromatina y la formación de cuerpos de inclusión (Fig. 71 y 76).

Referente al **selenio**, todas las concentraciones afectan sobre la viabilidad celular, siendo más acusada en el caso de la media de individuos adultos (0,45 mM), juveniles (0,145 mM) y pollos (0,098 mM), con respecto a la  $\text{CE}_{50}$  (5,4  $\mu\text{M}$ ) (tabla 46 y Fig. 64). En el caso de los adultos es superior el porcentaje de células en apoptosis tardía frente al de necrosis (Fig. 63), pero en concentraciones menores (juveniles y pollos) el porcentaje de células en necrosis es superior al de apoptosis tardía. Estas diferencias pueden deberse a las condiciones del cultivo o manipulación de las células, en cualquier caso sería necesario realizar nuevos estudios con diferentes concentraciones y tiempos de exposición para indicar cuál es el tipo de muerte predominante y si es dependiente de la concentración.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 64.** Representación gráfica del porcentaje de células en cada estado para los cuatro compuestos en células VERO

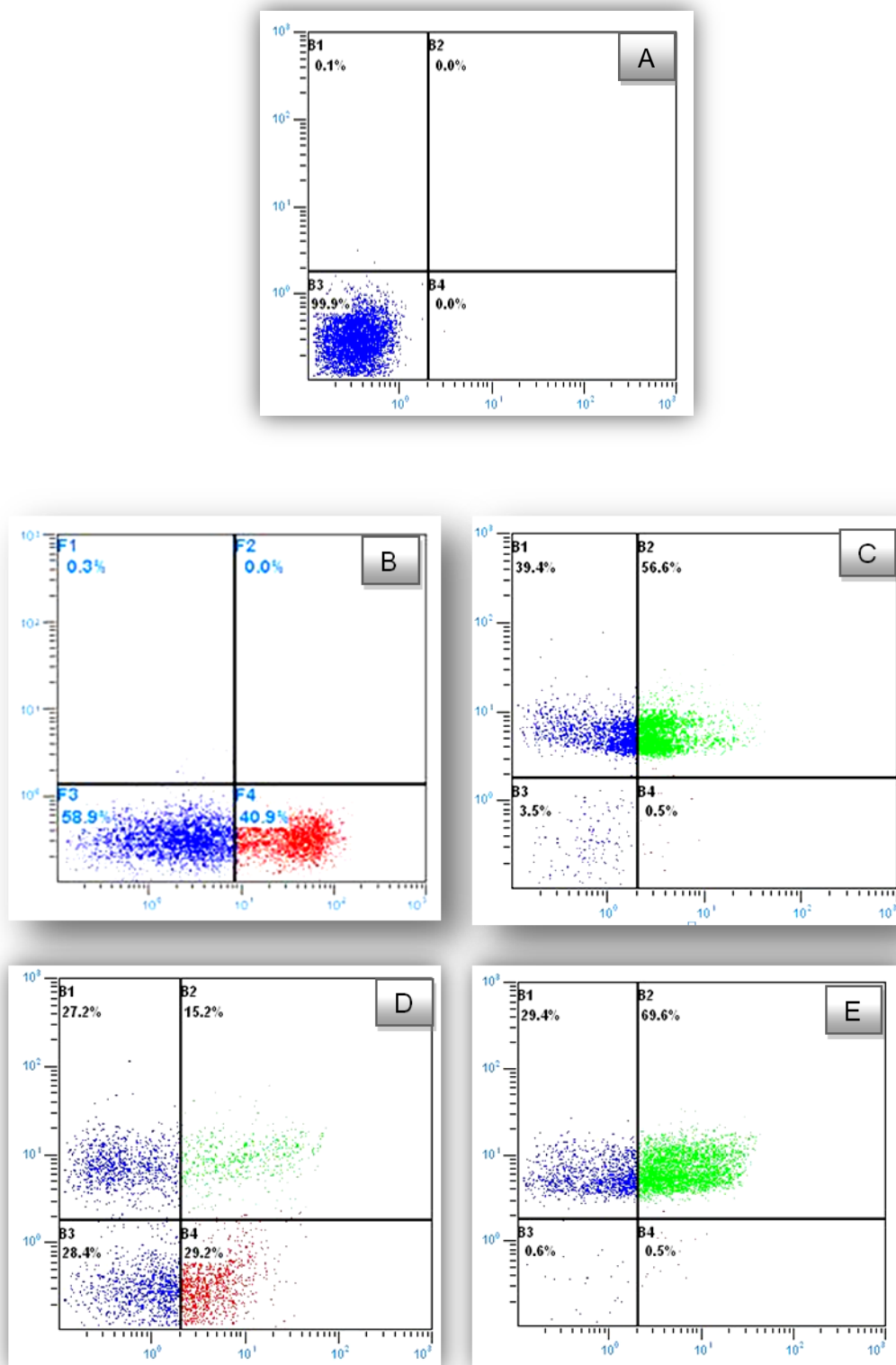
I.V.7.2. LÍNEA CELULAR AML12

En la siguiente tabla se puede observar el porcentaje de células encontrado para cada cuadrante en las distintas concentraciones de cadmio, plomo, cromo y selenio en la línea celular AML12.

**Tabla 47.** Porcentajes de células por cuadrante en la línea celular AML12

Elementos	Concentraciones	Viables	Apoptosis temprana	Apoptosis tardía	Necrosis
Cadmio	CE <sub>50</sub>	60,9	13,4	4,8	20,8
	Adultos	3,5	0,5	56,6	39,4
	Juveniles	89,9	7,3	0,4	2,4
	Pollos	97,8	1,7	0,1	0,4
Plomo	CE <sub>50</sub>	28,4	29,2	15,2	27,2
	Adultos	97,5	1,7	0,1	0,7
	Máxima	69,8	2,2	5,5	22,3
	Pollos	66,1	14,9	2,9	16,1
Cromo	CE <sub>50</sub>	62,1	9,1	4	24,8
	Adultos	68,1	15,8	5,2	10,9
	Juveniles	58,9	40,9	0	0,3
	Pollos	40	59,3	0,1	0,5
Selenio	CE <sub>50</sub>	85,2	14,6	0	0,2
	Adultos	0,1	0,1	89,6	10,1
	Juveniles	0,1	0,1	89,6	10,1
	Pollos	0,6	0,5	69,6	29,4

En las siguientes imágenes se pueden observar los resultados obtenidos por citometría de flujo para el cultivo control y los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de metales en células AML12.



**Figura 65.** Citometría de flujo para células AML12: control (A), concentración media de adultos de CdCl<sub>2</sub>(B), CE<sub>50</sub> de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (C),concentración media de juveniles de CrO<sub>3</sub> (D) y concentración media de pollos Cl<sub>4</sub>Se(E).

Si comparamos los cuatro compuestos en rasgos generales ocurre lo mismo que en la línea celular VERO, donde el compuesto que provoca mayor porcentaje de muerte celular es el selenio, seguido por el cadmio, el cromo y por último el plomo (tabla 47). De igual forma, las células que presentan grados de degeneración más avanzados incluso adquiriendo una morfología alargada, son las tratadas con selenio (Fig. 87).

En el caso del **cadmio**, la concentración de adultos (0,12 mM) es la que causa una mayor cantidad de muerte celular presentando el mayor porcentaje de células muertas por necrosis y por apoptosis tardía (96%) (Fig. 65), seguida por la  $CE_{50}$  (61,3  $\mu$ M/25,6%). La concentración que muestra mayor cantidad de células en apoptosis temprana es la  $CE_{50}$  (13,4%) seguida de la de juveniles (3,15  $\mu$ M/7,3%), mientras que la hallada en pollos (0,73  $\mu$ M) no afecta a la viabilidad celular (97,8% células viables) (tabla 47 y Fig. 67). La concentración encontrada en individuos adultos, presenta un porcentaje mayor de células en apoptosis frente a necrosis (17,7%). Esto podría indicar que en las concentraciones menos elevadas de cadmio predomina la muerte celular por apoptosis y en la concentración más elevada (adultos) ocurre lo mismo, pero el porcentaje de células necróticas también es elevado (39,4%).

Existen diferentes estudios donde concentraciones similares a la  $CE_{50}$  producen un mayor porcentaje de células apoptóticas. Pathak y Khandelwal (2006) expusieron linfocitos esplénicos de ratón a 10, 25 y 50  $\mu$ M de cadmio durante 1, 1,5, 3, 6 y 18 horas. A las 6 horas ya detectaron la fragmentación del ADN y un aumento de las células apoptóticas. Con una concentración de 50  $\mu$ M (1,5 horas) detectaron la disminución del potencial de membrana y la activación de la caspasa 3 (marcadores de las primeras etapas de la apoptosis). Mediante citometría de flujo (ensayo anexina/IP) el número de células apoptóticas aumentó de forma dependiente con la dosis. Con una concentración de 50  $\mu$ M las células apoptóticas aumentaron desde 5,1 % (control) hasta 69,1% a las 18 horas de exposición. En nuestro estudio en AML12 la concentración que produce un mayor porcentaje de células apoptóticas (57,1%) es la de adultos (0,12 mM), aproximadamente la mitad de la concentración más elevada analizada por Pathak y Khandelwal (2006). Estas diferencias pueden deberse al distinto origen de la línea celular. Aún así, en ambos estudios el porcentaje de apoptosis provocado por el cadmio aumenta de forma dependiente con la concentración.



Distintos estudios muestran que el cadmio en células hepáticas produce apoptosis tanto por vía intrínseca como extrínseca. Oh y Lim (2006), observaron como el cadmio en células HepG2 producía ROS que activaba la apoptosis tras la unión de ligandos a receptores de muerte celular presentes en la superficie celular (Fas) y por la activación de Bax. Por la técnica de TURNEL detectaron la fragmentación del ADN, rasgo característico de apoptosis, con concentraciones superiores a 8  $\mu\text{M}$  ( $\text{CI}_{50}$  de 15  $\mu\text{M}$ ). Después de 24 horas de exposición detectaron a 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$  la activación de caspasa 8 (vía extrínseca), caspasa 9 (vía intrínseca) y caspasa 3 (vía de ejecución). En nuestro caso, no está claro el mecanismo por el cual se produce la apoptosis, ya que el estudio de expresión génica revela un aumento de Bax, pero no es significativo, lo que podría significar que la muerte celular por apoptosis que muestra el estudio por citometría de flujo podría estar produciéndose por vía extrínseca únicamente.

En otros estudios también observan un aumento del porcentaje de células apoptóticas dependiente de la concentración de cadmio en células hepáticas. Recientemente Skipper *et al.* (2016), determinaron el porcentaje de apoptosis mediante citometría de flujo (ensayo anexina-V/IP) en células de cáncer hepático con diferentes dosis de cloruro de cadmio tras 48 horas de tratamiento. Los resultados manifestaron un aumento gradual de células positivas a anexina (para 0  $\mu\text{g/ml}$ , 10,3 $\pm$ 3,2% de anexina/IP; 1  $\mu\text{g/ml}$ , 14,4 $\pm$ 5,6%; 2  $\mu\text{g/ml}$ , 21,4 $\pm$ 4,6%; 3  $\mu\text{g/ml}$ , 30,5 $\pm$ 2,8%; 4  $\mu\text{g/ml}$ , 43,2 $\pm$ 7,5% y 5  $\mu\text{g/ml}$ , 52,5 $\pm$ 9,4%).

Con respecto al **plomo**, la  $\text{CE}_{50}$  (1,9058 mM) produce el mayor número de células en proceso de muerte celular (71,7%) (Fig. 65), lo cual concuerda con los resultados del ensayo citotóxico, puesto que es la concentración más elevada; mientras que la concentración más baja perteneciente a la media de individuos adultos (0,4  $\mu\text{M}$ ) es la concentración que menos afecta a la viabilidad celular (97,5% células viables). Las dos concentraciones más elevadas (aunque con una gran diferencia entre ellas),  $\text{CE}_{50}$  y máxima hallada con respecto al plomo son las que muestran un mayor porcentaje de células necróticas (27,2% y 22,3%, respectivamente), si bien el porcentaje de células apoptóticas es superior al de necróticas en la  $\text{CE}_{50}$  (44,5%). En las concentraciones más bajas, pollos y adultos (0,5 y 0,4  $\mu\text{M}$ , respectivamente), la diferencia entre células apoptóticas o necróticas es inferior al 2% (tabla 47 y Fig. 67). Estos resultados podrían indicarnos que a elevadas concentraciones, la muerte predominante es la apoptosis, mientras que no está claro el mecanismo de muerte

celular con concentraciones muy por debajo de la  $CE_{50}$ . Lo que sí es evidente es que se produce un aumento del porcentaje de células necróticas dependiente de la concentración. Para obtener más información sería preciso realizar nuevos ensayos a dosis subcitotóxicas de plomo.

Otros autores encuentran porcentajes más elevados de apoptosis en células de diferente origen. Así, Guo *et al.* (2014), demostraron que la concentración óptima que induce apoptosis en células de feocromocitoma de rata (PC12) se encuentra en torno a 10  $\mu\text{M}$ , confirmado por los niveles de expresión de los genes Bax y Bcl-2, pudiendo las células afectadas propagar daños a las células vecinas. El análisis por citometría de flujo reveló que el porcentaje de apoptosis en la población de células PC12 sin tratar era de  $0,40\% \pm 0,46\%$ , siendo significativamente más altos los porcentajes después del tratamiento con 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  de acetato de plomo ( $1,33\% \pm 0,42\%$ ,  $5,40\% \pm 0,51\%$ ,  $38,33\% \pm 3,06\%$  y  $46,67\% \pm 4,51\%$ , respectivamente). Estas diferencias pueden deberse al tipo celular. Sin embargo, al igual que se produce en nuestro estudio, encuentran que el  $18,67\% \pm 2,08\%$  de las células murieron en la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , mientras que un menor porcentaje de células ( $9,97\% \pm 1,95\%$ ) murieron en el grupo de 10  $\mu\text{M}$ , es decir, se produce un aumento del porcentaje de células necróticas con la concentración.

En cuanto al **chromo**, la concentración más alta, perteneciente a la media de los individuos pollos (9,5  $\mu\text{M}$ ), provoca un 59,3% de células en estado de apoptosis temprana, seguida de la de juveniles (8,2  $\mu\text{M}/40,9\%$ ), adultos (6  $\mu\text{M}/15,8\%$ ) y  $CE_{50}$  (3,6  $\mu\text{M}/9,1\%$ ), si bien estas dos últimas concentraciones presentan cierto porcentaje de células necróticas (24,8 y 10,9%, respectivamente) (tabla 47 y Fig. 67). Dicho porcentaje puede deberse a la manipulación de las células durante los ensayos realizados, ya que es clara la dependencia con la concentración en células con apoptosis.

En estudios previos con concentraciones similares a la media encontrada en pollos, la más alta para chromo en hígado, también hallan porcentajes similares de células apoptóticas. Así Son *et al.* (2010), células de epidermis de ratón (JB6Cl41) a una concentración de cromato de sodio de 10  $\mu\text{M}$ , el 40% de la población mostró por citometría de flujo fluorescencia para anexina (células apoptóticas) frente a una baja cantidad de yoduro de propidio (células necróticas).

Banu *et al.* (2011), estudiaron los efectos del dicromato de potasio en cultivos primarios de células granulosas de ovario de rata. Tras un tratamiento con una concentración de 10  $\mu\text{M}$  durante 12 ó 24 horas encontraron las siguientes evidencias de muerte celular por apoptosis: fragmentación del ADN y aumento de la apoptosis de forma dependiente con el tiempo (12 horas 25% de apoptosis y 24 horas 50% de apoptosis); aumento de la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citosol; infraexpresión de Bcl-2, Bcl-XL, Hsp70, Hsp90 (genes anti-apoptóticos); sobreexpresión de Bax, Bad (genes pro-apoptóticos); translocación de Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Bad, Hsp70 y Hsp90 a la mitocondria y activación de caspasa-3 y PARP. Por el contrario, en nuestro estudio observamos una infraexpresión de Bax. Esto puede deberse a que al haber efectuado una sola medición a las 24 horas, durante este tiempo se ha estado produciendo la síntesis de proteínas y a tiempo final la expresión del gen se ve reducida con respecto a su estado fisiológico. Delgado *et al.* (2013), evidenciaron el aumento de la cantidad de proteína p53 (induce apoptosis por vía intrínseca) por  $\text{Cr}^{+6}$  en hepatocitos de rata mediante Western blot. La proteína p53 se evidenció a partir de una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de cromo (VI) incrementándose a mayor concentración del metal y se observó la fragmentación del ADN a partir de concentraciones de 20  $\mu\text{M}$  de cromo (VI) de forma dependiente con la concentración (10, 20, 50 y 100  $\mu\text{M}$  durante 24 horas). Esto podría indicar que aunque se produzca infraexpresión de Bax si puede existir una gran cantidad de proteína.

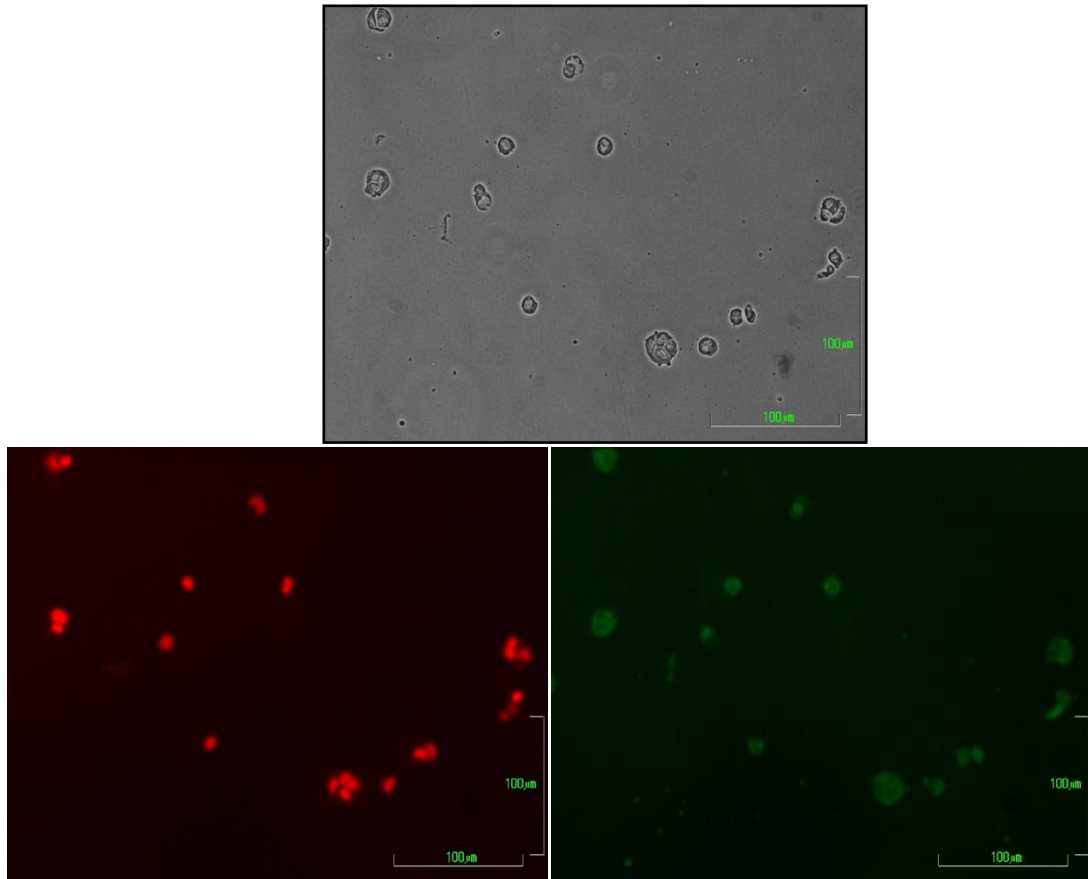
Por otro lado, otras vías de apoptosis (vía extrínseca) pueden ser más activas en la intoxicación por cromo. Es evidente que se produce apoptosis, porque a concentraciones ligeramente inferiores a las estudiadas por Banu *et al.* (2011), observamos porcentajes superiores (10%) de células positivas para anexina mediante citometría de flujo. Las diferencias mencionadas también podrían estar causadas porque en dichos estudios se emplean diferentes tipos celulares y los hepatocitos podrían ser más sensibles al cromo que las células de ovario de rata, ya que metabólicamente son más activos.

Referente al **selenio**, todas las concentraciones afectan sobre la viabilidad celular, siendo más acusada en el caso de la media de individuos adultos y juveniles (0,13 mM) y pollos (0,093 mM), con respecto a la  $\text{CE}_{50}$  (27,2  $\mu\text{M}$ ) (tabla 47 y Fig. 67). Tanto en las concentraciones medias de individuos adultos y juveniles (89,7%-10,1%), como en pollos (70,1%-29,4%) y la  $\text{CE}_{50}$  (14,6%-0,2%) es superior el porcentaje de

células apoptóticas sobre el de necróticas. En células de origen hepático parece indicar que la muerte predominante ocasionada por el selenio es la apoptosis.

Wei *et al.* (2001), estudiaron los efectos del  $\text{SeO}_2$  en una línea celular normal hepática humana (HL-7702) y en una línea de hepatoma humano (SMMC-7721) tras 48 horas de tratamiento con una concentración de  $30 \mu\text{M}$ . A nivel morfológico las células mostraban características propias de la apoptosis con membrana nebulosa, cromatina condensada, fragmentación del núcleo y cuerpos apoptóticos. Mediante electroforesis se aprecia fragmentación del ADN. Por citometría de flujo se determinó un 68% de muerte por apoptosis en la línea HL-7702 y un 50% para la línea SMMC-7721. Como señalamos en el párrafo anterior, la muerte predominante ocasionada por el selenio en células AML12 es la apoptosis y su porcentaje es dependiente de la concentración. A una concentración similar a la estudiada por Wei *et al.*, (2001) perteneciente a  $\text{CE}_{50}$ , el porcentaje de células apoptóticas es inferior (14,6%), mientras que en concentraciones superiores, pertenecientes a la media de pollos ( $93,1 \mu\text{M}$ ) hallamos porcentaje de células apoptóticas similares a los encontrados por Wei *et al.*, (2001) (tabla 47 y Fig. 67). Esto indica que las células hepáticas humanas muestran una mayor sensibilidad al plomo, frente a las células hepáticas AML12.

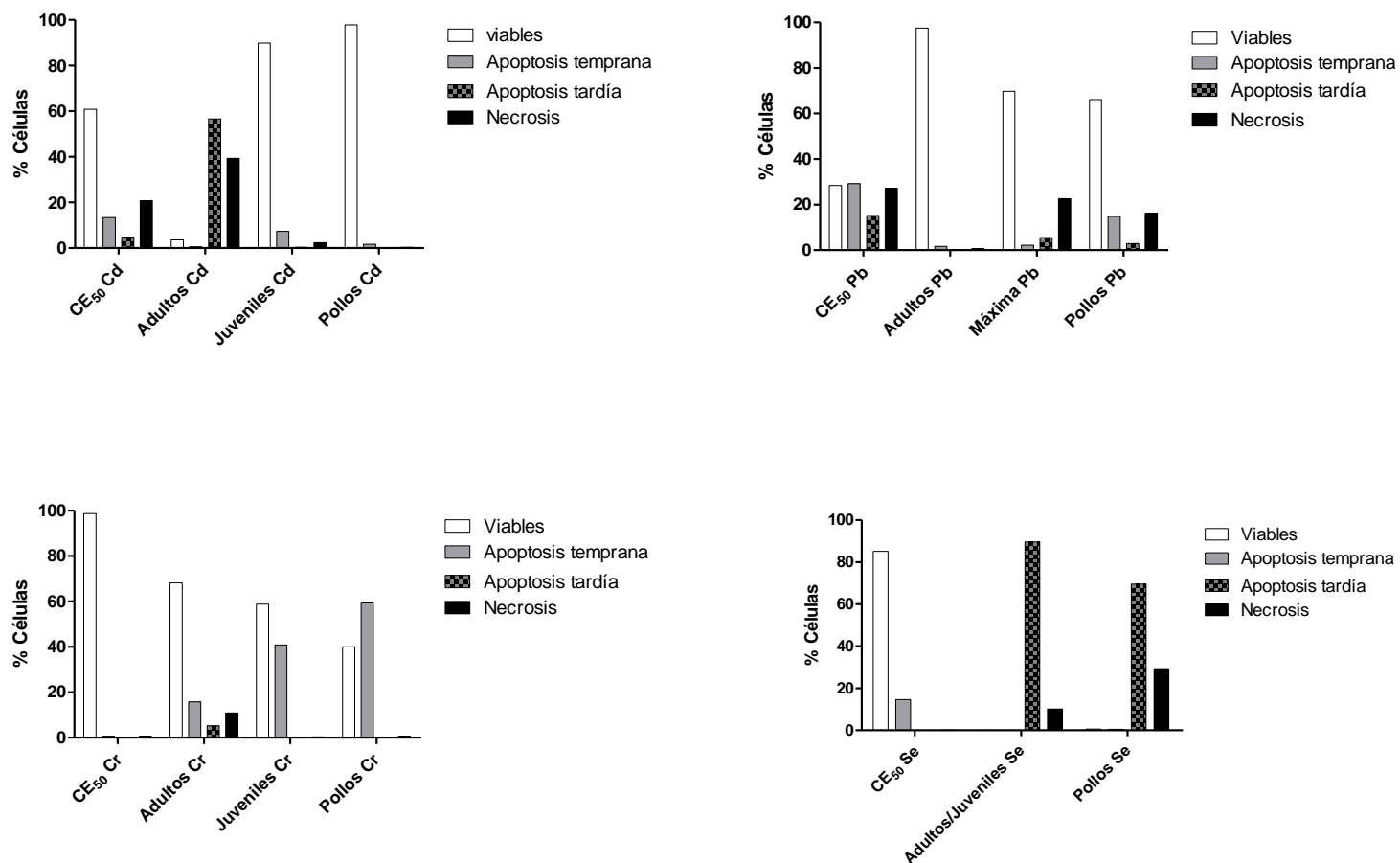
Si bien los resultados aportados con el microscopio electrónico no aportaban evidencias de apoptosis temprana, mediante el microscopio de fluorescencia si hemos observado células positivas a IP/anexina, es decir, dentro del tercer cuadrante con apoptosis tardía o necróticas previa apoptosis como muestran las siguientes imágenes. Además también existen estudios donde la apoptosis se observa en hepatocitos en forma de condensación de la cromatina y mitocondrias, rasgos que si se observan durante su estudio al microscopio electrónico (Angermüller *et al.*, 1998).



**Figura 66.** Células AML12 positivas a IP/anexina sometidas a  $CE_{50}$  de selenio

El proceso de apoptosis continúa con la formación de pequeñas evaginaciones esféricas surgidas a partir de la membrana citoplasmática y fragmentación del núcleo, rasgo que se puede observar en la figura 66. Después la célula se fragmenta formando cuerpos apoptóticos (Kataoka y Tsuruo, 1996). Tras la muerte celular, las células sufren cambios postmortem (necrosis), donde serían positivas a IP/anexina.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 67.** Representación gráfica del porcentaje de células en cada estado para los cuatro compuestos en células AML12

Si comparamos los efectos sobre la viabilidad de las CE<sub>50</sub> en ambas células encontramos que la CE<sub>50</sub>, para el cadmio resulta más letal en células AML12 (60,9% viables - 39% en proceso de muerte celular) (tablas 46, 47 y 48), para el plomo ocurre lo mismo con una diferencia más acusada con respecto a VERO (28,4% viables – 71,6% en proceso de muerte celular), para el cromo las diferencias son menores del 10% (CE<sub>50</sub> similares) y para el selenio resulta más letal en células VERO (39,8% viables – 60,2% proceso de muerte celular), que presenta un valor de CE<sub>50</sub> muy por debajo de AML12.

En las siguientes tablas se puede observar en qué línea celular aparece un mayor porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas y el tipo de muerte celular predominante.

**Tabla 48.** Comparación entre ambas líneas del estado celular tras la inoculación de CE<sub>50</sub>

CE <sub>50</sub>	Viables	Apoptóticas	Necróticas
<b>Cadmio</b>	VERO>AML12	AML12>VERO	AML12>VERO
<b>Plomo</b>	VERO>AML12	VERO>AML12	AML12>VERO
<b>Cromo</b>	VERO>AML12	AML12>VERO	AML12>VERO
<b>Selenio</b>	VERO>AML12	AML12>VERO	AML12>VERO

**Tabla 49.** Tipo de muerte predominante según concentración.

Tipo de muerte celular línea celular VERO				
Metales	CE <sub>50</sub>	Adultos	Juveniles	Pollos
<b>Cadmio</b>	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS=NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS=NECROSIS
<b>Plomo</b>	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS=NECROSIS
<b>Cromo</b>	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS=NECROSIS
<b>Selenio</b>	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS	NECROSIS>APOPTOSIS	NECROSIS>APOPTOSIS
Tipo de muerte celular línea celular AML12				
Metales	CE <sub>50</sub>	Adultos	Juveniles	Pollos
<b>Cadmio</b>	NECROSIS>APOPTOSIS	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS
<b>Plomo</b>	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS	NECROSIS>APOPTOSIS	APOPTOSIS>NECROSIS
<b>Cromo</b>	APOPTOSIS=NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS
<b>Selenio</b>	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS	APOPTOSIS>NECROSIS

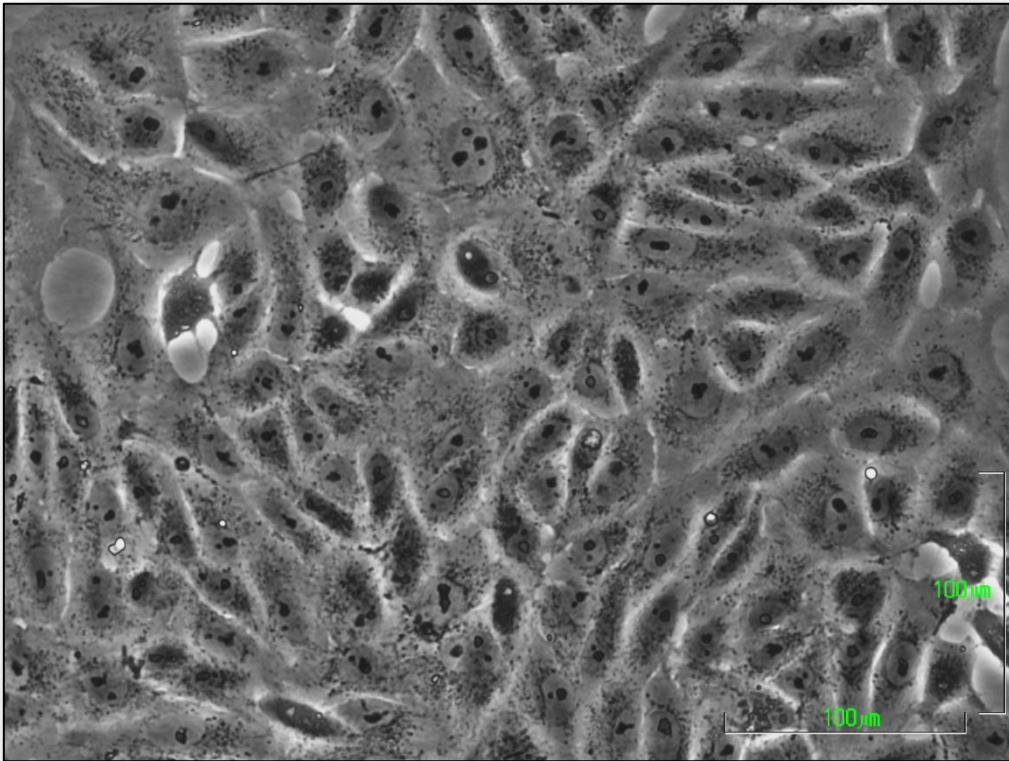
### IV.8. ESTUDIO MORFOLÓGICO

#### IV.8.1. LÍNEA CELULAR VERO

##### IV.8.1.1. Microscopía óptica

■ Cultivo control. La línea celular VERO con el microscopio de contraste de fases presenta morfología fibroblástica en su mayoría, de apariencia alargada con prolongaciones citoplasmáticas. Algunas células adquieren una morfología redondeada. Tras 1 o 2 horas después de la siembra, muchas células presentan ya adherencias a la superficie de cultivo iniciando su crecimiento en monocapa. Las células se expanden contactando entre ellas. En estado de confluencia, no se aprecia de forma tan clara la morfología típica alargada, si no que van adquiriendo un aspecto más acortado. La mayoría de ellas presentan un citoplasma claro con aspecto granular que puede coincidir principalmente con mitocondrias u otros orgánulos citoplasmáticos. Se puede apreciar un núcleo más claro (eucromatina) bien definido que en ocasiones ocupa todo el eje menor de la célula, de forma alargada o redondeada. Dicho núcleo presenta en una tonalidad más oscura 1 o varios nucléolos muy desarrollados, lo que indica que se trata de células funcionalmente muy activas. Estas observaciones están en concordancia con los obtenidos por Romero *et al.* (2004a y b), los cuales describen dicha línea celular como células de morfología variable, fibroblástica y epitelial, con un contorno celular bien definido y con un número de microvellosidades variable, pero normalmente escaso. En lo referente a los orgánulos, describen la presencia de mitocondrias esféricas o alargadas, ribosomas libres o adosados al RER, cuerpos de inclusión autofágicos y vacuolas. En cuanto al núcleo, lo evidencian con forma alargada y nucléolo irregular. La heterocromatina se encuentra formando grumos y gran cantidad de eucromatina.



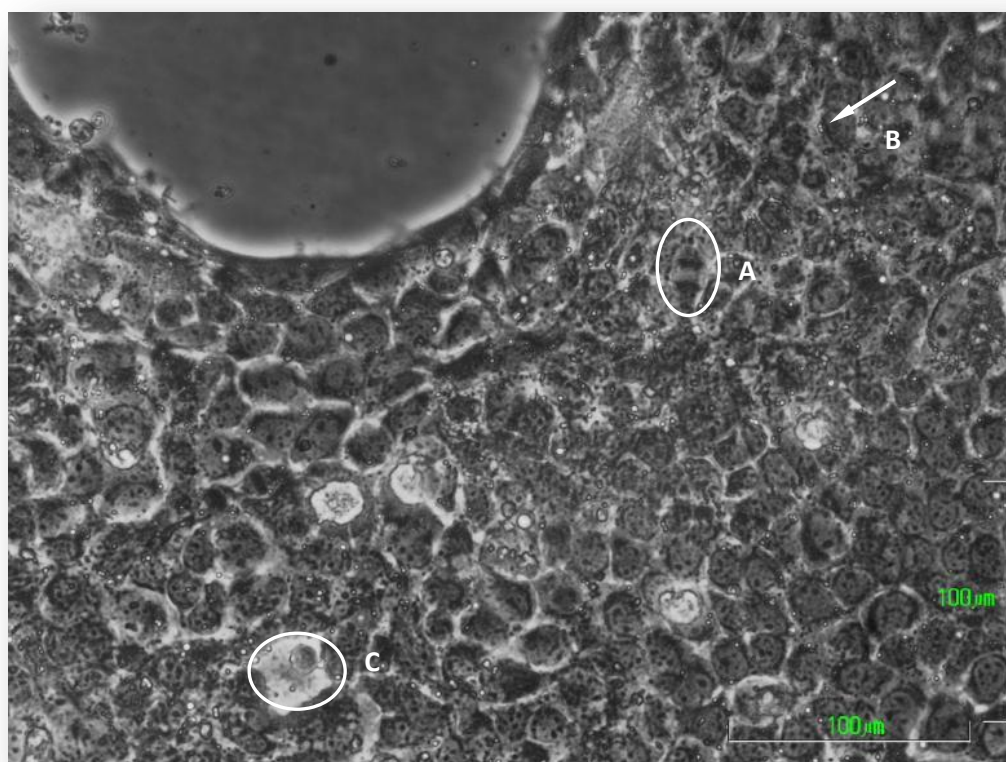


**Figura 68.** Control línea celular VERO (20X+1.5)

■ Células sometidas a diferentes concentraciones de cadmio. Cuando las células son sometidas a la concentración media encontrada en pollo ( $2,7 \mu\text{M}$ ), no se observan diferencias significativas con respecto al control. Aparecen algunas células que presentan una pequeña reducción del volumen nuclear por condensación de la cromatina y un citoplasma de mayor densidad, debido a la coagulación de las proteínas citoplasmáticas. Las células expuestas a la concentración media de cadmio encontrada en individuos juveniles ( $0,012 \text{ mM}$ ) pierden su morfología típica mostrando un aspecto más redondeado y homogéneo. Lyons-Alcántara *et al.* (1998), también observaron la distorsión de las conexiones celulares, que puede identificarse como una separación entre células debida a cambios morfológicos. Aunque el cadmio es estabilizante de membrana, la altera en gran medida, incrementando la glucólisis e inhibiendo la respiración y la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Repetto, 1995). Disminuye el número de células adheridas al frasco de cultivo apareciendo grandes espacios vacíos que contienen material celular. Hamada *et al.* (1994), señalan que el cadmio afecta rápidamente al núcleo y al metabolismo citoplasmático. En nuestro estudio, muchas células aparecen con el citoplasma vacuolizado, proceso previo a la obtención de células totalmente degeneradas o restos celulares. Algunas células para intentar recuperarse se dividen, apreciándose determinadas células en fase de

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

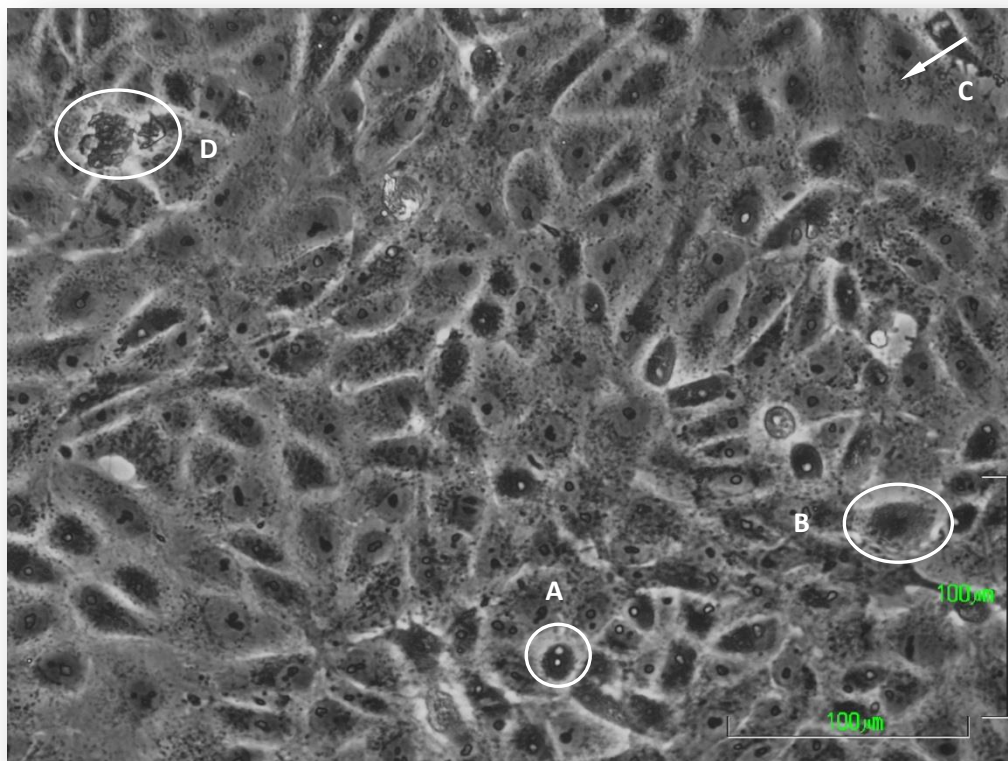
anafase o telofase. Tanto las células sometidas a la  $CE_{50}$  (0,0457 mM) como a la concentración media encontrada en ejemplares adultos (1,37 mM), muestran grandes espacios vacíos ocupados únicamente por medio de cultivo o restos celulares similares a los apreciados por Lyons-Alcantara *et al.* (1998). La mayoría de las células se encuentran flotando en el medio (forma redondeada), con un grado mayor de vacuolización que las células sometidas a concentraciones inferiores. Matsuura *et al.* (1991), a dosis elevadas observaron una condensación de la cromatina y degeneración vacuolar y Song y Koh (2012) constataron que el cadmio provocaba un aumento del daño celular y del número de células muertas (flotan en el medio de cultivo al perder su capacidad de adhesión), lesiones que aparecen en nuestras muestras en las células tratadas con las dosis de cadmio más elevadas. Un estudio reciente realizado por Odewumi *et al.* (2015), muestran también como las células de pulmón humanas (A549) retraen sus extensiones y adquieren forma redondeada.



**Figura 69.** Células sometidas a concentración media de cadmio de individuos juveniles. A. Células en división (anafase). B. Células con citoplasma condensado. C. Células degeneradas.

■ Células sometidas a diferentes concentraciones de plomo. En cultivos de células con la concentración media de pollo (0,45  $\mu\text{M}$ ) e individuos adultos (0,724  $\mu\text{M}$ ),

la mayoría de las células muestran una morfología similar a la muestra control, pero se pueden apreciar algunas de ellas en diferentes etapas iniciales de degeneración; células donde aparecen cromosomas condensados en la fase inicial de mitosis, células con un condensación citoplasmática y vacuolización y células que han perdido su morfología, con citoplasma muy vacuolizados y sin estructura definida por rotura de la membrana plasmática. Este hecho se debe a que las concentraciones halladas para estos individuos son considerablemente inferiores a la  $CE_{50}$  (1,9 mM). Las células sometidas a la  $CE_{50}$  muestran la morfología alargada típica de dicha línea celular, con núcleos bien definidos y nucléolos muy densos, pero también aparecen mayores espacios vacíos entre ellas, por lo que la densidad celular disminuye apreciándose células muertas flotando en el medio de cultivo.



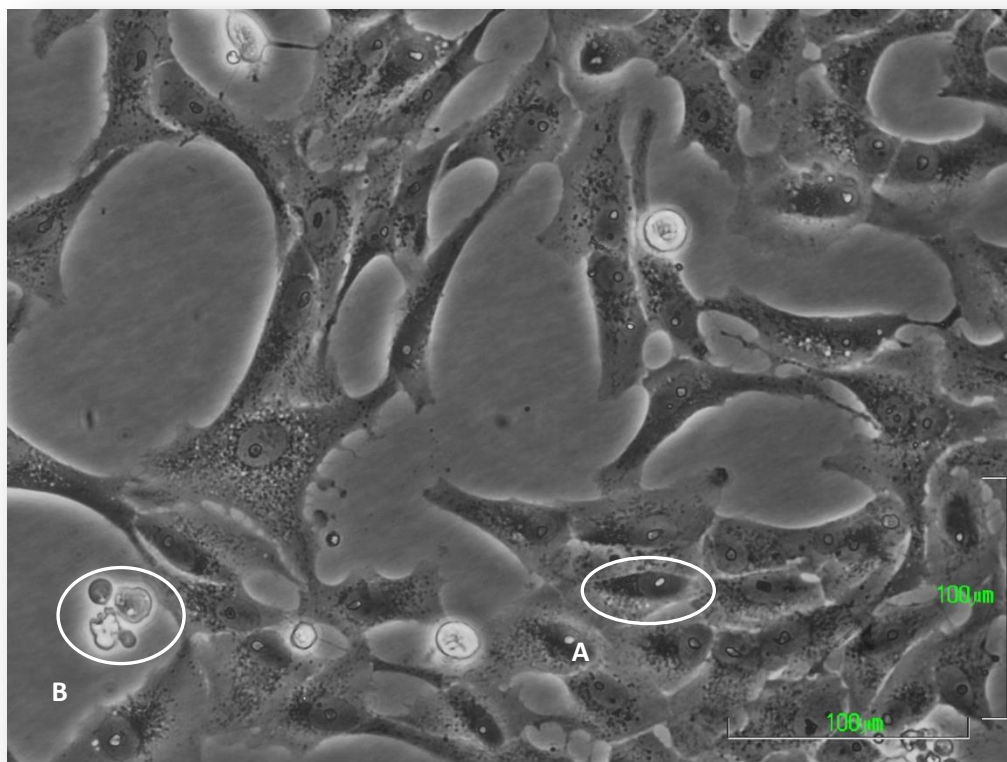
**Figura 70.** Células sometidas a concentración media de plomo de pollo. A. Condensación y vacuolización citoplasmática. B. Célula en mitosis. C. Pérdida de límites celulares. D. Restos celulares.

■ Células sometidas a diferentes concentraciones de cromo. Las células tratadas con las diferentes concentraciones de cromo muestran una disminución de la densidad celular, es decir, menor número de células adheridas al sustrato y células flotando en el medio de aspecto redondeado (muertas). Las células que aún están adheridas al



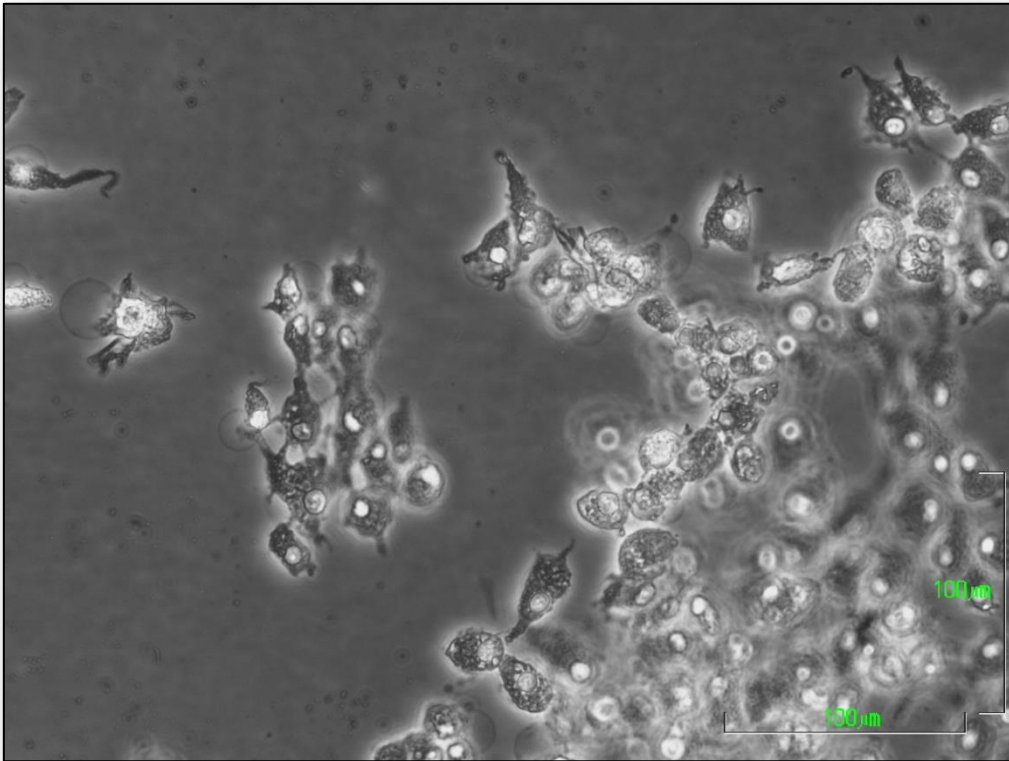
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

sustrato muestran una mayor condensación citoplasmática y nuclear y también pueden apreciarse restos celulares flotando en el medio de cultivo. Estos resultados se deben a que dichas concentraciones (0,005 mM y 0,0075 mM para adultos y pollos, respectivamente) son similares a la  $CE_{50}$  (0,0067 mM) e incluso superiores (0,1 mM en individuos juveniles) provocando graves lesiones o la muerte celular.



**Figura 71.** Células sometidas a la concentración media de cromo de pollos. A. Célula con citoplasma condensado y vacuolizado. B. Restos celulares.

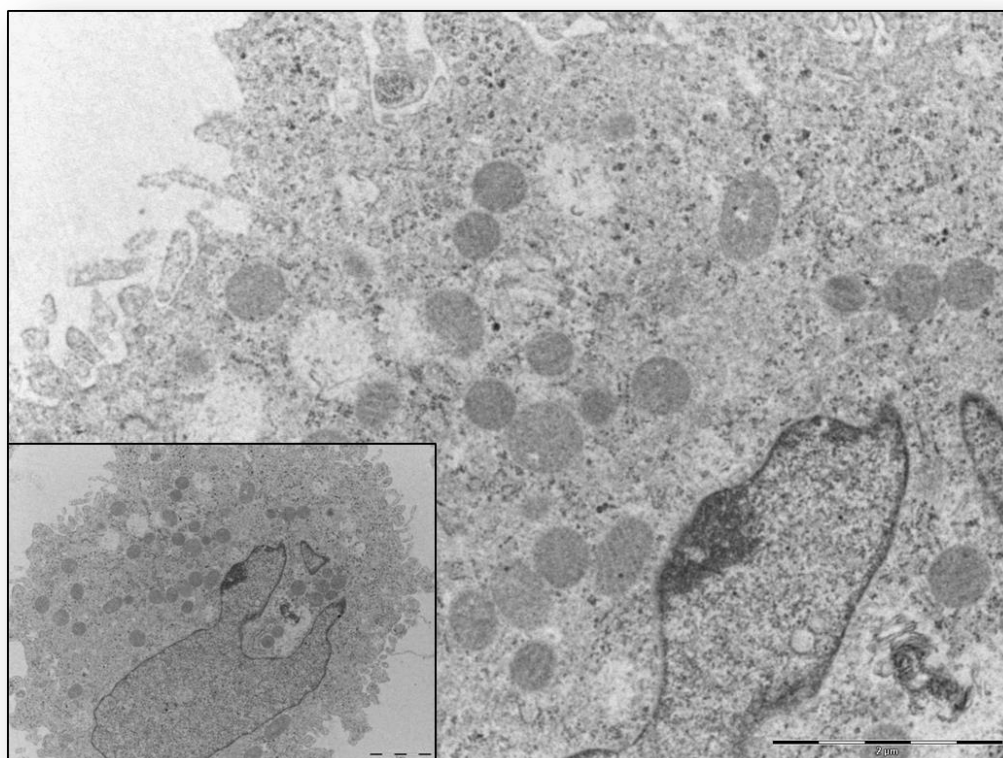
■ Células sometidas a diferentes concentraciones de selenio. Casi la totalidad de las células en las concentraciones encontradas en individuos adultos, juveniles y pollos, han perdido su capacidad de adhesión al sustrato encontrándose flotando en el medio de cultivo con una morfología alargada o en forma de restos celulares. Las células presentan degeneración hídrica, apareciendo vacuolizaciones perinucleares, núcleos bien definidos y nucléolos muy electrodensos. Conforme aumenta la concentración, encontramos un aumento de la vacuolización y un mayor proceso degenerativo.



**Figura 72.** Células sometidas a concentración media de selenio en pollos

#### IV.8.1.2. Microscopía electrónica

■ Cultivo control. Bajo el microscopio electrónico las células se presentan con contornos celulares bien definidos y una cantidad de prolongaciones citoplasmáticas variable, pero generalmente escasas. Muestran un citoplasma abundante con orgánulos bien visibles. Las mitocondrias son esféricas o alargadas con membranas nítidas, pocas crestas transversales y distribuidas por toda la célula. Los ribosomas aparecen libres en el hialoplasma, en forma de polirribosomas o asociados al retículo endoplasmático rugoso (RER). También pueden apreciarse lisosomas primarios y secundarios y en algunas de ellas los centriolos. Presentan un núcleo de aspecto irregular con una gran cantidad de euromatina y heterocromatina en forma de grumos. Tienen uno o dos nucléolos electrodensos adheridos a la envoltura nuclear. En alguna de estas células pueden apreciarse laminillas anulares (se considera que se originan como precursores de la cubierta nuclear en las células que están preparándose para la división).



**Figura 73.** Control de línea celular VERO (5800X-9700X)

■ Células sometidas a  $CE_{50}$  y concentración media de individuos adultos para el cadmio. En las células con  $CE_{50}$  (0,0457 mM) aparecen en las primeras etapas de degeneración celular con mitocondrias condensadas, gran cantidad de ribosomas y polirribosomas, desorganización del retículo endoplasmático y amplios nucléolos adheridos a la envoltura nuclear con grumos de heterocromatina asociada también a la envoltura nuclear. Como se ha indicado anteriormente, las mitocondrias son uno de los orgánulos más afectados a nivel estructural por metales pesados en células epiteliales del túbulo proximal renal (Peraza *et al.*, 2003; Thévenod, 2003). Mahaffey *et al.* (1981) y Rehm y Walkes (1990) constatan el hinchazón mitocondrial producido por el cadmio. Matsuura *et al.* (1991), detectaron mitocondrias en forma de anillo y Romero *et al.* (2003), detectaron la presencia de mitocondrias condensadas y deformadas en células BGM tras una exposición 0,062 mM. En nuestro estudio, se hace patente la condensación, deformidad y posterior degeneración a nivel mitocondrial con los distintos compuestos tóxicos. Ord *et al.* (1988), también señalan la alteración del RE, aparato de Golgi y ribosomas.

Las células con concentraciones medias de adultos (1,37 mM), aparecen fuertemente necrosadas y degeneradas con rotura de la membrana plasmática por gran vacuolización y ausencia de orgánulos citoplasmáticos, pero con presencia de gránulos de  $\beta$ -glucógeno. El núcleo reduce su tamaño por condensación de la cromatina que aparece en forma de eucromatina y heterocromatina en grumos y formando una banda de heterocromatina periférica.

En lo referente al núcleo celular, al igual que en nuestras muestras, diversos autores constatan distintas alteraciones (Ord *et al.*, 1988; Rehm y Waalkes, 1990). Hazen-Martin (1989) y Matsuura *et al.* (1991), constatan la condensación de la cromatina y segregación nucleolar y Lyons-Alcántara *et al.* (1998), constatan la presencia de núcleos irregulares, cambio morfológico que observamos cuando sometemos la línea celular VERO a la concentración media de individuos adultos.

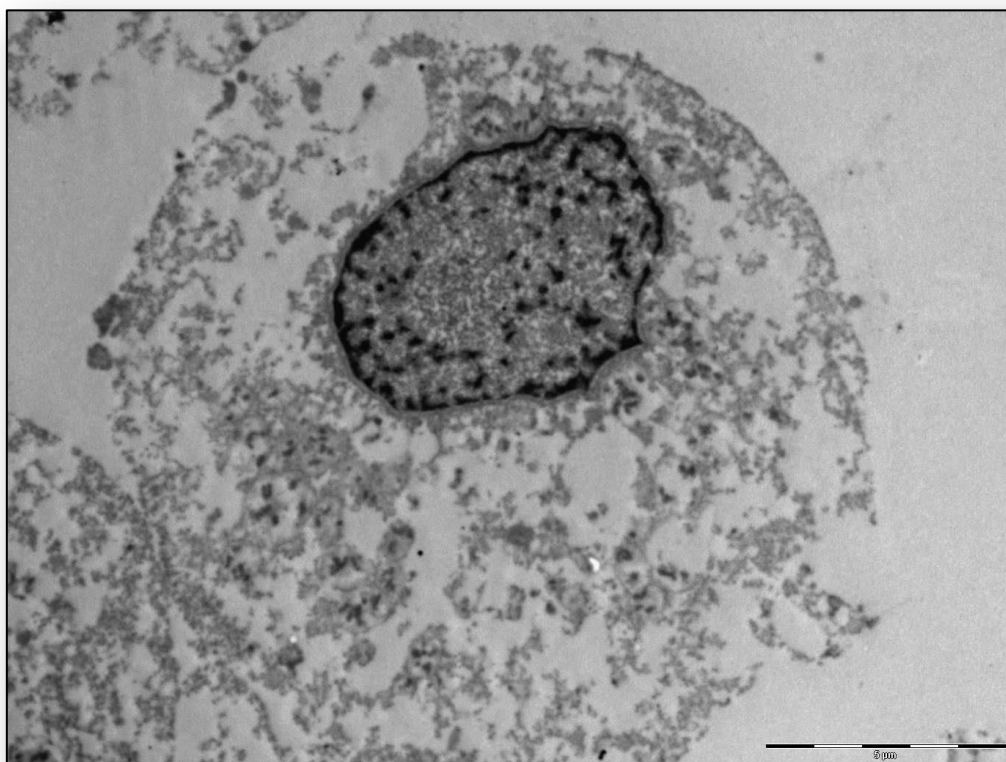
En varios estudios suele aparecer un aumento en el número de vacuolas citoplasmáticas en células renales tratadas con metales (líneas celulares LLC-PK1 y MDCK; Zimmerhackl *et al.*, 1998). En nuestro estudio, ese nivel de vacuolización se ve aumentado de forma dependiente de la concentración de los diferentes productos tóxicos. Matsuura *et al.*, (1991) constatan la aparición de vesículas y la degeneración vacuolar, mientras que Romero *et al.* (2003), detectan un aumento de la vacuolización. Con concentraciones elevadas, como en nuestro caso la hallada en individuos adultos (1.37 mM), Lyons-Alcántara *et al.* (1998), evidencian características propias de células necrosadas. Matsuura *et al.* (1991), muestran que los cambios finales producidos a nivel celular por el cadmio son la degeneración celular y la necrosis. De igual forma, Condrón *et al.* (1994), detectan núcleos distorsionados y células necróticas. La degeneración celular finaliza con la desintegración celular (Rehm y Waalkes, 1990).

Ord *et al.* (1988), indican que generalmente, el daño de la membrana celular es la primera muestra de la acción adversa del cadmio, mientras que en nuestro estudio los primeros cambios se aprecian a nivel citoplasmático. Sin embargo, al igual que denotan ellos, en general, el punto de inflexión en el que el cadmio se convirtió en letal, se caracterizó por una cascada de eventos que incluye el daño de componentes tanto citoplasmáticos como nucleares.

A diferencia de otros autores (Mahaffey *et al.*, 1981 y Romero *et al.*, 2003) en nuestro estudio no hemos detectados cuerpos de inclusión intranucleares en células

tratadas por cadmio, aunque si los presenciamos en células tratadas con plomo y cromo. Este hecho puede deberse a que la formación de cuerpos de inclusión se considera un mecanismo de defensa inicial y nuestras células se encuentran en un estado de degeneración superior. Las células tubulares tienen una cierta capacidad de producción de metalotioneína, que contrarresta los efectos tóxicos del cadmio libre al originarse un complejo cadmio-metalotioneína. Si la capacidad de producción de la proteína se sobrepasa por una elevada cantidad de cadmio, puede ocurrir un daño de las células tubulares proximales iniciándose los efectos tóxicos (Elinder y Nordberg, 1982 y Repetto, 1995).

Con respecto a las microvellosidades también existen diferentes estudios que muestran una disminución en su número tras la exposición a diferentes concentraciones de cadmio (Hazen-Martin *et al.*, 1989; Condrón *et al.*, 1994 y Romero *et al.*, 2003). En nuestro estudio, se produce la ausencia de prolongaciones citoplasmáticas en células tratadas con la concentración media hallada en individuos adultos (1.37 mM).



**Figura 74.** Célula sometida a concentración media de cadmio de individuos adultos (3900X).



■ Células sometidas a  $CE_{50}$ , concentración media y máxima encontrada en individuos adultos para el plomo. Todas las células presentan un comienzo de degeneración celular activándose el aparato lisosómico que hace que aumenten en número los ribosomas y el RER, además del número de prolongaciones citoplasmáticas. En el hialoplasma pueden observarse estructuras reticulares, mitocondrias electrodensas y de morfología diferente al control, aumento del número de lisosomas secundarios de contenido heterogéneo con gránulos de plomo que pueden acumularse en las células, citosomas y telolisosomas.

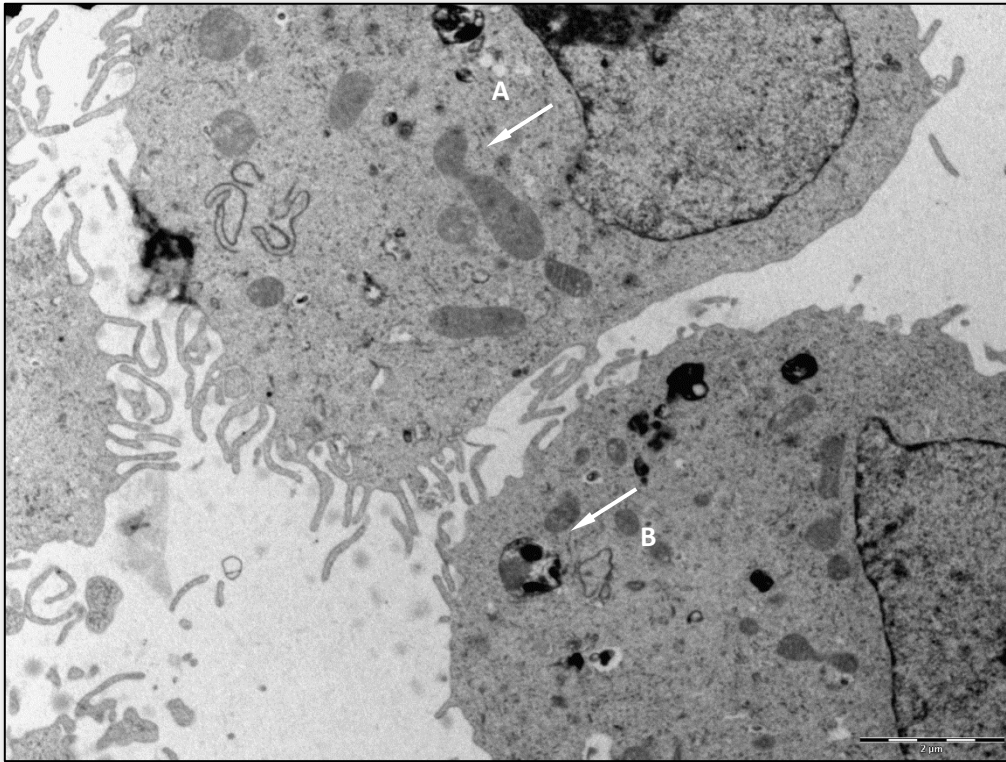
Tang *et al.* (1996), estudian las alteraciones morfológicas que produce el acetato de plomo sobre cultivos primarios de astrocitos y células de Schwann, mostrando rasgos similares a los detallados en el párrafo anterior para nuestro estudio. En los astrocitos a concentraciones de 10  $\mu\text{g/ml}$  observaron un aumento de la densidad lisosomal, inclusiones nucleares y dilatación de RE y con 100  $\mu\text{g/ml}$  además de los anteriores efectos, observan hinchazón mitocondrial, aumento del número de cuerpos mieloides en el citoplasma y el número de vacuolas junto a la membrana citoplasmática. De forma similar a nuestro trabajo las lesiones empeoran de forma dependiente a la concentración del metal. En las células Schwann, con una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  observaron hinchazón mitocondrial y del RE, vacuolización y numerosos cuerpos mieloides en el citoplasma celular. En general, tanto en nuestro estudio como en el realizado por Tang *et al.* (1996), se aprecia que las principales lesiones encontradas están relacionadas con la aparición de lisosomas secundarios, condensación mitocondrial y vacuolización.

Existen numerosos estudios que muestran la acumulación de diferentes metales como el plomo y el cadmio en el núcleo celular (Cherian y Nordberg, 1983). El rasgo más llamativo encontrado en diversos estudios, entre los que se encuentra el nuestro, es la aparición de cuerpos de inclusión de plomo en el interior de lisosomas o cuerpos de inclusión de plomo (LIB) libres en el citoplasma y en el núcleo (Tang *et al.*, 1996; Blankenship *et al.*, 1997; Sing *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2004a y Holmes *et al.*, 2005).

Concretamente de manera intranuclear, al igual que Romero *et al.* (2004a), las inclusiones encontradas son esporádicas. La migración de estos cuerpos de inclusión hacia el núcleo ya ha sido descrita por varios autores (McLaughlin *et al.*, 1980; Kendall *et al.*, 1981; Bonucci *et al.*, 1983; Kendall, Scanlon y Veit, 1983; Vicente-Ortega *et al.*,

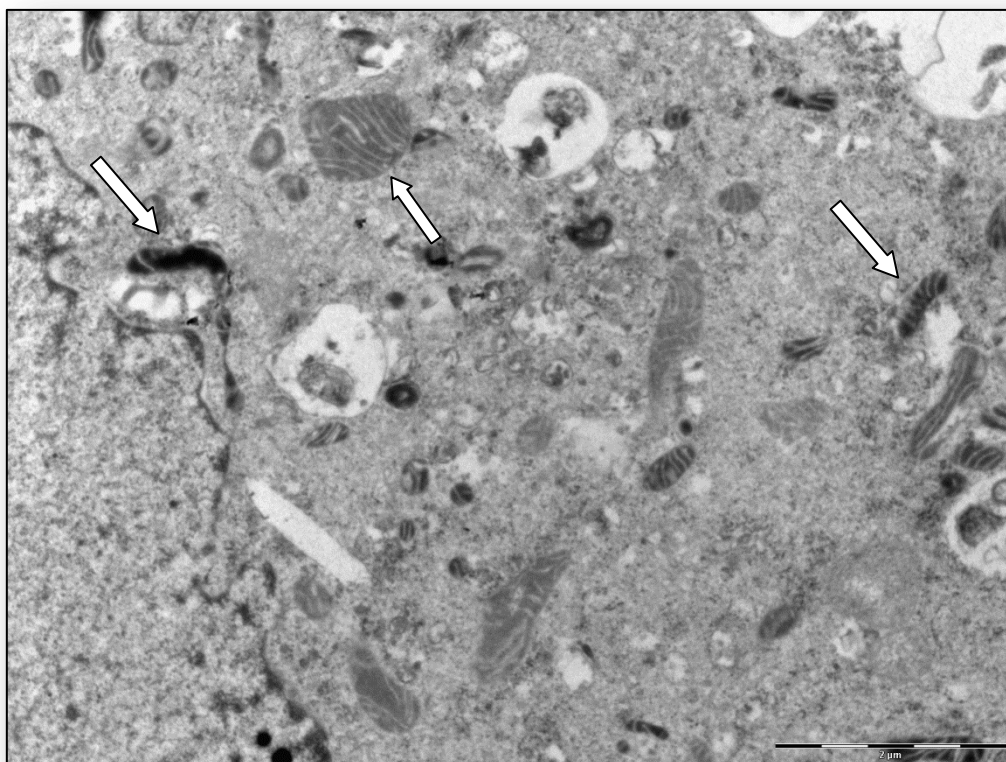
1996). Los cuerpos de inclusión de vez en cuando son apreciados en nuestro estudio en los núcleos en forma de grumos electrodensos, de manera similar a la forma descrita por otros autores (Vicente-Ortega *et al.*, 1996 y Romero *et al.*, 2004a). Esta formación de inclusiones intranucleares de proteínas y plomo en forma no difusible, aparecen en las células renales antes que ninguna afectación funcional como mecanismo defensivo (Repetto, 1995).

No está claro el tiempo necesario de exposición para que se produzca la aparición de dichos cuerpos de inclusión de plomo en el núcleo celular. Algunos autores defienden la hipótesis de que tras 24 horas de exposición son suficientes para poder ser observados (Choi y Richter, 1972). Sin embargo, otros autores afirman que es necesaria una exposición crónica para su observación (Horn, 1970). En nuestro estudio, el plomo estaba presente en el medio de cultivo en el que las células viven, pero a diferentes concentraciones. En las células sometidas a menores concentraciones de plomo tanto para la línea celular VERO como AML12, no se observaban inclusiones nucleares de forma tan frecuente como cuando se trataban las células con CE<sub>50</sub>. Esto podría sugerir que la aparición de este componente en el núcleo puede estar relacionada no solo con el tiempo de exposición, sino también con las concentraciones.



**Figura 75.** Células sometidas a concentración máxima de plomo encontrada en individuos adultos (5800X). A. Mitocondria. B. Lisosoma secundario

■ Células sometidas a  $CE_{50}$  y media de individuos adultos para el cromo. Ambas concentraciones (0,0067 y 0,005 mM, respectivamente) provocan vacuolización citoplasmática, hipertrofia mitocondrial (pleomorfismo) que afecta al sistema oxidativo de la célula (algunas mitocondrias con una concentración enzimática en la cámara interna y otras altamente degeneradas) y cuerpos de inclusión de cromo citoplasmáticos. Como se menciona en el apartado anterior, existen diversos estudios donde las células tratadas con diversos compuestos de cromo muestran un aumento de la vacuolización (Blankenship *et al.*, 1997) y de cuerpos de vacuolas autofágicas con gránulos electrodensos (Sing *et al.*, 1999 y Holmes *et al.*, 2005). En algunas células pueden apreciarse laminillas anulares, dentro del núcleo y los poros nucleares.



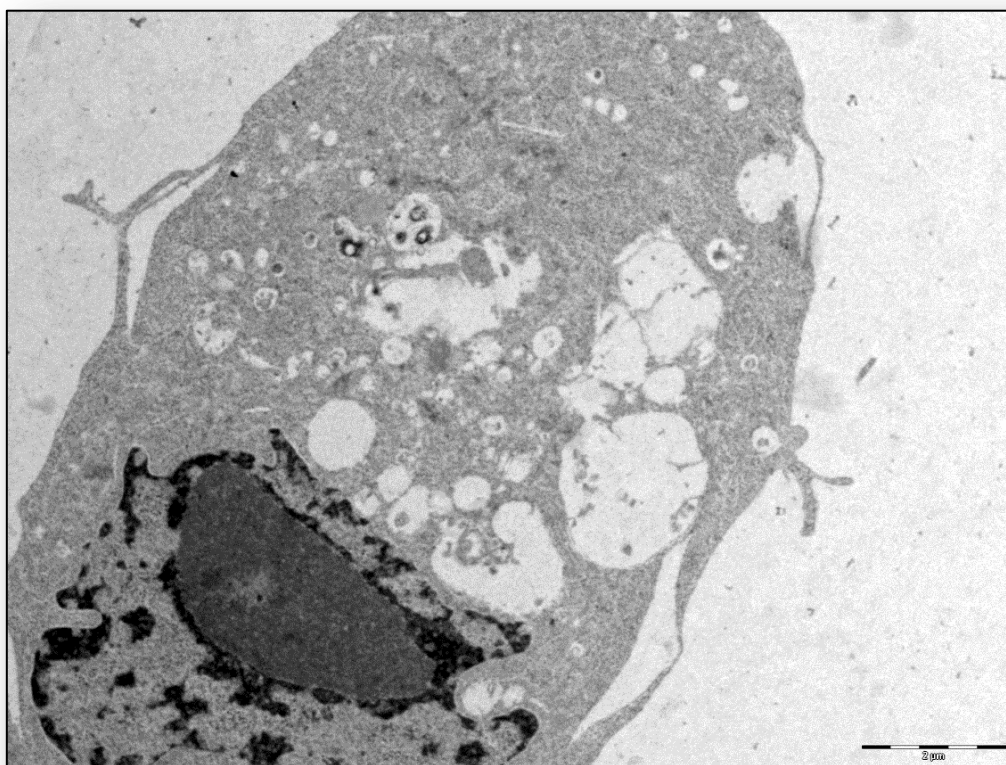
**Figura 76.** Células sometidas a la concentración media de individuos adultos en cromo (9700X). Pueden observarse diferentes grados de degeneración en las mitocondrias.

■ Células sometidas a  $CE_{50}$ , media de individuos adultos para el selenio y mitad de  $CE_{50}$ . Cuando sometemos las células a la mitad de la  $CE_{50}$  ( $2,7 \mu\text{M}$ ) las células presentan una etapa inicial de degeneración con pleomorfismo mitocondrial, gran cantidad de ribosomas y RER y citoplasma ligeramente vacuolizado. Sin embargo, las células sometidas a la  $CE_{50}$  tienen mayor cantidad de vacuolas en su citoplasma, picnosis nuclear y lisosomas secundarios. Las células sometidas a la concentración media de adultos, presentan un estado muy avanzado de degeneración celular con fuerte vacuolización del citoplasma por rotura de la membrana plasmática y ausencia de orgánulos, hipercromatosis (picnosis nuclear) donde se aprecia el espacio perinuclear aumentado.

Nagy *et al.* (2015), realizaron un estudio utilizando diferentes compuestos de selenio sobre queratinocitos de humanos (HaCaT). Cuando las células fueron tratadas con 1ppm de nanoselenio se observa un proceso de inhibición celular. Dicho proceso de inhibición celular se aprecia en nuestro estudio tanto por microscopía óptica como electrónica cuando las células son tratadas con selenio. Después de 60 minutos de



exposición aparecía un alargamiento celular, hecho que relacionan con muerte celular producida por apoptosis. El alargamiento celular también es observado en nuestro estudio en ambas líneas celulares antes de producirse la completa degeneración celular, que Nagy *et al.* (2015), comienzan a observar a partir de 10 horas con una concentración de 5 ppm. Como puede atestiguar en ambos estudios, la desintegración completa de la morfología celular se produce con el aumento de la concentración y el tiempo de exposición.



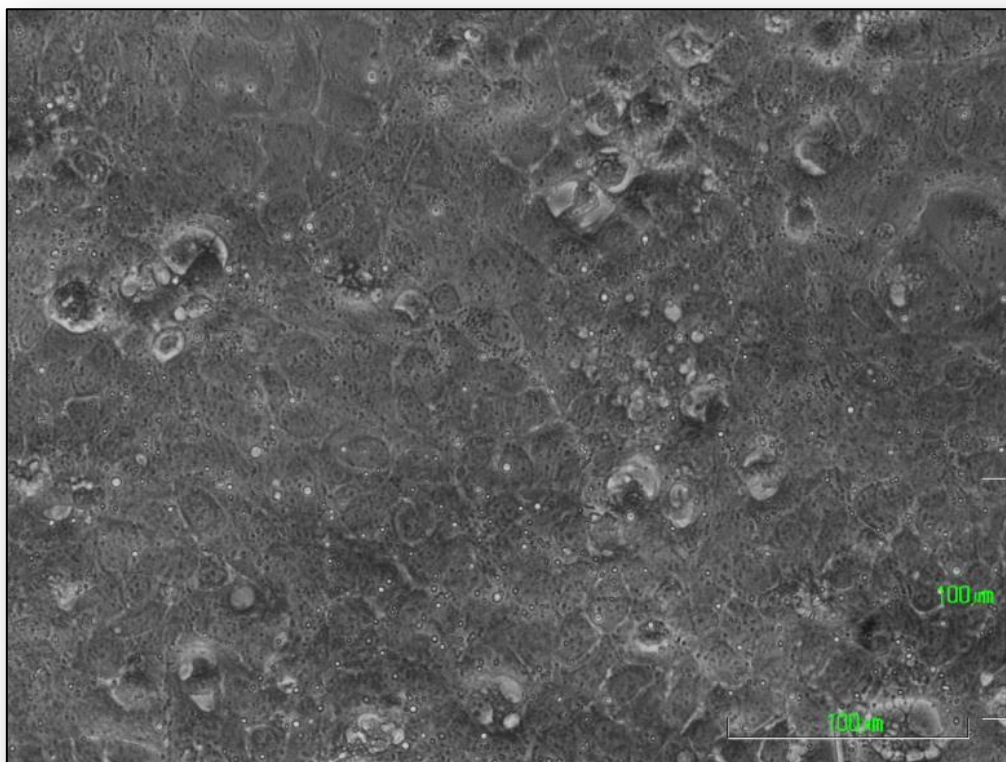
**Figura 77.** Célula VERO sometida a la  $CE_{50}$  de selenio (5800X)

#### IV.8.2. LÍNEA CELULAR AML12

##### IV.8.2.1. Microscopía óptica

■ Cultivo control. La línea celular AML12 con el microscopio de contraste de fases presenta morfología epitelial, de apariencia poliédrica con mayor número de prolongaciones citoplasmáticas que la línea anterior. El primer día de la siembra ya pueden observarse células adheridas al sustrato, pero presentan un DT superior a la línea celular VERO. Las células se expanden contactando entre ellas y quedando muy

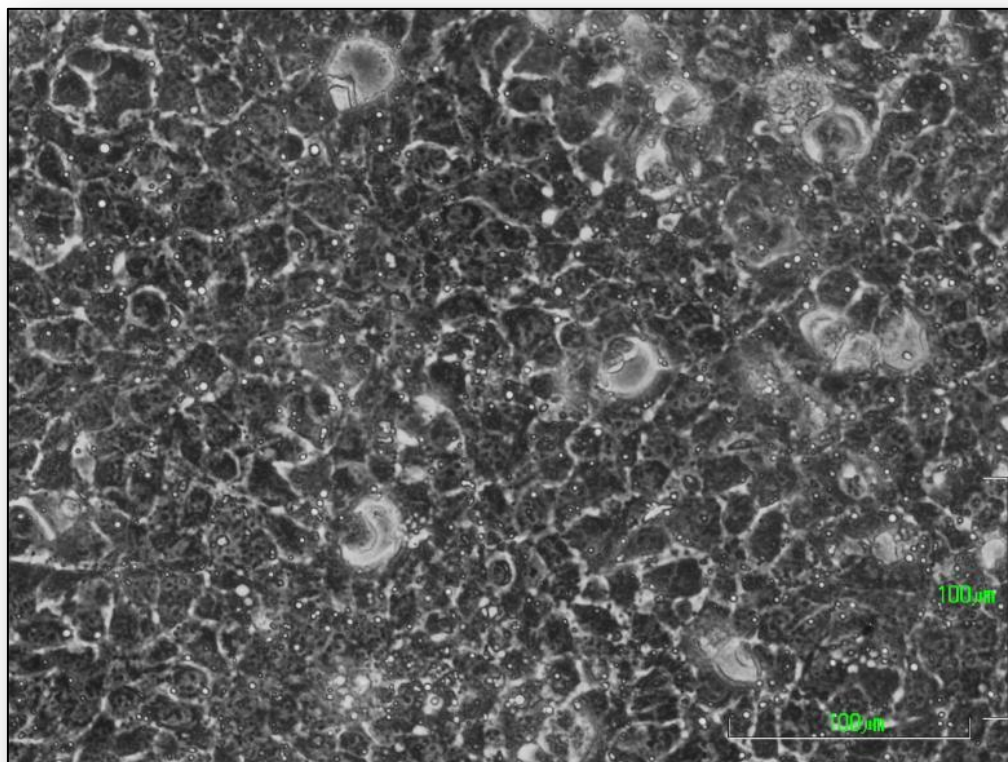
próximas entre sí. En estado de confluencia las células ocupan toda la superficie de cultivo de forma masiva sin apreciarse con claridad los límites celulares. La mayoría de ellas presentan un citoplasma claro con gran cantidad de orgánulos celulares. El núcleo, mayormente eucromático, ocupa la mayor parte de la célula, con uno o dos nucléolos de gran tamaño que indica, de la misma forma que en la línea celular VERO, que son células funcionalmente muy activas.



**Figura 78.** Control línea celular AML12 (20X+1.5)

■ Células sometidas a diferentes concentraciones de cadmio. Las células pierden la cohesión entre ellas (rotura de desmosomas) y se observa una mayor separación entre estas con respecto a la muestra control. Aumenta el número de vacuolas citoplasmáticas por pérdida de la permeabilidad de la membrana y aumenta la condensación del núcleo mostrándose con menor tamaño y más electrodensos. Hamada *et al.* (1994), constataban que el cadmio puede llegar rápidamente al núcleo en cultivos primarios de células del tubo proximal de perro, de esta forma puede producirse la condensación del núcleo que se aprecia en nuestras muestras. En las células sometidas a una mayor concentración (0,12 y 0,0613 mM para adultos y  $CE_{50}$ , respectivamente) aparecen mayor número de células degeneradas o bien flotando en

el medio (restos celulares). Como hemos comentado anteriormente, Lyons-Alcántara *et al.* (1998), señalaron que el cadmio en células epidérmicas cultivadas de explantes de piel de la trucha arco iris, produce conexiones distorsionadas entre células, compatibles con la separación celular encontrada en nuestras células con respecto al control.

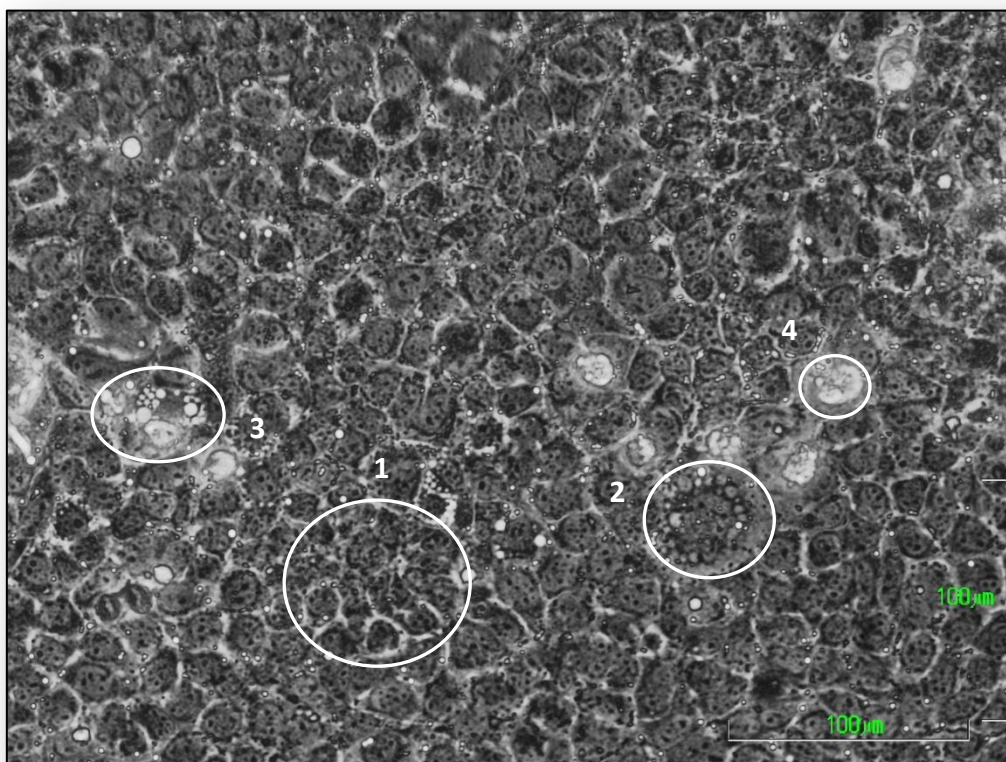


**Figura 79.** Células sometidas a concentración media de cadmio en pollos (20X+1.5)

■ Células sometidas a diferentes concentraciones de plomo. De la misma forma que para el cadmio, las diferentes concentraciones de plomo ocasionan vacuolización citoplasmática, condensación citoplasmática y algunas células degeneradas o restos celulares flotando en el medio de cultivo sumado al aumento de la separación entre células. Carranza-Rosales *et al.* (2005), encuentran cambios similares cuando exponen células de riñón de zarigüeya (CRL-1840) a bajas dosis de cloruro de mercurio; las células pierden su morfología típica al adquirir una morfología redondeada y se produce el desprendimiento celular de la superficie del frasco de cultivo (células muertas o altamente degeneradas). La membrana celular y las enzimas son los lugares diana más importantes para los metales; en la primera se fijan sobre la superficie externa por ligandos esenciales, y afectan tanto los fenómenos de permeabilidad, como el normal funcionamiento de las enzimas implicadas en el



transporte activo. Estos trastornos estructurales, aunque sean mínimos, repercuten en la función celular (Repetto, 1995). Los metales pueden modificar la composición de las membranas reaccionando con sus constituyentes o intercambiarse con elementos que cumplen misiones fisiológicas (por ejemplo, plomo por calcio), de todo lo cual se derivan alteraciones de la función, e incluso muerte celular.

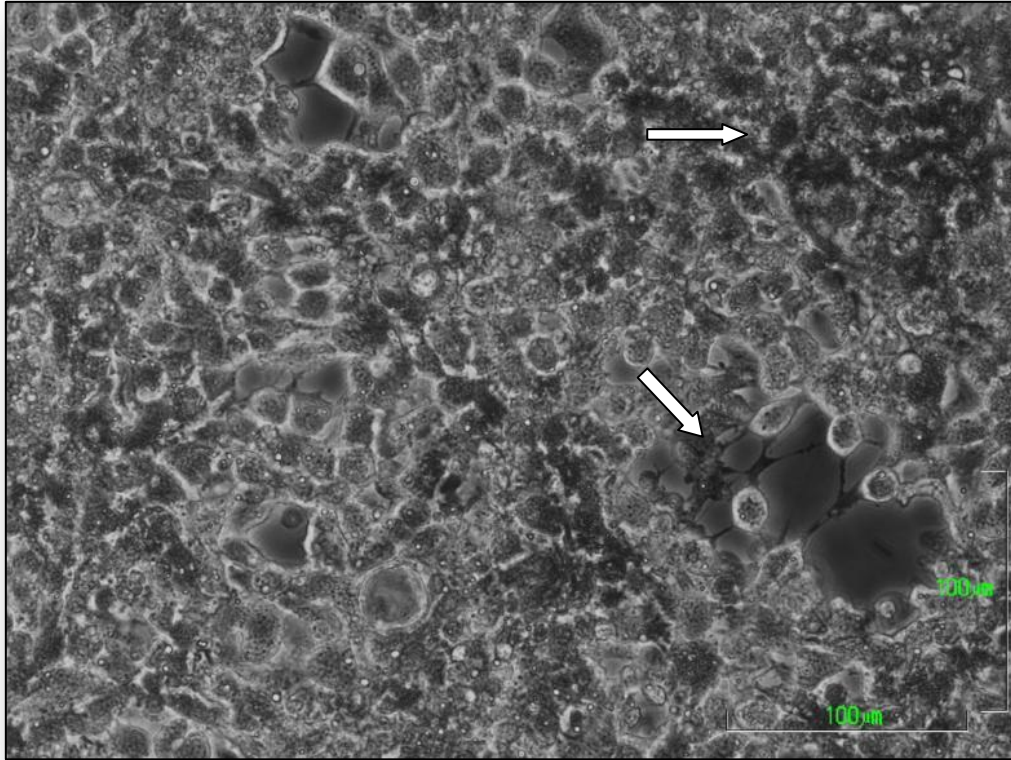


**Figura 80.** Células sometidas a la concentración de plomo en pollos (20X+1.5). Se pueden apreciar diferentes grados de vacuolización citoplasmática y degeneración celular.

■ Células sometidas a diferentes concentraciones de cromo. Las células tratadas con la menor concentración ( $CE_{50}$ ) presentan un aspecto similar a las células control, pero se pueden observar los contornos celulares (por disminución del tamaño de la célula) y mayor vacuolización del citoplasma. Para la concentración de adultos se aprecia una mayor condensación del citoplasma y mayores espacios intercelulares. En las células tratadas con las concentraciones más altas de cromo (9,5 y 8,2  $\mu$ M para pollo y juvenil, respectivamente), la separación entre las células aumenta apareciendo grandes espacios vacíos donde se aprecian prolongaciones citoplasmáticas o restos celulares flotando en el medio. Dichas prolongaciones citoplasmáticas también son

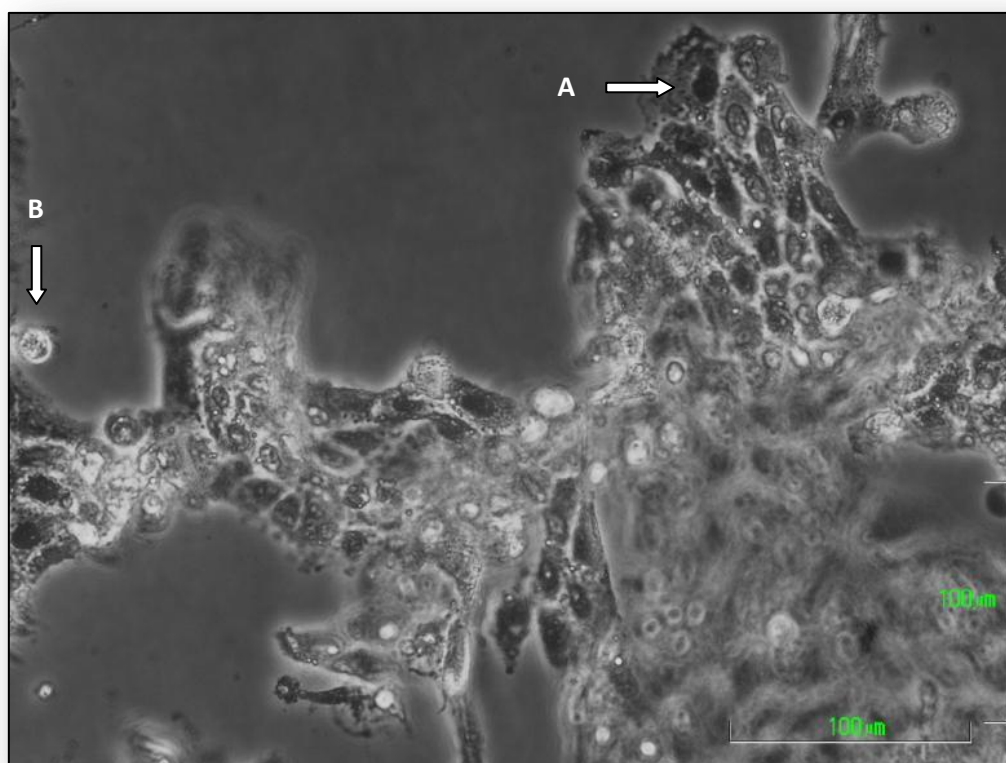


identificadas por Romero *et al.* (2004b), en células BGM tratadas con cloruro de mercurio (0,045 mM). En nuestro estudio, se aprecian células con el contenido celular condensado y algunas células en diferentes fases de degeneración de mayor tamaño, debido a la pérdida de selectividad de la membrana plasmática.



**Figura 81.** Células sometidas a la concentración media de cromo de individuos juveniles (20X+1.5). Pueden observarse los grandes espacios vacíos con prolongaciones citoplasmáticas y la condensación celular con pérdida de morfología típica epitelial.

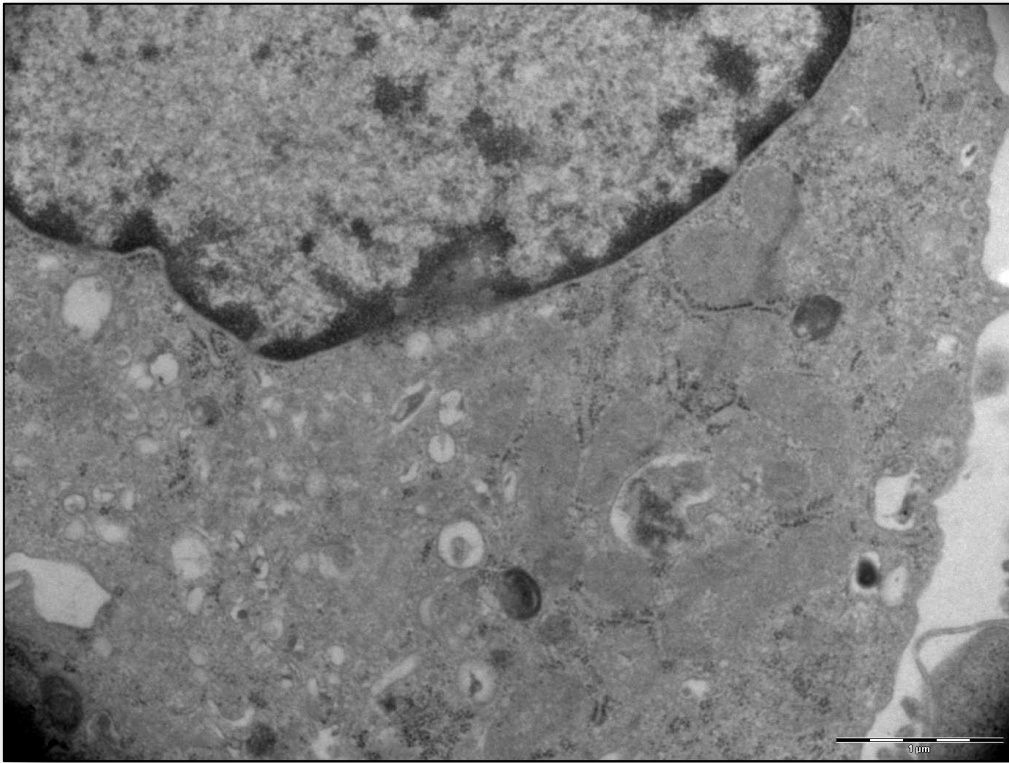
- Células sometidas a diferentes concentraciones de selenio. Las células presentan las lesiones vistas con anterioridad con el resto de elementos inorgánicos ensayados: condensación del citoplasma, núcleos electrodensos por condensación de la cromatina, fuerte vacuolización, disolución del material nuclear por pérdida de selectividad, falta de cohesión celular, grandes espacios vacíos entre las células y células con diferentes grados de degeneración.



**Figura 82.** Células sometidas a la concentración media de selenio de individuos adultos (20X+1.5).A. Condensación nuclear. B. Célula muerta

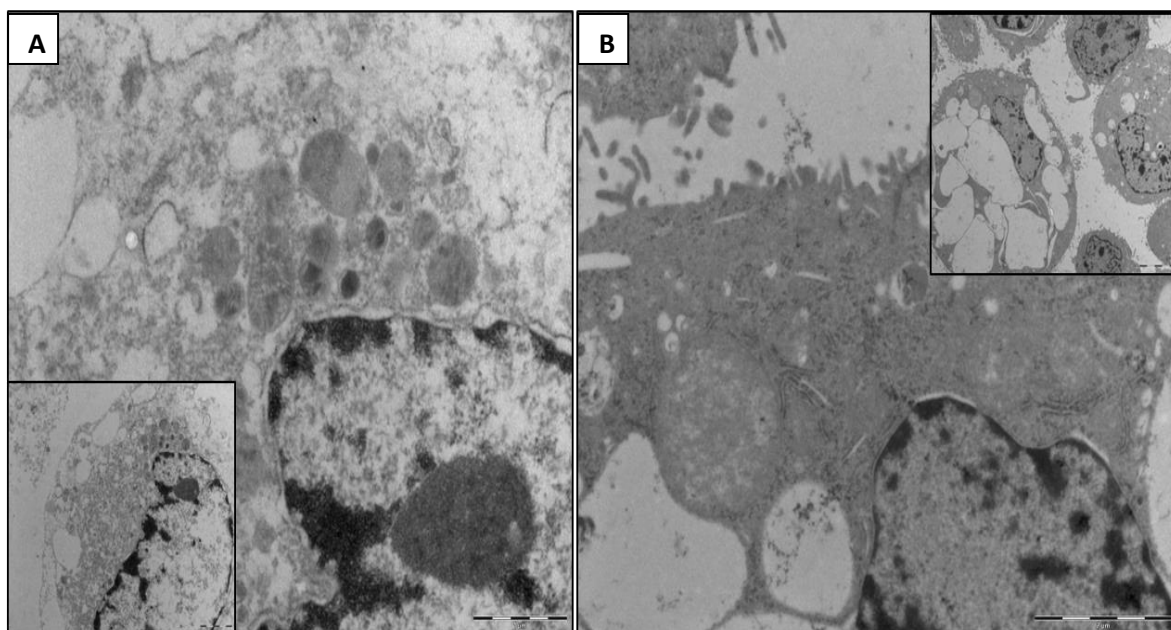
#### IV.8.2.2. Microscopía electrónica

■ Cultivo control. Con el microscopio electrónico las células AML12 se presentan con contornos celulares bien definidos y una cantidad de prolongaciones citoplasmáticas variable mayor que en las células VERO. Muestran un citoplasma abundante con orgánulos bien visibles. Las mitocondrias, distribuidas por toda la célula, son esféricas o alargadas con membranas menos nítidas que en la anterior línea celular, donde no se observan las crestas mitocondriales y aparecen con una tonalidad más clara. Los ribosomas aparecen libres en el hialoplasma, en forma de polirribosomas o asociados al retículo endoplasmático rugoso (RER). Estas células de origen hepático presentan un REL más desarrollado y mayor cantidad de lisosomas que la línea celular VERO. También pueden observarse en algunas de ellas el aparato de Golgi y los centriolos. Presenta un núcleo de aspecto irregular predominantemente eucromático con una banda periférica de heterocromatina. Por lo general tienen uno o dos nucléolos electrodensos.



**Figura 83.** Célula muestra control AML12 (13500X)

■ Células sometidas a  $CE_{50}$  y concentración media de individuos adultos para el cadmio. Las células tratadas con ambas concentraciones aparecen necrosadas y con diferentes grados de degeneración, que se acentúa en las células tratadas con la concentración media hallada en individuos adultos. En las células tratadas con  $CE_{50}$  (0,0613 mM) se pueden observar diferentes grados de vacuolización celular, fagolisosomas y mitocondrias tumefactas (mayor volumen). En las células tratadas con la concentración media encontrada en individuos adultos, se aprecia una fuerte vacuolización por pérdida de la selectividad de la membrana y consecuentemente un aumento del contenido líquido y menor condensación del citoplasma, mitocondrias desnaturalizadas con crestas dilatadas (electrodensas), lisosomas secundarios y un aumento del espacio perinuclear junto con grumos de heterocromatina dispersos en el núcleo. Dichos cambios a nivel mitocondrial, sistema membranoso y nuclear quedan también patentes en diferentes estudios previos. Así, Bucio *et al.* (1995), constatan que el cadmio provoca la disminución de mitocondrias o cambios en su morfología, RER desorganizado, aumento de cuerpos residuales electrodensos y vacuolización y desorganización de la cromatina, en células de origen hepático (WRL-68).



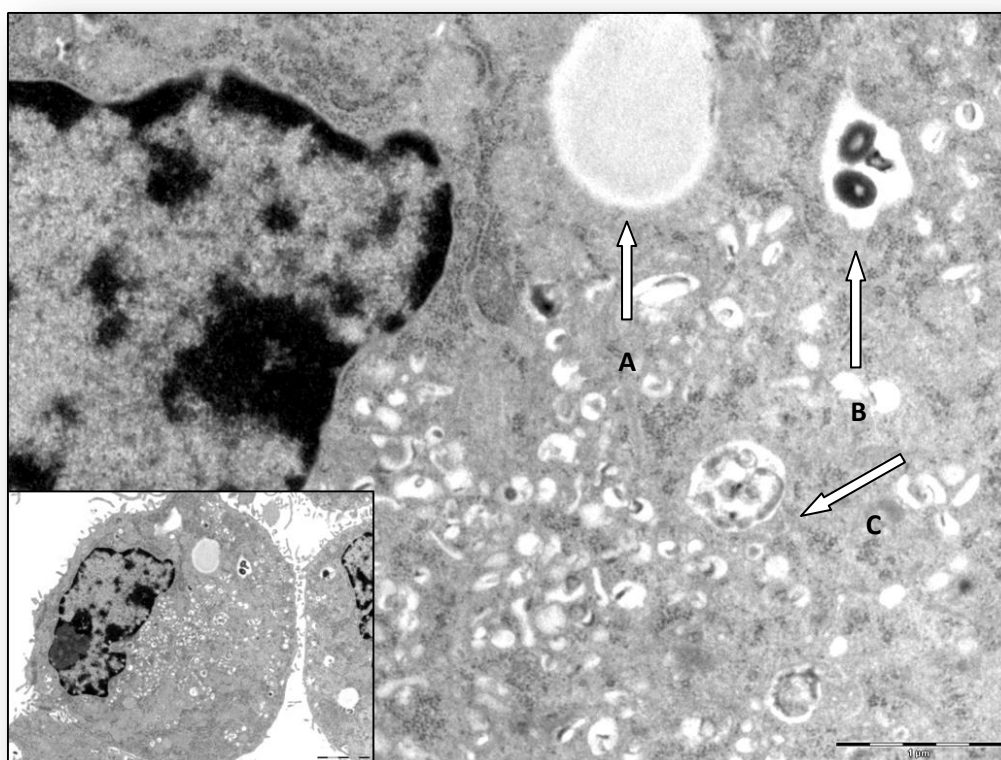
**Figura 84.** A Células sometidas a concentración. A. Célula sometida a concentración media de cadmio de individuos adultos (5800X-13500X). B. Célula sometida a la  $CE_{50}$  de cadmio (2400X-9700X).

■ Células sometidas a  $CE_{50}$ , concentración media y máxima encontrada en individuos adultos para el plomo. En las células tratadas con la concentración más alta (1,9058 mM,  $CE_{50}$ ) se observan cuerpos residuales de plomo en el citoplasma y de forma esporádica en el núcleo, mitocondrias tumefactas y el núcleo en fase inicial de picnosis (inicio de condensación de la cromatina nuclear) y una vacuolización citoplasmática similar a la encontrada en células tratadas con  $CE_{50}$  de cadmio. Numerosos estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, muestran que el plomo es un metal capaz de producir alteraciones a nivel mitocondrial, en diferentes tipos de células, entre ellas hepáticas (Wielgus-Serafieska *et al.*, 1980; Mahaffey *et al.*, 1981; Laszczyca, 1989; Goyer, 2001). Las lesiones encontradas en concentraciones inferiores de plomo son similares a las comentadas anteriormente, pero con un grado de degeneración y vacuolización inferior. Tienen núcleos de morfología irregular con hiperchromatosis.

Como se ha descrito anteriormente, uno de los principales cambios que se puede observar tras el tratamiento con plomo es la aparición de cuerpos libres o en el interior de lisosomas de restos de plomo que aparecen en líneas celulares de diferente origen (Tang *et al.*, 1996 y Sigh *et al.*, 1999). Qu *et al.*, (2002) estudiaron el efecto del plomo en fibroblastos de ratón MT (no presentaban metalotioneínas) y ratones



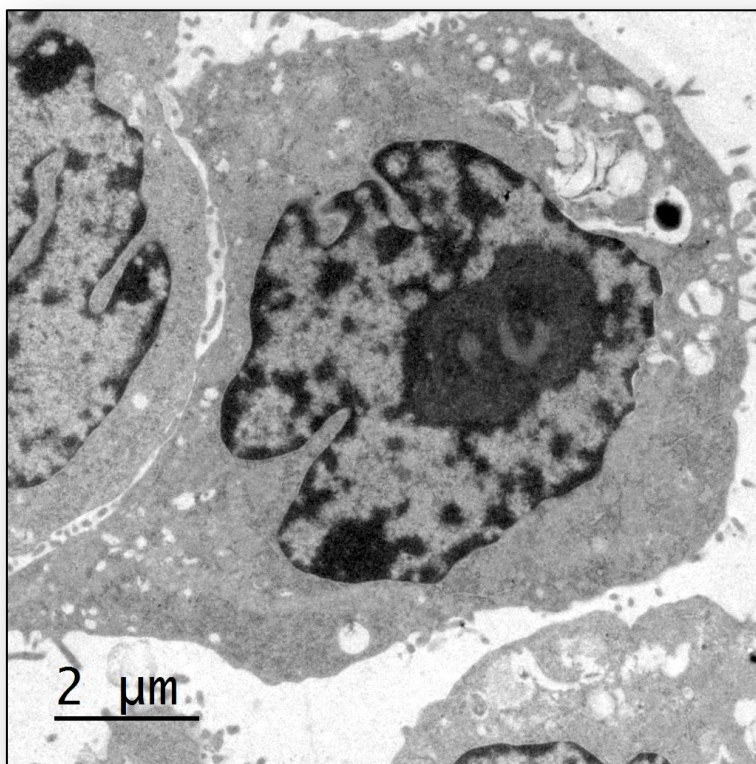
salvajes WT. Sus resultados muestran que los ratones sin metalotioneína eran más sensibles al plomo y no mostraban cuerpos de inclusión de plomo a diferencia de los ratones WT. Por lo que la formación de cuerpos de inclusión de plomo podría estar relacionada con el papel detoxicador de las metalotioneínas sobre el plomo. Este papel ejercido por las proteínas ha sido también descrito para otros metales como el cadmio y el cromo. En el hígado, el cadmio induce la síntesis de metalotioneínas formándose un complejo cadmio-metalotioneína que se considera menos tóxico que el cadmio no enlazado, pudiendo la proteína actuar como agente detoxicante (Repetto, 1995).



**Figura 85.** Células sometidas a concentración media de plomo encontrada en individuos adultos (5800X-13500X). A. Inclusión lipídica. B. Lisosomas secundarios. C. Citoplasma muy vacuolizado.

■ Células sometidas a  $CE_{50}$  y media de individuos adultos para el cromo. En ambas concentraciones (3,6 y 6  $\mu\text{M}$ , respectivamente) se observan mitocondrias dilatadas (mayor tamaño), restos de productos metabólicos (grandes espacios circulares), aumento del número de prolongaciones citoplasmáticas, telolisosomas, vacuolas citoplasmáticas y gránulos de cromo electrodensos libres en el citoplasma y esporádicamente en el núcleo o en cuerpos de inclusión autofágicos.

La presencia de los lisosomas o vacuolas con un contenido electrodensos y microgránulos libres en el hialoplasma, tanto en la línea celular VERO como en AML12 para el plomo y el cromo, sugiere que el metal podría ser inicialmente encapsulado como parte del mecanismo de defensa celular. La presencia de estos microgránulos distribuidos por el hialoplasma podría sugerir la posterior alteración del sistema lisosomal. Este hecho estaría en concordancia con los datos obtenidos por otros autores, que citan que algunos metales, como el mercurio, que se acumula en los lisosomas son capaces de modificar las membranas de los orgánulos citoplasmáticos, tales como lisosomas, mitocondrias y peroxisomas (Lauwerys y Buchet, 1972; Roels, Buchet y Lauwerys, 1974; Marigómez, Soto y Kortabitarte, 1996) alterando el sistema fagolisosómico que forma parte del mecanismo de defensa de la célula (Romero *et al.*, 2004b).

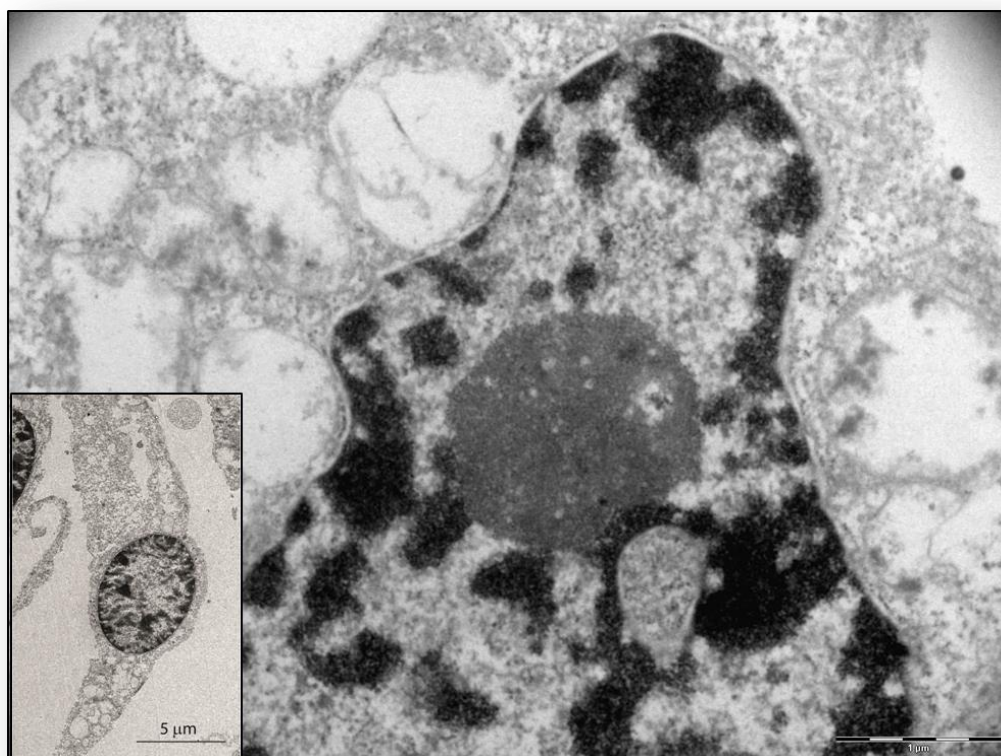


**Figura 86.** Células sometidas a  $CE_{50}$  de cromo (8000X)

■ Células sometidas a  $CE_{50}$ , media de individuos adultos para el selenio y mitad de  $CE_{50}$ . Las células sometidas a la mitad de la  $CE_{50}$  (0,0136 mM) muestran un aumento en el número de vacuolas citoplasmáticas, ribosomas y una mayor cantidad de prolongaciones citoplasmáticas. Las células tratadas con  $CE_{50}$  (0,0272 mM) y concentración media encontrada en individuos adultos (0,13 mM) son células con un

alto grado de degeneración. Dichas células están muy vacuolizadas por la entrada y aumento del contenido líquido presente en el citoplasma, han perdido los orgánulos y solo aparecen restos celulares. El núcleo se encuentra en una fase avanzada de hipercromatosis (picnosis) con gran cantidad de grumos de heterocromatina distribuidos por todo el núcleo y adosados a la envoltura nuclear. El espacio perinuclear se encuentra aumentado por la pérdida de selectividad de membrana que permite la entrada de contenido líquido. La célula ha perdido su morfología típica epitelial y ha adoptado una forma más alargada.

Como en el caso de otros autores, uno de los principales rasgos que aparecen como resultado del tratamiento de las células con metales, es el aumento de la vacuolización (Ware, Burkholder y Chang, 1975 y Bracken, Sharma y Bourcier, 1984). Dichos autores señalan un alto grado de tumefacción en diferentes líneas celulares tratadas con distintos compuestos tóxicos. Determinados estudios han señalado que este choque hídrico provocado por la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana, es la causa de la pérdida de viabilidad celular, en lugar de la interacción directa del compuesto tóxico sobre los componentes celulares (Bracken *et al.*, 1984; Bracken y Sharma, 1985; Miura y Imura, 1987).



**Figura 87.** Célula sometida a CE<sub>50</sub> de selenio (3400X-13500X)

En síntesis, podemos indicar que la localización de los distintos productos inorgánicos comienza con su depósito en el hialoplasma celular, posteriormente se acumulan en los lisosomas y el sistema endomembranoso actúa para eliminar por autofagolisis aquellos orgánulos que contengan el compuesto inorgánico (Goyer, 1983). Posteriormente, cuando el sistema lisosomal falla, comienzan una serie de reacciones en cadena que conllevan a la hipertrofia mitocondrial, formación de telolisosomas, picnosis nuclear, destrucción de orgánulos y aumento de la vacuolización por pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana, que finaliza con la degeneración celular y necrosis. En nuestro estudio podemos observar diferentes grados de alteración y degeneración celular. Los rasgos más característicos en ambas líneas celulares son la formación de cuerpos de inclusión en el caso del plomo y el cromo y la fuerte vacuolización, condensación mitocondrial y células con un alto grado de degeneración cuando son tratadas con cadmio y selenio.

En lo relativo al cadmio encontramos un alto número de células en estado de degeneración o necrosadas para ambas concentraciones. Esto concuerda con los datos obtenidos por espectrofotometría que indican que la dosis hallada en individuos



adultos es muy superior a la  $CE_{50}$ , siendo mucho más acusada para el caso de las células renales. En este caso la no presencia de células observables en un estado de apoptosis temprana concuerda con los datos obtenidos por citometría de flujo. En ambas líneas celulares el tercer cuadrante (apoptosis tardía, es decir, la célula pasa de un estado de apoptosis a necrosis) o cuarto cuadrante (células que mueren directamente por necrosis) es muy superior a las células que encontradas en el segundo cuadrante (células en apoptosis temprana). Este hecho puede deberse a las altas concentraciones de cadmio halladas en los individuos adultos. Para poder observar un proceso de muerte por apoptosis producido por cadmio en dichas líneas celulares, habría que delimitar concentraciones más bajas (la concentración de juveniles) o bien tiempos de exposición más cortos. Está referenciado que algunos autores encuentran diferencias con respecto al tipo de mecanismo de muerte celular por cadmio, en función de la concentración utilizada (El-Azzouzi *et al.*, 1994).

En lo referente al plomo, encontramos una baja frecuencia de células muertas en VERO y superior en células AML12, lo cual concuerda con el análisis citotóxico que muestra una  $CE_{50}$  muy superior al resto de compuestos en ambas líneas celulares y con los resultados obtenidos mediante el ensayo de anexina/IP, donde el porcentaje de células muertas por necrosis tras someterse a las diferentes concentraciones, no supera el 1,9% para VERO ni el 27,2% para AML12. Existen determinados autores que han señalado la baja toxicidad del plomo en el mantenimiento de la monocapa (Kaji *et al.*, 1995). El único tipo de muerte celular observado como consecuencia de la exposición al plomo fue el de necrosis (escasa cantidad de células muertas tanto por microscopía óptica como electrónica). Existen escasas referencias que muestren que el plomo provoque apoptosis como muerte celular (Romero *et al.*, 2009) y las existentes muestran este tipo de muerte tras la exposición a concentraciones entre la que en el presente estudio observamos en individuos adultos y la  $CE_{50}$  (Oberto *et al.*, 1996). El rasgo más característico observable han sido los depósitos de plomo en el citoplasma y de forma esporádica en el núcleo. Esto contrasta con otros estudios donde los cuerpos de inclusión se encuentran principalmente en el núcleo (Mahaffey *et al.*, 1981; Boulahdour y Berry, 1996; Tang *et al.*, 1996 y Singh *et al.*, 1999). Esto puede deberse a que estos últimos son principalmente estudios *in vivo* no *in vitro*, por lo que existen diferencias con respecto a la vía de entrada del metal, el tiempo de exposición, la dosis y la presencia o ausencia de sistema inmunológico.

En lo relativo al cromo los efectos producidos son similares a los encontrados para el plomo. La  $CE_{50}$  para VERO es ligeramente superior a la hallada en adultos y en el caso de AML12, la concentración de adultos es superior a la  $CE_{50}$ , mientras que las halladas en juveniles y adultos son superiores en ambas líneas. Esto concuerda con los datos obtenidos en microscopia óptica, donde las alteraciones tienen un mayor grado en células tratadas con las concentraciones medias halladas para juveniles y pollos. En lo referente a los hallazgos efectuados mediante el uso de microscopia electrónica, la principal característica es la degeneración del sistema vacuolar. Estos resultados concuerdan con los datos encontrados con respecto a citometría de flujo, ya que es bajo el porcentaje de células que muestren apoptosis o necrosis (9,1% para  $CE_{50}$  y 5,5% en adultos con respecto a VERO y 1,2% para  $CE_{50}$  y 32% para adultos con respecto a AML12). Las diferencias entre ambas líneas celulares (aunque no observables por microscopia) pueden deberse a una mayor sensibilidad de las células de origen hepático a los compuestos de cromo, pues presenta una  $CE_{50}$  inferior a la hallada para la línea celular VERO. Si bien sería interesante llevar a cabo estudios posteriores de microscopia electrónica con las concentraciones medias de juveniles y pollos donde cabría esperar un mayor grado de degeneración.

En lo relativo al selenio, todas las concentraciones halladas superan la  $CE_{50}$ . Esto se evidencia con los datos obtenidos mediante microscopia óptica y electrónica, donde las células presentan un alto grado de degeneración o muerte encontrándose despegadas de la superficie de cultivo y perdiendo su morfología típica adoptando una forma alargada. Por citometría de flujo, el cuadrante tres muestra el mayor porcentaje de células (32,2% para  $CE_{50}$  y 63,8% para adultos en VERO y 69,6% para  $CE_{50}$  y 89,6% para adultos en AML12), lo que concuerda con los datos obtenidos por microscopía donde se aprecian células muy necrosadas. En ambas líneas celulares los porcentajes aumentan con la concentración media de individuos adultos, ya que para ambas líneas superan la  $CE_{50}$ . Para poder observar rasgos característicos de apoptosis temprana, tendríamos que evaluar mediante microscopía electrónica durante tiempos de exposición más cortos.

IV.9. PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

En la siguiente tabla se pueden observar los resultados obtenidos tras el análisis (programa estadístico Graph Pad Prism), de cuatro ensayos independientes realizados para cada una de las condiciones.

**Tabla 50.** Unidades de intensidad de fluorescencia media obtenida para cada línea celular (medias y error estándar)

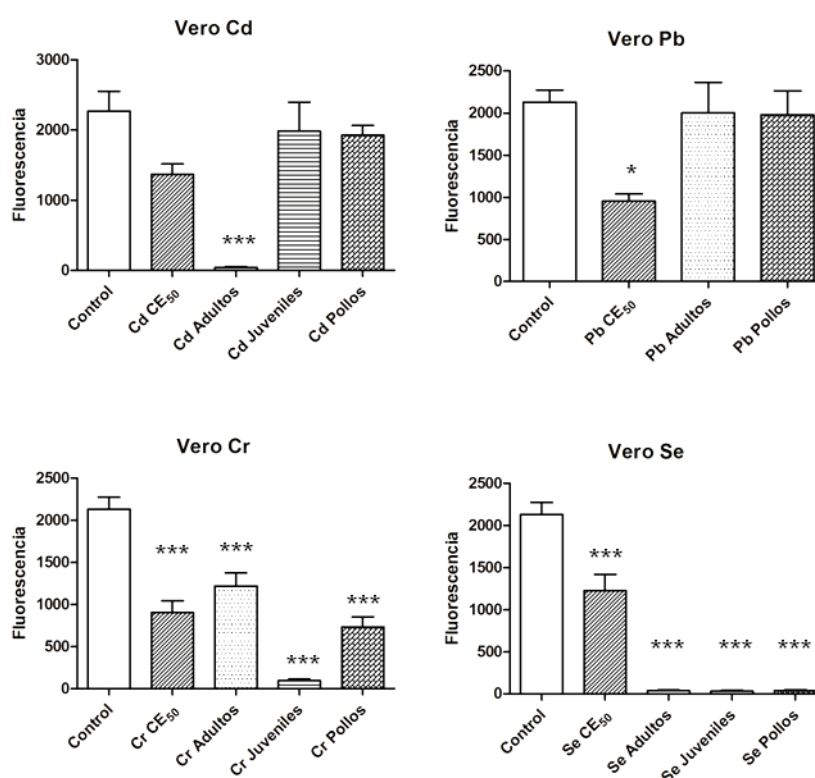
Concentraciones	VERO	AML12
Control	2131±142	135,5±4
Cd CE <sub>50</sub>	1369±147	112,9±6
Cd Adultos	42,08±12	239,8±26
Cd Juveniles	1985±414	102,3±7
Cd Pollos	1926±138	111,7±9
Pb CE <sub>50</sub>	952,3±88	88,4±12
Pb Adultos	2001±363	107,6±11
Pb Pollos	1976±288	105,3±8
Cr CE <sub>50</sub>	903.5±140	135,5±1
Cr Adultos	1219±154	107,8±1
Cr Juveniles	94,75±19	133,8±4
Cr Pollos	731,8±121	143,3±9
Se CE <sub>50</sub>	1225±195	120,3±7
Se Adultos	36,63±9	95,4±3
Se Juveniles	33±9	95,4±3
Se Pollos	39±9	95,38±5

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.9.1. LÍNEA CELULAR VERO

En líneas generales el elemento que produce un mayor efecto sobre la producción de ROS es el selenio, seguido del cromo, cadmio y plomo (Tabla 50 y Fig. 88). Todas las condiciones del selenio y el cromo tienen efectos significativos sobre la fluorescencia, mientras que en el caso del cadmio y el plomo, únicamente para las concentraciones más elevadas hemos observado efectos significativos (Fig. 88).

En la figura 88 pueden observarse los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico, de los diferentes ensayos llevados a cabo con la línea celular VERO:



**Figura 88.** Representación gráfica del estudio estadístico de la producción de ROS para la línea celular VERO (One-Way ANOVA; \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  y ns  $p > 0.05$ )

## IV.9.1.1. Cadmio

Como se puede observar en la tabla 50, todas las concentraciones estudiadas para el cadmio presentan una menor fluorescencia con respecto a la muestra control, siendo muy acusada en el caso de la concentración media hallada en individuos adultos. Dicha concentración presenta un grado de significancia del 99,9% con respecto al control (Fig. 88). Estos resultados coinciden con el ensayo de citotoxicidad, ya que dicha concentración es la más elevada (muy superior a la  $CE_{50}$ ) y con los resultados obtenidos mediante el ensayo IP/anexina, donde se aprecia un porcentaje de células no viables del 98,6% (tabla 46 y Fig. 64). Se ha evidenciado que el estrés oxidativo es un importante mediador en el proceso de apoptosis y que, dependiendo de su gravedad, ROS puede conducir a la necrosis, la apoptosis, o ambos (Leonard *et al.*, 2004).

Estos resultados indican que las concentraciones halladas para cadmio modifica la integridad del ADN celular no permitiendo a la célula producir ROS, y por lo tanto disminuyendo la fluorescencia.

Pathak y Khandadelwal (2006) estudiaron la producción de ROS y la inducción de apoptosis en linfocitos de ratón con diferentes concentraciones de cadmio (25 y 50  $\mu\text{M}$ ). Ellos observaron un aumento significativo de la producción de ROS que se mantiene hasta las 6 horas. Sin embargo, a partir de las 18 horas, igual que ocurre en nuestro estudio, momento en el que la concentración causa un daño drástico sobre el ADN, la fluorescencia medida por citometría de flujo (DCFH-DA) disminuyó.

Oh, Lee y Lim (2006) comprobaron la producción de ROS en fibroblastos de pulmón (WI 38) tras la exposición a 40  $\mu\text{M}$  de cadmio durante diferentes tiempos, mostrando un aumento a partir de 6 horas de exposición, una concentración máxima a las 24 horas y un descenso tras 36 horas. Descenso apreciable en nuestro estudio tras 24 horas de exposición.

En otros estudios también se ha observado una ligera disminución en la producción de ROS para el cadmio, como se produce en todas las concentraciones excepto la de adultos (la más elevada). Curcic *et al.* (2014), comprobaron el efecto en la producción de ROS en una línea celular de carcinoma de colon humano (SW 480) tras 72 horas de exposición a cadmio, comprobando que la concentración más baja (22,67  $\mu\text{M}$ ) mostraba niveles ligeramente inferiores al control. Para comprobar cuando

aumenta la concentración de ROS habría que emplear en futuros estudios tiempos de exposición inferiores.

### IV.9.1.2. Plomo

Todas las concentraciones presentan valores de fluorescencia similares a la muestra control, salvo en el caso de la  $CE_{50}$  (concentración más elevada), que muestra una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) (Fig. 88 y tabla 50). Los resultados observados muestran que las concentraciones encontradas en individuos adultos y pollos no producen un cambio en la producción de ROS. De igual forma, la  $CE_{50}$  es la concentración que muestra un mayor grado de apoptosis y muerte celular mediante el ensayo IP/anexina (tabla 46 y Fig. 64).

Igual que en el caso del cadmio, existen estudios que muestran un aumento significativo de la fluorescencia (DCFH-DA por citometría de flujo) después de tratamientos con plomo. Li *et al.* (2016), comprobaron que en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) una concentración de 125  $\mu\text{M}$  de acetato de plomo, provocaba un aumento en la producción de ROS de una forma dependiente hasta las 8 horas y un descenso entre las 8 horas y las 24 horas. Ese mismo descenso fue comprobado en otro estudio realizado por Su *et al.* (2016), con una concentración de 30  $\mu\text{M}$  en células PC12. Anteriormente, Penugonda *et al.* (2006), demostraron efectos similares en dicha línea celular con una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . En todos los estudios se comprueba lo evidenciado en nuestro trabajo, un considerable descenso de la producción de ROS tras 24 horas de exposición.

### IV.9.1.3. Cromo

Las concentraciones estudiadas muestran una disminución de la fluorescencia de forma dependiente con la concentración (Fig. 88 y tabla 50). Esta disminución es muy acusada para la concentración media hallada en individuos juveniles (la concentración más elevada), concentración que causa un mayor porcentaje de células en apoptosis (ensayo IP/anexina) (tabla 46 y Fig. 64). Todas las concentraciones muestran diferencias significativas con un grado de significancia del 99,9%. Estos resultados indican un daño celular severo que impide a la célula la producción de ROS.

Existen distintos estudios donde observan un aumento en la producción de ROS tras la exposición a diferentes compuestos de cromo. De esta forma, Pourahmad *et al.* (2003), estudiaron la citotoxicidad y la producción de ROS para diferentes metales en cultivos primarios de hepatocitos de rata. Para el caso del dicromato de potasio tras la introducción de 1mM ( $DL_{50}$ ), la absorbancia fue de  $508\pm 7$  tras 15 minutos y de  $502\pm 6$  tras 2 horas, siendo todas superiores a la muestra control ( $78\pm 5$ ). Vasant *et al.* (2003), observaron un aumento dependiente con el tiempo en la fluorescencia (DCFH-DA por citometría de flujo) tras el tratamiento de linfocitos humanos. Tras un periodo de 3 horas con una concentración de  $5\ \mu\text{M}$  de dicromato de potasio, la fluorescencia alcanza un 95% con respecto al 30% del control. De igual forma, Son *et al.* (2010), tras el tratamiento con 1, 5 y  $10\ \mu\text{M}$  con cromato de sodio de células de epidermis de ratón mostraron un aumento de la fluorescencia dependiente del tiempo. Estas diferencias en la producción de ROS con respecto a nuestro estudio pueden deberse a que en los trabajos anteriores se realiza la medición a tiempos de exposición muy inferiores.

No está bien establecido el vínculo entre la generación de ROS inducida por metales y la detención del ciclo celular (Leonard *et al.*, 2004). Son limitados los estudios disponibles que asocien la detención del ciclo celular inducida por metales y la generación de ROS mediada por metal.

Todas las concentraciones estudiadas, tanto en la línea celular VERO como AML12, provocan un aumento significativo de la fase S (Fig. 88 y 90), sobre todo para las concentraciones más altas, lo que podría indicar que el cromo provoca la detención del ciclo celular en la fase S.

Estudios anteriores han indicado que existe un vínculo directo entre el daño del ADN por ROS y la detención del ciclo celular en fase S tras su exposición al cromo (Xu, Buble, Detrick, Blankenship y Patierno, 1996). Efectos similares hemos encontrado no solo para el cromo, sino para el resto de elementos tóxicos estudiados en ambas líneas celulares.

#### IV.9.1.4. Selenio

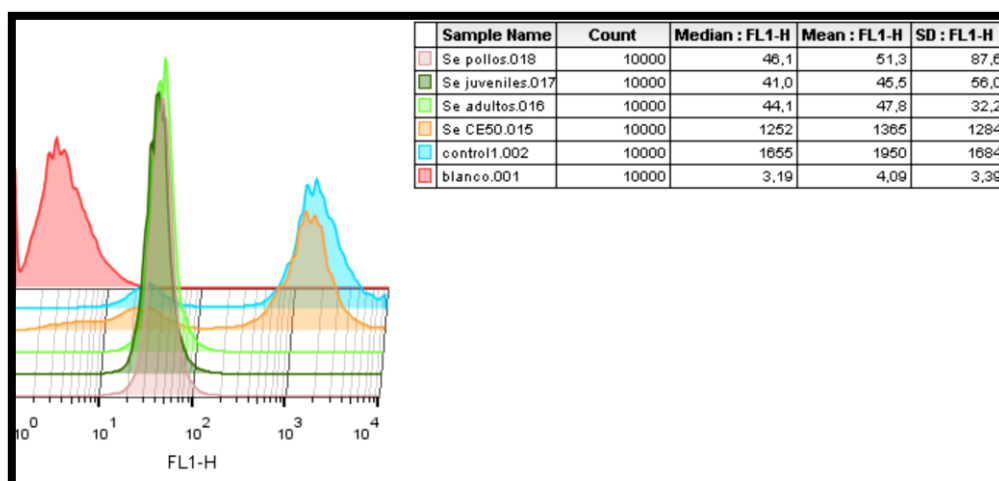
Todas las concentraciones estudiadas para el selenio provocan una disminución de las unidades de fluorescencia con respecto al control, incluso más

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

drástica que la encontrada para la concentración más elevada de cadmio (adultos) (Fig. 89). Muestran un grado de significancia del 99,9% (Fig. 88). Estos resultados coinciden con los observados mediante el ensayo de IP/anexina, donde todas las concentraciones producen daños elevados sobre la viabilidad, siendo ésta más alta para la concentración más baja (CE<sub>50</sub>) (tabla 46 y Fig. 64).

Estos resultados son indicativos de la destrucción celular provocada por las concentraciones utilizadas por el selenio.

Existen referencias que indican que entre el cadmio, mercurio, plomo, plata hierro, cobre y selenio, este último es el más tóxico para los sistemas vivos, dependiendo de la forma química ingerida (Stewart *et al.*, 1999). El selenio, clasificado como un no metal tiene exquisitas propiedades metálicas y puede sufrir reacciones redox fáciles con tioles. En esto radica la explicación general de la toxicidad del selenio. Es un catalizador oxidante de primera orden en el estado de oxidación de seleniuro capaz de oxidar continuamente tioles tales como glutatión (GSH) y reducir el oxígeno produciendo el radical libre superóxido (Xu *et al.*, 1991).



**Figura 89.** Solapamiento de los histogramas para las concentraciones de selenio en la línea celular VERO.

Los valores obtenidos para la línea celular VERO tras la exposición a los contaminantes estudiados, sugieren un papel de ROS, en este ensayo, como indicador de mortandad más que de toxicidad, ya que la mayoría de las concentraciones utilizadas producen altos efectos tóxicos a nivel celular, provocando la destrucción del

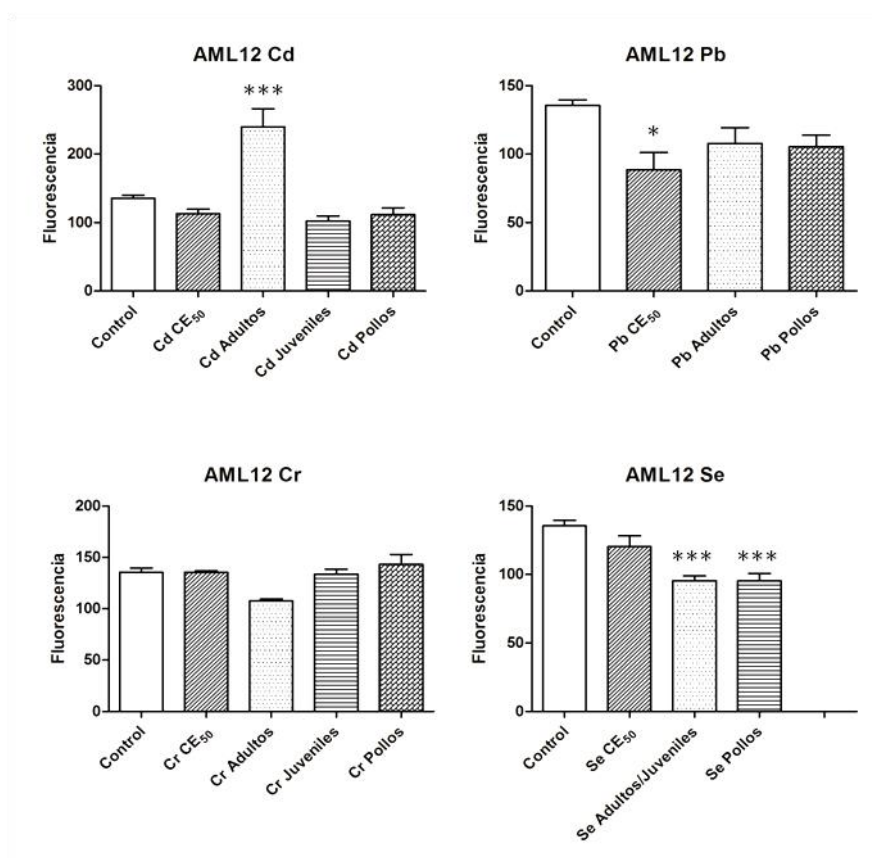


material genético y por tanto, una disminución de ROS tras 24 horas de exposición al tóxico.

#### IV.9.2. LÍNEA CELULAR AML12

En líneas generales el elemento que produce un mayor efecto sobre la producción de ROS es el selenio, seguido del cadmio, plomo y cromo. Los efectos observados son menos drásticos que los encontrados en la línea celular VERO. Las concentraciones encontradas para el selenio y la más elevada para el caso del cadmio presentan un mayor grado de significancia. Mientras que la concentración más elevada de plomo, produce un menor grado de significancia. En el caso del cromo, no hemos observado diferencias significativas con respecto al control.

En la figura 90 pueden observarse los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico de los diferentes ensayos llevados a cabo con la línea celular AML12:



**Figura 90.** Representación gráfica del estudio estadístico de la producción de ROS para la línea celular AML12 (One-Way ANOVA; \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05 y ns p > 0.05)

### IV.9.2.1. Cadmio

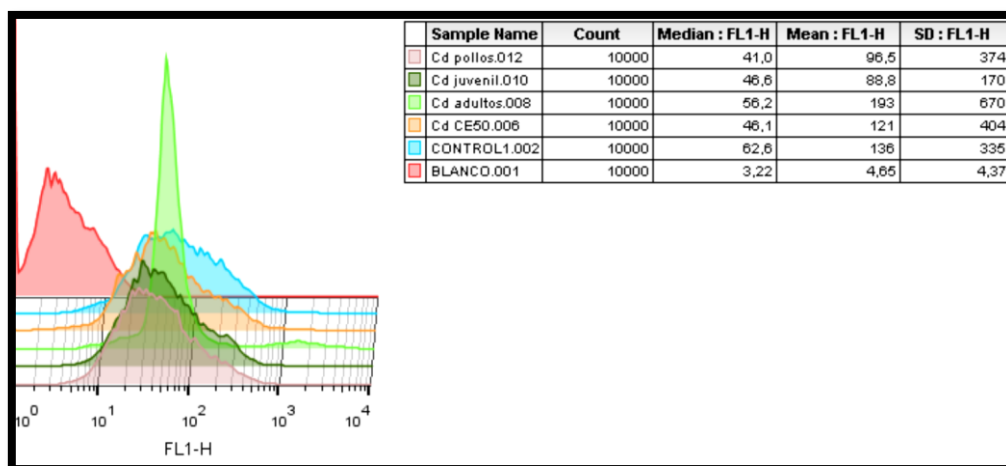
Todas las concentraciones, salvo la concentración media hallada en individuos adultos muestran valores similares a la muestra control (tabla 50 y Fig. 90). La concentración de adultos (la más elevada), produce un aumento significativo ( $p < 0.001$ ) de la fluorescencia (Fig. 91), es decir, provoca un aumento en la producción de ROS y coincide con la concentración que provoca una mayor disminución de la viabilidad celular (ensayo IP/anexina) (tabla 46 y Fig. 67). Las diferencias con la línea celular VERO con respecto a la concentración de adultos puede deberse a que en la línea VERO es más elevada (1,37 mM VERO y 0,12 mM AML12) y al origen celular. Estos resultados indican que el cadmio en AML12 produce un aumento significativo en la producción de ROS (Fig. 91).

Otros autores también han observado aumento de la producción de ROS tras la exposición a diferentes dosis de cadmio. Así, Yang *et al.* (1997), mostraron un aumento en la producción de ROS de forma dependiente con la concentración de cadmio en fibroblastos fetales de pulmón (MRC-5). Con 30 minutos de tratamiento la intensidad de la fluorescencia (DCFH-DA por citometría de flujo) en células tratadas era significativamente superior a las células control. Tras 4 horas de exposición al tóxico (35  $\mu$ M de cadmio) se observa un aumento de la absorbancia próximo al 100%. Las concentraciones y tiempos de exposición empleados por dichos autores son inferiores a las llevadas a cabo en este estudio, lo que podría indicar que los fibroblastos son células más sensibles a la producción de ROS.

Diferentes estudios, al igual que nuestro trabajo, muestran un aumento en la producción de ROS tras tiempos de exposición más largos al metal pesado. Oh y Lim (2006) para determinar el papel de ROS en la inducción de apoptosis producida por el cadmio, expusieron las células HepG2 a 16  $\mu$ M de cadmio durante 0,5, 1, 1,5, 3, 6, 12 y 24 horas por citometría de flujo utilizando DCFH-DA observando un aumento en la producción de ROS a partir de 0,5 horas, alcanzando su punto máximo a 3 horas y cayendo por debajo del control a las 24 horas. En un estudio reciente que emplea la misma línea celular (AML12) llevado a cabo por Zhang *et al.* (2015), comprobaron el efecto de puntos cuánticos de telururo de cadmio (TeCD QDs) observando también un aumento de la generación de ROS de manera dependiente con la concentración, mostrando un aumento de la fluorescencia (DCFH-DA) que se hace máximo a una concentración de 40 mg/ml tras 24 horas de exposición (13 veces superior al control).

En nuestro caso, la producción más elevada (adultos) produce un aumento de la producción de ROS tras la medición a 24 horas. Para comprobar si es la producción máxima producida, habría que utilizar diferentes tiempos de exposición en estudios posteriores.

Los resultados obtenidos mediante ciclo celular mostraban que la concentración más elevada (adultos) provocaba un aumento del porcentaje de células en fase S y G2/M. En estudios previos han relacionado la detección del ciclo en la fase G2/M con un aumento en la producción de ROS tras la exposición a diferentes concentraciones de cadmio. Yang *et al.* (2004), investigaron dicha correlación en células CHO-K1 midiendo los niveles de ROS por citometría de flujo (DCFH-DA). ROS aumentó notablemente a las 8 h tras recibir 4  $\mu$ M, y aumentó aún más con el tiempo. También añadieron a las células antioxidantes, tales como BHA (butilado hidroxianisol), manitol o catalasa, junto con 1  $\mu$ M de Cd durante 24 h. Los niveles de ROS se redujeron significativamente por los tratamientos. Sin embargo, la reducción de ROS no evitó la detección del ciclo celular en la fase G2/M demostrándose de esta forma que la presencia de ROS no está asociada con la detención del ciclo celular. Sería necesario llevar a cabo nuevos estudios donde empleáramos distintos antioxidantes, para comprobar si existe una correlación directa entre la producción de ROS y la parada del ciclo celular en la fase G2/M provocada por el cadmio en la línea celular AML12.



**Figura 91.** Solapamiento de los histogramas para las concentraciones de cadmio en la línea celular AML12.

### IV.9.2.2. Plomo

De igual forma que ocurría en la línea celular VERO, todas las concentraciones producen una ligera disminución de la fluorescencia, salvo para el caso de la  $CE_{50}$  (concentración más elevada y similar a la  $CE_{50}$  de VERO) que produce una disminución significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ ) (tabla 50 y Fig. 90). Esta disminución es más elevada en AML12 con respecto a VERO; estos resultados coinciden con los observados en el ensayo de apoptosis/necrosis, donde el plomo en AML12 produce una disminución de la viabilidad superior que en la línea de origen renal (tablas 46 y 47 y Fig. 64 y 67).

Como se ha comentado anteriormente en el caso de la línea celular VERO, existen estudios donde se observa una ligera disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno, pero no de forma significativa (Morcillo *et al.*, 2016).

### IV.9.2.3. Cromo

En el caso del cromo, ninguna concentración estudiada produce un efecto significativo sobre la producción de ROS. Sin embargo, los resultados obtenidos por el ensayo IP/anexina sí muestran un aumento del porcentaje de células en apoptosis temprana. Esto podría deberse a que la aparición de apoptosis no está involucrado el aumento o disminución de ROS.

Ciapetti *et al.* (1998) realizaron un estudio para comprobar la producción de ROS por varios metales (Cr, Co, Ni, Ti, Al, V y Mo) utilizados en dispositivos ortopédicos mediante citometría de flujo (DCFH-DA). Los resultados para el Cr, Ni y Ti no diferían con respecto al control como ocurre en nuestro estudio para las todas las concentraciones de cromo en AML12.

Todas las concentraciones ensayadas provocan una disminución del porcentaje de células en la fase G0/G1 con respecto al control y un aumento de la fase S (acusado) y de la fase G2/M salvo para la concentración media de juveniles que provoca una ligera disminución (0,8%) no considerada relevante (tabla 45 y Fig. 57). Como hemos comentado anteriormente existen referencias que también aprecian una relación entre la producción de ROS y la detección del ciclo celular en la fase S. Con respecto a la detección de en la fase G2/M, Zhang *et al.* (2001) observaron que el cromo provocaba la detección del ciclo celular en dicha fase en células A549. Estos

estudios indican que el  $H_2O_2$  es esencial para que el cromo pueda producir la detección del ciclo celular en la fase G2/M.

#### IV.9.2.4. Selenio

Todas las concentraciones estudiadas para el selenio provocan una disminución de las unidades de fluorescencia con respecto al control, de forma acusada para las concentraciones halladas en individuos adultos, juveniles y pollos observando diferencias significativas con un grado de significancia del 99,9% (tabla 50 y Fig. 90). Esta disminución de la fluorescencia coincide con una elevada mortalidad de las células observada mediante el ensayo de IP/anexina, donde todas las concentraciones producen daños elevados sobre la viabilidad, excepto para la concentración más baja ( $CE_{50}$ ) (tabla 47 y Fig. 67).

Son escasos los artículos que estudian la producción de ROS tras exposiciones a distintos compuestos de selenio. Misra y Niyogi (2009) comprobaron la producción de ROS provocada por el selenito de sodio a diferentes concentraciones (50, 100 y 200  $\mu M$ ), en cultivos primarios de hepatocitos de trucha arcoíris tras 2 horas de exposición, mostrando que la intensidad de la fluorescencia (DCFH-DA por microscopía confocal) aumentaba de forma dependiente con la concentración hasta 100  $\mu M$ . En nuestro caso, en ambas líneas celulares el selenio provocaba una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) de la fluorescencia con respecto al control. Esto puede deberse a que Misra y Niyogi (2009) estudian concentraciones inferiores (menores a la  $CE_{50}$ , mientras que en nuestro estudio todas las concentraciones halladas son superiores a la  $CE_{50}$ ) y emplean tiempos de exposición más cortos, para capturar los efectos en tiempos de exposición temprana y para evitar fugas del colorante debido al potencial daño de la membrana inducido por el selenio.

Estos resultados indican que los elementos tóxicos producen daño celular ocasionando una disminución de la fluorescencia (plomo y selenio), o el daño ocasionado no es suficiente para provocar efectos significativos (cromo) en la producción de ROS, o bien en el caso de la concentración más elevada de cadmio (adultos) se produce un aumento de la fluorescencia y por consiguiente un aumento en la producción de ROS.

### **IV.10. EXPRESIÓN GÉNICA**

#### IV.10.1. LÍNEA CELULAR VERO

La acción de los distintos metales pesados en estudio produjo una gran pérdida de viabilidad en las células VERO, de manera que de muchas de las muestras en estudio no se pudo obtener un ARN mensajero en calidad y cantidad suficiente como para obtener datos de expresión génica fiables. El experimento se realizó por triplicado con el fin de evitar errores de manejo, sin embargo los resultados obtenidos fueron similares. De cara a afrontar un ensayo de expresión génica con garantías, es necesario obtener un ARN mensajero de calidad y en cantidad, puesto que sino los resultados pueden verse muy desvirtuados como consecuencia de amplificaciones inespecíficas, restos de ADN o resultados difícilmente interpretables como consecuencia de diferentes eficiencias en las reacciones de amplificación.

De esta forma, sólo se tuvieron en cuenta aquellas muestras de ARN que mostraron una relación 260/280 próxima a 2 y 260/230 en torno a 1.

La obtención de un ARN de mala calidad y en poca cantidad a partir de un total de 104 células/cm<sup>2</sup>, se debe a la pérdida de viabilidad celular previamente comentada frente a las diferentes concentraciones de metales pesados durante el tiempo de estudio. Considerando estas características, en el estudio de expresión génica de células VERO se excluyeron las siguientes condiciones: cadmio adultos, CE<sub>50</sub>, juveniles, selenio y cromo (todas las concentraciones).

##### IV.10.1.1. Cadmio

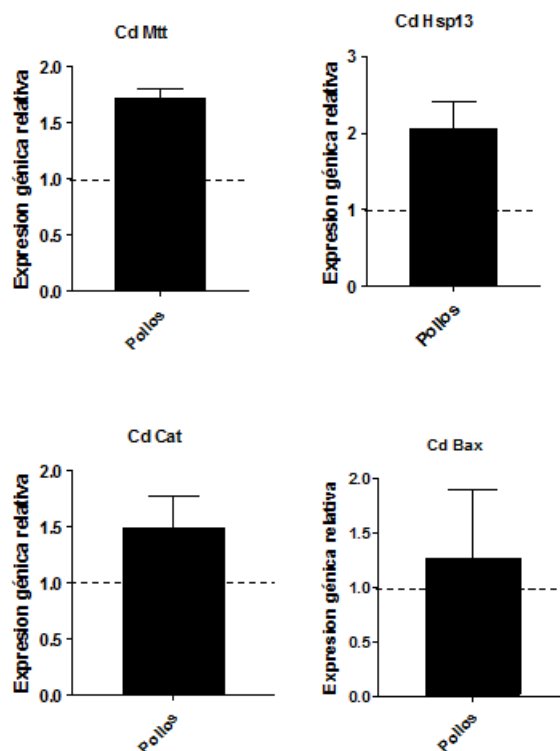
El gen Mtt es el encargado de transcribir la metalotioneína-1. Las metalotioneínas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular, con un alto contenido en Cisteína y que actúan en mecanismos de defensa celular en situaciones de estrés. Las cisteínas son capaces de unirse a un gran número de metales pesados, además las metalotioneínas regulan el estado redox al liberar grupos tiol que neutralizan agentes libres en situaciones de ROS elevadas (Thornalley y Vasak, 1985; Lazo *et al.*, 1995). La concentración media de cadmio hallada en riñón de la población de pollos, produjo una ligera sobreexpresión de este gen con respecto a la situación fisiológica en las células VERO. Esta sobreexpresión indica que las células sufren estrés como

consecuencia del cadmio, incrementar la expresión de este tipo de proteínas es un mecanismo celular para mantener los niveles de ROS estables a nivel celular (Fig. 92).

Esta sobreexpresión coincide con los resultados obtenidos en células de riñón de dorada (*Sparus aurata*), si bien en este estudio utilizan un rango de concentraciones superiores a las usadas en nuestro estudio y los tiempos de exposición son inferiores (Morcillo *et al.*, 2015).

De la misma forma, también observamos una sobreexpresión en el gen Hspa13 (Fig. 92). Dicho gen es parte de un grupo de proteínas de distinto peso molecular, Heat Shock Protein (HSP) encargadas de neutralizar situaciones de estrés celular. Se trata de chaperonas capaces de transportar proteínas a través de membranas, involucradas en los procesos de transcripción (Tiwari *et al.*, 2015) y bajo circunstancias de estrés celular pueden agregar o desagregar proteínas, viéndose su expresión incrementada (Shevtsov *et al.*, 2016). Además, la interacción entre un péptido y una HSP actúa en células presentadoras de antígeno del sistema inmune innato y facilita la maduración de células dendríticas, incrementa la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad I y II, induce la secreción de citoquinas y modula el óxido nítrico (Shevtsov y Multhoff, 2016). Este incremento en la transcripción de este tipo de proteínas es indicador de estrés celular, apuntando a que concentraciones menores de cadmio, aunque no resulten letales, si son perjudiciales a nivel renal pudiendo ocasionar daños crónicos en exposiciones prolongadas. Exposiciones de cadmio en peces también han demostrado generar una sobreexpresión de este gen, coincidiendo en señalar a este tipo de proteínas como indicador de estrés celular frente a la exposición de metales pesados (Morcillo *et al.*, 2016).

El resto de genes en estudio, Catalasa y Bax, no mostraron ninguna diferencia estadísticamente significativa con la concentración media de pollos en riñón con respecto a la expresión que mostraron en las células sin tratamiento (Fig. 92).

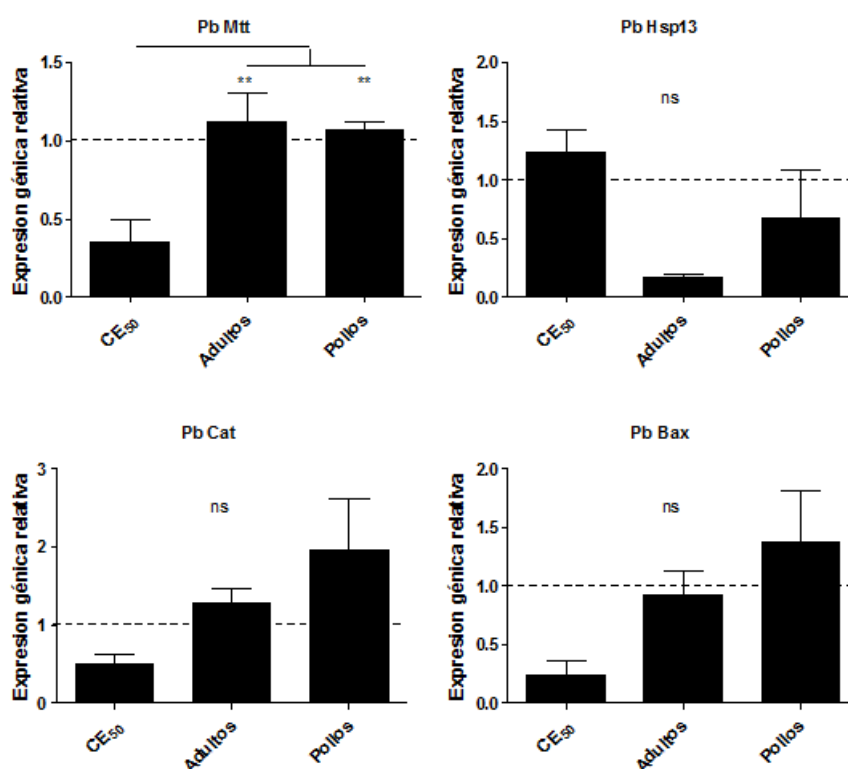


**Figura 92.** Expresión génica de células VERO expuestas a las concentraciones de Cd para los genes Mtt, Hsp13, Cat y Bax

#### IV.10.1.2. Plomo

Sobre las células de riñón VERO, las concentraciones de plomo halladas en adultos y pollos no modificaron la expresión de Mtt, Bax y Cat (Fig. 93). Sí se observó un descenso en la expresión de Mtt, Bax y Cat para la concentración  $CE_{50}$ , sin embargo ésta es muy superior a las estudiadas. Sin embargo, tanto para la concentración de pollos, como de adultos sí se apreció una caída en la regulación del gen Hsp13 con respecto a su expresión en condiciones sin tratamiento. Si bien no se comporta de la misma forma que las células sin tratamiento, el que las distintas concentraciones de plomo no sobreexpresen Hsp13, parece indicar que son concentraciones que no generan estrés en la célula.





**Figura 93.** Expresión génica de células VERO expuestas a las concentraciones de Pb para los genes Mtt, Hsp13, Cat y Bax.

#### IV.10.2. LÍNEA CELULAR AML12

Sobre las células de hígado AML12, se estudiaron los efectos de los 4 metales pesados a las distintas concentraciones en estudio. Sobre las muestras de selenio a las concentraciones de adultos y juveniles (las dos más altas), el ARN que se obtuvo no fue de suficiente calidad (ratio 280/260 y 260/230) como para realizar el estudio de expresión génica con ciertas garantías, por lo que no fueron consideradas en el mismo.

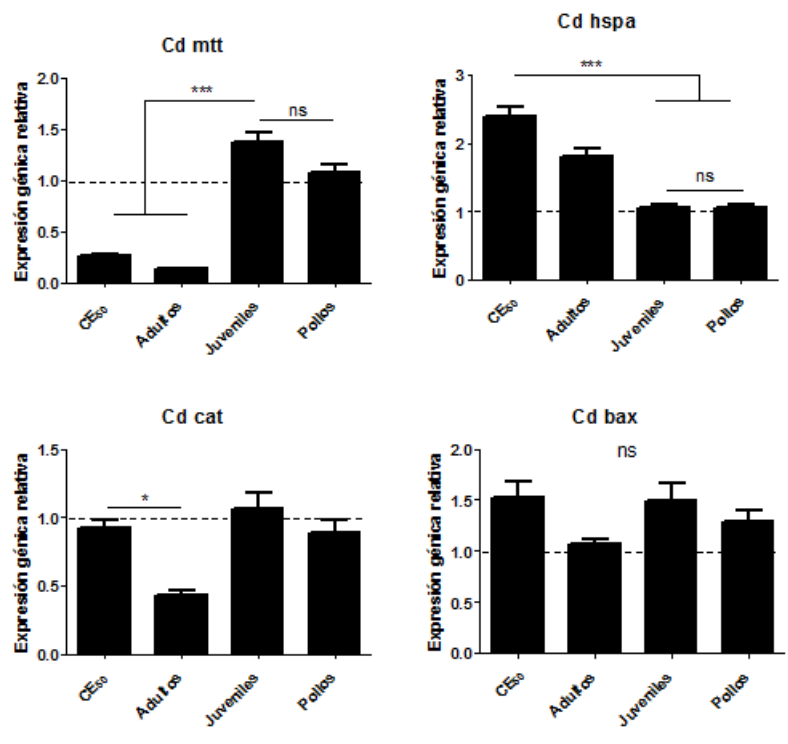
##### IV.10.2.1. Cadmio

La expresión génica de metalotioneína en células AML12, no sufrió variación con respecto a su expresión en ausencia de metal pesado para las concentraciones de pollos y juveniles, sin embargo, las concentraciones más altas en estudio (adultos y CE<sub>50</sub>) sí mostraron una disminución en la expresión de la misma (Fig. 94). Esta disminución de la producción de metalotioneína, coincide con la pérdida de viabilidad

que se observa en estas condiciones, sugiriendo que el efecto tóxico de estas concentraciones de cadmio impide una normal regulación de las mismas. En estudios sobre fibroblastos de Dorada (*Sparus aurata*), la  $CE_{50}$  produjo una sobreexpresión de metalotioneína (Morcillo *et al.*, 2015, 2016), efecto contrario al que observamos en este estudio. Esta diferencia puede deberse a la diferencia entre los tipos celulares en ambos estudios.

Con respecto a la producción de HSP, las concentraciones más altas de cadmio produjeron un incremento en la expresión de ésta, mientras que las concentraciones de pollos y juveniles no afectan a la misma (Fig. 94). Las metalotioneínas son la primera defensa celular frente a los mecanismos de toxicidad de los metales pesados, sin embargo, cuando este efecto tóxico empieza a producir desnaturalización proteica, en un estadio más avanzado, las HSP actúan para reparar el daño ocasionado (Morcillo *et al.*, 2016). La caída en la expresión de metalotioneína y la sobreexpresión de hspa sugiere que el cadmio a la concentración media de la población de adultos, empieza a generar desnaturalización proteica tras 24 horas *in vitro*, evidenciando el daño celular sobre hepatocitos. Sobre los otros dos genes en estudio, la catalasa sufrió un descenso en su expresión a la concentración más alta en estudio (adultos) que se correlaciona con una mayor pérdida de viabilidad y un incremento en la detección de ROS. Esto puede significar la incapacidad de la célula para mantener su homeostasis, evidenciando una circunstancia en la cual ya no se expresa más catalasa y por tanto aumentan los niveles de ROS. En estudios previos se ha descrito una ligera infra expresión de catalasa, resultado achacado al excesivo estrés oxidativo (Saidi *et al.*, 2013). Para el gen bax, no se observó diferencia significativa entre la situación sin tratamiento y las diferentes concentraciones de cadmio.

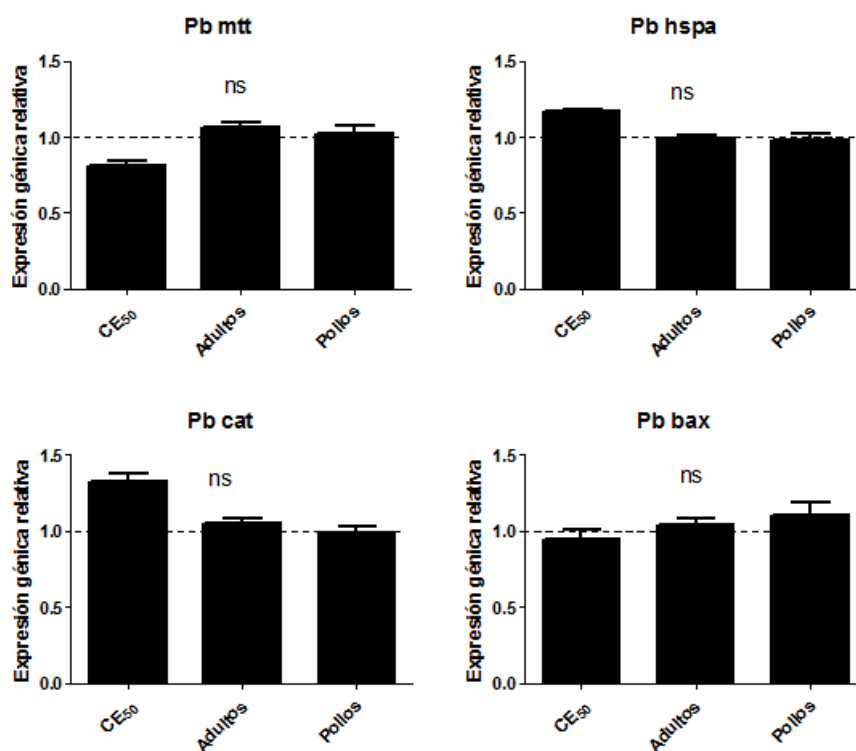
Estos resultados, muestran que las células hepáticas sometidas a la concentración media hallada en hígado de individuos adultos, genera estrés celular.



**Figura 94.** Expresión génica de células AML-12 expuestas a las concentraciones de Cd para los genes mtt, hspa, cat y bax.

#### IV.10.2.2. Plomo

Con respecto al plomo, ninguna de las concentraciones en estudio modificó la expresión de los 4 genes en estudio tras 24 horas de exposición (Fig. 95).



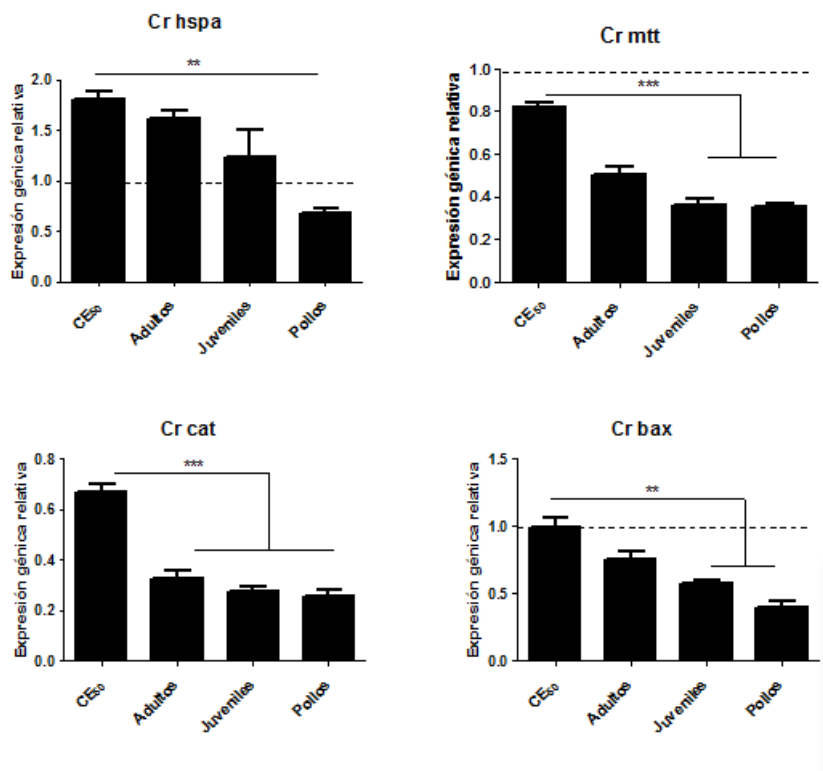
**Figura 95.** Expresión génica de células AML-12 expuestas a las concentraciones de Pb para los genes mtt, hspa, cat y bax.

#### IV.10.2.3. Cromo

La exposición de las células AML-12 frente a las distintas concentraciones de cromo en estudio, no produjo ninguna variación en la expresión de HSP salvo en la concentración media encontrada para la población de pollos, la más alta en estudio, donde se observó un descenso en su expresión. Con respecto a la metalotioneína, catalasa y bax se evidenció una disminución en la regulación de estas proteínas en las tres concentraciones en estudio, mientras que la CE<sub>50</sub> mantuvo los niveles de expresión normales (Fig. 96).

Las concentraciones de cromo halladas en las distintas poblaciones de pingüino en hígado, fueron muy bajas y relativamente similares entre las tres poblaciones (adultos, juveniles y pollos). Del mismo modo, la viabilidad celular no se vio muy afectada por el efecto del cromo, con porcentajes de necrosis en general bajos.

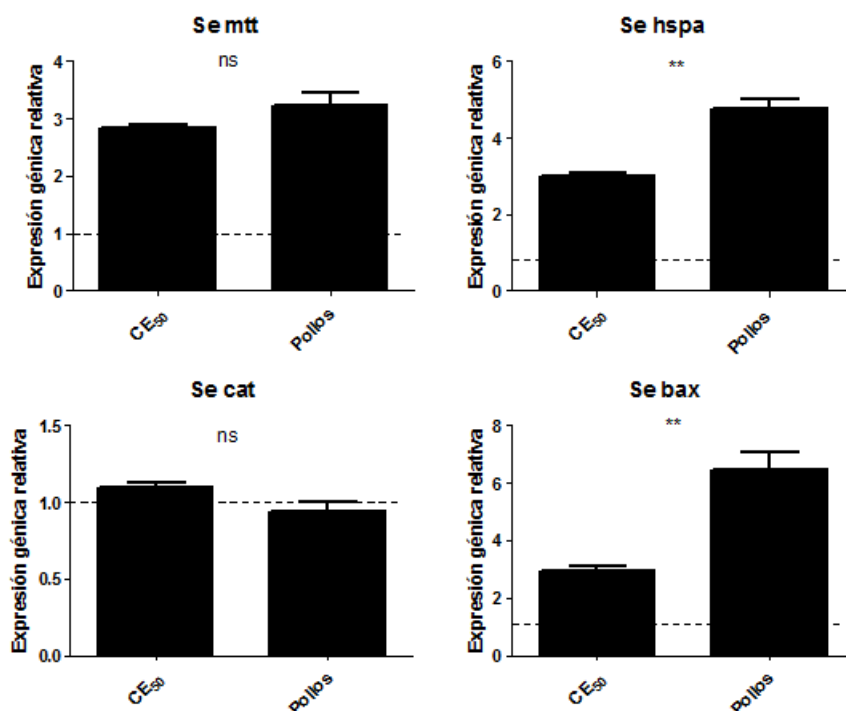
En estudios previos realizados sobre hígado de *Sebastes schlegeli* sometido a dietas altas en cromo, mostraron una sobreexpresión de las metalotioneínas como efecto de protección frente a metales (Kim y Kang, 2016). Este efecto no lo observamos en nuestro estudio, si bien las concentraciones y tiempos de exposición no pueden ser comparadas al tratarse de tratamientos en la dieta. Por otro lado, se ha demostrado sobre células granulosas que el cromo produce una disminución en la expresión de proteínas HSP siendo capaz de producir apoptosis y fragmentación de ADN por varias rutas (Banu *et al.*, 2011). Considerando el escaso efecto necrótico sobre las células y que tampoco hemos observado un incremento en la producción de ROS, parece lógico que no haya una sobreexpresión de los genes en estudio.



**Figura 96.** Expresión génica de células AML-12 expuestas a las concentraciones de Cr para los genes mtt, hspa, cat y bax.

IV.10.2.4. Selenio

Las concentraciones medias de selenio encontradas en hígado de pingüinos antárticos, fueron idénticas en la población de adultos y juveniles, y a su vez sensiblemente superiores a las encontradas en pollos y a la CE<sub>50</sub> para este metal. Estas concentraciones generaron una alta tasa de mortalidad (99,7%) y como consecuencia de la misma una pérdida de la estructura de ARN mensajero, imposibilitando el estudio de expresión génica para estas concentraciones. Así, en las concentraciones medias halladas en la población de pollos y CE<sub>50</sub>, observamos una fuerte sobreexpresión de los genes *mtt*, *hspa* y *bax* (Fig. 97). Un incremento de la producción de metalotioneína y de HSP se relaciona con estrés celular y con desnaturalización proteica, evidenciando que aunque son concentraciones inferiores a las encontradas en las poblaciones de adultos y juveniles, éstas ejercen un daño celular en células hepáticas *in vitro*. Por otro lado, el gen proapoptótico *bax* también mostró una sobreexpresión, resultado que coincide con los datos previamente expuestos sobre apoptosis siendo además ésta dependiente de la concentración de metal.



**Figura 97.** Expresión génica de células AML-12 expuestas a las concentraciones de Se para los genes *mtt*, *hspa*, *cat* y *bax*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 51. Tabla resumen de resultados

	ELEMENTOS TÓXICOS	CONCENTRACIONES (mM)	CITOTOXICIDAD (% viabilidad)	C. CELULAR	APOPTOSIS/NECROSIS (Porcentaje)	ALTERACIONES MORFOLÓGICAS	ESTRÉS OXIDATIVO	EXPRESIÓN GÉNICA
LÍNEA CELULAR VERO (células epiteliales de riñón)	CADMIO	CE <sub>50</sub> (0,0457)	50	↓G0/G1 ↑S	13,5/3,6	Elevado grado de degeneración: vacuolización, mitocondrias desnaturalizadas,...	**	↑Mtt y Hspa 13 (pollos)
		Adultos (1,37)	*	**	49,1/49,6		↓ROS	
		Juveniles (0,012)	99,54	↓G0/G1 ↑S	53/0		**	
		Pollos (0,0027)	*	↓G0/G1 ↑S	0,4/0,1		**	
	PLOMO	CE <sub>50</sub> (1,9043)	50	↓G0/G1 ↑S ↓G2/M	13,6/1,9	Cuerpos de inclusión, picnosis, vacuolización, mitocondrias condensadas,...	↓ROS	↓Mtt, Bax y Cat (CE <sub>50</sub> ) y ↓Hspa (adultos y pollos)
		Adultos (7,24 · 10 <sup>-4</sup> )	*	↓G0/G1 ↑G2/M	2,2/0,5		**	
		Máxima (1,58 · 10 <sup>-3</sup> )	*	↓G0/G1 ↑G2/M	3,5/0,7		-	
		Pollos (4,5 · 10 <sup>-4</sup> )	*	↓G0/G1 ↑S	0,2/0,4		**	
	CROMO	CE <sub>50</sub> (0,0067)	50	↓G0/G1 ↑S	8,2/0,9	Gránulos de cromo, mitocondrias dilatadas, telolisosomas,...	↓ROS	-
		Adultos (0,005)	67,91	↓G0/G1 ↑S	5,1/0,4		↓ROS	
		Juveniles (0,1)	0,439	↓G0/G1 ↑S	35,5/0,2		↓ROS	
		Pollos (0,0075)	44,92	↓G0/G1 ↑S	0,3/0,4		↓ROS	
SELENIO	CE <sub>50</sub> (0,0054)	50	↓G0/G1 ↑S ↑G2/M	33,6/26,6	Elevado grado de degeneración: hipercromatosis, sin orgánulos,...	↓ROS	-	
	Adultos (0,45)	3,88	↓G0/G1 ↑S	64/35,6		↓ROS		
	Juveniles (0,145)	3,88	↓G0/G1 ↑S ↓G2/M	1,6/96,5		↓ROS		
	Pollos (0,098)	3,88	↓G0/G1 ↑S	1,4/96,6		↓ROS		
LÍNEA CELULAR AML12 (células hepáticas)	CADMIO	CE <sub>50</sub> (0,00613)	50	↑G0/G1 ↓S	18,6/20,8	Elevado grado de degeneración: vacuolización, fagolisosomas, tumefacción,...	**	↓mtt y ↑hspa (CE <sub>50</sub> y adultos) y ↓cat (adultos)
		Adultos (0,12)	2,12	↓G0/G1 ↑S ↑G2/M	57,1/39,4		↑ROS	
		Juveniles (0,00315)	*	↑G0/G1 ↓S ↓G2/M	7,7/2,4		**	
		Pollos (7,4 · 10 <sup>-4</sup> )	*	↑G0/G1 ↓S	1,8/0,4		**	
	PLOMO	CE <sub>50</sub> (1,9058)	50	↑G0/G1 ↓S	44,4/27,2	Cuerpos de inclusión, picnosis, vacuolización, mitocondrias tumefactas,...	↓ROS	**
		Adultos (4,34 · 10 <sup>-4</sup> )	*	↓G0/G1 ↑G2/M	1,8/0,7		**	
		Máxima (9,99 · 10 <sup>-4</sup> )	*	↓G0/G1 ↑G2/M	7,7/22,3		**	
		Pollos (5,76 · 10 <sup>-4</sup> )	*	↑G0/G1 ↓S	17,8/16,6		**	
	CROMO	CE <sub>50</sub> (0,0036)	50	↓G0/G1 ↑G2/M	13,1/24,8	Gránulos de cromo, mitocondrias dilatadas, restos de productos metabólicos,...	**	↓hspa (pollos) y ↓mtt, cat y bax (adultos, juveniles y pollos)
		Adultos (0,006)	29,87	↓G0/G1 ↑S	21/10,9		**	
		Juveniles (0,0082)	22,18	↓G0/G1 ↑S	40,9/0,3		**	
		Pollos (0,0095)	19,04	↓G0/G1	59,4/0,5		**	
SELENIO	CE <sub>50</sub> (0,0272)	50	**	14,6/0,2	Elevado grado de degeneración: hipercromatosis, forma alargada,...	**	↑ mtt, hspa y bax (CE <sub>50</sub> y pollos)	
	Adultos (0,13)	0,78	↓G0/G1 ↑S	89,7/10,1		↓ROS		
	Juveniles (0,13)	0,78	↓G0/G1 ↑S	89,7/10,1		↓ROS		
	Pollos (0,0931)	2,15	↓G0/G1 ↑S	71,1/29,4		↓ROS		

\* Concentraciones fuera del rango de la curva dosis-respuesta \*\*Sin diferencias significativas -Obtención de ARN de mala calidad







**CONCLUSIONES**

### V. CONCLUSIONES

**1ª.** Ambas líneas celulares resultaron idóneas para evaluar los daños toxicológicos producidos por el cadmio, el plomo, el cromo y el selenio. Dichas líneas celulares presentan una fase exponencial de crecimiento acentuada, lo que les confiere su utilidad como monitoras para el estudio de la acción de los metales pesados *in vitro*, pudiéndose determinar la muerte celular a tiempos de exposición cortos.

**2ª.** Las  $CE_{50}$  obtenidas mediante la técnica colorimétrica del MTT, son en líneas generales inferiores a las concentraciones halladas en individuos adultos, juveniles y pollos, salvo para el caso del plomo, donde son muy inferiores. Esto indica que dichas concentraciones, podrían resultar tóxicas y producir distintos efectos nocivos a nivel renal y hepático en pingüinos.

**3ª.** Las  $CE_{50}$  obtenidas a partir de la curva dosis-respuesta muestran el siguiente orden decreciente en VERO Pb>Cd>Cr>Se y en AML12 Pb>Cd>Se>Cr.

**4ª.** Todas las concentraciones de selenio, la concentración media de cadmio hallada en adultos y la concentración media de cromo hallada en juveniles en la línea celular VERO, reducen drásticamente la viabilidad celular.

**5ª.** Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, muestran que las concentraciones estudiadas producen cambios significativos sobre el porcentaje de células en distintas fases del ciclo celular con respecto a la muestra control. Las concentraciones más elevadas provocan un aumento del porcentaje en la fase S, lo que indica que se está produciendo la parada del ciclo celular en dicha fase impidiendo la división celular.

**6ª.** Los datos obtenidos mediante el ensayo de anexina V, muestran un aumento en el porcentaje de células en estado de apoptosis y/o necrosis para las concentraciones estudiadas, siendo drástico para el caso del selenio (concentraciones medias halladas en adultos, juveniles y pollos) y cadmio (concentración media hallada en adultos). Por lo general, la muerte celular por apoptosis predomina sobre la necrosis.

**7ª.** Las pruebas de microscopía muestran diferentes signos de degeneración a nivel celular que pueden afectar sobre la función celular y su viabilidad, siendo mayor el

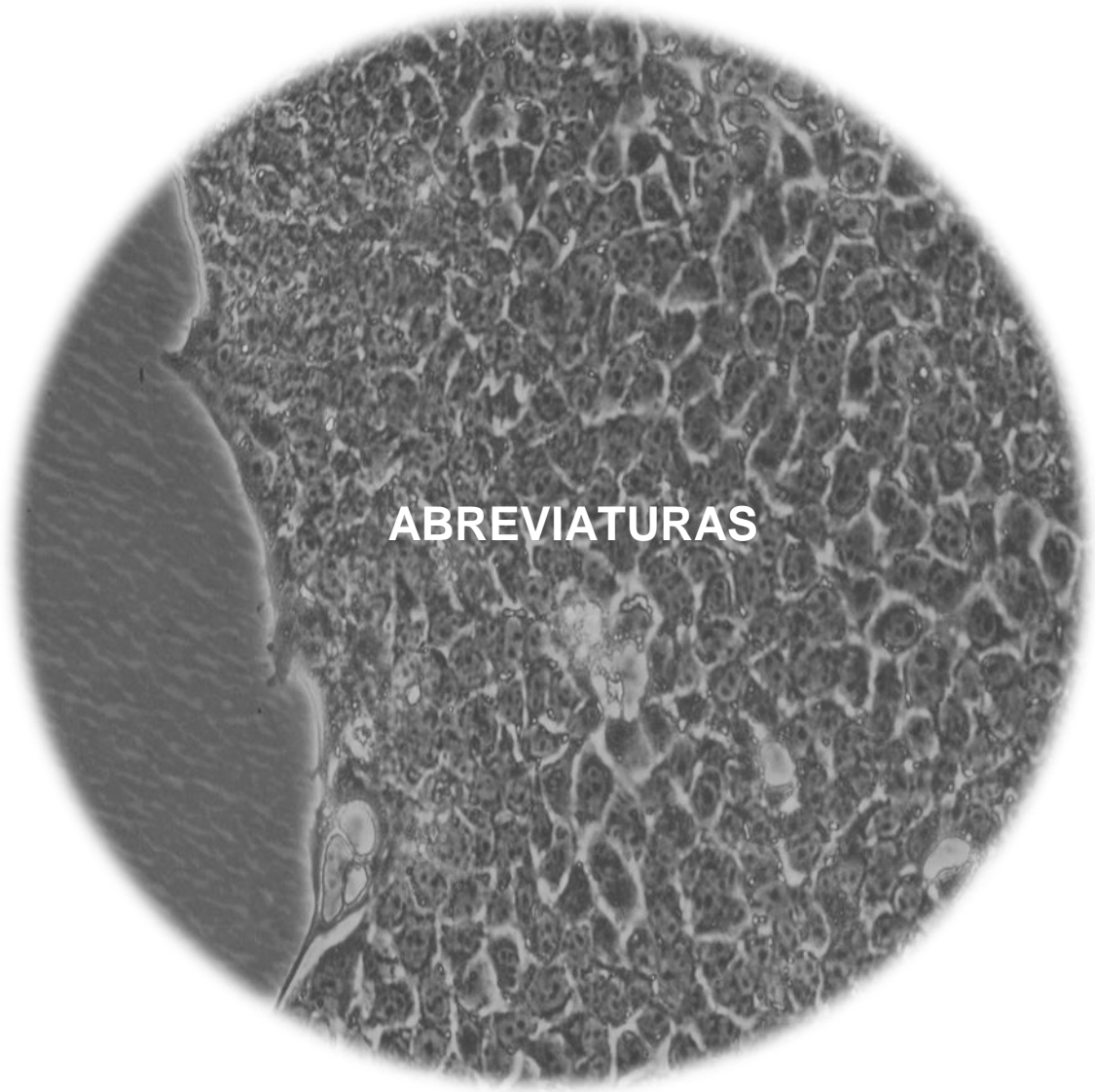
grado de deterioro en células tratadas con cadmio y selenio, lo que podría implicar que exista un daño renal o hepático en las especies referidas.

**8<sup>a</sup>.** La mayoría de las concentraciones utilizadas producen efectos tóxicos a nivel celular, provocando la destrucción del material genético y por tanto, una disminución de la producción de ROS tras 24 horas de exposición al tóxico.

**9<sup>a</sup>.** El cadmio y el selenio provocaron una sobreexpresión de genes relacionados con la protección celular (metalotioneínas y *heat shock proteins*) en las condiciones en que la viabilidad celular permitió este estudio. Estos datos ponen de manifiesto que las concentraciones de estos metales hallados en pingüinos de la Antártida, producen estrés celular en células hepáticas y renales.

**10<sup>a</sup>.** Los resultados obtenidos evidencian el posible riesgo toxicológico que la contaminación en la Antártida puede provocar a nivel celular sobre las poblaciones de *Pygoscelis antarctica*, *Pygoscelis papua* y *Pygoscelis adeliae* a nivel renal y hepático.





**ABREVIATURAS**

**VI ABREVIATURAS**

7-ADD: 7-aminoactinomicina D.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AETOX: Asociación española de toxicología.

APAF-1: Apoptotic protease activating factor-1. Proteasa apoptótica activadora del factor-1.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATCC: American type of cell collection. Colección Americana de células tipo.

ATP: Adenosín trifosfato.

BHA: Butilado hidroxianisol.

BP: Benzopireno.

BUB: Budding uninhibited by benzimidazole.

CAD: DNasa activada por caspasas.

CAT: Catalasa.

CDKs: Cycline dependent kinases. Kinasas dependientes de ciclina.

cDNA: ADN complementario.

CE<sub>50</sub>: Concentración efectiva 50.

CI<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria 50

CI<sub>10</sub>: Concentración inhibitoria 10

CKIs: CKI inhibitors. Inhibidores de CKs.

CL<sub>50</sub>: Concentración letal 50

CMF: Citometría de flujo.

CMRB: Centro de Medicina regenerativa de Barcelona.

Con A: Concanavalina A.

Ct: Cycle threshold. Ciclo umbral.

CV: Coeficiente de variación.

DAPI: Diamidino fenil indol.

DCFH: Diclorofluoresceína.

DCFH-DA: 2,7-Dichlorodihidrofluoresceín diacetato.

DL<sub>50</sub>: Dosis letal 50.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DR: Death receptor. Receptor ligado a muerte.

DRh123: Dihidrorodamina 123.

ECVAM: European centre for the validation of alternative methods. Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos.

EDTA: Ácido dietilentriaminotetracético.

Endo G: Endonucleasa G.

FADD: eFas-Associated Death Domain. Dominio de muerte asociado a FAS.

FASL: Fatty acid synthetase Ligand. Ligando asociado a sintetasa de ácidos grasos.

Fig.: Figura

FBS-FCS: Foetal bovine/calf serum. Suero fetal bovino.

FRAME: Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments. Fundación para el reemplazo de animales en experimentación médica.

FS: Forward scatter.

GCCP: Guidance on Good Cell Culture Practice. Guía de buenas practices en cultivos celulares.

GLP: Good laboratory practice. Buenas prácticas de laboratorio.

GPx: Glutación peroxidasa.

GR: Glutation reductasa.

GSH: Grupo sulfhidrilo.

GSH: Tripéptido glutación.

GSSG: Radicales de glutación disulfuro.

GST: Glutación transferasa.

HE\*: Dihidro etídio.

HE: Hematoxilina eosina.

Hsp: Heat shock proteins. Proteínas de choque térmico.

IAP: Inhibidores de proteasas apoptóticas.

ID: Índice de ADN.

IP: Ioduro de propidio.

## ABREVIATURAS

---

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LIB: Lean inclusión body. Cuerpos de inclusión de plomo.

LPO: Lipoperoxidación.

MAD: Mitotic arrest deficient. Factor deficient en el arresto mitótico.

MCP: Muerte celular programada.

MET: Microscopio electrónico de transmisión.

MPS1: Monopolar spindle.

MPT: Mithochondrial permeability transition. Transición de permeabilidad mitocondrial

mRNA: ARN mensajero.

Mta: Metalotioneinas.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

PARP: Poli ADP-Ribosa.

PBS: Tampón salino fosfato.

PCR: Polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa.

PSAP: a-fenilselenil acetofenona.

QSAR: Quantitative structure-activity relation. Relación Cuantitativa Estructura-Actividad.

RE: Retículo endoplasmático.

REMA: Red Española de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal.

RER: Retículo endoplasmático rugoso.

RH 123: Rodamina 123.

RN: Rojo neutro.

ROS: Reactive oxygen species. Especies reactivas de oxígeno.

RT: Retrotranscripción.

SACE: Servicio de apoyo a las ciencias experimentales.

SAI: Servicio de apoyo a la investigación.

SCARR: Scientific Comitee for Antartic Research. Comité científico para la investigación en la Antártida.

SNC: Sistema nervioso central.



SOD: Superóxido dismutasa.

SSC: Side scatter.

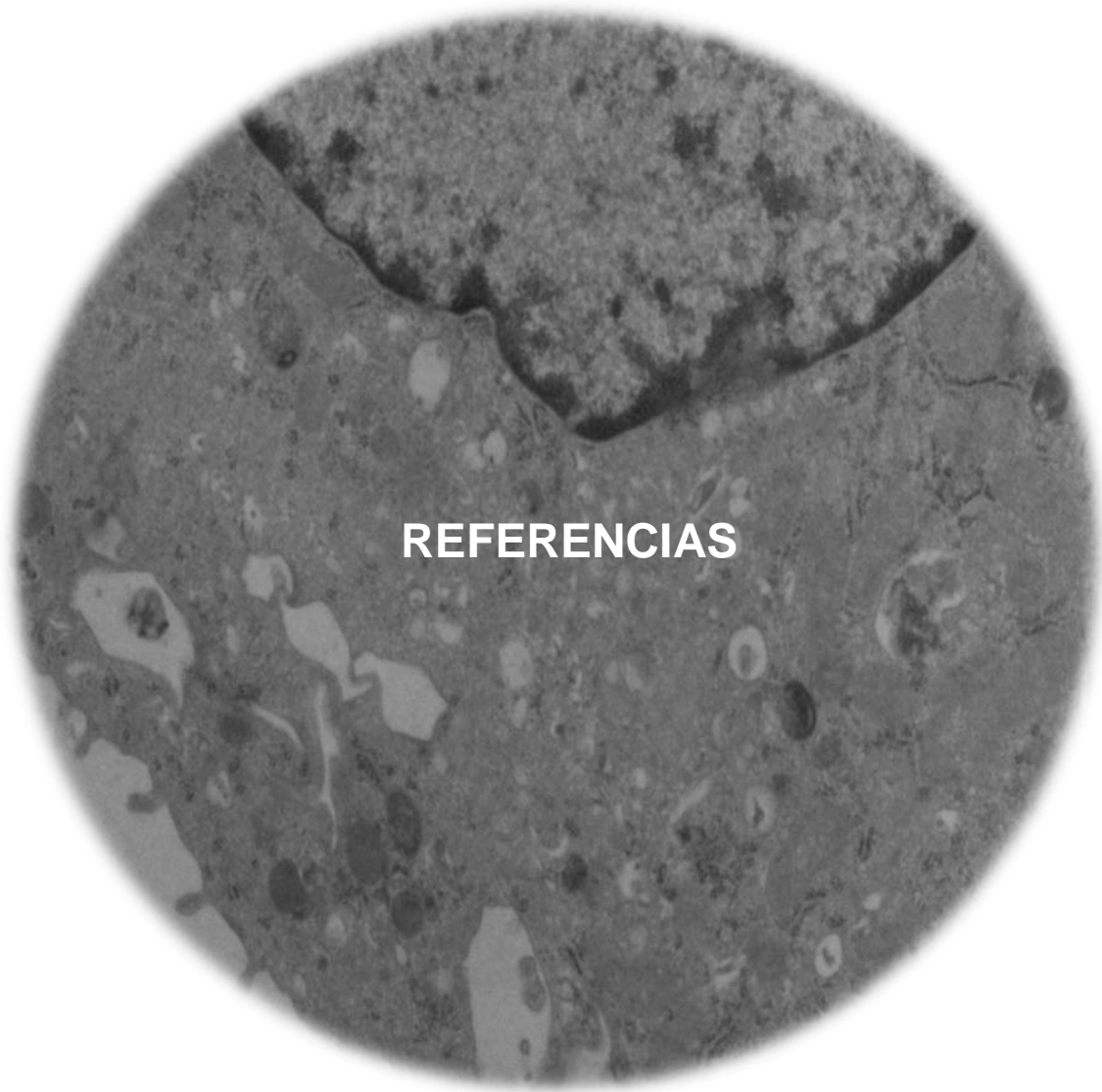
TNF: Tumoral necrosis factor. Factor de necrosis tumoral.

TRADD: TNF Receptor-Associated Death Domain. Dominio de muerte asociado al receptor de TNF.

TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand. Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF.

UAA: United action for the animals. Acción unida por los animales.





**REFERENCIAS**

### VII. REFERENCIAS

Abid-Essefi, S., Ouanes, Z., Hasen, W., Baudrimont, I., Creppy, E.E. y Bacha, H. (2004). Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicology In Vitro*, 18, 467–474.

Acevedo Fernández, J.J., Angeles Chimal, J.S., Rivera, H.M., Petricevich López, V.L., Nolasco Quintana, N.Y., Collí Magaña, D.Y. y Santa-Olalla Tapia, J. (2013). Modelos *in vitro* para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero y D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 29- 82). Barcelona: OmniaScience.

Ahamed, M. y Siddiqui, M.K.J. (2007). Environmental lead toxicity and nutritional factors. *Clinical Nutrition* 26, 400-408.

Alam, I.A. y Sadiq, M. (1993). Metal concentrations in Antarctic sediments samples collected during the Trans-Antarctica 1990 expedition. *Marine Pollution Bulletin* 26, 523-527.

Albrecht, R., Péliissier, M.A. y Boisset, M. (1994). Excessive dietary selenium decreases the vitamin A storage and the enzymatic antioxidant defence in the liver of rats. *Toxicology Letters* 70, 291–297.

Alcolea, V., Plano, D., Karelia, D.N., Palop, J.A., Amin, S., Sanmartín, C. y Sharma, A.K.. (2016). Novel seleno and thio urea derivatives with potent *in vitro* activities against several cancer cell lines. *Eur J Med Chem.*, 113, 134-44.

Alfaro, E., García, C. y Dueñas, A. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, 46(4), 275-280.

Anoopkumar-Dukie, S., Carey, J.B., Conere, T., O'Sullivan, E., Van Pelt, F.N. y Allshire, A. (2005). Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *Br J Radiol.*, 78 (934), 945-947.

Ancora, S., Volpi, V., Olmastroni, S., Focardi, S. y Leonzio, C. (2002). Assumption and elimination of trace elements in Adélie penguins from Antarctica: a preliminary study. *Marine Environmental Research* 54, 341-344.

Andrade, S., Poblet, A., Scagliola, M., Vodopivec, C., Curtosi, A., Pucci, A. y Marcovecchio, J. (2001). Distribution of heavy metals in surface sediments from an Antarctic marine ecosystem. *Environmental Monitoring and Assessment* 66, 147-158.

- Angermüller, S., Künstle, G. y Tiegs, G. (1998). Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNF $\alpha$ -treated galactosamine-sensitized mice. *J Histochem Cytochem.*, 46(10), 1175-83.
- Arellano, M. y Moreno, S. (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29, 559-573.
- Arencibia, D.F., Rosario, L.A. y Curveco, D.L. (2009). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Retel*, 19, 40-52.
- Arteel, G.E. y Sies, H. (2001). The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 10, 153–158.
- Arur S., Uche UE., Rezaul K., Fong M., Scranton V., Cowan AE., Mohler W. y Han DK. (2003). Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Developmental Cell*, 4(4), 587-98.
- ATSDR. (2005). Toxicological Profile for Lead (update). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia, 1–577.
- ATSDR, 2008a. Toxicological Profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.
- ATSDR, 2008b. Toxicological profile for chromium . Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA.
- ATSDR, 2012. Toxicological profile for chromium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA.
- Austin B, Mothersill C (2003). *In vitro methods in aquatic toxicology*. Berlin: Springer.
- Babich, H., Shopsis, C. y Borenfreund, E. (1986). *In vitro* cytotoxicity testing of aquatic pollutants (cadmium, copper, zinc, nickel) using established fish cell lines. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 11(1), 91-9.
- Bagchi, D., Vuchetich, P.J., Bagchi, M., Hassoun, E.A., Tran, M.X., Tang, L. y Stohs, S.J. (1997). Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate and cadmium chloride to rats. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 471–478.

## REFERENCIAS

---

- Bagchi, D., Joshi, S.S., Bagchi, M., Balmoori, J., Benner, E.J., Kuszynski, C.A. y Stohs, S.J. (2000). Cadmium- and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Biochem Mol Toxicol.*, 14(1), 33-41.
- Bagchi, D., Bagchi, M. y Stohs, S.J. (2001). Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biochem.*, 222(1-2), 149-58.
- Bagchi, D., Stohs, S.J., Downs, B.W. y Bagchi, M., Preuss, H.G. (2002). Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of Chromium. *Toxicolog*, 180, 5 -22.
- Baker, D.J., Dawlaty, M.M., Galardy, P. y van Deursen, J.M. (2007). Mitotic regulation of the anaphasepromoting complex. *Cell Mol. Life Sci.*, 64, 589-600.
- Banu, S.K., Stanley, J.A., Lee, J., Stephen, S.D., Arosh, J.A., Hoyer, P.B. y Burghardt, R.C. (2011). Hexavalent chromium-induced apoptosis of granulosa cells involves selective sub-cellular translocation of Bcl-2 members, ERK1/2 and p53. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 251(3), 253-66.
- Barbacanne, M.A., Souchard, J.P., Darblade, B., Iliou, J.P., Nepveu, F., Pipy, B., Bayard, F. y Arnal, J.F. (2000). Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. *Free Radic Biol Med.*, 29, 388– 96.
- Barbosa, A., Moreno, J., Potti, J. y Merino, S. (1997). Breeding group size, nest position and breeding success in the chinstrap penguin. *Polar Biol.*, 18, 410-414.
- Barbosa, A., De Mas, E., Benzal, J., Diaz, J.I., Motas, M., Jerez, S., Pertierra, L., Benayas, J., Justel, A., Lauzurica, P., García-Peña F.J. y Serrano, T. (2013). Pollution and physiological variability in gentoo penguins at two rookeries with different levels of human visitation. *Antarctic Science*, 25(2), 329-338.
- Bargagli, R. (2005a). *Antarctic Ecosystems: Environmental Contamination, Climate Change and Human Impact*. Berlín: Springer-Verlag.
- Bargagli, R., Nelli, L., Ancora, S. y Focardi, S. (1996). Elevated cadmium accumulation in marine organisms from Terra Nova Bay (Antarctica). *Polar Biology* 16, 513-520.

- Bargagli, R. (2008). Environmental contamination in Antarctic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 400, 212-226.
- Barile FA (2008) *Principles of toxicology testing*. New York: Informa Healthcare USA.
- Baroni ,T., Lilli, C., Bellucci, C., Luca, G., Mancuso, F., Fallarino, F., Falabella, G., Arato, I., Calvitti, M., Marinucci, L., Muzi, G., Dell'Omo, M., Gambelunghe, A. y Bodo M. (2015). *In vitro* cadmium effects on ECM gene expression in human bronchial epithelial cells. *Cytokine.*, 72(1), 9-16.
- Barrouillet, M.P., Ohayon-Courtès, C., Dubus, I., L'Azou, B. y Nguyen, Ba. C. (2001). Influence of cadmium speciation for the evaluation of *in vitro* cadmium toxicity on LLC-PK(1) cells. *Toxicol In Vitro.*, 15(4-5), 525-9.
- Bayoumi, A.E., Pérez-Pertejo, Y., Ordoñez, C., García-Fernández, A.J., Reguera, R.M., Balaña-Fouce, R. y Ordoñez, D. (1999). Evaluación de la citotoxicidad de metales *in vitro* en las líneas celulares de peces BF-2 y RTG-2 por dos métodos alternativos. *Revista de Toxicología*, 16, 17–21.
- Bellairs, R. (1961) Cell death in chick embryos as studied by electron microscopy. *J Anat*, 95, 54 -60.
- Bellinger, D.C. (2005). Lead. *Pediatrics*, 113, 1016–1022.
- Benjamin, C.W., Hiebsch, R.R. y Jones, D.A. (1998). Caspase activation in MCF7 cells responding to etoposide treatment. *Mol Pharmacol.*, 53, 446-450.
- Benov, L., Szejnberg, L. y Fridovich, I. (1998). Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic Biol Med.*, 25, 826– 31.
- Berridge, M., Tan, A., McCoy, K. y Wang, R. (1996). The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 4, 14-19.
- Bhatnagar, M.K., Vrablic, O.E. y Yamashiro, S. (1982). Ultrastructural alterations of the liver of Pekin ducks fed methyl mercury-containing diets. *J Toxicol Environ Health.*, 10(6), 981-1003.
- Bindokas, V.P., Jordan, J., Lee, C.C. y Miller, R.J. (1996). Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci.*, 16, 1324– 36.

## REFERENCIAS

---

- Biswas, S., Talukder, G. y Sharma, A. (2000). Chromosome damage induced by selenium salts in human peripheral lymphocytes. *Toxicol In Vitro.*, 14(5), 405-8.
- Blankenship, L.J., Carlisle, D.L., Wise, J.P., Orenstein, J.M., Dye, L.E. 3rd y Patierno, S.R. (1997). Induction of apoptotic cell death by particulate lead chromate: differential effects of vitamins C and E on genotoxicity and survival. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 146(2), 270-80.
- Bodey, B., Bodey, B. Jr., Kaiser, H.E. (1998). Apoptosis in the mammalian thymus during normal histogenesis and under various *in vitro* and *in vivo* experimental conditions. *In Vivo.*, 12(1), 123-33.
- Boersma, P.D. (2008). Penguins as marine sentinels. *Bioscience* 58, 597-607.
- Bols, N.C., Dayeh, V.R., Lee, L.E.J. y Schirmer, K. (2005). Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology in T.W. Moon and T.P. Mommsen (eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fish*. Vol. 6. Amsterdam: Elsevier Science.
- Bonucci, E., Barckhaus, R.H., Silvestrini, G., Ballanti, P. y Di Lorenzo, G. (1983). Osteoclast changes induced by lead poisoning (saturnism). *Appl Pathol.*, 1(5), 241-50.
- Bortner, C., Oldenburg, N. y Cidlowski, J. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 5, 21-26.
- Bouaziz, C., Sharaf el dein, O., El Golli, E., Abid-Essefi, A., Brenner, C., Lemaire, C. y Bacha, H. (2008). Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. *Toxicology* 254, 19–28.
- Boulahdour, H. y Berry, J.P. (1996). Intranuclear dense bodies after metal intoxication: a review of ultrastructural and microanalytical findings. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*., 42(3), 421-9. Review.
- Bracken, W.M., Sharma, R.P. y Bourcier, D.R. (1984). Cellular distribution of inorganic mercury and its relation to cytotoxicity in bovine kidney cell cultures. *J. Toxicol. Environ. Health*, 13, 865–877.
- Bracken, W.M. y Sharma, R.P. (1985). Biochemical responsiveness of a bovine kidney cell line to inorganic mercury. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 14, 509–515.
- Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A. y Henson, P.M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated



- nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26159-65.
- Bruce, A., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing Inc.
- Bucio, L., Souza, V., Albores, A., Sierra, A., Chávez, E., Cáramez, A. y Gutierrez-Ruiz, M.C. (1995). Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology*, 102, 285– 299.
- Burau, R.G. (1985). Environmental chemistry of selenium. *California Agriculture* 39, 16-18.
- Burger, J. (1993). Metals in avian feathers: bioindicators of environmental pollution. *Reviews in Environmental Toxicology*, 5, 203-311.
- Burger, J. y Gochfeld, M., (2004). Marine birds as sentinels of environmental pollution. *EcoHealth*, 1, 263-274.
- Bustamante, P., Bocher, P., Cherel, Y., Miramand, P. y Caurant, F. (2003). Distribution of trace elements in the tissues of benthic and pelagic fish from the Kerguelen Islands. *Science of the Total Environment*, 313, 25-39.
- Caccia, V.G., Millero, F.J. y Palanques, A. (2003). The distribution of trace metals in Florida Bay sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 1420-1433.
- Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity, *Ann. Rev. Biochem.* 58, 79–110.
- Caldefie-Chézet, F., Walrand, S., Moinard, C., Tridon, A., Chassagne, J. y Vasson, M.P. (2002). Is the neutrophil reactive oxygen species production measured by luminol and lucigenin chemiluminescence intra or extracellular? Comparison with DCFH-DA flow cytometry and cytochrome c reduction. *Clin Chim Acta*, 319, 9–17.
- Campisi, J. (2003). Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Experimental Gerontology*, 38(1–2), 5-11.
- Campisi, J. y D'Adda di Fagagna F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Molecular Cell Biology*, 8, 729-740.
- Carlini, A.R., Coria, N.R., Santos, M.M., Negrete, J., Juarez, M.A. y Daneri, G.A. (2009). Responses of *Pygoscelis adeliae* and *P. papua* populations to environmental changes at Isla 25 de Mayo (King George Island). *Polar Biology*, 32, 1427-1433.

## REFERENCIAS

---

- Carranza-Rosales, P., Said-Fernández, S., Sepúlveda-Saavedra, J., Cruz-Vega, D.E. y Gandolfi, A.J. (2005). Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. *Toxicology*, 210(2-3), 111-21.
- Casadelvalle, I. (2006). Apoptosis: una muerte silenciosa. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 37, 13-17.
- Casalino, E., Sblano, C., and Landriscina, C. (1997). Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 346, 171–179.
- Casaril, A.M., Martinez, D.M., Ricordi, V.G., Alves, D., Lenardão, E.J., Schultze, E., Collares, T., Seixas, F.K. y Savegnago, L. (2015). Evaluation of the toxicity of  $\alpha$ -(phenylselanyl) acetophenone in mice. *Regul Toxicol Pharmacol.*, 73(3), 868-74.
- Cemeli, E., Marcos, R. y Anderson, D. (2006). Genotoxic and antigenotoxic properties of selenium compounds in the *in vitro* micronucleus assay with human whole blood lymphocytes and TK6 lymphoblastoid cells. *Scientific World Journal.*, 6, 1202-10.
- Chang, L.J., Chen, C.H., Urlacher, V. y Lee, T.Z. (2000). Differential apoptosis effects of primate lentiviral Vpr and Vpx in mammalian cells. *J Biomed Sci.*, 7(4), 322-33.
- Chao, J.I. y Yang, J.L. (2001). Opposite roles of ERK and p38 mitogen-activated protein kinases in cadmium-induced genotoxicity and mitotic arrest. *Chem Res Toxicol.*, 14(9), 1193-202.
- Chen, J. y Shaikh, Z.A. (2009). Activation of Nrf2 by cadmium and its role in protection against cadmium-induced apoptosis in rat kidney cells. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 241(1), 81-9.
- Cherian, M.G. y Nordberg, M. (1983). Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology*, 28(1-2):1-15. Review.
- Chinnaiyan, A. (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, 1, 5-15.
- Choi, Y.J., Yin, H.Q., Suh, H.R., Lee, Y.J., Park, S.R. y Lee, B.H. (2011). Involvement of E2F1 transcriptional activity in cadmium-induced cell-cycle arrest at G1 in human lung fibroblasts. *Environ Mol Mutagen.*, 52(2), 145-52.

- Choie, D.D. y Richter, G.W. (1972). Lead poisoning: rapid formation of intranuclear inclusions. *Science.*, 177(4055), 1194-5.
- Ciapetti, G., Granchi, D., Verri, E., Savarino, L., Cenni, E., Savioli, F. y Pizzoferrato, A. (1998). Fluorescent microplate assay for respiratory burst of PMNs challenged *in vitro* with orthopedic metals. *J Biomed Mater Res.* 41(3), 455-60.
- Claridge, G.G.C., Campbell, I.B., Powell, H.K.J., Amin, Z.H. y Balks, M. (1995). Heavy metal contamination in some soils of the McMurdo Sound region, Antarctica. *Antarctic Science*, 7, 9-14.
- Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O.W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. y Stokes, W. (2005). Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim*, 33(3), 261-87.
- Collins, J.A., Schandi, C.A., Young, K.K., Vesely, J. y Willingham, M.C. (1997). Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem.*, 45(7), 923-34.
- Columbié, F. y Galdeta, P. (2002). Mecanismos involucrados en la apoptosis inducida por el VSV. *Botanic Revist.*, 86, 162-169.
- COMNAP, 2012. Proceedings of the COMNAP symposium 2012. Sustainable solutions to Antarctic challenges. Portland, Julio 2012. The Council of Managers of National Antarctic Programs.
- Condron, R.J., Schroen, C.J. y Marshall, A.T. (1994). Morphometric analysis of renal proximal tubules in cadmium-treated rats. *J Submicrosc Cytol Pathol.*, 26(1), 51-8.
- Convey P. (2006). Antarctic Climate change and its influence on terrestrial ecosystems, in Bergstrom, P. Convey and A.H.L. Huiskes (eds.) Trends in Antarctic Terrestrial and Limnetic Ecosystems: Antarctica as a Global Indicator. Dordrecht: Springer.
- Corsolini, S., (2009). Review: Industrial contaminants in Antarctic biota. *Journal of Chromatography A* 1216, 598-612.
- Costa, M. y Klein, C.B. (2006). Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans. *Crit Rev Toxicol*, 36, 155–163, 2006.
- Croteau, M.N., Luoma, S.N. y Stewart, A.R. (2005). Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnology and Oceanography* 50, 1511-1519.

## REFERENCIAS

---

- Curcic, M., Durgo, K., Kopjar, N., Ancic, M., Vucinic, S., y Antonijevic, B. (2014). Cadmium and decabrominated diphenyl ether mixture: *In vitro* evaluation of cytotoxic, prooxidative and genotoxic effects. *Environmental Toxicology and Pharmacology.*, 38, 663-671.
- Curtosi, A., Pelletier, E., Vodopivec, C., St Louis, R. y Mac Cormack, W.P. (2010). Presence and distribution of persistent toxic substances in sediments and marine organisms of Potter Cove, Antarctica. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 59, 582-592.
- Damia, G. y Brogini, M. (2004). Cell cycle checkpoint proteins and cellular response to treatment by anticancer agents. *Cell Cycle.*, 3, 46-50.
- Daniel, N.N. y Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell.*, 116(2), 205-19. Review.
- Daniel, P.T., Sturm, I., Ritschel, S., Friederich, K., Dorken, B., Bendzko, P. y Hillebrand, T. (1999). Detection of genomic DNA fragmentation during apoptosis (DNA ladder) and simultaneous isolation of RNA from low cell numbers. *Analytical Biochem.*, 266, 110-15.
- Davis, C.H., Li, Y., McConnell, J.R., Frey, M.M. y Hanna, E. (2005). Snowfall-driven growth in East Antarctic ice sheet mitigates recent sea-level rise. *Science*, 308, 1898-1901.
- Degterev, A. y Yuan, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 378-390.
- Deheyn, D.D., Gendreau, P., Baldwin, R.J. y Latz, M.I. (2005). Evidence for enhanced bioavailability of trace elements in the marine ecosystem of Deception Island, a volcano in Antarctica. *Marine Environmental Research*, 60, 1-33.
- Delgado, P., Vera, C y Arenas, C. (2013). Efecto *in vitro* del cromo (VI) sobre un biomarcador tumoral p53 y daño al ADN en hepatocitos murinos. *Rev Soc Quím Perú.* 79(1), 37-46.
- Denizot, F., Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, 89(2):271-7.

Dimri, G., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. y Campisi, J. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 9363-9367.

Directiva 86/609/CEE del Consejo de 24 de noviembre de 1986 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

Doillon, C.J, Gagnon, E., Paradis, R. y Koutsilieris, M. (2004). Three-dimensional culture system as a model for studying cancer cell invasion capacity and anticancer drug sensitivity. *Anticancer Res.*, 24(4), 2169-2177.

Dominguez, M.C., Sole, E., Goñi, C. y Ballabriga, A. (1995). Effect of aluminum and lead salts on lipid peroxidation and cell survival in human skin fibroblasts. *Biol Trace Elem Res.*, 47(1-3), 57-67.

Dos Santos, I.R., Silva-Filho, E.V., Schaefer, C.E., Albuquerque-Filho, M.R. y Campos, L.S. (2005). Heavy metal contamination in coastal sediments and soils near the Brazilian Antarctic Station, King George Island. *Marine Pollution Bulletin* 50, 185-194.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. y Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.

Dubois, F., Cézilly, F. y Pagel, M., (1998). Mate fidelity and coloniality in waterbirds: a comparative analysis. *Oecologia* 116, 433-440.

Duncan-Achanzar, K.B., Jones, J.T., Burke, M.F., Carter, D.E. y Laird, H.E. (1996). Inorganic mercury chloride-induced apoptosis in the cultured porcine renal cell line LLC-PK1. *J Pharmacol Exp Ther.*, 277(3), 1726-32.

Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122(3168), 501-14.

## REFERENCIAS

---

ECVAM (2002) Acute lethal toxicity. Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future prospects. European Centre for the Validation of Alternative Methods, Ispra, 27–33.

Ekwall, B. (1995). The basal cytotoxicity concept. *World Congr. Altern. Anim. Use Life Sci. Educ. Res. Test.*, 11, 721–5.

Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J-C., Pieters, R. y Kleiner, J. (2002). Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem. Toxicol*, 4,193–236.

Eisler, R. (1986). Chromium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report 85, Washington, DC.

El Azzouzi, B., Tsangaris, G.T., Pellegrini, O., Manuel, Y., Benveniste, J. y Thomas, Y. (1994). Cadmium induces apoptosis in a human T cell line. *Toxicology.*, 88(1-3), 127-39.

Elinder, C.G. y Nordberg, M. (1982). Critical concentration of cadmium estimated by studies on horse kidney metallothionein. *Dev Toxicol Environ Sci.*, 9, 37-46.

Ellenhorn, M.J. y Barceloux, D.G. (1988). *Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*. New York: Elsevier.

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.

Ercal, N., Gurer-Orhan, H. y Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress. Part 1. Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.*, 1, 529–539.

Evan, G. y Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, 281(5381),1317-22.

Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D. y Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.*, 33, 389-396.

Farreny, R., Oliver-Solà, J., Lamers, M., Amelung, B., Gabarrell, X., Rieradevall, J., Boada, M. y Benayas, J. (2011). Carbon dioxide emissions of Antarctic tourism. Antarctic. *Science*, 23, 556-566.

- Ferrer E., Juan-García A., Font G. y Ruiz M.J. (2009). Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicology in Vitro*, 23, 1504–1509.
- Ferri, K. y Kroemer, G. (2002). Organelle-specific initiation of the death pathways. *Nat. Cell. Biol.*, 3, 255-263.
- Fischer, A.B. (1976). Heavy metal toxicity in mammalian cell cultures (author's transl). *Zentralbl Bakteriol Orig B.*, 162(1-2), 77-84.
- Flora SJS, Mittal M, Mehta A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res*, 128, 501-23.
- Folkes, L. K., Patel, K. B., Wardman, P. y Wrona, M. (2009). Kinetics of reaction of nitrogen dioxide with dihydrorhodamine and the reaction of the dihydrorhodamine radical with oxygen: implications for quantifying peroxynitrite formation in cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 484, 122–126.
- Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G.E., Capaccioli, S. y Orlandini, S.Z. (2000). Aponecrosis: Morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell Physiol.*, 182, 41-49.
- Frenot, Y., Chown, S.L., Whinam, J., Selkirk, P., Convey, P., kotnicki, M. y Bergstrom, D. (2005). Biological invasions in the Antarctic: extent, impacts and implications. *Biological Reviews*, 80, 45-72.
- Freshney, R.I. (2010). *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications*. New York: Wiley-Blackwell.
- Fuji, C., Saratutsuchi, A., Manaka, J., Yonehara, S. y Nakanishi, Y. (2001). Difference in the way of macrophage recognition of target cells depending of their apoptotic stages. *Cell Death Diferr.*, 8, 1113-1122.
- Furness, R.W. y Camphuysen, C.J. (1997). Seabirds as monitors of the marine environment. *ICES Journal of Marine Science* 54, 726-737.
- Gadhia, S.R., O'Brien, D. y Barile, F.A. (2015). Cadmium affects mitotically inherited histone modification pathways in mouse embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro.*, 30(1 Pt B), 583-92.

## REFERENCIAS

---

- Galan, A., Garcia-Bermejo, L., Troyano, A., Vilaboa, N.E., Fernandez, C., de Blas, E. y and Aller, P. (2001). The role of intracellular oxidation in death induction (apoptosis and necrosis) in human promonocytic cells treated with stress inducers (cadmium, heat, X-rays), *Eur. J. Cell. Biol.*, 80, 312–320.
- Ganther HE. (1971). Reduction of the selenotrisulfide derivative of glutathione to a persulfide analog by glutathione reductase. *Biochemistry.*, 10(22), 4089-98.
- García-Rodríguez, M.C., López-Santiago, V. y Altamirano-Lozano, M. (2001). Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res.*, 496(1-2), 145-51.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P., Didelot, C. y Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 13, 1423-1433.
- Gartner, L.P. y Hiatt, J.L. (2002). *Texto Atlas de Histología*. McGraw-Hill Interamericana.
- Garza, A., Chávez, H., Vega, R. y Soto, E. (2005). Mecanismos celulares y moleculares de la neurotoxicidad por plomo. *Salud Mental*, 28, 48-58.
- Gasiorek, K. y Bauchinger, M. (1981). Chromosome changes in human lymphocytes after separate and combined treatment with divalent salts of lead, cadmium, and zinc. *Environ Mutagen.*, 3(5), 513-8.
- Gasser, J.P., Hehl, M. y Millward, T.A. (2009). A homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay for phosphatidylserine exposure on apoptotic cells. *Analytical Biochemestri*, 384(1), 49-55.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson y S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119, 490-501.
- Gey, G. O., Coffman W.D., y Kubicek, M.T. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, 12, 264–265.
- Gil-Loyzaga, P.E. (2011). *Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa*. Madrid: Visión libros.



- Girard, F.S., Fernández, A. y Lamb, N.J. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblast. *Cell.*, 67, 1169.
- Goldsmith, M. (1966). The Anatomy of Cell Death. *J. Cell Biol.*, 31, 41A.
- Gomes, A., Fernandes, L. y Lima, J.L. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods.*, 65(2-3), 45-80.
- Gómez i Arbonés X. (1998). Tesis doctoral: Estudio del contenido en ADN y cinética celular de síndromes linfoproliferativos. Estudio por citometría de flujo e inmunohistoquímica. I S B N: 84-89727-64-3 Depósito Legal: S. 54-98. Universitat de Lleida.
- Gotti, C., Cabrini, D., Sher, E. y Clementi, F. (1987). Effects of long-term *in vitro* exposure to aluminum, cadmium or lead on differentiation and cholinergic receptor expression in a human neuroblastoma cell line. *Cell Biol Toxicol.*, 3(4), 431-40.
- Goyer, R.A., Leonard, D.L., Moore, J.F., Rhyne, B., Krigman, M.R. (1970). Lead dosage and the role of the intranuclear inclusion body. An experimental study. *Arch Environ Health*, 20(6), 705-11.
- Goyer, R.A. y Rhyne, B.C. (1973). Pathological effects of lead. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 12, 1-77.
- Goyer, R.A. (1983). Intracellular sites of toxic metals. *Neurotoxicology.*, 4(3), 147-56.
- Goyer, R.A. (1990). Lead toxicity: from overt to subclinical to subtle health effects. *Environ Health Perspect*, 86, 177-181.
- Goyer R.A. (2001). *Toxic effects of metals. In: Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons.* 6th ed. Amdur M.O., Doull J. and Klaasen C.D. (eds). Pergamon Press. New York. pp 691-736.
- Grasl-Kraupp, B., Ruttkay-Nedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W. y Schulte-Hermann, R. (1995). In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology*, 21, 1465-8.
- Gray, J.W., Dolbeare, F. y Pallavicini, M.B. (1991). Quantitative cell-cycle analysis. En: *Flow Cytometry and Sorting.* Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L. New York: Wiley-Liss.

## REFERENCIAS

---

- Guo, S., Zhou, J., Chen, X., Yu, Y., Ren, M., Hu, G., Liu, Y. y Zou, F. (2014). Bystander effects of PC12 cells treated with Pb<sup>2+</sup> depend on ROS-mitochondria-dependent apoptotic signaling via gap-junctional intercellular communication. *Toxicol Lett.*, 229(1), 150-7.
- Gurer, H. y Ercal, N. (2000). Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic. Biol. Med.*, 29, 927–945.
- Gutierrez-Reyes, E.Y., Albores, A. y Rios, C. (1998). Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone induced metallothionein. *Toxicology*, 131, 145-54.
- Hall, J.O. (2007). Selenium, en: Gupta, R.C. (Ed.). *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. Amsterdam: Academic Press, Elsevier.
- Halliwell, .B y Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.*, 142, 231– 55.
- Hamada, T., Tanimoto, A., Iwai, S., Fujiwara, H. y Sasaguri, Y. (1994). Cytopathological changes induced by cadmium-exposure in canine proximal tubular cells: a cytochemical and ultrastructural study. *Nephron.*, 68(1), 104-11.
- Hamada, T., Sasaguri, T., Tanimoto, A., Arima, N., Shimajiri, S., Abe, T. y Sasaguri, Y. (1996). Apoptosis of human kidney 293 cells is promoted by polymerized cadmium-metallothionein. *Biochem Biophys Res Commun.*, 219(3), 829-34.
- Hartung, J. (1999). An Alternative Method for Meta-Analysis. *Biometrical Journal*, 41(8), 901-916.
- Hartung, T., Balls, M., Bardouille, C., Blanck, O., Coecke, S., Gstraunthaler, G. y Lewis, D. (2002). Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1. *Altern Lab Anim*, 30(4), 407-14.
- Hazen-Martin, D.J., Sens, D.A., Blackburn, J.G. y Sens, M.A. (1989). Cadmium nephrotoxicity in human proximal tubule cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol.*, 25(9), 784-90.
- He, X., Chen, M.G. y Ma, Q. (2008). Activation of Nrf2 in defense against cadmium-induced oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.*, 21, 1375–1383.

- Hemann, C., Velayutham, M. y Zweier J.L. (2011). Removal of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and generation of superoxide radical: Role of cytochrome C and NADH. *Free radical biology & medicine* 51(1), 160-170.
- Hernández-García, A., Romero, D., Gómez-Ramírez, P., María-Mojica, P., Martínez-López, E., García-Fernández, A.J. (2014). In vitro evaluation of cell death induced by cadmium, lead and their binary mixtures on erythrocytes of Common buzzard (*Buteo buteo*). *Toxicol In Vitro*, 28(2), 300-6.
- Hiddeman, W., Schumann, J., Andreeff, M., Barlogie, B., Herman, C.J., Leif, R.C., Mayall, B.H., Murphy, R.F. y Sandberg, A.A. (1984). Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry*, 5, 445-446.
- Hill, M., Adrain, C., Duriez, P., Creagh, E. y Martin, S. (2003). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J*, 23, 2134-2145.
- Hoffmann, E.O., Cook, J.A., di Luzio, N.R. y Coover, J.A. (1975). The effects of acute cadmium administration in the liver and kidney of the rat. Light and electron microscopic studies. *Lab Invest.*, 32(5), 655-64.
- Hoffman, D.J. y Heinz, G.H. (1998). Effects of mercury and selenium on glutathione metabolism and oxidative stress in mallard ducks. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17(2), 161–166.
- Holian, A., Hamilton, R.F., Morandi, M.T., Brown, S.D. y Li, L. (1998). Urban particle-induced apoptosis and phenotype shifts in human alveolar macrophages. *Environ Health Perspect*, 106, 127-32.
- Holmes, A.L., Wise, S.S., Xie, H., Gordon, N., Thompson, W.D. y Wise, J.P. (2005). Lead ions do not cause human lung cells to escape chromate-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 203(2), 167-76.
- Honda, K., Yamamoto, Y., Hidaka, H. y Tatsukawa, R. (1986). Heavy metal accumulations in Adélie penguin, *Pygoscelis adeliae*, and their variations with the reproductive processes. *Memoirs of National Institute of Polar Research*, 40, 443-453.
- Hoppel, C.L., Kim, J., Minkler, y Paul, E. (2011, january) cardiolipin: characterization of distinct oxidized molecular species. *Journal of lipid research American Society for Biochemistry and molecular. Biology.*, 52(1), 125-135

## REFERENCIAS

---

Horn, J. (1970). Isolation and examination of inclusion-bodies of the rat-kidney after chronic lead poisoning. *Virchows Arch B Cell Pathol.*, 6(4), 313-7.

Huerta, S., Goulet, E., Huerta-Yépez, S. y Livingston, E. (2007). Screening and Detection of Apoptosis. *Journal of Surgical Research*, 139, 143-156.

Hughes, K.A, Fretwell p. Rae j. Holmes K. y Fleming A. (2011). Untouched Antarctica: mapping a finite and diminishing environmental resource. *Antarctic Science*, 23, 537-548.

IAATO, 2015. International Association of Antarctica Tour Operators. 2013-2014 Tourism Summary. Disponible en: [http://www.iaato.org/tourism\\_stats.html](http://www.iaato.org/tourism_stats.html) (último acceso: enero 2015).

INVITROGENTM. 2009. Assay for Apoptosis. En: INVITROGENTM Molecular Probes: The Handbook. USA. Disponible en URL: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>.

INVITTOX. (1996). Protocolo: The FRAME cytotoxicity test (kenacid blue). Number 3b: INVITTOX edition, p.13-16.

Ishido, M., Homma-Takeda, S., Tohyama, C. y Suzuki, T. (1998). Apoptosis in rat renal proximal tubular cells induced by cadmium. *J Toxicol Environ Health A.*, 55(1), 1-12.

Iturralde, M y Coll, J. (1984). Cultivo de células animales. *Medicina clínica*, 82(6), 273-280.

Izaguirre, I. y Mataloni, G. (2000). *Antártida descubriendo el continente blanco*. Ciudad de Buenos Aires: Del Nuevo Extremo.

Jakubowski, W. y Bartosz, G. (2000). 2,7-Dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol Int.*, 24, 757-60.

Jamwal, A., Naderi, M. y Niyogi, S. (2016). An *in vitro* examination of selenium-cadmium antagonism using primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Metallomics.*, 8(2), 218-27.

Jerez, S., Motas, M., Palacios, M.J., Valera, F., Cuervo, J.J. y Barbosa, A. (2011). Concentration of trace elements in feathers of three Antarctic penguins: Geographical and interspecific differences. *Environmental Pollution*, 159(10), 2412-2419.

- Jerez, S., Motas, M., Benzal, J., Diaz, J., Vidal, V., D'Amico, V. y Barbosa, A. (2013a). Distribution of metals and trace elements in adult and juvenile penguins from the Antarctic Peninsula area. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 3300-3311.
- Jerez, S., Motas, M., Benzal, J., Diaz, J. y Barbosa, A. (2013b). Monitoring trace elements in Antarctic penguin chicks from South Shetland Islands, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, 69(1-2), 67-75.
- Jiménez, N., González, M., Fernándezm C. y López, J. (2007). Estudio de la biocompatibilidad *in vitro* de polímeros metacrílicos derivados de pirrolidona/ina. *Biomecánica*, 15(1), 63-71.
- Jomova K y Valko M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.*, 283(2-3), 65-87.
- Jordán, K. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *Offarm*, 22(6), 100-106.
- Jos, A., Cameán, A.M., Pflugmacher, S. y Segner, H. (2009). The antioxidant glutathione in the fish cell lines EPC and BCF-2: response to model pro-oxidants as measured by three different fluorescent dyes. *Toxicol In Vitro.*, 23(3), 546-53.
- Kaji, T., Suzuki, M., Yamamoto, C., Mishima, A., Sakamoto, M. y Kozuka, H. (1995). Severe damage of cultured vascular endothelial cell monolayer after simultaneous exposure to cadmium and lead. *Arch Environ Contam Toxicol.*, 28(2), 168-72.
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J., Dennery, P.A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts 2nd L.J. y Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.*, 52, 1-6.
- Kang, B.S., Ahn, J.Y., Kim, M.K., Kim, H.J., Kang, L., Lim, H.C., Park, K.S., Lee, J.S., Seo, J.S., Cha, C.I., Kim, S.U., Park, Y.J. y Kim, M. (2007). Heat shock protein 70 alters the endosome-lysosomal localization of huntingtin. *Exp Mol Med.*, 39(1), 38-46.
- Karlsson, M., Kurz, T., Brunk, U.T., Nilsson, S.E. y Frennesson, C. (2010). What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem. J.*, 428, 183-190.
- Karlsson-Rosenthal, C. y Millar, J.B. (2006). Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol.*, 16, 285-292.

## REFERENCIAS

---

- Kasprzak, K.S. (2002). Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.*, 32, 958–967.
- Kastan, M.B. y Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432, 316-323.
- Kataoka, S. y Tsuruo, T. (1996). Physician Education: Apoptosis. *Oncologist.*, 1(6), 399-401.
- Kelly, S.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H. y Levin, E.D. (1998). Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*, 106, 375–384.
- Kendall, R.J., Scanlon, P.F. y Veit, H.P. (1983). Histologic and ultrastructural lesions of mourning doves (*Zenaidura macroura*) poisoned by lead shot. *Poult Sci.*, 62(6), 952-6.
- Kennicutt, M.C. (2009). King George Island and SCAR science. Invited paper for COMNAP meeting, Punta Arenas, Chile.
- Keogh, J.P., Steffen, B. y Siegers, C.P. (1994). Cytotoxicity of heavy metals in the human small intestinal epithelial cell line I-407: the role of glutathione. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 43, 351–359.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. y Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-257.
- Kerr, J.F.R. y Searle, J. (1973). Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, 13, 87-102.
- Kim, J., Kim, S.H., Johnson, V.J. y Sharma, R.P. (2005). Extracellular signal-regulated kinase-signaling-dependent G2/M arrest and cell death in murine macrophages by cadmium. *Environ Toxicol Chem.*, 24(12), 3069-77.
- Kim, J., Minkler, P.E., Salomon, R.G., Anderson, V.E. y Hoppel, C.L. (2011). Cardiolipin: characterization of distinct oxidized molecular species. *Journal of lipid research American Society for Biochemistry and molecular Biology.*, 52(1), 125-135.
- Kim, J.H. y Kang, J.C. (2016). Oxidative stress, neurotoxicity, and metallothionein (MT) gene expression in juvenile rock fish *Sebastes schlegelii* under the different levels of dietary chromium(Cr6+) exposure. *Ecology and Environmental Safety*. 125, 78-84.

- Kimbrough, D.E., Cohen, Y. y Winer, A.M. (1999). A critical assessment of chromium in the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 29, 1-46.
- Kitagawa, K. y Niilkura, Y. (2008). Caspase-independent mitotic death (CIMD). *Cell Cycle.*, 7, 1001-1005.
- Klaassen C.D. (2008). *Casarett and Doull's Toxicology the basic science of poisons. Seventh Edition.* Kansas: McGraw-Hill.
- Klasing, K.C. (2005). Cadmium, en: National Research Council (Ed.). *Mineral Tolerance of Animals.* The National Academies Press, Washington, DC, pp. 79-96.
- Kohler, G. y Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495 – 497.
- Kotas, J. y Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution*, 107, 263-283.
- Kumar, V., Abbas, A. K., and Fausto, N. (2005). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 7th edition. Philadelphia: Elsevier Inc.
- Kury, T., Milczarek, M. y Debski, B. (2014). The Effect of Chromium and Selenium Ions on Mitochondrial Trans membrane Transport of Fatty Acids in Healthy and Diabetic Rats. *J Veterinar Sci Technol*, 5, 159.
- Lakkad, B.C., Nigam, S.K., Karnik, A.B., Thakore, K.N. y Chatterjee, B.B. (1986). Effect of cadmium chloride on cell division and chromosomes in Chinese hamster ovary cells. *Bull Environ Contam Toxicol.*, 36(3), 342-9.
- Langlois, R.G. (1989). DNA stains as cytochemical probes for chromosomes. En: *Analytical Flow Cytology Series. Flow Cytogenetics.* Londres: Academic Press.
- Lanneau, D., de Thonel, A., Maurel, S., Didelot, C. y Garrido, C. (2007). Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion.*, 1(1), 53-60.
- Laraque, D., Trasande, L. (2005). Lead poisoning: successes and 21st century challenges. *Pediatr Rev.*, 26, 435–443.
- Larison, J.R., Likens, G.E., Fitzpatrick, J.W. y Crock, J.G. (2000). Cadmium toxicity among wildlife in the Colorado Rocky Mountains. *Nature*, 406(6792), 181-183.

## REFERENCIAS

---

- Laszczyca, P. (1989). The activity of mitochondrial enzymes in the muscles of rats subjected to physical training and subchronical intoxication with lead and zinc. *Acta Physiol Pol.*, 40(5-6), 544-51.
- Latimer, K.S., and Rakich, P.M. (2007). Avian Cytology. *Vet. Clin. Exot. Anim.* 10, 131-154.
- Lauwerys, R. y Buchet, J.P. (1972). Study on the mechanism of lysosome labilization by inorganic mercury *in vitro*. *Eur. J. Biochem.*, 26, 535–542.
- Lawrence, A, Jones, C.M., Wardman, P. y Burkitt, M.J. (2003). Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of glutathione, NADH, ascorbate, and dichlorofluorescein by cytochrome c/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Implications for oxidative stress during apoptosis. *J Biol Chem.*, 278, 29410–9.
- Lazo, J.S., Kondo, Y., Dellapiazza, D., Michalska, A.E., Choo, K.H.A. y Pitt, B.R. (1995). Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *The journal of Biological Chemistry.*, 270(10), 5506-5510.
- Lemley, A.D. (1993). Guidelines for evaluating selenium data form aquatic monitoring and assessment studies. *Environmental Monitoring and Assessment* 28(1), 83-100.
- Leonard, S.S, Harris, G.K. y Shi, X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(12), 1921–1942.
- Li, X., Ye, F., Li. L., Chang, W., Wu, X., and Chen, J. (2016). Neurotoxicology. The role of HO-1 in protection against lead-induced neurotoxicity. 52, 1-11.
- Lin, Y. y Spallholz, J.E. (1993). Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with thiols and mammary tumor cells. *Biochemical Pharmacology*, 45, 429–437.
- Lin, R.H., Lee, C.H., Chen, W.K. y Lin-Shiau, S.Y. (1994). Studies on cytotoxic and genotoxic effects of cadmium nitrate and lead nitrate in Chinese Hamster Ovary cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 23, 143–149.
- Lin, C.J., Wu, K.H., Yew, F.H. y Lee, T.C. (1995). Differential cytotoxicity of cadmium to rat embryonic fibroblasts and human skin fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 133(1), 20-6.



- Liu, J., Kershaw, W.C. y Klaassen, C.D. (1990). Rat primary hepatocyte cultures are a good model for examining metallothionein-induced tolerance to cadmium toxicity. *In Vitro Cell Dev Biol.*, 26(1), 75-9.
- Liu, F. y Jan, K.Y. (2000). DNA damage in arsenite- and cadmium-treated bovine aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 28, 55–63.
- Liu, K.J. y Shi, X.L. (2001). *In vivo* reduction of chromium (VI) and its related free radical generation, *Mol. Cell. Biochem.*, 222, 41–47.
- Liu, B.H., Yu, F.Y., Wu, T.S., Li, S.Y., Su, M.C., Wang, M.C. y Shih, S.M. (2003). Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191, 255–263.
- Liu, B.H., Wu, T.S., Yu, F.Y. y Su, C.C. (2007). Induction of oxidative stress response by the mycotoxin patulin in mammal cells. *Toxicology Science*, 95, 340–347.
- Liu, J., Qu, W. y Kadiiska, M.B. (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238, 209–214.
- Lizarbe, A. (2007). El suicidio y la muerte celular. *R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat*, 101(2).
- Lynch, H., Naveen, R. y Fagan, W.F. (2008). Censuses of penguin, blue-eye shag *Phalacrocorax atriceps* and southern giant petrel *Macronectes giganteus* populations on the Antarctic Peninsula, 2001–2007. *Marine Ornithology* 36, 83-97.
- Lynch, H.J., Crosbie, K., Fagan, W.F. y Naveen, R. (2009). Spatial patterns of tour ship traffic in the Antarctic Peninsula region. *Antarctic Science*, 22(2), 123-130
- Lynch, H. J., Crosbie, K., Fagan y W. F., Naveen, R. (2010). Spatial patterns of tour ship traffic in the Antarctic Peninsula region. *Antarctic Science*, 22, 123-130.
- Lynch, H.J., Naveen, R., Trathan, P.N. y Fagan, W.F. (2012). Spatially integrated assessment reveals widespread changes in penguin populations on the Antarctic Peninsula. *Ecology*, 93(6),1367-1377.
- Lyons-Alcántara, M., Mooney, R., Lyng, F., Cottel, I D. y Mothersill, C. (1998). The effects of cadmium exposure on the cytology and function of primary cultures from rainbow trout. *Cell Biochem Funct.*, 16(1), 1-13.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D. Y Darnell, J.. (2002). *Biología Celular y Molecular*. 4th Ed. New York: Freeman and Company eds, 595-597.

## REFERENCIAS

---

- López-Artíguez, M. y Repetto, M. (1995). Estado actual de la toxicología del cadmio, en: Repetto, M. (Ed.). *Toxicología Avanzada*. Madrid: Díaz de Santos, Madrid, pp. 393-424.
- Lucky, T.D., Venugopal, B. (1977). *Metal Toxicity in Mammals*, Vol. I, Physiological and Chemical Basis for Metal Toxicity. New York: Plenum Press.
- Lumeij J.T. 1994. Hepatology, in *Avian Medicine, Principles and Applications*. Wingers Publishing Inc. Lake Worth, Florida. ISBN 0-9636996-0-1.
- Lumeij J.T. 1994b. Nephrology, in *Avian Medicine, Principles and Applications*. Wingers Publishing Inc. Lake Worth, Florida. ISBN 0-9636996-0-1.
- Lushchak, V.I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*, 153(2), 175-90.
- Magos, L. y Webb, M., (1980). The interactions of selenium with cadmium and mercury. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 8, 1-42.
- Mahaffey, K.R., Capar, S.G., Gladen, B.C. y Fowler B.A. (1981). Concurrent exposure to lead, cadmium, and arsenic. Effects on toxicity and tissue metal concentrations in the rat. *J Lab Clin Med.*, 98(4), 463-81.
- Majer, A.P., Petti, M.A.V., Corbisier, T.N., Ribeiro, A.P., Theophilo, C.Y.S. y Figueira, R.C.L. (2012). *Cadmium biomagnification in Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) using stable nitrogen isotope analysis*. Proceeding of the International Polar Year "From Knowledge to Action" Conference, Montreal, Canada.
- Malhotra, S., Welling, M.N., Mantri, S.B. y Desai, K. (2016). *In vitro* and *in vivo* antioxidant, cytotoxic, and anti-chronic inflammatory arthritic effect of seleniumnanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, 104(5), 993-1003.
- Malik, R.N. y Zeb, N. (2009). Assessment of environmental pollution using feathers of *Bulbucus ibis* L., as biomonitor of heavy metals pollution, Pakistan. *Ecotoxicology*, 18, 522-536.
- Manca, D., Richard, A.C., van Tra, H. y Chevalier, G. (1994). Relation between lipid peroxidation and inflammation in the pulmonary toxicity of cadmium. *Arch. Toxicol.*, 68, 364–369.

- Manca, D., Ricard, A.C., Trotter, B. y Chevalier, G. (1991). Studies for lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology*, 67, 303-23.
- Marchetti, C., Di marco, B., Cifone, G., Migliorati, G. y Riccardi, C. (2003). Dexamethasone-induced apoptosis in tymphocytes: Role of glucocorticoid receptor associated Src kinase and caspase 8 activation. *Blood*, 101, 585- 593.
- Marigómez, I., Soto, M. y Kortabitarte, M. (1996). Tissue-level biomarkers and biological effect of mercury on sentinel slugs, *Arion ater*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 54–62.
- Martin, S.L., Lennon, S.V., Bonham, A.M. y Cotter, T.G. (1990). Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukaemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *J Immunol.*, 145, 1859-67.
- Martínez, M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular *in vitro* y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 152-166.
- Matsuoka M. y Call, K.M. (1995)-Cadmium-induced expression of immediate early genes in LLC-PK1 cells. *Kidney Int.*, 48(2), 383-9.
- Matsuura K, Takasugi M, Kunifuji Y, Horie A, Kuroiwa A. (1991). Morphological effects of cadmium on proximal tubular cells in rats. *Biol Trace Elem Res.*, 31(2), 171-82.
- Maxwell, K., Vinters, H.V., Berliner, J.A., Bready, J.V. y Cancilla, P.A. (1986). Effect of inorganic lead on some functions of the cerebral microvessel endothelium. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 84(2), 389-99.
- McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A. (1998). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res.*, 288(1), 47-63.
- McKelvey, S.M., Horgan, K.A. y Murphy, R.A. (2015). Chemical form of selenium differentially influences DNA repair pathways following exposure to lead nitrate. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 113, 134-144.
- McLachlin, J.R., Goyer, R.A., Cherian, M.G. (1980). Formation of lead-induced inclusion bodies in primary rat kidney epithelial cell cultures: effect of actinomycin D and cycloheximide. *Toxicol Appl Pharmacol*, 56(3), 418-31.

## REFERENCIAS

---

Melamed, M.R., Mullaney, P.F. y Shapiro, H.M. (1990). An historical review of the development of flow cytometry and sorters. En Melamed, M.R., Lindmo, T. y Mendelsohn, M.L. *Flow cytometry and sorting*. New York: John Wiley Sons, 1-9.

Méndez-Armenta M. y Ríos C. (2007). Cadmium neurotoxicity. *ETAP*, 23, 350-8.

Méndez-Armenta M, Villeda-Hernández J, Barroso-Moguel R, Nava-Ruíz C, Jiménez-Capdeville ME y Ríos C. (2003). Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone. *Toxicol Lett*, 144, 151-7.

Méplan, C., Mann, K. y Hainaut, P. (1999). Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J Biol Chem.*, 274(44), 31663-70.

Metcheva, R., Yurukova, L., Teodorova, S. y Nikolova, E. (2006). The penguin feathers as bioindicator of Antarctica environmental state. *Science of the Total Environment* 362, 259-265.

Misra, S. y Niyogi, S. (2009). Selenite causes cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes by inducing oxidative stress. *Toxicology in Vitro*, 23, 1249–1258.

Misra, S., Hamilton, C. y Niyogi, S. (2012). Induction of oxidative stress by selenomethionine in isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol In Vitro.*, 26(4), 621-9.

Miura, K. y Imura, N. (1987). Mechanism of methylmercury cytotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.*, 18, 161–189.

Moore, A., Donahue, C.J., Bauer, K.D., Mather, J.P. (1998). Medición simultánea de ciclo celular y la muerte celular por apoptosis. *Métodos Cell Biol.* 57, 265-78.

Morcillo, P., Cordero, H., Meseguer, J., Esteban, M.A. y Cuesta, A. (2015). Toxicological *in vitro* effects of heavy metals on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) head–kidney leucocytes. *Toxicol In Vitro*, 30(1 Pt B), 412-20.

Morcillo, P., Esteban, M.A. y Cuesta, A. (2016). Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line. *Chemosphere*, 144, 225-233.

- Moreno-Graw, M.D. (2003). *Toxicología Ambiental. Evaluación del Riesgo para la Salud Humana*. Madrid Mc: Graw-Hill.
- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, 374, 131.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J.Immunol.Methods*, 65, 55-63.
- Moscona, A. y Moscona, H. (1952). The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J Anat.*, 86(3), 287-301.
- Mukherjee, J.J., Gupta, S.K., Kumar, S. y Sikka, H.C. (2004). Effects of cadmium (II) on (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage response in human fibroblasts and DNA repair: a possible mechanism of cadmium's cogenotoxicity. *Chem Res Toxicol.*, 17(3), 287-93.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Haskó, G., Hawkins, B., Madesh, M. y Pacher, P. (2007). Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nature Protocols*, 2(9), 2295-2301.
- Murrant, C.L. y Reid, M.B.(2001). Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech.*, 55(4):236-48.
- Nagy, G., Benko, I., Kiraly, G., Voros, O., Tanczos, B., Sztrik, A., Takács, T., Pocsi, I., Prokisch, J. y Banfalvi, G. (2015). Cellular and nephrotoxicity of selenium species. *J Trace Elem Med Biol.*, 30, 160-70.
- Nava-Hernández, M.P., Hauad-Marroquín, L.A., Bassol-Mayagoitia, S., García-Arenas, G., Mercado-Hernández, R., Echávarri-Guzmán, M.A. y Cerda-Flores, R.M. (2009). Lead-, cadmium-, and arsenic-induced DNA damage in rat germinal cells. *DNA Cell Biol.*, 28(5), 241-8.
- Nava-Ruiz, C., Méndez-Armenta, M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch Neurocién*, 16(3), 140-147.
- Neckers, L., Kern, A. y Tsutsumi, S. (2007). Hsp90 inhibitors disrupt mitochondrial homeostasis in cancer cells. *Chem Biol.*, 14(11), 1204-6.
- Newton, A. (2008). Overheating Antarctica. *Geophysical Research Letters*, 35, L07502.

## REFERENCIAS

---

NRC (2007). Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. The National Academies Press, Washington. pp. 216.

Nocentini, S. (1987). Inhibition of DNA replication and repair by cadmium in mammalian cells. Protective interaction of zinc. *Nucleic Acids Res.*, 15(10), 4211-25.

Norheim, G. (1987). Levels and interactions of heavy metals in sea birds from Svalbard and the Antarctic. *Environmental Pollution*, 47, 83-94.

Norton, F. (2000). Dye exclusion viability assays using a hemacytometer. *Tech Note: Nalge Nunc International Corp.*, 3(25), 67-68.

O'Brien, T.J., Ceryak, S. y Patierno, S.R. (2003). Complexities of chromium carcinogenesis: Role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res.*, 533, 3–36.

O'Flaherty, E.J. (1998). Physiologically based models of metal kinetics. *Critical Reviews in Toxicology*, 28, 271-317.

Obe, G., Beek, B. y Dudin, G. (1975). Proceedings: Some experiments on the action of lead acetate on human leukocytes *in vitro*. *Mutat Res.*, 29(2), 283.

Oberdörster, G. (1988). Lung clearance of inhaled insoluble and soluble particles. *Journal of Aerosol Medicine*, 1, 289-330.

Oberto, A., Marks, N., Evans, H.L. y Guidotti, A. (1996). Lead (Pb+2) promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implications. *J Pharmacol Exp Ther.*, 279(1), 435-42.

Odewumi, C.O., Latinwo, L.M., Ruden, M.L., Badisa, V.L., Fils-Aime, S. y Badisa, R.B. (2015). Modulation of cytokines and chemokines expression by NAC in cadmium chloride treated human lung cells. *Environ Toxicol.* doi: 10.1002/tox.22165.

Oh, S., Lee, B. y Lim, S. (2004). Cadmium induces apoptotic cell death in WI 38 cells via caspase-dependent Bid cleavage and calpain-mediated mitochondrial Bax cleavage by Bcl-2-independent pathway. *Biochemical Pharmacology*, 68, 1845–1855.

Oh, S.H. y Lim, S.C. (2006). A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 212, 212–223.

- Ohtsubo, M., Theodoras, A.M., Schumacher, J., Roberts, J.M. y Pagano, M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell Biol.*, 15, 2612-2624.
- Olabarrieta, I., L'Azou, B., Yuric, S., Cambar, J. y Cajaraville, M.P. (2001). *In vitro* effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicology in Vitro*, 15, 511–517.
- Oliver, T. (1914). *Lead poisoning: from the industrial, medical and social points of view*. London: H.K. Lewis, pp. 1-294.
- Ord, M.J., Bouffler, S.D. y Chibber, R. (1988). Cadmium induced changes in cell organelles: an ultrastructural study using cadmium sensitive and resistant muntjac fibroblast cell lines. *Arch Toxicol.*, 62(2-3), 133-45.
- Ormerod, M.G. (1990). Analysis of DNA: 4A. General methods. En: *Flow Cytometry, a practical approach*. Oxford: IRL Press, Oxford University Press.
- Palomino, J.C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J. y Portaels F. (2002). Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.*, 46(8), 2720-2722.
- Pae, H.O., Oh, G.S., Choi, B.M., Seo, E.A., Oh, H., Shin, M.K., Kim, T.H., Kwom, T.O. y Chung, H.T. (2003). Induction of apoptosis by 4-acetyl-12,13-epoxyl-9- trichothecene-3,15-diol from *Isaria japonica* Yasuda through intracellular reactive oxygen species formation and caspase-3 activation in human leukaemia HL-60 cells. *Toxicology In Vitro*, 17, 49–57.
- Park, D.J. y Patek, P.Q. (1998). Detergent and enzyme treatment of apoptotic cells for the observation of DNA fragmentation. *Biotechniques*, 24, 558-60.
- Pathak, N. y Khandelwal, S. (2006). Oxidative stress and apoptotic changes in murine splenocytes exposed to cadmium. *Toxicology.*, 220(1), 26-36.
- Paton, G.R. y Allison, A.C.. (1972). Chromosome damage in human cell cultures induced by metal salts. *Mutat Res.*, 16(3), 332-6.
- Patrick, L. (2006). Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern. Med. Rev.*, 11, 114–127.

## REFERENCIAS

---

- Payette, Y., Lachapelle, M., Daniel, C., Bernier, J., Fournier, M. y Krzystyniak, K. (1995). Decreased interleukin-2 receptor and cell cycle changes in murine lymphocytes exposed *in vitro* to low doses of cadmium chloride. *Int J Immunopharmacol.*, 17(3), 235-46.
- Peng, S.Y., Chou, S.P. y Hsu, H.C. (1998). Association of downregulation of cyclin D1 and of overexpression of cyclin E with p53 mutation, high tumor grade and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 29, 281-289.
- Penugonda, S., Mare, S., Lutz, P., Banks, W.A. y Ercal, N. (2006). Potentiation of lead-induced cell death in PC12 cells by glutamate: protection by N-acetylcysteine amide (NACA), a novel thiol antioxidant. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 216(2), 197-205.
- Peraza, M.A., Carter, D.E. y Gandolfi, A.J. (2003). Toxicity and metabolism of subcytotoxic inorganic arsenic in human renal proximal tubule epithelial cells (HK-2). *Cell Biol Toxicol.*, 19(4), 253-64.
- Pérez, C.C., Díez, I. y García, P. (1999). *Introducción a la experimentación y protección animal*. León: Universidad de León.
- Peropadre, A. (2014). Tesis doctoral. Estudio *in vitro* de las respuestas celulares asociadas con la exposición a contaminantes emergentes. Universidad Autónoma de Madrid.
- Pertierra, L. R. y Hughes, K. A. (2013). Management of Antarctic Specially Protected Areas: Permitting, visitation, and information exchange practices. *Antarctic Science* 25(4), 553-564.
- Pfaller, W., Gstraunthaler, G. y Willinger, C.C. (1990). Morphology of renal tubular damage from nephrotoxins. *Toxicol Lett.*, 53(1-2), 39-43.
- Pines J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Adv. Cancer. Res.*, 66, 181-212.
- Poblet, A., Andrade, S., Scagliola, M., Vodopivec, C., Curtosi, A., Pucci, A. y Marcovecchio, J. (1997). The use of epilithic Antarctic lichens (*Usnea aurantiacoatra* and *U. antarctica*) to determine deposition patterns of heavy metals in the Shetland Islands, Antarctica. *Science of the Total Environment*, 207, 187-194.



- Pourahmad, J., O'Brien, P.J., Jokar, F. y Daraei, B. (2003). Carcinogenic metal induced sites of reactive oxygen species formation in hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 17, 803–810.
- Pozarowski, P., Grabarek, J. y Darzynkiewicz, Z. (2003). Flow cytometry of apoptosis. *Curr Protoc Cytom. Wiley Online Library*, 7(19).
- Plumb, J.A., Milroy, R. y Kaye, S.B. (1989). Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res*, 49(16), 4435-40.
- Price, D.J. y Joshi, J.G. (1983) Ferritin. Binding of beryllium and other divalent metal ions, *J. Biol. Chem.*, 258, 10873–10880.
- Pütz, K., Ingham, R.J., Smith, J.G. y Croxall, J.P. (2001). Population trends, breeding success and diet composition of gentoo *Pygoscelis papua*, magellanic *Spheniscus magellanicus* and rockhopper *Eudyptes chrysocome* penguins in the Falkland Islands. A review. *Polar Biology* 24, 793-807.
- Qian, S. Y. y Buettner, G. R. (1999). Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological and free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 1447–1456.
- Qu, W., Diwan, B.A., Liu, J., Goyer, R.A., Dawson, T., Horton, J.L., Cherian, M.G., Waalkes, M.P. (2002). The metallothionein-null phenotype is associated with heightened sensitivity to lead toxicity and an inability to form inclusion bodies. *Am J Pathol*, 160(3), 1047-56.
- Quintanar-Escorza, M.A., González-Martínez, M.T., del Pilar, I.O.y Calderón-Salinas, J.V. (2010). Oxidative damage increases intracellular free calcium [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> concentration in human erythrocytes incubated with lead. *Toxicol In Vitro*, 24(5), 1338-46.
- Rabinovitch, R. y June, C.H. (1991). Measurement of intracellular ionized and membrane potential. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L. New York: Wiley-Liss.
- Rajaram R., Nair, B.U. y Ramasami, T. (1995). Chromium(III) induced abnormalities in human lymphocyte cell proliferation: evidence for apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 210(2), 434-40.

## REFERENCIAS

---

Rathmell, J.C. y Thompson, C.B. (2002). Pathways of apoptotic in lymphocyte development, homeostasis and disease. *Cell.*, 109, 97-107.

Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Rehm, S. y Waalkes, M.P. (1990). Acute cadmium chloride-induced renal toxicity in the Syrian hamster. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 104(1), 94-105.

Reinecke, S.A., Helling, B., Reinecke, A.J.. (2002). Lysosomal response of earthworm (*Eisenia fetida*) coelomocytes to the fungicide copper oxychloride and relation to life-cycle parameters. *Environ Toxicol Chem.*, 21(5), 1026-31.

Repetto, M. (1995). *Toxicología Avanzada*. Madrid: Díaz Santos.

Repetto, G, del Peso, A., Salguero, M. y Repetto, M. (1999). Inventory of the Spanish Institutions and Scientists Involved in Alternatives to the use of Laboratory Animals (Refinement, Reduction or Replacement). *Revista de Toxicología*, 16, 50-127.

Repetto, M. y Sanz, P. (2008). Toxicología de los metales, en: Repetto, M. (Ed.). Postgrado en Toxicología. Ilustre Colegio Oficial de Químicos, Sevilla.

Repetto, G. y Repetto, M. (2009). *Toxicología Fundamental*. Madrid: Díaz de Santos.

Riberg, D. y Alexander, J. (1990). Mechanisms of chromium toxicity in mitochondria. *Chem. Biol Interactions*, 75, 141-151.

Riley, R.S. y Mahin, E.J. (1989). ASCP Workshop #9072. ASCP Weekend of Pathology. Seattle, Washington..

Rodilla, V., Miles, A.T., Jenner, W. y Hawksworth, G.M. (1998). Exposure of cultured human proximal tubular cells to cadmium, mercury, zinc and bismuth: toxicity and metallothionein induction. *Chem Biol Interact.*, 115(1), 71-83.

Rodrigue, J., Champoux, L., Leclair, D. y Duchesne, J.F. (2007). Cadmium concentrations in tissues of willow ptarmigan (*Lagopus lagopus*) and rock ptarmigan (*Lagopus muta*) in Nunavik, Northern Québec. *Environmental Pollution*, 147(3), 642-647.

Rodríguez, J., Hernández, M.D. y De Costa, J. (2001). *Introducción a la experimentación con animales*. Murcia: Universidad de Murcia.

Rodríguez L. (2012). Tesis doctoral. Evaluación de impactos humanos en ecosistemas terrestres antárticos. Un análisis de las presiones humanas y estrategias de gestión en las zonas libres de hielo de la Antártida Marítima. Departamento Interuniversitario de Ecología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.

Roels, H., Buchet, J.P. y Lauwerys, R. (1974). Comparative study of the labilization of lysosomes, peroxysomes and mitochondria by inorganic mercury *in vitro*. In: Reid, E. (Ed.), *Methodological Developments in Biochemistry, Subcellular Studies*, vol. 4. London: Longman.

Röhr, G. y Bauchinger, M. (1976). Chromosome analyses in cell cultures of the Chinese hamster after application of cadmiumsulphate. *Mutat Res.*, 40(2), 125-30.

Rolón, M., Vega, C., Escario, J.A. y Gómez-Barrio, A. (2006). Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Tripanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res.*, 99(2), 103-107.

Romano, B., Plano, D., Encío, I., Palop, J.A. y Sanmartí, C. (2015). *In vitro* radical scavenging and cytotoxic activities of novel hybrid Selenocarbamates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23, 1716–1727.

Rombolá, E., Marschoff, E. y Coria, N., (2004). *Comparación de la dieta y éxito reproductivo del pingüino barbijo (Pygoscelis antarctica) durante dos temporadas reproductivas consecutivas en la isla Laurie, Orcadas del Sur*. Actas del V Simposio Argentino y I Latinoamericano sobre Investigaciones Antárticas, Buenos Aires.

Romero, D. (1998). Tesis doctoral: Evaluación de la toxicidad y de los efectos tóxicos de la exposición subletal a metales pesados sobre líneas celulares de origen renal. Murcia: Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria, Departamento de Ciencias Sociosanitarias.

Romero, D., Gómez-Zapata, M., Luna, A. y García-Fernández, A.J. (2003). Morphological characterisation of BGM (Buffalo Green Monkey) cell line exposed to low doses of cadmium chloride. *Toxicology in Vitro*, 17, 293–299.

Romero, D., Gómez-Zapata, M., Luna, A. y García-Fernández, A.J. (2004a). Morphological characterization of renal cell lines (BGM and VERO) exposed to low doses of lead nitrate. *Histol Histopathol.*, 19(1), 69-76.

## REFERENCIAS

---

- Romero, D., Gómez-Zapata, M., Luna, A. y García-Fernández, A.J. (2004b). Comparison of cytopathological changes induced by mercury chloride exposure in renal cell lines (VERO and BGM). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17, 129–141.
- Romero ,D., Hernández-García, A., Tagliati, C.A., Martínez-López, E. y García-Fernández, A.J. (2009). Cadmium- and lead-induced apoptosis in mallard erythrocytes (*Anas platyrhynchos*). *Ecotoxicol Environ Saf.*, 72(1), 37-44.
- Rooprai, H.K., Kyriazis, I., Nuttall, R.K., Edwards D.R., Zicha, D., Aubyn, D., Davies, D., Gullan, and R. y Pilkington, G.J. (2007). Inhibition of invasion and induction of apoptosis by selenium in human malignant brain tumour cells *in vitro*. *Int J Oncol.*, 30(5), 1263-71.
- Russell, W.M.S. y Burch, R.L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. London UK: Methuen.
- Rybczynska M. (1994). Biochemical aspects of free radical mediated tissue injury. *Postepy Hig Med Dows*, 48(4), 419-41.
- Sabaliauskas, V., Juciute, R., Bukelskiene, V., Rutkunas, V. Trumpaite-Vanagiene, R. y Puriene, A. (2011). *In vitro* evaluation of cytotoxicity of permanent prosthetic Materials. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, 13, 75-80.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande, W., Van Gorp, M., Van Loo, G. y Vandenamee, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23, 2861-2874.
- Saïdi, S.A., Azaza, M.S., Windmolders, P., van Pelt, J. Y El-Fek, A. (2013). Cytotoxicity evaluation and antioxidant enzyme expression related to heavy metals found in tuna by-productsmeal: An *in vitro* study in human and rat liver cell lines. *Exp Toxicol Pathol.*, 65(7-8), 1025-33.
- Sánchez-Hernández, J.C. (2000). Trace element contamination in Antarctic ecosystems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 166, 82-127.
- Sasaki, D.T., Dumas, S.E., Englemann. (1987). Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. *Cytometry*, 8, 413-420.

- Schreck, R., Rieber, P. y Baeuerle, P. A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.*, 10, 2247–2258.
- Schedle, A., Samorapoompichit, P., Rausch-Fan, X.H., Franz, A., Füreder, W., Sperr, W.R., Sperr, W., Ellinger, A., Slavicek, R., Boltz-Nitulescu, G. y Valent, P.J. (1995). Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations. *Dent Res.*, 74(8), 1513-20.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. y Meter, M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.*, 254, 439-459.
- Schwartzman, R.A. y Cidlowski, J.A. (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Society*, 14(2), 133-51.
- Searle, J., Kerr, J.F.R. y Bishop, C.J. (1982). Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.*, 17, 229-259.
- Seibert H, Balls M, Fentem JH, Bianchi V., Clothier RH, Dierickx PJ, Ekwall B, Garle MJ, Gómez-Lechon MJ, Gribaldo L et al. (1996) Acute Toxicity Testing *In Vitro* and the Classification and Labelling of Chemicals. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 16. *Altern. to Lab. Anim. ATLA*, 24, 499–510.
- Segner, H. (1998). Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. *EXS.*, 86, 1-38.
- Shackney, S.E., Burholt, D.R., Pollice, A.A., Smith, C.A., Pugh, R.P. y Hartsock, R.J. (1990). Discrepancies between flow cytometric and cytogenetic studies in the detection of aneuploidy in human solid tumors. *Cytometry*, 11, 94-104.
- Shamberger RJ. (1985). The genotoxicity of selenium. *Mutat Res.*, 154(1), 29-48. Review.
- Shapiro, H.M. (1988). *Practical Flow Cytometry*. Nueva York: Alan R. Liss, Inc.
- Shen, H.M., Yang, C.F., Liu, J. y Ong, C.N. (2000). Dual role of glutathione in selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 1115–1124.
- Shevtsov, M. y Multhoff, G. (2016). Heat shock protein peptide and HSP based immunotherapies for the treatment of cancer. *Frontiers in immunology.*, 7, 171.

## REFERENCIAS

---

- Shi, X.L. y Dalal, N.S. (1992). The role of superoxide radical in chromium (VI)-generated hydroxyl radical: the Cr(VI) Haber-Weiss cycle. *Arch Biochem Biophys.*, 292(1), 323-7.
- Silbergeld, E.K., Waalkes, M. y Rice, J.M. (2000). Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *Am J Ind Med*, 38(3), 316-23. Review.
- Silveira, L.R., Pereira-da-Silva, L., Juel, C. y Hellstein, Y. (2003). Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. *Free Radic Biol Med.*, 35, 455–64.
- Singh, J., Pritchard, D.E., Carlisle, D.L., Mclean, J.A., Montaser, A., Orenstein, J.M. y Patierno, S.R. (1999). Internalization of carcinogenic lead chromate particles by cultured normal human lung epithelial cells: formation of intracellular lead-inclusion bodies and induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 161(3), 240-8.
- Sinha, K., Pal, P.B. y Sil, P.C. (2014). Cadmium (Cd<sup>2+</sup>) exposure differentially elicits both cell proliferation and cell death related responses in SK-RC-45. *Toxicology in Vitro* 28, 307–318.
- Skipper, A., Sims, J.N., Yedjou, C.G. y Tchounwou, P.B. (2016). Cadmium Chloride Induces DNA Damage and Apoptosis of Human Liver Carcinoma Cells via Oxidative Stress. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13, 88.
- Skreb, Y. y Fischer, A.B. (1984). Toxicity of nickel for mammalian cells in culture. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B.*, 178(5-6), 432-45.
- Sladen, W.J.L., Menzie, C.M. y Reichel, W.L. (1963). DDT residues in Adélie penguins and a crabeater seal from Antarctica. *Nature*, 210, 670-673.
- Smichowski, P., Vodopivec, C., Muñoz-Olivas, R. y Gutierrez, A.M. (2006). Monitoring trace elements in selected organs of Antarctic penguin (*Pygoscelis adeliae*) by plasma-based techniques. *Microchemical Journey*, 82, 1-7.
- Smith, R.I.L. y Simpson, H.W. (1987). Early nineteenth century sealer refuges on Livingston Island, South Shetland Islands. *British Antarctic Bulletin*, 74, 49-72.
- Son, Y.O., Hitron, J.A., Wang, X., Chang, Q., Pan, J., Zhang, Z., Liu, J., Wang, S., Lee, J.C. y Shi, X. (2010). Cr(VI) induces mitochondrial-mediated and caspase-dependent apoptosis through reactive oxygen species-mediated p53 activation in JB6 Cl41 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 245(2), 226-35.

- Song, N.H. y Koh, J.W. (2012). Effects of cadmium chloride on the cultured human lens epithelial Cells. *Molecular Vision*, 18, 983-988.
- Soria, M.L., Repetto, G., Repetto, M., (1995). Revisión general de la toxicología de los metales, en: Repetto, M. (Ed.). *Toxicología Avanzada*. Díaz de Santos, Madrid, pp. 293-358.
- Spallholz, J.E. (1994). On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 17, 45–64.
- Spallholz, J.E. y Hoffman, D.J. (2002). Selenium toxicity: cause and effects in aquatic birds. *Aquatic Toxicology*, 57, 27-37.
- Spallholz, J.E., Palace, V.P. y Reid, T.W. (2004). Methioninase and selenomethionine but not Se-methylselenocysteine generate methylselenol and superoxide in an *in vitro* chemiluminescent assay: Implications for the nutritional carcinostatic activity of selenoamino acids. *Biochem. Pharmacol.* 67, 547–554.
- Steig, E.J., Schneider, D.P., Rutherford, S.D., Mann, M.E., Comiso, J.C. y Shindell, D.T. (2009). Warming of the Antarctic ice-sheet surface since the 1957 International Geophysical Year. *Nature*, 457, 459-462.
- Stewart, M., Neldner, K., Spallholz, J. y Pence, B. (1999). Selenite, selenocystamine, and selenomethionine have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis in mouse keratinocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 42–48.
- Stohs, S.J., and Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.*, 18(2), 321-36.
- Stout, J.H., Trust, K.A., Cochrane, J.K., Suydam, R.S. y Quakenbush, L.T. (2002). Environmental contaminants in four eider species from Alaska and arctic Russia. *Environmental Pollution* 119(2), 215-226.
- Strange, R., Li, F., Saurer, S., Burkhardt, A. y Friis, R.R. (1992). Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development*, 115(1), 49-58.
- Su, P., Zhang, J., Wang, S., Aschner, M., Cao, Z. y Zhao, F. (2016). Genistein alleviates lead-induced neurotoxicity *in vitro* and *in vivo*: Involvement of multiple signaling pathways. *Neurotoxicology*, 53, 153-164.

## REFERENCIAS

---

Sun, L. y Xie, Z. (2001). Changes in lead concentration in Antarctic penguin droppings during the past 3,000 years. *Environmental Geology*, 40, 1205-1208.

Suzuki A, Tsutomi Y, Yamamoto N, Shibutani T, Akahane K. (1999). Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. *Mol Cell Biol.*, 19(5), 3842-7.

Szabo, A. G., 2000. Fluorescence principles and measurement. En: Hercules, D. (Ed.), *Fluorescence and phosphorescence analysis principles and applications*. USA: Interscience Publ., 33-67.

Szefer, P., Pempkowiak, J., Skwarzee, B., Bojanowski, R. y Holm, E. (1993). Concentration of selected metals in penguins and other representative fauna in the Antarctica. *Science of Total Environment*, 138, 281-288.

Tang, H.W., Yan, H.L., Hu, X.H., Liang, Y.X. y Shen, X.Y. (1996). Lead cytotoxicity in primary cultured rat astrocytes and Schwann cells. *J Appl Toxicol.*, 16(3), 187-96.

Tapiero, H., Townsend, D.M. y Tew, K.D. (2003). The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother.*, 57(3-4), 134-44.

Tarpey, M.M., Wink, D.A., y Grisham, M.B. (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *Am J Physiol, Regul Integr Comp.*, 286, R431-44.

Telford, W.G., King LE y Fraker, P.J. (1991). Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. *Cell Prolif.*, 24(5), 447-59.

Thévenod F. (2003). Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol.*, 93(4), 87-93. Review.

Thornalley, P.J., and Vasak, M. (1985). Possible role of metallothionein in protection against radiation induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 827, 36-44.

Thornberry, N.A. y Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies within. *Science*, 281, 1312-1316.

Tin, T., Fleming, Z.L., Hughes, K.A., Ainley, D.G, Convey, P., Moreno, C.A., Pfeiffer, S., Scott, J. y Snape, I. (2009). Impacts of local human activities on the Antarctic environment. *Antarctic Science*, 21, 3-33.



Tiwari, S., Thakur, R., and Shankar, J. (2015). Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi. *Biotechnology Research International*. 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/132635>. Review.

Tratado Antártico. Disponible en: <http://ats.aq> (último acceso: Junio, 2016).

Trump, B.F., Berezsky, I.K., Chang, S.H. y Phelps, P.C. (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol.*, 25(1), 82-8.

Turner, J, Colwell, S.R., Marshall, G.J., Lachlan-Cope, T.A., Carleton, A.M., Jones, P.D., Lagun, V., Reid, P.A. y Lagovkina, S. (2005) Antarctic climate change during the last 50 years. *Int. J. Climatol.* 25, 279–294.

Turner, J., Bindshadler, R. A., Convey, P., Di Prisco, G., Fahrbach, E., Gutt, J., Hodgson, D. A., Mayewski, P. A. y Summerhayes, C. P. (2009). *Antarctic Climate Change and the Environment*. Cambridge: Scientific Committee on Antarctic Research.

Uchida, N., Ohyama, K., Besso, T., Yuan, B. y Yamakawa, T. (2002). Apoptosis in cultured Human fetal membrane cell. Infected with influenza virus. *Biol. and Pharma.*, 25, 109-110.

Umeda, M. y Nishimura, M.. (1979). Inducibility of chromosomal aberrations by metal compounds in cultured mammalian cells. *Mutat Res.*, 67(3), 221-9.

Underwood, E.J., Patty, P.C. y Robertson, W.B. (1977). Evidence of heavy metal accumulation in sooty terns. *Science of the Total Environment*, 14, 147-152.

UNEP (2002). Regionally based assessment of persistent toxic substances - Antarctica. United Nations Environment Programme, Global Environment Facility, Chatelaine, Geneva.

Uroz, V., Anadón, M.J. y Capó, M. (2008). Estudio comparativo de la toxicidad del metilmercurio, cadmio (II) y cromo (VI) en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de rata. *Rev. Toxicol.*, 25, 56-60.

Valko, M., Rhodes C.J., Moncol, J., Izakovic, M. y Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cáncer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1–40.

Valdivia-Infantas, M.M. (2005). Intoxicación por plomo. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 18, 22-27.

## REFERENCIAS

---

Van Cruchten S, Van Den Broeck W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol.*, 31(4), 214-23. Review.

Van den Heuvel S. (2005). Cell-cycle regulation. *Wormbook.*, 21, 1-16.

Van Engeland, M., Ramaekers, F.C., Schutte, B. y Reutelingsperger, C.P. (1996). A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry.* 1, 24(2), 131-9.

Vance, G.F., See, R.B. y Reddy, K.J. (1998). *Environmental Chemistry of Selenium*. New York: Marcel Dekker.

Vanesa U. (2009). Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis en opción de grado Científico de Doctor en Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona, España, ISBN B.21912-2009 / 978-84-692- 2226-3, 54-55.

Vasant, C., Rajaram, R. y Ramasami, T. (2003). Apoptosis of lymphocytes induced by chromium(VI/V) is through ROS-mediated activation of Src-family kinases and caspase-3. *Free Radic Biol Med.*, 35(9), 1082-100.

Vaughan, D.G., Marshall, G.L., Connolley, W.L., Parkinson, C., Mulvaney, R., Hodgson, D.A., King, J.C., Pudsey, C.J. y Turner, J. (2003). Recent rapid regional climate warming on the Antarctic Peninsula. *Climatic Change*, 60, 243-274.

Vera-Sempere, G. y Climent-Díaz, B. (2004). Intoxicaciones por metales pesados, en: Bataller, R., Balaguer-Martínez, J.V. (Eds.). *Toxicología clínica*. Universitat de Valencia, Valencia, pp. 171-192.

Vermes, I., Haanen. C., Steffens-Nakken. H. y Reutelingsperger. C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Elsevier, Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39-51.

Viarengo, A.S. y Nicotera, P. (1991). Possible role of Ca<sup>2+</sup> in the heavy metal cytotoxicity. *Comp Biochem Physiol*, 100, 81-4.

Vicencio, J., Galluzzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., Criollo A., Tasdemir, E., Morselli, E., Younes, A., Maiuri, M., Lavandro, S. y Kroemer, G. (2008). Senescence, Apoptosis or Autophagy? *Gerontology*, 54, 92-99.

- Vicente-Ortega, V., Martínez-García, A.F., Cremades-Campos, A., Rodríguez-Vicente, J., Calderón-Rubiales, F. y Martínez-Díaz, F. (1996). Ultrastructural investigation of lead-induced intranuclear inclusion bodies in mice. *Ultrastruct Pathol.*, 20(3), 263-73.
- Vick, U., Cavalli, F., Isaacson, P.G., Gascoyne, R.D., y Zucca, E. (2003). MALT Lymphomas. *Hematology*, 1, 241-258.
- Vitale, M., Manzoli, L., Maraldi, N.M. y Papa, S. (1990). Chromosome karyotyping in flow. En: Reunión Internacional de Citometría. Libro de Ponencias y Comunicaciones. Salamanca, 1990.
- Vodopivec, C. y Curtosi, A. (1998). Trace metals in some invertebrates, fishes and birds from Potter Cove, en: Wiencke, C., Ferreyra, G., Arntz, W., Rinaldi, C. (Eds.). *The Potter Cove Coastal Ecosystem, Antarctica*. Ber Polarforsch, Bremerhaven, 296-303.
- Waalkes, M.P., Liu, J., Goyer, R.A. y Diwan, B.A. (2004). Metallothionein-I/II double knockout mice are hypersensitive to lead-induced kidney carcinogenesis: role of inclusion body formation. *Cancer Res*, 64(21), 7766-72.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. y Beyersmann, D., (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192, 95-117.
- Walker, D.H. y Maller, J.L. (1991). Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature*, 354, 314-317.
- Walrand, S., Valeix, S., Rodriguez, C., Ligot, P., Chassagne, J. y Vasson, M.P. (2003). Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta.*, 331, 103– 10.
- Walsh, P. (1990). The use of seabirds as monitors of heavy metals in the marine environment, en: Furness, R., Rainbow, P. (Eds.). *Heavy Metals in the Marine Environment*. CRC, Boca Raton, FL, 183-204.
- Walsh, G.M., Dewson, G., Wardlaw, A.J., Levi-Schaffer, F. y Moqbel, R. (1998). A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils. *J Immunol Methods.*, 217(1-2), 153-63.
- Walum, E. (1998). Acute oral toxicity. *Environ Health Perspect*, 106(2), 497–503.
- Wang, M.Ch., Peng, S.Q., Zhou, Q., Wang, M.W., Yang, C.H., Yang, H.Y. y Wang, G.Q. (2006). Depletion of intracellular glutathione mediates butenolide-induced cytotoxicity in HepG2 cells. *Toxicology Letters*, 164, 231–238.

## REFERENCIAS

---

- Wang, H. y Joseph, J.A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.*, 27, 612–6.
- Ware, R.A., Burkholder, P.H. y Chang, L.W. (1975). Ultrastructural changes in renal proximal tubules after chronic organic and inorganic mercury intoxication. *Environ. Res.* 10, 121–140.
- Watanabe, M., Henmi, K., Ogawa, K. y Suzuki, T. (2003). Cadmium dependent generation of reactive oxygen species and mitochondrial DNA breaks in photosynthetic and non-photosynthetic strains of *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 134, 227–234.
- Watjen, W. y Beyersmann, D. (2004). Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals* 17, 65–78.
- Wei, Y., Cao, X., Ou, Y., Lu, J., Xing, C. y Zheng, R. (2001). SeO(2) induces apoptosis with down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of P53 expression in both immortal human hepatic cell line and hepatoma cell line. *Mutat Res.*, 490(2), 113-21.
- Weil, M., Jacobson, M.D., Coles, H.S.R., Davies, T.J., Gardner, R.L., Raff, K.D. and Raff, M.C. (1996) Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J. Cell Biol.*, 133, 1053–1059.
- Weiller, M., Latta, M., Kresse, M., Lucas, R. y Wendel, A. (2004). Toxicity of nutritionally available selenium compounds in primary and transformed hepatocytes. *Toxicology*, 201, 21–30.
- Whanger, P.D. (2002). Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *Journal of the American College of Nutrition*, 21, 223-232.
- WHO (2011). Selenium in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.
- Wielgus-Serafińska, E., Zawadzka, A. y Falkus, B. (1980). The effect of lead acetate on rat liver mitochondria. *Acta Physiol Pol.*, 31(6), 659-68.
- Williams, T. y Rodwell, S., (1992). Annual variation in return rate, mate and nest-site fidelity in breeding gentoo and macaroni penguins. *The Condor*, 92, 636-645.
- Williams, T. (1995). *The Penguins*. Oxford: Oxford University Press.

- Wise, J.P., Wise, S. y Little, J.E. (2002). The cytotoxicity and genotoxicity of particulate and soluble hexavalent chromium in human lung cells. *Mutation Research*, 517, 221–229.
- Wyllie, A.H. (1981). *Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis in Bowen. Lockshin. Cell death in biology and pathology*. London: Edt. Chapman and Hall. 9-34.
- Xiao, H.J., Huang, C.Y., Wang, H.Y. y Li, M. (2008). Effect of selenium and zinc on the proliferation of human esophageal cancer Eca109 cell line *in vitro*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.*, 28(12), 2117-20.
- Xie, J. y Shaikh, Z.A. (2006). Cadmium induces cell cycle arrest in rat kidney epithelial cells in G2/M phase. *Toxicology*, 224(1-2), 56-65.
- Xie, Z., Zhang, Y., Li, A., Li, P., Ji, W. y Huang D. (2010). Cd-induced apoptosis was mediated by the release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular Ca storage. *Toxicol Lett.*, 192(2), 115-118.
- Xu, H., Feng, Z. y Yi, C. (1991). Free radical mechanism of the toxicity of selenium compounds. *Huzahong Longong Daxue Xuebao*, 19, 13–19.
- Xu, J., Bublely, G.J., Detrick, B., Blankenship, L.J.y Patierno, S.R. (1996). Chromium(VI) treatment of normal human lung cells results in guanine-specific DNA polymerase arrest, DNA-DNA cross-links and S-phase blockade of cell cycle. *Carcinogenesis.*, 17(7), 1511-7.
- Yamamoto, A., Honma, R. y Sumita, M. (1998). Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res.*, 39(2), 331-40.
- Yang, C., Shen, H., Shen, Y., Zhuang, Z., Ong, C., Wanga, D., Chena, J. y Luoa, W. (1997). Cadmium-induced Oxidative Cellular Damage in Human Fetal Lung Fibroblasts (MRC-5 Cells). *Environmental Health Perspectives*, 105, 712-716.
- Yang, P.M., Chiu, S.J., Lin, K.A. y Lin, L.Y. (2004). Effect of cadmium on cell cycle progression in Chinese hamster ovary cells. *Chem Biol Interact.*, 149(2-3), 125-36.
- Youle, R.J. y Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 9(1), 47-59.

## REFERENCIAS

---

- Yu, M.H. (2001). *Environmental Toxicology: Impacts of Environmental Toxicants on Living Systems*. Lewis, Washington, DC.
- Zhang, Z., Leonard, S.S., Wang, S., Vallyathan, V., Castranova, V. y Shi, X. (2001). Cr (VI) induces cell growth arrest through hydrogen peroxide-mediated reactions. *Mol Cell Biochem.*, 222(1-2), 77-83.
- Zhang, J. y Xu., M. (2002). Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. *Trend Cell Biol.*, 12, 84-89.
- Zhang, H., Du, G., Zhang, J. (2004). Assay of mitochondrial functions by resazurin *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin.* 25(3), 385-389.
- Zhang, L., Mu, X., Fu, J. y Zhou, Z. (2007). *In vitro* cytotoxicity assay with selected chemicals using human cells to predict target-organ toxicity of liver and kidney. *Toxicology in Vitro*, 21, 734–740.
- Zhang, T., Hu, Y., Tang, M., Kong, L., Ying, J., Wu, T., Xue, Y. y Pu, Y. (2015). Liver Toxicity of Cadmium Telluride Quantum Dots (CdTe QDs) Due to Oxidative Stress *In Vitro* and *in Vivo*. *Int J Mol Sci.*, 16(10), 23279-99.
- Zhitkovich, A., Quievryn, G., Messer, J. y Motylevich, Z. (2002). Reductive activation with cysteine represents a chromium(III)-dependent pathway in the induction of genotoxicity by carcinogenic chromium(VI). *Environ Health Perspect.*, 5, 729-31.
- Zhitkovich, A. (2005). Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium(VI). *Chem Res Toxicol.*, 18, 3–11.
- Zhivotovsky, B. y Orrenius, S. (2001). Current Concepts in Cell Death. En: Wiley, J. & Sons (eds). *Current Protocols in Cell Biology*. USA: Wiley InterScience. 18.1.1-18.1.18.
- Zhou, F., Chen, Y., Fan, G., Feng, C., Du, G., Zhu, G., Li, Y., Jiao, H., Guan, L. y Wang, Z. Lead-induced iron overload and attenuated effects of ferroportin 1 overexpression in PC12 cells. *Toxicol In Vitro.*, 28(8), 1339-48.
- Zhu, Q.L., Luo, Z., Zhuo, M.Q., Tan, X.Y., Zheng, J.L., Chen, Q.L. y Hu, W. (2014). *In Vitro* Effects of Selenium on Copper-Induced Changes in Lipid Metabolism of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) Hepatocytes. *Arch Environ Contam Toxicol*, 67, 252–260.

---

Zielonka, J. y Kalyanaraman, B. (2008). "ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis"--a critical commentary. *Free Radic Biol Med.*, 45(9), 1217-9.

Zimmerhackl, L.B., Momm, F., Wiegele, G. y Brandis, M. (1998). Cadmium is more toxic to LLC-PK1 cells than to MDCK cells acting on the cadherin-catenin complex. *Am J Physiol.*, 275(1 Pt 2), F143-53.

Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R. y Thompson, C.B. (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.*, 15(12), 1481-6.

Zúñiga, J.M., Orellana, J.M. y Tur, J.A. (2008). *Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio*. Madrid: Universidad de Alcalá de Henares.

