



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

RESPUESTA ANTIOXIDANTE A LA EXPOSICIÓN A  
CADMIO EN MIOBLASTOS DE MAMÍFEROS  
MARINOS Y MAMÍFEROS TERRESTRES

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
( Orientación Biología Marina )

Presenta

**Adriana Citlalli del Águila Vargas**

La Paz, Baja California Sur, Abril de 2017

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9:00 horas del día 5 del Mes de ABRIL del 2017, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Respuesta antioxidante a la exposición a cadmio en mioblastos de mamíferos marinos y mamíferos terrestres "**

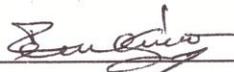
Presentada por el alumno:

**Adriana Citlalli del Águila Vargas**

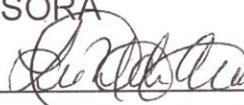
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biología Marina**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

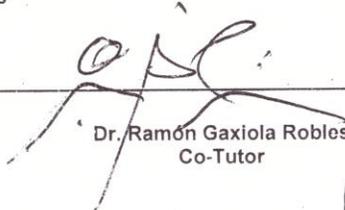
### LA COMISIÓN REVISORA



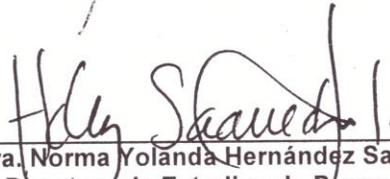
Dra. Tania Zepteno Savin  
Director de Tesis



Dra. Lta-Celina Mendéz Rodríguez  
Co-Tutor



Dr. Ramón Gaxiola Robles  
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

# **CONFORMACIÓN DE COMITÉS**

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **Director de tesis**

Dra. Tania Zenteno Savín  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

### **Co-tutores**

Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Ramón Gaxiola-Robles  
Instituto Mexicano del Seguro Social

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dra. Tania Zenteno Savín

Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez

Dr. Ramón Gaxiola-Robles

## **JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Dra. Tania Zenteno Savín

Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez

Dr. Ramón Gaxiola-Robles

## **SUPLENTES**

Dr. Juan Antonio De Anda Montañez

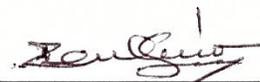
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez

## Resumen

El cadmio (Cd) es un metal de transición que está presente en el ambiente de manera natural, sin embargo, su concentración se incrementa como resultado de actividades antropogénicas. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer lo ha clasificado como un elemento potencialmente carcinógeno debido a que puede tener efectos tóxicos en mamíferos. El Cd interfiere con los mecanismos de defensa antioxidantes y estimula la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), que pueden actuar como moléculas de señalización en la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y otras actividades celulares. Uno de los sistemas de defensa que contribuyen a contrarrestar la toxicidad del Cd y la producción de ERO son los antioxidantes; particularmente los involucrados en el ciclo redox del glutatión, dentro de los que se incluyen: glutatión reducido (GSH), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST). Los mamíferos marinos, como el elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*), toleran períodos prolongados de hipoxia asociados al cese de la respiración durante sus inmersiones sin evidencia de daño oxidativo en los tejidos, como se esperaría en mamíferos terrestres expuestos a condiciones similares; esto es debido a la presencia de mayores niveles de antioxidantes en tejidos de mamíferos marinos en comparación con los de mamíferos terrestres. Con el objetivo de evaluar y comparar la respuesta antioxidante en mioblastos de mamíferos marinos y mamíferos terrestres bajo condiciones de cultivo celular ante la exposición a Cd, se realizaron cultivos primarios de mioblastos a partir de muestras de músculo de elefante marino del norte y de humano, y fueron expuestos a diferentes concentraciones de cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ , 0-5 $\mu\text{M}$ ) durante diferentes tiempos (1-6 h). Se midió la actividad de las enzimas antioxidantes GST, GPx, GR, purina nucleósido fosforilasa (PNP) y la concentración de GSH, como defensas antioxidantes; el daño oxidativo se midió a partir de la tasa de GSH oxidado:reducido (GSSG:GSH-Eq) y de los niveles de carbonilos proteicos. Los resultados indican que la actividad de las enzimas responsables del ciclo del glutatión difiere entre especies, y sugieren que los mioblastos de humano son más sensibles a la exposición a Cd que los de elefante marino del norte, probablemente debido a los mayores niveles de antioxidantes que éstos presentan.

**Palabras clave:** *Cadmio, cultivo celular, estrés oxidativo*

Vo.Bo.



---

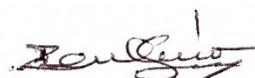
Dra. Tania Zenteno Savín.  
Director de tesis

## Summary

Cadmium (Cd) is a transition metal found naturally in the environment; however, as a result of anthropogenic activities its concentration has increased. The International Agency for Research on Cancer considers it as a potential carcinogen due its toxic effects. Cd interferes with antioxidant defense mechanisms and stimulates the production of reactive oxygen species (ROS), which may act as signaling molecules in cell proliferation, differentiation, apoptosis and other cellular activities. Among the defense systems against Cd toxicity and ROS are antioxidants; particularly those involved in the glutathione redox cycle, including reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST). Marine mammals, such as northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*) tolerate prolonged periods of hypoxia associated with breath-hold diving, without showing evidence of the oxidative damage in tissues expected in terrestrial mammals; this is due to antioxidant levels higher than those in terrestrial mammals. With the aim of evaluating and comparing the antioxidant response to Cd exposure in marine and terrestrial mammal myoblasts under cell cultures condition. Primary myoblast cultures were developed from northern elephant seal and human muscle samples, and were expose to cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>) in different concentration (0-5  $\mu$ M) and time (1-12 h). Antioxidant enzymes (GST, GPx, GR, purine nucleoside phosphorylase (PNP)) activities and GSH concentration were measured as antioxidant defense; oxidative damage was quantified as oxidized:reduced GSH (GSSG:GSH-Eq) ratio and protein carbonyl levels. The results show that the activity of enzymes involved in glutathione redox cycle differ between species and suggest that human myoblasts are more sensitive to Cd exposure than those from northern elephant seal, probably due to the higher antioxidants levels in the latter.

**Keywords:** *Cadmium, culture cells, oxidative stress*

Vo.Bo.



---

Dra. Tania Zenteno Savín.  
Director de tesis

## **Dedicatoria**

A mi familia que ha estado conmigo en  
cada etapa de este nuevo desafío.

Paty, Gonzo, Osw, Choco, Lucky y Alf.

## Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. por permitirme realizar mis estudios de maestría en el programa de Uso Manejo y Preservación de los Recursos Naturales y a CONACYT por la beca otorgada (335825).

Este trabajo de tesis se desarrolló a través del financiamiento del proyecto SEP-CONACYT 152784 “Metabolismo de las purinas en mamíferos marinos en respuesta a condiciones hipóxicas asociadas al buceo y al ejercicio: estudios *in vivo* e *in vitro*” y del proyecto fiscal Estrés oxidativo PC0.10.

A mi directora de tesis Dra. Tania Zenteno-Savín por permitirme formar parte del grupo de Estrés Oxidativo, por tenerme la confianza para trabajar con cultivos celulares (aun sabiendo que carecía de experiencia). Por todo su apoyo, por siempre tener tiempo, la puerta abierta y la paciencia para resolverme dudas y ayudarme en el trabajo de tesis.

A la Dra. Lia Méndez-Rodríguez y al Dr. Ramón Gaxiola por ser parte de mi comité tutorial, por sus comentarios, sugerencias, correcciones y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A las instituciones que facilitaron la colecta de muestras, Hospital Fidepaz, gracias a las pacientes que donaron una muestra para hacer posible la realización de los cultivos celulares. Así como al Dr. Daniel E. Crocker de Sonoma State University, y a su equipo, por su apoyo en la colecta y traslado de las muestras de elefante marino que se colectaron bajo el permiso de colecta científica emitido por National Marine Fisheries Service (NMFS) marine mammals permit #14636-02.

A la Dra. Crisalejandra Rivera por ayudarme con las técnicas de laboratorio y enseñarme a trabajar en el laboratorio, por tenerme paciencia y reírse de mis errores, y por compartirme un poquito de su sabiduría.

A Norma Olgúin por el apoyo con el cultivo celular, por enseñarme a ser tan metódica, paciente para trabajar “a ciegas” en el laboratorio, por todas las horas extras y por los regaños, que siempre son necesarios para aprender y mejorar.

Al Dr. Roberto López-Cruz por su ayuda en la estandarización de la técnica para el cultivo de mioblastos de humanos, así como al Dr. José Pablo Vázquez-Medina de University of Pennsylvania por valiosa colaboración en los levantamientos de los cultivos de elefante marino del norte. Gracias a ambos por estar al pendiente de las células, y por resolverme dudas.

Al I.B.Q. Orlando Lugo Lugo, por toda su ayuda en el Laboratorio de Estrés Oxidativo, por siempre resolver mis dudas o agregar nuevas, por las sugerencias y por las horas extras de trabajo, así como por darme libertad para organizarme con las técnicas.

A la M. en C. Norma Ochoa por permitirme trabajar en el laboratorio de Análisis microbiológico, por estar al pendiente de mi trabajo, de mis cultivos y de las dudas que surgieran en el camino. De igual forma a la Dra. María de Lourdes Morquecho y a la M. en C. Amada Reyes por permitirme el uso del microscopio invertido en el Laboratorio de Taxonomía y Ecofisiología de Microalgas Marinas.

A todo el personal de posgrado por sus atenciones, resolución de dudas en trámites, etc.; sin ustedes la vida de todos los estudiantes no sería posible.

A mis compañeros del Laboratorio de Estrés Oxidativo (CIBNOR), Tania, Norma, Orlando, Bere, Priscila, Iris, Crisalejandra, Andrés, Roberto, Carolina. Gracias por toda la ayuda en laboratorio, por las reuniones semanales que aportaron nuevos conocimientos e ideas nuevas, así como por las horas de pachanga.

Al Laboratorio de Recursos Bentónicos y Modelación Bioeconómica, Cristina, Horacio, Bere y Oswaldo, por las horas de café matutinas, por siempre tener la puerta abierta para poder trabajar en su espacio o por adoptarme en los momentos que me quedaba fuera del lab.

A mi familia (especialmente a Paty, Gonzalo y Oswaldo) por estar en todo momento para mí, por aguantarme en todos los cambios de humor que trajo consigo este trabajo. Por qué lejos o cerca siempre estuvieron conmigo. Por siempre darme ánimos cuando las frustraciones fueron grandes, y también por compartir conmigo las emociones de aprender y avanzar en nuevos temas. Los amo inmensamente!!

A aquellos amigos que siempre tuvieron tiempo para compartir las experiencias de este nuevo reto, por sus consejos, y porras (Cris, Fausto, Mariana, Aby, Dona, Pau, Eli, Magda, Saraí, Magy, etc.). También a mis amadas Raks Farah por compartir conmigo las risas y danzas, por siempre darme ánimos e inyectarme de nuevas energías; especialmente gracias a mis Habibis, Annette y Caro, por todas sus enseñanzas, por su amistad y por siempre tener una gran sonrisa.

A mi último rinconcito de inspiración, Laguna San Ignacio, por tan hermosos amaneceres, atardeceres, cielos estrellados, lunas llenas, mar y ballenas, la combinación perfecta que ayudó a que fluyeran las ideas; así como a la familia de Kuyimita Camping por transmitirme su mejores vibras, parte importante para poder sentarme a terminar este círculo que empezó y terminó cerca del mar. Por supuesto al Laboratorio de mamíferos marinos “Pachico” por permitirme usar su espacio y su electricidad para sentarme a trabajar en mis ratos libres.

A todos aquellos con los que tuve la oportunidad de compartir las ideas de este trabajo, por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorarlo.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	vii
<b>Lista de figuras</b> .....	x
<b>Lista de tablas</b> .....	xi
<b>Abreviaturas</b> .....	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1    Antioxidantes.....	5
1.2    Respuesta al buceo.....	6
1.3    Elefante marino de norte.....	8
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	10
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	12
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	13
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	14
5.1    Objetivo general.....	14
5.2    Objetivos particulares.....	14
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	15
6.1    Colecta de muestras.....	15
6.2    Cultivo celular.....	16
6.2.1    Humano.....	16
6.2.2    Elefante marino del norte.....	17
6.3    Conteo celular.....	18
6.4    Exposición a cadmio.....	19
6.5    Preparación de muestras previo al análisis.....	20
6.6    Cuantificación de proteínas.....	20
6.7    Defensas antioxidantes.....	20
6.7.1    Glutación S-transferasa (EC 2.5.1.18).....	20
6.7.2    Glutación peroxidasa (EC 1.11.1.9).....	21

6.7.3	Glutación disulfuro reductasa (EC 1.8.1.7) .....	21
6.7.4	Purina nucleósido fosforilasa (EC 2.4.2.1).....	22
6.7.5	Glutación .....	22
6.8	Daño oxidativo .....	23
6.8.1	Carbonilos proteicos .....	23
6.9	Análisis estadísticos .....	23
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
7.1	Cultivos celulares.....	24
7.2	Exposición a cadmio.....	24
7.2.1	Sobrevivencia .....	24
7.2.2	Defensas antioxidantes .....	26
7.2.2.1	Glutación S-transferasa (EC 2.5.1.18).....	26
7.2.2.2	Glutación disulfuro reductasa (EC 1.8.1.7).....	31
7.2.2.3	Glutación peroxidasa (EC 1.11.1.9).....	34
7.2.2.4	Purina nucleósido fosforilasa (EC 2.4.2.1).....	37
7.2.2.5	Glutación .....	40
7.2.2.5.1	Glutación total (GSH-Eq) .....	40
7.2.2.5.2	Glutación oxidado (GSSG) .....	44
7.2.2.5.3	Glutación reducido (GSH).....	47
7.2.3	Daño oxidativo .....	50
7.2.3.1	Tasa de glutación oxidado: glutación total (GSSG/GSH-Eq).....	50
7.2.3.2	Carbonilos proteicos .....	54
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>58</b>
8.1	Sobrevivencia .....	58
8.2	Defensas antioxidantes .....	59
8.2.1	Glutación S-transferasa (EC 2.5.1.18).....	59
8.2.2	Glutación disulfuro reductasa (EC 1.8.1.7).....	61
8.2.3	Glutación peroxidasa (EC 1.11.1.9).....	61
8.2.4	Purina nucleósido fosforilasa (EC 2.4.2.1).....	62
8.2.5	Glutación .....	63
8.3	Daño oxidativo .....	64

8.3.1 Tasa de glutatión oxidado: glutatión total (GSSG:GSH-Eq).....	64
8.3.2 Carbonilos proteicos .....	65
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>66</b>
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>67</b>
11. ANEXOS.....	75
11.1 Anexo A.....	75
11.2 Anexo B.....	78
11.3 Anexo C .....	79
11.4 Anexo D .....	80

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Elefante marino (Dibujo de Uko, Tomado de Niño <i>et al.</i> , 2011) .....	9
<b>Figura 2.</b> Cámara Neubauer. Tomado de (Freshney, 2005) .....	19
<b>Figura 3.</b> Cultivo primario de mioblastos. ....	24
<b>Figura 4.</b> Supervivencia en cultivos de mioblastos.....	25
<b>Figura 5.</b> Actividad de glutatión S-transferasa (GST, unidades por miligramo de proteína) en mioblastos de humano y elefante marino. ....	30
<b>Figura 6.</b> Actividad de glutatión reductasa (GR, unidades por miligramo de proteína) en mioblastos de humano y elefante marino del norte.....	33
<b>Figura 7.</b> Actividad de glutatión peroxidasa (GPx, unidades por miligramo de proteína) en mioblastos de humano y elefante marino del norte.....	36
<b>Figura 8.</b> Actividad de purina nucleósido fosforilasa (PNP, unidades por miligramo de proteína) en mioblastos de humano y elefante marino del norte.....	39
<b>Figura 9.</b> Concentración de glutatión total (GSH-Eq, nanomoles por miligramo de proteína) en mioblastos de humano y elefante marino del norte.....	43
<b>Figura 10.</b> Concentración de glutatión oxidado (GSSG, nanomoles por miligramo de proteína) en mioblastos de humano y elefante marino del norte.,.....	46
<b>Figura 11.</b> Concentración de glutatión reducido (GSH, nanomoles por miligramo de proteína) en mioblastos de humano y elefante marino del norte.....	49
<b>Figura 12.</b> Tasa de glutatión oxidado: glutatión total (GSSG:GSH-Eq) en mioblastos de humanos y elefante marino del norte. ....	53
<b>Figura 14.</b> Concentración de carbonilos proteicos en nmol mL <sup>-1</sup> en mioblastos de humanos y elefante marino del norte. ....	57

## Lista de tablas

<b>Tabla I.</b> Tipos de antioxidantes de acuerdo a su clasificación (modificado de Pisoschi y Pop, 2015). .....	5
<b>Tabla II.</b> Actividad enzimática en mioblastos de humanos en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl <sub>2</sub> ). .....	28
<b>Tabla III.</b> Actividad enzimática en mioblastos de elefante marino en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl <sub>2</sub> ). .....	29
<b>Tabla IV.</b> Concentración de glutatión en mioblastos de humano en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl <sub>2</sub> ). .....	41
<b>Tabla V.</b> Concentración de glutatión en mioblastos de elefante marino en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl <sub>2</sub> ). .....	42
<b>Tabla VI.</b> Tasa de glutatión oxidado: glutatión total (GSSG-GSH-Eq) en mioblastos de humano en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl <sub>2</sub> ). .....	51
<b>Tabla VII.</b> Tasa de glutatión oxidado: glutatión total (GSSG:GSH-Eq) en mioblastos de elefante marino en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl <sub>2</sub> ). .....	52
<b>Tabla VIII.</b> Concentración de carbonilos proteicos en mioblastos de humano en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl <sub>2</sub> ). .....	55
<b>Tabla IX.</b> Concentración de carbonilos proteicos en mioblastos de elefante marino en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl <sub>2</sub> ). .....	56

### Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
As <sup>III</sup>	Arsenito
As <sup>V</sup>	Arsenato
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
Ca	Calcio
Cd	Cadmio
CdCl <sub>2</sub>	Cloruro de cadmio
CDNB	1-cloro-2,4 dinitrobenceno
Cu	Cobre
DHBS	3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Di-metil sulfóxido
DNPH	2,4-dinitrofenil hidracina
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzónico)
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Fe	Hierro
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSH-Eq	GSH total
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación S-transferasa
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
HgCl <sub>2</sub>	Cloruro de mercurio

HX	Hipoxantina
Mb	Mioglobina
Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
MT	Metalotioneinas
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamin adenin dinucleótido fosforilado
NADPH	Nicotinamin adenín dinucleótido fosforilado reducido
NS	No significativa
O <sub>2</sub>	Oxígeno
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Nitrato de plomo
PbCl <sub>2</sub>	Cloruro de plomo
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PNP	Purina nucleosido fosforilasa
R-SH	Grupos tiol
SOD	Súper oxido dismutasa
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
XDH	Xantina deshidrogenasa
XO	Xantina oxidasa
Zn	Zinc

## 1. INTRODUCCIÓN

El cadmio (Cd) es un miembro del grupo IIb de la tabla periódica de los elementos, considerado como un metal de transición. Está presente en el ambiente de manera natural, principalmente como producto de la actividad volcánica, de incendios forestales y del transporte eólico de partículas (Waisberg *et al.*, 2003). De igual forma puede encontrarse en algunos sedimentos marinos, distribuido en el océano por eventos de surgencias y corrientes oceánicas, por lo que puede hallarse a mayores concentraciones en aguas superficiales cerca de las costas que en aguas profundas (Cullen y Maldonado, 2013). Sin embargo, las concentraciones de este elemento incrementan debido a actividades antropogénicas, como la quema de combustibles fósiles, la refinación y fundición de metales no ferrosos y el uso de fertilizantes fosfatados, entre otros (Waisberg *et al.*, 2003; Martelli *et al.*, 2006).

La deposición atmosférica de Cd en el aire, las actividades mineras y la aplicación de fertilizantes que contienen Cd, conducen a la contaminación de suelos aumentando la absorción de este elemento en cultivos, principalmente de cereales y verduras, destinados a consumo humano (Maret y Moulis, 2013). En el ambiente marino el Cd entra a la red trófica a través del fitoplancton, principalmente diatomeas y se acumula en los consumidores primarios, como moluscos y crustáceos (Cullen y Maldonado, 2013). Por lo tanto, el consumo de estos productos representa una alta exposición al Cd, tanto en humanos como en mamíferos marinos, cuya dieta incluye una variedad de moluscos y crustáceos.

El Cd es considerado como un elemento no esencial en la mayoría de los animales, entre los que se encuentran los mamíferos, al no contar con un sistema de control homeostático (Maret y Moulis, 2013). Cuando un elemento no esencial ingresa al organismo, puede interactuar con moléculas implicadas en el control de iones metálicos que, si son esenciales, como zinc (Zn), calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe) e incluso cobre (Cu) y manganeso (Mn) (Martelli *et al.*, 2006; Moulis, 2010; Maret y Moulis, 2013).

Las interacciones con diferentes metales se deben a su presentación química más importante, biológicamente hablando, cadmio II ( $\text{Cd}^{\text{II}}$ ). El  $\text{Cd}^{\text{II}}$  presenta características similares a las del zinc II ( $\text{Zn}^{\text{II}}$ ) en cuanto a la flexibilidad de coordinación y a la falta de reacciones redox; pero a diferencia de  $\text{Zn}^{\text{II}}$ , posee mayor afinidad para adoptar números de coordinación superiores, tales como ligandos que contienen azufre (tioles) (Martelli *et al.*, 2006). Por otro lado,  $\text{Cd}^{\text{II}}$  puede competir por oxígeno y nitrógeno con los cationes alcalinotérreos Ca y Mg (Maret y Moulis, 2013).

En humano, la exposición a Cd ocurre por inhalación, ingestión y absorción por la piel. La principal forma en la que se absorbe el Cd es por el tracto respiratorio (del 40 al 60% de las partículas inhaladas) (Maret y Moulis, 2013; Thévenov y Lee, 2013); sin embargo, es más frecuente que éste entre al organismo a través de la dieta debido a que es la principal fuente de exposición ambiental (WHO/IPCS, 1992; Järup y Åkesson, 2009). Una vez absorbido, el Cd es distribuido por el torrente sanguíneo, unido a albúmina en plasma, hacia sus órganos objetivo, el hígado y los riñones (Nordberg, 2009). En el hígado, Cd induce la síntesis de metalotioneínas (MT), las cuales se encargan de distribuirlo hacia otros órganos (Maret y Moulis, 2013). En el riñón, el Cd es filtrado por los glomérulos y re-absorbido por las células epiteliales de los túbulos proximales, donde se acumula (Maret y Moulis, 2013; Thévenov y Lee, 2013). Durante su biotransformación no se lleva a cabo una degradación metabólica a especies menos tóxicas y relativamente poco Cd es excretado a través de la bilis, unido a glutatión, y de la orina, unido a MT (Arita y Costa, 2009; Maret y Moulis, 2013).

Una vez dentro de órganos y tejidos, el Cd entra al espacio intracelular por acción de proteínas en la membrana celular, ya sean canales iónicos o receptores de membrana. El paso a través de canales iónicos ocurre cuando el Cd se encuentra como ión libre ( $\text{Cd}^{2+}$ ), puesto que presenta mimetismo iónico con algunos metales esenciales como Zn, Ca, Cu, Fe, Mn y Mg (Taki, 2013). El ingreso mediado por receptores de membrana sucede cuando existe mimetismo molecular, es decir cuando el  $\text{Cd}^{2+}$  forma complejos con otras moléculas, como proteínas y péptidos

que contengan tioles, similares a moléculas endógenas (Martelli *et al.*, 2006; Taki, 2013). Con base en esto, el transporte de  $\text{Cd}^{2+}$  sólo puede ocurrir si las células poseen vías de transporte de metales esenciales o moléculas biológicas (Taki, 2013). Una vez en el espacio intracelular, los complejos formados por  $\text{Cd}^{2+}$  pueden intercambiar ligandos con otras proteínas; esto tiene dos efectos opuestos, evitar que Cd se difunda a otras células y formar un sumidero de Cd (Moulis, 2010; Thévenov y Lee, 2013).

La toxicidad por Cd se debe principalmente a su interferencia con el control homeostático del Zn celular, así como a la inducción de estrés oxidativo en las células de mamíferos. Algunas de las funciones biológicas de las que forma parte Zn y que se pueden ver alteradas por Cd son expresión de genes, proliferación y diferenciación celular, crecimiento y desarrollo, apoptosis y respuesta inmune; en muchas de estas funciones intervienen enzimas que utilizan Zn como sustrato o como cofactor para realizar sus funciones; por lo tanto, juega un papel importante como catalizador, inhibidor o como accesorio en la regulación de enzimas tipo quinasas o fosfatasas (Moulis, 2010).

La exposición de las células a Cd puede resultar en la interrupción del control fisiológico de señales dinámicas que tiene como consecuencia una señalización celular disfuncional. Por ejemplo, la sustitución de  $\text{Ca}^{2+}$  con  $\text{Cd}^{2+}$  en procesos de señalización, así como la sustitución de Zn en muchas enzimas y factores de transcripción, puede inducir la expresión de genes aberrantes llevando a la estimulación de proliferación celular o a la supresión de la apoptosis (Waisberg *et al.*, 2003; Maret y Moulis, 2013).

Además, el  $\text{Cd}^{2+}$  inhibe a enzimas antioxidantes, disminuye los niveles intracelulares de antioxidantes no enzimáticos y a la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, generando un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Waisberg *et al.*, 2003; Nordberg, 2009). Como resultado de esto, es posible que se produzca daño en las hebras de ADN, peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas, que a largo plazo puede llevar a disfunción y muerte celular (Waisberg *et al.*, 2003; Maret y Moulis, 2013; Taki, 2013).

La exposición a Cd (tanto en células como en organismos íntegros) puede inducir la expresión de genes de respuesta al estrés, entre los que se encuentran los que codifican para la síntesis de glutatión (GSH) (Chin y Templeton, 1993; Beyersmann y Hechtenberg, 1997). El glutatión participa en funciones biológicas como el transporte de moléculas (aminoácidos, ADN, estrógenos, prostaglandinas), así como el mantenimiento celular del estado óxido-reducción, debido a que puede atrapar ERO, además puede proteger el ADN contra los efectos del oxígeno singulete (Liu *et al.*, 2009; Nzengue *et al.*, 2011). El GSH, junto con otras proteínas que contienen grupos tiol (R-SH), conforma el sistema de detoxificación fase II de metales como el Cd, ya que tienen la capacidad de compactar la especie iónica  $Cd^{2+}$  para prevenir la interacción con células objetivo (Chin y Templeton, 1993; Eneman *et al.*, 2000; Waisberg *et al.*, 2003; Nzengue *et al.*, 2011).

El Cd puede disminuir el contenido intracelular de glutatión o las actividades de la superóxido dismutasa (SOD, que cataliza la conversión del anión de radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), glutatión peroxidasa (GPx, convierte  $H_2O_2$  a  $H_2O$ ) y catalasa (CAT, cataliza la conversión de  $H_2O_2$  a agua y a oxígeno molecular) (Waisberg *et al.*, 2003).

El Cd se considera como no mutagénico (Waisberg *et al.*, 2003); sin embargo, al combinarse con agentes genotóxicos actúa como elemento co-mutagénico ya que inhibe el proceso de reparación de ADN (Takiguchi *et al.*, 2003). El Cd es considerado como un carcinógeno no genotóxico, es decir, que sus mecanismos de acción no incluyen la modificación directa del ADN, no forma aductos con el ADN, eliminando con ello el daño que conduce a la mutación (Arita y Costa, 2009). Sin embargo, de manera indirecta puede alterar la expresión de determinados genes, ya que actúa como inductor, e incrementa la velocidad de síntesis de otras moléculas (Waisberg *et al.*, 2003).

## 1.1 Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier compuesto que, aun en concentraciones bajas, comparado con un sustrato oxidable, es capaz de eliminar o prevenir la oxidación del sustrato (Halliwell y Gutteridge, 2007). Los antioxidantes pueden clasificarse según su origen en a) antioxidantes exógenos, los cuales al no ser sintetizados dentro del organismo son obtenidos a partir de la dieta; y b) antioxidantes endógenos, los cuales sí pueden ser sintetizados por el organismo, éstos a su vez se pueden clasificar en enzimáticos y no enzimáticos (Halliwell y Gutteridge, 2007; Costantini, 2014). En la tabla I se muestran ejemplos de antioxidantes de los grupos anteriormente mencionados.

**Tabla I.** Tipos de antioxidantes de acuerdo a su clasificación (modificado de Pisoschi y Pop, 2015).

Endógenos		Exógenos
Enzimáticos	No enzimáticos	
Glutación S-transferasa	Glutación	Vitamina E
Glutación reductasa	Metalotioneína	Vitamina C
Glutación peroxidasa	Tioles	$\beta$ caroteno

Las enzimas antioxidantes son activadas por compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química variable, tales como difenoles, quinonas, metales pesados, entre otros. La inducción de estas enzimas está regulada a nivel transcripcional y está mediada por un potenciador específico, el elemento de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés), encontrado en el promotor de genes de enzimas (Nguyen *et al.*, 2000; Königsberg, 2007). Entre los factores de transcripción que se activan se encuentran el factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF $\kappa\beta$ ), la proteína activadora 1 (AP1) y los factores relacionados al factor nuclear eritroide-2 (Nrf2). Particularmente, el factor de transcripción Nrf2 ha sido implicado como la proteína central que interactúa con ARE para activar la transcripción de genes constitutivamente o en respuesta a señales de estrés (Costantini, 2014; Nguyen *et al.*, 2000).

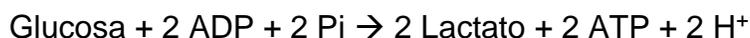
## 1.2 Respuesta al buceo

La falta de oxígeno compromete las funciones de células y tejidos de mamíferos (Storey, 1996). Sin embargo, los mamíferos marinos, como el elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*), toleran los periodos en los que la concentración de oxígeno disminuye (hipoxia) como una posible consecuencia al cese de la respiración (apnea) durante el buceo (Elsner, 1999).

El intercambio de gases durante la respiración permite el mantenimiento de los niveles de oxígeno que requiere la célula para la producción de adenosín trifosfato (ATP). Esta molécula de alta energía puede sintetizarse a partir de varias vías. Una de ellas es la glucólisis, en la cual se transforma glucosa a piruvato con una producción neta de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (Lehninger *et al.*, 2005). Este proceso ocurre en dos fases; 1) fase preparatoria, en la cual una hexosa, la glucosa, es fosforilada y fragmentada, dando lugar a dos moléculas de triosa gliceraldehído-3-fosfato, consumiéndose dos moléculas de ATP, y 2) fase de beneficio, en la cual las dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato se convierten a piruvato, con la producción de cuatro moléculas de ATP (Lehninger *et al.*, 2005; Voet y Voet, 2006); la reacción global de ambas fases es:



Durante los períodos de apnea hay una disminución constante del oxígeno disponible (hipoxia) y un incremento del dióxido de carbono (hipercapnia), lo que crea una condición de asfixia (Elsner, 1999). En situaciones de hipoxia, la síntesis de ATP se lleva a cabo por glucólisis anaeróbica, proceso que suministra ATP rápidamente (Lehninger *et al.*, 2005); la reacción global de este proceso es:



En esta reacción, el producto final es el lactato, cuya acumulación disminuye el pH muscular y sérico; ello implica un incremento en la concentración de iones hidrógeno ocasionando acidosis intracelular (Voet y Voet, 2006; Konigsberg, 2008).

Los mamíferos marinos han desarrollado diferentes estrategias fisiológicas que les permiten aumentar la cantidad y el rendimiento de oxígeno almacenado en el cuerpo. El oxígeno es almacenado en tres compartimentos, el sistema respiratorio, la sangre y los músculos. En el sistema respiratorio, la cantidad de oxígeno que se puede almacenar depende del volumen de los pulmones; sin embargo, antes de una inmersión, los mamíferos marinos exhalan, vaciando hasta un 50% de la capacidad pulmonar (Kooyman, 2002). La cantidad de oxígeno almacenado en sangre y músculo depende del volumen de sangre, de la masa muscular y de la concentración de las proteínas respiratorias, hemoglobina (Hb) en sangre y mioglobina (Mb) en músculo (Panneton, 2013). Los mamíferos marinos tienen 9.5 veces mayor concentración de Hb en sangre que los mamíferos terrestres. La cantidad de Mb en mamíferos marinos es de 10 a 30 veces mayor que en mamíferos terrestres, y es responsable de proveer oxígeno a los músculos durante un período de apnea (Kooyman y Ponganis, 1998; Kooyman, 2002).

Los vertebrados expuestos a hipoxia exhiben una serie de ajustes en los sistemas cardiovascular y respiratorio que, en su conjunto, se conocen como respuesta al buceo (Panneton, 2013). Esta respuesta incluye una disminución en la frecuencia cardíaca (bradicardia) acompañada de una vasoconstricción periférica (isquemia), que implica una distribución preferencial de la circulación de la sangre a los órganos sensibles a oxígeno (como el cerebro), así como un descenso en la temperatura corporal central y en la tasa metabólica (Elsner, 1999; Castellini *et al.*, 2002; Panneton, 2013).

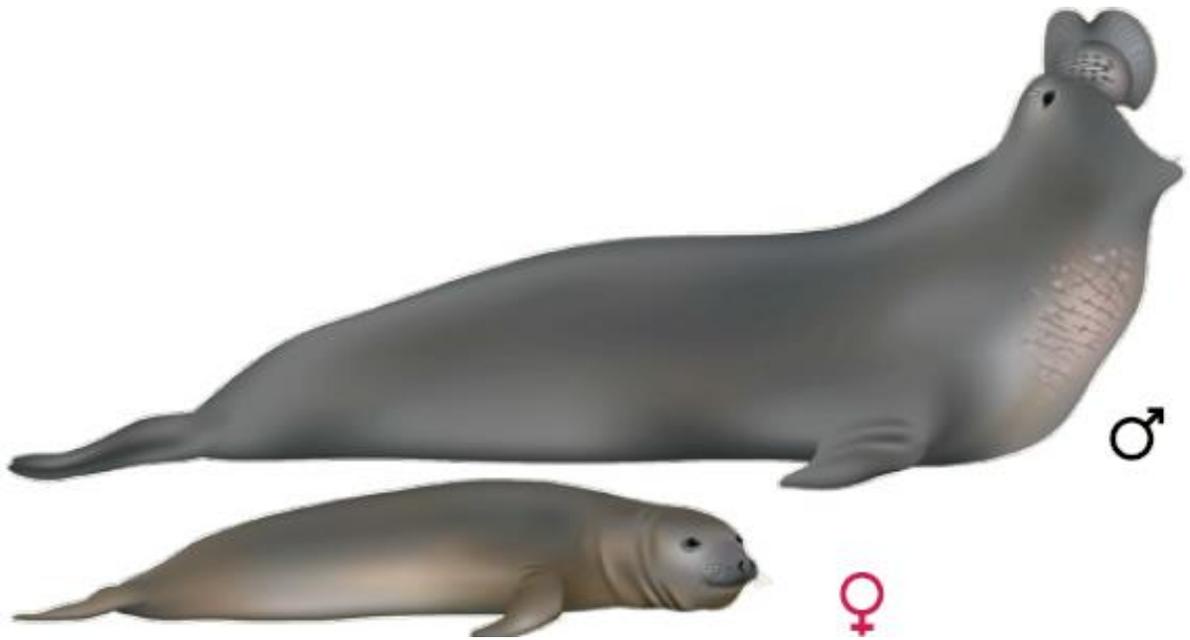
Al término de la apnea, la respuesta al buceo se revierte; es decir, con la primera respiración se eleva el ritmo cardíaco (taquicardia) y se restablece el flujo sanguíneo (reperfusión) (Elsner, 1999; Panneton, 2013). Ello permite enviar nuevamente oxígeno hacia los órganos y tejidos que habían sido privados, así como eliminar el CO<sub>2</sub> y otros metabolitos de desecho acumulados durante el periodo de apnea (Castellini *et al.*, 2002). El lactato es transportado por la corriente sanguínea al hígado, en donde se convierte en piruvato por acción de la enzima lactato deshidrogenasa y después en glucosa a través del proceso de gluconeogénesis

(Castellini *et al.*, 2002; Lehninger *et al.*, 2005). La corriente sanguínea devuelve la glucosa a los músculos, en los que puede almacenarse en forma de glucógeno. Este ciclo es conocido como ciclo de Cori (Voet y Voet, 2006; Berg *et al.*, 2007).

El ciclo de isquemia-reperusión que acompaña a cada buceo induce la producción de ERO debido a que, durante la isquemia, la degradación del ATP provoca la acumulación de hipoxantina (HX) y el incremento de calcio intracelular (Kuppusamy y Zweier, 1989). Este último activa lipasas y proteasas calcio-dependientes que causan la transformación proteolítica de la enzima xantina deshidrogenasa (XDH) a xantina oxidasa (XO); además, durante la reperusión la XO actúa sobre HX y el oxígeno ( $O_2$ ) incrementando la producción de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , xantina y ácido úrico (Kuppusamy y Zweier, 1989; Thompson-Gorman y Zweier, 1990; Halliwell y Gutteridge, 2007). El aumento en la producción de ERO puede llevar a estrés oxidativo. Sin embargo, los mayores niveles de antioxidantes (Zenteno-Savín *et al.*, 2012) observados en tejidos de mamíferos marinos en comparación con mamíferos terrestres les permite contrarrestar el efecto de las ERO evitando así el daño oxidativo (Vázquez-Medina *et al.*, 2012).

### 1.3 Elefante marino de norte

El elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) pertenece a la familia Phocidae. Es una especie con evidente dimorfismo sexual cuya principal característica es que los machos pesan entre 8 y 10 veces más que las hembras; además, presentan una probóscide, la cual juega un papel clave en el despliegue de dominancia con otros machos (Fig. 1) (Reeves *et al.*, 1992). Esta especie se distribuye en islas y zonas costeras del Pacífico nororiental, principalmente desde la Isla de Cedros hasta la Isla Guadalupe y las Islas Farallón en la parte central de Baja California (Reeves *et al.*, 1992; Hindell, 2002). Realiza dos migraciones anuales (~8,000 km cada una), una reproductiva (diciembre y marzo) y la otra para mudar su pelaje (diferentes momentos de acuerdo a la edad y sexo), desde sus zonas de alimentación en el Golfo de Alaska e Islas Aleutianas, hacia California y la península de Baja California (Stewart y Huber, 1993; Hindell, 2002; Niño *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Elefante marino (Dibujo de Uko, Tomado de Niño *et al.*, 2011).

## 2. ANTECEDENTES

De acuerdo a la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) el Cd es tóxico a bajas concentraciones y lo agrupan como cancerígeno en el grupo I. En humanos, se ha reportado que a concentraciones a partir de  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  en riñón existe riesgo de sufrir daño renal (Dietz *et al.*, 1998; Järup y Åkesson, 2009), mientras que en mamíferos marinos, particularmente pinnípedos, las concentraciones reportadas van de 1 a  $581 \mu\text{g g}^{-1}$  en riñón; sin embargo, no existe un daño aparente (Dietz *et al.*, 1998). Bajo este panorama existe la posibilidad de que los mamíferos marinos estén adaptados a tolerar grandes concentraciones de Cd; entender cómo es que lo hacen se vuelve de potencial interés para proponer tratamientos médicos en humanos que permitan evitar o reducir el daño causado por Cd (Dietz *et al.*, 1998).

Para abordar la pregunta de cómo afecta el Cd en sistemas biológicos a nivel celular, se han desarrollado diferentes trabajos en los que se exponen cultivos de células de diferentes órganos y tejidos provenientes de mamíferos terrestres (humano y ratón, principalmente). En algunos estudios se evaluó la sensibilidad de diferentes tipos de células a concentraciones crecientes de cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) y se obtuvo la dosis letal 50 ( $\text{DL}_{50}$ ), dosis a la que la mitad de la población muere en un tiempo de exposición de 24h (Schäfer *et al.*, 1999). Las células más sensibles son las células de riñón bovino cuya  $\text{DL}_{50}$  es  $0.8 \mu\text{M}$  (Bracken *et al.*, 1984), seguidas de fibroblastos de embriones de rata con  $\text{DL}_{50}$  de  $1.5 \mu\text{M}$  (Lin *et al.*, 1995), células V79 de hámster chino cuya  $\text{DL}_{50}$  es  $3 \mu\text{M}$  (Beyersmann y Hechtenberg, 1997), mioblastos de ratón con  $\text{DL}_{50}$  de  $9.4 \mu\text{M}$  (Abshire *et al.*, 1996) y fibroblastos de piel de humano con  $\text{DL}_{50}$  de  $25 \mu\text{M}$  (Lin *et al.*, 1995).

Tátrai *et al.* (2001) evaluaron los efectos en las enzimas involucradas en el ciclo del GSH (GPx, GR) en neumocitos tipo II de ratas expuestas por 24 h a diferentes concentraciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  M) de  $\text{CdCl}_2$  y nitrato de plomo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ). Los autores encontraron una relación inversamente proporcional entre la concentración de Cd y la actividad de las enzimas GR y GPx,

mientras que el  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  incrementa la actividad de GR pero disminuye la de GPx. Con base en estos resultados Tátrai *et al.* (2001) concluyen que el Cd inhibe la actividad de las enzimas a muy bajas concentraciones provocando también un daño significativo en la membrana; adicionalmente, de acuerdo a sus resultados, consideran que el daño causado por Cd es significativamente mayor que aquel causado por  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ .

La enzima purina nucleósido fosforilasa (PNP) participa en el metabolismo de purinas y es la encargada de metabolizar adenosina en adenina, inosina en hipoxantina, guanina en guanosina (Bzowska *et al.*, 2000; Van Den Berghe *et al.*, 2006). En cada caso, PNP utiliza el grupo de fosfato de la ribosa, permitiendo que las células utilicen bases de purina recuperados de ribo- y desoxirribonucleósidos metabolizados para sintetizar nucleótidos de purina (Bzowska *et al.*, 2000). De acuerdo a De Chaudhuri *et al.* (2008) esta enzima participa en el metabolismo del arsénico junto con la GST, reduciendo el arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) a arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ). Sin embargo, hasta el momento se desconoce si hay algún cambio en la actividad de esta enzima frente a la exposición al Cd.

Estudios científicos que comparen la exposición a  $\text{CdCl}_2$  en humanos o mamíferos terrestres con mamíferos marinos es inexistente. Hasta el momento, el único estudio reportado en el que se utilizan cultivos celulares de mamíferos marinos expuestos a Cd es el de De Guise *et al.* (1996). El objetivo de dicho estudio fue evaluar la proliferación de espleinocitos y timocitos de beluga (*Delphinapterus leucas*) expuestos a distintas concentraciones de cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ),  $\text{CdCl}_2$  y cloruro de plomo ( $\text{PbCl}_2$ ) de manera individual. Las concentraciones utilizadas para  $\text{CdCl}_2$  fueron 0,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  M en un tiempo de 66 h. En sus resultados De Guise *et al.* (1996) encuentran que la viabilidad de las células no es afectada significativamente por las diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$ ; sin embargo, la proliferación disminuye en ambos tipos de células. Sólo una de las concentraciones empleadas ( $10^{-5}$  M) de  $\text{CdCl}_2$  redujo significativamente la proliferación de los espleinocitos y la de timocitos; las bajas concentraciones no afectaron significativamente la proliferación celular.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El Cd se encuentra en los sedimentos marinos de la península de Baja California, en concentraciones mayores que el promedio en la corteza terrestre (Martin y Broenkow, 1975; Cheng *et al.*, 1976). Lo anterior está asociado tanto a eventos de surgencias como a actividades mineras realizadas en la zona (Shumilin *et al.*, 2001). Dichos procesos hacen que el Cd se encuentre biodisponible y pueda ingresar a la cadena trófica, con el potencial de repercutir en la salud humana (Méndez *et al.*, 1998).

Los reportes sugieren que en humano existe un daño a partir de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  de Cd en riñón, mientras que en pinnípedos como el elefante marino, se encuentran concentraciones superiores ( $1$  a  $581 \mu\text{g Cd g}^{-1}$  en riñón) sin efecto aparente. Ello sugiere diferencias en el sistema de detoxificación entre especies, siendo el de pinnípedos más eficiente que el de humanos (Järup y Åkesson, 2009; Habran *et al.*, 2012).

Bajo este contexto, es relevante evaluar los efectos de la exposición a Cd para entender las defensas antioxidantes y el sistema de detoxificación en dos especies modelo, un mamífero terrestre y uno marino. Este estudio puede generar información con potenciales aplicaciones médicas, como la terapia de reemplazo de enzimas, frente a exposiciones a Cd.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si los tejidos musculares del elefante marino del norte tienen mayores niveles de antioxidantes que los de humano; entonces los mioblastos de los elefantes marinos contarán con un sistema de detoxificación más eficiente contra la exposición a cadmio que los mioblastos de humanos, y con ello menor daño oxidativo.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta antioxidante a la exposición a cadmio en mioblastos de elefante marino del norte y humano bajo condiciones de cultivo celular.

### 5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar indicadores de defensas antioxidantes en cultivos celulares de músculo de elefante marino y humano expuestos a concentraciones crecientes de cadmio a través de la actividad enzimática de glutatión S-transferasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, purina nucleósido fosforilasa y la concentración de glutatión total, glutatión reducido y glutatión oxidado.
2. Determinar el daño oxidativo en cultivos celulares de músculo de elefante marino y humano expuestos a concentraciones crecientes de cadmio, a través de la cuantificación de los niveles de carbonilos proteicos y la tasa glutatión oxidado: glutatión total.
3. Comparar y evaluar el efecto, en términos de estrés oxidativo, de la exposición a cadmio en cultivos celulares de músculo de elefante marino y humano.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Colecta de muestras

Se colectaron muestras de músculo esquelético de individuos de elefante marino del norte en el Parque Estatal Año Nuevo, California, E.U.A., por personal de University of California, Merced y Sonoma State University durante el mes de abril de 2016. Previo a la toma de muestra los individuos fueron sedados con telazol (tiletamina/zolazepam HCl, 1 mg kg<sup>-1</sup>) administrado por vía intramuscular; así mismo, se les aplicó una inyección subcutánea de lidocaína como anestésico local. La muestra fue tomada del flanco cerca de una de las aletas traseras con una aguja estéril *dermapunch* (Ortíz *et al.*, 2003).

Las muestras de músculo esquelético de humano fueron colectadas por personal del Centro de Especialidades Médicas Fidepaz en la ciudad de La Paz, Baja California Sur, durante partos por cesárea programados de mujeres sanas, previo consentimiento informado (Anexo I). La muestra fue tomada de la parte media del abdomen con bisturí y pinzas.

Todas las biopsias fueron enjuagadas con solución salina fisiológica (0.9%), posteriormente se colocaron en tubos Falcon de 50 mL con medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 85.4 U mL<sup>-1</sup> de penicilina/estreptomicina, 0.1 mM de piruvato de sodio, 25 mM de HEPES y 10% de DMSO. Los tubos fueron almacenados en frío hasta su traslado al laboratorio. Una vez en laboratorio se mantuvieron en un ultracongelador a -80°C hasta su uso. Las muestras de elefante marino del norte fueron trasladadas al Instituto de Medicina Ambiental de la Escuela de Medicina Perelman en la Universidad de Pensilvania, donde se iniciaron los cultivos celulares primarios por el Dr. José Pablo Vázquez-Medina, siguiendo la metodología descrita en la sección 6.2.2; las muestras de humano se trasladaron al Laboratorio de Estrés Oxidativo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., donde se realizaron los cultivos celulares descritos en la sección 6.2.1.

## 6.2 Cultivo celular

### 6.2.1 Humano

Para establecer el cultivo celular primario, las muestras fueron enjuagadas con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) suplementada con antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomycin y anfotericina). Una vez enjuagadas, cada muestra se cortó y se colocó dentro de cajas de cultivo Corning de 25 cm<sup>2</sup>. A cada caja se le añadió medio de cultivo DMEM/F12 sin L-glutamina, suplementado con: 15% suero fetal bovino, 85.4 U mL<sup>-1</sup> penicilina/estreptomycin, 2 mM glutamax (L-glutamina-L-alanina), 0.1 mM de piruvato de sodio y 25 mM de HEPES. Todas las cajas se mantuvieron en una incubadora (Barnstead Lab-Line) a 35°C realizando recambios totales de medio de cultivo cada 3 días (Freshney, 2005). El crecimiento de las células al interior de las cajas fue monitoreado cada 15 días con ayuda de un microscopio invertido (Zeiss, Axiovert 100). Una vez que las cajas estuvieron llenas en un 80-100% o alcanzaron una densidad de 1 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> se hicieron reexplantos (Freshney, 2005).

Para realizar los reexplantos se retiró el medio de cultivo de cada caja, se enjuagó con PBS para eliminar restos de medio de cultivo, y se utilizó tripsina para despegar las células adheridas a la caja. Para desactivar la tripsina se agregó medio de cultivo; el contenido de cada caja se colocó en tubos de 15 mL, mismos que fueron centrifugados a 322 x g durante 10 minutos; se desechó el sobrenadante, el pellet fue resuspendido y homogenizado en 1 mL de medio de cultivo. Del homogenizado de células se separó una alícuota de 20 µL para calcular la densidad celular, el resto de homogenizado se dividió en alícuotas para reexplantos o análisis, según fuese requerido.

### 6.2.2 Elefante marino del norte

Las muestras de elefante marino del norte fueron enjuagadas 4 veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) suplementada con antibióticos y antimicóticos (penicilina, estreptomina y anfotericina). Una vez enjuagadas, los tejidos fueron disgregados con  $0.625 \text{ mg mL}^{-1}$  de colagenasa tipo II, incubados a  $37^\circ\text{C}$  durante 40 min. El tejido disgregado fue pasado por un colador celular de  $100 \mu\text{m}$  de luz de malla y posteriormente se centrifugaron a  $322 \times g$  durante 10 minutos; el sobrenadante fue desechado y el pellet resuspendido en 1 mL de medio de cultivo DMEM/F12 con L-glutamina y 15 mM de HEPES, suplementado con 15% de suero fetal bovino, 1% antibiótico antimicótico, 1% de glutamax y 0.1% de piruvato de sodio y colocado en cajas T de  $25 \text{ cm}^2$ . Las cajas se mantuvieron en una incubadora (Barnstead Lab-Line) a  $35^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ , realizando recambios totales de medio de cultivo cada 3 días (Freshney, 2005).

Una vez que las cajas estuvieron llenas en un 80-100% o alcanzaron una densidad de  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  (Freshney, 2005) se hicieron reexplantes (descritos anteriormente). Cuando el cultivo celular llegó al pase 3 las células fueron despegadas de las cajas T utilizando tripsina, el contenido de cada caja se colocó en tubos de 15 mL, se centrifugaron a  $322 \times g$  durante 10 min y se desechó el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en 1 mL de medio de cultivo con 10% de DMSO y colocado en crioviales. Los crioviales fueron colocados en nitrógeno líquido hasta su traslado al Laboratorio de Estrés Oxidativo del CIBNOR, donde se reactivó el cultivo.

Para reactivar el cultivo, los crioviales se descongelaron, se centrifugaron a  $322 \times g$  durante 10 min, se desechó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 mL de medio DMEM/F12 sin L-glutamina, suplementado con: 15% suero fetal cosmic,  $85.4 \text{ U mL}^{-1}$  penicilina/estreptomina, 2 mM glutamax (L-glutamina-L-alanina), 0.1 mM de piruvato de sodio y 25 mM de HEPES y colocado en cajas T, que se mantuvieron en una incubadora (Thermo Fisher Scientific, Series 8000WJ, Marietta, Ohio, E.U.A.) a  $35^\circ\text{C}$ , se realizaron recambios totales de medio de cultivo

cada 3 días. Al igual que los mioblastos de humano, estas células se mantuvieron en cultivo hasta que se contó con la densidad necesaria para realizar los experimentos.

### 6.3 Conteo celular

Para realizar el conteo celular se utilizó el análisis de exclusión con azul de tripano. Este colorante permite distinguir fácilmente entre células viables y no viables cuando se observan en un microscopio, ya que las células viables tienen membranas celulares intactas y no permiten la entrada del colorante, por lo que aparecen sin teñir; mientras que las células no viables no poseen una membrana funcional por lo que el colorante atraviesa la membrana y tiñe el interior de la célula de azul (Louis y Siegel, 2011).

A las alícuotas del homogenizado de células se les añadió azul de tripano, se dejaron reposar por aproximadamente 8 min. Se colocó una alícuota en cada lado de una cámara de Neubauer, misma que fue observada en microscopio óptico (Leica) a 10X. Se contaron las células vivas y muertas de los cuadrantes extremos y central (Fig. 2). El porcentaje de células viables se determinó empleando la siguiente ecuación:

$$\% C_{Vb} = C_L / C_T \times 100 \quad (1)$$

donde:

%  $C_{VB}$  = porcentaje de células viables  
 $C_L$  = células vivas  
 $C_T$  = células totales

La cantidad de células viables por mililitro se calculó usando las formulas:

$$C_c = C_{Vb} / N_c \quad (2)$$

donde:

$C_c$  = células por cuadrante  
 $C_{VB}$  = células viables  
 $N_c$  = número de cuadrantes contabilizados

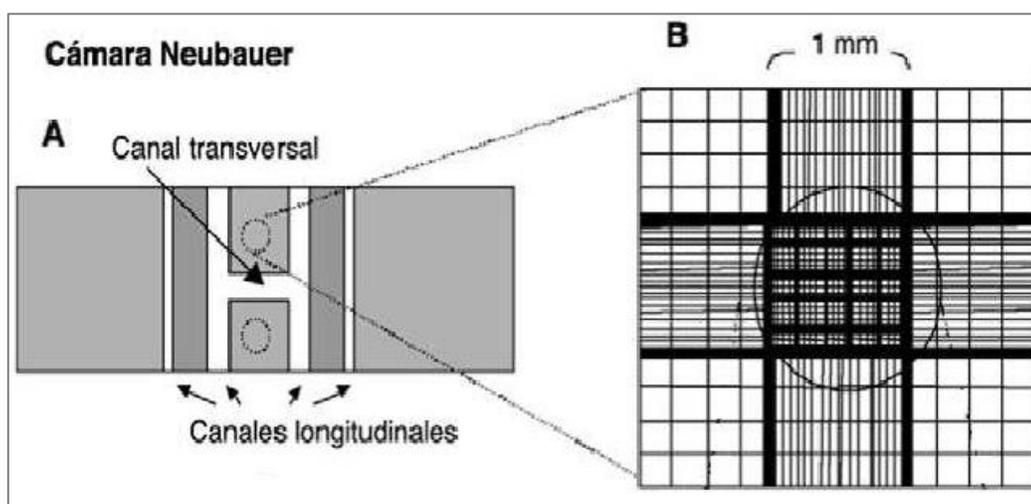
$$C_{vb} \text{ml}^{-1} = C_{VB} \times F_D \times 10^4 \quad (3)$$

donde:

$C_{VB}$  = células viables por mililitro

$C_{VB}$  = células viables

$F_D$  = factor de dilución



**Figura 2.** Cámara Neubauer. Tomado de (Freshney, 2005).

#### 6.4 Exposición a cadmio

La exposición a Cd se realizó usando cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) disuelto en medio de cultivo en las siguientes concentraciones  $0 \mu\text{M}$ ,  $0.5 \mu\text{M}$ ,  $2.5 \mu\text{M}$ , y  $5 \mu\text{M}$ . Estas concentraciones fueron elegidas de acuerdo a la  $DL_{50}$  ( $9.4 \mu\text{M}$ ) para  $\text{CdCl}_2$  (0 a  $100 \mu\text{M}$  durante 24 h) calculada para mioblastos de ratón por Abshire *et al.* (1996). Antes de añadir el medio de cultivo con  $\text{CdCl}_2$ , se retiró el medio de cultivo estándar a todas las cajas requeridas. A cada caja se le añadió una de las concentraciones, y fueron mantenidas bajo ese tratamiento por 1 h, 6 h, o 12 h (Jin y Ringertz, 1990; Abshire *et al.*, 1996). Se utilizaron 3 cajas por triplicado para cada tratamiento en cada tiempo.

Transcurrido el tiempo de exposición, se retiró el medio de las cajas y se enjuagaron con PBS, las células fueron despegadas de la caja utilizando tripsina en incubación a 37°C por 4 min, se les agregó medio de cultivo para desactivar la tripsina y el contenido de cada caja se colocó en tubos de 15 mL. Se centrifugaron a 322 x *g* durante 10 min, se deshechó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido y homogenizado en medio de cultivo. Se tomó una alícuota para conteo, el resto del homogenizado se colocó en crioviales con 10 % de DMSO y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

### 6.5 Preparación de muestras previo al análisis

Se descongelaron los crioviales, se centrifugaron a 226 x *g* durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en agua destilada. Para asegurar la lisis celular, las muestras se sometieron a congelación a -80°C durante 5 min seguida de descongelación a temperatura ambiente (25°C); este proceso se repitió 2 veces.

### 6.6 Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteína en cada muestra de células, se utilizó el método de Bradford (1976) adaptado a microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific, Finlandia). En cada corrida se incluyó una curva de calibración con albumina sérica bovina (BSA) en un rango de concentraciones de 3 a 18  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Se utilizaron las concentraciones de proteínas para estandarizar los resultados.

### 6.7 Defensas antioxidantes

#### 6.7.1 Glutati6n S-transferasa (EC 2.5.1.18)

La actividad de GST se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Habig y Jakoby (1981) adaptada para microplaca. Para ello se midió la aparición del complejo 1-cloro-2,4 dinitrobenceno (CDNB) con GSH, la aparición de este complejo es acompañada por un incremento en la absorbancia a 340 nm cuya tasa de incremento es directamente proporcional a la actividad de GST de la muestra.

Se registró el cambio de absorbancia cada 60 seg durante 5 min en un lector de microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific, Finlandia) a 340 nm. Los resultados se expresan en unidades (U) de GST por mg de proteína. Una U de GST es definida como la cantidad de enzima que cataliza la conjugación de 1 nmol de CNDB con GSH por minuto a 25°C.

#### 6.7.2 Glutación peroxidasa (EC 1.11.1.9)

La actividad de GPx se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Folh  y Günzler (1984) adaptada para microplaca. Est  técnica mide la oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup> al usar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato, la cual es acompañada por un decremento en la absorbancia a 340 nm que es directamente proporcional a la actividad de GPx en la muestra. Se registró el cambio de absorbancia cada 60 seg durante 5 min en un lector de microplaca a 340 nm. Los resultados se expresan en U por mg de proteína. Una U de GPx es definida como la cantidad de enzima que puede oxidar 1 nmol de NADPH a NADP<sup>+</sup> por minuto a 25°C.

#### 6.7.3 Glutación disulfuro reductasa (EC 1.8.1.7)

La actividad de GR se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Goldberg y Spooner (1987) adaptada para microplaca. En esta técnica se mide la tasa de oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup>, la cual es acompañada por una disminución en la absorbancia a 340 nm y es directamente proporcional a la actividad de GR en la muestra. Se registró el cambio de absorbancia cada 60 seg durante 5 min en un lector de microplaca a 340 nm. Los resultados se expresan en U de GR por mg de proteína. Una U de GR es definida como la cantidad de enzima que puede oxidar 1 nmol de NADPH a NADP<sup>+</sup> por minuto a 25°C.

#### 6.7.4 Purina nucleósido fosforilasa (EC 2.4.2.1)

La actividad de PNP se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Chu *et al.* (1989) adaptada para microplaca. Esta técnica mide la aparición del complejo N-(4-antipiril)-3-cloro-5-sulfonato-p-benzoquinonamonoimina formado a partir de las reacciones catalizadas por las enzimas PNP y xantina oxidasa (XO) al oxidar 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico (DHBS) y 4-aminoantipirina por medio de la enzima peroxidasa, este proceso está acompañado de un incremento en la absorbancia a 520 nm que es directamente proporcional a la actividad de PNP. Se registró el cambio de absorbancia cada 30 seg durante 3 min en un lector de microplaca a 510 nm. Los resultados se expresan en U por mg de proteína. Una U de PNP es definida como la cantidad de enzima que puede reducir 1 nmol de inosina por minuto a 25°C.

#### 6.7.5 Glutati6n

Para cuantificar la concentraci6n del GSH total (GSH-Eq) se utiliz6 el m6todo de reciclaje, usando GR, empleando las metodologías propuestas por Tietze (1969) y Griffith (1980) adaptadas por Rahman *et al.* (2007) para microplaca. En este ensayo el grupo sulfhídrido del GSH reacciona con ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) produciendo ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB); el GSTNB (mezcla de GSH y TNB) que se produce es reducido por GR para reciclar el GSH y producir más TNB. La tasa de producci6n de TNB es directamente proporcional a esta reacci6n de reciclaje que, a su vez es directamente proporcional a la concentraci6n de GSH-Eq en la muestra, y puede detectarse a 405 nm. Debido a que el GSH es f6cilmente oxidado a GSSG por la enzima GPx, para poder cuantificar GSSG se aña de a la muestra 2-vinil piridina (2VP, 0.5 M) la cual se une al grupo sulfhidrido del GSH, evitando su oxidaci6n.

La concentración de GSH-Eq y GSSG se determinó comparando la tasa de producción del TNB con una curva estándar con concentraciones conocidas de GSH (0.165 a 1.65 nM) y GSSG (0.165 a 1.65 nM), respectivamente. Para determinar la concentración de GSH se consideró la relación estequiométrica 1:2 GSH:GSSG, y se calculó a partir de las concentraciones de GSH-Eq y GSSG. Los resultados son expresados en nmol de GSH-Eq, GSH o GSSG  $\text{mg}^{-1}$  proteína.

## 6.8 Daño oxidativo

### 6.8.1 Carbonilos proteicos

La cuantificación de carbonilos proteicos se realizó empleando la metodología descrita por Levine *et al.* (1994), adaptada para microplaca. Este ensayo se basa en la reacción entre 2,4-dinitrofenil hidracina (DNPH) y los carbonilos proteicos, en la cual se forma una base de Schiff que produce una hidracina que puede ser detectada entre 360 y 385 nm. Las muestras y blancos fueron leídas en un lector de microplaca a 370 nm. Los resultados obtenidos se expresan en  $\text{nmol mL}^{-1}$  de proteína.

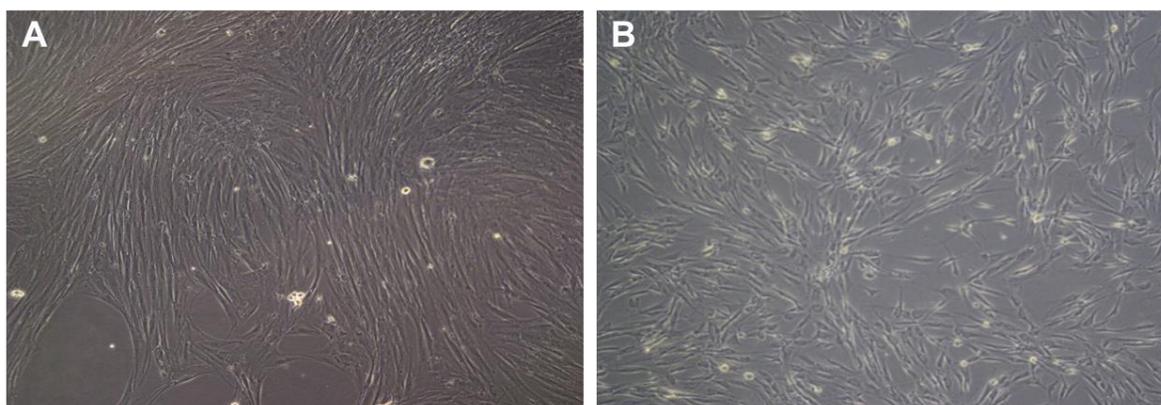
## 6.9 Análisis estadísticos

A cada grupo de datos se les realizó pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y homocedasticidad de Levene para determinar si los datos seguían una distribución normal (Zar, 1996; Celis de la Rosa y Labrada-Martagon, 2014). Los datos no cumplieron con esos supuestos por lo que se hicieron pruebas no paramétricas. Para comparar entre tiempos y concentraciones por especie se utilizó el estadístico de Kruskal-Wallis para muestras independientes y se aplicó una prueba *a posteriori* de comparación múltiple de medias. Las comparaciones entre especies en cada uno de los tiempos y concentraciones de exposición fueron realizadas mediante la U de Mann-Withey (Zar 1996).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Cultivos celulares

Se establecieron dos cultivos primarios de mioblastos de humano (Fig. 3A) y dos de mioblastos de elefante marino del norte (Fig. 3B). Los cultivos fueron duplicados hasta contar con 108 cajas de humano por individuo y 72 cajas de elefante marino del norte por individuo. Las cajas fueron asignadas de manera aleatoria y uniforme a cada concentración y tiempo de exposición a  $\text{CdCl}_2$ ; los experimentos se realizaron por triplicado en el caso de humano y por duplicado en el de elefante marino del norte. El total de cajas de ambas especies representa un tamaño de muestra igual a 120,  $n = 72$  para mioblastos de humanos y  $n = 48$  de mioblastos para elefante marino.



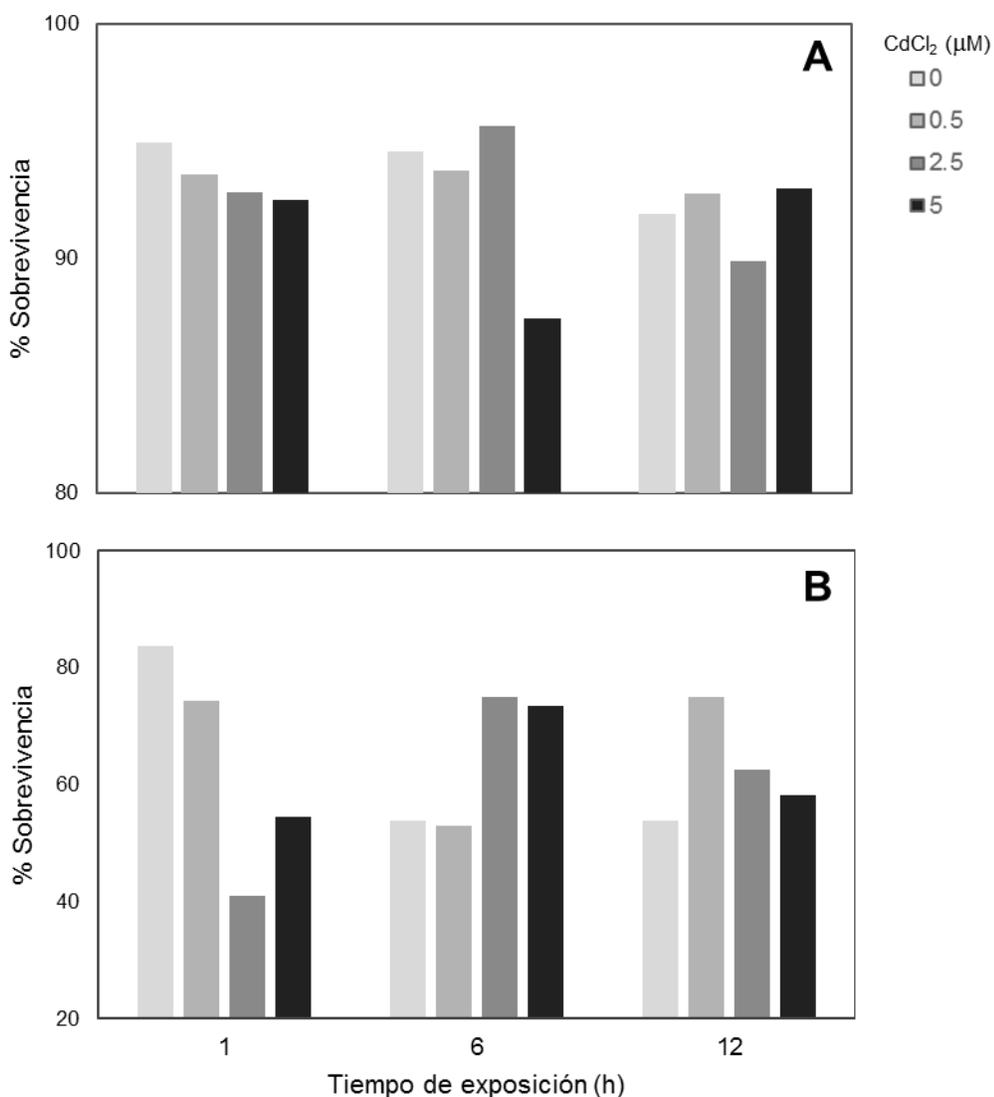
**Figura 3.** Cultivo primario de mioblastos de A) humano y B) elefante marino del norte formando una capa semiconfluyente a 10X.

### 7.2 Exposición a cadmio

#### 7.2.1 Supervivencia

Se observó una supervivencia de mioblastos de humanos expuestos a  $\text{CdCl}_2$  desde 87% para la mayor concentración utilizada ( $5\mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ) con exposición durante 6 h, hasta 95% para el tratamiento a  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  durante 6 h de exposición (Fig. 4A). Por lo tanto, todas las concentraciones utilizadas en los ensayos de exposición del cultivo de mioblastos de humanos estuvieron por arriba de la  $\text{DL}_{50}$ .

El intervalo de sobrevivencia de mioblastos de elefante marino del norte expuestos a  $\text{CdCl}_2$  fue del 41% para la dosis de  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  durante 1 h de exposición hasta 83% para el grupo control durante 1 h de exposición (Fig. 4B). En comparación con los mioblastos de humano, los de elefante marino del norte presentaron, en general, 20% menos sobrevivencia.



**Figura 4.** Sobrevivencia en cultivos de mioblastos de A) humano y B) elefante marino del norte, expuestos a diferentes tiempos y concentraciones de cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ).

## 7.2.2 Defensas antioxidantes

### 7.2.2.1 Glutación S-transferasa (EC 2.5.1.18).

La actividad de GST en mioblastos de humano expuestos a concentraciones crecientes de CdCl<sub>2</sub> fue menor de 1 U mg<sup>-1</sup> proteína (Fig. 5, Tabla II). A 1 h de incubación, la menor actividad de GST se encontró en los mioblastos expuestos a 2.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>, mientras que la mayor actividad se observó en aquellos expuestos a 5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (H (3, N = 24) = 2.54, p = 0.4681). De los mioblastos de humano incubados durante 6 h, el grupo control fue el que presentó menor actividad de GST; la actividad de GST aumentó (NS) con la exposición a 0.5 μM CdCl<sub>2</sub>; a pesar de que se observó una tendencia a disminuir la actividad de GST en un 10% conforme incrementa la concentración de CdCl<sub>2</sub>, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 24) = 0.06, p = 0.9955). Para las incubaciones por 12 h, la actividad de GST en mioblastos de humanos se encontró en el tratamiento 2.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y la mayor para el tratamiento con 0.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 24) = 4.04, p = 0.2565). Cuando se considera sólo el tiempo de exposición (agrupando todos los tratamientos con las diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub>), la menor actividad de GST se encontró a las 12 h y la mayor a las 6 h de incubación (Anexo A); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de incubación (H (2, N = 72) = 0.60, p = 0.7380).

En mioblastos de elefante marino del norte la actividad de GST en las diferentes concentraciones y tiempos fue menor a 0.55 U mg<sup>-1</sup> proteína (Fig. 5, Tabla III). En las incubaciones por 1 h, el grupo control (0 CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>) presentó la menor actividad de GST; esta actividad incrementó con la concentración de CdCl<sub>2</sub>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a las diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (H (3, N = 16) = 6.94, p = 0.0737).

En los mioblastos de elefante marino del norte incubados durante 6 h, la menor actividad de GST se observó en el tratamiento con  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  y la mayor actividad en el tratamiento  $5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $H(3, N = 16) = 2.38, p = 0.4969$ ). Al tiempo de incubación de 12 h, la menor actividad de GST se observó en el tratamiento con  $5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  y la mayor en el grupo control; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con  $\text{CdCl}_2$  ( $H(3, N = 16) = 2.41, p = 0.4903$ ). Considerando únicamente los tiempos de incubación (sin considerar los tratamientos con las diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ), la menor actividad de GST se encontró a las 12 h y la mayor a las 6 h de incubación (Anexo B); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de incubación ( $H(2, N = 48) = 3.86, p = 0.1451$ ).

Los mioblastos de elefante marino del norte presentaron 50% menos actividad de GST que aquella observada en mioblastos de humanos (Fig. 5). Sin embargo, sólo se encontraron diferencias significativas entre especies en la incubación por 1 h en el grupo control ( $0 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}, p = 0.009$ ) y a 12 h de incubación en el grupo tratado con  $0.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  ( $p = 0.033$ ).

**Tabla II.** Actividad enzimática en mioblastos de humanos en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>).

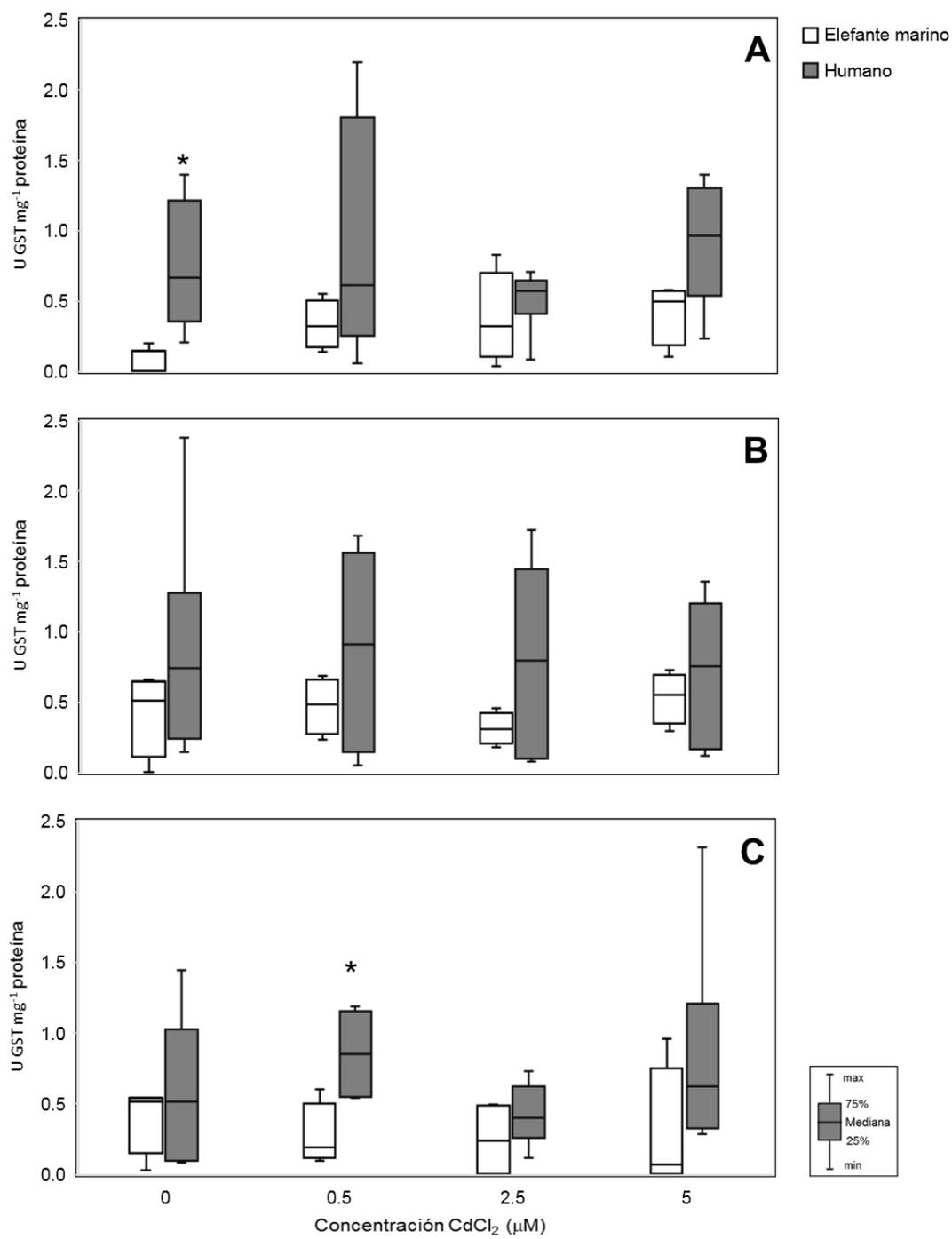
Tiempo (h)	Concentración (μM)	GST (U mg <sup>-1</sup> proteína)	GR (U mg <sup>-1</sup> proteína)	GPx (U mg <sup>-1</sup> proteína)	PNP (U mg <sup>-1</sup> proteína)
1	0	0.66 (0.4–1.15)	0.89 (0.56–2.52)	11.27 (5.04–13.82)	0.99 (0.48–1.38)
	0.5	0.61 (0.32–2.19)	1.15 (0.77–1.43)	4.36 (0.002–7.67)	0.81 (0.6–1.48)
	2.5	0.57 (0.57–0.71)	0.71 (0.53–0.85)	7.6 (4.63–9.41)	1.62 (0.75–1.84)
	5	0.96 (0.63–1.4)	0.34 (0.25–0.45)	9.74 (3.98–16.31)	0.99 (0.84–1.57)
6	0	0.74 (0.27–0.9)	0.61 (0.57–0.84)	8.09 (5.21–21.4)	0.28 (0.18–0.52)
	0.5	0.91 (0.17–1.52)	0.42 (0.002–0.77)	21.89 (7.26–28.16)	0.54 (0.32–1.01)
	2.5	0.8 (0.1–1.35)	0.87 (0.45–1.72)	11.64 (8.34–16.01)	0.44 (0.34–0.53)
	5	0.75 (0.18–1.15)	0.41 (0.38–0.677)	19.38 (14.34–23.9)	1.21 (0.53–1.59)
12	0	0.51 (0.1–0.89)	0.56 (0.38–1.24)	15.8 (13.06–18.47)	0.75 (0.12–1.26)
	0.5	0.85 (0.55–1.14)	0.53 (0.15–0.7)	16.16 (6.67–40.55)	0.62 (0.34–0.88)
	2.5	0.4 (0.31–0.58)	0.58 (0.4–0.66)	11.91 (8.44–22.75)	0.28 (0.12–0.73)
	5	0.62 (0.33–0.84)	0.63 (0.14–0.86)	8.35 (4.95–36.51)	0.75 (0.31–1.06)

GST: glutatión S-transferasa, GR: glutatión reductasa, GPx: glutatión peroxidasa, PNP: purina nucleósido fosforilasa. Los datos se muestran como mediana con percentiles 25% y 75%. Nivel de significancia estadística  $p < 0.05$

**Tabla III.** Actividad enzimática en mioblastos de elefante marino en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>).

Tiempo (h)	Concentración (μM)	GST (U mg <sup>-1</sup> proteína)	GR (U mg <sup>-1</sup> proteína)	GPx (U mg <sup>-1</sup> proteína)	PNP (U mg <sup>-1</sup> proteína)
1	0	0.005 (0.005–0.1)	0.91 (0.74–1.34)	0.37 (0.17–0.9)	0.032 (0.02–0.072)
	0.5	0.32 (0.21–0.46)	0.69 (0.53–0.91)	0.13 (0.002–0.7)	0.036 (0.029–0.057)
	2.5	0.32 (0.177–0.58)	1.50 (1.21–1.92)	0.12 (0.019–0.45)	0.069 (0.05–0.086)
	5	0.50 (0.27–0.57)	1.06 (0.7–1.69)	0.86 (0.27–1.76)	0.068 (0.037–0.086)
6	0	0.51 (0.21–0.62)	0.83 (0.65–1.15)	0.80 (0.2–1.71)	0.037 (0.011–0.064) <sup>a</sup>
	0.5	0.48 (0.31–0.63)	0.79 (0.5–1.04)	0.43 (0.19–0.74)	0.068 (0.044–0.12) <sup>ac</sup>
	2.5	0.31 (0.24–0.39)	0.74 (0.63–1.004)	1.02 (0.65–3.21)	0.180 (0.13–0.19) <sup>bc</sup>
	5	0.55 (0.4–0.65)	0.73 (0.71–1.38)	0.16 (0.002–0.59)	0.071 (0.065–0.08) <sup>ac</sup>
12	0	0.51 (0.26–0.53)	0.51 (0.22–1.42)	0.31 (0.002–1.47)	0.08 (0.061–0.093)
	0.5	0.19 (0.14–0.4)	0.26 (0.2–0.82)	0.35 (0.26–1.46)	0.092 (0.048–0.13)
	2.5	0.24 (0.005–0.48)	0.93 (0.5–1.23)	0.002 (0.002–0.2)	0.095 (0.074–0.11)
	5	0.06 (0.005–0.54)	0.72 (0.67–0.76)	0.76 (0.2–2.92)	0.074 (0.041–0.21)

GST: glutatión S-transferasa, GR: glutatión reductasa, GPx: glutatión peroxidasa, PNP: purina nucleósido fosforilasa. Los datos se muestran como mediana con percentiles 25% y 75%. Las letras diferentes indican diferencias entre concentraciones de exposición. Nivel de significancia estadística,  $p < 0.05$ . Las letras diferentes indican diferencias entre tiempos de concentración.



**Figura 5.** Actividad de glutatión S-transferasa (GST, unidades por miligramo de proteína) en mioblastos de humano y elefante marino del norte. A) 1 h, B) 6 h y C) 12 h de incubación, expuestos a concentraciones crecientes de cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>). \* indica diferencias entre especies a un tiempo y concentración determinada. Nivel de significancia estadística,  $p < 0.05$ .

### 7.2.2.2 Glutati3n disulfuro reductasa (EC 1.8.1.7)

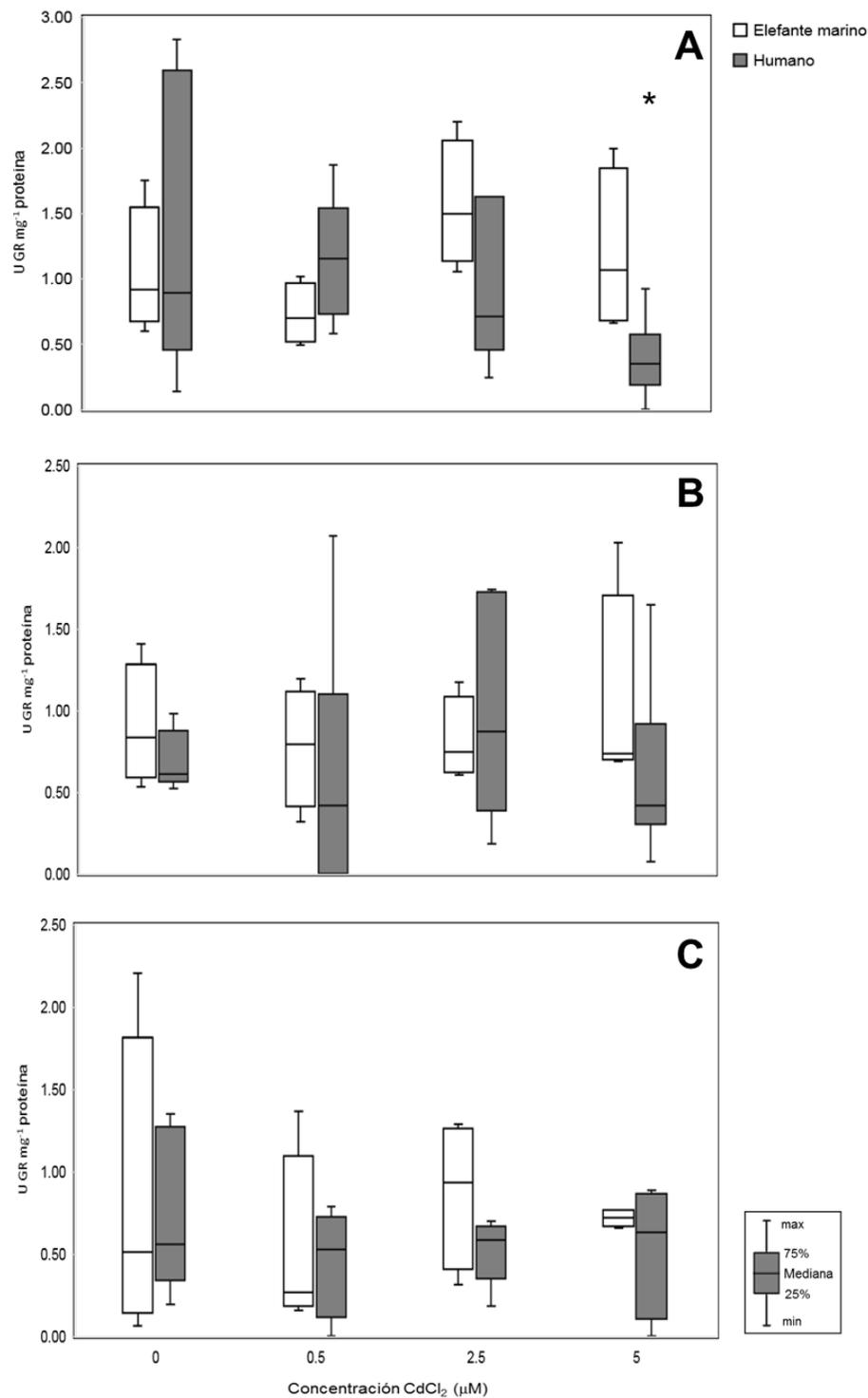
La actividad de GR en mioblastos de humano expuestos a concentraciones crecientes de CdCl<sub>2</sub> fue menor a 1.15 U mg<sup>-1</sup> prote3na (Fig. 6, Tabla II). A 1 h de incubaci3n se observ3 un incremento en la actividad de GR entre el grupo control y el tratamiento con 0.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; posteriormente, se observaron decrementos en la actividad de GR con el aumento en la concentraci3n de CdCl<sub>2</sub>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (H (3, N = 24) = 6.44, p = 0.0921). En las incubaciones por 6 h, la menor actividad de GR se observ3 en el tratamiento con 5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y la mayor en el tratamiento con 2.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (H (3, N = 24) = 2.61, p = 0.4550). En las incubaciones por 12 h se observaron actividades de GR similares entre los tratamientos con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (H (3, N = 24) = 0.92, p = 0.8201). Tomando en cuenta s3lo el tiempo de incubaci3n (sin considerar la concentraci3n de CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>), la actividad de GR disminuy3 con el tiempo de incubaci3n; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de incubaci3n (H (2, N = 72) = 2.89, p = 0.2354)

La actividad de GR en los mioblastos de elefante marino del norte fue menor a 1.5 U mg<sup>-1</sup> prote3na (Fig. 6, Tabla III). A 1 h de incubaci3n, la mayor actividad de GR se observ3 en el tratamiento con 2.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y la menor en el tratamiento con 0.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 16) = 5.73, p = 0.1252). A 6 h de incubaci3n, la mayor actividad de GR se registr3 en el grupo control y se observ3 una ligera disminuci3n, menor al 6%, con la concentraci3n de CdCl<sub>2</sub>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 16) = 0.44, p = 0.9316). A 12 h de incubaci3n, la mayor actividad de GR se registr3 en el tratamiento con 2.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y la menor en el tratamiento con 0.5 μM CdCl<sub>2</sub>

mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $H(3, N = 16) = 2.38, p = 0.4969$ ).

Considerando únicamente los tiempos de incubación (sin considerar las concentraciones de CdCl<sub>2</sub>), la actividad de GR disminuyó 30% con el tiempo (Anexo B); sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $H(2, N = 48) = 5.29, p = 0.0707$ ).

La actividad de GR en mioblastos de elefante marino del norte fue 20% mayor que aquella observada en mioblastos de humanos (Fig. 6). Las comparaciones entre especies para cada tratamiento sólo arrojaron diferencias significativas en la incubación de 1 h en los mioblastos tratados con 5 µM de CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> ( $p = 0.033$ ).



**Figura 6.** Actividad de glutatión reductasa (GR, unidades por miligramo de proteína) en mioblastos de humano y elefante marino del norte. A) 1 h, B) 6 h y C) 12 h de incubación, expuestos a concentraciones crecientes de cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>). \* indica diferencias entre especies. Nivel de significancia estadística,  $p < 0.05$

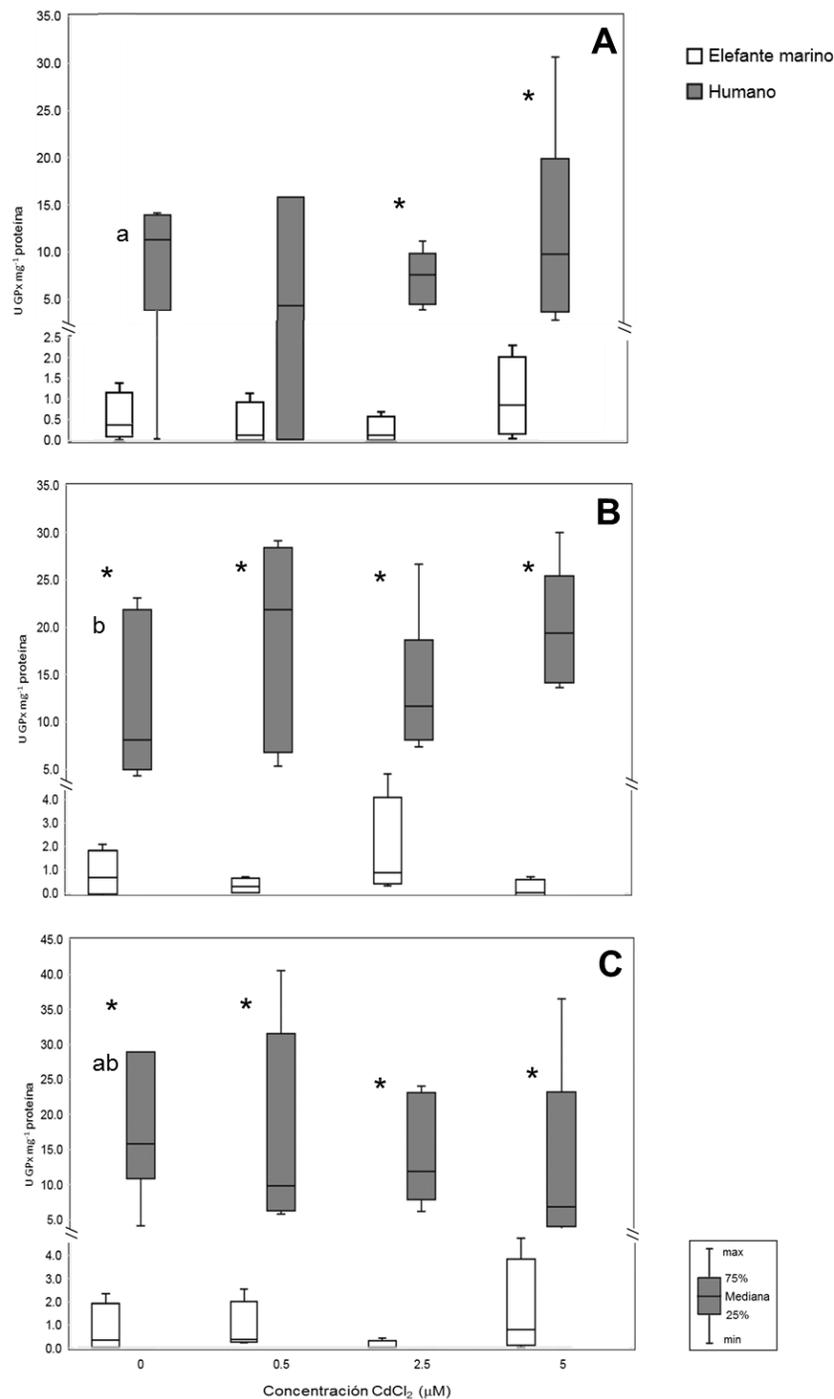
### 7.2.2.3 Glutati3n peroxidasa (EC 1.11.1.9)

La actividad de GPx en mioblastos de humano expuestos a concentraciones crecientes de CdCl<sub>2</sub> fue menor de 21.9 U mg<sup>-1</sup> prote3na (Fig. 7, Tabla II). La actividad de GPx a 1 h de incubaci3n fue menor en el tratamiento con 0.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y mayor en el grupo control; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 24) = 2.26, p = 0.5195). A 6 h de incubaci3n, la actividad de GPx fue menor en el grupo control y mayor en el tratamiento con 0.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (H (2, N = 24) = 4.24, p = 0.2360). A las 12 h de incubaci3n, el grupo control present3 la menor actividad de GPx con un incremento del 2% para el tratamiento con 0.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y una disminuci3n del 25% conforme se increment3 la concentraci3n de CdCl<sub>2</sub> sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (H (3, N = 24) = 0.64, p = 0.8857). Cuando s3lo se consider3 el tiempo de incubaci3n (sin considerar la concentraci3n de CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>), la actividad de GPx fue menor a 1 h y mayor a 6 h de incubaci3n (Anexo B, H (2, N = 72) = .31, p = 0.0095); los an3lisis de comparaci3n m3ltiple sugieren diferencias significativas en la actividad de GPx entre 1 h y 6 h de incubaci3n (Z = 2.73, p = 0.018), y entre 1 h y 12 h de incubaci3n (Z = 2.53, p = 0.0033).

En mioblastos de elefante marino del norte, la actividad de GPx fue menor a 1 U mg<sup>-1</sup> prote3na (Fig. 7, Tabla III). A 1 h de incubaci3n la menor actividad de GPx se observ3 en el tratamiento con 2.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y la mayor en el tratamiento con 5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (H (3, N = 16) = 2.87, p = 0.4119). A 6 h de incubaci3n, la actividad de GPx m3s baja fue la observada en el tratamiento con 5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y la mayor en el tratamiento con 2.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (3, N = 16) = 4.34, p = 0.2262).

A 12 h de incubación, la menor actividad de GPx se observó en el tratamiento con  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  y la mayor en el tratamiento con  $5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  ( $H(3, N = 16) = 3.47, p = 0.3246$ ). Al comparar únicamente los tiempos de incubación (sin considerar las concentraciones de  $\text{CdCl}_2$ ), no se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $H(2, N = 48) = 1.18, p = 0.5530$ ).

La actividad de GPx en mioblastos de elefante marino del norte equivale a sólo el 5% de la actividad observada en mioblastos de humanos (Fig. 7). Las comparaciones entre especies para mioblastos sometidos al mismo tratamiento (tiempo e incubación) sugieren que no existen diferencias significativas entre especies en el grupo control a 1 h y en el tratamiento con  $0.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  a 1 h; en el resto de los tratamientos las diferencias entre especies fueron significativas ( $p < 0.019$ ).



**Figura 7.** Actividad de glutatión peroxidasa (GPx, unidades por miligramo de proteína) en mioblastos de humano y elefante marino del norte. A) 1 h, B) 6 h y C) 12 h de incubación, expuestos a concentraciones crecientes de cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>). Las letras dentro de las gráficas indican diferencias entre concentraciones de exposición a un tiempo específico; \* indica diferencias entre especies. Nivel de significancia estadística,  $p < 0.05$ .

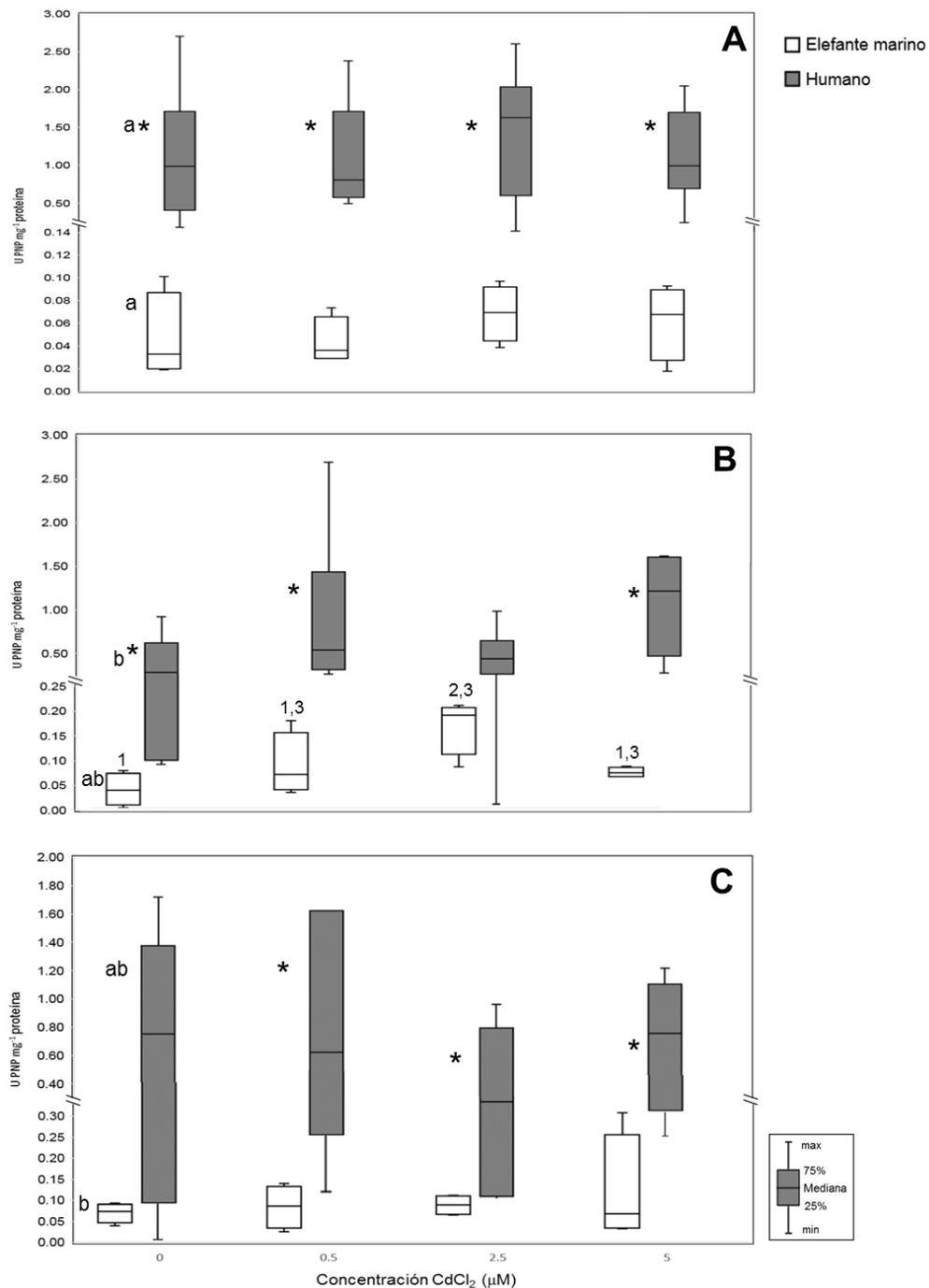
#### 7.2.2.4 Purina nucleósido fosforilasa (EC 2.4.2.1).

La actividad de PNP en mioblastos de humanos fue menor a  $1.7 \text{ U mg}^{-1}$  proteína (Fig. 8, Tabla I). A 1 h de incubación, se observó menor actividad de PNP en el tratamiento con  $0.5 \text{ } \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  y mayor actividad de PNP en el tratamiento con  $2.5 \text{ } \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  ( $H(3, N = 24) = 0.84, p = 0.8383$ ). A 6 h de incubación, la menor actividad de PNP se registró en el grupo control y la mayor en el tratamiento con  $5 \text{ } \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  ( $H(3, N = 24) = 6.96, p = 0.0730$ ). A 12 h de incubación, la menor actividad de PNP se encontró en el tratamiento con  $2.5 \text{ } \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  y la mayor en el grupo control; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  ( $H(3, N = 24) = 1.67, p = 0.6429$ ). Cuando se consideró sólo el tiempo de incubación (sin considerar las concentraciones de  $\text{CdCl}_2$ ), la menor actividad de PNP se encontró a 6 h y la mayor a 1 h de incubación (Anexo B) con diferencias significativas entre tiempos ( $H(2, N = 72) = 7.82, p = 0.0200$ ); adicionalmente los análisis de comparación múltiple sugieren diferencias entre las incubaciones a 1 h y 12 h ( $Z = 2.47, p = 0.040$ ).

En mioblastos de elefante marino del norte, la actividad de PNP fue menor a  $0.2 \text{ U mg}^{-1}$  proteína (Fig. 8, Tabla III). En las incubaciones durante 1 h las menores actividades de esta enzima se registraron en el grupo control y en el tratamiento con  $0.5 \text{ } \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ , mientras que la mayor actividad se observó en los tratamientos con  $2.5 \text{ } \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  y  $5 \text{ } \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias entre ellos ( $H(3, N = 16) = 1.80, p = 0.6130$ ). A 6 h de incubación, se encontró una diferencia significativa entre tratamientos ( $H(3, N = 16) = 9.41, p = 0.0242$ ) con la menor actividad de PNP en el grupo control y la mayor en el tratamiento con  $2.5 \text{ } \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  ( $Z = 3.04, p = 0.013$ ). A 12 h de incubación, la actividad de PNP registrada para todos los tratamientos con diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  fue similar y no se encontraron diferencias significativas

entre ellos ( $H(3, N = 16) = 0.50, p = 0.9173$ ). Cuando se tomaron en cuenta sólo los tiempos de exposición (sin considerar los tratamientos con diferentes concentraciones de  $CdCl_2$ ), se observa una tendencia de la actividad de PNP incrementar con el tiempo; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de incubación ( $H(2, N = 48) = 5.74, p = 0.0567$ ).

La actividad de PNP en mioblastos de humanos fue 90% mayor que la de elefante marino del norte (Anexo B). Las comparaciones entre especies para mioblastos sometidos al mismo tratamiento (tiempo e incubación) no detectaron diferencias significativas entre especies en el tratamiento con  $5 \mu M CdCl_2 mL^{-1}$  a 6 h y en el grupo control a 12 h; en el resto de los tratamientos las diferencias fueron significativas ( $p < 0.033$ ).



**Figura 8.** Actividad de purina nucleósido fosforilasa (PNP, unidades por miligramo de proteína) en mioblastos de humano y elefante marino del norte. A) 1 h, B) 6 h y C) 12 h de incubación, expuestos a concentraciones crecientes de cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>). Las letras dentro de las gráficas indican diferencias entre concentraciones de exposición a un tiempo específico; los números indican diferencias entre los tiempos de incubación a una concentración específica; \* indica diferencias entre especies. Nivel de significancia estadística,  $p < 0.05$ .

## 7.2.2.5 Glutación

### 7.2.2.5.1 Glutación total (GSH-Eq)

La concentración de glutatión total (GSH + GSSG) en mioblastos de humanos fue menor a  $400 \text{ nmol mg}^{-1}$  proteína (Fig. 9, Tabla IV). A 1 h de incubación, se observó menor concentración de GSH-Eq en el tratamiento con  $5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  y mayor concentración en el tratamiento con  $0.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $H(3, N = 24) = 1.64, p = 0.6489$ ). A 6 h de incubación, la menor concentración de GSH-Eq se registró en el grupo control y la mayor en el tratamiento con  $5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $H(3, N = 24) = 7.06, p = 0.0698$ ). A 12 h de incubación, la menor concentración de GSH-Eq se encontró en el grupo control y la mayor en el tratamiento con  $0.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $H(3, N = 24) = 5.46, p = 0.1406$ ). Considerando únicamente los tiempos de incubación (sin considerar las concentraciones de  $\text{CdCl}_2$ ), la concentración de GSH-Eq aumentó 17% con el tiempo (Anexo C); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $H(2, N = 72) = 1.95, p = 0.3766$ ).

La concentración de GSH-Eq en mioblastos de elefante marino del norte fue menor a  $1110 \text{ nmol mg}^{-1}$  proteína (Fig. 9, Tabla V). A 1 h de incubación, se observó menor concentración de GSH-Eq en el grupo control y mayor concentración en el tratamiento con  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $H(3, N = 16) = 1.08, p = 0.7817$ ). A 6 h de incubación, la menor concentración de GSH-Eq se registró en el grupo control y la mayor en el tratamiento con  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $H(3, N = 16) = 7.83, p = 0.06$ ). A 12 h de incubación, la menor concentración de GSH-Eq se encontró el tratamiento con  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  y la mayor en el grupo control; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $H(3, N = 16) = 3.79, p = 0.2846$ ). Considerando únicamente los tiempos de incubación (sin considerar las

concentraciones de CdCl<sub>2</sub>), la menor concentración de GSH-Eq se encontró a 1 h de incubación y la mayor a 6 h de incubación (Anexo C); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $H(2, N = 48) = 1.60, p = 0.4493$ ).

La concentración de GSH-Eq en mioblastos de elefante marino del norte fue 60% mayor que la de mioblastos de humano (Anexo C). Las comparaciones entre especies para mioblastos sometidos al mismo tratamiento (tiempo e incubación) sugieren diferencias significativas entre especies entre el grupo control, tratamiento con 0.5  $\mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  y con 2.5  $\mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ , todos a 6 h de incubación, y el grupo control a 12 h de incubación ( $p < 0.033$ ).

**Tabla IV.** Concentración de glutatión en mioblastos de humano en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>).

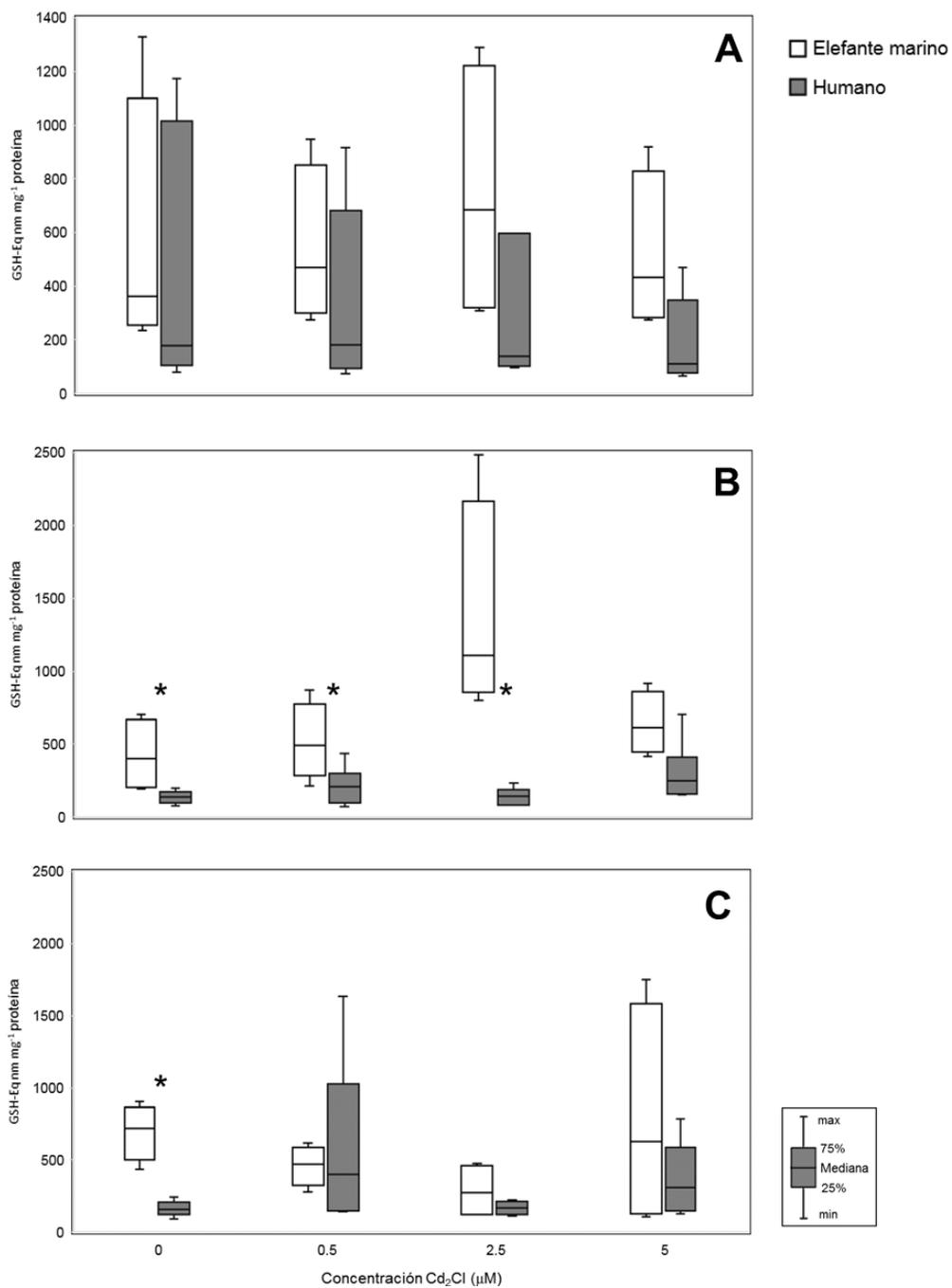
Tiempo (h)	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	GSH-Eq (nmol mg <sup>-1</sup> proteína)	GSH (nmol mg <sup>-1</sup> proteína)	GSSG (nmol mg <sup>-1</sup> proteína)
1	0	178.44 (114.94 - 963.39)	52.47 (27.88 - 335)	125.96 (87.06 - 628.39)
	0.5	181.29 (101.23 - 605)	47.21 (25.44 - 174.82)	79.86 (58.36 - 184.23)
	2.5	140.39 (104.81 - 286)	58.05 (30.79 - 158.53)	100.14 (67.29 - 127.47)
	5	112 (79.52 - 308.15)	28.79 (6.17 - 244.6)	71.14 (17.83 - 81.09)
6	0	137.68 (101.84 - 165.5)	16.15 (6.47 - 83.66)	90 (53.26 - 117.21)
	0.5	208.88 (105.28 - 254.95)	39.98 (3.75 - 83.07)	114.99 (70.55 - 139.29)
	2.5	141.28 (83.53 - 172.5)	34.58 (4.77 - 89.13)	77.66 (70.85 - 138.03)
	5	249.89 (160.3 - 313.86)	46.02 (13.51 - 140.66)	197.59 (96.42 - 296.02)
12	0	159.88 (128.96 - 195.64)	35.19 (8.14 - 87.56)	91.39 (41.4 - 169.13)
	0.5	400.29 (150.09 - 823.02)	188.33 (12.77 - 301.9)	134.92 (32.49 - 521.12)
	2.5	169.96 (128.27 - 213)	28.3 (17.81 - 92.04)	103.3 (92.93 - 124.62)
	5	312.32 (152.17 - 519.71)	66.77 (39.34 - 163.98)	210.66 (129.64 - 379.57)

GSH-Eq: glutatión total (GSH + GSSG), GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado. Los datos se muestran como mediana con percentiles 25% y 75%. Nivel de significancia estadística,  $p < 0.05$ .

**Tabla V.** Concentración de glutatión en mioblastos de elefante marino en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>).

Tiempo (h)	Concentración (μM)	GSH EQ (nmol mg <sup>-1</sup> proteína)	GSH (nmol mg <sup>-1</sup> proteína)	GSSG (nmol mg <sup>-1</sup> proteína)
1	0	362.59 (271.69 - 873.24)	141.33 (108.63 - 361.7)	253.96 (151.55 - 523.04)
	0.5	470.85 (326.27 - 755.97)	226.56 (166.49 - 430.04)	244.28 (159.82 - 325.92)
	2.5	684.58 (330.4 - 1153.11)	323.23 (104.81 - 607.3)	362.69 (225.59 - 545.81)
	5	432.41 (290.71 - 738.56)	214.2 (149.88 - 333.5)	267.03 (134.31 - 411.58)
6	0	400.76 (215.58 - 635.47)	130.84 (86.82 - 365.67)	128.76 (119.71 - 278.86)
	0.5	494.37 (351.92 - 683.82)	258.92 (183.02 - 353.58)	235.44 (154.95 - 344.19)
	2.5	1110.98 (910.15 - 1844.25)	685.5 (473.44 - 1412.22)	432.03 (345.82 - 522.91)
	5	614.7 (478.8 - 803.77)	376.27 (335.27 - 468.14)	277.84 (102.53 - 376.63)
12	0	718.58 (568.6 - 822.02)	270.4 (202.69 - 383.02)	403.26 (203.84 - 601.06)
	0.5	469.84 (365.49 - 554.89)	285.17 (150.46 - 417.889)	196.24 (101.38 - 250.65)
	2.5	273.13 (123.95 - 449.33)	183.8 (74.02 - 267.33)	115.59 (49.93 - 182)
	5	630.65 (144.11 - 1416.38)	314.75 (140.3 - 523.57)	315.9 (3.81 - 892.8)

GSH-Eq: glutatión total (GSH + GSSG), GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado. Los datos se muestran como mediana con percentiles 25% y 75%. Nivel de significancia estadística, p<0.05.



**Figura 9.** Concentración de glutatión total (GSH-Eq, nanomoles por miligramo de proteína) en mioblastos de humano y elefante marino del norte. A) 1 h, B) 6 h y C) 12 h de incubación, expuestos a concentraciones crecientes de cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>). Las letras dentro de las gráficas indican diferencias entre concentraciones de exposición a un tiempo específico; los números indican diferencias entre los tiempos de incubación a una concentración específica; \* indica diferencias entre especies. Nivel de significancia estadística,  $p < 0.05$ .

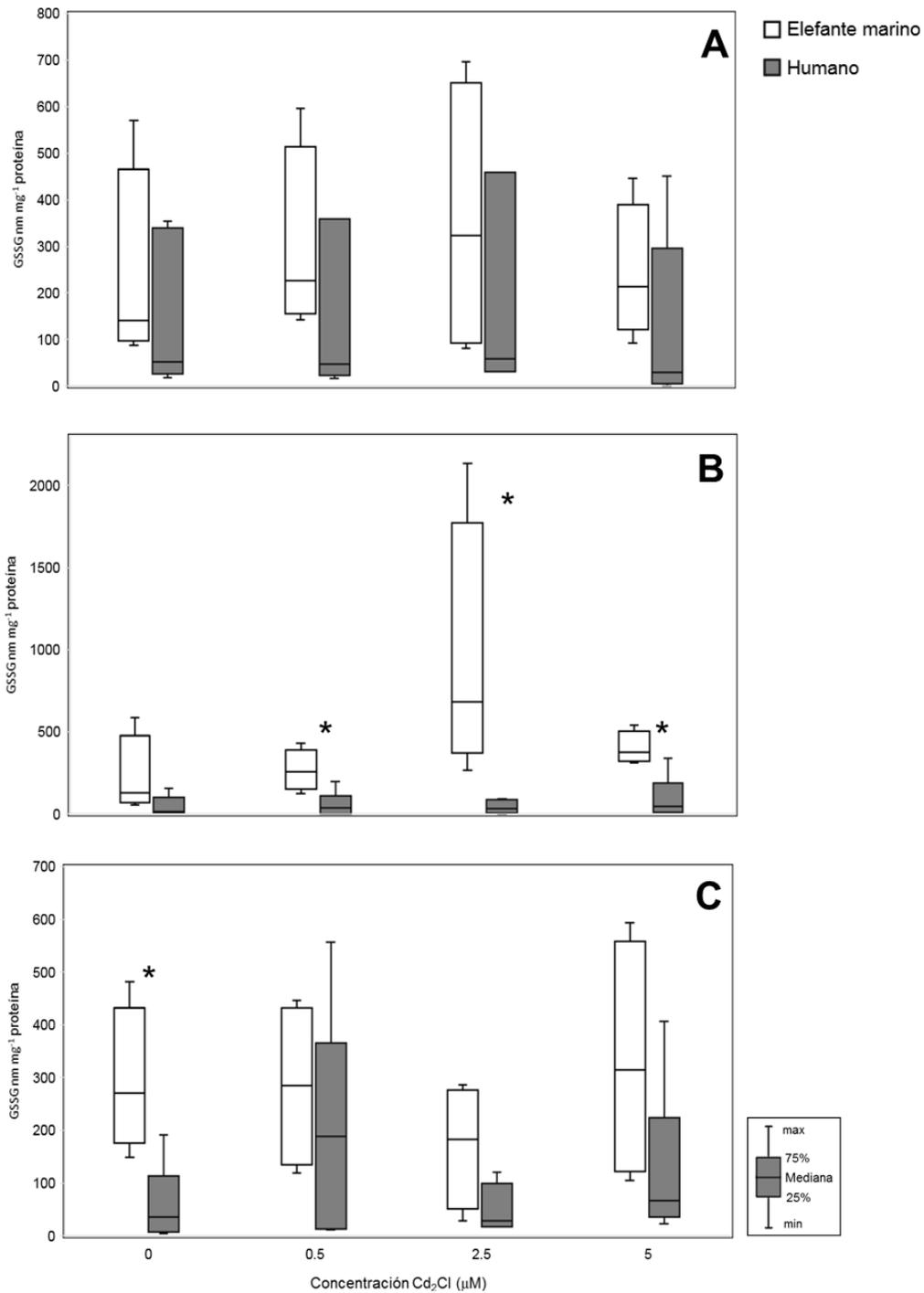
#### 7.2.2.5.2 Glutati3n oxidado (GSSG)

La concentraci3n de GSSG en mioblastos de humanos fue menor a 210 nmol mg<sup>-1</sup> prote3na (Fig. 10, Tabla IV). A 1 h de incubaci3n, se observ3 menor concentraci3n de GSSG en el tratamiento con 5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y mayor concentraci3n en el grupo control; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 24) = 1.51, p = 0.6792). A 6 h de incubaci3n, la menor concentraci3n de GSSG se registr3 en el tratamiento con 2.5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y la mayor en el tratamiento con 5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 24) = 1.28, p = 0.7323). A 12 h de incubaci3n, la menor concentraci3n de GSSG se encontr3 en el grupo control y la mayor en el tratamiento con 5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 24) = 3.02, p = 0.3886). Considerando 3nicamente los tiempos de incubaci3n (sin considerar las concentraciones de CdCl<sub>2</sub>), la concentraci3n de GSSG aument3 conforme increment3 el tiempo de incubaci3n (Anexo C); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas (H (2, N = 72) = 3.97, p = 0.1370).

La concentraci3n de GSSG en mioblastos de elefante marino del norte fue menor a 432 nmol mg<sup>-1</sup> prote3na (Fig. 9, Tabla V). A 1 h de incubaci3n, se observ3 menor concentraci3n de GSSG en el tratamiento con 0.5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y mayor en el tratamiento con 2.5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (H (3, N = 16) = 0,79, p = 0.8509). A 6 h de incubaci3n, la menor concentraci3n de GSSG se registr3 en el grupo control y la mayor en el tratamiento con 2.5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 16) = 6.33, p = 0.0966). A 12 h de incubaci3n, la menor concentraci3n de GSSG se encontr3 el tratamiento con 2.5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y la mayor el grupo control; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 16) = 1.83, p = 0.6082).

Considerando únicamente los tiempos de incubación (sin considerar las concentraciones de  $\text{CdCl}_2$ ), la menor concentración de GSSG se encontró a 12 h de incubación y la mayor a 6 h de incubación (Anexo C); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $H(2, N = 48) = 2.03, p = 0.3617$ ).

La concentración de GSSG en mioblastos de humano fue 50% menor que la de mioblastos de elefante marino del norte (Anexo C). Las comparaciones entre especies para mioblastos sometidos al mismo tratamiento (tiempo e incubación) sugieren diferencias significativas entre especies para el tratamiento con  $0.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ,  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ,  $.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ , todos a 6 h de incubación, y el grupo control a 12 h de incubación ( $p < 0.019$ ).



**Figura 10.** Concentración de glutatión oxidado (GSSG, nanomoles por miligramo de proteína) en mioblastos de humano y elefante marino del norte. A) 1 h, B) 6 h y C) 12 h de incubación, expuestos a concentraciones crecientes de cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>). \* indica diferencias entre especies. Nivel de significancia estadística,  $p < 0.05$ .

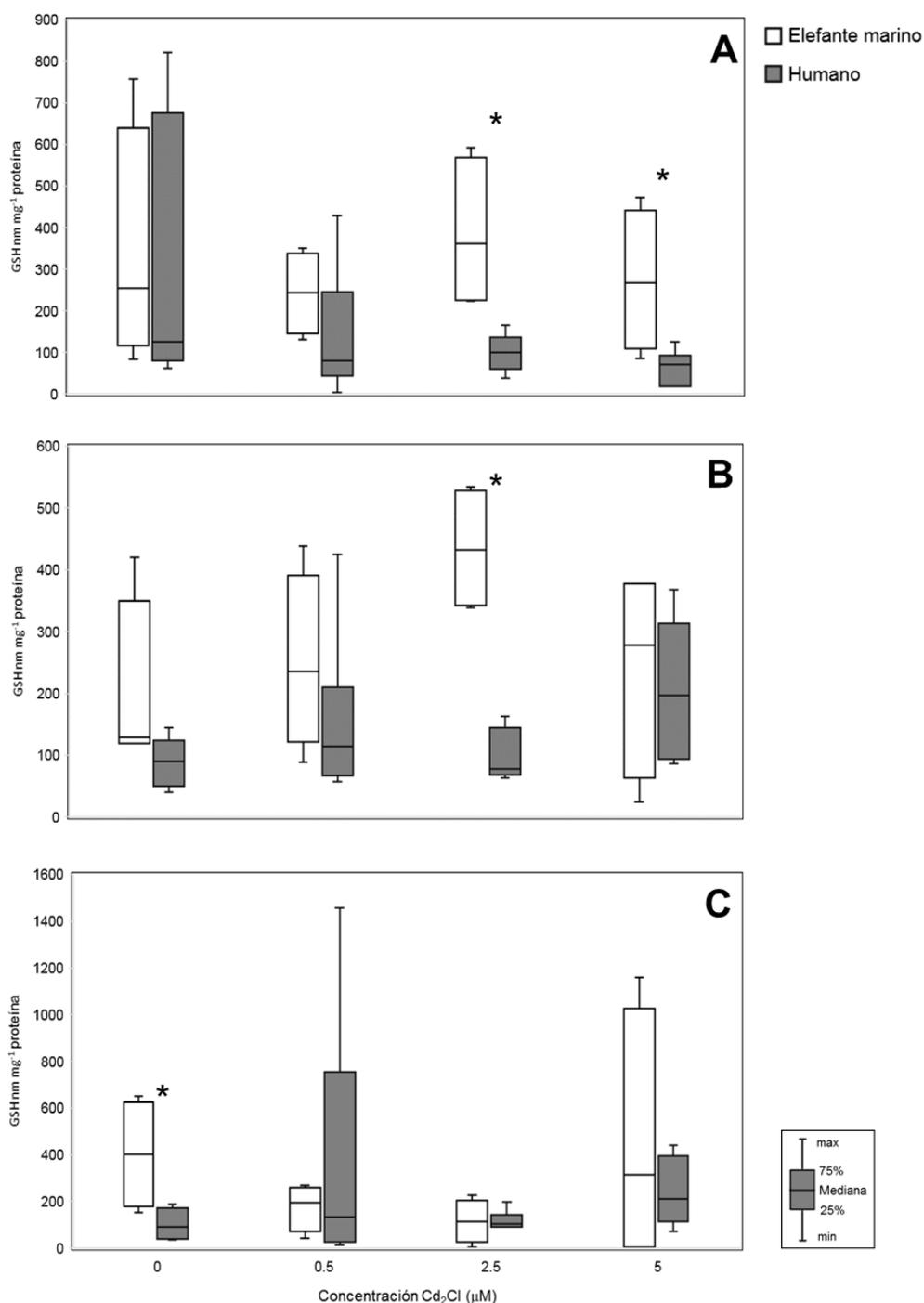
### 7.2.2.5.3 Glutati3n reducido (GSH)

La concentraci3n de GSH en mioblastos de humanos fue menor a 189 nmol mg<sup>-1</sup> prote3na (Fig. 11, Tabla IV). A 1 h de incubaci3n, se observ3 menor concentraci3n de GSH en el tratamiento con 5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y mayor concentraci3n en el tratamiento con 2.5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (H (3, N = 24) = 4.33, p = 0.2276). A 6 h de incubaci3n, la menor concentraci3n de GSH se registr3 en el grupo control y la mayor en el tratamiento con 5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 24) = 4.73, p = 0.1913). A 12 h de incubaci3n, la menor concentraci3n de GSH se encontr3 en el tratamiento con 2.5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y la mayor en el tratamiento con 0.5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 24) = 3.44, p = 0.3277). Considerando 3nicamente los tiempos de incubaci3n (sin considerar las concentraciones de CdCl<sub>2</sub>), la concentraci3n de GSH fue menor a 6 h de incubaci3n y mayor a 12 h de incubaci3n (Anexo C); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas (H (2, N = 72) = 2.26, p = 0.3221).

La concentraci3n de GSH en mioblastos de elefante marino del norte fue menor a 685 nmol mg<sup>-1</sup> prote3na (Fig. 11, Tabla V). A 1 h de incubaci3n, se observ3 menor concentraci3n de GSH en el grupo control y mayor concentraci3n en el tratamiento con 2.5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (H (3, N = 16) = 1.50, p = 0.6823). A 6 h de incubaci3n, la menor concentraci3n de GSSG se registr3 en el grupo control y la mayor en el tratamiento con 2.5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 16) = 3.99, p = 0.2623). A 12 h de incubaci3n, la menor concentraci3n de GSSG se encontr3 en el tratamiento con 2.5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y la mayor el tratamiento con 5  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 16) = 3.17, p = 0.3652).

Considerando únicamente los tiempos de incubación (sin considerar las concentraciones de  $\text{CdCl}_2$ ), la menor concentración de GSH se encontró a 1 h de incubación y la mayor a 6 h de incubación (Anexo C); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $H(2, N = 48) = 0.88, p = 0.6426$ ).

La concentración de GSH en mioblastos de humano fue 15% menor a la de mioblastos de elefante marino del norte (Anexo C). Las comparaciones entre especies para mioblastos sometidos al mismo tratamiento (tiempo e incubación) sugieren diferencias significativas entre especies para el tratamiento con  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  y  $5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  a 1 h de incubación;  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  a 6 h de incubación y en el grupo control a 12 h de incubación ( $p < 0.033$ ).



**Figura 11.** Concentración de glutatión reducido (GSH, nanomoles por miligramo de proteína) en mioblastos de humano y elefante marino del norte. A) 1 h, B) 6 h y C) 12 h de incubación, expuestos a concentraciones crecientes de cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>). \* indica diferencias entre especies. Nivel de significancia estadística,  $p < 0.05$ .

### 7.2.3 Daño oxidativo

#### 7.2.3.1 Tasa de glutatión oxidado: glutatión total (GSSG/GSH-Eq)

La tasa de GSSG:GSH-Eq en mioblastos de humanos fue menor a 0.45 (Fig. 12, Tabla VI). A 1 h de incubación, se observó la menor tasa de GSSG:GSH-Eq en el grupo control y la mayor en el tratamiento con  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  ( $H(3, N = 24) = 1.83, p = 0.6077$ ). A 6 h de incubación, la tasa de GSSG:GSH-Eq se incrementó con la concentración de  $\text{CdCl}_2$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $H(3, N = 24) = 1.20, p = 0.7514$ ). A 12 h de incubación, la menor tasa de GSSG:GSH-Eq se registró en el tratamiento con  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  y la mayor en el grupo control ( $H(3, N = 24) = 0.20, p = 0.9765$ ). Considerando únicamente los tiempos de incubación (sin considerar las concentraciones de  $\text{CdCl}_2$ ), la tasa de GSSG:GSH-Eq disminuyó conforme se incrementó el tiempo de incubación (Anexo C); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $H(2, N = 72) = 3.23, p = 0.1984$ ).

La tasa de GSSG:GSH-Eq en mioblastos de elefante marino del norte fue menor a 0.69 (Fig. 12, Tabla VII). A 1 h de incubación, se observó menor tasa de GSSG:GSH-Eq en el grupo control y mayor en el tratamiento con  $0.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  ( $H(3, N = 16) = 1.83, p = 0.6082$ ). A 6 h de incubación, la tasa de GSSG:GSH-Eq aumentó conforme se incrementó la concentración  $\text{CdCl}_2$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $H(3, N = 16) = 2.80, p = 0.4233$ ). A 12 h de incubación, se observó menor tasa de GSSG:GSH-Eq en el grupo control y mayor en el tratamiento con  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $H(3, N = 16) = 1.47, p = 0.6874$ ). Considerando únicamente los tiempos de incubación (sin considerar las concentraciones de  $\text{CdCl}_2$ ), la tasa de GSSG:GSH-Eq fue menor a 1 h de incubación y mayor a 12 h de incubación (Anexo C); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $H(2, N = 48) = 2.29, p = 0.3172$ ).

La tasa de GSSG:GSH-Eq en mioblastos de humano fue 30% menor a la de mioblastos de elefante marino del norte (Anexo C). Las comparaciones entre especies para mioblastos sometidos al mismo tratamiento (tiempo e incubación) no arrojaron diferencias significativas.

**Tabla VI.** Tasa de glutatión oxidado: glutatión total (GSSG-GSH-Eq) en mioblastos de humano en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>).

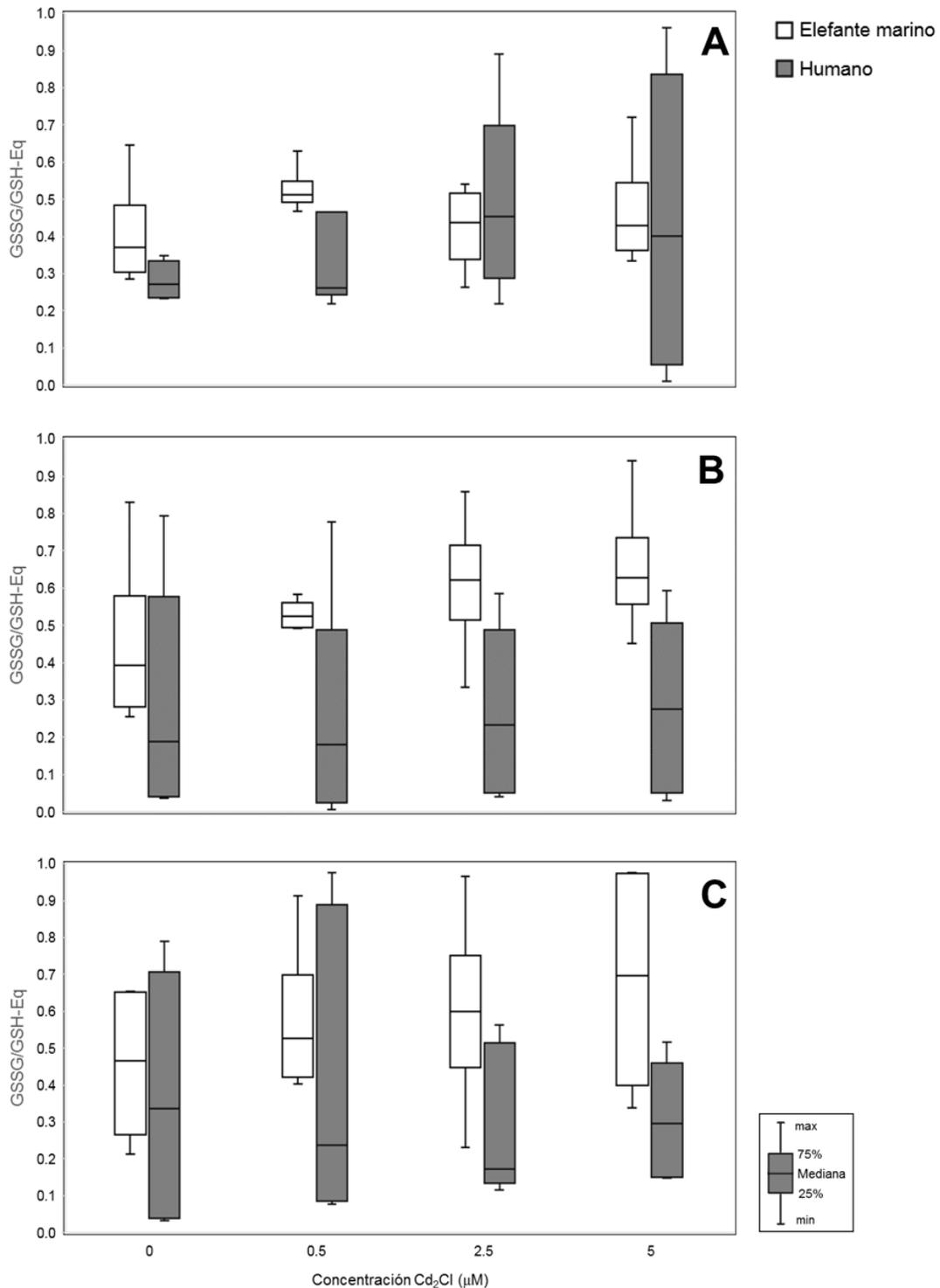
Tiempo (h)	Concentración (μM)	GSSG:GSH-Eq
1	0	0.27 (0.23 – 0.33)
	0.5	0.26 (0.25 – 0.28)
	2.5	0.45 (0.31 - 0.63)
	5	0.40 (0.07 - 0.79)
6	0	0.18 (0.04 - 0.50)
	0.5	0.18 (0.03 – 0.39)
	2.5	0.23 (0.05 – 0.45)
	5	0.27 (0.05 – 0.47)
12	0	0.33 (0.04 – 0.68)
	0.5	0.23 (0.09 – 0.86)
	2.5	0.17 (0.13 - 0.49)
	5	0.29 (0.15 – 0.44)

GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado. Los datos se muestran como mediana con percentiles 25% y 75%. Nivel de significancia estadística,  $p < 0.05$ .

**Tabla VII.** Tasa de glutatión oxidado: glutatión total (GSSG:GSH-Eq) en mioblastos de elefante marino en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>).

Tiempo (h)	Concentración (μM)	GSSG:GSH-Eq
1	0	0.36 (0.29 – 0.53)
	0.5	0.51 (0.48 - 0.57)
	2.5	0.43 (0.31 – 0.52)
	5	0.42 (0.35 – 0.60)
6	0	0.39 (0.27 – 0.66)
	0.5	0.52 (0.49 – 0.57)
	2.5	0.62 (0.45 - 0.76)
	5	0.63 (0.52 - 0.80)
12	0	0.46 (0.24 – 0.65)
	0.5	0.52 (0.41 - 0.77)
	2.5	0.60 (0.38 – 0.82)
	5	0.69 (0.37 - 0.97)

GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado. Los datos se muestran como mediana con percentiles 25% y 75%. Nivel de significancia estadística,  $p < 0.05$ .



**Figura 12.** Tasa de glutatión oxidado: glutatión total (GSSG:GSH-Eq) en mioblastos de humanos y elefante marino del norte. A) 1 h, B) 6 h y C) 12 h de incubación, expuestos a concentraciones crecientes de cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>). Nivel de significancia estadística,  $p < 0.05$ .

### 7.2.3.2 Carbonilos proteicos

La concentración de carbonilos proteicos en mioblastos de humano expuestos a concentraciones crecientes de CdCl<sub>2</sub> estuvieron entre los 0.01 y 0.03 nmol mg<sup>-1</sup> proteína (Fig. 14, Tabla VIII). A 1 h de incubación, la menor concentración de carbonilos proteicos se encontró en el grupo control y la mayor en el tratamiento con 2.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (H (3, N = 24) = 0.48 p = 0.9233). A 6 h de incubación, la menor concentración de carbonilos proteicos se observó en el tratamiento con 2.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y la mayor en el tratamiento con 5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (H (3, N = 24) = 5.96, p = 0.1132). A 12 h de incubación, se encontró la menor concentración de carbonilos proteicos en el tratamiento con 0.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y la mayor en el grupo control; no se observaron diferencias significativas entre tratamientos (H (3, N = 24) = 0.82, p = 0.8447). Al comparar únicamente entre tiempos incubación, sin considerar las concentraciones de CdCl<sub>2</sub>, no se observaron diferencias significativas (H (2, N = 72) = 2.74, p = 0.2541).

En mioblastos de elefante marino del norte la concentración de carbonilos proteicos fue menor a 0.02 nmol mg<sup>-1</sup> proteína (Fig. 14, Tabla IX). A 1 h de incubación, las menores concentraciones de carbonilos proteicos estuvieron en el tratamiento con 0.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y con 2.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>, mientras que las mayores estuvieron en el grupo control y en el tratamiento con 5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos con diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (H (3, N = 16) = 0.68, p = 0.8770). A 6 h de incubación, la menor cantidad de carbonilos proteicos se encontró en el tratamiento con 0.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> y la mayor en el tratamiento con 2.5 μM CdCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H (3, N = 16) = 5.05, p = 0.1681).

A 12 h de incubación, la mayor concentración de carbonilos proteicos se observó en el tratamiento con 5  $\mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  y el menor en el tratamiento con 2.5  $\mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  ( $H(2, N = 48) = 0.59$   $p = 0.7426$ ). Al comparar únicamente entre tiempos incubación, sin considerar las concentraciones de  $\text{CdCl}_2$ , no se observaron diferencias significativas ( $H(3, N = 16) = 3.93$ ,  $p = 0.2689$ ).

Comparando entre especies se encontró que la concentración de carbonilos proteicos fue mayor en mioblastos de humano que en aquellos de elefante marino del norte únicamente para el tratamiento con 0.5  $\mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  a 6 h de incubación ( $p = 0.0105$ ).

**Tabla VIII.** Concentración de carbonilos proteicos en mioblastos de humano en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ).

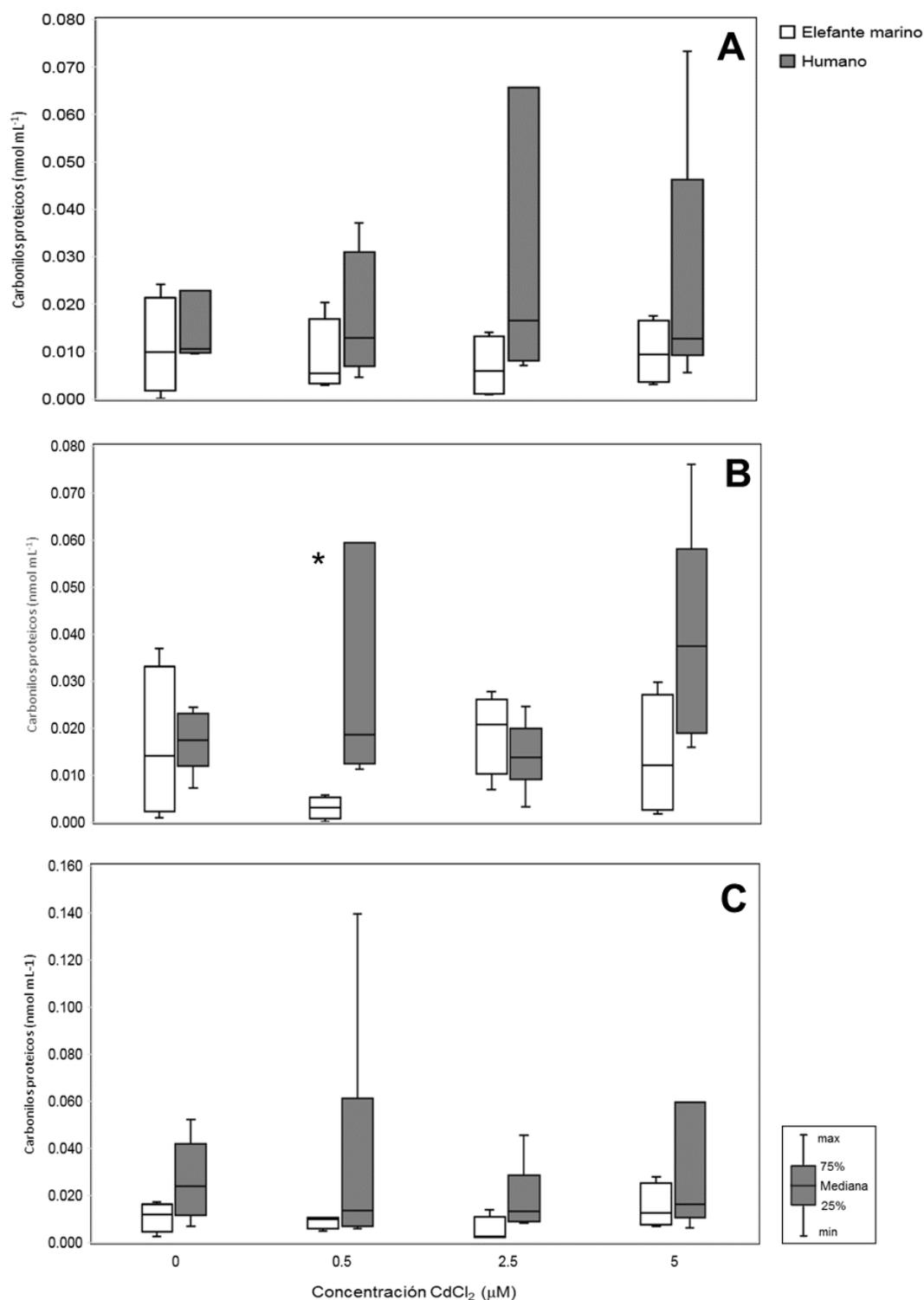
Tiempo (h)	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Carbonilos proteicos ( $\text{nmol mg}^{-1}$ proteína)
1	0	0.010 (0.009–0.049)
	0.5	0.012 (0.004–0.037)
	2.5	0.016 (0.007–0.18)
	5	0.012 (0.005–0.07)
6	0	0.017 (0.007–0.024)
	0.5	0.018 (0.011–0.059)
	2.5	0.013 (0.003–0.024)
	5	0.03 (0.015–0.076)
12	0	0.024 (0.006–0.052)
	0.5	0.013 (0.005–0.13)
	2.5	0.013 (0.008–0.045)
	5	0.016 (0.006–0.14)

Los datos se muestran como mediana con percentiles 25% y 75%. Nivel de significancia estadística,  $p < 0.05$ .

**Tabla IX.** Concentración de carbonilos proteicos en mioblastos de elefante marino en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición a cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>).

Tiempo (h)	Concentración (μM)	Carbonilos proteicos (nmol mg <sup>-1</sup> proteína)
1	0	0.009 (0.0001–0.024)
	0.5	0.005 (0.002–0.020)
	2.5	0.005 (0.0009–0.014)
	5	0.009 (0.003–0.017)
6	0	0.014 (0.0009–0.036)
	0.5	0.003 (0.0001–0.005)
	2.5	0.020 (0.006–0.027)
	5	0.012 (0.001–0.029)
12	0	0.011 (0.002–0.017)
	0.5	0.009 (0.004–0.010)
	2.5	0.002 (0.002–0.013)
	5	0.012 (0.007–0.028)

Los datos se muestran como mediana con percentiles 25% y 75%. Nivel de significancia estadística, p<0.05.



**Figura 13.** Concentración de carbonilos proteicos en nmol mL<sup>-1</sup> en mioblastos de humanos y elefante marino del norte. A) 1 h, B) 6 h y C) 12 h de incubación, expuestos a concentraciones crecientes de cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>). \* indica diferencias entre especies. Nivel de significancia estadística, p<0.05.

## 8. DISCUSIÓN

El Cd interfiere con los procesos vitales de las células simulando ser un elemento esencial y de manera indirecta provoca un incremento en la producción de ERO (Martelli *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Taki, 2013). Para contrarrestar el daño celular provocado se activan mecanismos de protección, el más importante de ellos tiene como protagonista al glutatión. El glutatión ayudado por enzimas como GST, GR y GPx protegen a las células de los efectos causados por Cd (Chin y Templeton, 1993; Beyersmann y Hechtenberg, 1997); en ocasiones este sistema resulta superado por la cantidad de Cd y se generan daños a proteínas, lípidos y ADN; reduciendo con ello la viabilidad celular (Chin y Templeton, 1993; Eneman *et al.*, 2000; Nzungue *et al.*, 2011).

### 8.1 Sobrevivencia

Los daños causados a las células por químicos como el Cd conllevan una serie de procesos que pueden culminar en la muerte celular (Waisberg *et al.*, 2003; Maret y Moulis, 2013; Taki, 2013). La muerte celular puede ocurrir por dos procesos: a) necrosis, causada por un daño físico, químico y osmótico asociado a la ruptura la membrana celular; y b) apoptosis, asociada a marcadores celulares que activan su propia muerte (Kroemer *et al.*, 1995).

De acuerdo a Hart *et al.* (1999) y a Song *et al.* (2015) la viabilidad de las células disminuye conforme se incrementa el tiempo de exposición a 10 y 20  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  y la sensibilidad que presenten al tratamiento depende del tipo de células. En el presente estudio, se registró una sobrevivencia del 87 al 95% para los mioblastos de humanos expuestos a concentraciones de 0 a 5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ . Esto puede sugerir que las dosis empleadas en este estudio fueron lo suficientemente bajas para no inducir la muerte celular. También, es posible que a dosis bajas sea necesario un mayor tiempo de incubación para poder observar cambios más drásticos en la sobrevivencia de las células en cultivo. Otro punto a considerar es que el cultivo no esté muriendo como consecuencia de la exposición, sino que esté

disminuyendo la proliferación celular; de acuerdo a Templeton y Liu (2010) esto ocurre a concentraciones submicromolares y por debajo de  $10 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$

A diferencia de los mioblastos de humano, los de elefante marino del norte presentaron un intervalo de sobrevivencia de 40 a 80% entre las distintas concentraciones y tiempos de incubación utilizados. De acuerdo a Hart *et al.* (1999) la sobrevivencia de las células disminuye 15% entre el grupo control y el expuesto a  $20 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  por 24 h. Sin embargo, en los mioblastos de elefante marino del norte los grupos control a 6 y 12 h de incubación presentaron una sobrevivencia menor respecto a los expuestos a  $\text{CdCl}_2$ . Dado que el efecto que causa la exposición al Cd depende, no sólo de la duración y nivel de exposición, sino de otros factores intrínsecos de la propia célula y su estado metabólico actual Templeton y Liu (2010); la mortalidad de los mioblastos de elefante marino del norte en cultivo no puede ser atribuida directamente al tratamiento de exposición a  $\text{CdCl}_2$  sino posiblemente a condiciones de mortalidad intrínseca del cultivo.

## 8.2 Defensas antioxidantes

### 8.2.1 Glutación S-transferasa (EC 2.5.1.18).

Una de las principales enzimas que conforman el sistema de detoxificación fase II, es GST. Esta enzima cataliza la conjugación del grupo tiol del GSH a un segundo sustrato (Halliwell y Gutteride, 2007); en este caso el segundo sustrato es  $\text{Cd}^{+2}$ . Con esta reacción se evita que el Cd siga reaccionando con otras moléculas y pueda ser eliminado del sistema a través de la bilis y orina (Arita y Costa, 2009; Maret y Moulis, 2013).

En el presente estudio al comparar la actividad de GST en mioblastos de humano sometidos al mismo tratamiento de  $\text{CdCl}_2$  y diferentes tiempos de incubación, no se observaron diferencias significativas; sin embargo, en mioblastos de elefante marino del norte, a pesar de no existir diferencias significativas, es posible observar un patrón. A bajas concentraciones ( $0.5$  y  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ) la

actividad de GST aumenta a 6 h y disminuye a 12 h de incubación, mientras que a altas dosis ( $5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ) la actividad se mantiene a 6 h y disminuye drásticamente a 12 h de incubación. Este patrón fue también detectado en células musculares C2C12 de ratones por Yano y Cintra-Gomes (2005), en las que la actividad de GST se eleva a bajas concentraciones de Cd ( $1-3 \mu\text{M}$ ), pero se inhibe al incrementar la concentración ( $> 5 \mu\text{M}$ ). Los cambios en la actividad de GST se deben a la activación de mecanismos para desactivar las moléculas de Cd, y evitar que éstas reaccionen con otras moléculas al interior de la célula (Arita y Costa, 2009; Taki, 2013).

Adicionalmente estos datos sugieren que, en los periodos más cortos de incubación, las células fueron sometidas a estrés fisiológico y se activó el sistema de detoxificación para contrarrestar el efecto de Cd. El incremento en la actividad de GST se relaciona directamente con la producción de GSH (Yano y Cintra-Gomes, 2005) que atrapa ERO y actúa como cofactor en el metabolismo de detoxificación de dichas moléculas (Halliwell y Gutteridge, 2007). Es posible que, al transcurrir el tiempo de incubación o incrementar la concentración de Cd, el incremento de ERO exceda la capacidad de aumento de la actividad de GST y/o la capacidad catalítica para reducir GSH; esto último lleva a un desbalance entre la cantidad del sustrato (Cd) y de GSH, evitando con ello que GST catalice la reacción (Mehlen *et al.*, 1997; Yano y Cintra-Gomes-Marcondes, 2005; Casalino *et al.*, 2006).

Al comparar entre especies, en este estudio se observa una mayor actividad de GST en mioblastos de humano en todos los tratamientos (sólo significativa para el grupo control a 1 h y el tratamiento  $0.5 \text{ CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  a 12 h). Estos datos sugieren que las células de mamíferos marinos responden de manera diferente, quizá debido a que generalmente estas especies se encuentran sometidas a mayores niveles de contaminantes, como el Cd (Méndez *et al.*, 2002), y/o a que presentan mayores niveles de antioxidantes que los mamíferos terrestres para contrarrestar el estrés oxidativo al que están sujetos como producto del ciclo isquemia-reperfusión asociado al buceo (Zenteno-Savín *et al.*, 2002; Vázquez-Medina *et al.*, 2006).

### 8.2.2 Glutación disulfuro reductasa (EC 1.8.1.7)

Para que GSH pueda seguir donando electrones, ya sea para convertir el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) a agua o para unirse al Cd, es necesario que regrese de su forma oxidada (GSSG) a su forma reducida (GSH), esta transformación la cataliza la enzima GR, utilizando como cofactor al NADPH (Halliwell y Gutteridge 2007).

En el presente estudio, la actividad de GR en mioblastos de humano y elefante marino del norte disminuyó (NS) con el tiempo de incubación a diferentes concentraciones de  $CdCl_2$ . La disminución de la actividad de GR está relacionada con reducción de los niveles de GSH que conlleva a acumulación de GSSG, ello provoca desbalance en la tasa GSSG:GSH-Eq, así como un potencial estado de estrés oxidativo en la célula; además, al reducirse los niveles de GSH, éstos pueden resultar insuficientes para mantener la actividad de GST. De acuerdo a Kim *et al.* (2010) el Cd puede interferir con la regulación de la actividad de GR; esta interferencia produce cambios diferentes en distintos tipos de células y, en conjunto con la actividad de GPx, puede ayudar a explicar la sensibilidad de cada tipo de célula a estrés oxidativo (Yano y Cintra-Gomes, 2005).

### 8.2.3 Glutación peroxidasa (EC 1.11.1.9)

Otra de las formas en las que el GSH ayuda a contrarrestar el estrés oxidativo ocasionado por el Cd es a través de la enzima GPx, la cual se encarga de remover el  $H_2O_2$ , convirtiéndolo en agua, utilizando dos moléculas de GSH que son oxidadas a GSSG (Halliwell y Gutteridge, 2007).

En el presente trabajo, se observó que la actividad de GPx en mioblastos de humanos se incrementa a 6 h de incubación ( $p < 0.05$ ). Este incremento en la actividad de GPx sugiere que la exposición a Cd en este tipo de células incrementa la producción de ERO, particularmente  $H_2O_2$ , lo que podría reflejarse como una mayor demanda de GSH para contrarrestar el estrés oxidativo provocado por Cd (Yano y Cintra-Gomes, 2005).

Al comparar entre especies, la actividad de GPx en los mioblastos de elefante marino del norte corresponde a sólo el 5% de la observada en mioblastos de humanos ( $p < 0.05$ ). De acuerdo a Yang *et al.* (2006), el Cd causa una disminución de la tasa GSH/GSSG en células HepG2 y glioma C6, pero existe una mayor sensibilidad de las últimas; los autores sugieren que las enzimas involucradas en el metabolismo del glutatión difieren entre tipos de células. Los resultados del presente estudio sugieren que, al ser mayor la actividad de GPx en mioblastos de humano, éstos son más sensibles al CdCl<sub>2</sub> que las del elefante marino. Esto apoya la hipótesis del presente estudio que los mayores niveles de antioxidantes, debido a los procesos de isquemia/reperfusión asociados al buceo, en mamíferos marinos (Zenteno-Savín *et al.*, 2002; Vázquez-Medina *et al.*, 2006; Vázquez-Medina *et al.*, 2007) les provee una mayor protección contra exposición a Cd.

#### 8.2.4 Purina nucleósido fosforilasa (EC 2.4.2.1).

La enzima PNP participa en el metabolismo de purinas, es la encargada de eliminar la ribosa-1-fosfato de los nucleósidos guanosina, xantosa e inosina, dando como resultado guanina, xantina e hipoxantina, respectivamente (Chu *et al.*, 1989; Lehninger *et al.*, 2005). Además participa en procesos de detoxificación celular, y también se le conoce como arsenato reductasa, ya que se encarga de la transformación del arsenato (As<sup>V</sup>) a arsenito (As<sup>III</sup>) (Bzowska *et al.*, 2000; Gregus y Nemeti, 2002; Radabaugh *et al.*, 2002; De Chaudhuri *et al.*, 2008).

En el presente estudio, la actividad de PNP en mioblastos de humanos fue mayor a 1 h de exposición, mientras que en mioblastos de elefante marino del norte la actividad de PNP aumentó con el tiempo de incubación ( $p < 0.05$ ) y a 6 h de incubación la actividad incrementó a bajas concentraciones (0.5 y 2.5  $\mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ) y disminuyó a altas concentraciones (5  $\mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$ ). De acuerdo a Gregus y Nemeti (2002), PNP, al poseer cisteína en su estructura, aporta grupos tiol junto con GSH, además de trabajar en conjunto con esta molécula. En el caso del Cd, esta aportación de grupos tiol contribuye a que la enzima GST pueda facilitar la eliminación del Cd. Por otro lado, PNP puede contribuir a la regeneración del GSH

a través del metabolismo de purinas, en el cual se encarga de transformar las purinas a sus bases más simples que, a través del reciclaje de purinas, restablece los niveles de ATP. El ATP es la fuente de energía para las enzimas gama-glutamil-cisteína sintetasa y GSH sintetasa, encargadas de producir GSH a partir de los aminoácidos L-glutamato y L-cisteína (Meister, 1995; Lin y Yang, 2007).

Por otro lado, al comparar entre especies se observan mayores actividades de PNP en mioblastos de humanos que en mioblastos de elefante marino del norte, en todos los tratamientos y tiempos de incubación ( $p < 0.05$ , excepto en grupo control a 12 h y  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  a 6 h). Estas diferencias han sido reportadas previamente por López-Cruz *et al.* (2014) en eritrocitos de elefante marino del norte y humano, ellos sugieren que PNP incrementa su actividad en mamíferos no buceadores, como el humano, en respuesta a la degradación de ATP, mientras que, en mamíferos buceadores, como el elefante marino, la cantidad de nucleótidos de guanina y adenina es mantenido por la vía de reciclaje por lo que la actividad de PNP es menor.

#### 8.2.5 Glutati6n

El GSH es la primera lnea de defensa contra la toxicidad de Cd (Sighal *et al.*, 1987), ya que es necesario para secuestrar el  $\text{Cd}^{2+}$  que es liberado de la degradaci6n lisosomal del Cd unido a metalotioneinas (Sk y Bhattacharya, 2006). El GSH tambi6n tiene funciones importantes en el metabolismo celular, entre las que se incluyen el mantenimiento del estado reducido intracelular, almacena y transporta cisteina, protege a la c6lula del estr6s oxidativo al reaccionar con ERO antes de que interact6en con otras proteinas esenciales y participa como sustrato espec6fico para enzimas como GPx y GST (Meister, 1995; Sk y Bhattacharya, 2006).

En el presente estudio, al comparar entre especies se observa una menor concentraci6n de GSH en mioblastos de humano en el tratamiento a  $2.5$  y  $5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  a 1 h de incubaci6n, en el tratamiento  $2.5 \mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  a 6 h de incubaci6n y en el grupo control a 12 h de incubaci6n. De acuerdo a Suzuki y Cherian (1989), la disminuci6n de GSH incrementa la toxicidad del Cd, al no poder

contrarrestar sus efectos; por otro lado, Sk y Bhattacharya (2006) sugieren que, en células del epitelio renal, si se reducen los niveles de GSH las células son susceptibles a la toxicidad de Cd, aún a niveles muy bajos del metal. Lo encontrado por estos autores sugiere que los mioblastos de humano son más sensibles a bajas concentraciones de Cd, en comparación con los mioblastos de elefante marino del norte. Trabajos como los de Vázquez-Medina *et al.* (2006, 2007) han reportado mayores concentraciones de GSH en mamíferos marinos en comparación con mamíferos terrestres. Estos mayores niveles de antioxidantes en mamíferos marinos son asociados a la capacidad de suspender la respiración durante el buceo en apnea y los consecuentes ciclos de isquemia-reperusión, que por sí mismos aumentan la producción de ERO (Halliwell y Gutteridge, 2007).

La concentración de GSSG fue mayor en elefante marino del norte en los tratamientos a 0.5, 2.5 y 5  $\mu\text{M CdCl}_2 \text{ mL}^{-1}$  a 6 h de incubación y en el grupo control a 12 h de incubación ( $p < 0.05$ ). Ello sugiere que la concentración de GSSG aumenta debido a que GSH está donando sus electrones para evitar que  $\text{H}_2\text{O}_2$  cause daño en la célula. Por tanto, GPx podría contrarrestar el efecto del Cd sobre la producción de ERO, mientras que la actividad de GR disminuye y no se regenera el GSH, el sistema no podría seguir funcionando para evitar los daños ocasionados por Cd (Waisberg *et al.*, 2003; Halliwell y Gutteridge, 2007; Nzungue *et al.*, 2011).

### 8.3 Daño oxidativo

#### 8.3.1 Tasa de glutatión oxidado: glutatión total (GSSG:GSH-Eq)

Las células vivas mantienen estables los niveles de metabolitos intermediarios como GSH y GSSG a través de reacciones enzimáticas específicas para producirlos o degradarlos; sin embargo, este balance puede ser perturbado por un incremento en la producción de ERO debido a la exposición a Cd (Beyersmann y Hechtenberg, 1997; Yang *et al.*, 2004; Martelli *et al.*, 2006). La tasa o relación entre los niveles de GSSG y GSH-Eq se utiliza como un indicador del cambio del estado oxidado y reducido en la célula (Jones, 2002)

En el presente estudio, no se encontraron diferencias en GSSG:GSH-Eq entre los tiempos de incubación, las concentraciones de exposición, ni entre especies. Estos datos sugieren que a pesar de existir cambios en las actividades de algunos antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) debido a la exposición a Cd, el sistema actúa de manera eficiente para evitar daños intracelulares.

### 8.3.2 Carbonilos proteicos

Las ERO pueden dañar todo tipo de moléculas biológicas, entre ellas las proteínas, las cuales pueden formar carbonilos proteicos. Los carbonilos proteicos son producidos a partir de la reacción de aldehídos o cetonas procedentes de lipoperoxidación o de oxidación de azúcares/carbohidratos con proteínas; estas modificaciones son relativamente estables y sensibles a su detección, por lo que son usadas como marcadores de estrés oxidativo (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

En el presente estudio no se observaron diferencias significativas en los niveles de carbonilos proteicos en mioblastos de humano y de elefante marino del norte en respuesta a la exposición a CdCl<sub>2</sub>. Ello sugiere que los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes y los antioxidantes que participan en los mecanismos de detoxificación fueron suficientes para evitar un daño oxidativo aún a las concentraciones de CdCl<sub>2</sub> más elevadas.

## 9. CONCLUSIONES

- La sobrevivencia en mioblastos de humanos fue del 87 al 95%, lo cual puede sugerir que las dosis empleadas fueron suficientemente bajas para evitar la muerte celular, o que el tiempo de incubación fue muy corto para poder observar cambios significativos en la sobrevivencia.
- La sobrevivencia en mioblastos de elefante marino del norte presentó un amplio intervalo (40-80%), estas variaciones no pueden ser atribuidas a la exposición a Cd, sino posiblemente a la mortalidad intrínseca del cultivo.
- Las células de elefante marino del norte y de humano no responden de la misma manera a la exposición a Cd; debido a que los mamíferos marinos se encuentran expuestos a mayores niveles de Cd de manera natural, tal vez no son tan susceptibles a daño oxidativo. También, es posible que, debido a que los mamíferos marinos presentan mayores niveles de antioxidantes que los mamíferos terrestres, estas moléculas que les permiten contrarrestar el estrés oxidativo provocado por Cd.
- La actividad de las enzimas responsables del metabolismo del glutatión difiere entre tipos de células y entre especies. Los resultados del presente estudio sugieren que los mioblastos de humano son más sensibles a la exposición a Cd que los de elefante marino del norte.
- Los resultados del presente estudio sugieren que la enzima PNP contribuye a la regeneración de GSH en mioblastos de humanos, como respuesta a la alta demanda de ATP requerida para eliminar el Cd.
- El sistema de detoxificación analizado en este estudio aparentemente es suficiente para evitar el daño a proteínas y para mantener el estado redox de los mioblastos de humanos y elefantes marinos del norte bajo las condiciones de exposición a Cd (0.5-5  $\mu$ M, 1-12 h) utilizadas.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abshire, M. K., G, S. Buzard, N. Shiraishi, M. P. Waalkes. 1996. Induction of c-myc and c-jun proto-oncogene expression in rat I6 myoblasts by cadmium is inhibited by zinc preinduction of the metallothionein gene. *J. Toxicol. Environ. Health.* 48 (4): 359–77.
- Arita, A., M. Costa. 2009. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium. *Metallomics.* 1: 222–28.
- Berg, J. M., L. Stryer, J. L. Tymocz. 2007. *Bioquímica.* Barcelona: Reverté. 1020p.
- Beyersmann, D., S. Hechtenberg. 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144 (2): 247–61.
- Bracken, W. M., R. P. Sharma, S. J. Kleinschuster. 1984. Cadmium accumulation and subcellular distribution in relation to cadmium chloride induced cytotoxicity in vitro. *Toxicology.* 33: 93–102.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Bzowska, A., E. Kulikowska, D. Shugar. 2000. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.* 88 (2000): 349–425.
- Casalino, E., C. Sblano, G. Calzaretti, C. Landriscina. 2006. Acute cadmium intoxication induces alpha-class glutathione s-transferase protein synthesis and enzyme activity in rat liver. *Toxicology.* 217 (2–3): 240–245.
- Castellini, M. A., P. M. Rivera, J. M. Castellini. 2002. Biochemical aspects of pressure tolerance in marine mammals. *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol.* 133 (3): 893–99.
- Celis de la Rosa, A, V. Labrada-Martagon. 2014. *Bioestadística. Manual moderno.* Tercera edición. México. 634p.
- Cheng, L., G. V. Alexander, P. J. Franco. 1976. Cadmium and other metals in sea-sckaters. *Wat. Air. Soil Pollut.* 6: 33–38.
- Chin, T. A., D. M. Templeton. 1993. Protective elevations of glutathione and metallothionein in cadmium-exposed mesangial cells. *Toxicology.* 77 (1–2): 145–156.

Chu, S.Y., P. Cashion, M. Jiang. 1989. A new colorimetric assay for purine nucleoside phosphorylase. *Clin. Biochem.* 22: 357–362.

Costantini, D. 2014. *Oxidative stress and hormesis in evolutionary ecology and physiology*. Springer. Berlin. 566p.

Cullen, J., M. Maldonado. 2013. Biogeochemistry of cadmium and its release to the environment. En: Sigel, A., H. Sigel, R. Sigel. *Cadmium: from toxicity to essentiality*. Springer. EUA. pp. 31–62.

Dalle-Donne, I., R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, R. Colombo. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.* 329 (1–2): 23–38.

De Chaudhuri, S., P. Ghosh, N. Sarma, P. Majumdar, T. J. Sau, S. Basu, S. Roychoudhury, K. Ray, A. K. Giri. 2008. Genetic variants associated with arsenic susceptibility: study of purine nucleoside phosphorylase, arsenic (+3) methyltransferase, and glutathione s-transferase omega genes. *Environ. Health Perspect.* 116 (4): 501–5.

De Guise, S., J. Bernier, D. Martineau, P. Beland, M. Fournier. 1996. Effects of in vitro exposure of beluga whale splenocytes and thymocytes to heavy metals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (8): 1357–1364.

Dietz, R., J. Norgaard, J.C. Hansen. 1998. Have arctic marine mammals adapted to high cadmium levels? *Marine Poll. Bull.* 36 (6): 490–492.

Elsner, R. 1999. Living in water: solutions to physiological problems. En: Reynolds, J. E. S. A. Rommel (eds.). *Biology of marine mammals*. Washington DC. Smithsonian Institution Press. pp. 73–116.

Eneman, J. D., R. J. Potts, M. Osier, G. S. Shukla, C. H. Lee, J. F. Chiu, B. A. Hart. 2000. Suppressed oxidant-induced apoptosis in cadmium adapted alveolar epithelial cells and its potential involvement in cadmium carcinogenesis. *Toxicology.* 147 (3): 215–28.

Folhé, L., W. A. Günzler. 1984. Assays for glutathione peroxidase. Pp. 114-120. En: Packer, L. (ed.). *Methods in enzymology*, Vol. 105: Oxygen radicals in biological systems. EUA. Academic Press.

Goldberg, D. M., R. J. Spooner. 1987. Glutathione reductase. En: Bermeyer-Ulrich, H. *Methods of enzymatic analysis*, Vol III: Enzymes, I: Oxidoreductases transferases. Alemania. Academic Press. pp. 258–265.

Gregus, Z., B. Nemeti. 2002. Purine nucleoside phosphorylase as a cytosolic arsenate reductase. *Toxicol. Sci.* 70 (1): 13–19.

Griffith, O. W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106: 207–212.

Habig, W. H., H. B. Jakoby. 1981. Glutathione s-transferases (rat and human). En: Jakoby, W. B. (ed). *Methods in Enzymology*. Academic Press. E.U.A. pp. 218-235.

Habran, S., D. E. Crocker, C. Debier, K. Das. 2012. How are trace elements mobilized during the postweaning fast in northern elephant seals? *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (10): 2354–2365.

Halliwell, B., M. C. Gutteridge. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press. Nueva York.

Hart, B. A., C. H. Lee, G. S. Shukla, A. Shukla, M. Osier, J. D. Eneman, J. F. Chiu. 1999. Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology*. 133: 43–58.

Hindell, M. A. 2002. Elephant seals. En: Perrin W. F., B. Würsig, J. G. M. Thewissen (eds.). *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press. pp. 370-373.

Järup, L., A. Åkesson. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238 (3): 201–208.

Jin, P., N. R. Ringertz. 1990. Cadmium induces transcription of protooncogenes, c-jun y c-myc in rat I6 myoblasts. *J. Biol. Chem.* 265: 14061–14064.

Jones, D. P. 2002. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol.* 348: 93–112.

Kim, S., H. Jung, D. Hyun, E. Park, Y. Kim, C. Lim. 2010. Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. *Biochimistry*. 92 (8): 927–32.

Königsberg, M. 2007. Nrf2: la historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *REB.* 26 (1): 18–25.

Konigsberg, M. 2008. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas*. México: Manual moderno. México. 322p.

Kooyman, G. 2002. Diving Physiology. En: Perrin W. F., B. Würsig J. G. M. Thewissen (eds.). *Encyclopedia of marine mammals*. EUA. Academic Press. pp. 240-246.

- Kooyman, G. L., P. J. Ponganis. 1998. The physiological basis of diving to depth: birds and mammals. *Am. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 60 (1): 19–32.
- Kroemer, G., P. Petit, N. Zamzami, J. L. Vayssière, B. Mignotte. 1995. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB.* 9 (13): 1277–1287.
- Kuppusamy, P., J. L. Zweier. 1989. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J. Biol. Chem.* 264: 9880–9884.
- Lehninger, A., D. Nelson, M. Cox. 2005. *Lehninger principles of biochemistry.* Freeman, W. H. & Company. 1476p.
- Levine, R. L., J. A. Williams, E. R. Stadtman, E. Shacter. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Method. Enzymol.* 233: 346–357.
- Lin, C. J., K. H. Wu, F. H. Yew, T. C. Lee. 1995. Differential cytotoxicity of cadmium to rat embryonic fibroblasts and human skin fibroblast. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 33: 20–26.
- Lin, T., M. S. Yang. 2007. Benzo[a]pyrene-induced elevation of gsh level protects against oxidative stress and enhances xenobiotic detoxification in human hepg2 cells. *Toxicology.* 235 (1–2): 1–10.
- Liu, J., W. Qu, M. B. Kadiiska. 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238 (3): 209–214.
- López-Cruz, R. I., M. B. Pérez-Milicua, D. E. Crocker, R. Gaxiola-Robles, J. A. Bernal-Vertiz, A. De la Rosa, J. P. Vázquez-Medina, T. Zenteno-Savín. 2014. Purine nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase activities in erythrocytes and plasma from marine, semiaquatic and terrestrial mammals. *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol. A Molecular and Integrative Physiology.* 171.
- Louis, K. S., A. C. Siegel. 2011. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. En: Stoddart, M. J. (ed.) *Mammalian cell viability: methods and protocols, methods in molecular biology.* Springer. pp. 7-12.
- Maret, W., J. M. Moulis. 2013. The bioinorganic chemistry of cadmium in the context of its toxicity. En: Sigel, A., H. Sigel, R. Sigel. *Cadmium: from toxicity to essentiality.* Springer. EUA. pp. 1-30.
- Martelli, A., E. Rousselet, C. Dycke, A. Bouron, J. M. Moulis. 2006. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimistry.* 88 (11): 1807–14.

- Martin, J. H., W. W. Broenkow. 1975. Cadmium in plankton: elevated concentrations off baja california. *Science*. 190: 884–85.
- Mehlen, P., E. Hickey, L. A. Weber, A. P. Arrigo. 1997. Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against tnfa in nih-3t3-ras cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241: 187–192.
- Meister, A. 1995. Glutathione metabolism. *Method. Enzymol.* 251 (1995): 3–7.
- Méndez, L., B. Acosta, S. T. Alvarez-Castañeda, C. H. Lechuga-Devéze. 1998. Trace metal distribution along the southern coast of Bahia de La Paz (Gulf of California), México. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61 (5): 616–622.
- Méndez, L., S. T. Alvarez-Castañeda, B. Acosta, A. P. Sierra-Beltrán. 2002. Trace metals in tissues of gray whale (*eschrichtius robustus*) carcasses from the northern pacific mexican coast. *Mar. Pollut. Bull.* 44 (3): 217–221.
- Moulis, J. M. 2010. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biometals.* 23: 877–96.
- Nguyen, T., H. C. Huang, C. B. Pickett. 2000. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by nrf2 and repression by mafk. *J. Biol. Chem.* 275 (20): 15466–15473.
- Niño, C., J. Urbán, O. Vidal. 2011. Mamíferos marinos del Golfo de California. WWF-Telcel. México. 170p.
- Nordberg, G. F. 2009. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238 (3). 192–200.
- Nzengue, Y., S. M. Candéias, S. Sauvaigo, T. Douki, A. Favier, W. Rachidi, P. Guiraud. 2011. The toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: its redox biomarkers. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25 (3). 171–180.
- Ortíz, R. M., D. P. Noren, C. L. Ortiz, F. Talamantes. 2003. Gh and ghrelin increase with fasting in a naturally adapted species, the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *J. Endocrinol.* 1978: 533–539.
- Panneton, W. M. 2013. The mammalian diving response: an enigmatic reflex to preserve life? *Physiology.* 28: 284–97.
- Pisoschi, A. M., A. Pop. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur. J. Med. Chem.* 97: 55–74.

Radabaugh, T. R., A. Sampayo-Reyes, R. A. Zakharyan, H. Vasken Aposhian. 2002. Arsenate reductase II. Purine nucleoside phosphorylase in the presence of dihydrolipoic acid is a route for reduction of arsenate to arsenite in mammalian systems. *Chem. Res. Toxicol.* 15 (5): 692–98.

Rahman, I., A. Kode, S. K Biswas. 2007. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* 1 (6): 3159–3165.

Reeves, R. R., B. S Stewart, S. Leatherwood. 1992. The sierra club handbook of seals and sirenians. Part II: pinnipeds-northern elephant seal. 363p.

Schäfer, S. G., R. L. F Dawes, B Elsenhans, W. Porth, K Schümann. 1999. Metals. En: Schäfer, S. G., R. O. McClellan, F Welsch (eds.). *Toxicology*, Academic Press. Nueva York. pp. 755-831.

Shumilin, E., F. Páez-Osuna, C. Green-Ruiz, D. Sapozhnikov, G.D. Rodriguez-Meza, L. Godínez-Orta. 2001. Arsenic, antimony, selenium and other trace elements in sediment of the La Paz lagoon, peninsula of Baja California, Mexico. *Mar. Poll. Bull.* 42 (3): 174–78.

Sighal, R. K., M. Anderson, A. Meister. 1987. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB J.* 1 (3): 220–23.

Sk, U. H., S. Bhattacharya. 2006. Prevention of cadmium induced lipid peroxidation, depletion of some antioxidative enzymes and glutathione by a series of novel organoselenocysnates. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 22 (3): 298–308.

Song, J. J., J. Y. Kim, A. S. Jang, S. H. Kim, Y. C. Rah, M. Park, M. K. Park. 2015. Effect of cadmium on human middle ear epithelial cells. *J. Int. Adv. Otol.* 11 (3): 183–87.

Stewart, B., H. R. Huber. 1993. *Mirounga angustirostris*. *Mammalian Species*. 449:1-10.

Storey, K. B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian. Med. Biol. Res.* 29: 1715–1733.

Suzuki, C. A. M., M. G. Cherian. 1989. Renal glutathione depletion and nephrotoxicity of cadmium-metallothionein in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 98 (3): 544–552.

Taki, M. 2013. Imaging and sensing of cadmium in cells. En: Sigel, A., H. Sigel, R. Sigel. *Cadmium: from toxicity to essentiality*. Springer. EUA. pp. 99-116.

- Takiguchi, M., W. E. Achanzar, W. Qu, G. Li, M. P. Waalkes. 2003. Effects of cadmium on DNA-(cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp. Cell. Res.* 286: 355–365.
- Tátrai, E., Z. Kováčiková, A. Hudák, Z. Adamis, Gy. Ungváry. 2001. Comparative in vitro toxicity of cadmium and lead on redox cycling in type II pneumocytes. *J. Appl. Toxicol.* 21 (6): 479–483.
- Templeton, D. M., Y. Liu. 2010. Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chem. Biol. Interact.* 188 (2): 267–275.
- Thévenov, F., W. K. Lee. 2013. Toxicology of cadmium and its damage to mammalian organs. En: Sigel, A., H. Sigel, R. Sigel (eds.). *Cadmium: from toxicity to essentiality*. Springer. EUA. pp. 415-490.
- Thompson-Gorman, S. L., J. L. Zweier. 1990. Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* 265: 6656–63.
- Tietze, F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27 (3): 502–522.
- Van Den Berghe, G., M. F. Vincent, S. Marie. 2006. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment*. 86: 433–449.
- Vázquez-Medina, J. P. 2007. Defensas antioxidantes en pinnípedos (Tesis de maestría). CIBNOR. 67p.
- Vázquez-Medina, J. P., T. Zenteno-Savín, R. Elsner, R. M. Ortiz. 2012. Coping with physiological oxidative stress: a review of antioxidant strategies in seals. *J. Comp. Physiol. B*: 182 (6): 741–750.
- Vázquez-Medina, J. P., T. Zenteno-Savín, R. Elsner. 2006. Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion. *J. Comp. Physiol. C*. 142 (3–4 SPEC. ISS.): 198–204.
- Voet, D., J. G. Voet. 2006. *Bioquímica*. 3a Edición. Editorial Medica panamericana. Buenos Aires. 1640p.
- Waisberg, M., P. Joseph, B. Hale, D. Beyersmann. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*. 192: 95–117.
- WHO/IPCS. 1992. Environmental health criteria document 134, IPCS. WHO, Geneva.

Yang, M. S., H. W. Chan, L. C. Yu. 2006. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology*. 226 (2–3): 126–130.

Yang, M. S., L. C. Yu, R. C. Gupta. 2004. Analysis of changes in energy and redox states in hepg2 hepatoma and c6 glioma cells upon exposure to cadmium. *Toxicology*. 201 (1–3): 105–113.

Yano, C. L., M. C. Cintra Gomes Marcondes. 2005. Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 39 (10): 1378–1384.

Zar, J. H. 1996. *Biostatistical analysis*. 4a ed. New Jersey. Prentice Hall. 663p.

Zenteno-Savín, T., E. Clayton-Hernández, R. Elsner. 2002. Diving seals: are they a model for coping with oxidative stress? *Comp. Biochem. Physiol. C*. 133 (4): 527–36.

Zenteno-Savín, T., J. P. Vázquez-Medina, N. Cantú Medellín, P. J. Ponganis, R. Elsner. 2012. Ischemia/reperfusion in diving birds and mammals: how they avoid oxidative damage. En: Abele, D., J. P. Vazquez-Medina, T. Zenteno-Savin (eds.). *Oxidative stress in aquatic ecosystems*, Blackwell Publishing. pp. 178-189.

## 11. ANEXOS

### 11.1 Anexo A

#### **Carta de Consentimiento Informado Central de Especialidades Médicas CEM**

##### **1. Nombre del estudio y Patrocinador**

##### **“RESPUESTA ANTIOXIDANTE A LA EXPOSICIÓN A CADMIO EN MIOBLASTOS DE MAMÍFEROS MARINOS Y MAMÍFEROS TERRESTRES”**

El estudio se llevará a cabo en el Central de Especialidades Médicas de La Paz Baja California Sur por Investigadores de dicho Hospital.

##### **2. Propósito del estudio**

Lo(a) estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo con el propósito determinar la respuesta antioxidante ante la exposición a cadmio en cultivos primarios de mioblastos provenientes de pacientes sometidos a cirugía exploratoria, bajo condiciones basales, por lo que pensamos que pudiera ser un buen candidato para participar en este proyecto. Al igual que usted, 12 personas más serán invitadas a participar. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

##### **3. Procedimientos**

Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente:

-Durante su cirugía se tomará una porción de musculo de aproximadamente 30 mgs con un tamaño aproximado a una semilla de lenteja. Las muestras se tomarán del músculo recto abdominal, esto no le ocasionara ninguna molestia durante o posterior a su cirugía.

##### **4. Posibles riesgos y molestias.**

La toma de muestra de musculo, no le ocasionara molestia alguna porque se utilizarán los pequeños trozos de tejido muscular que son cortados durante el mismo procedimiento.

##### **5. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio.**

- No recibirá un pago por su participación en este estudio, ni implica gasto alguno para usted.
- No recibirá ningún beneficio al participar en este estudio.
- Un posible beneficio de su participación en este estudio es que los resultados de las pruebas de laboratorio que le realizaremos le proporcionarán información sobre su estado de salud. El saber que su estado de salud es bueno pudiera ser un beneficio para usted.
- Si bien los beneficios directos para usted pudieran no existir, los resultados del presente estudio contribuirán al avance en el conocimiento de la cadena causal de los riesgos de la exposición a cadmio y otras enfermedades relacionadas a la exposición de este elemento traza. Además, los resultados de este estudio brindarán información relevante para el mejor manejo de personas como usted para brindará información de gran utilidad para futuros programas de prevención primaria y secundaria.

## 6. Participación o retiro.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en momento que quiera no modificará de ninguna manera el que nosotros le brindemos los resultados hasta el momento recabados. De tal forma que se le pedirá que responda sobre datos personales.

## 7. Privacidad y confidencialidad.

La información que se obtenga como parte de este estudio es estrictamente confidencial. La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla/o, (su nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial. Sus datos personales serán guardados por separado para mantener la confidencialidad y de los resultados de sus pruebas. Sus datos personales y sus resultados serán guardados en un archivero bajo llave en las oficinas del Dr Ramón Gaxiola Robles investigador responsable. Sólo el equipo de investigación tendrá acceso a su información.

Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad, su nombre y toda información que pudiera ser utilizada para identificarla/o no estará vinculada con la información que nos proporcione en la entrevista y con los resultados de sus estudios de gabinete y laboratorio. Le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos. Guardaremos toda su información en bases de datos seguras que estarán protegidas por una clave de acceso. Toda la información será destruida 5 años después de concluir el estudio.

## 8. Personal de contacto para dudas y aclaraciones

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 8:00 a 20:00 h, de lunes a viernes con el Dr. Ramón Gaxiola Robles, que es el investigador responsable del área médica, al teléfono: 612 3485229 o en el Hospital Central de Especialidades Médicas de la Paz ubicado en Delfines No. 110 Fraccionamiento FIDEPAZ en La Paz BCS, México.

## Declaración de consentimiento informado

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

No autorizo

Sí autorizo participar en el estudio y que se me tome la muestra de musculo que se emplearan en el laboratorio para los estudios pertinentes.

\_\_\_\_\_  
Nombre del Participante

\_\_\_\_\_  
Firma del Participante

\_\_\_\_\_  
Fecha

**Firma del encargado de obtener el consentimiento informado**

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Creo que él/ella entiende la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

\_\_\_\_\_  
Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

\_\_\_\_\_  
Firma del Investigador

\_\_\_\_\_  
Fecha

**Firma de los testigos**

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 1.

\_\_\_\_\_  
Firma del Testigo

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 2.

\_\_\_\_\_  
Firma del Testigo

\_\_\_\_\_  
Fecha

Actividad enzimática en mioblastos de humanos y elefante marino del norte en los diferentes tiempos de exposición a CdCl<sub>2</sub>.

Especie	TIEMPO (h)	GPx (U mg <sup>-1</sup> proteína)	GR (U mg <sup>-1</sup> proteína)	GST (U mg <sup>-1</sup> proteína)	PNP (U mg <sup>-1</sup> proteína)
Humano	1	7.80 (0.002–40.34) <sup>a</sup>	0.69 (0.002–3.94)	0.63 (0.06–2.1)	1.04 (0.13–2.70) <sup>a</sup>
	6	15.20 (4.30–30.01) <sup>b</sup>	0.57 (0.002–2.07)	0.75 (0.05–2.38)	0.51 (0.002–2.69) <sup>b</sup>
	12	13.64 (3.10–156.07) <sup>ab</sup>	0.56 (0.002–1.35)	0.57 (0.086–2.31)	0.68 (0.003–3.84) <sup>ab</sup>
Elefante marino	1	0.30 (0.002–2.32)	0.97 (0.49–2.20)	0.29 (0.005–0.82)	0.05 (0.017–0.10) <sup>a</sup>
	6	0.56 (0.002–5.22)	0.75 (0.32–2.03)	0.44 (0.005–0.72)	0.076 (0.001–0.20) <sup>ab</sup>
	12	0.35 (0.002–4.73)	0.67 (0.065–2.20)	0.19 (0.005–0.96)	0.08 (0.032–0.31) <sup>b</sup>

Los datos se muestran como mediana con valores mínimos y máximos. Las letras diferentes indican diferencias entre concentraciones de exposición. Nivel de significancia estadística, p<0.05.

Concentración de glutatión en mioblastos de humanos y elefante marino del norte en los diferentes tiempos de exposición a CdCl<sub>2</sub>.

Especie	TIEMPO (h)	GSH EQ		GSH		GSSG		GSSG:GSH-Eq
		(nmol mg <sup>-1</sup> proteína)						
Humano	1	138.9 (9.49 - 388.75)	48.53 (26.66 - 209.71)	85.49 (62.73 - 137.09)	0.29 (0.23 - 0.59)			
	6	162.89 (114.71 - 234.63)	21.6 (6.7 - 86.4)	99.83 (73.01 - 142.78)	0.20 (0.04 - 0.47)			
	12	190.29 (140.18 - 312.32)	55.54 (17.34 - 171.74)	130.43 (81.84 - 204.2)	0.17 (0.11 - 0.54)			
Elefante marino	1	398.22 (306.58 - 933.48)	198.76 (129 - 482.28)	257.68 (185.75 - 411.95)	0.47 (0.35 - 0.53)			
	6	627.03 (454.55 - 894.25)	335.27 (193.35 - 564.89)	294.33 (128.76 - 399.11)	0.56 (0.47 - 0.66)			
	12	463.9 (230.55 - 718.58)	252.39 (134.34 - 417.88)	194.57 (68.92 - 410.33)	0.57 (0.37 - 0.79)			

Los datos se muestran como mediana con valores mínimos y máximos. Las letras diferentes indican diferencias entre concentraciones de exposición. Nivel de significancia estadística, p<0.05.

## 11.4 Anexo D

Concentración de carbonilos proteicos en mioblastos de humano y elefante marino en los diferentes tiempos de exposición a CdCl<sub>2</sub>.

<b>Especie</b>	<b>TIEMPO (h)</b>	<b>Carbonilos proteicos (nmol mg<sup>-1</sup> proteína)</b>
Humano	1	0.01 (0.004–0.18)
	6	0.018 (0.003–0.07)
	12	0.015 (0.005–0.14)
Elefante marino	1	0.006 (0.0001–0.02)
	6	0.006 (0.0001–0.036)
	12	0.009 (0.002–0.028)

Los datos se muestran como mediana con valores mínimos y máximos. Nivel de significancia estadística,  $p < 0.05$ .