

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL CADMIO SOBRE EL  
MEDIOAMBIENTE Y EL ORGANISMO HUMANO: PERSPECTIVAS  
EXPERIMENTALES, EPIDEMIOLÓGICAS Y MORFOFUNCIONALES  
EN EL HOMBRE Y EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Memoria presentada por D. Roberto Madeddu para optar al grado de  
Doctor Europeo en Medicina y Cirugía





**Dña. ANTONIA ARÁNEGA JIMÉNEZ, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.**

**HACE CONSTAR:**

Que D. Roberto Madeddu ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral **“Estudio de la influencia del cadmio sobre el medioambiente y el organismo humano: perspectivas experimentales epidemiológicas y morfofuncionales en el hombre y en los animales de experimentación”** durante los años 2002-2005 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 8 de Junio de 2005.

Fdo. Antonia Aránega Jiménez

**Dña. HOURIA BOULAIZ**, PROFESORA AYUDANTE DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE JAEN.

**HACE CONSTAR:**

Que D. Roberto Madeddu ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral **“Estudio de la influencia del cadmio sobre el medioambiente y el organismo humano: perspectivas experimentales epidemiológicas y morfofuncionales en el hombre y en los animales de experimentación”** durante los años 2002-2005 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 8 de Junio de 2005.

Fdo. Houria Boulaiz

**D. JOSE CARLOS PRADOS SALAZAR** PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**HACE CONSTAR:**

Que D. Roberto Madeddu ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral **“Estudio de la influencia del cadmio sobre el medioambiente y el organismo humano: perspectivas experimentales epidemiológicas y morfofuncionales en el hombre y en los animales de experimentación”** durante los años 2002-2005 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 8 de Junio de 2005.

Fdo. Jose Carlos Prados Salazar

# *ÍNDICE*



---

<b>I</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>I.1.</b>	<b><i>LOS METALES PESADOS</i></b>	<b>4</b>
<b>I.1.1.</b>	<b>El Cadmio</b>	<b>4</b>
<b>I.1.2.</b>	<b>Producción mundial de Cadmio</b>	<b>5</b>
<b>I.1.3.</b>	<b>Concentraciones de Cadmio</b>	<b>5</b>
<b>I.1.4.</b>	<b>Acumulación de Cadmio</b>	<b>6</b>
<b>I.1.5.</b>	<b>Los elementos</b>	<b>8</b>
<b>I.1.6.</b>	<b>Bioacumulación de Cadmio</b>	<b>10</b>
<b>I.1.7.</b>	<b>Vías de absorción</b>	<b>10</b>
<b>I.1.8.</b>	<b>Intoxicación con Cadmio</b>	<b>13</b>
<b>I.2.</b>	<b><i>CADMIO EN EL MEDIO AMBIENTE</i></b>	<b>17</b>
<b>I.2.1.</b>	<b>Emisiones atmosféricas</b>	<b>18</b>
<b>I.2.2.</b>	<b>Contaminación del agua</b>	<b>19</b>
<b>I.2.3.</b>	<b>Contaminación de suelos</b>	<b>19</b>
<b>I.3.</b>	<b><i>CONTAMINACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR CADMIO</i></b>	<b>20</b>
<b>I.3.1.</b>	<b>Aire-alimentos</b>	<b>20</b>
<b>I.3.2.</b>	<b>Agua-alimentos</b>	<b>21</b>
<b>I.3.3.</b>	<b>Suelo-vegetales</b>	<b>21</b>
<b>I.3.4.</b>	<b>Suelo-plantas-animales-alimento</b>	<b>22</b>
<b>I.3.5.</b>	<b>Tecnología alimentaria-alimentos</b>	<b>22</b>
<b>I.4.</b>	<b><i>VALORES DE CADMIO</i></b>	<b>23</b>
<b>I.5.</b>	<b><i>ALIMENTOS QUE ACUMULAN CADMIO</i></b>	<b>24</b>
<b>I.6.</b>	<b><i>TOXICOCINÉTICA.</i></b>	<b>27</b>
<b>I.7.</b>	<b><i>EL MODELO TOXICOCINÉTICO</i></b>	<b>30</b>
<b>I.8.</b>	<b><i>TOXODINÁMICA.</i></b>	<b>32</b>
<b>I.8.1.</b>	<b>Las metalotioneínas.</b>	<b>33</b>
<b>I.8.2.</b>	<b>La beta 2 microglobulina.</b>	<b>33</b>
<b>I.8.3.</b>	<b>Evaluación de la exposición con indicadores biológicos</b>	<b>35</b>
<b>I.8.4.</b>	<b>Evolución de la acción toxicodinámica.</b>	<b>36</b>
<b>I.8.5.</b>	<b>Albuminuria.</b>	<b>36</b>
<b>I.8.6.</b>	<b>N-Acetil-B-D-glucosaminodasa.</b>	<b>37</b>

<b>I.8.7.</b>	<b>Calcio urinario.</b>	<b>37</b>
<b>I.8.8.</b>	<b>Perfil hepático.</b>	<b>37</b>
<b>I.8.9.</b>	<b>Evaluación respiratoria.</b>	<b>38</b>
<b>I.8.10.</b>	<b>Intoxicación crónica por exposición a Cadmio.</b>	<b>38</b>
<b>I.8.11.</b>	<b>Vía de ingreso Vs. manifestaciones clínicas y cáncer.</b>	<b>38</b>
<b>I.8.13.</b>	<b>Síndromes de exposición crónica a Cadmio.</b>	<b>38</b>
I.8.13.1.	<u>Síndrome renal.</u>	39
I.8.13.2.	<u>Síndrome de disfunción pulmonar.</u>	39
I.8.13.3.	<u>Síndrome óseo: itai – itai.</u>	40
I.8.13.4.	<u>Síndrome cardio-vascular.</u>	40
I.8.13.5.	<u>Otras manifestaciones.</u>	41
<b>I.9.</b>	<b><i>CARCINOGENESIS</i></b>	<b>41</b>
<b>I.10.</b>	<b><i>EL CITOESQUELETO</i></b>	<b>43</b>
<b>I.10.1.</b>	<b>Actina.</b>	<b>44</b>
<b>I.10.2.</b>	<b>Tubulina.</b>	<b>46</b>
<b>I.10.3.</b>	<b>Filamentos intermedios.</b>	<b>47</b>
<b>I.10.4.</b>	<b>Vimentina.</b>	<b>47</b>
<b>I.10.5.</b>	<b>Actinina.</b>	<b>47</b>
<b>I.10.6.</b>	<b>Fibronectina.</b>	<b>48</b>
<b>II</b>	<b>OBJETIVOS.</b>	<b>49</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>53</b>
<b>III. 1.</b>	<b><i>ESTUDIO SOBRE EL CITOESQUELETO: CÉLULAS EN CULTIVO, NORMALES (FG) Y NEOPLÁSICAS (SGS/3A)</i></b>	<b>55</b>
<b>III.1.1.</b>	<b>Líneas celulares</b>	<b>55</b>
<b>III.1.2.</b>	<b>Congelación de las líneas celulares</b>	<b>56</b>
<b>III.1.3.</b>	<b>Descongelación de las líneas celulares</b>	<b>57</b>
<b>III.1.4.</b>	<b>Ensayo con cadmio</b>	<b>57</b>
<b>III.1.5.</b>	<b>Determinación de los marcadores celulares mediante inmunofluorescencia indirecta</b>	<b>57</b>

<b>III.2.</b>	<b><i>ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE LA POBLACIÓN SARDA: ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DEL CADMIO EN LA SANGRE TOTAL</i></b>	<b>59</b>
<b>III.2.1.</b>	<b>Estudio de población</b>	<b>59</b>
<b>III.2.2.</b>	<b>Toma y análisis de muestras de sangre</b>	<b>60</b>
<b>III.2.3.</b>	<b>Análisis estadístico</b>	<b>61</b>
III.2.3.1.	<u>Estudio paramétrico</u>	62
III.2.3.2.	<u>Estudio no paramétrico</u>	62
<b>III.3</b>	<b><i>ESTUDIO DEL EFECTO DEL CADMIO INOCULADO POR VÍA INTRACEREBROVENTRICULAR SOBRE LA PRESIÓN SANGUÍNEA EN RATAS CON CALICREINA URINARIA NORMAL Y BAJA</i></b>	<b>62</b>
<b>III.3.1.</b>	<b>Outbred strains</b>	<b>62</b>
<b>III.3.2.</b>	<b>Cánula estereotáxica</b>	<b>63</b>
<b>III.3.3.</b>	<b>Ratas LKR y NKR</b>	<b>64</b>
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>65</b>
<b>IV.1.</b>	<b><i>ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS CITOESQUELÉTICAS ACTINA, TUBULINA Y VIMENTINA EN FIBROBLASTOS NORMALES (LÍNEA FG) Y FIBROBLASTOS NEOPLÁSICOS (LÍNEA SGS/3A)</i></b>	<b>67</b>
<b>IV.1.1.</b>	<b>Fibroblastos normales. Línea FG</b>	<b>67</b>
<b>IV.1.2.</b>	<b>Fibroblastos neoplásicos. Línea SGS/3<sup>a</sup></b>	<b>69</b>
<b>IV.2.</b>	<b><i>MODIFICACIONES INDUCIDAS POR CADMIO EN LAS PROTEÍNAS CITOESQUELÉTICAS ACTINA, TUBULINA Y VIMENTINA DE FIBROBLASTOS NORMALES (LÍNEA FG) Y FIBROBLASTOS NEOPLÁSICOS (LÍNEA SGS/3A).</i></b>	<b>71</b>
<b>IV.2.1.</b>	<b>Fibroblastos normales. Línea FG.</b>	<b>71</b>
IV.2.1.1.	<u>Actina</u>	71
IV.2.1.2.	<u>Tubulina</u>	73
IV.2.1.3.	<u>Vimentina</u>	73

<b>IV.2.2.</b>	<b>Fibroblastos neoplásicos. Línea SGS/3A.</b>	<b>76</b>
IV.2.2.1.	<u>Actina</u>	76
IV.2.2.2.	<u>Tubulina</u>	77
<b>IV.2.2.3.</b>	<b><u>Vimentina</u></b>	<b>79</b>
<b>IV.3.</b>	<b><i>ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO SOBRE LA POBLACIÓN SARDA. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE CADMIO EN SANGRE.</i></b>	<b>81</b>
<b>IV.3.1.</b>	<b>Características de la población de estudio.</b>	<b>81</b>
<b>IV.3.2.</b>	<b>Análisis de los niveles de cadmio en sangre.</b>	<b>83</b>
<b>IV.3.3.</b>	<b>Niveles de cadmio en sangre. Mediana y Percentiles.</b>	<b>87</b>
<b>IV.4.</b>	<b><i>ESTUDIO SOBRE LAS DIFERENTES RESPUESTAS A LA INOCULACIÓN DE CADMIO POR VÍA INTRACEREBROVENTRICULAR. ANÁLISIS DE LA PRESIÓN SANGUINEA EN RATAS CON NIVELES NORMALES Y BAJOS DE CALICREINA URINARIA.</i></b>	<b>91</b>
<b>IV.4.1.</b>	<b>Excreción urinaria de calicreina</b>	<b>91</b>
<b>IV.4.2.</b>	<b>Excreción de Potasio</b>	<b>93</b>
<b>IV.4.3.</b>	<b>Volumen urinario</b>	<b>93</b>
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>95</b>
<b>V.1.</b>	<b><i>ESTUDIO DEL CITOESQUELETO DE FIBROBLASTOS NORMALES (FG) Y NEOPLÁSICOS (SGS/3A) EN CULTIVO.</i></b>	<b>97</b>
<b>V.1.1.</b>	<b>Modificaciones de la proteína actina</b>	<b>98</b>
<b>V.1.2.</b>	<b>Modificaciones de la proteína tubulina</b>	<b>99</b>
<b>V.1.3.</b>	<b>Modificaciones de la proteína vimentina</b>	<b>100</b>
<b>V.2.</b>	<b><i>ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO SOBRE LA POBLACIÓN SARDA. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DEL CADMIO EN SANGRE</i></b>	<b>102</b>
<b>V.3.</b>	<b><i>ESTUDIO SOBRE LAS DIFERENTES RESPUESTAS A LA INOCULACIÓN DE CADMIO POR VIA INTRACEREBROVENTRICULAR. ANÁLISIS DE LA PRESIÓN SANGUINEA EN RATAS CON VALORES</i></b>	

---

	<b><i>NORMALES Y BAJOS DE CALICREINA URINARIA</i></b>	<b>109</b>
<b>V.4.</b>	<b><i>NUEVAS PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN SOBRE CADMIO. ESTUDIO SOBRE ALGUNAS PATOLOGÍAS NEUROLÓGICAS (EM, ELA, ALZHEIMER) DESDE UN PUNTO DE VISTA CUANTITATIVO Y CUALITATIVO</i></b>	<b>114</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>123</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>126</b>

# *I. INTRODUCCIÓN*



La corteza terrestre contiene diversos elementos químicos, entre ellos muchos metales (53). Desde tiempos remotos, han resultado de gran importancia para el desarrollo y progreso de las civilizaciones, a tal punto que sería muy difícil imaginar nuestra sociedad actual sin un extenso empleo de utensilios y herramientas elaborados con metales.

De los elementos químicos que hoy conocemos, aproximadamente un 75 % son metales. La mayoría son sólidos a temperatura normal, muchas veces brillantes, maleables y dúctiles, buenos conductores de electricidad y calor. Ésta y otras propiedades químico-físicas, dependen de un bajo número de electrones en sus orbitales exteriores y por consiguiente de su tendencia a perderlos para formar iones positivos.

Los metales son un componente fundamental del mundo mineral, y constituyen gran parte de la composición de la corteza terrestre en donde se encuentran bajo forma cristalina. Sin embargo, también son importantes en el mundo animal y vegetal ya que, incluso estando presentes en cantidad a veces infinitesimal, los oligoelementos metálicos ejercen actividades biológicas extremadamente importantes (53). Los metales están, por lo tanto, presentes en el aire, en el agua y en el suelo y por consiguiente en los alimentos.

El fenómeno de la industrialización y el incremento considerable de las actividades humanas, ha precisado de un mayor empleo de metales, con la consecuencia de su creciente ecodispersión. Esto, aparte del impacto socioeconómico que ha producido, se ha revelado potencialmente peligroso para la salud tanto animal como humana.

Los metales presentes en el ecosistema están sometidos a unos procesos biológicos y químico-físicos, capaces de atenuar su peligrosidad; este fenómeno es comúnmente conocido como “*autodetonación*”. En base a su peso específico inferior o superior a  $5 \text{ g/cm}^3$  los metales se clasifican en ligeros o pesados.

## **I.1. LOS METALES PESADOS**

Los metales pesados, debido a su fuerte resistencia a la degradación natural, conservan por mucho tiempo su carácter tóxico. Por lo tanto, resulta de vital importancia mantener bajo control la concentración de los metales en el medio ambiente, y de modo específico la de los metales pesados (50 - 51 - 52).

Entre los metales que tradicionalmente, están considerados más tóxicos y dañinos para la salud así como fuertemente relacionados con actividades industriales y de combustión cabe destacar: el cadmio, el aluminio, el zinc, el plomo y el mercurio (20).

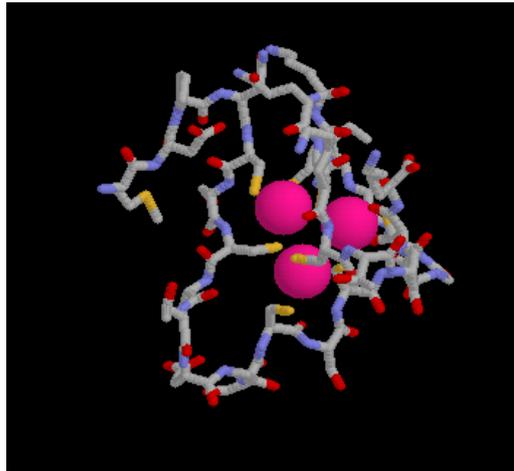
El cadmio es considerado uno de los más peligrosos para el medio ambiente y la salud, por ser teratogénico y con un potencial cancerígeno comprobado.

### **I.1.1. El cadmio**

El cadmio (Cd) fue descubierto en 1817 como componente de la smithsonita. En la naturaleza no se encuentra como elemento puro sino en asociación con metales como el zinc, el cobre o el plomo, y es un elemento presente en toda la corteza terrestre, aunque generalmente su concentración no supera los 0.015/0.020 p.p.m.

La presencia natural del cadmio en el medio ambiente se debe principalmente a actividades volcánicas, a incendios forestales y a erosión de las rocas. Las minas principales se encuentran en Sudamérica, en África y en Australia; pequeños yacimientos se encuentran en Cerdeña (Italia).

Se conoce un sólo verdadero mineral de cadmio, la greenockita, pero el mayor interés comercial reviste la extracción desde minerales de zinc mediante fusión. Además, el cadmio está presente en el denominado "polvo azul", producto de la condensación que contiene del 4 al 5% de cadmio.



*Figura 1. Los átomos del cadmio del metalotioneina*

### **I.1.2. Producción mundial de cadmio**

La producción mundial del cadmio es de más de 20 mil toneladas/año. El cadmio es muy resistente a la corrosión y se utiliza para su electrodeposición galvánica (cadmiatura) en otros metales, especialmente el acero y el hierro. Además, por su inalterabilidad al calentamiento, el cadmio amarillo, se emplea sobre todo en la industria del plástico como en la de pinturas, de tinta de colores, en la fabricación de acumuladores y baterías al Ni/Cd, o de aparatos radiofónicos o de TV; en menor medida.

Debido a su elevada dispersión ambiental el cadmio se encuentra en el aire, en el suelo, y en el agua, y como todos los metales pesados causa un impacto ambiental que modifica los parámetros de calidad del agua y del suelo.

### **I.1.3 Concentraciones de cadmio**

Las concentraciones de cadmio en las aguas marinas no contaminadas son de 0,04/0,3 mg por litro, en las aguas naturales son inferiores a 1 mg/l, en el suelo son menos de 1 mg/l, mientras que alrededor de zonas industriales pueden alcanzar niveles más elevados, 60-70 mg/litro, siendo sus fuentes de emisión principales los vertidos industriales, las centrales a carbón y los incineradores (51 - 52 - 70).

En las zonas rurales no contaminadas la concentración media anual de cadmio en el aire es de  $300 \mu\text{g} / \text{m}^3$ , mientras que cerca de las zonas industriales la concentración media semanal en el aire supera con facilidad a los  $500 \mu\text{g} / \text{m}^3$ . El transporte a distancia a través de la atmósfera representa una fuente relevante de contaminación para las zonas no industrializadas.

El suelo es el primero en ser objeto de inmisión de metales pesados y por lo tanto de cadmio, por la caída de partículas difundidas en el aire por actividades industriales, por la actividad humana (vertederos, coches, y otros), por su presencia en los fertilizantes químicos, o por su acumulación después de los incendios. La concentración del cadmio en el suelo depende del ph de la tierra, que tiene la función primaria de controlar la solubilidad y movilidad del metal, y además, desempeña un papel fundamental en determinar su disponibilidad para las plantas.

La absorción del cadmio por los vegetales es fácil. El metal es uno de los pocos elementos capaces de acumularse en las porciones comestibles de las plantas, pudiendo alcanzar niveles tóxicos para los humanos. Efectivamente, la absorción del cadmio por parte de las plantas representa uno de los primeros estadios de bioacumulación en las cadenas alimentarias. En la sustancia seca, las hojas generalmente presentan un contenido en cadmio más elevado respecto a las raíces, a los frutos y a las semillas.

### **I.1.6 Acumulación de cadmio**

Algunos investigadores piensan que la acumulación del cadmio en el suelo no depende tanto de su concentración, sino de la relación s.f./Cd: cuanto más se aproxima o es mayor de 100, menor será la acumulación del metal.

Según una estimación aproximada, la mayor distribución potencial de los metales pesados y por lo tanto del cadmio, se encuentra en el agua y en las especies acuáticas tanto vegetales como animales. Éstas últimas se utilizan frecuentemente como bioindicadores. Por ejemplo, en algunas especies

marinas como la "posidonia *oceánica spiaggiata*", se ha observado que el contenido de metales pesados y entre ellos el cadmio, es directamente proporcional al nivel de contaminación marina. Además, los moluscos bivalvos como el "*Mythilus, Gallo Provincialis*", bioindicadores capaces de bioacumular, bioconcentrar y provocar procesos de biomagnificación, pueden representar en los diferentes ecosistemas y en especial de las aguas costeras, un indicador útil y precoz del grado de contaminación por metales pesados, sobre todo de cadmio y mercurio.

Los peces y algunos vertebrados también son extremadamente sensibles a pequeñas concentraciones de cadmio; las concentraciones de 1,2 µg y 0,4 µg por litro, son consideradas peligrosas según se trate de aguas más o menos duras respectivamente. En los músculos de algunos peces, han sido hallados niveles mil veces superiores a los presentes en el agua, presentando concentraciones tóxicas para los eventuales consumidores.

A través del agua y de las plantas el exceso de metales pesados puede finalmente alterar la cadena alimentaria provocando el desarrollo de mecanismos patogenéticos en los animales y en los humanos. En relación a esto, se ha manifestado desde hace tiempo un creciente interés por la aplicación de técnicas "voltamétricas de stripping" especialmente sensibles y aptas para la investigación de metales pesados, presentes en muy pequeñas cantidades en matrices alimentarias. Estas técnicas, a través del empleo de proteínas como la caseína, la lactoalbumina y las lactoglobulinas, han evidenciado la presencia de metales pesados y entre ellos el cadmio, en matrices alimentarias donde frecuentemente están presentes en trazas (7 - 140 - 118).

En relación a los posibles efectos sobre la salud humana y animal, los metales se dividen en esenciales, no esenciales y tóxicos. Los componentes de estos tres grupos se han modificado con el progreso de las investigaciones. De todas formas, aún no es aceptable del todo una distinción absoluta entre los tres grupos.

Esta distinción tiende a simplificar las relaciones entre organismo y metales, ya que los 14 elementos considerados hoy esenciales para la vida animal y los 20-30 no esenciales son todos tóxicos si se ingieren en niveles suficientemente elevados durante largos períodos de tiempo.

En algunos casos, por tanto, la esencialidad y la toxicidad de un metal dependen de la duración de la exposición, la dosis, la vía de administración, la forma química del compuesto metálico absorbido y de la vida media corporal (60 - 70 - 74 - 126).

### **I.1.7 Los elementos**

En todo caso con respecto a sus funciones biológicas, los elementos, en general, pueden ser clasificados en:

- elementos esenciales principales, cuya exigencia es valorada en el orden de algunos gramos y que comprenden seis elementos estructurales (H, C, N, O, P, Z) y cinco macro minerales (Na K, Mg, Ca, Cl);
- micros minerales esenciales, cuya exigencia es valorada en el orden de algunos miligramos y cuya esencialidad es claramente nota desde hace muchos años, como Fe, s.f. y Cu;
- elementos esenciales, cuya exigencia es valorada en el orden de algunos micros gramos como Si, LOS, Mo, Cr, Co, y cuyas funciones son más o menos conocidas;
- elementos para los cuales existe sospecha de esencialidad como el St;
- elementos traza como Cd, As, Hg, Al, de los que no se conoce ninguna función esencial y que, por tanto, si son absorbidos en determinadas cantidades, pueden ser tóxicos; este término es correcto, siendo activos a concentraciones suficientemente bajas.

La esencialidad de un elemento puede ser definida en base a distintos criterios:

- la reducida absorción debe causar un daño funcional;

- la reintroducción en la dieta en cantidades fisiológicas debe prevenir y curar los síntomas de deficiencia;
- la ausencia debe impedir el crecimiento o el cumplimiento del ciclo vital del organismo;
- la influencia sobre el metabolismo de un determinado organismo tiene que ser directa;
- el efecto no puede ser completamente reemplazado por la sustitución con otro elemento.

En general, incluso estando los oligoelementos implicados en funciones o estructuras diversificadas, se puede afirmar que su papel principal es el coenzimático en casi el 25/30% de las enzimas actualmente conocidas.

En este contexto, bien un aumento, bien una reducción de estos elementos puede provocar efectos tóxicos y en especial, una disminución de la aportación puede determinar la aparición de efectos desfavorables.

Algunos de ellos como el flúor en los humanos y el cobre en la oveja, poseen un margen entre asunción benéfica y tóxica, es decir entre necesidad, exigencia y tolerancia, mientras que otros como el zinc y manganeso, poseen una alta tolerancia y por tanto un amplio margen entre asunción mínima esencial y la producción de efectos tóxicos en los organismos (138).

De los elementos traza, como el cadmio, sólo una aportación elevada es capaz de determinar la aparición de efectos desfavorables sobre la salud siendo tanto más relevantes cuanto más alta es su dosis.

Las distintas especies de elementos traza y sus derivados organometálicos son absorbidos por los organismos vivientes a través de distintos mecanismos, se localizan en órganos blanco para luego ser excretados.

### **I.1.8 Bioacumulación del cadmio**

La bioacumulación representa el cociente entre los niveles de un elemento en un organismo y la cantidad del mismo en el entorno en el que vive, o en las distintas especies de organismos animales o vegetales del que se alimenta.

Mientras que en el hombre y en el ganado el problema de la bioacumulación puede ser controlado mediante la utilización de pruebas limitadas al régimen alimenticio suministrado, en los animales salvajes, el problema es mucho más complicado y puede ser valorado sólo en base a la entidad de la contaminación ambiental.

La bioacumulación de los metales pesados en el organismo es relevantemente tóxica, y se manifiesta con la aparición de patologías en diferentes órganos y tejidos.

Para el estudio de las distintas fases de absorción, distribución, biotransformación y excreción del cadmio, han sido propuestos varios modelos metabólicos multicompartimentales. Éstos han permitido determinar el ciclo que el metal cumple en el organismo y los compartimentos en los que se reparte según sea absorbido (18 - 21 - 27).

### **I.1.9 Vías de absorción**

En la población profesionalmente expuesta, la vía principal de absorción es el sistema respiratorio, con una dosis de absorción del 10 al 40% según se trate de polvo o humo y según las dimensiones de las partículas.

Por otra parte, la vía respiratoria será también una importante vía de absorción durante la exposición extra profesional, ya que dicho metal es vaporizado en el humo producido durante la combustión del tabaco. Los cigarrillos pueden contener hasta 1,2 µg de Cadmio, del cual el 10% es absorbido por los pulmones.

En la exposición industrial, la vía gastrointestinal, juega un papel menos importante pero no irrelevante, con una dosis de absorción que oscila entre el 2 y el 10%. En la población en general el aparato digestivo constituye en todo caso, la principal vía de absorción debido a la ingestión de comidas o bebidas que contienen cadmio (arroz, agua potable u otros elementos) o por la disolución del metal a partir de los recipientes. De hecho, muchas veces se han observados casos de absorción accidental debida a la ingestión de comidas y bebidas levemente ácidas, preparadas y guardadas en recipientes recientemente elaborados con cadmio (el cadmio es soluble en los ácidos). Cierta penetración también puede realizarse a través de la piel, cuando se le aplicada compuestos solubles de cadmio.

En los animales, las fuentes de cadmio están estrechamente relacionadas con la contaminación ambiental (piensos, las aguas contaminadas) así como, con los productos utilizados como ascaricidas.

Por otra parte, la absorción por vía digestiva presenta un cierto interés toxicológico, aunque menor, ya que el poderoso efecto emético del metal limita notablemente su toxicidad. Además, ésta última depende de factores dietéticos: es mayor en dietas pobres en calcio, vitamina D, hierro y proteínas y, menor en regímenes ricos en zinc. Hay que recordar, en realidad, que el cadmio desde un punto de vista químico y metabólico presenta una fuerte afinidad con el zinc, y muchos síntomas de la toxicidad del cadmio son parecidos a los de falta de zinc.

Muchos estudios epidemiológicos desde hace tiempo han indicado la interacción tóxica y cinética entre cadmio-zinc y plomo-zinc. Efectivamente, como consecuencia de una exposición a bajos niveles de Cadmio-plomo se observa una relativa deficiencia de zinc. Uno de los efectos de la toxicidad del cadmio es debido a una mayor exigencia de zinc además del cobre y el hierro.

En la absorción por vía digestiva se producen alteraciones interesantes como las lesiones inflamatorias de la mucosa oral y la alteración del color de

los dientes. La absorción después de la ingestión es condicionada por diferentes variables, como la dimensión de las partículas ingeridas, el pH, la velocidad del tránsito gastroentérico, la ingestión de otros alimentos al mismo tiempo, la solubilidad del compuesto metálico y las interferencias con otros metales.

Una vez absorbido, el metal se reparte en muchos órganos y tejidos diana en forma libre o enlazada; entre dichos órganos, los principalmente afectados son el hígado y el riñón que juntos pueden contener más del 75% del cadmio total. Otros órganos depósito, son los pulmones, la hipófisis, el páncreas, la glándula tiroidea, los músculos, los testículos, las glándulas salivales y el tejido óseo (1 - 54 - 60 -113).

En la población no profesionalmente expuesta, las concentraciones de cadmio en estos órganos aumentan según la edad, tendiendo a estabilizarse, según muchos estudiosos, alrededor de los 60 años, probablemente por el reducido consumo de comidas y por cambios fisiológicos a nivel de la corteza renal.

La vida media del cadmio es muy larga, siendo el ritmo de excreción interior muy lento, y se estima alrededor de los 20-35 años, aunque los datos relativos a los diferentes órganos diana todavía han de ser definidos de manera exacta.

Uniones proteicas a nivel plasmático, de los tejidos y a nivel celular regulan la difusibilidad del metal en el plasma, en los tejidos, en el fluido intersticial e intracelular. La unión a nivel de tejidos es importante porque, teniendo una elevada afinidad con el metal, puede, hasta determinadas concentraciones, neutralizar su toxicidad actuando como un depósito inerte.

No existe un mecanismo de control homeostático sobre los niveles de cadmio en los tejidos. En éstos, el contenido del metal varía proporcionalmente al variar la cantidad ingerida. Además, después de haber superado el potencial

de unión, el metal acumulado puede pasar en la cuota plasmática difundible y alcanzar los sitios de acción.

En la sangre el cadmio se enlaza a casi el 90% de la hemoglobina y la tioneína. La tioneína es un  $\alpha$ -globulina rica en cisteína y por consiguiente en radicales sulfidrilicos con los cuales el metal presenta gran afinidad.

El cadmio por tanto se enlaza a ella y forma el complejo cd-tioneína o metalotioneína (25 -144). La metalotioneína es una proteína de transporte de bajo peso molecular sumamente específica, que transporta el cadmio al hígado y de éste a otros órganos, sobre todo a los riñones por los que presenta un tropismo selectivo muy estable y por tanto otorga al cadmio una vida biológica media larga (20/30 años) (145 – 146 -147).

En base a su elevada capacidad de enlazar el cadmio y el zinc, la metalotioneína secuestra el metal quitándole la disponibilidad por enlaces en los sitios funcionales más delicados, reduciendo considerablemente su toxicidad.

En la sangre la acción tóxica se manifiesta con el bloque de los grupos sulfidrilicos de enzimas esenciales y la consiguiente inhibición de la biosíntesis de hemo; tiene una vida media de más de dos horas, se acumula en los eritrocitos y es causa, a altas dosis, de una caída del contenido hemoglobínico y una reducción del número de los glóbulos rojos.

#### **I.1.10 Intoxicación con cadmio**

La toxicidad del Cadmio se caracteriza por una forma aguda y una crónica. Hay intoxicación aguda generalmente consecuencia de la inhalación de elevadas concentraciones de polvos o humos de cadmio; se manifiesta a partir de 4-6 horas de la inhalación con fenómenos de irritación del aparato respiratorio y digestivo, irritación nariz-faríngea, cefalea, náuseas, vómito, escalofríos y fiebre.

Los efectos agudos han sido observados también en personas que han usado comidas guardada durante largo tiempo en recipientes con elevada cantidad de cadmio. La ingestión de comidas contaminadas produce náuseas, vómitos, dolores abdominales y a veces diarrea. Otras manifestaciones agudas serían, según observaciones clínicas y experimentales, lesiones hepato-renales y coronarias, de los ganglios sensoriales, de los testículos, del páncreas y alteraciones teratológicas. Las intoxicaciones agudas son muy raras, ya que después de casos letales ocurridos en el pasado, los controles son más rigurosos. Son, en cambio, todavía peligrosos los efectos debidos a una larga exposición o intoxicación crónica.

La intoxicación crónica tiene como manifestaciones principales pero no únicas, la nefropatía tubular, el enfisema pulmonar, la osteoporosis y la osteomalacia (28 - 64 - 86). Las manifestaciones crónicas aparecen después de un tiempo de exposición variable de dos a treinta años. Dichas manifestaciones están todavía en discusión, son menos frecuentes, pero igualmente importantes, y se presentan bajo forma de: acción cancerígena y teratógena, hipertensión arterial, anemia, lesiones testiculares y hepáticas y pigmentación amarilla de los dientes.

Las alteraciones del color de los dientes van del amarillo claro al moreno dorado y se manifiestan bajo la forma de un anillo sobre la superficie vestibular de la corona, empezando por el cuello y extendiéndose circularmente en el margen incisivo hasta casi la mitad de la altura del diente. Este anillo es considerado como una de las primeras señales clínicas de intoxicación, que generalmente nunca se manifiesta antes de dos años desde la exposición.

En el ámbito clínico, la nefropatía por cadmio se presenta como una tubulopatía de lenta evolución que según algunos autores gradualmente podría retroceder una vez terminada la exposición. La hipótesis del retroceso ha sido en todo caso refutada por otros estudios que han demostrado cómo los daños renales, además de mantenerse después de muchos años de acabar la actividad laboral, tienden, en los casos más graves, a empeorar (2 - 29 - 38).

El cuadro anatómo-patológico es caracterizado por una inicial afección de los glomérulos y los túbulos proximales; la consecuencia es una proteinuria de bajo peso molecular acompañada por la enzimuria. La proteinuria por el cadmio se debe principalmente a la imposibilidad de reabsorción tubular debida a la aumentada permeabilidad tubular, a la descompensación energética y a las inhibiciones de la peptidasas.

Cómo índice de lesión tubular en la intoxicación de cadmio, se utiliza una proteína de bajo peso molecular, la B<sub>2</sub> microglobulina urinaria. En esta fase denominada de adaptación, las células tubulares renales presentan un aumento del retículo endoplasmático liso, de microcuerpos y de lisosomas; al mismo tiempo se observa un aumento de la metalotioneína intracelular. Sucesivamente, el daño se presenta con mayor evidencia, aunque la porción distal de los túbulos retorcidos resulta dañada sólo en algunos casos y tras una larga exposición. Esta fase resulta caracterizada por inflamación y necrosis de las células tubulares.

Con respecto a los efectos del cadmio sobre el sistema cardiovascular, la hipertensión ha sido demostrada sólo experimentalmente, sobre animales de laboratorio, como más adelante será ilustrado con más detalle. En el modelo humano, no han sido totalmente definidos los efectos tóxicos provocados por dicho metal sobre la hipertensión arterial y el sistema cardiovascular (83 - 107 - 130).

Los datos experimentales confirman que la exposición a bajas dosis de cadmio parece ser nociva. Sin embargo, el grado de toxicidad dependerá de los factores genéticos, la edad, la costumbre de fumar, y la predisposición familiar. Además, la dieta también influye ya que la concentración de sal en la dieta por la presencia de metales como s.f., Cu, Se, tiene un efecto inhibitorio, mientras que el plomo la potencia.

Posteriores investigaciones han demostrado como existe una fuerte correlación entre los niveles de cadmio atmosférico y la mortalidad por

patologías cardiovasculares, la incidencia de arteriosclerosis; además, parece ser más elevada en las poblaciones que usan habitualmente aguas dulces muchos más ricas en cadmio y plomo respecto a las duras.

El cadmio tiene otros efectos sobre el sistema cardiovascular. Así pues, el suministro de bajas concentraciones de cadmio en el agua para beber, puede alterar las funciones del corazón, puede perjudicar el microcículo engendrando un espesamiento de las pequeños vasos y los capilares reduciendo la circulación. En las mujeres también es afectada la circulación uterina con posible premadurez o deformidad del feto.

La anemia por cadmio es una anemia moderada normo o hipocrómica, con reducción de las resistencias osmóticas y de la vida media de los eritrocitos (32 - 42 - 150).

El pulmón representa uno de los órganos diana del cadmio; es selectivamente afectado como consecuencia de exposiciones a elevadas concentraciones de humos y polvos de metal, que provocan daños pulmonares acompañados por tos, sensación de opresión torácica, disnea sin fiebre, y que han sido evidenciados sólo en trabajadores que lo tomaban por inhalación. Efectos crónicos también pueden manifestarse por exposiciones a más bajas concentraciones, con cuadros de tipo irritativos bronquiales. La patología más común es el enfisema pulmonar que aparece habitualmente después de la nefropatía y después de largos períodos de exposición (unos 20 años).

El cadmio también afecta el esqueleto provocando osteoporosis, fracturas espontáneas y osteomalacia, no solamente en trabajadores expuestos a dicho metal, sino también en individuos no expuestos a altas concentraciones atmosféricas de cadmio y que ingieren una dieta pobre en calcio (79). Los pacientes acusan graves dolores reumáticos y mialgias; esta sintomatología fue señalada por primera vez en 1946 en Japón y fue denominada Itai-Itai por los habitantes de un pueblo que se intoxicaron nutriéndose con arroz contaminado por cadmio.

El cadmio constituye un grave factor de riesgo en el desarrollo del proceso osteoporótico incluso cuando las dosis suministradas son bajas. Sin embargo estas patologías surgen sólo en concomitancia con otras causas adyuvantes, como la escasa alimentación y la modificación del metabolismo de la vitamina D (de la que el cadmio es sin duda una causa).

Otros mecanismos han sido sugeridos para explicar los efectos del cadmio sobre el esqueleto:

-Algunos investigadores han demostrado que la alteración del metabolismo fosfocálcico es secundaria respecto al daño renal como ya hemos dicho, con el consiguiente incremento de la pérdida de calcio y una reducida hidroxilación de la vitamina D.

-Otros investigadores han sugerido que el cadmio ralentiza la formación de nuevo tejido óseo en consecuencia de la desestabilización del colágeno, o por alteración de la síntesis directa o finalmente por inhibición del enzima “*lisilosidasa*”.

-Una tercera posibilidad es que el cadmio, siendo un fuerte antagonista del calcio estimula el proceso de reabsorción ósea tanto in vivo como in vitro. Esto fue demostrado por el hecho de que en cultivos de médula ósea in vitro el metal es capaz de estimular la producción de osteoclastos y a nivel osteoblástico, de parar el proceso de mineralización inhibiendo la actividad de la fosfatasa alcalina ósea y el depósito de sales de calcio.

El cadmio también tiene un efecto tóxico sobre el cartílago ya que influye negativamente sobre las vías de diferenciación de los condroblastos.

## ***1.2. CADMIO EN EL MEDIOAMBIENTE***

Podemos hallar cadmio en la atmósfera, en el agua y en el suelo. A continuación describiremos cómo llega este metal a cada uno de estos ecosistemas.

El cadmio es un metal cuyo uso es bastante nuevo. Antes de la II guerra mundial prácticamente no había demanda, y se asociaba a una impureza de zinc y plomo, con lo que era desechado, produciendo grandes áreas de contaminación alrededor de la industria del zinc y del plomo. Actualmente, se sigue relacionando la contaminación por cadmio con este tipo de industria, es donde se producen mayores emisiones al medio ambiente. Sin embargo, también se producen emisiones de cadmio, aunque en mucha menor cantidad, en la combustión de basuras, combustión de carbón, industria del acero y producción de cementos. La emisión de metales pesados al medio ambiente puede producir daños a nivel global, regional o local. En el caso del cadmio, se ha visto que la relación de contaminación es de regional a local.

<b>Origen de la Emisión</b>	<b>Emisión de Cd (Tm./año)- media</b>
Combustión Carbón	232
Combustión de aceites	143
Producción de Plomo	117
Producción de Cobre/níquel	2550
Producción de Zinc/Cadmio	2760
Incineración de basuras	748
Industria del acero	156
Producción de cementos	272
Industria de Fertilizantes	171

*Tabla 1: Valores de 1983*

### **I.2.2 Emisiones atmosféricas**

La mayoría de las emisiones a nivel atmosférico se realizan a través de la industria del metal, seguida por la combustión de residuos o basuras, combustión de carbón, industria cementera y producción de fertilizantes. Si comparamos la emisión de cadmio a partir de fuentes naturales con la realizada por procesos humanos, vemos que, por ejemplo, en 1986 fueron 960 toneladas frente a 7570 toneladas respectivamente, lo que representa que el 90% del flujo anual de cadmio es de origen humano.

La concentración de cadmio es elevada alrededor de minas y zonas industriales, así como en zonas urbanas, concentración que disminuye a medida que uno se aleja de estas zonas, siendo menor, por ejemplo, en áreas rurales. Sin embargo, se sabe que el aire es un medio que permite el transporte de cadmio a la cadena alimentaria de zonas muy alejadas de la civilización; por ejemplo, se han realizado estudios de niveles ambientales de cadmio en el ártico, que han resultado ser muy similares a los niveles ambientales de ciertas zonas rurales de los Estados Unidos.

### **I.2.3. Contaminación del agua**

El cadmio que llega al agua procede principalmente de vertidos industriales y urbanos. La contaminación depende también de la cercanía de superficies acuáticas a zonas urbanas, ya que no será igual la cantidad del cadmio que pueda llegar a un río cercano a una zona industrial, que en alta montaña. Sin embargo, parte del cadmio atmosférico acaba siendo depositado en la superficie acuática, y representa el 23% del cadmio contaminante, es decir, es la vía principal de entrada de cadmio en agua.

El 3 de diciembre de 1997 la Comisión Europea estableció los valores límite de emisiones mensuales permitidos por la industria, garantizando también la no transferencia de contaminación del aire al agua, los valores permitidos en agua para compuestos de cadmio son 0.02 mg/L (promedio mensual).

### **I.2.4 Contaminación de suelos**

La mayor parte de cadmio vertido por el hombre va a parar al suelo. Al igual que en el agua, la vía principal de deposición es la atmosférica (23% del total), seguida de vertidos urbanos, uso de barros industriales como fertilizantes para mejorar las características minerales de los suelos, o uso de fertilizantes, como derivados de fosfato impuros.

Se considera la concentración de cadmio en suelos entre 0.3-0.6  $\mu\text{g/g}$ , y se piensa que esta concentración se doblará cada 50-80 años, contando los índices de emisión de origen humano. Actualmente, en la mayoría de suelos urbanos, es raro encontrar concentraciones inferiores a 1.0  $\mu\text{g/g}$ . Incluso se han hallado zonas en Japón tan contaminadas que no pueden usarse ni para cultivar arroz. En Europa la mayoría de suelos contaminados lo han sido por el uso de fertilizantes y lodos industriales más que por la industria en sí. El problema que se plantea actualmente, es cómo conseguir descontaminar estos suelos (63 - 81 -102).

### **I.3. CONTAMINACIÓN DE ALIMENTOS POR CADMIO**

El acumulo de cadmio tiene, mayoritariamente, un origen alimentario. Además, de todos los metales tóxicos emitidos al medio ambiente, éste es uno de los que más tienden a acumularse en los alimentos.

Una característica del cadmio es su fácil transferencia del suelo a los vegetales, siendo uno de los metales que mejor se absorben por las plantas, sobre todo cereales como el arroz, el trigo y, en menor cantidad el maíz. A nivel de contaminación por agua, son los moluscos bivalvos, crustáceos y peces los que presentan mayor incidencia de contaminación.

#### **I.3.1 Aire-alimentos**

La forma de transferencia del cadmio atmosférico a los alimentos es la deposición de éste sobre las frutas y vegetales. La retención del cadmio en la superficie vegetal dependerá de factores como: la velocidad de deposición, el tamaño de partícula, factores climáticos y características de las hojas. Se ha visto que, lavar los vegetales antes de su uso, reduce significativamente los valores de cadmio, lo que corrobora la idea del depósito de cadmio atmosférico.

### **I.3.2. Agua-alimentos**

La concentración de cadmio en el agua de bebida suele ser del orden de 2 µg/L, lo que quiere decir que no es una vía importante de exposición.

El cadmio contenido en el agua puede pasar a los recursos alimenticios acuáticos, y de aquí llegará a la cadena de alimentación. La mayoría de la fauna y flora acuáticas pueden acumular cadmio en cantidades superiores a los niveles que pueda haber en el agua.

Si observamos la cadena trófica, el primer nivel, el de las plantas acuáticas, será el que posea mayor poder de acumulación del metal. Tendríamos después los moluscos y crustáceos, que también tienden a bioacumular cadmio. Por ello, ciertos tipos de dietas basadas en el uso de algas marinas pueden acabar produciendo toxicidad al individuo. Lo mismo ocurre en los pueblos pescadores, cuya dieta está basada en pescado y otros productos de origen acuático.

### **I.3.3. Suelo vegetales**

Se ha relacionado la concentración de cadmio en los vegetales con la concentración del metal en el suelo. Además, se ha constatado que estos niveles han ido aumentando a lo largo de los últimos años, incluso en zonas naturales no industrializadas ni urbanizadas.

La acumulación se produce de forma continua, no existiendo ningún tipo de umbral, como ocurre con otros metales, por ejemplo, el plomo, y esto ocurre a concentraciones tan bajas de sólo 0.3 ppm en el suelo.

Todos los alimentos de origen vegetal sufren una contaminación débil, pero sistemática, que corresponde a unos niveles que van de 5 ppb hasta 100 ppb como máximo. De forma puntual será despreciable, pero cuando se compara con valores diarios se llega a niveles bastante elevados en algunos casos.

Una disminución del ph del suelo facilita la transferencia del cadmio al vegetal. Por ello es importante, en zonas industrializadas, el fenómeno de la lluvia ácida, ya que ésta hace disminuir el ph del suelo, aumentando la absorción por parte de las plantas y, por tanto, la acumulación. Se ha visto que el aumento puede llegar a ser de 2 a 20 veces superior que en zonas con suelos no contaminados o ph más elevados.

#### **I.3.4. Suelo-plantas-animales-alimento**

En los últimos años, varios estudios realizados sobre los desperdicios animales han demostrado que el contenido en cadmio ha aumentado a medida que aumentaban sus concentraciones en el medio ambiente (suelos, vegetales, semillas). Esto indica que se están viendo expuestos a niveles cada vez más elevados del contaminante. Sin embargo aún no está claro que los niveles que acumulan puedan llegar a crear un problema de salud en el hombre.

Los productos animales más frecuentes en la dieta humana son huevos, leche, músculo y carne roja, y éstos son, precisamente, productos conocidos por tener niveles particularmente bajos en cadmio. Todos estos productos nos darían tan sólo un 10% de la ingesta diaria total estimada en la población adulta de los Estados Unidos. Este valor tan bajo, se debe al hecho de que, en general, el hígado y los riñones de los animales actúan como filtros, donde se retiene el cadmio, con lo que no llega a acumularse en otras zonas. Diferente es, sin embargo, el consumo de vísceras, sobretodo de riñones e hígado, ya que es donde tiende a acumularse.

#### **I.3.5. Tecnología alimentaria-alimentos**

También la tecnología alimentaria puede contaminar los productos en la cadena de manipulación y tratamiento de los alimentos, sobretodo en el caso de embalajes.

No es muy frecuente que ocurra en el caso de conservas, pero cuando el envase es cerámico sí que puede disolverse el cadmio, ya que muchos esmaltes cerámicos coloreados pueden liberar, en contacto con el alimento, sobretodo si éste es ácido, cantidades no despreciables de cadmio. Así pues, se han realizado estudios para cuantificar la liberación de cadmio por las vajillas, colocando las piezas 24 horas en contacto con una solución de ácido acético al 4%, y se vio que el límite establecido por la OMS de 0.5 mg/l se superaba en el 36% de los casos en platos barnizados y esmaltados, en un 22% en platos para niños, y en un 13% en platos de vidrio templado.

También puede ocurrir con envases plásticos, ya que algunos tipos de plásticos son estabilizados con estearato de cadmio. Sin embargo, los estudios realizados con recipientes plásticos estabilizados con estearato de cadmio, y coloreados con pigmentos que contienen cadmio no han dado resultados apreciables de liberación de dicho metal, ya que se han obtenido valores normalmente inferiores a 30 µg/l (lejos de los 0.5 mg/l permitidos por la UE).

Se debe tener en cuenta también la acción de la luz, ya que la luz favorece la degradación de pigmentos con cadmio, posibilitando la migración su al alimento. Esta posibilidad se tiene en cuenta en la Directiva Europea del 15 de Octubre de 1984) (73 - 85 - 110).

#### **I.4. VALORES DE CADMIO**

En 1972 la FAO/OMS fijan como valor de cadmio que puede ingerirse semanalmente por un adulto **400-500 µg** y considera una dosis mortal la de **100 µg/dl**. La cantidad en agua potable debe ser, según la OMS inferior a **5 µg/l**. Este valor se contempla en nuestra legislación en el RD 1138/1990, y se ratifica en una nueva propuesta Directiva en el 2000

La FDA limita la concentración en colorantes alimentarios a **15 ppm**.

La OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*) limita a **100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$**  de cadmio en lugares de trabajo y se recomienda que los trabajadores respiren la menor cantidad de cadmio posible.

La dosis fijada por la OMS de 400  $\mu\text{g}$ /semanales es muy baja, y esto se debe al carácter acumulativo que presenta el cadmio. Por ejemplo, en un neonato, la cantidad total de cadmio en el organismo es de 1  $\mu\text{g}$ , pero en la edad adulta podemos acumular 30-40  $\mu\text{g}$ , sin que lleguen a aparecer manifestaciones de toxicidad.

### ***I.5. ALIMENTOS QUE ACUMULAN CADMIO***

Como ya se ha comentado anteriormente, la acumulación se da, mayoritariamente, en productos de origen vegetal, sobretodo en semillas y cereales (arroz, trigo...), también en verduras como la lechuga y los rábanos, hortalizas, frutas (Tabla 2).

Además de los ejemplos antes citados, a nivel Europeo se han hallado valores importantes de bioacumulación en ciertos tipos de champiñones, especies comestibles del género *Agáricos* (*A. Augusta*, *A. Ferrarus*, *A. Silvícola*, *A. Macrosporus* y *A. Maleolens*). El Cadmio se acumula en las partes aéreas en mayor concentración de la existente en el suelo, concentrándose sobretodo en las lamelas. Esta acumulación está determinada genéticamente y es distinta según las razas, pero también influye el contenido de cadmio en el suelo. Por ejemplo, se ha visto que los champiñones cultivados en estiércol de caballo contienen aproximadamente una décima parte del cadmio que los que crecen en compuestos obtenidos a partir de basura.

Muchos champiñones que se consumen en diversas partes de Europa, especialmente en el sur de Alemania y en Suiza, contienen más de 50 mg de Cd/Kg de peso seco. Es decir, el límite que establece la FAO/OMS de 500  $\mu\text{g}$  semanales correspondería a la cantidad que contendría 50g de champiñón de bosque.

<b>Producto</b>	<b>Concertación (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>
Col	24
Lechuga	40
Espinacas	104
Maíz dulce	268
Judías secas	35
Arroz	166
Maíz	277
Trigo	288
Soja	322
Pimiento	2
Pepinos	22
Tomates	231
Naranja	20
Uva	23
Manzana	36
Pera	38
Zanahorias	207
Patatas	297

*Tabla 2. Concentración media de cadmio en diferentes especies de cultivos norteamericanos*

En aguas contaminadas, los crustáceos suelen tener una media de 2-10  $\mu\text{g/g}$  de cadmio, sobretodo concentrado en riñón e hígado. Por ello, es importante tener en cuenta el tipo de dieta. Por ejemplo en un pueblo pescador, con dieta básicamente de pescado, considerando que la concentración de cadmio en moluscos y crustáceos es de 0.05-0.1  $\mu\text{g/g}$ , la ingesta total diaria puede llegar a ser de 42-69  $\mu\text{g/día}$ , cuando los valores de ingesta en una ciudad media serían de unos 14  $\mu\text{g/día}$ . Dentro de este grupo, los mejillones, las ostras, y gran número de bivalvos contienen entre 0.5 y 1.5 ppm de cadmio. Los cangrejos son los que parecen retener más cadmio, sobretodo en la parte de vísceras, donde pueden llegar a acumular hasta 10 ppm, mientras en el resto de la carne no suele sobrepasar las 0.3 ppm. En el caso del pescado, los valores suelen ser muy bajos, del orden de 0.2 ppm.

Los alimentos de origen animal serían los menos contaminados por cadmio, suelen tener unas concentraciones de algunas decenas de ppb en relación al peso fresco. Sin embargo, hay una excepción, la de las vísceras animales, sobretodo hígado y riñón. Por el metabolismo del cadmio, éste tiende a acumularse en estos dos órganos, sobretodo en forma combinada con metalotioneina, lo que favorece posteriormente la absorción intestinal en el hombre, aumentando el riesgo de toxicidad.

En Francia, por ejemplo, podemos encontrar en el “*Inventario Nacional de Calidad*” una relación de los alimentos que contienen mayor proporción de cadmio, y hallamos mayores concentraciones en alimentos como vísceras (riñones, hígados), en algunas aves (pato, pavo...), en el conejo, diversas verduras frescas (lechuga), o en conserva (espinacas, judías verdes...), atún enlatado, huevos, algunos quesos (quesos cocidos, sobretodo) y algunos productos de panadería y bollería (biscotes, croissants, pan completo), productos que derivan en su mayoría de cereales.

La concentración del cadmio en las bebidas no se ha investigado suficientemente, sin embargo se sabe que el vino, la cerveza y la sidra contienen proporciones muy bajas.

Por otra parte, se conoce el hecho de que el agua puede contaminarse por el sistema de distribución, ya que muchas tuberías se realizan con hierro galvanizado, esto se logra con aleación con zinc, muchas veces impuro, y la impureza que lleva el zinc suele ser cadmio, con lo que parte será liberada en el agua de las tuberías.

En el caso del café, también se han hallado ciertos residuos de cadmio, normalmente en café de máquinas automáticas, ya que las piezas metálicas de aleación de la máquina pueden ceder cadmio.

Debido al elevado poder de bioacumulación que posee el cadmio y su toxicidad, es necesario controlar y conocer con exactitud la contaminación de

los diferentes tipos de alimentos, ya que éstos son la vía principal de aporte del metal al organismo humano.

Una vez conocemos los valores de cadmio contenidos en los diferentes tipos de alimentos, nos interesa conocer cuáles serán los valores de aporte diario de este metal debido a los alimentos. Los valores varían dependiendo de la zona estudiada, por ello, las cantidades establecidos por diferentes países, difieren significativamente. Tendríamos, como valores más bajos, los establecidos por el Reino Unido, para un consumo medio diario de 1,5 Kg De alimentos, el aporte de cadmio sería de 15 a 30  $\mu\text{g}$ . Valores similares también en Suecia. Sin embargo, países como Japón, Estados Unidos y Canadá prevén un intervalo más amplio, entre 15 y 70  $\mu\text{g}/\text{día}$ . A pesar de estas diferencias, ninguno de los valores es preocupante, ya que se cumplen los límites establecidos por la OMS de 400-500  $\mu\text{g}$  semanales permitidos.

En otras ocasiones las exposiciones a pequeñas cantidades de una sustancia puede proteger el organismo contra efectos letales de una sola dosis grande, por ejemplo, la exposición repetida a dosis pequeñas de compuestos de cadmio puede proteger a la persona contra dosis que pudieran ser letales para un organismo que previamente no hubiera estado expuesto al cadmio (66 - 81 - 102).

## ***1.6. TOXICOCINÉTICA***

En los adultos, la carga corporal de cadmio puede llegar a 40 miligramos, dependiendo de la situación geográfica y sobretodo del hábito de fumar, pues en un fumador la carga alcanza el doble

En condiciones "normales" de distribución, el cadmio absorbido se excreta principalmente por orina y en menor cantidad con la bilis, aunque pequeñas porciones puedan eliminarse con sudor, pelo y aún secreción gastrointestinal, pero el Cd que sale con heces en su mayor parte es el que no se absorbió (133).

En exposición no laboral, la alimentación es la fuente más importante de ingesta de cadmio. La absorción por el tracto gastrointestinal es de aproximadamente 50%. La dieta deficiente en Ca, Fe o proteína incrementa la velocidad de su absorción.

En sangre encontramos aproximadamente 0,06% del contenido corporal de Cd y más del 50% está en los hematíes unido inestablemente a una pseudo proteína, la metalotioneína. La metalotioneína es el "medio de transporte" del cadmio en el plasma sanguíneo. El aclaramiento sanguíneo del Cd es rápido, se acumula principalmente en el riñón y en adultos no expuestos llega a valores entre 7,4 y 8,8 mg, lo que representa entre 30% y 50% de su contenido corporal. La concentración en la corteza renal es 1,5 veces mayor que la del riñón total y se fija en las células del túbulo proximal. El hígado de adultos no expuestos tiene en promedio 2,7 mg de cadmio.

La acumulación de Cd en riñón e hígado depende de la intensidad, del tiempo de exposición y del estado óptimo de la función de excreción renal. En ambos casos se ha encontrado incremento con la edad. Después de sobreexposición alcanza concentraciones elevadas en el hígado; pero con el tiempo el metal se localiza en el riñón. Se ha descrito también que las concentraciones renales de zinc se incrementan al aumentar las de cadmio y que la capacidad de almacenamiento de la corteza es limitada a 300 µg/g (55 -134 - 135).

En las células, el cadmio se une a la metalotioneína, proteína cuyo peso molecular es de 6 945 u (7 000 dalton) y que contiene 26 grupos SH libres por molécula, debido a la gran proporción de residuos de cisteína. La función principal de esta microproteína es la protección del sistema enzimático celular, aunque se le ha descrito otra función, que es la de unirse específicamente al cadmio y a otros metales pesados. Su síntesis en hígado, riñón e intestinos es inducida por el cadmio. Varios estudios han demostrado que el complejo cadmio-metalotioneína es más tóxico para los túbulos renales que el cadmio per se. Paradójicamente, cuando la metalotioneína se sintetiza en las células, las protege de la toxicidad del cadmio, pues inactiva el metal. Se ha

demostrado también escasa capacidad del riñón para sintetizarla, lo que lo hace insuficiente para fijar el cadmio y da lugar a aparición de las manifestaciones tóxicas.

Poblaciones adultas del medio urbano pueden retener hasta 1,77  $\mu\text{g}$  del cadmio por día; así, en personas de 50 años hay cantidades acumuladas de hasta 32 mg; de ellos, la corteza renal contiene aproximadamente 50  $\mu\text{g}$  Cd/g, en un rango que varía entre 15 y 85. Por otra parte, se sabe que la concentración del cadmio en el hígado depende del daño de la función renal. Así pues, la disfunción renal disminuye la reabsorción del complejo cadmio-metalotioneína e incrementa su excreción urinaria. Sólo entonces la concentración de cadmio en hígado excede la de nivel renal.

El cadmio atraviesa la barrera placentaria fácilmente, induciendo allí la síntesis de metalotioneína, con la que forma el complejo cadmio-metalotioneína, que se acumula progresivamente en la placenta durante el embarazo, actuando como mecanismo protector frente al transporte de cadmio al feto. Al término del embarazo, la concentración de cadmio en la placenta es aproximadamente 10 veces más que en la sangre materna. Por el contrario, la concentración de cadmio en el cordón umbilical es alrededor de 2 a 3 veces más baja que en la sangre materna. Por ello, se cree que el cadmio puede interferir en la evolución del embarazo por acción directa sobre el metabolismo de la placenta, pero no por acción directa sobre el feto. En el recién nacido el cadmio sanguíneo es de 30 a 50% menor que el cadmio en la sangre materna. La leche materna sólo secreta pequeñas cantidades.

En exposiciones laborales, la inhalación es la ruta principal de ingreso y la absorción a partir de esta vía depende del tipo de compuesto inhalado, del tamaño de las partículas y de su retención en el pulmón. El depósito en el pulmón de partículas menores de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro es del orden de 25% y de ellas aproximadamente el 60% pasa a la sangre. Los grandes fumadores presentan valores adicionales de absorción por inhalación de hasta el 50%. Las partículas de cadmio depositadas en la nasofaringe, traquea y bronquios son

transportadas por mecanismo mucociliar a la faringe, desde donde son parcialmente ingeridas. La absorción percutánea ocurre solamente por contacto con los compuestos orgánicos del cadmio.

La concentración del cadmio aumenta en sangre solo en los primeros 6 meses. Luego sus niveles son proporcionales a la concentración en el ambiente laboral. En expuestos ocupacionales, el cadmio aparece también en páncreas, pulmón, aorta, corazón y músculos. Elevadas concentraciones en un tejido infieren concentración alta en otros, lo que nos lleva a afirmar que la distribución se determina, solo por el nivel ambiental de cadmio y no por alguna función especial (64 - 65 - 74).

### ***1.7. EL MODELO TOXICOCINÉTICO***

La figura 2 muestra el modelo toxicocinético del cadmio, elaborado a partir de investigaciones en animales y por observaciones clínicas en trabajos de Kjellstrom T. Y Nordberg GF., que podemos resumirlo así:

***Absorción:*** Es relativamente lenta, con un promedio de 14 días en exposiciones prolongadas. Esto puede no ser importante cuando se calcula la concentración del cadmio en órganos de trabajadores o individuos expuestos crónicamente, pero si influye en los cálculos para periodos cortos de exposición.

***Vías de ingreso y distribución:*** El cadmio procede de dos vías de ingreso: inhalación e ingestión. La fracción que pasa a sangre se distribuye en 3 compartimentos de recambio:

*Compartimento 1* de “recambio rápido” y, por tanto, no genera acumulación.

*Compartimento 2* de “recambio medio”, constituido por los hematíes, en los que se acumula en pequeñas cantidades.

*Compartimento 3* de “recambio lento”; aquí, una fracción significativa de cadmio se une a la metalotioneina y va a depositarse en los órganos diana.

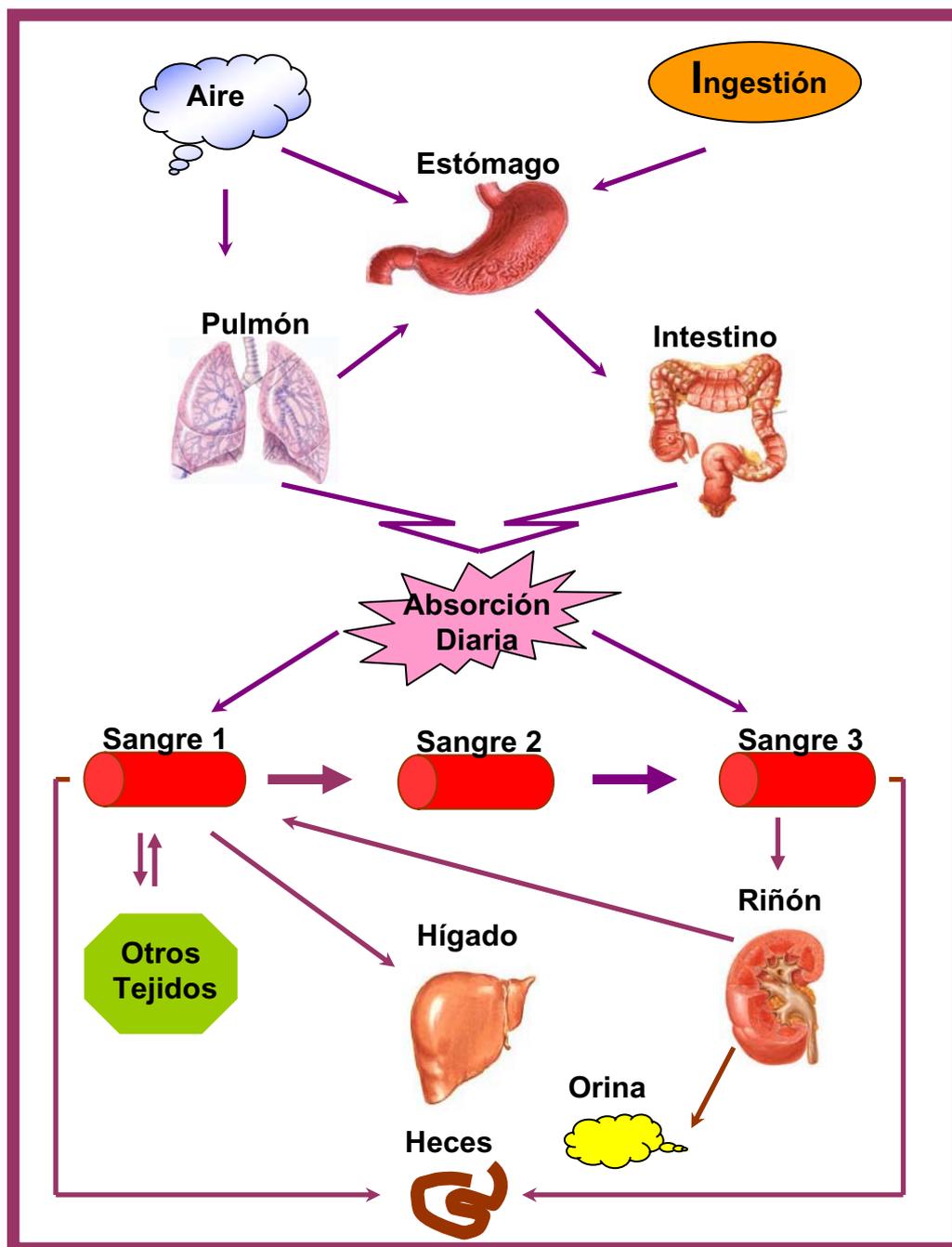


Figura 2. Toxicología del Cadmio Esquema toxicocinético.

Los compartimentos 1 y 3 son los de mayor intercambio con los demás órganos y se estima que desde el compartimiento 1 la tasa de transferencia a otros tejidos es del 50% y al hígado del 16%. Entre los tres compartimentos hay equilibrio dinámico. Sin embargo, existiría un aporte extra del riñón hacia el compartimiento 1.

En el riñón, el compartimiento 3, aunque de forma lenta, es el de mayor intercambio y por tanto no se produce acumulación, pero sí filtración por el glomérulo. Una parte se reabsorbe en el tubulo, contribuyendo así a su acumulación. El excedente se excreta con la orina. La vida media del cadmio en el organismo total es de 25 a 35 años.

**Excreción:** Las principales vías de excreción son orina y heces. Por orina, diariamente se elimina 0,007% del contenido corporal y por heces 0,03%. La vida media de excreción urinaria es de hasta 35 años. Tan solo una pequeña fracción del cadmio del compartimiento sanguíneo y otra del hígado, a través de la vía biliar, se elimina por heces (69 – 106 – 118).

### ***1.8. TOXODINÁMICA***

El cadmio es un xenobiótico y, por tanto, un metal tóxico y no esencial para el organismo, que se acumula en los tejidos humanos.

En el riñón, el epitelio del túbulo renal proximal es la diana del cadmio. Su deterioro se pone de manifiesto por el incremento de proteínas de bajo peso molecular, lo que causa "*proteinuria de peso molecular bajo*". Simultáneamente, hay alteración de la filtración glomerular, por cambios en la restricción electrostática para la filtración de las proteínas polianiónicas, lo que disminuye su reabsorción y conduce a incrementar la excreción urinaria de proteínas de alto peso molecular, que origina "*proteinuria de peso molecular alto*". Teóricamente, pues no se ha demostrado in vivo, la acción tóxica del cadmio se debería a su afinidad por radicales de los grupos –SH, –OH, carboxilo, fosfatil, cisteinil e histidil y a su acción competitiva con otros elementos funcionalmente esenciales como Zn, Cu, Fe y Ca.

Sus principales interacciones serían:

1. Unión fuerte del Cd a los grupos -SH de las proteínas intracelulares, que inhibiría a las enzimas que poseen estos grupos.

2. Desplazamiento del Zn de los enlaces -S- y la consiguiente alteración enzimática y de sus procesos bioquímicos, que se refleja en su deficiencia relativa (7-14).

### **I.8.1. Las metalotioneínas**

Existen dos tipos de las metalotioneínas que se comportan de forma distinta respecto a la acumulación del xenobiótico y a su excreción urinaria. La fracción del cadmio en el plasma se encuentra unida de forma inestable a la metalotioneína 1 y es la que se transfiere rápidamente al riñón. En el tejido renal, en cambio, el cadmio acumulado se encuentra unido de forma relativamente estable a la metalotioneína 2 y su vida media se estima hasta en 68 años.

En el hígado, la mayor cantidad de cadmio acumulado se encuentra unida también a la metalotioneína 2, con una vida media estimada hasta en 19 años.

La vida media en la sangre es aproximadamente de 2,5 meses. No tenemos datos sobre su vida media en otros órganos o tejidos; sin embargo, puede afirmarse que el 50% del contenido total corporal del cadmio está en los riñones, el hígado y la sangre, por lo que a estos 3 órganos se les denomina compartimiento de depósito.

### **I.8.2. La beta 2 microglobulina (B<sub>2</sub>M)**

La B<sub>2</sub>M es una proteína de peso molecular bajo, 11 707 u (11 800 dalton), de tipo globular sin carbohidratos, compuesta por 100 aminoácidos con un puente –S – S– entre el aminoácido cistina de las posiciones 25 y 81, con secuencias de aminoácidos y estructura tridimensional muy similar a la de las cadenas cortas y largas de las inmunoglobinas. Incluso se les ha establecido un desarrollo genético común. Se le aísla de la orina de intoxicados crónicos con cadmio, pero este aumento no es patognomónico, ya que también se le ha aislado de antígenos humanos histocompatibles y del suero de enfermos con

procesos malignos inflamatorios. La B<sub>2</sub>M es producida constantemente y se elimina casi exclusivamente por vía renal. En sujetos normales, se encuentra en baja concentración. Por su tamaño, se cree que es filtrada libremente por el glomérulo. Considerando que su concentración en el suero normal es de 2 mg/L y que su velocidad de filtración glomerular es de 140 l/ día, en los túbulos cada 24 horas hay 280 mg de B<sub>2</sub>M.

Por otro lado, se ha medido su velocidad de síntesis, usando I125 - B<sub>2</sub>M. Se obtuvo una media de 95 mg /hora/kg y se ha calculado que cada día se liberan entre 150 y 200 mg de B<sub>2</sub>M. Debido a su pequeño tamaño, difunde libremente entre los espacios intra y extravasculares, pero no pasa al espacio intracelular. Estas características moleculares, hacen que su catabolismo se regule por filtración glomerular, pasando libremente a través de la membrana glomerular. Una vez filtrada es reabsorbida por células del túbulo proximal.

La concentración urinaria de B<sub>2</sub>M en el suero del adulto sano depende de la edad y el sexo, alcanza concentraciones hasta de 1 500 mg/g creatinina. La cantidad de B<sub>2</sub>M en los compartimentos intra y extra vasculares puede llegar hasta 8 mg. Se le ha calculado una vida media entre 30 y 60 minutos, lo que concuerda con estudios de su metabolismo, que muestran un tiempo de vida promedio de 40 minutos. Su catabolismo se da por filtración glomerular y reabsorción por micropinocitosis a nivel del túbulo proximal, donde se degrada. La velocidad de desaparición de la B<sub>2</sub>M del suero depende de la velocidad de filtración glomerular, pero no de la función tubular; por tanto, el incremento en la excreción urinaria refleja un fallo temprano en la reabsorción tubular. En jóvenes no expuestos, la excreción urinaria es menor de 150 mg/24 h; pero, en adultos llega a 250. En cuanto a la filtración glomerular, el rango está entre 180 y 275 mg/24 h, con un coeficiente de reabsorción aproximado de 99,9%. Por tanto, podemos afirmar que su vida media es muy corta, pues la totalidad de B<sub>2</sub>M en el intersticio se renovarían cada 2 horas.

### I.8.3. Evaluación de la exposición con indicadores biológicos

Para evaluar la exposición al cadmio, independiente de la vía de ingreso, se debe hacer el muestreo biológico regular con los siguientes indicadores biológicos de exposición (BEIs):

A) **Cadmio en orina:** Cuando el nivel crítico de cadmio en la corteza del riñón aún no se ha alcanzado, este indicador es un buen reflejo de la carga corporal del metal. Pero cuando se aproxima al nivel crítico, refleja más una exposición reciente y al saturarse todos los tejidos con cadmio sus niveles en orina varían entre 5 y 10 mg/g de creatinina. La “*Ameritan Conferencie of Governmental Industrial Hygienists*” (ACGIH) fija como indicadores biológicos de exposición para el período 1997-1998, 5 mg Cd/g de creatinina.

B) **Cadmio en sangre:** Este indicador biológico de exposición refleja exposición muy reciente, de 45 a 60 días, por lo que es un buen indicador laboral cuando se valora mejoras higiénicas o tecnológicas del ambiente de trabajo. Pero, para exposiciones ambientales mínimas, es un parámetro menos satisfactorio que el cadmio en orina. El límite biológico que fija la ACGIH para el período 1997– 1998 es de 5 mg/l (20 - 41).

C) **Cadmio en heces:** Sólo refleja la entrada diaria de cadmio con la dieta (EDD). Por tanto, el Cd excretado por esta vía no es útil en exposición laboral.

D) **Cadmio en la raíz del pelo:** Es un parámetro muy variable cuando valora diferentes niveles de exposición, pero refleja más adecuadamente exposiciones ambientales. No se ha establecido su relación con niveles de cadmio en riñón o hígado. Tampoco sirve para diferenciar si lo que expresa es Cd ambiental o simplemente se libera a partir del Cd atesorado por el organismo. Por esta razón, no se le utiliza como indicador de exposición laboral.

#### **I.8.4. Evaluación de la acción toxicodinámica**

Si se tiene certeza de la exposición, medida por la carga corporal de cadmio, pero se quiere conocer el daño que el xenobiótico pudiera haber causado al riñón, el hígado o el pulmón, se utilizan los siguientes indicadores:

##### **1. Proteínas totales en orina de 24 horas:**

En exposición a cadmio, proteínas urinarias mayores a 1 g en 24 horas indican daño renal; pero ya desde 0,2 g /l se les considera críticas.

##### **2. Proteinuria de peso molecular bajo:**

- B<sub>2</sub>M, lisozima β galactosidasa, p glutation -S- transferasa (p GST) y ribonucleasa - metalotioneína.

- 

- Aunque este grupo de proteínas de peso molecular bajo y enzimas, individualmente en orina no son específicas para evaluar exposición ocupacional o ambiental, son índices ampliamente usados para valorar el grado de disfunción renal tubular causado por la exposición al cadmio. El inconveniente de la B<sub>2</sub>M es que se degrada en la vejiga y, con el incremento de la edad, aumenta su cantidad en la orina; así tenemos que en mayores de 50 años se halla cantidades “normales” de hasta 1,8 mg/g de creatinina (63 - 81).

#### **I.8.5. Albuminuria**

La proteinuria de peso molecular alto también ha sido referida como indicador no específico de exposición al cadmio y, por tanto, tampoco es un indicador relevante.

### **I.8.6. N-acetil-b-d-glucosaminidasa (NAG)**

Hemos separado esta enzima, producto de secreción renal, porque es muy sensible para medir daño renal inducido por cadmio.

### **I.8.7. Calcio urinario**

Si bien ya se había aceptado la calciuria como indicador de disfunción renal inducida por el cadmio, es sólo recientemente que la escuela de Shanghai ha postulado la excreción de calcio urinario como indicador temprano y específico de exposición ambiental. El mecanismo por el que se produce la calciuria inducida por cadmio aún no ha sido bien determinado, pero se postula que el cadmio al entrar en la célula, podría causar cambios en el gradiente electroquímico por competición e inhibición en la bomba sodio-calcio, lo que afectaría la relación ciclo-adenosina monofosfato/ciclo-guanosinamofosfato, que a su vez produciría disminución en la reabsorción del  $\text{Ca}^{2+}$  y por tanto su incremento en orina. Se sabe que la calciuria se correlaciona muy bien con el incremento precoz de  $\text{B}_2\text{M}$  y NAG, indicadores de disfunción tubular renal.

### **I.8.8. Perfil hepático**

Es útil para evaluar el posible daño hepático en trabajadores de larga exposición, pues la alteración hepática aparece mucho después que el daño renal.

### **I.8.9. Evaluación respiratoria**

Para evaluar el posible daño pulmonar, se usa radiografía del tórax y los principales indicadores de la función ventilatoria pulmonar:

- Capacidad vital forzada
- FEV1
- FEV1 / CVF
- Pico de flujo espiratorio, etc...

### **I.8.10. Intoxicación crónica por exposición al cadmio**

En lo relativo a la exposición/alteración de la función renal en sujetos expuestos al cadmio, se ha descrito el desarrollo de la intoxicación en tres fases:

1) En la primera fase, el cadmio que ingresa en el organismo se acumula en la corteza renal y se liga a la metalotioneína. Si el complejo cadmio- metalotioneína no se satura, la eliminación de cadmio urinario está en relación directa a la cantidad acumulada en la corteza renal.

2) En exposiciones prolongadas, una segunda fase resulta en la saturación de los sitios de unión cadmio-metalotioneína y, por lo tanto, el incremento del cadmio urinario en esta fase reflejará carga corporal.

3) Una tercera fase se caracteriza por la disfunción renal, en la que la excreción de cadmio está directamente relacionada con daño renal.

### **I.8.11. Vía de ingreso vs. Manifestaciones clínicas y cáncer**

Exceptuando los síntomas respiratorios, las manifestaciones clínicas son independientes de la vía de ingreso y del tipo de exposición. No hay estudios sobre si la ingestión del cadmio favorece el desarrollo del cáncer, pero sí que la exposición laboral podría estar asociada al incremento del riesgo de cáncer de mama (127 - 130 -159). Otros tipos de cáncer pulmonar o renal deben ser considerados únicamente como probables, pues los datos actuales sólo sugieren riesgo bajo, aún con niveles de exposición elevados. Lo que sí se ha demostrado en animales es que el cadmio es teratogénico y embriotóxico (21 - 21 - 27 - 59 - 94 - 95).

### **I.8.13. Síndromes de exposición crónica al cadmio**

Para sistematizar el estudio de exposición crónica a cadmio, ambiental o laboral, se ha agrupado hallazgos de laboratorio, principalmente, que permiten describir los siguientes síndromes:

### I.8.13.1 Síndrome renal

En exposiciones ocupacionales se ha demostrado que, primero aparece disfunción glomerular y después de un período de latencia, entre 10 y 20 años, se manifiesta la clásica microproteinuria (80). El síndrome renal clásico de exposición al cadmio se caracteriza por:

- Proteinuria de bajo peso molecular, constituida principalmente por proteínas de tipo tubular, pero con predominio de proteínas específicas, como B<sub>2</sub>M, proteínas unidas al retinol, inmunoglobulinas de cadena corta o pos-w-proteínas, además de enzimas como lisozima, N-acetil-b-D-glucosaminidasa, ribonucleasa y pGST.

- Aumento en la eliminación de la enzima lisosoma-b-galactosidasa, lo que sugiere daño a nivel de algunas células epiteliales de las vías urinarias.

- Calciuria: En exposición ocupacional o ambiental prolongada hay daño en la reabsorción tubular, lo que provoca alteración del metabolismo del calcio con calciuria y formación de cálculos.

- Glucosuria, aminoaciduria y fosfaturia.

- Incremento de los niveles de urea, creatinina y ácido úrico en suero, por falta en el aclaramiento renal.

- Proteinuria de alto peso molecular de tipo glomerular, albúmina principalmente, pero también de transferrina e IgG (2 -107 - 150).

### I.8.13.2. Síndrome de disfunción pulmonar

En la exposición aguda se describe un síndrome de irritación de vías respiratorias y, en exposición crónica, síndromes obstructivos y restrictivos e inclusive fibrosis pulmonar. Sin embargo, en la evaluación clínica de alteración de la función pulmonar en expuestos es necesario puntualizar que:

**Primero**, es imprescindible valorar correctamente el hábito de fumar, pues el humo del tabaco potencia la acción del cadmio sobre los bronquios y los pulmones.

**Segundo**, estudios epidemiológicos señalan que la mortalidad por enfermedad respiratoria crónica es mayor en individuos con antecedentes de exposición que en no expuestos.

**Tercero**, si se separa al trabajador del ambiente contaminado, no se detiene necesariamente la evolución de la enfermedad.

#### 1.8.13.3. Síndrome óseo: Itai-Itai

Uno de los primeros cuadros clínicos descritos atribuible exclusivamente a la exposición ambiental fue el del cadmio y se le denominó “itaí-itaí”, cuya traducción al inglés sería “ouch-ouch” ergo, en español es “ay-ay”, onomatopeya de las quejas debidas a los fuertes dolores que producía la osteomalacia entre los pobladores expuestos en la zona de Toyama (Japón). Fue después de la Segunda Guerra Mundial, donde se le describió por primera vez en zonas agrícolas con altos índices de contaminación por Cd y s.f. en el agua de los cultivos de arroz. Posteriormente, se ha demostrado que la enfermedad ambiental ocurre principalmente en sujetos con metabolismo de hueso osteoporótico, como mujeres multíparas o, en ambos sexos, en personas sedentarias mayores de 50 años y también en algunos casos de trastornos del metabolismo del calcio o baja ingesta de proteínas y de vitamina D.

En exámenes radiográficos de pacientes con “itaí-itaí” y en expuestos ocupacionales a cadmio se ha demostrado pseudo-fracturas. Los primeros daños óseos descritos en expuestos que ingerían arroz contaminado era descalcificación y todavía sigue como el primer indicio de exposición que puede terminar en osteomalacia, deformaciones óseas manifiestas, fracturas espontáneas, lumbalgia, parestesias y neuralgias en miembros inferiores.

#### 1.8.13.4. Síndrome cardiovascular

Se ha descrito hipertensión arterial, además de daño en la pared de las arterias, como las principales manifestaciones de la exposición ocupacional al cadmio (103 - 105). Sin embargo, estudios epidemiológicos en sujetos

expuestos ambientales no han sido concluyentes para establecer causalidad entre exposición y efectos cardiovasculares.

#### I.8.13.5. Otras manifestaciones

Entre las manifestaciones generales no patognomónicas tenemos:

- Anosmia, pérdida de peso, decaimiento general.
- Coloración amarilla de los dientes e incremento de caries dental.
- Síntomas gastrointestinales variados.
- Anemia moderada, por alteración en el transporte del hierro dentro de las células eritropoyéticas, similar a la producida por el plomo.
- Leucocitosis y linfocitosis.
- Daño hepático moderado y, por tanto, disminución de la capacidad metabólica del hígado en general y en particular para los xenobióticos.
- Atrofia testicular en exposiciones a altos niveles de cadmio (29 - 38).

### **I.9. CARCINOGENESIS**

El cadmio ha sido descrito como cancerígeno para el hombre por la IARC y la OMS y el *Programa Nacional de toxicología* de los U.S.A..

Muchos estudios han relacionado la exposición profesional al cadmio con el carcinoma pulmonar humano. La clara relación entre la exposición profesional al cadmio y la manifestación del carcinoma pulmonar, representa el motivo por el que muchos organismos de control lo han declarado sustancia cancerígena. Otros estudios, relacionan el cadmio con los tumores prostáticos y renales, mientras que otros sugieren su implicación en los tumores del hígado, del sistema hemopoyético, de la vejiga y del estómago. También se sospecha que el cadmio pueda tener un papel en el génesis del carcinoma pancreático pero eso no está demostrado todavía.

Por otra parte, el cadmio es efectivamente un cancerígeno “multitejido” en el animal. Así pues, y confirmando los datos recogidos en el hombre, los

estudios sobre los roedores demuestran que la inhalación crónica del cadmio causa tumores pulmonares y, en los ratones, lesiones proliferativas de la próstata, incluidos adenocarcinomas, después de exposición directa o sistémica (109).

Otros órganos diana son representados por los sitios de inyección y acumulación, es decir testículos, glándulas suprarrenales, hígado, riñones, páncreas y sistema hemopoyético (84).

El tratamiento con el zinc puede modificar la acción cancerígena del cadmio previniendo los tumores de los sitios de inyección y de aquellos testiculares, aunque favoreciendo los tumores prostáticos (62). Así pues, un régimen pobre en zinc aumenta la progresión de los tumores testiculares pero reduce las neoplasias prostáticas.

Existen diferencias en la sensibilidad a la acción cancerígena del cadmio, que depende de la especie y el género.

El mecanismo de acción del cadmio es desconocido aunque muchos modelos celulares permiten formular hipótesis. La débil unión al ADN no parece ser su acción principal. El cadmio no es un activo modelo redox, aunque produce estrés oxidativo que puede perjudicar indirectamente el ADN, pero eso todavía no ha sido dilucidado (32 -107 -130).

El Cadmio podría ser un agente epigenético o un genotóxico indirecto, ya que, en general, es escasamente mutágeno. Podrían existir otros factores que contribuyen al poder oncógeno del cadmio y entre este podemos recordar una defectuosa activación de los genes, una reducida apoptosis y/o una alterada reparación del ADN. Son en todo caso necesarios ulteriores estudios para explicar la acción de este contaminante ambiental (9).

El metabolismo de los metales tóxicos es muchas veces determinado por la acción de elementos esenciales que imitan. El cadmio parece imitar el zinc y,

en parte, el calcio. La absorción del cadmio depende considerablemente de la vía de administración: sólo el 5% de una dosis oral es absorbida por el aparato gastrointestinal, mientras que casi el 90% de una dosis inhalada es absorbida por el pulmón.

Hay una vía común de absorción del cadmio y del hierro a través del DMT-1 que muestra una considerable acumulación de cadmio en caso de deficiencia de hierro. Una vez asumido, el cadmio es retirado rápidamente de la sangre y concentrado en distintos tejidos, especialmente en el hígado y en el riñón debido a su considerable producción de metalotioneína (MT).

El zinc, conocido factor de protección contra la acción tóxica y, en algunos casos, cancerígena del cadmio, parece actuar estimulando la producción de MT. La larga persistencia del cadmio en el organismo parece una consecuencia de su unión a la MT. La persistencia aumenta la probabilidad de desarrollo de neoplasias, pero este aspecto aún no ha sido claramente demostrado.

En efecto, el hecho que el cadmio pueda ser cancerígeno en los animales, con una sola dosis, hace creíble la idea de que su persistencia en un órgano diana contribuya a la manifestación de tumores (70).

### **1.10. EL CITOESQUELETO**

El citoesqueleto consiste en un retículo de filamentos proteicos que se extienden por todo el citoplasma de la célula eucariota. Proporciona una osamenta estructural a la célula y constituye el andamio que determina la forma de la célula y la organización general del citoplasma. Además de tener este papel estructural, el citoesqueleto es responsable de los movimientos celulares tanto in vitro como in vivo. Estos comprenden no solo los movimientos de las células completas, sino también el transporte interno de orgánulos y de otras estructuras a través del citoplasma (29 – 59 – 43 – 44 -106).

El citoesqueleto es una estructura dinámica que puede incluso influir en el metabolismo celular creando un ambiente tridimensional donde ocurren los procesos moleculares vitales para las células. Se compone de tres tipos principales de filamentos proteicos:

- Los microfilamentos (principalmente Actina).
- Los filamentos intermedios
- Los microtúbulos.

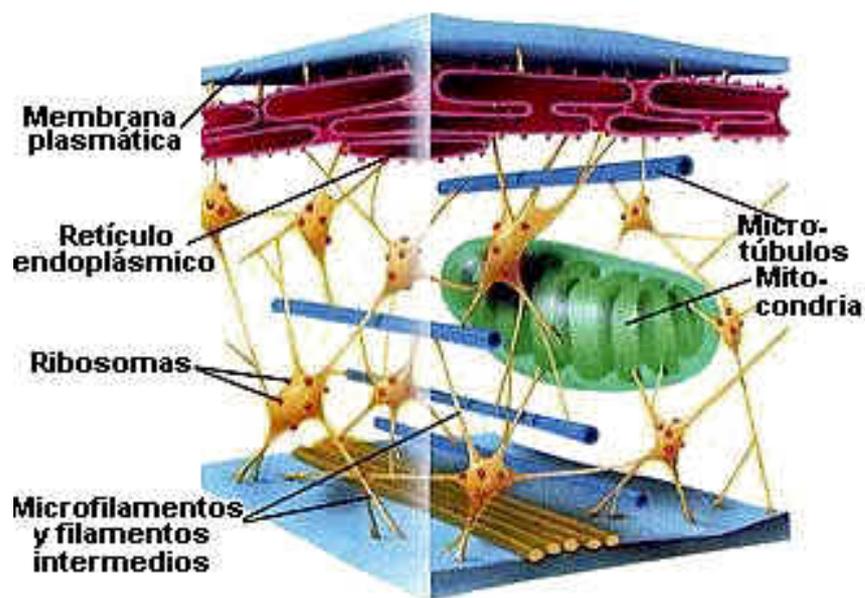


Figura 3. Estructura del citoesqueleto

En este trabajo nosotros, consideramos proteínas típicas como la  $\alpha$ -actina (microfilamentos), la  $\alpha$ -tubulina (microtúbulos), la vimentina (filamentos intermedios), proteínas estructurales como la  $\alpha$ -actinina y de adhesión como la fibronectina.

### I.10.1. Actina

La actina es la principal proteína del citoesqueleto en la mayor parte de las células. Ésta proteína, polimeriza para formar filamentos de actina,

delgadas fibras flexibles con diámetro de cerca de 7nm y de longitud hasta varios micrómetros.

En el interior de las células los filamentos de actina están organizados en estructuras de orden superior que forman haces o retículo superiores. El ensamblaje y el desensamblaje de los filamentos de actina, los ligamentos cruzados que forman los haces y retículos y su asociación con otras estructuras, como la membrana plasmática, están regulados por un notable número de proteínas que se unen a la actina y que son componentes fundamentales de los microfilamentos.

Los filamentos de actina desarrollan un papel crítico localizándose bajo la membrana plasmática donde forman un retículo que proporciona un soporte estructural, determina la fuerza de las células y hacen posible el movimiento de la superficie celular.

La actina es una proteína globular con peso molecular de 42,8 kD. Está presente en todas las células musculares estriadas esqueléticas y es estructuralmente diferente de aquella presente en otros tipos celulares.

Las diferencias estructurales entre las diversas isoformas de actina son mínimas y atribuibles a la sustitución de cualquier residuo aminoacídico en la estructura primaria.

Indicamos con  $\alpha$  las isoformas musculares - o sarcoméricas - características de las células musculares estriadas esqueléticas, estriadas cardíacas y lisas, con  $\beta$  y  $\gamma$  aquellas denominadas citoplasmáticas de las células no musculares.

Cada monómero de la actina - actina G globular - tiene fuertes lugares de unión que proporcionan interacciones cabeza - cola con otros dos monómeros de actina, así que los monómeros de actina polimerizan formando filamentos/actina F-filamentosa.

### I.10.2 $\alpha$ -Tubulina

Los microtúbulos son tubos rígidos con un diámetro de cerca de 25nm. Como los filamentos de actina son estructuras dinámicas que sufren un continuo ensamblaje y desensamblaje en el interior de la célula. Tienen la función de determinar la forma de la célula, de producir varios movimientos celulares, incluidos algunas formas de locomoción celular, el transporte intracelular de orgánulos y la separación de cromosomas durante la mitosis.

A diferencia de los filamentos intermedios, que están compuestos de varias proteínas, los microtúbulos poseen un único tipo de proteína globular, la tubulina. Se trata de un dímero, de peso molecular de 110 kD, formado por dos subunidades de secuencias aminoacídicas similares pero no idénticas, llamadas  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina, cada una de 55 kD. Las  $\alpha$ -tubulinas están representadas por seis isoformas y una secuencia primaria de 451 aminoácidos. Las isoformas tubulínicas, de forma diferente a la isoforma actínica, no se corresponden con otros genes estructurales, es decir no existe un gen para cada isoforma, sino que son el fruto de modificaciones post-traduccionales como la acetilación, la tirosinización-destirosinización y, específicamente para la  $\alpha$ -tubulina, la fosforilación.

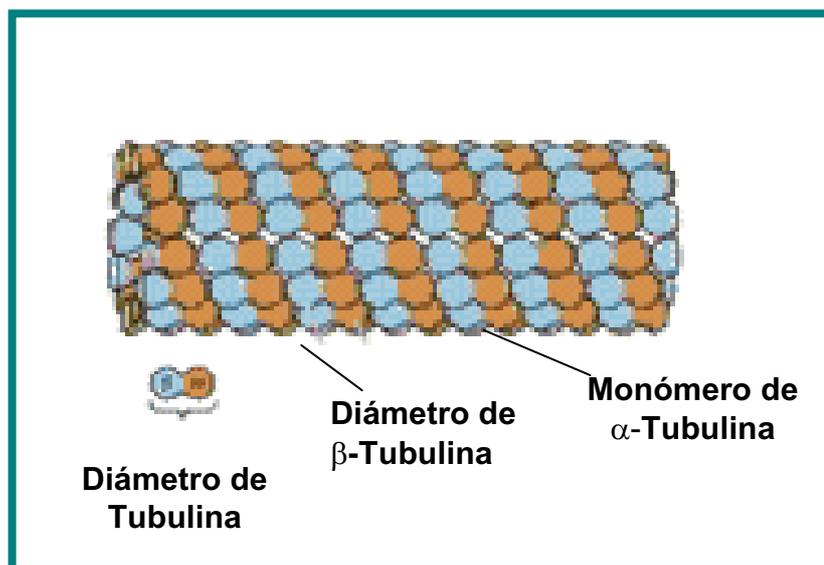


Figura 4. Microtúbulo

### **I.10.3. Filamentos intermedios**

Los filamentos intermedios tienen un diámetro de cerca de 10 nm que es intermedio entre los de los otros dos tipos principales del citoesqueleto, los microfilamentos y los microtúbulos. A diferencia de éstos, los filamentos intermedios no están implicados directamente en los movimientos celulares, si no que parecen tener fundamentalmente un papel estructural proporcionando fuerza mecánica a células y tejidos.

Están compuestos de una variedad de proteínas que se expresan en diversos tipos de células. Más de cincuenta tipos de proteínas de los filamentos intermedios han sido aisladas y clasificadas en seis grupos basados sobre la similitud entre la secuencia aminoacídica.

### **I.10.4. Vimentina**

Forma parte del tercer grupo y junto a la desmina y a otras proteínas se encuentra en una variedad de tipos diferentes de células incluidos los fibroblastos, los leucocitos y las células musculares lisas.

Los filamentos de vimentina se adhieren a la envoltura nuclear, sirviendo aparentemente para posicionar y anclar el núcleo en la célula. Además, se pueden asociar con la membrana plasmática y formar una unión directa desde el núcleo hasta la membrana plasmática. Este retículo de filamentos intermedios está probablemente sostenido por asociaciones con microtúbulos, ya que, sustancias que inducen el desensamblaje de los microtúbulos, provocan su colapso.

### **I.10.5. $\alpha$ -Actinina**

La  $\alpha$ -actinina forma parte de la “*actin-binding proteins*” o proteínas que ligan actina y colaboran en la consecución de la “tridimensionalidad” que es la base de los individuales procesos celulares actino-mediados.

Ha sido originariamente aislada del músculo esquelético, donde es uno de los mayores componentes del disco Z. Posteriormente, se han identificado distintas isoformas en el músculo liso y en células no musculares.

#### **I.10.6. Fibronectina**

Es una glicoproteína multifuncional que aparece como proteína plasmática circulante, proteína que se puede unir a la superficie de muchas células y por último, en fibrillas insolubles que forman parte de la matriz extracelular, cuando los dímeros de fibronectina se interconectan por medio de puentes de disulfuro.

La fibronectina es reconocida por receptores específicos de la membrana plasmática, permitiendo la adhesión de la célula a la matriz extracelular. El receptor de la fibronectina pertenece a las clases de receptores celulares de superficie llamados en conjunto *integrinas*. Estando los receptores para la fibronectina ligados a la actina intracelular, la orientación del citoesqueleto, puede condicionar la de la matriz extracelular.

## *II. OBJETIVOS*



El cadmio representa uno de metales pesados de más elevada peligrosidad y su presencia como contaminante ambiental, hace enormemente importante la determinación de su presencia en el cuerpo humano así como el estudio de los posibles mecanismos por los que puede intervenir en el origen de algunas patologías humanas, de las que, a pesar de las numerosas observaciones descritas en la literatura, no se conoce todavía el mecanismo fisiopatológico por el que se desarrollan.

Los **OBJETIVOS** concretos que nos planteamos en este trabajo de investigación son:

1. Determinar los efectos del acetato de cadmio sobre la estructura del citoesqueleto celular. Serán analizadas las proteínas citoesqueléticas actina, tubulina y vimentina en modelos experimentales basados en cultivos celulares de fibroblastos normales (línea FG) y neoplásicos (línea SGS/3A).
2. Determinar los niveles de cadmio en sangre y los aspectos epidemiológicos relacionados con la contaminación ambiental por cadmio en una población-estudio seleccionada de la zona Norte de Cerdeña (Italia) (población sarda).
3. Estudiar los efectos sobre la presión arterial de la inoculación de cadmio por vía intracerebroventricular utilizando un modelo experimental in vivo (ratas ) con niveles normales y bajos de calicreina (cepas NKR y LKR)



### *III. MATERIAL Y MÉTODOS*



### **III. 1. ESTUDIO SOBRE EL CITOESQUELETO DE CÉLULAS EN CULTIVO, NORMALES (FG) Y NEOPLÁSICAS (SGS/3A)**

#### **III.1.1. Líneas celulares**

Han sido utilizadas dos líneas celulares de fibroblastos una normal y otra neoplásica.

Los fibroblastos normales han sido obtenidos por medio de explante directo de fragmentos de embriones de rata de la estirpe Galliera al llegar al 8º/10º día de gestación, y utilizados al 12º pase en condiciones de confluencia.

Los fibroblastos tumorales, SGS/3A (Sarcoma Galliera Strain) son células altamente infectivas derivadas de la línea de fibroblastos SGS/2 obtenidas directamente después del explante del Sarcoma Galliera, un tumor sólido que surge espontáneamente en una raza seleccionada de ratas (*Rattus Norvegicus*, variedad Albus, estirpe Galliera), que se presenta como una masa redondeada localizada en proximidad de la cadera.

Como se ha descrito por Mc Pherson y Montigner, las células SGS/2 al 20º pase en cultivo han sido seleccionadas mediante tres sucesivos pases en agar semisólido para eliminar los fibroblastos normales presentes en la población. Los fibroblastos SGS/3 han sido utilizados al 10º pase en condiciones de confluencia.

Los cultivos celulares se realizaron en frascos de cultivo (Falcon) de 25 u 80 cm<sup>2</sup> de superficie útil que se mantuvieron en estufa a 37°C, atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Todas las manipulaciones de las líneas celulares se realizaron en esterilidad trabajando en campana de flujo laminar y utilizando material y soluciones estériles.

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio modificado Dulbecco's Eagle (sigma). El medio de cultivo fue cambiado de acuerdo con su

acidificación (color amarillo). Las células fueron duplicadas antes de que los cultivos alcanzaran la saturación. Para ello se despegaron mediante tripsina (Tripsina IX Sigma al 0,25%) y se incubaron durante 10 min. a 37°C. Tras golpear suavemente y varias veces el falcon, las células se despegaron debido a que el EDTA secuestra el  $\text{Ca}^{++}$  que es necesario para la adhesión celular.

*Medio de cultivo Dulbecco's Eagle* (Gibco, USA): 13.37 g de medio base con el 10% de suero fetal bovino (Sigma, S.L) (inactivado en calor húmedo a 56°C durante 30 min.). El medio fue tamponado con 27 ml de  $\text{NaHCO}_3$  al 7.5% (Flow Laboratories) y suplementado con 50  $\mu\text{g}$  /ml gentamicina (Sigma), se completó con agua bidestilada hasta 1000 ml.

Una vez preparados, el medio de cultivo fue filtrado en falcones estériles, bajo cabina de flujo laminar (Micro-V, Telstar, España) con filtros estériles de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Francia) en el momento de ser añadido a los frascos de cultivo.

### **III.1.2. Congelación de las líneas celulares**

Las células, despegadas de la superficie de los frascos de cultivo como se ha descrito anteriormente, fueron centrifugadas en frascos de 25 ml estériles a 1500 rpm durante 5 min y fueron lavadas 2 veces con PBS (Sigma). Tras retirar el sobrenadante, se resuspendieron en medio de congelación a razón de  $0.5 \times 10^6$  células por ml. A continuación fueron dispensadas en criotubos e introducidas inmediatamente en congelador a -80°C donde permanecieron 24 h, siendo almacenadas después definitivamente en nitrógeno líquido.

*Medio de congelación:* suero fetal bovino (Sigma, SL), inactivado en calor húmedo a 56°C durante 30 min, y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%.

### **III.1.3. Descongelación de las líneas celulares**

Las líneas celulares (en criotubos y almacenadas en nitrógeno líquido), fueron descongeladas en calor húmedo a 37°C. Posteriormente, en una cabina de flujo laminar, las células fueron lavadas 2 veces con PBS estéril para eliminar los restos de DMSO, resuspendidas en medio de cultivo previamente filtrado y depositadas en frascos de cultivo.

### **III.1.4. Ensayo con cadmio**

Las líneas celulares, una vez en confluentes, fueron despegadas del frasco de cultivo como se ha descrito anteriormente. A continuación, fueron sembradas en pocillos de 0.7. En condiciones de semiconfluencia, se les añadió 5µM de Cadmio Acetato (Sigma) con el que se incubaron durante 2h, 8h y 24h.

Como control, se utilizaron las células normales y neoplásicas sembradas en pocillos de 0.7 y cultivadas durante los mismos tiempos sin añadirles Cadmio Acetato.

### **III.1.5 Determinación de los marcadores celulares mediante inmunofluorescencia indirecta**

Poseemos experiencia de laboratorio sobre la determinación del cadmio a nivel celular (89 - 90). Para analizar el efecto del Cadmio Acetato sobre la morfología y el citoesqueleto de los fibroblastos, se realizó un estudio mediante inmunofluorescencia indirecta.

Las líneas parentales de fibroblastos normales y neoplásicas así como los cultivos de fibroblastos normales y neoplásicos tratados con Cadmio Acetato durante distintos tiempos (2, 8 y 24h), fueron despegados de los frascos de cultivo con una solución de tripsina (Tripsina IX Sigma al 0,25%), lavados con PBS, centrifugados a 1500 rpm durante 5 min en centrífuga refrigerada a 4°C y resuspendidos en 1 ml de PBS. Las células se contaron en cámara de Newbauer y se ajustaron a una concentración de  $6 \times 10^5$

células para cada fluorescencia. Una vez ajustada la cantidad de células, se centrifugaron. Se decantó el sobrenadante añadiendo al botón celular metanol frío (-20°C) durante un minuto, para fijar las células.

A continuación, las células fueron lavadas con PBS durante 5 minutos, 3 veces y luego permeabilizados con Tritón X-100 (0,1) durante un 1 minuto.

***Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:***

1. Actina.
2. Tubulina.
3. Vimentina.

La tubulina y la vimentina fueron incubadas durante 1h en oscuridad, a 37°C, en cámara húmeda con anticuerpos mononucleares de ratón diluidos con PBS libre de Calcio y Magnesio.

El exceso de anticuerpo fue eliminado por inversión de la placa seguida de 3 lavados consecutivos con PBS durante 5 min. Las células fueron incubadas durante 1h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo conjugado Antimouse TRITC y FITC.

Los controles de fluorescencia fueron obtenidos omitiendo el primer anticuerpo.

Para el estudio de la Actina, se utilizó faloidina TRITC conjugada que se liga de manera específica con la F-Actina.

Los núcleos fueron coloreados con una solución de Hoechst 33258 (1mg/10ml) por 8 min. a temperatura ambiente (DAPI).

Los portaobjetos fueron lavados con tres pases de 5 min. en PBS y cubiertos mediante glicerina tamponada con PBS (90% +10%) y depositados en el frigorífico a 4°C durante toda la noche.

A continuación se procedió a su análisis mediante microscopio de fluorescencia (Nikon Microphot FX) equipado con material fotográfico, utilizando película Fijichrome HP2600.

## **III.2. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE LA POBLACIÓN SARDA: ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DEL CADMIO EN LA SANGRE TOTAL**

### **III.2.1. Estudio de población**

Este trabajo se ha desarrollado en el periodo de tiempo comprendido entre septiembre del 2004 y Abril del 2005.

Voluntarios masculinos y femeninos residentes en el Norte de Cerdeña (Italia) con una población de cerca de 450.000 habitantes han contestado a un doble cuestionario después de haber firmado el consentimiento informado.

En el primer cuestionario han sido revelados los siguientes datos:

1. Datos personales: Edad, sexo, peso, altura
2. Posibles factores de riesgo: Actividad laboral, hábitos de vida, tabaco, alcohol, actividades de ocio, zona de residencia, distancia del polígono industrial, anamnesis familiar, y eventuales ocasiones de contacto con el Cadmio.

En el segundo cuestionario, se ha prestado particular atención a la adquisición de información relativa a la dieta. Así pues, a través del cuestionario (EPIC), con múltiples preguntas (250 preguntas) ya ampliamente utilizadas en otros estudios, se obtuvieron importantes datos relacionados con el consumo medio de 164 nutrientes durante el transcurso del precedente año.

En nuestro estudio, los criterios de exclusión que fueron utilizados son:

1. Menores de edad, por debajo de 18 años
2. Exposición relacionada al Cadmio en el trabajo o en los lugares de ocio.
3. Todos los voluntarios con patologías neoplásicas o enfermedades que puedan interferir con el estudio de concentraciones del Cadmio.

Actualmente, han sido analizados los valores y los datos de 251 voluntarios presentes en algunos centros hospitalarios del Norte de Cerdeña (Sassari, Thiesi, Alghero, Olbia, La Madalena).

Según la edad, los sujetos fueron divididos en 3 grupos:

**Primer grupo:** De 18 a 35 años con 69 sujetos.

**Segundo grupo:** De 36 a 60 años con 99 sujetos.

**Tercer grupo:** Más de 60 años con 85 sujetos.

De todos los voluntarios, **64** fueron fumadores, **40** fueron ex-fumadores- y **147** fueron no fumadores.

Por último, todos los sujetos eran caucásicos.

### **III.2.2. Toma y análisis de muestras de sangre**

Las muestras fueron extraídas de todos los sujetos usando un cilindro BD vacutainer que contiene EDTA con una aguja de acero inoxidable. Parte de la muestra (sangre entera) fue conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. La otra parte fue centrifugada y el plasma fue conservado también a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Las muestras fueron conservadas en crioviales (Nunc de 1.8ml) de polipropileno con tapón a rosca de polipropileno lavado en solución de ácido nítrico.

La determinación del cadmio fue efectuada mediante espectrofotómetro a absorción atómica con hornillo de grafito y corrección del fondo por efecto Zeeman longitudinal (Perkin Elmer 5100 ZL) equipado de automuestreo.

El procedimiento analítico empleado ha seguido el protocolo de análisis instrumental SPTF (Stabilized Platform Temperature Furnace) y prevé la determinación directa del Cadmio mediante el uso del modificador de matriz.

Las muestras de sangre fueron diluidas 1:10 con solución acuosa de Triton X-100 (0.2%) y analizadas directamente sin posterior tratamiento.

El método ha previsto la doble exposición de la muestra (2x10 µl) y el modificador de matriz (2x5µl NH<sub>4</sub> H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+MgNO<sub>3</sub>) separados por un ciclo térmico de desecación.

La concentración del Cadmio viene determinada por interpolación sobre la curva de calibración realizada con soluciones acuosas de Cadmio a concentraciones de 0.0 - 0.02 - 0.04 y 0.08 ng/ml.

La posibilidad de repetición ha sido valorada sobre dos muestras de sangre cuyas concentraciones medias eran 0.5 y 2.9 µl/l. Sobre cada muestra han sido efectuadas seis determinaciones. Los coeficientes de variación eran respectivamente de 12.9% y 2%.

Todos los materiales usados para la toma, conservación y análisis de las muestras de sangre fueron sometidos al test de liberación, realizado poniendo los materiales en soluciones de ácido nítrico, para eliminar cualquier posible contaminación con el cadmio.

Durante todo el trabajo, el minucioso estudio fue controlado a través de muestras estándar de referencia (International Bureau of Reference, Bruselas, Bélgica: samples N 194 y 195) con concentración comprobada de 0.5 (S.D. 0.1) µl/l y 5.37 (S.D. 0.24) µg / l).

### **III.2.3. Análisis estadístico**

En la descripción del análisis estadístico han sido tomados en consideración bien el estudio paramétrico o bien aquel no-paramétrico.

### III.2.3.1. Estudio paramétrico

El estudio paramétrico (media) fue realizado para poder comparar nuestros valores con aquellos de otros estudios del mismo tipo. Para ello, fueron utilizados el software Excel de Windows y el programa estadístico Stata8.

### III.2.3.2. Estudio no paramétrico

En este estudio se analizó la mediana y el percentil, y fue utilizado para cuando los valores observados no eran de tipo cuantitativo. Para ello, el software Excel de Windows y el programa estadístico Stata8 fueron empleados.

## **III.3 ESTUDIO DEL EFECTO DEL CADMIO INOCULADO POR VÍA INTRACEREBROVENTRICULAR SOBRE LA PRESIÓN SANGUÍNEA EN RATAS CON CALICREINA URINARIA NORMAL Y BAJA**

### **III.3.1 Outbred strains**

Los experimentos fueron realizados en una línea originaria de “outbred strain” de colonias de ratas Wistar.

De esta colonia fue derivada una tipo de ratas con baja excreción de calicreína exclusivamente a través de un cruce hermano-hermana (imbred strain).

En el momento de la realización del trabajo, esta raza mostraba una significativa diferencia en la excreción urinaria de calicreína, respecto a la raza normal de ratas Wistar de  $12,4 \pm 2,8$  nkat/24h versus  $32,8 \pm 2,9$  nkat/24h respectivamente.

La raza de ratas Wistar NKR fue utilizada como control.

Las ratas machos pesaban cerca de 300-358 gr y fueron mantenidas en locales a temperatura constante ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) con una humedad controlada ( $60 \pm 5\%$ ) y con un ciclo día-noche de 12h. Estas tenían libre acceso al agua y a los alimentos.

Cuatro días antes del experimento, fue extraída la orina de las 24h para determinar el volumen urinario (UV), la excreción de sodio (UNa) y de potasio (UK), la osmolaridad (UOsm) y la caliceína (UK). Durante este periodo las ratas tenían libre acceso al agua pero no al alimento.

Un día después las ratas han sido anestesiadas por vía intraperitoneal con cloruro de ketamina y con diazepam.

### **III.3.2 Cánula estereotáxica**

Ha sido instalada estereotáxicamente una cánula con una aguja de acero con un diámetro de 22 en el ventrículo cerebral izquierdo (1,5mm lateralmente y 1mm posteriormente respecto al bregma y 4,5mm en profundidad respecto a la superficie craneal).

Después de dos días en este estado (steady - state) las ratas fueron anestesiadas otra vez y un catéter de polietileno fue insertado en la aorta abdominal a través de la arteria femoral izquierda, el catéter fue insertado bajo la piel y por tanto en superficie posterior al cuello.

Los experimentos se continuaron a la mañana siguiente.

Se utilizó para la inyección a nivel intracerebroventricular una jeringuilla de 25 microlitros.

La presión sanguínea media (MBP) fue continuamente detectada a través del catéter femoral por medio de un transductor Statham que estaba conectado a un bolígrafo (BM61472 y BM618).

La presión sanguínea fue estable durante 20min aproximadamente.

### III.3.3. Ratas LKR y NKR

El grupo de ratas LKR (grupo 1, n = 9) recibió vía i.c.v. una inyección de acetato de cadmio (10 microgramos en 10 microlitros de solución salina).

Un segundo grupo de ratas LKR (grupo 2, n=8) se utilizó como control y recibió 10 microlitros de solución salina en lugar de cadmio acetato.

Posteriormente dos grupos de ratas NKR fueron usadas como control: un grupo (grupo 3, n = 6) recibió acetato de cadmio y un segundo grupo (grupo 4, n=6) recibió solución salina como el LKR.

La presión media sanguínea (MBP) fue detectada en todos los grupos durante los siguientes 120 min.

Durante las sucesivas 24h las ratas fueron mantenidas en las mismas condiciones basales y se les extrajo la orina de las 24h para determinar su volumen, la osmolaridad y los electrolitos.

Al final del experimento fue determinada la correcta localización de la cánula en el ventrículo estudiando la respuesta a la angiotensina II a nivel i.c.v., en todas las ratas se ha obtenido una respuesta positiva a la angiotensina II.

Todos los procesos fueron realizados siguiendo el “**International standards for care and use of animals**” de acuerdo con el “**Institute of laboratory animal resource**” (National Academy of Science, Bethesda, USA).

## *IV. RESULTADOS*



---

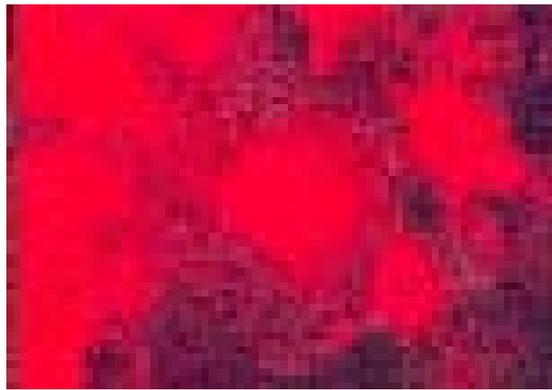
#### **IV.1. ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS CITOESQUELÉTICAS ACTINA, TUBULINA Y VIMENTINA EN FIBROBLASTOS NORMALES (LÍNEA FG) Y FIBROBLASTOS NEOPLÁSICOS (LÍNEA SGS/3A).**

##### **IV.1.1. Fibroblastos normales. Línea FG.**

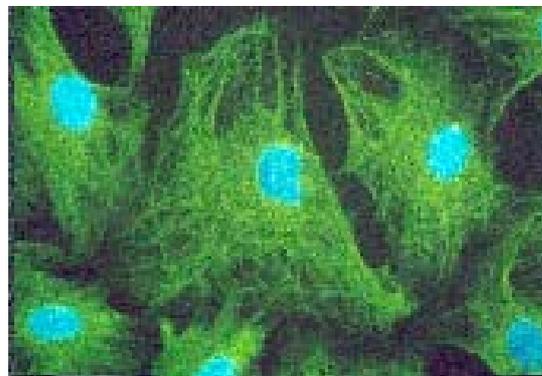
Los cultivos de la línea FG de fibroblastos normales se caracterizan morfológicamente por presentar un alto grado de homogeneidad, apareciendo como monocapa de células fuertemente unidas al substrato y presentando, como hecho típico, un aspecto filiforme con células alargadas y extremadamente finas. Los estudios mediante inmunofluorescencia demostraron que la actina se organiza formando haces y redes que atraviesan ampliamente el citoplasma y que terminan anclándose en la membrana plasmática (Figura 1.A).

El estudio de la distribución de la tubulina en la línea de fibroblastos normales FG, demostró que esta proteína se estructura formando una delgada red de filamentos que aparece especialmente densa en la zona central de la célula. Desde aquí, se distribuye hacia el resto del citoplasma, pasando lejos del eje mayor celular y presentando una menor expresión en las zonas más periféricas del mismo. Es por ello que aún localizándose en todo el citoplasma, aparece en ciertas células con una típica configuración de estrella (Figura 1.B).

Por otra parte, la proteína de filamentos intermedios vimentina, se estructura en los fibroblastos normales, como una densa trama de filamentos que se sitúan preferentemente rodeando al núcleo aunque también presenta extensiones en forma de trabéculas hacia la zona periférica de la célula (Figura 1.C)



1.A



1.B



1.C

**Figura 1.** Estudio mediante inmunofluorescencia de la expresión y distribución de actina (1.A), tubulina (1.B) y vimentina (1.C) en la línea fibroblástica FG.

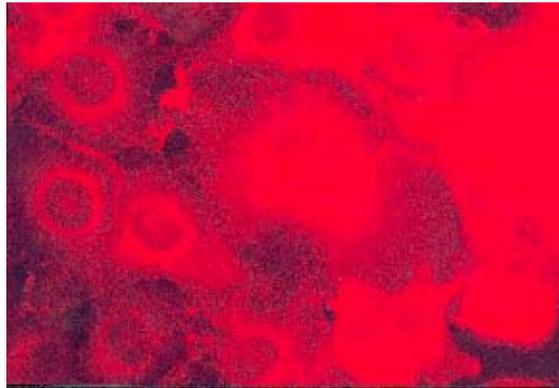
#### **IV.1.2. Fibroblastos neoplásicos. Línea SGS/3A.**

El estudio de la morfología de los fibroblastos neoplásicos de la línea SGS/3A en cultivo, mostró notables diferencias en relación a la línea FG de fibroblastos normales. A diferencia de estas últimas, las células neoplásicas presentaron un tamaño más pequeño y una forma más o menos redondeada, alejada del aspecto filiforme de los fibroblastos normales. Como otros tipos de células neoplásicas, se caracterizaron por poseer un gran núcleo siendo la relación núcleo/citoplasma más favorable al componente nuclear que en las células normales. Además, en algunas de ellas se pudo observar la típica presencia de un núcleo doble. Por otra parte, su crecimiento también fue diferente al de los fibroblastos normales, siendo desordenado y apareciendo sobre la monocapa típica del cultivo celular, nuevos estratos de células que aparecían al microscopio óptico como áreas de elevada densidad.

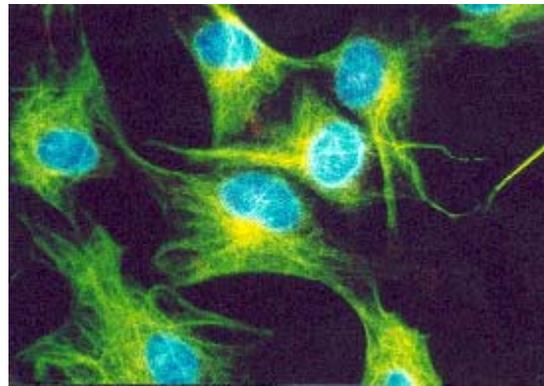
El estudio mediante inmunofluorescencia de los filamentos de actina demostró una arquitectura más desestructurada que la encontrada en los fibroblastos normales, con una distribución más irregular y un menor número y tamaño de los haces de fibra de estrés (Figura 2.A).

El estudio de la tubulina permitió determinar la disposición de esta proteína en las células SGS3A, observando como se distribuía como una delgada red de filamentos densamente entrelazados por el citoplasma de las redondeadas o achatada células neoplásica. Pero también se pudo observar como el marcaje se extendía hacia las prolongaciones en forma de pseudópodos que presentaban estas células y que no fueron observados en los fibroblastos normales (Foto 2.B).

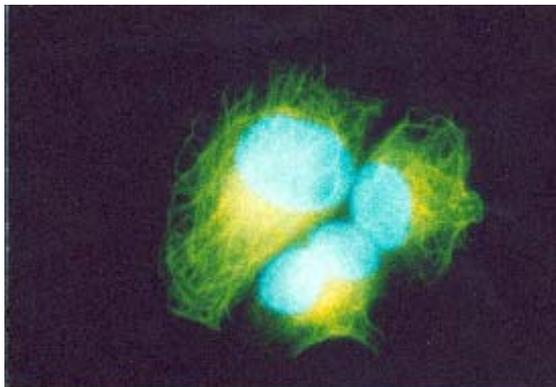
Por último, en las células SGS-3A, los filamentos intermedios aparecen como unas grandes y densas masas perinucleares de las que se alejan filamentos que van reduciendo progresivamente su densidad y que cubren una parte del citoplasma celular (Foto 2.C).



2.A



2.B



2.C

**Figura 2.** Estudio mediante inmunofluorescencia de la expresión y distribución de actina (2.A), tubulina (2.B) y vimentina (2.C) en la línea fibroblástica neoplásica SGS-3A .

---

## **IV.2. MODIFICACIONES INDUCIDAS POR CADMIO EN LAS PROTEÍNAS CITOESQUELÉTICAS ACTINA, TUBULINA Y VIMENTINA DE FIBROBLASTOS NORMALES (LÍNEA FG) Y FIBROBLASTOS NEOPLÁSICOS (LÍNEA SGS/3A).**

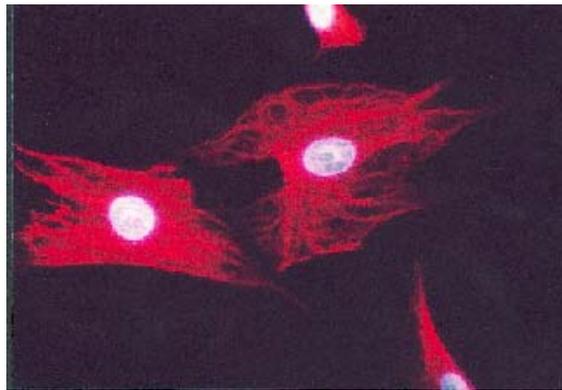
### **IV.2.1. Fibroblastos normales. Línea FG.**

#### IV.2.1.1. Actina

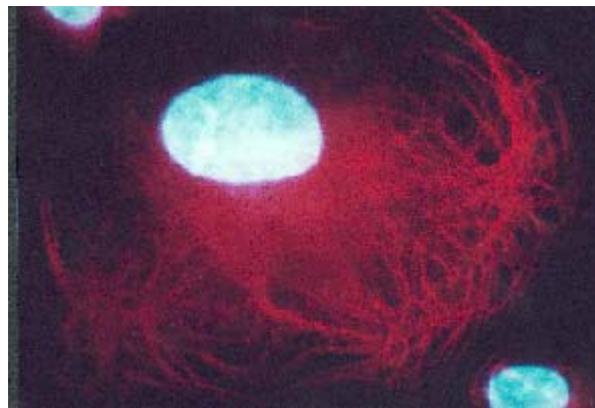
El tratamiento con acetato de cadmio de cultivos de fibroblastos normales causa evidentes modificaciones en la morfología celular. Dichas modificaciones son observables tan sólo después de una hora de exposición al agente. Los fibroblastos, que eran alargados, adquieren un aspecto redondeado y sus contornos aparecen difuminados observándose en los marcajes, una intensidad de fluorescencia mucho más débil. El marcaje mediante anticuerpos que reconocen actina demuestra una importante alteración en la citoarquitectura de estos filamentos. Dichos filamentos aparecen ahora extremadamente gruesos y se agregan (smeared patches) en determinados puntos celulares, siendo lo más frecuente la aparición de condensaciones cerca del núcleo (Figura 3.A).

Después de 8h de exposición al acetato de cadmio, la desestructuración de los filamentos de actina en los fibroblastos se hace más notable, aumentando la condensación en la zona nuclear. La presencia de agregados de actina despolimerizada también se hace más evidente (Figura 3.B)

Exposiciones más prolongadas a este agente (24 h), originan un aumento de la disposición perinuclear de los gránulos de actina. Desaparecen del citoesqueleto las fibras de estrés y se hacen muy evidentes numerosos "smeared patches", probablemente causados por el desensamblaje de los filamentos de actina (Figura 3.C).



3.A



3.B



3.C

**Figura 3.** Estudio mediante inmunofluorescencia de la expresión y distribución de actina en la línea fibroblástica normal FG expuesta a acetato de cadmio durante 1h (3.A), 8h (3.B) y 24h (3.C)

#### IV.2.1.2. Tubulina

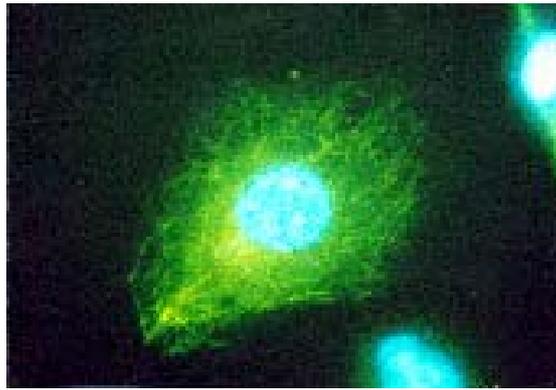
En los estudios realizados sobre células SGS-3A expuestas a acetato de cadmio durante cortos periodos de tiempo (1h), no pudimos observar alteraciones significativas de la trama celular microtubular. Los marcajes con inmunofluorescencia sólo desvelaron la presencia de estructuras microtubulares algo más densas que las normales (Figura 4.A). Sin embargo, después de 8h de exposición a dicho agente, si observamos un parcial desensamblaje de los microtúbulos en la región periférica de la célula que se asoció a una fluorescencia perinuclear intensa y compacta (Figura 4.B).

Estas alteraciones se hicieron mucho más evidentes después de 24h de exposición, desapareciendo la organización inicial de los microtúbulos de los fibroblastos. Éstos ahora se mostraban como una estructura enmarañada y estrecha alrededor del núcleo (Figura 4.C).

#### IV.2.1.3. Vimentina

La observación de las células SGS-3A después de una hora de tratamiento, demuestra una ligera perdida de la estructura tridimensional de los filamentos intermedios, sobre todo en la zona correspondiente a los márgenes celulares que sufren una parcial separación del substrato (Figura 5.A). Después de 8h de exposición, este fenómeno se hace más notable, perdiéndose en parte los grandes haces de filamentos intermedios, que sin embargo, permanecen distribuidos en manera más sutil en la región citoplasmática y con escasa concentración a nivel perinuclear (Figura 5.B).

Tras 24h de tratamiento, observamos un mayor “aclaramiento” de los filamentos intermedios que, no existiendo ya cerca núcleo, aparecen en algunos casos con sus extremos acodados en el citoplasma periférico (Figura 5.C).



4.A

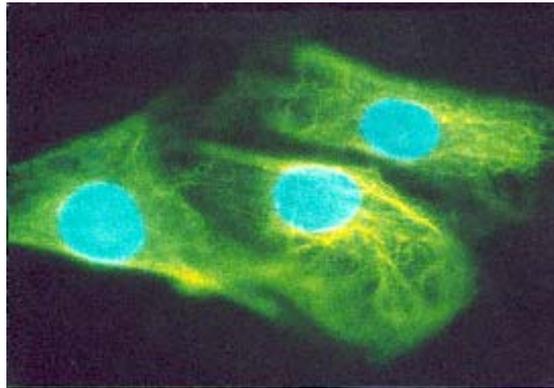


4.B

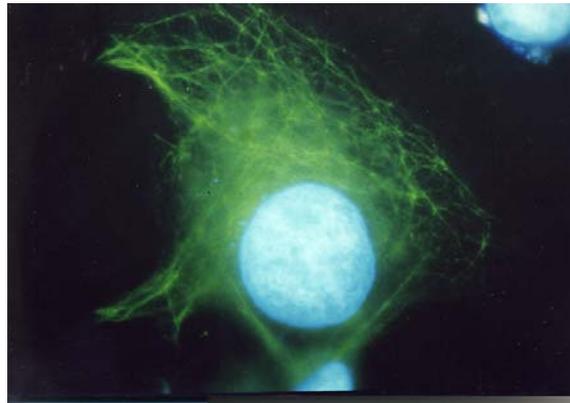


4.C

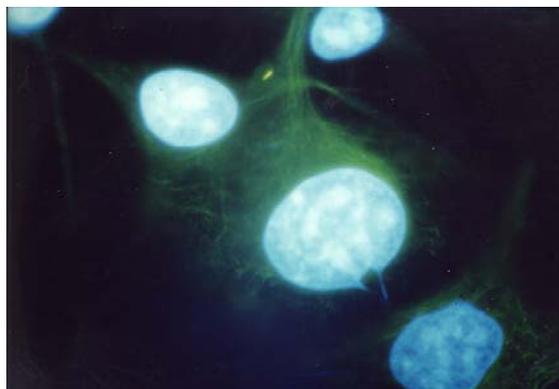
**Figura 4.** Estudio mediante inmunofluorescencia de la expresión y distribución de tubulina en la línea fibroblástica normal FG expuesta a acetato de cadmio durante 1h (4.A), 8h (4.B) y 24h (4.C)



5.A



5.B



5.C

**Figura 5.** Estudio mediante inmunofluorescencia de la expresión y distribución de vimentina en la línea fibroblástica normal FG expuesta a acetato de cadmio durante 1h (5.A), 8h (5.B) y 24h (5.C)

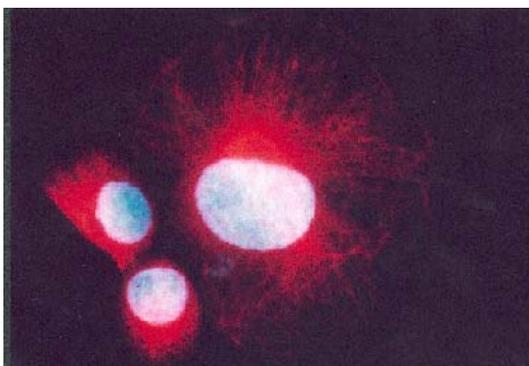
## IV.2.2. Fibroblastos neoplásicos. Línea SGS/3A.

### IV.2.2.1. Actina

Diferentes alteraciones morfológicas pudieron ser observadas en las células SGS/3A tras cortas exposiciones al acetato de cadmio. Así, los estudios realizados después de 1h de tratamiento con este agente, demuestran un cambio en la morfología de la célula tumoral que se hace globosa y con contornos no bien definidos. La actina comienza a perder su típica organización en haces, siendo este hecho especialmente evidenciable en las zonas perinucleares, mientras que el citoplasma periférico permanece sin modificaciones sustanciales (Figura 6.A).

Después de 8h de tratamiento se pueden apreciar con nitidez pequeños agregados de actina, mientras desaparecen casi totalmente las fibras de estrés (Figura 6.B).

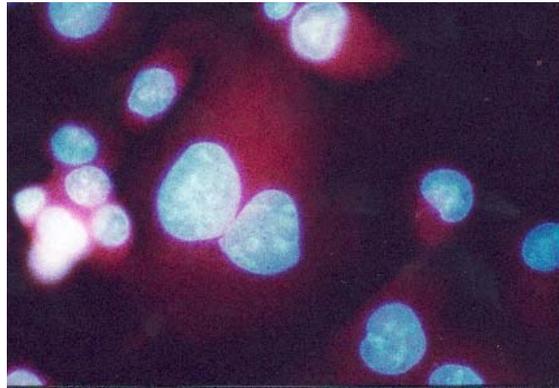
Mayores tiempos de exposición (24h), provocan una mayor condensación celular, la actina aparece completamente despolimerizada y el citoplasma está ocupado por una fluorescencia compacta e uniforme, mucho mayor que la apreciada en los fibroblastos normales; como si las células entrasen en una fase degenerativa (Figura 6.C)



6.A



6.B



6.C

**Figura 6.** Estudio mediante inmunofluorescencia de la expresión y distribución de actina en la línea fibroblástica neoplásica SGS-3A expuesta a acetato de cadmio durante 1h (6.A), 8h (6.B) y 24h (6.C)

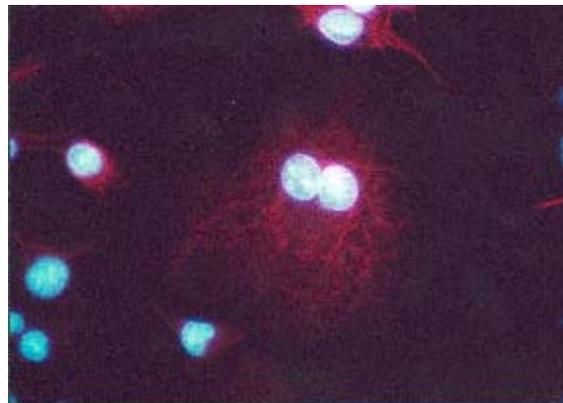
#### IV.2.2.2. Tubulina

Al igual que en los fibroblastos normales, el acetato de cadmio no altera significativamente los microtúbulos en las células SGS/3A después de 1h de tratamiento (Figura 7.A). Solo después de 8h de exposición, las modificaciones comienzan a ser visibles y se puede ver anomalías de la forma celular, predominando las células estrelladas. En ellas, la fluorescencia es más intensa en la región citoplasmática central en donde existe un parcial desensamblaje de la trama microtubular que, sin embargo, no aparece en la zona periférica (Figura 7.B).

Los fibroblastos SGS3A resultan sensiblemente dañados después de 24h de exposición. Esta lesión es notablemente mayor que la observada en los fibroblastos normales. La superficie celular se vuelve lisa y globosa, el citoesqueleto no muestra el típico aspecto filamentoso que observábamos en los fibroblastos normales y la fluorescencia aparece como una masa uniforme que rodea al núcleo indicando la casi completa despolarización de los microtúbulos. Se hace también evidente que la relación núcleo/citoplasma está alterada (Figura 7.C).



7.A



7.B



7.C

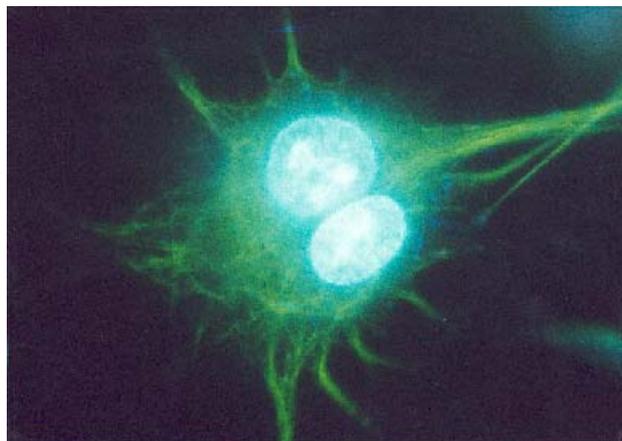
**Figura 7.** Estudio mediante inmunofluorescencia de la expresión y distribución de tubulina en la línea fibroblástica neoplásica SGS-3A expuesta a acetato de cadmio durante 1h (6.A), 8h (6.B) y 24h (6.C).

### IV.2.2.3. Vimentina

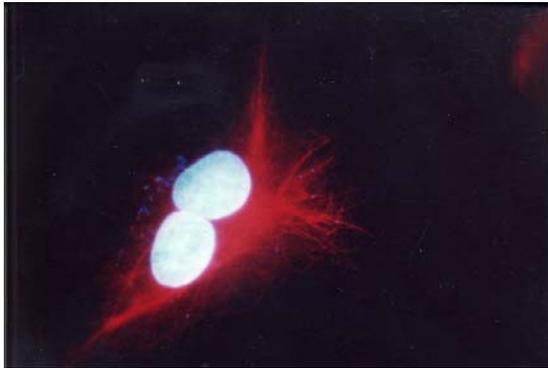
La organización de los filamentos de vimentina sólo se ven alterada moderadamente después de la exposición a acetato de cadmio durante un periodo de 1h. La principal modificación morfológica encontrada en estas células fue la aparición de una forma celular de tipo globoso (Figura 8.A).

Tras un periodo de exposición de 8h, la densa trama que formaba la vimentina en las células SGS-3A se ve significativamente reducida, apareciendo como una red menos organizada y existiendo relaciones menos estrechas entre los que filamentos. A pesar de ello, el marcaje de vimentina es fácilmente visible, especialmente en las prolongaciones celulares (Figura 8.B).

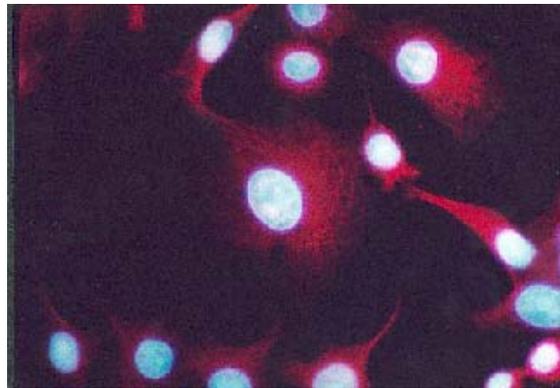
Después de 24h de exposición, todavía es identificable la estructura tridimensional de la trama de filamentos de vimentina. No obstante, observamos como dicha trama predomina en las zonas periféricas del citoplasma, reduciéndose en la zona perinuclear ("vimen"). Estos resultados indican que los filamentos de vimentina son resistentes a la desestructuración originada por la acción del cadmio, aunque sufren una deslocalización (Figura 8.C)



**8.A**



**8.B**



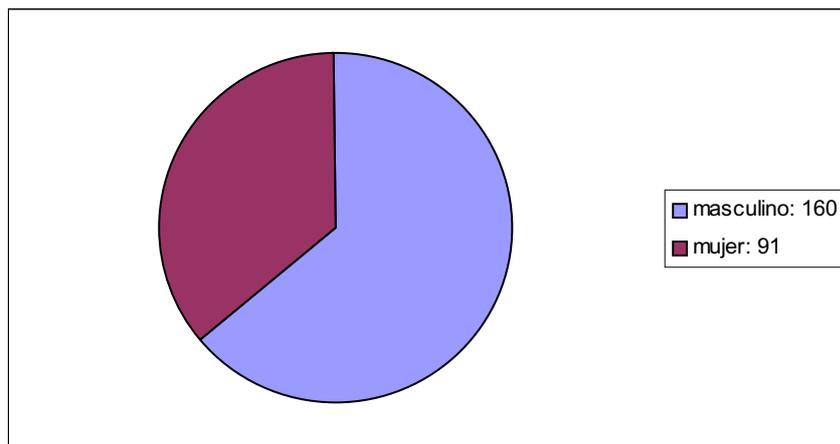
**8.C**

**Figura 8.** Estudio mediante inmunofluorescencia de la expresión y distribución de vimentina en la línea fibroblástica neoplásica SGS-3A expuesta a acetato de cadmio durante 1h (6.A), 8h (6.B) y 24h (6.C).

### IV.3. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE LA POBLACIÓN SARDA. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE CADMIO EN SANGRE

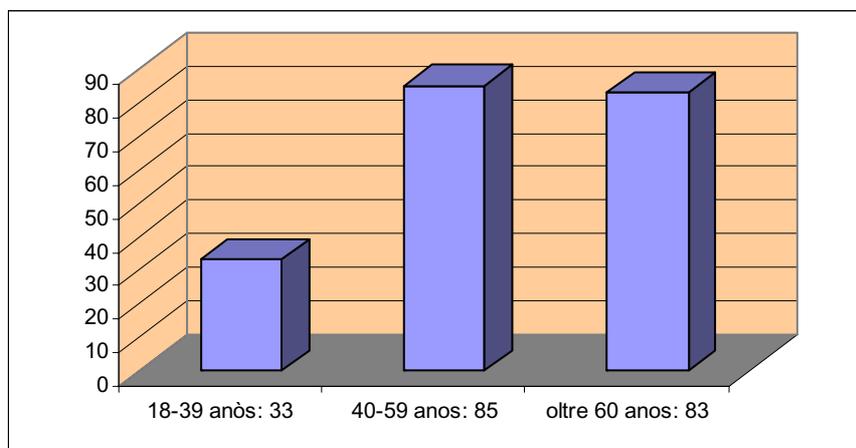
#### IV.3.1. Características de la población de estudio

El estudio fue realizado en 251 personas de la población sarda. La distribución por sexo queda reflejada en la Figura 9.



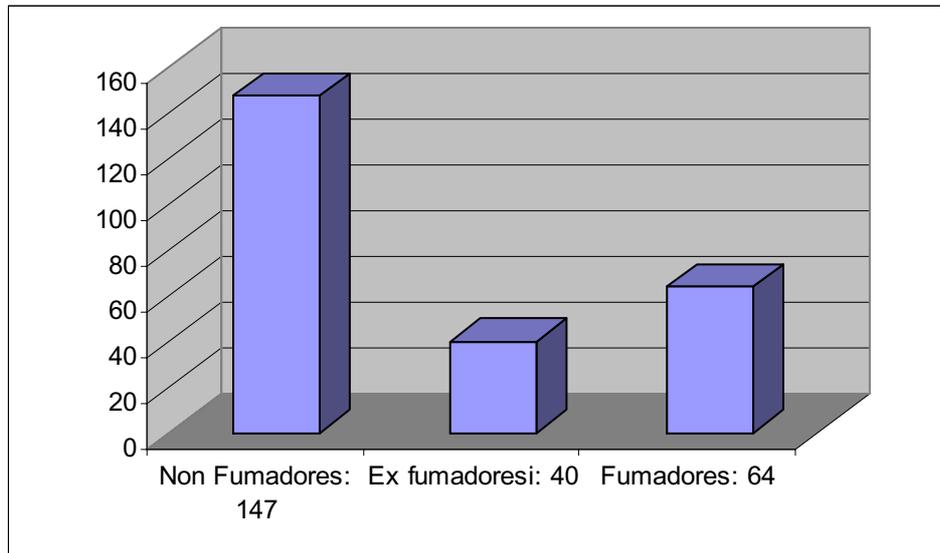
**Figura 9.** Distribución por sexo de los sujetos sometidos al estudio.

El rango de edad de la población analizada fue de 18-90 años. De todos los sujetos se obtuvo el consentimiento informado para el estudio. Los sujetos fueron divididos en tres grupos según la edad como refleja la Figura 10.



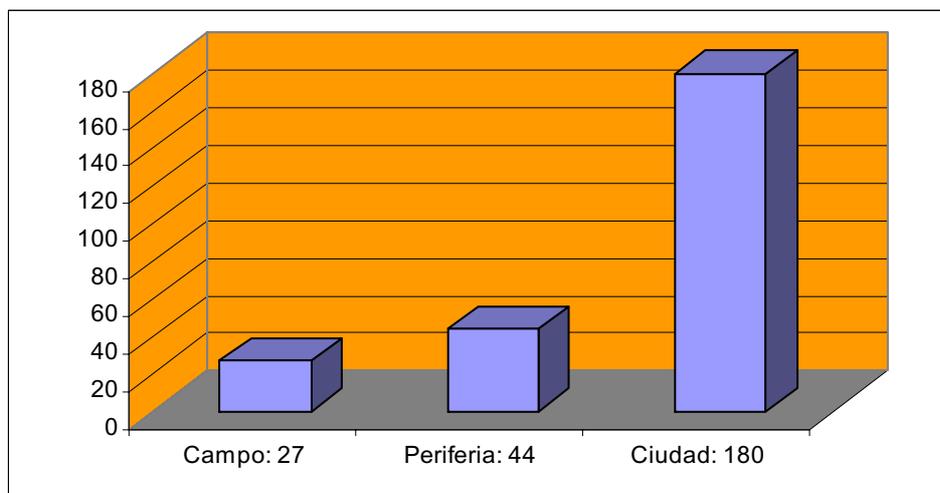
**Figura 10.** Distribución por edad de los sujetos sometidos al estudio.

En el estudio se tuvo en cuenta el consumo de tabaco por parte de los sujetos analizados, dividiéndose la población en no-fumadores (147), exfumadores (40) y fumadores (64) (Fig. 11).



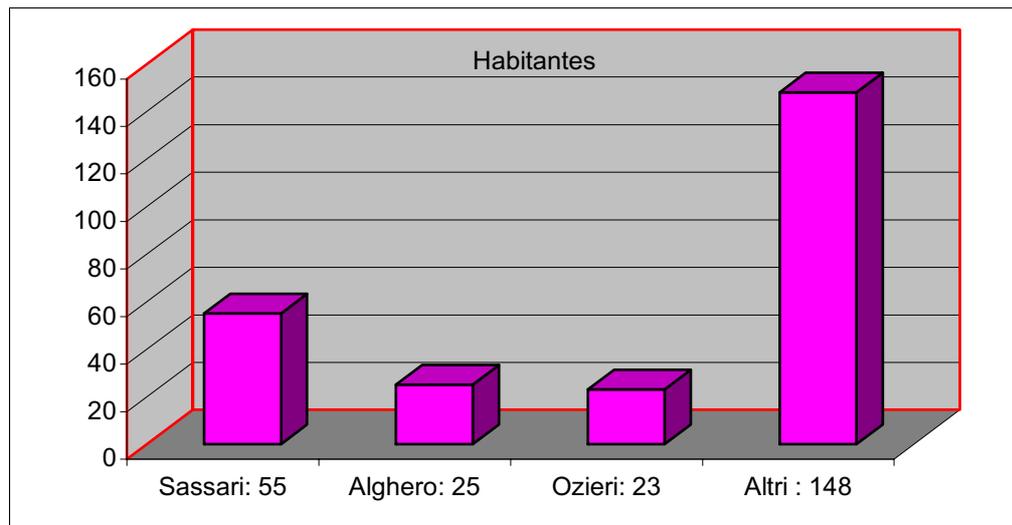
**Figura 11.** Distribución los sujetos sometidos al estudio según consumo de tabaco.

Según el la residencia e independientemente de la ciudad en la que habitaban, la población fue dividida en tres grupos: población de campo ( 27), de la periferia (44) y de ciudad o pueblo ( 180) (Fig. 12).



**Figura 12.** Distribución los sujetos sometidos al estudio según la residencia.

Por último, se realizó una distribución de los sujetos según procedieran de una ciudad con más de 100.000 habitantes (Sassari, 52 sujetos), de una ciudad con un número de habitantes entre 5.000 y 400.000 (Alghero, Porto Torres, Ozieri, Oschiri, Sennori, Sorso, Thiesi, 93 sujetos) o de ciudades o pueblos con menos de 5.000 habitantes (106 sujetos) (Fig. 13).



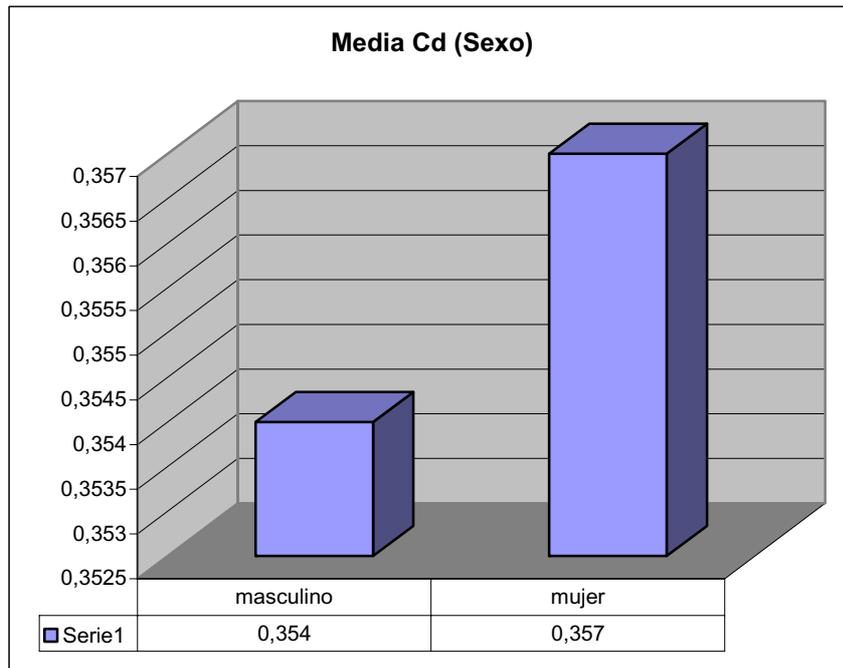
**Figura 13.** Distribución los sujetos sometidos al estudio según la población.

#### IV.3.2. Análisis de los niveles de cadmio en sangre

La media de los niveles de cadmio en sangre en la población analizada fue de  $0.355 \mu\text{gr/l}$ . Estos niveles son menores que los detectados en otros estudios sobre una población no expuesta profesionalmente (12 – 19 – 59 – 78).

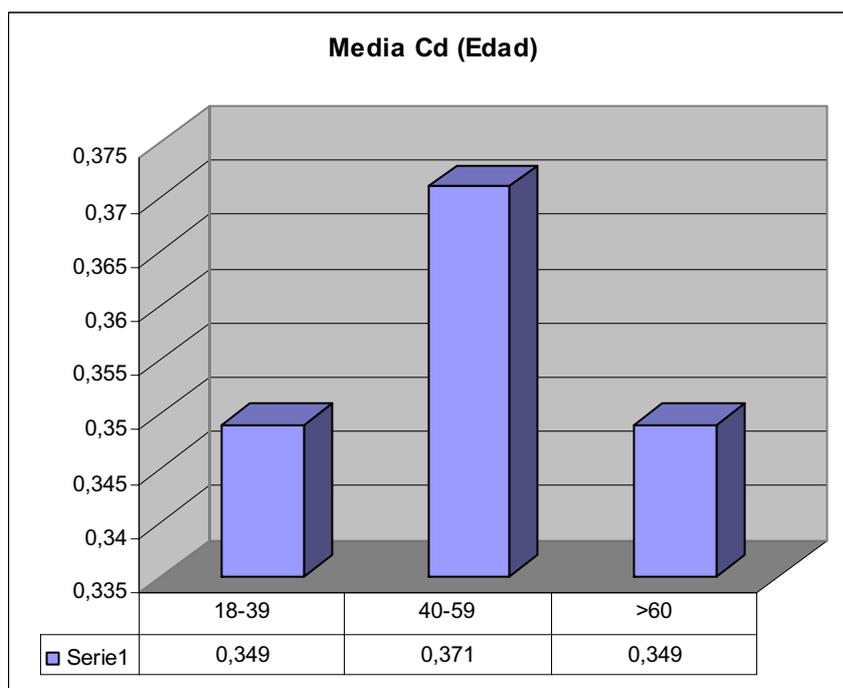
La mediana obtenida en relación a todas las muestras analizadas fue de  $0.31 \mu\text{g/l}$ , siendo este valor también menor que el encontrado en la mayor parte de los trabajos científicos.

El estudio de la media de los valores de cadmio, teniendo en cuenta el sexo de la población, demostró valores muy similares en los hombres ( $0.354 \mu\text{g/l}$ ) y en las mujeres ( $0.357 \mu\text{g/l}$ ) (Fig. 14).



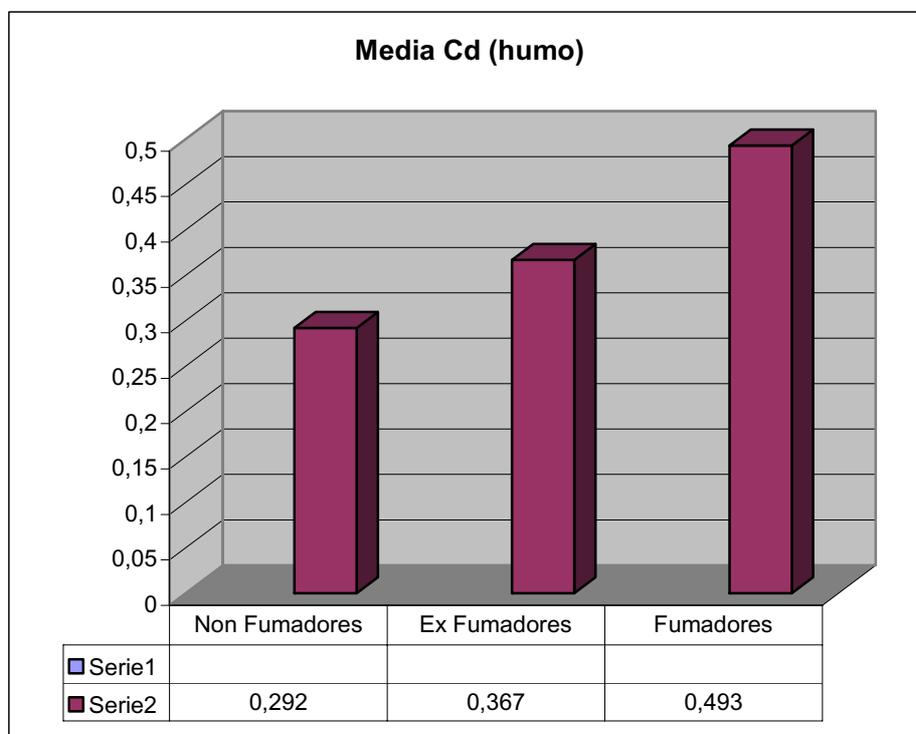
**Figura 14.** Valores medios de cadmio según sexo.

Los valores medios de cadmio también fueron similares en los diferentes grupos de edad: 18-39 años, 0.349  $\mu\text{g/l}$ , 40-59, 0.371  $\mu\text{g/l}$ , y más de 60 años, 0.359  $\mu\text{g/l}$  (Fig. 15).



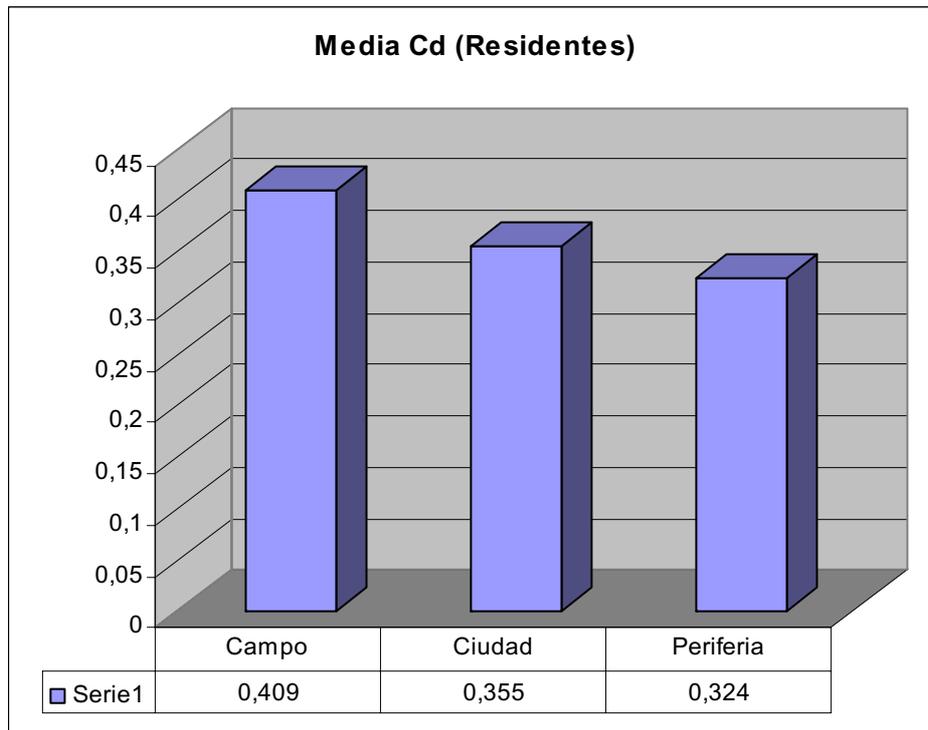
**Figura 15.** Valores medios de cadmio según edad.

Sin embargo, cuando el estudio fue realizado en la población distribuida según el hábito de consumo de tabaco, encontramos notables diferencias entre los valores medios de cadmio en sangre. Este hecho coincide con los datos obtenidos por otros autores y viene a confirmar que los valores de cadmio son mayores en los pacientes fumadores que en los no fumadores y también, aunque en menor grado, que en los pacientes exfumadores. Así, en sujetos fumadores la media fue de  $0.497\mu\text{g/l}$ , casi el doble del valor de la media encontrada tanto en sujetos no-fumadores ( $0.292\mu\text{g/l}$ ), mientras que el valor en los pacientes exfumadores fue de  $0.368\mu\text{g/l}$  (Fig. 16).



**Figura 16.** Valores medios de cadmio en pacientes distribuidos según el hábito de fumar.

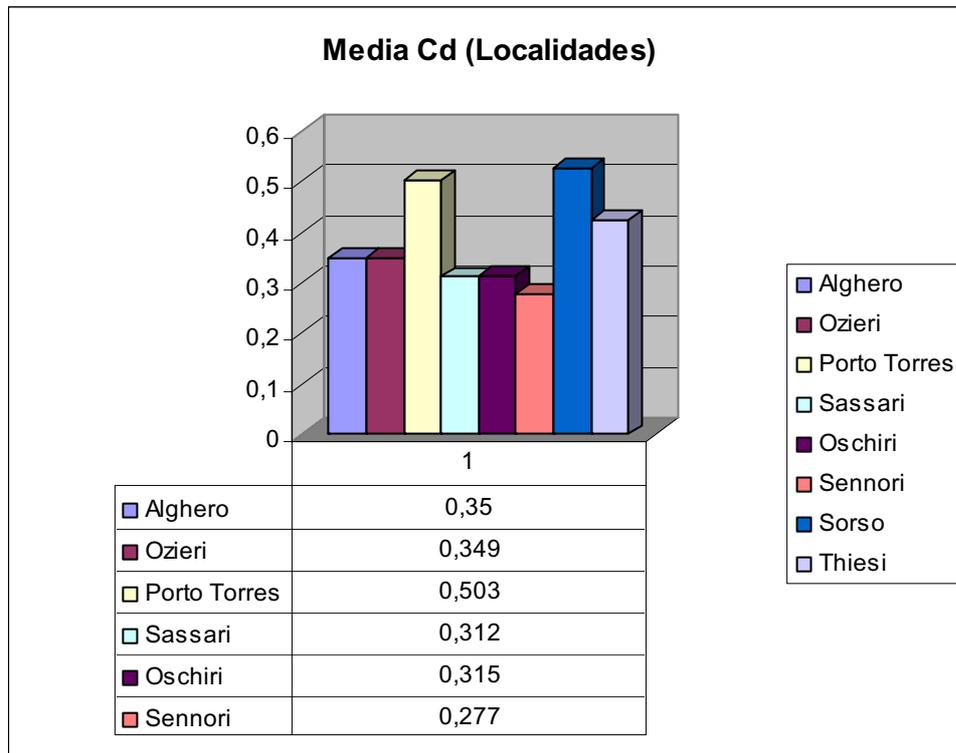
Por otra parte, el lugar de residencia de la población estudiada también parece influir en los valores de cadmio en sangre, encontrando que en los residentes en el campo, la media fue de  $0.409\mu\text{g/l}$ , siendo esta más elevada que la encontrada en los residentes en la ciudad o su periferia ( $0.349\mu\text{g/l}$ ) (Fig. 17).



**Figura 17.** Valores medios de cadmio en pacientes distribuidos según su lugar de residencia.

Por último, analizando los sujetos en grupos según la localidad de residencia hemos podido observar diferencias en los niveles de cadmio. Así, los habitantes de ciudades como Sassari, que presenta bajos niveles de contaminación ambiental debido a la ausencia de asentamientos industriales en sus cercanías, muestran valores medios de cadmio de  $0.312 \mu\text{g/l}$ , significativamente menores que los encontrados en los habitantes de pequeñas ciudades como Porto Torres ( $0.503 \mu\text{g/l}$ ), que posee una gran empresa industrial siderúrgica y Sorso ( $0.526 \mu\text{g/l}$ ), lugar de residencia de una importante bolsa de mano de obra para la industria circundante.

No obstante, debemos señalar el reducido número de muestras obtenido en estas dos poblaciones (8 para la primera y 9 para la segunda) que hacen necesario un estudio más amplio y en profundidad para obtener datos estadísticamente significativos (Fig. 18).



**Figura 18.** Valores medios de cadmio en pacientes distribuidos según la localidad.

#### IV.3.3. Niveles de cadmio en sangre. Mediana y percentiles.

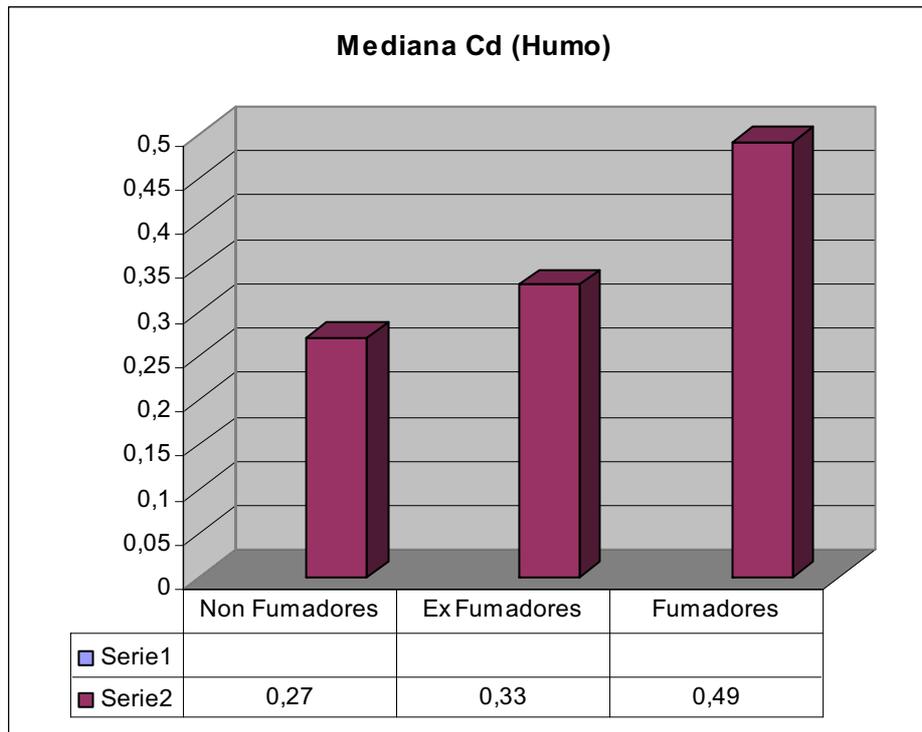
Los datos obtenidos del estudio de los niveles de cadmio en la población analizada fueron sometidos a un estudio estadístico de tipo no-paramétrico (mediana y percentil). Los resultados obtenidos demuestran un valor de la mediana de  $0.31\mu\text{g/l}$ , lo que representa un valor significativamente más bajo que el obtenido en otros trabajos científicos con similares características (entre los  $0.5$  y  $0.7\mu\text{g/l}$ ) (Figura 19).

Este estudio confirmó los resultados obtenidos anteriormente, observando como la concentración del cadmio determinada en la sangre de los sujetos fumadores fue casi el doble de la que se pudo determinar en los sujetos no-fumadores. Así, los valores de la mediana en los primeros fue de  $0.49\mu\text{g/l}$ , mientras que en los segundos fue de  $0.27\mu\text{g/l}$ .

Niveles de Cadmio en Sangre ( $\mu\text{g/l}$ )					
Población	Mediana	Total			
		5° Pct	25° Pct	75° Pct	95° Pct
total	0,31	0,125	0,23	0,45	0,715
Non Fumadores - Ex Fumadores					
Total	0,27	0,123	0,22	0,365	0,547
Edad					
18-39	0,23	0,12	0,18	0,305	0,508
40-59	0,26	0,146	0,22	0,36	0,614
> 60	0,32	0,124	0,245	0,39	0,502
Fumadores					
Total	0,49	0,149	0,355	0,602	0,857
Edad					
18 - 39	0,49	0,161	0,34	0,615	1,001
40 - 59	0,48	0,116	0,37	0,592	0,669
> 60	0,475	0,31	0,385	0,77	0,836

**Figura 19.** Estudio de los valores de cadmio mediante mediana y percentiles.

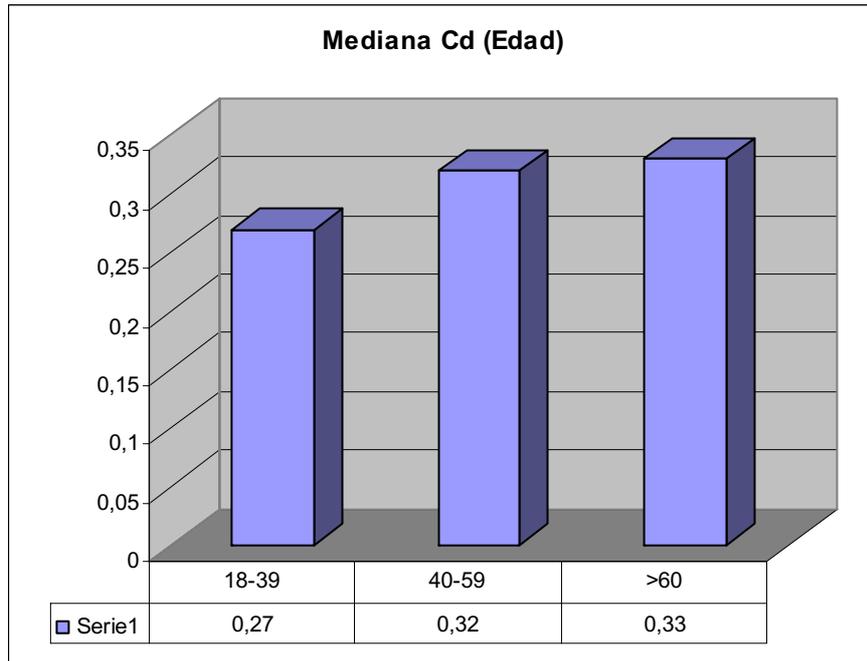
Además, como ocurría en el estudio anterior, la mediana de valores de cadmio en los exfumadores fue mayor ( $0.33 \mu\text{g/l}$ ) que la que presentaron los sujetos que no habían fumado nunca ( $0.26 \mu\text{g/l}$ ) (Fig. 20).



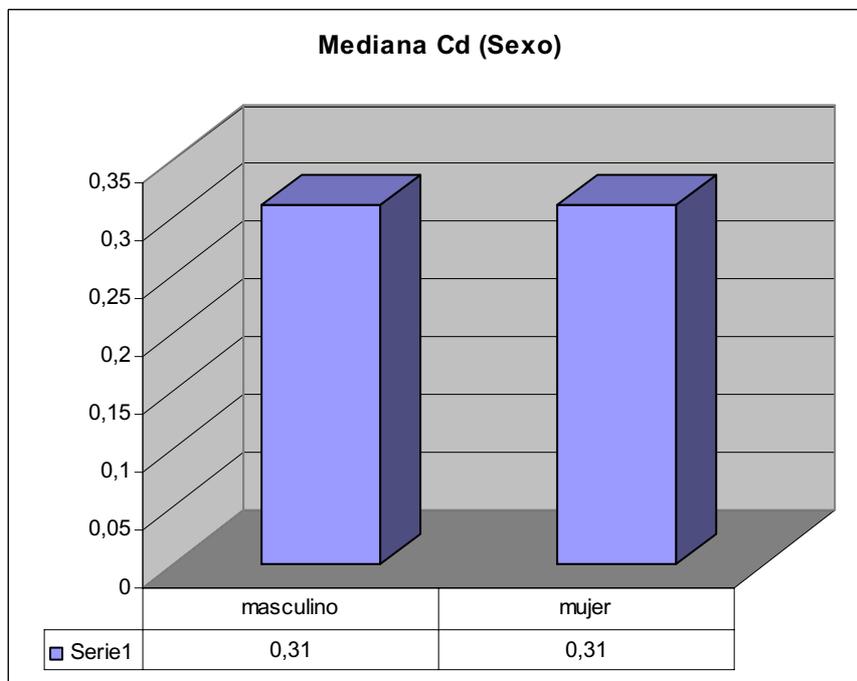
**Figura 20.** Mediana de los valores de cadmio en la población distribuida según el hábito de fumar

Por último, hemos podido detectar una correlación, entre los valores del cadmio en sangre y la edad de los sujetos sometidos a estudio que eran no fumadores. La mediana del grupo comprendido entre 18 y 39 años fue de  $0.23 \mu\text{g/l}$ ; la del grupo comprendido entre 40 y 59 años fue de  $0.26 \mu\text{g/l}$  y en el grupo de sujetos de más de 60 años fue de  $0.32 \mu\text{g/l}$ . Cuando el estudio fue relazado en los mismos grupos de edad pero en sujetos fumadores, los valores encontrados fueron significativamente más elvados:  $0.49 \mu\text{g/l}$ ,  $0.48 \mu\text{g/l}$  y  $0.48 \mu\text{g/l}$  en los tres grupos, respectivamente (Fig. 21).

Sin embargo, no pudimos demostrar una correlación significativa entre la variable sexo y el grupo de fumadores y no fumadores (Fig. 22).



**Figura 21.** Correlación entre la mediana de los valores de cadmio y la población distribuida según edad.



**Figura 22.** Correlación entre la mediana de los valores de cadmio y la población distribuida según sexo.

#### **IV.4. ESTUDIO SOBRE LAS DIFERENTES RESPUESTAS A LA INOCULACIÓN DE CADMIO POR VIA INTRACEREBROVENTRICULAR. ANÁLISIS DE LA PRESIÓN SANGUINEA EN RATAS CON NIVELES NORMALES Y BAJOS DE CALICREINA URINARIA.**

##### **IV.4.1. Excrecion urinaria de calicreina**

El estudio de urinario de los niveles de calicreina demostró que su excreción es menor en los grupos de ratas LKR ( $12.4 \pm 2.8$  nkat/24h) en relación a los grupos NKR ( $32.8 \pm 2.9$  nkat/24h), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (test de Student).

Trás la administración de cadmio inyectado por vía intracerebroventricular, se realizó un estudio de las modificaciones de la presión sanguínea media (MBP).

Así, en los grupos 1 y 3, observamos un inmediato y sostenido aumento de la MBP. En el grupo 1, después de la aparición de un pico inicial de MBP en el séptimo minuto ( $118 \pm 4$  mmHg versus  $161 \pm 7$  mmHg, 27%), la presión permaneció, durante todo el experimento, con valores más altos que los encontrados en condiciones basales. Al final del experimento la presión sanguínea era todavía del 10% más alta que los valores basales ( $118 \pm 4$  mmHg versus  $131 \pm 8$  mmHg). Después de 24h esta diferencia de MBP se mantenía. En el grupo 3, encontramos una respuesta similar, observando también un pico inicial en el cuarto minuto ( $113 \pm 9$  versus  $151 \pm 11$  26%), aunque la presión volvió, al final del experimento, a sus valores normales ( $113 \pm 9$  versus  $116 \pm 8$ ).

En los grupos 2 y 4, que fueron sometidos a inyección vía i.c.v. de solución salina, no han sido observados efectos sobre la MBP relevantes ( $117 \pm 4$  mmHg versus  $116 \pm 3$  mmHg y  $115 \pm 5$  mmHg versus  $114 \pm 3$  mmHg, respectivamente).

Una diferencia estadísticamente significativa ha sido encontrada en todos los parámetros urinario basales entre las dos cepas analizadas (Fig. 18).

Así, ha sido detectada una disminución significativa ( $P < 0.03$ ) de los valores en el grupo 1. Al contrario, en el grupo 3 se ha encontrado un aumento significativo ( $P < 0.03$ ) respecto a los datos basales mediante el análisis de la *t* de Student. En las ratas tratadas con solución salina no han sido observadas diferencias relevantes (Figura 23).

Parámetros urinarios antes y después de inyección i.c.v. de cadmio o salina

<b>Parámetros urinarios</b>	<b>Valores basales</b>	<b>Valores finales</b>
<b>UV (ml/24 h)</b>		
Grupo 1	43.0 ± 20	13.2 ± 6
Grupo 2	35.0 ± 12	39.0 ± 11
Grupo 3	17.7 ± 8	22.0 ± 4
Grupo 4	17.0 ± 4.8	13.0 ± 1.5
<b>UNa (mEq/24 h)</b>		
Grupo 1	1761 ± 432	1156 ± 522
Grupo 2	1475 ± 234	1096 ± 540
Grupo 3	667 ± 274	1725 ± 300
Grupo 4	720 ± 235	820 ± 175
<b>Uk (mEq/24 h)</b>		
Grupo 1	2186 ± 482	936 ± 299
Grupo 2	1874 ± 209	1274 ± 307
Grupo 3	1177 ± 580	1730 ± 212
Grupo 4	1406 ± 274	1493 ± 297
<b>Uosm (mOsm/l)</b>		
Grupo 1	500 ± 210	1391 ± 245
Grupo 2	478 ± 183	515 ± 200
Grupo 3	749 ± 329	1188 ± 119
Grupo 4	859 ± 280	1151 ± 230

**Figura 23.** Parámetros urinarios basales y finales

#### **IV.4.2 Excreción de potasio**

El estudio de los valores de excreción de potasio ( $U_k$ ) entre ambos grupos de ratas LKR, demostró una reducción estadísticamente significativa ( $P < 0.0006$  para el grupo 1 y  $P 0.0003$  para el grupo 2), respecto a los valores basales. Sin embargo, no encontramos diferencias entre los grupos de ratas NKR.

#### **IV.4.3 Volumen urinario**

Los estudios del volumen urinario (UV) demostraron sólo en el grupo 1 valores significativamente más bajos respecto a los valores basales ( $P < 0.0006$ ). Finalmente, sólo en este grupo ha sido observados valores más altos ( $P < 0.0002$ ) en cuanto a la osmolaridad ( $U_{osm}$ ).



## *V. DISCUSIÓN*



### **V.1. ESTUDIO DEL CITOESQUELETO DE FIBROBLASTOS NORMALES (FG) Y NEOPLÁSICOS (SGS13A) EN CULTIVO.**

Nuestros estudios han permitido determinar las modificaciones que provoca el acetato de cadmio (5 $\mu$ M) en la estructuración del citoesqueleto celular de fibroblastos normales y neoplásicos en cultivo. El análisis de la expresión y localización mediante inmunofluorescencia de las proteínas actina, tubulina y vimentina, ponen en evidencia que las modificaciones citológicas que se producen son, en líneas generales, similares en ambas líneas celulares.

Desde un punto de vista morfológico, el cadmio induce drásticas modificaciones en la forma celular. Dicha forma evoluciona gradualmente pasando a través de formas intermedias; de triangular a fusiforme en los fibroblastos normales, y pasando por formas irregulares y/o estrelladas con numerosas prolongaciones citoplasmáticas en los fibroblastos neoplásicos, que terminan adquiriendo una morfología globosa.

La acción del cadmio sobre la morfología de los elementos celulares normales y tumorales varía en función del tiempo de incubación. La exposición progresiva al cadmio provoca alteraciones cada vez mayores de las proteínas citoesqueléticas analizadas, proteínas, que como es bien conocido, además de desarrollar diferentes funciones celulares, son responsables de la forma y estructura celular. Este hecho explicaría los cambios morfológicos también progresivos que son observados en los cultivos de fibroblastos bajo la influencia del cadmio.

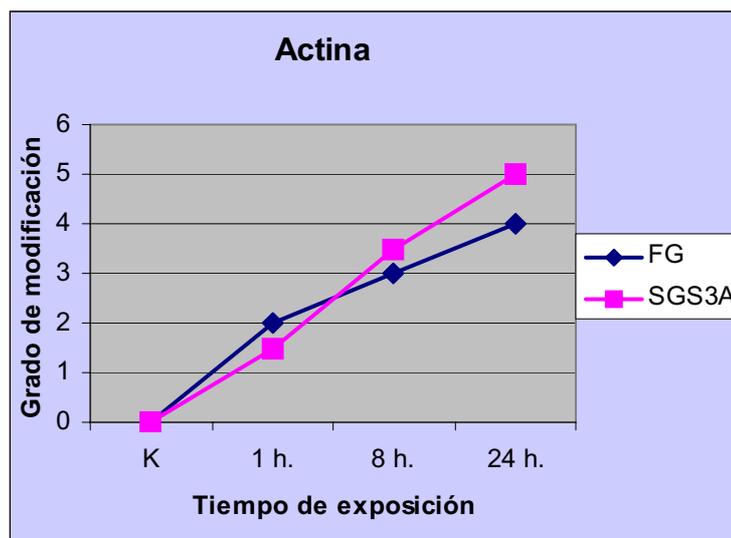
Las modificaciones morfológicas que comienzan a ser observables en primera hora de la incubación con cadmio, se vuelven muy evidentes después de 8 horas de exposición y alcanzan su máxima expresión a las 24 horas. Con este último tiempo de exposición se hace especialmente evidente una notable reducción del volumen total de las células unido a una pérdida de su capacidad de unión al substrato. Tales modificaciones pueden ser

atribuidas a las grandes alteraciones que se observan a nivel de la membrana celular, y que pueden tener su origen en el propio cambio de la forma celular o bien a la progresiva aunque parcial separación del sustrato.

### V.1.1. Modificaciones de la proteína actina

La actina es una de las proteínas que mayores cambios sufre por la acción del cadmio. Los estudios mediante inmunofluorescencia demuestran una progresiva desaparición y desestructuración de los filamentos tanto en la línea fibroblástica normal como en la neoplásica. No obstante, la comparación entre ambas permitió evidenciar que la desaparición de las fibras de estrés es más marcada aunque se produce más tardíamente en las células SGS/3A que en las FG (Fig. 19).

En ambas líneas y de forma paralela a los diferentes y progresivos tiempos de de incubación, observamos que el desensamblaje de la proteína se acompañaba de la progresiva formación de pequeños agregados de actina (smeared patches) que se disponen preferentemente cerca del núcleo.

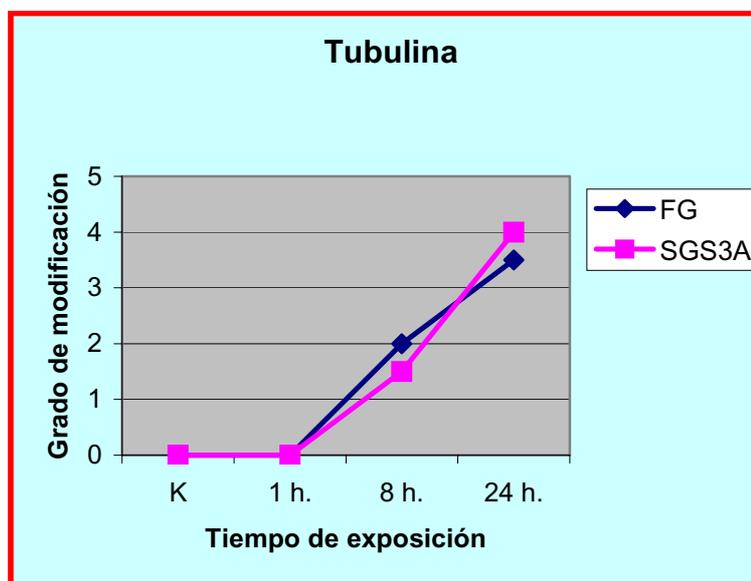


**Figura 19.** Modificación de la actina por exposición a cadmio en células FG y SGS/3A.

Es conocido que las fibras de estrés forman una especie de surcos o canales con una función celular enormemente importante: a través de ellos se vehiculiza el tráfico intracelular de vesículas. Por tanto, La desestructuración de los filamentos de actina no sólo conlleva un cambio o una pérdida parcial de la arquitectura celular y como consecuencia de ello de su forma, sino que también puede influir en la alteración del paso de señales desde la membrana al núcleo (39 – 61- 87 -120 -121 - 131).

### V.1.2 Modificaciones de la proteína tubulina

Los estudios realizados en relación a la tubulina mostraron pocas modificaciones en la primera hora de exposición al cadmio. Sólo después de ocho horas de exposición, pudimos detectar un desensamblaje de esta proteína en ambas líneas celulares, que se hizo más evidente a las veinticuatro horas, originado un colapso parcial de la trama microtubular de la célula (Fig. 20).



**Figura 20.** Modificación de la tubulina por exposición a cadmio en células FG y SGS/3A.

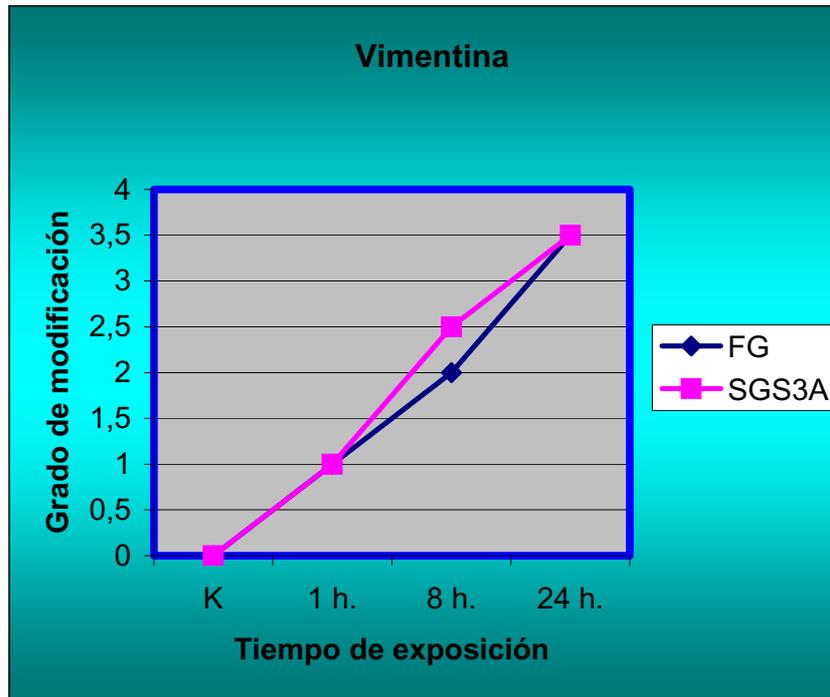
La desestructuración de los microtúbulos por la alteración de la tubulina podría estar ligada a las modificaciones intracelulares de la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Este último, el  $\text{Ca}^{2+}$ , sabemos que está directamente relacionado con la polimerización de los microtúbulos. En este sentido, entre las acciones de cadmio se encuentra la capacidad de activar una proteína asociada al citoesqueleto, la Calmodulina. Una vez activada, esta proteína es capaz de unirse a proteínas específicamente sobre los lugares donde actúa el  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta unión supondría un potente efecto inhibitorio sobre el ensamblaje de la tubulina, provocando su despolimerización y explicando la desestructuración de los microtúbulos que observamos en los fibroblastos tanto normales como neoplásicos.

No obstante, las principales modificaciones fueron observadas en las células neoplásicas, en donde aparecieron a menudo formas anómalas características con la presencia de apéndices puntiagudos que parecen indicar grandes modificaciones en la membrana celular.

Por último, si comparamos los efectos que el cadmio induce en la actina y en la tubulina en ambos tipos de fibroblastos, podemos observar como las alteraciones de los microtúbulos siempre aparecen más tardíamente (a partir de las 8 h de exposición es cuando se hacen evidentes) y, además, son menos acentuadas que las detectadas en la actina. Este hecho, sugiere que el cadmio actúa preferentemente sobre los filamentos de actina o que los microtúbulos son menos sensibles a la acción del metal pesado.

### **V.1.3. Modificaciones de la proteína vimentina**

La vimentina es, sin duda, la proteína que menos modificaciones sufre en los fibroblastos, tanto normales como neoplásicos, por la acción del cadmio. Es cierto que a lo largo de los diferentes tiempos de exposición (1h, 8h y 24h), observamos alteraciones graduales de la estructuración de la densa trama de estos delicados y delgados filamentos. Sin embargo, incluso después de más prolongado tiempo de exposición (24h), los filamentos de vimentina mantienen hasta cierto punto su morfología (Fig. 21).



**Figura 21.** Modificación de la vimentina por exposición a cadmio en células FG y SGS/3A.

A pesar de ello, la acción del cadmio provoca una pérdida de la organización tridimensional de estos filamentos, observando a menudo la presencia de haces gruesos que se alejan del núcleo y aparecen situados en las zonas periféricas.

A diferencia de lo que ocurre con la tubulina, en la vimentina no son evidentes grandes fenómenos de despolimerización. Esto puede ser atribuido a la elevada estabilidad química de los filamentos intermedios (148). De hecho, la despolimerización de estos filamentos sólo puede conseguirse en laboratorio mediante el uso de prolongadas extracciones con soluciones de alto poder desnaturizante.

Parece pues, que los filamentos intermedios, desde un punto de vista morfológico pero no funcional, son menos sensibles a la acción del cadmio

que la actina y la tubulina. Estas dos últimas proteínas parecen perder sus características propias por la acción del metal pesado.

## **V.2. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE LA POBLACIÓN SARDA. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DEL CADMIO EN SANGRE**

Los valores de referencia de las concentraciones de distintos elementos tóxicos determinados en la población sana no expuesta profesionalmente, constituyen un elemento clave de la Sanidad Pública. Estos estudios permiten la identificación y determinación de los límites máximos de exposición a dicha sustancia que pueden ser permitidos sin incidencia en la salud. Además son fundamentales para examinar situaciones especiales y para poder prevenir enfermedades causadas por la presencia de elementos tóxicos o por la falta de elementos esenciales.

El crecimiento industrial y otras actividades humanas han llevado en los últimos 50 años a una contaminación ambiental difusa. Hoy en día la exposición ambiental a elementos tóxicos, y entre estos al cadmio, es sin duda uno de los principales riesgos para la salud, no sólo para los trabajadores de las zonas industriales sino también para la población en general. En contraposición a esto, una considerable cantidad de elementos beneficiosos o incluso esenciales en algunas formulaciones químicas y en determinadas concentraciones, pueden ser introducidos en el ambiente con el objetivo de mejorar la salud de la población.

Sin embargo, la evaluación de tipo cualitativa o incluso cuantitativa de la contaminación ambiental por parte de algunos metales es muy difícil. La introducción de indicadores biológicos, animales o vegetales, en la monitorización ambiental es una alternativa a la determinación directa de elementos en "trazas" en el medio ambiente (13 - 128 -129 - 155 - 156). Ya que la exposición de la población humana a estas sustancias dañinas presenta un considerable interés, una evaluación efectuada sobre material biológico y en especial la sangre de origen humano, es sin duda de enorme importancia. Los valores de cadmio en sangre (S-Cd) son un buen

biomacador de la exposición ambiental y ocupacional al cadmio. El valor real de referencia para el S-Cd puede ser definido como el rango de las concentraciones de cadmio en sangre en individuos residentes en una específica área y con un estilo de vida definido en referencia a la alimentación, la bebida y el humo, de una edad y sexo definidos y que no están profesionalmente expuestos al metal. Así, los valores bajos pueden reflejar una exposición semanal o mensual, mientras en sujetos con largo tiempo de exposición o en los que han asimilado gran cantidad de cadmio, el acumulo corpóreo total (body burden) puede influenciar los niveles en sangre.

Los elementos en “trazas” son parte integrante de los tejidos humanos, dónde ejercen su efecto benéfico o tóxico, en base a la forma química y a la concentración. En concreto, la cantidad de cadmio ha crecido dramáticamente en las últimas décadas, en consecuencia de la progresiva industrialización y del consiguiente crecimiento económico. De ahí, la importancia del conocimiento del papel biológico y de los mecanismos a través de los cuales el cadmio puede actuar (37 - 100).

Resulta de vital importancia la exacta determinación de sus concentraciones en los fluidos biológicos y en los tejidos; ya que un conocimiento detallado de las concentraciones del cadmio en el organismo humano, en la población y de los valores normales de referencia, es indispensable para determinar los riesgos para la salud causados por su exposición ambiental (12 - 19 - 33 - 36 - 47). En este sentido, habrá que tener en cuenta los efectos según las diferentes características del territorio (geológicas, geográficas y demográficas), y también el estilo de vida (costumbres nutricionales, costumbre de fumar, actividad física, factores sociales etc.) de las poblaciones (101).

Cuando se elige un bioindicador se debe tener en cuenta la disponibilidad y las características metabólicas del material en el que se determina; la sangre, la orina y a veces, los cabellos son de los más representativos (149). Estos materiales son muy útiles en la determinación de

la exposición crónica a elementos en trazas, ya que pueden aparecer en ellos a partir de los tejidos en los que se depositan como hueso, riñón y grasa (82).

El cadmio es, entre los metales pesados, uno de los elementos más representativos y tóxicos que puede acumularse en tejidos. Es necesario examinar las fuentes principales de contaminación de Cadmio para el hombre. Los cultivos de hortalizas son una debido a la contaminación del terreno, de las aguas de riego, de los barros residuales empleados como fertilizantes y del uso indiscriminado de los pesticidas. También será necesario evaluar las fuentes principales de exposición y las características toxicológicas del cadmio, sus efectos sobre la salud humana, las actuales normas técnicas y de tutela de la salud para el control de sus niveles y las metodologías analíticas para su determinación (50 - 51 -52).

El cadmio posee una toxicidad parecida al Hg o al As y se difunde mucho más Pb. Los empleos industriales en los que aparece este metal son numerosos y es probable que se incrementen en el futuro. Por consiguiente, la presencia de cadmio podría aumentar en el agua, aire y suelo, lo que probablemente conllevará incrementos de sus niveles en las plantas y en la comida de origen animal. Dado que parece no existir ningún límite fisiológico para la acumulación del cadmio en los vegetales, en los individuos no expuestos profesionalmente, la vía principal de adquisición de este metal será la dieta (111 - 136).

Sabemos que los efectos de este elemento sobre la salud humana pueden ser graves, incluso después de una exposición a bajos niveles sobre todo si ésta es en continua y prolongada en el tiempo. El desarrollo tecnológico está permitiendo que los límites de su detección progresivamente se reduzcan. No obstante, son necesarios estudios más completos sobre las concentraciones de cadmio en todas las fuentes potenciales de exposición humana, para definir los límites de seguridad y adquirir un conocimiento detallado de la biodisponibilidad, las especies químicas y las estrategias de monitorización más eficaces. Estos datos servirán sin duda como sólida base

para llegar a unas conclusiones sobre los efectos fisiológicos y/o dañinos del cadmio.

Muchos trabajos de la literatura establecen una asociación entre sustancias xenobióticas y patologías humanas. El cadmio es considerado oncogénico en el hombre. Los niveles de exposición en determinadas categorías de trabajadores son bastante conocidos y también sus efectos agudos. Pero, su empleo extensivo en el pasado y su uso que actual en productos de procedencia extracomunitaria, suscita preocupación en relación a la salud de la población, sobre todo si se tiene en cuenta su larga vida media en el organismo.

Nos parece especialmente útil adquirir información sobre los niveles del cadmio en la población (35 - 48 - 67 - 99 - 108 - 137). Son numerosos los trabajos de este tipo en poblaciones residentes en América, Asia y algunos países europeos (71 - 72). Hay datos de Alemania, Bélgica, Suiza, Yugoslavia y del Norte de Italia pero esto son escasos en las poblaciones del centro de Italia y zonas insulares como Cerdeña poco expuestas profesionalmente al metal (18 - 19 - 3 - 4 - 5 - 6 - 45). En nuestro caso, estudiamos inicialmente la zona Norte de Cerdeña, lo que permitirá tener una referencia representativa de la población general residente en el área desde al menos quince años, en relación a factores específicos de riesgo. Además servirá como estudio de referencia para análisis posteriores y ya en curso, en algunos polígonos industriales de Cerdeña, donde presumiblemente los valores de Cadmio podrían ser diferentes, y en población con afectaciones neurológicas.

La determinación de los valores de cadmio en sangre de la población del Norte de Cerdeña (Italia), que se caracterizó por no estar expuesta profesionalmente al cadmio, nos ha permitido determinar los sujetos presentan una exposición ambiental al cadmio distribuida variablemente, con unos valores absolutos que son notables más bajos que los recogidos en otros estudios de similares características (3 - 6 - 33 - 112 - 122). De hecho, pudimos detectar cadmio en sangre en casi todos los sujetos sometidos al

estudio. Sin embargo, las concentraciones medias de cadmio en esta población (mediana 0.31), siempre se situaron por debajo de la concentración media detectada en otras regiones italianas y en otros países europeos (Bélgica, Suecia y Alemania) (45 - 67 - 108 - 137).

Nuestros resultados también difieren de los observados en otros estudios como los realizados en Inglaterra y en naciones no europeas, principalmente en, en los cuales los niveles de cadmio detectados siempre fueron mucho más elevados (8 -10 - 30 - 151 -153 - 157 -158). En concreto, en un estudio realizado sobre mujeres japonesas no fumadoras, la media geométrica (GM) de la concentración de cadmio en sangre fue de 0.2 gr/l, valores muy superiores a los nuestros y que pueden ser atribuidos a una continua exposición a este agente que se ingiere con la dieta, y en particular con consumo de arroz altamente contaminado de Cadmio (97 -119).

Los niveles mas bajos de cadmio en sangre detectado en nuestro estudio en relación a otros de similares características, ha podido ser confirmado mediante el análisis estadístico de tipo paramétrico. Así, hemos podido corroborar que los valores encontrados en nuestra población (media 0.355  $\mu\text{g/l}$ ) son menores que la media presente en la mayor parte de las poblaciones (rango desde 0.7 a 1.2  $\mu\text{g/l}$ ), incluyendo la detectada en otros trabajos, como el realizado en la población de Singapur, en la que los valores sobre los grupos étnicos variaban desde 0.21 a 0.49  $\mu\text{g/l}$ .

Es conocido que las concentraciones de cadmio detectadas en una población pueden estar influenciadas por diversos factores entre los que se encuentra la dieta, el humo, la edad, el sexo, la residencia, la ocupación, etc ( 65 – 67 -69 -99). En nuestro estudio, hemos utilizado criterios de exclusión que nos han permitido asegurar la no inclusión en la población analizada de sujetos que por diferentes motivos, de trabajo o personales, hubiesen estado expuestos al cadmio. Para identificar los remanentes determinados sobre las concentraciones del Cadmio, hemos efectuado, como ya hemos comentado, un análisis estadístico bien paramétrico o bien no-paramétrico.

Nuestros datos han mostrado como uno de los principales factores que condiciona los niveles de cadmio en sangre, el hábito de fumar. Así, las determinaciones de cadmio en este grupo de población (sujetos fumadores) fue notablemente más alta (casi el doble) en relación a los resultados obtenidos en sujetos no fumadores. Los sujetos exfumadores vienen a encontrarse en una posición intermedia con niveles inferiores a los fumadores, pero mayores que los de los no fumadores. En este sentido, nuestros resultados coinciden y son apoyados por los observados en otros estudios similares (26 - 45 - 152). No obstante, las diferencias encontradas en nuestro estudio entre ambos grupos de población, son ciertamente menores que las halladas en estos últimos análisis citados, en los que se describen diferencias de entre 2 a 5 veces.

Esta diferencia se hace mucho más notable cuando comparamos nuestros resultados con otros, como los obtenidos en Canadá. El análisis de la población de Quebec arroja unos resultados sorprendentes, con niveles extremadamente altos de cadmio en sujetos fumadores ya sean residentes en la ciudad o en el campo. En este grupo de población se encontraron niveles medios de cadmio hasta 14 veces mayores que los detectados en no-fumadores. Además, mientras que los fumadores residentes en la ciudad presentaban una concentración media de cadmio de 46.1  $\mu\text{g/l}$  (respecto a los 2.7  $\mu\text{g/l}$  de los no-fumadores), los fumadores residentes en el campo tenían una concentración media de 40.0  $\mu\text{g/l}$  (respecto a los 2.7  $\mu\text{g/l}$  de los no-fumadores). Estos datos indican la importancia de la zona de residencia en cuanto a la determinación de los niveles de cadmio en sangre (7 – 8 – 10 – 30). No obstante, los niveles de cadmio tan elevados en la población de Quebec no han sido satisfactoriamente explicados. Se ha sugerido que la diferencia con otros estudios de similares características podría encontrarse en el hecho de que los cigarrillos producidos en Canadá contienen valores muy elevados de cadmio respecto a los cigarrillos producidos en otros países.

Sin embargo, los datos sobre los niveles de cadmio en la población son extremadamente variables. Un ejemplo significativo de esta diversidad es el

estudio realizado en la India, en donde, en contraposición a los sorprendentes resultados de Canada, se han encontrado valores similares entre la población fumadora y la no-fumadora.

Como ya hemos comentado, son muchos los factores que parecen poder influir en los valores de cadmio detectados en la población. Además del hábito de fumar (98 - 104), el sexo y la edad se han considerado dentro de estos factores. No obstante, en nuestro estudio, ni la edad ni el sexo parecen poseer un efecto significativo sobre los valores de cadmio. En algunos estudios como los realizados en Suecia parecen determinar unos valores de cadmio mayores en la mujer no-fumadora que en los hombres. Sin embargo, estudios similares en el Norte de Italia arrojan resultados opuestos.

A diferencia de lo que ocurre con el sexo y la edad, en nuestro estudio si es significativo la variable que define el lugar de residencia de la población. El hecho de que la población residente en el campo muestre valores más altos respecto a los habitantes de la ciudad, podría ser explicado porque las ciudades y pueblos tomados en consideración en el análisis, muestran una bajísima contaminación ambiental y muchos son pueblos con pocos habitantes. Por otra parte, debería tenerse en cuenta la dieta de los residentes en el campo en la que pueden aparecer alimentos típicos del lugar, de fabricación propia y que podrían estar contaminados por el metal.

De hecho, el estudio de la dieta en nuestra población se está desarrollando actualmente. Presumimos que el tipo de dieta y de los diferentes factores nutricionales puedan interferir de forma bastante marcada sobre las concentraciones de cadmio en nuestra población. Esperamos tener resultados en breve que permitirán decir con exactitud cuanto puede llegar a influir esta dieta sobre nuestros resultados (49 - 97 - 119 - 14 - 36 - 108).

Como vemos, los diferentes y a veces contradictorios resultados encontrados en este tipo de estudios, hacen difícil llegar a unos datos definitivos y concluyentes. Habiendo analizado, por ahora, sólo la parte

septentrional de la región, donde ya estudios de la población animal habían mostrado valores bajos de cadmio, serán necesarios análisis de la población central y meridional de la isla, para confirmar los datos sobre la población sarda.

Dentro de nuestro estudio, todavía algunas variables pueden ser importantes: la dieta, objeto actual de estudio, las características ambientales, agrarias e industriales de la isla y por último y no por ello menos importante, el hecho de que la población de Cerdeña tiene unas características genéticas muy peculiares, presentandose con una incidencia elevada patologías del tipo de la diabetes, la esclerosis múltiple y talasemia, lo que ha llevado a realizar numerosos estudios en este sentido. Hasta ahora lo que podemos decir es que, los niveles de la concentración de cadmio en la población del Norte de Cerdeña, no expuesta profesionalmente al cadmio, son, en sus valores absolutos, bastantes bajos con referencia a otros países europeos, mientras que los datos obtenidos en relación a la influencia de factors como el humo, la edad, el sexo y la residencia, entran dentro de los resultados obtenidos en la mayor parte de los trabajos científicos de parecidos objetivos.

### **V.3. ESTUDIO SOBRE LAS DIFERENTES RESPUESTAS A LA INOCULACIÓN DE CADMIO POR VIA INTRACEREBROVENTRICULAR. ANÁLISIS DE LA PRESIÓN SANGUINEA EN RATAS CON VALORES NORMALES Y BAJOS DE CALICREINA URINARIA.**

El cadmio se acumula fundamentalmente en la corteza renal causando alteraciones funcionales y metabólicas de las células epiteliales de los túbulos glomerulares. No obstante, también se ha evidenciado su acúmulo en otros tejidos como hígado y sistema nervioso central.

La presencia de cadmio en el organismo se ha relacionado con la patogénesis de la hipertensión arterial. Así este metal pesado puede inducir hipertensión en ratas anestesiadas y no anestesiadas cuandoes administrado por vía oral, intraperitoneal (i.p.) y intracerebroventricular (i.c.v.). Parece que

la vía de administración es muy importante. Mientras que administrado por vía periférica, parece no alcanzar dosis suficientes para inducir efectos sobre la presión arterial, por vía i.c.v. aumenta la presión sanguínea.

Los mecanismos responsables de esta acción son todavía desconocidos. Entre las hipótesis que intentan explicar los efectos cardiovasculares del metal se encuentran el aumento de retención de sodio, una acción vasoconstrictora directa, una interacción con los canales del calcio y una activación del sistema nervioso simpático.

Se ha podido observar que la respuesta hipertensiva inducida por el cadmio i.c.v. es precedida en muchos casos por tratamientos de antagonistas del calcio. Esto hace suponer que dicho efecto puede estar relacionado con la modulación de los canales del calcio a nivel cerebral, aunque los resultados no son concluyentes. De hecho, una gran absorción de calcio (Intake) puede proteger contra la absorción, el acúmulo y toxicidad del cadmio. Se sabe que el cadmio se liga al calcio ocupando los sitios de la calmodulina. Este es un receptor intracelular que regula muchas actividades y procesos celulares activando los enzimas calcio-calmodulina dependientes; esto podría ser al menos, en parte, un punto de partida para explicar la toxicidad del cadmio y de otros metales pesados (22 - 46 - 58).

Por otra parte, algunos estudios han demostrado que la inoculación i.c.v. del cadmio han llevado a una reducción espontánea de la presión en ratas hipertensas (SHR) y en cobayas. Esto podría ser explicado por el hecho de que el cadmio puede sustituir al calcio en su unión a la calmodulina cerebral y ésta, una vez activada por el cadmio, podría aumentar la actividad de los enzimas que intervienen en la síntesis de dopamina. El aumento de los niveles de dopamina a nivel cerebral sería responsable de la hipotensión provocada por el Cadmio i.c.v. Todavía no podemos explicar estos dos efectos contrapuestos del cadmio i.c.v (141 - 142 -143).

En nuestro estudio determinamos los efectos hipertensivos de una administración aguda de cadmio por vía i.v.c en una cepa de ratas con una

congénita baja secreción urinaria de calicreína. Esta cepa (LKR) ha sido producto de un stok seleccionado de ratas Wistar con bajos niveles urinarios de calicreína. Inicialmente esta cepa desarrolló valores presores del 15% más altos respecto a la cepa Wistar, pero con el tiempo, los valores se acercaron a los de las ratas con niveles normales de calicreína (NKR).

La calicreína renal ha sido relacionada con la heredabilidad de la hipertensión arteriosa: ésta rompe las moléculas de quinínogeno con bajo peso y determina la liberación de los péptidos de quinina. Aunque ya en 1934 se observó una reducción de la excreción urinaria de calicreína en relación a la hipertensión humana, estas observaciones han pasado desapercibidas durante más de cuarenta años. Hoy sabemos que un fenotipo con bajos niveles de calicreína urinaria puede ser un indicador de sensibilidad a las sales en relación a la la presión sanguínea humana. De hecho, ratas con baja calicreína desarrollan un moderado aumento de los niveles de la presión sanguínea cuando están expuestas a altos niveles de sodio en la dieta diaria (11 - 23 - 115).

Nos preguntamos por tanto, si el cadmio inoculado por vía i.c.v. puede aumentar la presión arterial de ratas LKR, que poseen características cuantitativas y cualitativas diferentes de las NKR. Visto que las características de la calicreína incluyen una protección y reparación a nivel renal, la excreción de bajos niveles de calicreína puede modifica los efectos del cadmio a nivel de la excreción renal del sodio (31 - 32 - 114 -124 – 114 - 116).

Es conocido que el sistema calicreína-quinina influye sobre las funciones cardiovasculares. En base a este hecho, hemos diseñado una experiencia con el objeto de analizar, en una cepa de ratas “inbred” con bajos valores de excreción de calicreína, las eventuales diferencias que, sobre la presión sanguínea y sobre las excreciones de electrolitos, puede ejercer la adminitración de cadmio inoculado por vía intracerebroventricular. En contraposición a esta experiencia se han utilizado también las normales Wistar.

Nuestros resultados demuestran que la inoculación de cadmio por vía intracerebroventricular provoca una respuesta hipertensiva. El aumento de la presión sanguínea se pudo observar en las dos cepas, aunque la cepa LKR mostró un aumento de presión más prolongado que el observado en la cepa NKR. En concreto, el aumento de la presión sanguínea en la cepa LKR se mantuvo durante 2 horas más que en la cepa NKR, tiempo suficiente pudiesemos determinar como la presión se normalizaba y alcanzaba valores basales en esta última (NKR). Además, después de un periodo de 24 horas de la inyección del Cadmio, la presión sanguínea mostró un aumento del 10 %, lo que sin embargo fue observado en la cepa LKR a las horas de la administración del metal pesado. En cambio, en la cepa NKR la presión sanguínea sufrió un aumento transitorio en el momento de la introducción del cadmio por vía intracerebroventricular, pero volvió a sus valores basales después de una hora permaneciendo sin modificarse después de 24 horas.

Estos resultados, es decir el hecho de que el Cadmio intracerebroventricular pueda producir una hipertensión aguda en la cepa de las ratas LKR, confirma el dato de que este metal pesado puede interferir, a través de un mecanismo central sobre la funcionalidad cardiovascular.

Además, los valores con los que se sabe que actúan los calcio-antagonistas sugieren que el cadmio puede interferir con el paso transmembrana del calcio al interior del encéfalo, hecho que sabemos que es crítico en el control de la presión sanguínea a nivel central.

Aunque es aceptado la implicación de los canales del calcio en la hipertensión inducida por cadmio, nuestros resultados sugieren una mecanismo más complejo en la interrelación de ambos sistemas. En efecto, en las LKR hay un aumento de la actividad del sistema renina-angiotensina, no compensada por el sistema vasodilatador de la quinina. Sabemos que los AT1, receptores del subtipo 1 de la Angiotensina II, median la mayor parte de los efectos biológicos de esta molécula a través de varios sistemas de traducción de la señal, como la activación de la fosfolipasa C y A2, la inhibición de la adenilato ciclasa y la apertura de los canales de calcio. Es

posible que, en este caso, la apertura de los canales de calcio represente el sistema de traducción de la señal, determinado por una estimulación del AT1. Esto podría explicar, al menos en parte, la aumentada sensibilidad, en esta cepa, a la subida de la presión sanguínea.

Por otra parte, los diferentes efectos que induce el cadmio suministrado por vía intracerebroventricular en las ratas LKR, pueden estar relacionados con el diferente estado hemodinámico en el que se encuentran los animales de experimentación. Debemos tener en cuenta que la presencia de una hiperfiltración glomerular, una reducida excreción de sodio, una polidipsia y una poliuria con una posible disfunción central sobre el control de la sed, son todas características fenotípicas de las ratas LKR.

El hecho de que en las ratas LKR esté presente la poliuria a pesar de que el mecanismo de concentración urinaria se mantenga intacto, podría ser debido a una aumentada actividad del sistema renina-angiotensina; de esta forma la Angiotensina II cerebral provocaría un aumento del estímulo de la sed, la liberación de ADH y de la excreción a nivel renal de sodio. Por tanto, se puede sugerir que los diferentes efectos del cadmio no son sólo datos de una consecuencia directa del antagonismo a nivel del receptor entre el metal y el calcio, si no que seguramente son el resultado de un mecanismo más complejo.

Finalmente, cuando las experiencias se llevaron a cabo en los grupos de ratas NKR y LKR tratados solo con solución salina, no pudimos demostrar ninguna modificación de los parámetros renales. Sólo se pudo detectar una escasa excreción del potasio en las ratas LKR, que en este momento no podemos explicar. Además en las ratas, sea LKR que NKR, sometidas solamente al proceso quirúrgico, no se observaron cambios ni en la presión sanguínea ni en la excreción de los electrolitos.

Serán necesarios, por tanto, futuros estudios para aclarar y comprender mejor los efectos del cadmio sobre la presión sanguínea. Nuestro trabajo

refuerza la importancia de los factores ambientales en los cambios de los valores de presión en un contexto de causa no heredable.

#### **V.4. NUEVAS PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN SOBRE CADMIO. ESTUDIO SOBRE ALGUNAS PATOLOGÍAS NEUROLÓGICAS (EM, ELA, ALZHEIMER) DESDE UN PUNTO DE VISTA CUANTITATIVO Y CUALITATIVO**

Aunque no forma parte de los objetivos del presente trabajo de investigación, si queremos hacer mención de los próximos pasos que nos planteamos como continuación de esta línea de investigación relacionada con los efectos tóxicos del cadmio.

Las enfermedades neurológicas generalmente están bien caracterizadas desde un punto de vista médico y patológico, aunque en algunas no se conozca aún su etiología. Por tanto, la obtención de base de datos y registros es indispensable para estudios etiológicos de tipo retrospectivo o longitudinal (154). Este último es preferiblemente usado para trastornos no lineales como la esclerosis múltiple (EM) mientras que los estudios de tipo de cortes puede garantizar la homogeneidad en enfermedades de curso previsible como la enfermedad de Alzheimer (AD) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Con respecto a la EM, en Cerdeña, han sido creadas bases de datos (1995) debido a la alta incidencia de esta enfermedad, comparable sólo con algunas regiones de Escocia y cuyas causas pueden estar relacionadas con los nuevos acontecimientos ambientales en el contexto de un antiguo "background" genético.

La AD es el tipo más frecuente de demencia en la población italiana anciana. No hay por el momento datos epidemiológicos en Cerdeña. Su etiología es desconocida aunque se ha postulado la relación con alelos polimorfos del "locus apo-y" en varios grupos étnicos, incluidos los sardos.

Estudios epidemiológicos sobre la ELA sugieren que los factores exógenos desempeñan un papel relevante a pesar de los errores diagnósticos que todavía aparecen relevantes. En Cerdeña, la incidencia media de la ELA no presenta variaciones en el período 1971-90 aunque su distribución ha resultado heterogénea.

Las tres enfermedades nombradas (EM, AD, ELA) son fisiopatológica y clínicamente diferentes, pero todas resultan epidemiológicamente iguales cuando se relacionan con la exposición a los metales pesados, observación que también ha podido ser confirmada por datos de laboratorio (15 - 17 - 81 - 96).

En el caso del EM, evidencias epidemiológicas indican que la preocupante "explosión" ocurrida en Ohio (EE.UU.) durante el período 1982-85 (40 casos) está en relación con un exceso de concentración de residuos de metales pesados y especialmente de cadmio en las aguas. Otro pequeño "cluster" ha sido observado en Illinois (EE.UU.) alrededor de una zona de tratamiento de metales pesados.

En el caso de la ELA es sabido que ratones de experimentación expuestos al cadmio desarrollan una neuropatía periférica (132) y que esta enfermedad está asociada a la exposición prolongada al Cadmio en los trabajadores que producen baterías de Cd/Zn. Algunos sugieren que el Cadmio altera la barrera hematoencefálica (BHE) y reduce los niveles del Cu/Zn superóxido-dismutasa.

Por otra parte, altos niveles de metalotioneína (MT), señal de exposición a los metales pesados (25), se encuentran comúnmente en los cerebros de pacientes fallecidos por ELA. De la misma manera que para la EM, hay evidencias en algunos trabajos científicos acerca del posible papel del humo de los cigarrillos (y tal vez de la presencia de cadmio), como factor de riesgo de la ELA. No obstante estos datos no han sido confirmados.

Concentraciones altas de cadmio y zinc, han sido observadas, usando espectrofotometría de masa, en cerebros de individuos con involución senil cerebral (SICC) y con AD. Al igual que para la EM, el Zinc se reduce significativamente en los pacientes con AD. Los niveles de cadmio tienen una correlación inversa a la alteración neurofibrilar (presencia de “enredos” neurofibrilares) en tejido de sistema nervioso central (59 – 77 – 123).

Algunos estudios evidencian que en el líquido cerebroespinal (líquido cefalorraquídeo) de pacientes AD se hallan niveles reducidos de cadmio y aumentados niveles de cobre. La asociación de EM, ELA y AD con la presencia de metales pesados, y en particular con el cadmio, a nivel plasmático-licuoral, su papel fisiopatológico y las posibles medidas preventivas, están lejos de ser comprendidos. Hay pues una mayor exigencia de informaciones más amplias y detalladas en relación a estudios focalizados y, por tanto, debería ser prioritario investigar sobre regiones como Cerdeña que, siendo heterogénea desde un punto de vista ambiental, es homogénea y peculiar desde un punto de vista genético.

Debido a todos los hechos expuestos anteriormente, nos planteamos como un subproyecto dentro de esta línea de investigación, identificar los factores etiológicos y moduladores de la presencia de metales pesados, y en particular del cadmio, en las enfermedades ya descritas. En este sentido, el curso temporal y la severidad de las enfermedades serán analizados en el contexto de dos variables principales: la presencia del cadmio en los líquidos biológicos en relación al entorno y el fondo inmunológico y genético de la población sarda estudiada.

Es sabido que, mientras que AD y ELA mantienen un curso clínico temporalmente lineal, la EM presenta un curso imprevisible (reincidente, progresivo o ambos; de formas benignas a formas muy severas). Se puede especular que mientras que la acumulación de cadmio y otros metales pesados puede tener un efecto directo sobre la progresión clínica del AD y ELA, esta no influye en los aspectos de la actividad intermitente típica del EM. Sin embargo, el efecto asociado al cadmio si puede ser relacionado con

la progresión clínica del EM en sus componentes no-inflamatorios en "sensu stricto." (123 - 150).

Podemos adelantar algunos de los aspectos de esta nueva investigación.

En primer lugar, ya se ha empezado a efectuar estudios de población y estudios caso-control comparando las tasas de enfermedad en las diferentes áreas de estudio, rurales y urbanas, que difieren por background ambiental, socio-sanitario y genético. Dado que se ha afirmado que el Cadmio posee parecidos efectos a los desarrollados por los estrógenos en los tejidos corpóreos (76) y, siendo los estrógenos variablemente asociados con AD (efectos protectores) y con la EM (efectos dañinos), pensamos que el estudio presenta y puede aportar muchos datos relevantes. El área de estudio incluye el Norte de Cerdeña con una población de unos 454.000 habitantes. El flujo migratorio es moderado, sobre todo desde otras zonas de la isla, y la composición étnica del área es estable estando compuesta en gran parte por nativos.

En segundo lugar, y para garantizar la uniformidad de la comprobación neurológica, se ha decidido basarse en criterios diagnósticos universalmente aceptados.

\*La EM viene definida en base a los criterios de McDonald basados en la historia clínica, examen clínico, MRI y análisis de líquido cefalorraquídeo.

\*Para el diagnóstico de la AD, aunque los pacientes sean considerados probablemente afectados por AD, se están utilizando las líneas guía NINCDS-ADRDA Work Group.

\*La ELA es un síndrome peculiar que afecta a la primera y la segunda neurona de la vía motora. No existen pruebas hemáticas específicas, y el diagnóstico se basa en la historia, el examen clínico y las pruebas neurofisiológicas, o sea los criterios diagnósticos modificados de El Escorial.

En tercer lugar, ha sido preparado "ad hoc" un protocolo para rellenar por cada sujeto junto a la extracción de material biológico, sangre total,

plasma y, cuando es posible, líquido cerebroespinal. El protocolo incluye los siguientes cuestionarios:

- cuestionario abreviado para informaciones genealógicas, geográficas, sociales y laborales del donante.

- cuestionario dedicado a la individuación de casos múltiples por las enfermedades de interés en la misma familia

- módulo de consentimiento informado del donante.

En cuarto y último lugar, una vez conseguido el consentimiento se efectúa la extracción (unos 30 ml por donante) con material certificado para evitar contaminaciones por metales y guardado con EDTA, el plasma será filtrado para evitar contaminaciones celulares y los linfomonocitos separados por un gradiente de Ficoll. La mitad de los linfomonocitos será utilizada para extracción del ADN y la otra guardada en nitrógeno líquido para eventuales pruebas funcionales. Las alícuotas de ADN, sangre total y plasma serán conservadas en congelador a -80° hasta el momento del análisis.

Se han planeado los siguientes estudios: 1) caso-control, comparación entre individuos enfermos y sanos con respecto a la exposición al cadmio y a la presencia de este metal en la población de referencia en distintas situaciones geográficas; 2) estudio de seguimiento, es decir muestras de población aún no afectada pero seleccionada en base a su exposición al cadmio; 3) estudios ecológicos a través de la comparación de las diferentes tasas de enfermedades en áreas distintas (rurales, urbanas, etc.) del Norte de Cerdeña.

Actualmente, junto a la recolección de las muestras, se está empezando a analizar, a través de la espectrofotometría de absorción atómica, la concentración del cadmio en la sangre total, en el plasma, en las células mononucleadas periféricas y, si es posible, en el líquido cerebroespinal. Los datos serán comparados con los resultados que llegarán de un estudio representativo sobre la población general del Norte de Cerdeña. Las posibles diferencias serán analizadas para la significatividad estadística.

Además, se está empezando a estudiar en laboratorio el plasma, las células mononucleadas periféricas y las muestras de líquido cefalorraquídeo en relación a variables biológicas correlacionadas con la presencia del Cadmio. En la gama de pruebas disponibles, se han elegido, aquellos con la correlación más evidente con las enfermedades neurológicas objeto de estudio:

- Apoptosis (24 - 34 - 88 - 91 - 92 - 93 - 125).
- Citoquinas y receptores (IFN $\gamma$ , Tn- $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, IL-1, -2, -4, -6, -10)
- Niveles de estrógenos y otras hormonas esteroideas (56).
- Metaloproteínas y sus inhibidores (MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2) (16 – 78 - 112 ).



## *VI. CONCLUSIONES*



1. El cadmio induce drásticas modificaciones en la morfología celular de los fibroblastos normales (FG) y neoplásicos (SGS/3A). Dichas modificaciones son graduales, evolucionando desde la morfología fusiforme normal hacia formas irregulares, estrelladas, con marcadas prolongaciones citoplasmáticas y en último termino hacia una morfología globosa.
2. La acción del cadmio sobre la morfología de los fibroblastos normales y neoplásicos es dependiente del tiempo de exposición. Se inician en primera hora de la incubación y alcanzan su máxima expresión a las 24 horas.
3. El cadmio induce una desestructuración del citoesqueleto tanto en fibroblastos normales como neoplásicos, afectando a la organización de los filamentos de actina, tubulina y vimentina.
4. Los filamentos de actina son las estructuras del citoesqueleto celular que sufre la mayor y más temprana desestructuración por la acción del cadmio. Su progresiva desaparición se produce en ambas líneas celulares si bien, esta se produce más tardíamente y de forma más marcada en las células SGS/3A.
5. Los cambios inducidos por el cadmio en la organización de la tubulina son menores que los de la actina, aparecen más tardíamente (sólo a partir de las 8 horas de exposición) y se producen preferentemente en los fibroblastos neoplásicos.
6. La vimentina es, sin duda, la proteína que menos modificaciones sufre por la acción del cadmio en ambas líneas celulares, manteniendo hasta cierto punto su morfología incluso después del periodo más largo de exposición (24 horas).

7. La media de los valores de cadmio en sangre de la población sarda del Norte de Cerdeña fue de 0.355  $\mu\text{g/l}$ , siendo menor que la detectada en otras regiones italianas y en otros países europeos.
8. Los valores de cadmio en sangre en la población analizada presenta una relación estadísticamente significativa con el hábito de fumar y con el lugar de residencia. Sin embargo no se correlacionan ni con la edad ni con el sexo.
9. El cadmio administrado por vía intracerebroventricular provoca un aumento de la presión arterial en ratas. Este aumento fue significativamente mayor en la cepa NKR con baja excreción de calicreína, que en la cepa NKR usada como control y con excreción normal de calicreína.
10. La acción del cadmio administrado por vía intracerebroventricular sobre la presión arterial sugiere que este metal pesado puede interferir, a través de un mecanismo central, sobre la funcionalidad cardiovascular.

## *VII. BIBLIOGRAFÍA*



1. A.A.V.V.: Review of environmental contamination a toxicology. Vol. 154 Springer, New York. USA, 1998
2. Achanzar W., Diwan B.A., Salmann J.L., Waalkes M. P.: Cadmium induced malignant transformation of human prostate cells. *Cancer Research*, 61, 554-558, 2001.
3. Alessio L., Apostoli P., Ferioli A.: Identification of reference values for metals in general population groups. *Toxicol. Environ. Chem.*, 27, 39-48, 1990.
4. Alessio L., Apostoli, P., Forni, A., Toffoletto, F.: Biological monitoring of cadmium exposure - an italian experience. *Scand. J. Work Env. & Health*, 1, 27-33, 1993.
5. Alessio L., Apostoli P., Braga M., Duca P.G., Herber R.F.M., Nordberg G., Versterberger O.: Estimation of pooled reference values for cadmium in blood using meta-analysis and TRACY criteria. *Sci. Total Environ.*, 152, 169-177, 1994.
6. Alexander L., Meltzer H.M.: Selenium in: Oskarsson A. Editor, Risk Evaluation of essential trace elements. Essential versus Toxis Level of Intake. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, 1995.
7. Alimonti A., Petrucci F., Laurenti F., Popoff P., Caroli S.: Reference values for selected trace elements in serum of term newborns from the urban area of Rome. *Clin. Chim. Acta*, 292, 163-173, 2000.
8. Arena N., Alia E.E., Demontis M. P., Fattaccio M.C., Madeddu R., Deiana L.: Metodica alternativa per il monitoraggio ambientale dell'assunzione di metalli pesanti in sistemi biologici animale e vegetali. *Bioch. Clin. Suppl.*, 3/12, Vol. 17, 16-7, 1993.

9. Arena N., Madeddu R., Marchal J.A., Prados J., Melguizo C., Aranega A.: Perinuclear chromatin regions are elective sites for Cadmium in tissue and in vitro cells. *Eur. Micr. Analysis*, 5, 5-7, 1997.
10. Azara A.: Monitoraggio di metalli pesanti nelle acque costiere della Sardegna settentrionale mediante utilizzo di indicatori biologici. Univ. Degli Studi di Sassari II, Conf. Nazionale, Sassari, Maggio 2002.
11. Bagchi D. Bagchi M., Hassoun E.A., Stohs S.J.: Cadmium induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion and hepatic lipid peroxidation in Sprague-dawley rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, 52: 143-54, 1996.
12. Barany E., Bergdahl I.A., Bratteby L.E., Lundh T., Samuelson G., Skerfving S., Oskarsson A.: Iron status influences trace element level in human blood and serum. *Environ. Res.*, 98, 215-23, 2005.
13. Bàràny E., Bergdahl I.A., Bratteby L.E., Lundh , Samuelson G., SchütZ A., Skerfving S., Oskarsson A.: Trace elements levels and correlations in whole blood and serum from Swedish adolescent. *Sci. Tot. Environ.*, 286, 129-141, 2002.
14. Bàràny E., Bergdahl I.A., SchütZ A., S. Skerfving S., Oskarsson A.: Inductively coupled plasma mass spectrometry for direct multi-element analysis of diluted human blood and serum. *J. Anal. At. Spectron.*, 12, 1005-1009, 1997.
15. Bar-Sela S., Reingold S., Richter E.D.: Amyotrophic lateral sclerosis in a battery-factory worker exposed to cadmium. *Int. J. Occup. Environ. Health*, 7, 109, 2001.
16. Basun H., Forssell L.G., Wetterberg L., Winblad B.: Metals and trace elements in plasma and cerebrospinal fluid in normal aging and Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm. Parc. Dis.*, 3, 231, 1991.

17. Basun H., Lind B., Nordberg M., Nordstrom M., Bjorksten k.S., Winblad B.: Cadmium in blood in Alzheimer's disease and non-demented subjects. *Biometals*, 7, 130, 1994.
18. Bencko V., Cikrt I.V.L., Lener J.: Toxic Metal in the living and working environment. Grada/Avicenum, Praha, 1995.
19. Benedetti J.L., Dewailly E., Turcotte F., Lefebvre M.: Unusually high blood cadmium associated with cigarette smoking among three subgroups of the general population. Quebec. Canada. *Sci. Total Environ.*, 152, 161-167, 1994.
20. Benes S., Spevackova V., Smid J., Cerna M., Marecek J.: The concentration levels of Cd, Pb, Hg, Cu, Zn and Se in blood of the population in relation to the Czech Republic. *Cent. Eur. J. Publ. Health*, 8 (2), 11-119, 2000.
21. Bernard A., Roels H., Buchet J.P., Cardenas A., Lauwerys R.: Cadmium and health: the Belgian experience. In IARC Scientific Publications, 118, 115-33, 1992.
22. Bernard A.: Renal dysfunction induced by Cadmium: biomarkers of critical effects. *Biometals*, 17, 519, 2004.
23. Berry T.D., Hasstedt S.J., Hunt S.C., Wu L.L., Smith J.B., Asli K.O.: A gene for high kallikrein may protect against hypertension in Utah kindreds. *Hypertension*, 13, 3-8, 1989.
24. Boulaiz H., Prados J., Melguizo C., Garcia A.M., Marchal J.A., Ramos J.L., Carrillo E., Aranega A.: Inhibition of growth and induction of apoptosis in human breast cancer by transfection of gef gene. *Br. J. Cancer*, 89, 192-198, 2003.

25. Breen J. G., Nelson E., Miller N.K.: Cellular adaptation to chronic cadmium exposure: intracellular localization of metallothionein protein in human trophoblast cells. *Teratology*, 51, 266-72, 1995.
26. Brockhaus A., Freier I., Ewers U., Jermann E., Dolgner R.: Levels of cadmium and lead in blood in relation to smoking, sex, occupation, and other factors in an adult population of FRG. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 52, 167-175, 1983.
27. Brozoka M.M., Moniuszko-Jakoniuk J: Interaction between cadmium and zinc in organism. *Food Clin. Tox.*, 39, 967-980, 2001.
28. Broska M.M., Moniuszko Jakoniuk J.: The influence of calcium content in diet on cumulation and toxicity of cadmium in the organism. *Arch. Toxicol.*, 72, 62-73, 1998.
29. Buchet J.P., Lauwerys R., Roels H.: Renal effects of cadmium body burden of the general population. *Lancet*, 336, 699-702, 1990.
30. Bush P.G., Mayhew T.M., Abramovich D.R., Agget P.J., Burke M.D., Page K.R.: A quantitative study on the effects of maternal smoking on placental morphology and cadmium concentration. *Placenta*, 21, 247- 256, 2000.
31. Carlsson L., Lundholm L.D.: Characterization of the effects of cadmium on the release of calcium and on the activity of some enzymes from neonatal mouse calvaria in culture, *Comp. Biochem. Phisyol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 115, 251-256, 1996.
32. Carrol R.E.: The relationship of cadmium in the air to cardiovascular disease death rates. *Jama*, 198, 177 -182, 1966.

33. Castaldi M.R., Calzaferri G., Odone P., Dell'Orto A., Zocchetti C., Alessio L.: Behaviour of cadmium biological indicators in subjects living in the Milan area. *Med. Lav.*, 74, 442-452, 1983.
34. Chadderton A., Villeneuve D.J., Gluck S., Kirwan-Rhule A.F., Gannon BR., Blais D.E., Parissenti A.M.: Role of specific apoptotic pathways in the restoration of paclitaxel-induced apoptosis by valsopodar in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells". *Breast Cancer Res. Treat.*, 59, 231-244, 2000.
35. Cerna M., Spevackova V., Cejchanova M., Benes B., Rossner P., Bavorova H., Ocadlikova D., Smid J., Kubinova R.: Population based monitoring in the Czech Republic - the system and selected results. *Sci. Total Environ.*, 204, 263-270, 1997.
36. Cerny E.A., Bhattacharyya M.I.L.: Low-volume high-sensitivity assay for cadmium in blood and urine using conventional atomic absorption spectrophotometry. *Anal. Biochem.*, 314, 180-93, 2003.
37. Cornelis R., Sabbioni E., Van der Venne M.T.: Trace elements reference values in tissues from inhabitants of European Community. *Sci. Total Environ.*, 158, 191-196, 1994.
38. Coyle Y.M.: The effect of environment on breast cancer risk. *Breast Cancer Res. Treat.*, 84, 273-88, 2004
39. Dalledonne I., Milzani a., Colombo R.: Actin assembly by cadmium ions, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1357, 5-17, 1997.
40. De Burbure C., Buchet J.P., Bernard A., Leroyer A., Nisse C., Haguenoer J.M., Bergamaschi I., Mutti A.: Biomarkers of renal effects in children and adults with low environmental exposure to heavy metals. *J. Toxicol. Environ. Health*, 66, 783-98, 2003.

- 
41. Dell'Omo M., Muzi G., Piccinini R., Gambelunghe A., Morucci P., Abritti G.: Blood Cadmium concentration in the general population of Umbria, Central Italy. *Sc. Total. Env.*, 226, 56-74, 1999.
42. Dohi Y., Sugimoto K., Yoshikawa T., Ohgushi H., Katsuda T., Tabata S., Moriyama T.: Effect of cadmium on osteogenesis within diffusion chambers by bone marrow cells: biochemical evidence of decreased bone formation capacity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 120, 274-280, 1993.
43. Dominguez J.F., Marchal J.A., Correa A., Carrillo E., Boulaiz H., Aranega A., Gallo M., Espinosa A.: Synthesis and evaluation of new 5-FU antitumour cell differentiating derivatives. *Biorg. Med. Chem.*, 11, 315-323, 2003.
44. Eaker S.S., Hawles T.S., Ramezani A., Hawley RG.: Detection and enrichment of hematopoietic stem cells by side population phenotype. *Methods. Mol. Biol.*, 263, 161-180, 2004.
45. Elinder C.G., Kjellstrom T., Lind B., Linnman L., Piscator M., Sundstedt K.: Cadmium exposure from smoking cigarettes: variations with time and country where purchased. *Environ. Res.*, 32, 220-227, 1983.
46. Elliott A.H., Nuzum F.R.: The urinary excretion of a depressor substance (Kallikrein of Frey and Kraut) in arterial hypertension. *Endocrinology*, 18, 462-74, 1934.
47. Erzen I., Zaletel-Kragelj L.: Exposure assessment of male recruits in Slovenia to cadmium and lead due to biological monitoring. *J. Expo Anal. Environ. Epidemiol.*, 14, 385-390, 2004.
48. Erzen I., Zaletel-Kragelj L.: Cadmium measurements in blood and hair of occupationally non-exposed military recruits and in the food of plants origin produced in Slovenia. *Croat. Med. J.*, 44, 538-44, 2003.

- 
49. Fisher A.B., Georgieva R., Nikolova V., Halkova J., Bainova V., Hristeva V., Penkov D., Alandjisk D.: Health risk for children from lead and cadmium near a non-ferrous smelter in Bulgaria. *Int. J. Hyg. Environ Health*, 20, 25-38, 2003.
50. Frery N., Nessmann C., Girard F., Lafond J., Moreau T., Blot P., Lellouch J., Huel G.: Environmental exposure to cadmium and human birthweight. *Toxicology*, 79, 109-180, 1993.
51. Friberg L.: Cadmium in the environment. C.R.C. Press., 1971.
52. Friberg L.: Cadmium in the environment. II Ed. C.R.C. Press., 1974
53. Friberg L.: Handbook on the toxicology of metals. Elsevier, 1979.
54. Friberg L., Vahter M.: Assessment of exposure to lead and cadmium through biological monitoring: results of a UNEP/WHO global study. *Environ. Res.*, 30, 95-128, 1983.
55. Gachot B., Poujeol P.: Effects of cadmium and copper on zinc transport kinetics by isolated renal proximal cells. *Biol. Trace Elem. Res.*, 35, 93-103, 1992.
56. Garcia-Morales P., Saceda M., Kenney N., Kim N., Salomon D.S., Gottardis M.M., Solomon H.B., Sholler P.F., Martin M.B.: Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 269, 16896-16901, 1994.
57. Gaspa L., Madeddu R., Arena N., Alia F.A., Fighetti M.A., Alia E.E.: Osservazioni quantitative e qualitative di metalli mediante l'uso di un nuovo microscopio elettronico". IX Congr. Soc. It. Biof. Pure e Appl., 109-111, 1991.

58. Glauser S.C., Bello C.T., Glauser E.M.: Blood cadmium levels in normotensive and untreated hypertensive humans. *Clin. Exp. Lancet*, 7, 17-18, 1976.
59. Greenlee R.T., Murray T., Bolden S., Wingo P.A.: Cancer statistics, 2000. *Cancer J. Clin.*, 50, 7-33, 2000.
60. Goering P.L.: WMKC: Toxicology of cadmium. *Toxicology of metal*. 189- 217, 1995.
61. Gomez-Mendikute A., Cajaraville M.P.: Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzopirene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussels haemocytes. *Toxicol in vitro*, 17, 539-46, 2003.
62. Gunn S. A.: Cadmium induced interstitial cell tumours in rats and mice and their prevention by zinc. *J. Nat. Cancer. Inst.*, 31, 745, 1973.
63. Haga A., Nagase H., Hito H., Sato T.: Enhanced invasiveness of tumours cells after host exposure to heavy metals. *Eur. J. Cancer*, 324, 2342-2347, 1996.
64. Hagman U., Bruce A., Persson L.E., Samuelson, G. Sjölin S.: Food habits and nutrient intake in childhood in relation to health and socio-economics conditions. *Acta Paediatr. Scan.*, 75, 1-56, 1986.
65. Hasau M.Y., Kosanovic P., Fabim M.A., Adem A., Petroianu G.: Trace metal profiles in hair samples from children in urban and rural regions of the United Arab Emirates. *Vet. Hum. Toxicol.*, 46: 119-21, 2004.
66. Hellstrom L., Jarup L., Persson B., Axelson O.: Using environmental concentrations of cadmium and lead to assess human exposure d dose. *J. Expo Anal. Environ. Epidem.*, 14, 416-23, 2004.

67. Herber R.F.M., Christensen J.M., Sabbioni E.: Critical evaluation and review of cadmium concentrations in blood for use in occupational health according to the TRACY protocol. *Int. Occup. Environ. Health*, 69, 372-378, 1997.
68. Hew K.W., Heat G.L., Jiwa A.H., Welsh M.J.: Cadmium in vivo causes disruption of tight junction associated microfilaments in rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.*, 49: 840-849, 1993.
69. Horigacki H., Oguma E., Sasaki S., Miyamoto K., Ikeda Y., Machida M., Kayama F.: Dietary exposure to cadmium at close to the current provisional tolerable weekly intake does not affect renal function among female Japanese farmers". *Environ. Res.*, 95: 20-31, 2004.
70. IARC, International agency for research on cancer, Vol. 2 Francia, 1986.
71. Ikeda M., Zhang Z.W., Moon C.S., Imai T., Watanabe Y., Guo Y.L.: Background exposure of general population to cadmium and lead in Taiwan city, Taiwan. *Arc. Environ. Contam. Toxicol.*, 30, 121-126, 1996.
72. Ikeda M., Zhang Z.W., Shimbo S., Watanabe T., Nakatsuka H., Higashikawa K.: Urban population exposure to lead and cadmium in east and south - east Asia. *Sci. Total Env.*, 249, 373-384, 2000.
73. Jarup L., Alfven T.: Low level Cadmium exposure, renal and bone effects – the Oscar study. *Biometals*, 17, 505-509, 2004.
74. Jarup L.: Cadmium overload and toxicity. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 17 (Suppl 2), 35-39, 2002.
75. Jarup L., Alfven T., Persson B., Toss G., Elinder C.G.: Cadmium may be a risk factor for osteoporosis. *Occup. Environ. Med.*, 55: 435-439, 1998.

- 
76. Johnson M.D., Kenney N., Stoica A., Hilakivi-Clarke L., Singh B., Chepko G., Clarke R., Sholler P.F., Lirio A.A., Foss C., Reiter R., Trock B., Paik S., Martin M.B.: Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat. Med.*, 9, 1081-1084, 2003.
77. Kajikawa K., Nakanishi I., Kuroda K.: Morphological changes of the kidney and bone of rats in chronic cadmium poisoning. *Exp. Mol. Pathol.*, 34, 9-24, 1981.
78. Kamel F., et al. Umbach D.M., Munsat T.L., Shefner J.M., Dandler D.P.: Association of cigarette smoking with ALS. *Neuroepidemiology*, 18, 194, 1999.
79. Kazantis G.: Cadmium osteoporosis and calcium metabolism. *Biometals* 17: 493-498, 2004.
80. Kido T.: Progress of renal dysfunction in inhabitants environmentally exposed to cadmium. *Arch. Environ. Health.*, 43, 213-220, 1988.
81. Koyama H., Kitoh H., Tohyama C.: Low dose exposure to cadmium. Its health effects. Genotoxicity and carcinogenicity. *Nippon Eis. Zass.*, 57, 547-555, 2002.
82. Kozuka H.: Interactive exhibition of heavy metal toxicity in bone metabolism. 115, 157-169, 1995.
83. Kuliezkowski W., Jolda-Mydlowaska B., Kobusiak M., Antonowicz J.: Effect of heavy metal ions on function of vascular endothelium in patients with ischemic heart disease. *Pol. Arch. Med. Wezn.*, 111: 679-685, 2004.
84. L'Azou L., Henge-Napoli M.H., Minaro L., Mirto H., Barrouillet M.P., Cambar J.: Effects of cadmium and uranium on some in vitro renal targets. *Cell. Biol. Toxicol.*, 18, 329-340, 2002.

85. L'Azou B., Dubus I., Ohayon-Courtes C., Labouyrie J., Perez L., Pouvreau C., Juvet L., Cambar J.: Cadmium induces direct morphological changes in mesangial cell culture *Toxicology*, 179, 233-245, 2002.
86. Leffel E.K., Wolf C., Poklis A., White K.L.: Drinking water exposure to cadmium, an environmental contaminant, results in the exacerbation of autoimmune disease in the murine model. *Toxicology*, 188, 233-250, 2003.
87. Li W., Zhao Y., Chou I.N.: Alterations in cytoskeletal protein sulfhydryls and cellular glutathione in cultured cells exposed to cadmium and nickel ions. *Toxicology*, 77, 65-79, 1993.
88. Lundberg A.S., Weinberg R.A.: Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Cancer*, 35, 531-39, 1999.
89. Madeddu R., Alia E.E., Giola L.: A new method to verify the presence of Cadmium tissues. *Proc. Int. Cg. Med. Se. St.*, 1995.
90. Madeddu R., Galimi F., Todde C., Marchal J.A., Aranega A., Pirino A., Arena N.: Cadmium localization in cell cultures and tissues by electron energy loss spectroscopy. *Proc. 4<sup>th</sup> Multinational Congress on Electron Microscopy (Veszprem, Hungary)*, 239-240, 1999.
91. Marchal J.A.; Boulaiz H., Suarez I., Saniger E., Campos J., Carrillo E., Prados J., Gallo MA., Espinosa A., Aranega A.: Growth inhibition, g1-arrest, and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells by highly lipophilic 5-fluorouracil derivatives. *Invest. New Drugs*, 22, 379-384, 2004.
92. Marchal J.A., Melguizo C., Prados J., Aranega A.E., Gomez J.A., Campos J., Gallo M.A., Espinosa A., Arena N., Aranega A.: Modulation of myogenic differentiation in a human rhabdomyosarcoma cell line by a new derivate of a 5-fluorouracil. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 934-940, 2000.

93. Marchal J.A., Prados J., Melguizo C., Gomez J.A., Campos J., Gallo M.A., Espinosa A., Arena N., Aranega A.: A novel 5-fluorouracil acyclonucleoside prodrug for differentiation therapy in rhabdomyosarcoma cells. *Br. J. Cancer*, 79, 807-813, 1999.
94. Martin M.B., Voeller H.J., Gelmann E. P., Lu E.G., Stoica J., Hebert E.J., Reiter R., Singh A., Danielsen M., Pentecost M., Stoica A.: Role of cadmium in the regulation of AR Gene expression and activity. *Endocrinology*, 143, 263-275, 2002.
95. Matsuoka M., Iqisu H.: Cadmium induces phosphorylation of p53 at serine 15 in MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282, 1120-1125, 2001.
96. Melo T.M.: Manganese, copper and zinc in cerebrospinal fluid from patients with MS. *Biol. Trace Elem. Res.*, 93, 1, 2003.
97. Minoia C., Sabbioni E., Apostoli P., Pietra R., Bozzoli L., Gallorini M., Capodoglio E.: Trace elements reference values in tissues from inhabitants of the european community. A Study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *Sci. Total. Env.*, 95, 89-105, 1990.
98. Moreau T., Lellouch J., Juguet B., Festy B., Orssaud G., Claude J.R.: Blood cadmium levels in a general male population with special reference to smoking. *Arch. Environ. Health*, 38, 163-167, 1983.
99. Moreno M., Marin C., Vinagre F.: Trace elements in whole blood samples from residents of the city Badajoz, Spain. *Sc. Total. Env.*, 229, 209-215, 1999.
100. Moreno M., Marin C., Vinagre F.: "Trace elements in whole blood samples from residents of the city Badajoz, Spain". *Sc. Total. Env.* 229, 209-215, 1999.

101. Mortada W.I., Sobh M.A., El-Defrawy M.M.: The exposure to cadmium, lead and mercury from smoking and its impact on renal integrity. *Med. Sci. Monit. Cr.*, 10, 112-116, 2004.
102. Nagata C., Nagao Y., Shibuya C., Kashiky Y., Shimizu H.: Urinary cadmium and serum levels of estrogens and androgens in postmenopausal Japanese women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14, 705-708, 2005.
103. Navas-Acien A., Silbergeld E.K., Sharrett R., Calderon-Aranda I., Selvin E., Guallar E.: Metals in urine and peripheral arterial disease. *Environ. Health Perspect.*, 113: 164-169, 2005.
104. Navas-Acien A., Selvin F., Sharrett A.R., Calderon-Aranda E., Guallar E.: Lead, cadmium, smoking and increased risk of peripheral arterial disease. *Circulation* 109, 3196-3201, 2004.
105. Noel L., Guerin T., Kolf-Clauw M.: Subchronic dietary exposure of rats to cadmium alters the metabolism of metal essential to bone health. *Food Chem. Toxicol.*, 42: 1203-1210, 2004.
106. Nishijo M., Satarug S., Honda R., Tsuritani I., Aoshima K.: The gender differences in health effects of environmental cadmium exposure and potential mechanisms. *Mol. Cell Biochem.*, 255, 87-92, 2004.
107. Nordberg G.F.: Cadmium carcinogenesis and its relationship to other health effects in humans. *Scand. J. Work Environm. Health*, 19, 104-107, 1993.
108. Olsson I.M., Bensryd L., Lundh T., Ottosson I.L., Skerfving S., Oskarsson A.: Cadmium in blood and urine – impact of sex, age, dietary intake, iron status and former smoking-association of renal effects. *Environ. Health Perspect.*, 110, 1185-1190, 2002.

- 
109. Opalinska E., Michalak A., Stoma F., Latalski M., Goniewicz M.: Increasing level of prostate-specific antigen and prostate cancer risk factor among 193 men examined in screening procedure. *Ann. Univ. Mariae Curie Sklodowoska*, 58, 57-63, 2003.
110. Ordonez A., J. Loreda, E. DeMiguel, S. Charlesworth: "Distribution of heavy metals in the street dusts and soils of an industrial city in Northern Spain". *Arc. Env. Toxic.* 44 2, 160 - 170, 2003.
111. Oskarsson A., Widell A., Olsson IM., Grawe KP.: Cadmium in food chain and health effects in sensitive population groups. *Biometals*, 17, 531-534, 2004.
112. Panayi A.E., Apyrou A.E., Iversen B.S., White M.A. Part P.: Determination of cadmium and zinc in Alzheimer's brain tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Neurol. Sci.*, 195, 1-10, 2002.
113. Pant N., Upadhyay G., Pandev S., Mathur N., Saxens D.K., Srivatava S.P.: Lead and cadmium concentration in the seminal plasma of men in the general population: correlation with sperm quality". *Reprod. Toxicol.*, 17, 447-459, 2003.
114. Perry H.M., Erlanger M.W.: Sodium retention in rats with cadmium-induced hypertension. *Sci. Total Environ.*, 22, 31-34, 1981.
115. Perry H.M.: Effect of a second metal on cadmium induced hypertension. *Arch. Environ. Health*, 38, 80 -90, 1983.
116. Perry HM., Erlanger MW.: Elevated circulating renin activity in rats following doses of cadmium known to induce hypertension". *J. Lab. Clin. Med.*, 82, 399-404, 1973.

117. Piras M.R.: Alzheimer disease in Sardinian population: a neuropsychological and genetic study. *Arch. Gerontol. Geriatr., Suppl.* 6, 407, 1998.
118. Pirkle J.L., Kaufmann R.B., Brody D.J., Hickman T., Gunter E.W., Pascha D.C.: Exposure of the U.S. Population to lead, 1991 - 1994. *Environ. Health Perspect.*, 106, 745-750, 1998.
119. Pocock S.J., Delves H.T., Ashby D., Shaper A.G., Clayton B.E.: Blood cadmium concentrations in the general population of British middle-aged men. *Hum. Toxicol.*, 7, 95-103, 1988.
120. Prozialeck W.C., Niewenhuis R.L.: Cadmium disrupts intercellular junctions and actin filaments in LLC-PK1 cells. *Toxicol. Applied. Pharmacol.*, 107, 81-97, 1991.
121. Prozialeck W.C., et al.: Cadmium disrupts E-cadherin dependent cell-cell junctions in MDCK cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, 33, 516-26, 1997.
122. Puklova V., Batariova A., Cerna M., Kotlik B., Kratzer K., Melicherik J., Spevakova V.: Cadmium exposure pathways in the Czech urban population. *Cent. Eur. J. Public Health*, 13, 11-19, 2005.
123. Pugliatti M., Solinas G., Sotgiu S., Castiglia P., Rosati G.: Multiple esclerosis distribution in northern Sardinia. Spatial cluster analysis of prevalence. *Neurology*, 58, 277-282, 2002.
124. Puri V.N.: Cadmium induced hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.*, 21, 79-84, 1999.
125. Qin L.F., NG I.O. : Induction of apoptosis by cisplatin and its effect on cell cycle-related proteins and cell cycle changes in hepatoma cells. *Cancer Lett.*, 175, 27-38, 2002.

126. Richard A.C.: Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout *oncorhynchus mykiss*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 34, 377-81, 1998.
127. Roy S.S., Mukherjee S., Mukhopadhyay S., Das S.K.: Differential effect of cadmium on cholinephosphotransferase activity in normal and cancerous human mammary epithelial cell lines" *Mol. Cancer Ther.*, 3. 199204, 2004.
128. Rukgauer M., Klein J., Kruse-Jarrei J.D.: Reference values for trace elements Cd, Mn, Se and Zn in serum. *J. Trace Elements Med. Biol.*, 11, 92-97, 1997.
129. Rukgauer M., Klein J., Kruse-Jarres D.: Reference Values for the trace elements copper, manganese, selenium and zinc in the serum/plasma of children, adolescent and adults" *J. Trace Elements Med. Biol.*, 11, 92-98, 1997.
130. Rvdzewska A., Krol L., Lipinski L.: Concentration of cadmium in breast cancer tissue of women living in the Wielkopoiska region. *Przel Lek.* 61, 786-788, 2004.
131. Sabolic I., Herak-Kramberger C.M., Brown D.: Subchronic cadmium treatment affects the abundance and arrangement of cytoskeletal proteins in rat renal proximal tubule cells. *Toxicology*, 165, 205-216, 2001.
132. Sato K.: An ultrastructural study of chronic cadmium chloride induced neuropathy. *Acta Neuropathol.*, 15, 185, 1978.
133. Schwartz G.G., Ilvasova D., Ivanova D.: Urinary cadmium, impaired fasting glucose, and diabetes in the NHANES III. *Diabetes Care*, 26, 25-38, 2003.

134. Schuhmacher M., Domingo J.L., Corbella J.: Zinc and copper levels in serum and urine: Relationship to biological, habitual and environmental factors. *Sci. Tot. Environ.*, 148, 67-72, 1994.
135. Silleras M., Perz Garcia B., Mijan de la Torre A.: The zinc status in a selected Spanish population. A multivariate analysis. *Nutr. Hosp.*, 15, 32-41, 2000.
136. Singh K.P., Mohan D., Sinba S., Dalvani R.: Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health, agricultural and environmental quality in the wastewater disposal area. *Chemosphere*, 55, 227-255, 2004.
137. Sisman A.R., Bulbul M., Coker C., Onvural B.: Cadmium exposure in tobacco workers: possible renal effects". *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 17, 51-55, 2003.
138. Smedman M., Potempska A., Rubenstein R., Ju W., Ramakrisna N.: Effects of cadmium, copper and zinc and beta APP processing and turnover in COS-7 and PC12 cells. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 31, 13-28, 1997.
139. Spomenka T., et al.: Cadmium in the blood and seminal fluid of nonoccupationally exposed adult male subjects with regard to smoking habits. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 70, 243-248, 1997.
140. Stassen C., Laurwerys R.: Health effects of environmental exposure to cadmium in a population study. *J. Hum. Hypertens.*, 7, 195 -199, 1993.
141. Sutoo D., Akijama K.: Regulation of blood pressure with calcium-dependent dopamine synthesizing system in the brain and its related phenomena. *Brain Res. Rev.*, 25, 1-26, 1997,

142. Sutoo D., Akiyama K.: Effects of cadmium or magnesium on calcium-dependent central function that reduces blood pressure. *Arch. Toxicol.*, 74, 1-4, 2000.
143. Templeton D.M., Cherian G.M.: Cadmium and hypertension. *Trends Pharmacol. Sci.*, 4, 501-3, 1983.
144. Tetsuo H.: Apoptosis of human kidney 293 cells is promoted by polymerized cadmium-metallothionein. *Bioch. Biof. Res. Comm.*, 219, 829 - 834, 1996.
145. Tetsuo H.: Cythopatological changes induced by cadmium exposure in canine proximal tubular cells: a cytochemical and ultrastructural study. *Nephrom*, 68, 104 -111, 1994.
146. Trzeinka-Ochocka M., Jakubowski M., Razniewska G., Halatek T., Gazewski A.: The effects of environmental cadmium exposure on kidney function: the possible influence of age. *Environ. Res.*, 95: 143-150, 2004.
147. Tsukahara T., Ezaki T., Moriguchi J., Furiki K., Fukui Y., Ukai H., Okamoto S., Sakurai S., Ikeda M.: No significant effect of iron deficiency on cadmium body burden or kidney disfunction among women in the general population in Japan. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 76: 275-281, 2003.
148. Villaboa N.E., Garcia-Bermejo I., Perez C., DeBals E., Calle C., Aller P.: Heat-shock ad cadmium chloride increase the vimentin mRNA and protein levels in U-937 human promonocytic cells. *J. Cell. Sci.*, 110 (Pt 2) 201-207, 1997.
149. Vincetti M.: Lead cadmium and selenium in the blood of patients with sporadic ALS. *Ital. J. Neurol. Sci.*, 18, 87, 1997.
150. Waalkes M.P.: Cadmium Carcinogenesis. *Mut. Res.*, 533, 107-120, 2003.

151. Watanabe T., Fujita H., Koizumi A., Chiba K., Miyasaka M., Ikeda M.: Dietary cadmium intake of farmers in non-polluted areas in Japan and the relation with blood cadmium. *Environ. Res.*, 37, 33-43, 1985.
152. Watanabe T., Qu J.B., Jin C.: Blood cadmium levels in the populations of 3 chinese cities. *Toxicol. Lett.*, 47, 145-153, 1989.
153. Watanabe T., Nakatsika H., Shimbo S.: Reduced cadmium and lead burden in Japan in the past 10 years. *Int. Occup. Environ. Health*, 68, 305-314, 1996.
154. Weinshenker B.G.: Database in MS research. *Mult. Scler.*, 5, 206, 1999.
155. White M.A., Sabbioni E.: Trace Elements reference in tissues from inhabitants of the European Union. A Study in blood and urine of a United Kingdom population. *Sci. Total Env.*, 216, 253-270, 1999.
156. Wilhelm M., Ewers U., Schulz C.: Revised and new reference values for some trace elements in blood and urine for human biomonitoring in environmental medicine. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 207, 69-73, 2004.
157. Zhang ZW., Moon CS. Watanabe T.: Background exposure of urban population to lead and cadmium comparison between China and Japan. *Int. Arch. Environ. Health*, 69, 273-281, 1997.
158. Zeng X., Jin T., Buchet JP., Jiang X., Kong Q., Bernard A., Nordeberg G.H.: Impact of Cadmium exposure on male sex hormones: a population-based study in China. *Environ. Res.*, 96, 338-44, 2004.
159. Zeng X., Jin T., Jiang X., Nordeberg G.F.: Effects on the prostate of environmental cadmium exposure-a cross sectional population study in China. *Sci. Total Environ.*, 23, 34-43, 1998.

