

**ACUMULACIÓN Y EFECTO DEL CADMIO SOBRE
LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES
HUMANAS (CMN) EN CULTIVO**

GEOVANNY FINOL¹, MARÍA DEL PILAR BRACHO², MERY BELL MALDONADO³,
LETTY MARCANO^{2,*} Y NEREYDA VALERO³

¹*Facultad de Veterinaria,*

²*Facultad Experimental de Ciencias*

³*Facultad de Medicina,*

*Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo,
Estado Zulia, Venezuela*

**Autor de correspondencia: letty_marcano@hotmail.com,
lettymarcano@cantv.net*

Resumen. Se evaluó la capacidad de acumulación de cadmio y su efecto sobre la proliferación celular de células mononucleares humanas (CMN). Se realizaron cultivos celulares *in vitro* de CMN de sangre periférica humana de individuos sanos voluntarios sometidos a diferentes concentraciones con el metal en presencia o ausencia del mitógeno. La viabilidad celular se determinó por la técnica de exclusión del colorante azul tripán; la proliferación cuantificando la incorporación de timidina marcada con tritio (³H-TdR) y la acumulación a través de la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica por Llama (FAAS). Los resultados revelaron una inhibición de la viabilidad y proliferación ejercida por el metal, correlacionada con la acumulación en los cultivos de CMN expuestos, en presencia y ausencia de mitógenos. Se concluye que el metal se acumula en las CMN ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular. *Recibido: 30 marzo 2007, aceptado: 31 enero 2008.*

Palabras clave. Cadmio, citotoxicidad, acumulación, linfoproliferación, células mononucleares humanas.

**ACCUMULATION AND EFFECT OF CADMIUM ON PROLIFERATION
OF HUMAN MONONUCLEAR CELLS (MNC) IN CULTURES**

Abstract. We studied the accumulation capacity and effect of cadmium on cellular proliferation of human mononuclear cells (MNC). The MNC were obtained from human peripheral blood, from healthy volunteers. *In vitro* Cultures were subjected to different concentrations of the metal in

presence or absence of a mitogen. Cellular viability was determined by the exclusion technique using trypan blue colorant. Proliferation was quantified by incorporation of tritiated thymidine (^3H -TdR), and accumulation was determined by Atomic Absorption Spectrometry (FAAS). The results revealed that cell viability and proliferation were inhibited by cadmium, and was correlated with accumulation of the metal in the exposed MNC cultures, in both presence and absence of the mitogen. Cadmium accumulates in MNC, exercising an immunotoxic effect on cell proliferation. *Received: 30 March 2007, accepted: 31 January 2008.*

Key words. Cadmium, cytotoxicity, accumulation, lymphoproliferation, human mononuclear cells.

INTRODUCCIÓN

El cadmio es un metal pesado de gran interés toxicológico, debido a la gran variedad de sus usos en la fabricación de contenedores de alimentos, alambiques, baterías, pinturas, cueros, aleaciones, y otros (USEPA 2001). Es fácilmente absorbido por las células, causando un bajo nivel de excreción, largo proceso de desactivación biológica y alto poder de acumulación por parte de los organismos. Se considera de gran riesgo para la salud desde el punto de vista ocupacional y ambiental (Goering *et al.* 1995).

El principal efecto del metal en el metabolismo celular lo realiza al unirse a los grupos tiol en sustitución del zinc, causando cambios estructurales en las proteínas que afectan varios procesos celulares, incluyendo el metabolismo energético y la síntesis de biomoléculas (Crouse *et al.* 2000, Potts *et al.* 2003). El cadmio inhibe los procesos de reparación del ADN (Asmuss *et al.* 2000), asimismo se ha descrito la activación por el metal de las proteínas quinasas mitogénicas (Ding y Templeton 2000) y como un antagonista del calcio, interfiriendo en los procesos dependientes de este ión (Carageorgiou *et al.* 2004). También se han dado reportes del efecto del metal sobre la respuesta inmunitaria (Borella y Bargellini 1993, Goering *et al.* 1995); así como de la capacidad de acumulación e inhibición del crecimiento en diversos cultivos celulares (Nordberg 2004, Taiyi *et al.* 2004).

Fundamentado en los reportes del efecto del cadmio sobre la respuesta inmunitaria y en los estudios relacionados con la bioacumulación e inhibición del crecimiento inducidos por el metal en cultivos celulares, en el presente trabajo se determina la acumulación del cadmio y su efecto sobre la

proliferación de células mononucleares humanas (CMN) en cultivos, a diferentes concentraciones y tiempo de exposición.

MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE

Se tomaron 20 mL de sangre periférica de 10 individuos sanos voluntarios a través de la punción de la vena basilica media, utilizando un sistema de tubos marca vacutainer con anticoagulante (50 μ /mL de heparina sódica). El aislamiento de las células mononucleares (CMN) se realizó por centrifugación en gradiente de densidad, centrifugando la sangre por 10 min a 200 xg, separando el plasma y reconstituyéndolo con PBS y colocándolo sobre 5 mL de Ficoll-Hypaque (densidad 1,077 g/cm³). Posteriormente, se centrifugó a 200 xg por 30 min, obteniéndose la capa de CMN en la interfase, la cual fue extraída, lavada con PBS y colocada en medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 5% (Boyüm 1968).

ENSAYOS DE VIABILIDAD

La viabilidad celular se determinó utilizando la técnica de exclusión del colorante azul tripán al 0,4%, ajustando las células viables a una concentración de 1×10^6 células/mL por dilución con medio de cultivo. La suspensión celular se sembró en placas de 96 pozos de fondo cóncavo, en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de cadmio en solución acuosa (15 y 20 ppm) e incubadas a 37 °C y atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24, 48 y 72 h. Para cada tiempo y concentración se realizó un control, donde la solución de cadmio fue sustituida por medio de cultivo. Al término de cada período de incubación, se determinó el porcentaje de células viables por la técnica de exclusión referida.

EFFECTO DEL CADMIO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Se estudió el efecto del cadmio sobre la proliferación de células mononucleares estimuladas con mitógeno, utilizando la incorporación de timidina marcada con tritio (³H-Timidina). La suspensión celular (100 μ L), ajustada a 1×10^6 células/mL, se cultivó por triplicado en placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano (Falcon 3072, Beckton Dickinson) en presencia del mitógenos PHA (Sigma Chemical Co) y 15 ó 20 ppm de Cd⁺² por 72 h.

Los controles estuvieron representados por cultivos sin mitógenos y sin metal mantenidos en las mismas condiciones experimentales. Posteriormente, se agregó 0,6 mCi de ^3H -TdR (NENTM Boston, USA) y se incubaron por 6 h más. Al finalizar, las células se recolectaron en filtros de fibra de vidrio utilizando un recolector de muestras múltiples (Combi Cell Harvester – 11025MAN 00D. Skatron Inst.), lavando con agua destilada para lisar las células. Los filtros se colocaron en viales con líquido de centelleo y la timidina incorporada se cuantificó en un contador beta de centelleo (1217 RACK BETA Liquid Scintillation Counter LKB Wallac) registrándose en cuentas por minuto (cpm).

DETERMINACIÓN DE LA ACUMULACIÓN

La acumulación del metal se determinó en un Espectrómetro de Absorción Atómica de Llama (FAAS), en un equipo Perkin Elmer (Modelo: 3100 Ohio, USA), equipado con lámparas de cátodo hueco. Previo a la cuantificación del metal, para cada tiempo y concentración las muestras se deshidrataron en un liofilizador (Labconco model LYPH-LOCK) a $-46\text{ }^{\circ}\text{C}$ y presión de 3400×10^{-3} mbar. Posteriormente, el material fue digerido con ácido nítrico concentrado. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados expresados en $\mu\text{g/L}$ de muestra. La cuantificación del cadmio se realizó a una longitud de onda de 228,8 nm y amplitud espectral 0,7 nm (Bodenseewerk 1984).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de correlación simple para determinar la relación entre el tiempo de exposición, la concentración y los diferentes parámetros evaluados: viabilidad, proliferación y acumulación del metal. Asimismo, se realizó la prueba de Duncan para establecer comparaciones de medias entre los valores obtenidos experimentalmente y los controles, estableciendo un nivel de significancia de $P < 0,05$.

RESULTADOS

EFFECTO DEL CADMIO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

El porcentaje de células viables disminuyó proporcionalmente con el aumento de la concentración y el tiempo de exposición (Fig. 1). A partir de las 48 h de exposición el comportamiento fue similar para las dos concentraciones, no observándose diferencias significativas a 72 h, por lo que

por conveniencia, se tomó el tiempo de 72 h para la realización de todos los ensayos posteriores.

La Tabla 1 muestra la correlación existente entre la viabilidad celular y el tiempo a las diferentes concentraciones. Se observa una disminución paulatina

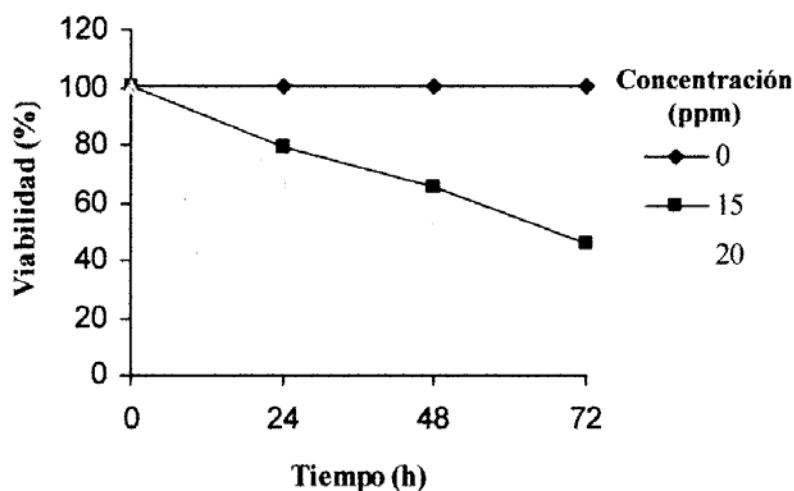


Figura 1. Porcentaje de viabilidad de células mononucleadas (CMN) en cultivos expuestos a diferentes tiempos y concentración con cadmio.

del coeficiente de correlación (r) a medida que aumenta la concentración, esto explica que al someter las células a diferentes concentraciones de cadmio, la viabilidad se ve afectada a diferentes proporciones. Se presentó una correlación negativa significativa entre la viabilidad celular con respecto al tiempo, en las células sin tratamiento ($r = -0,9739$, $P < 0,05$); el coeficiente de determinación ($R^2 = 94,85$) indicó que 94,85% de las variaciones observadas en la viabilidad celular, se debieron al paso del tiempo. En los cultivos expuestos al metal, se estableció una disminución altamente significativa en el número de células viables a medida que se aumentó la concentración (Fig. 1). Sin embargo, para los mismos tiempos de muestreo, el coeficiente de determinación (R^2) tiende a disminuir significativamente, manteniéndose la correlación negativa (Tabla 1); por lo que se puede establecer que, concentraciones a partir de 15 ppm influyen sobre la viabilidad celular. Con el objeto de corroborar el efecto de la concentración de cadmio a un mismo tiempo (72 h) sobre la viabilidad celular, se realizó una prueba de Duncan para

la comparación de medias entre los cultivos expuestos y los controles (Tabla 2). Se obtuvo una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre la viabilidad de los cultivos expuestos a 15 y 20 ppm, en relación con los controles, pero no hubo diferencias significativas al comparar los promedios entre 15 y 20 ppm.

Tabla 1. Coeficiente de Correlación (r), nivel de significancia (P) y Coeficiente de Determinación (R^2) al relacionar viabilidad celular vs. concentración de cadmio a diferentes tiempos.

Concentración de Cadmio (ppm)	r	R^2	P
0 ppm	-0,9739	94,85	$< 0,05$
15 ppm	-0,9585	9,87	$< 0,05$
20 ppm	-0,9201	84,66	$> 0,05$

Tabla 2. Comparación del efecto del cadmio sobre la viabilidad celular a un mismo tiempo (72 h) y diferentes concentraciones.

Muestras a 72 horas	Número de células vivas ($X \pm DS$)
Suspensión celular (Control)	933.300 ± 88.190
Suspensión celular + Cd^{+2} (15 ppm)	$483.300 \pm 109.300^*$
Suspensión celular + Cd^{+2} (20 ppm)	$366.700 \pm 72.650^*$

Prueba Múltiple de Duncan; *Diferencia con respecto al control ($P < 0,05$).

EFFECTO DEL CADMIO SOBRE LA PROLIFERACIÓN

En la Tabla 3, se muestran los resultados expresados en promedio $\pm$ error estándar ($X \pm EE$) de las cpm de cultivos de CMN controles y expuestas al Cd^{+2} con y sin mitógeno. Se observa una disminución en las cpm a medida que se incrementa la concentración del Cd^{+2} en ambas suspensiones celulares. Al comparar los resultados de la suspensión celular control con los de las células expuestas al metal (15 y 20 ppm), se observaron diferencias significativas, mientras que al comparar los promedios de las cpm en las suspensiones con Cd^{+2} 15 y 20 ppm entre sí, no se observó diferencias significativas ni en presencia, ni en ausencia de mitógeno. El análisis de regresión mostró una correlación negativa altamente significativa entre las concentraciones de Cd^{+2} y las cpm para las dos concentraciones utilizadas, con un coeficiente de determinación ($\% R^2$) de 80,04% para 15 ppm de Cd^{+2} y de 83,77% para 20

ppm, lo que indica el efecto deletéreo de la concentración del metal sobre la proliferación celular (Tabla 4). Resultados similares fueron encontrados al correlacionar el efecto del metal en presencia del mitógeno, sugiriendo que el mitógeno no revierte el efecto deletéreo del cadmio sobre la proliferación de CMN.

Tabla 3. Cuentas por minuto (cpm) expresadas en promedio $\pm$ error estándar ($X \pm EE$) de CMN de sangre periférica expuestas a diferentes concentraciones de cadmio (Cd^{+2}) con y sin mitógeno (PWM).

Muestras	Promedio $\pm$ EE
Suspensión celular (control)	23.965 $\pm$ 3.799
Suspensión celular + Cd^{+2} (15 ppm)	8.256 $\pm$ 406,5*
Suspensión celular + Cd^{+2} (20 ppm)	5.726 $\pm$ 986,2**
Suspensión celular (control + PWM)	43.410 $\pm$ 1.690
Suspensión celular + Cd^{+2} (15 ppm + PWM)	13.470 $\pm$ 1.258**
Suspensión celular + Cd^{+2} (20 ppm + PWM)	5.968 $\pm$ 1.175**

Comparación de medias (prueba *t*); *Representa diferencia significativa de los cultivos expuestos al metal con respecto al control en presencia y ausencia de mitógeno respectivamente (* $P < 0,01$, ** $P < 0,001$).

Tabla 4. Coeficiente de Correlación (*r*), porcentaje de Coeficiente de Determinación ($\%R^2$) y nivel de significancia (*P*) al relacionar las cuentas por minuto (cpm) vs concentración de Cd^{+2} en cultivos de CMN.

Concentraciones de Cd^{+2}	<i>r</i>	$\% R^2$	<i>P</i>
15 ppm	-0,8946	80,04%	< 0,01
20 ppm	-0,9152	83,77%	<0,001

DETERMINACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DEL CADMIO

En las Tablas 5 y 6, se presenta la acumulación del cadmio en los cultivos en presencia y ausencia del mitógeno, en ambos casos se observa una acumulación en los cultivos no expuestos experimentalmente (0 ppm). En los cultivos de CMN sin mitógeno sometidas a 15 y 20 ppm de Cd^{+2} , se muestra una diferencia significativa ($P < 0,01$) al comparar los niveles intracelulares de Cd^{+2} expresados en $\mu g/ml$ a 15 p.p.m. con respecto al control. Sin embargo, no se manifestó una diferencia significativa entre el control y la suspensión celular con 20 ppm de Cd^{+2} (Tabla 5).

En el caso de los cultivos expuestos al Cd^{+2} en presencia de mitógeno (Tabla 6), si se observó un aumento significativo del metal acumulado proporcional a la concentración agregada en el medio ($P < 0,01$); en este caso la diferencia fue altamente significativa entre el control y la concentración de 15 y 20 p.p.m. y entre 15 y 20 entre sí.

Tabla 5. Acumulación de cadmio ($\mu\text{g/ml}$) en CMN en ausencia de mitógeno, expresados en promedio $\pm$ error estándar ($X \pm \text{EE}$).

Muestras	$X \pm \text{EE}$ ($\mu\text{g/ml}$)
Suspensión celular (control)	$0,3970 \pm 0,079$
Suspensión celular + Cd^{+2} (15 ppm)	$5,844 \pm 0,062^{**}$
Suspensión celular + Cd^{+2} (20 ppm)	$0,633 \pm 0,1863$

Prueba Múltiple de Duncan; $*P < 0,05$, $**P < 0,01$.

Tabla 6. Acumulación de cadmio ($\mu\text{g/ml}$) en CMN en presencia de mitógeno expresados en promedio $\pm$ error estándar ($X \pm \text{EE}$).

Muestras	$X \pm \text{EE}$ ($\mu\text{g/ml}$)
Suspensión celular (control + PWM)	$0,7197 \pm 0,23$
Suspensión celular + Cd^{+2} (15 ppm + PWM)	$3,457 \pm 0,4362^{*}$
Suspensión celular + Cd^{+2} (20 ppm + PWM)	$10,60 \pm 0,435^{**}$

Prueba múltiple de Duncan; $*P < 0,05$; $**P < 0,01$.

INTERACCIÓN ENTRE LA ACUMULACIÓN DEL CADMIO Y SU EFECTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

El análisis de varianza (MANOVA) para evaluar el efecto del cadmio acumulado sobre la proliferación celular en presencia y ausencia de mitógenos se presenta en la Tabla 7. En ambos casos el efecto fue significativo ($F = 2729$, $P < 0,01$; $F = 1866$, $P < 0,01$, respectivamente). Sin embargo, el efecto en los cultivos con mitógenos fue 1,46 veces mayor que en el caso de los cultivos sin mitógeno.

Tabla 7. Análisis de varianza del efecto del cadmio acumulado sobre la proliferación celular en CMN en ausencia y presencia de mitógeno.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrados	F	P
Con mitógeno	8246	9	916,2	2729	< 0,01
Sin mitógeno	4617	9	513,0	1866	< 0,01
Residual	8259	26	0,490	-	-

DISCUSIÓN

Los resultados muestran en los cultivos no expuestos una disminución de la viabilidad celular con respecto al tiempo, lo que se considera un comportamiento normal de las células ya que existen controles en el ciclo de división celular que regulan los procesos de proliferación, diferenciación y senescencia celular (Ligner y Cech 1998).

En el caso de los cultivos expuestos, se puede establecer un evidente efecto tóxico del Cd^{+2} sobre la viabilidad celular, lo cual demuestra la sensibilidad de las CMN a la citotoxicidad ejercida por el metal, en concordancia con lo reportado por otros autores (Shimoda *et al.* 2001, Pillet *et al.* 2006). El hecho de que no se presenten diferencias significativas al comparar los promedios de las concentraciones de 15 y 20 ppm podría ser explicado, si se asume que posiblemente el Cd^{+2} ejerce su efecto al sobrepasar los procesos metabólicos implicados en la captación del metal a nivel intracelular. Esto está soportado por los reportes de otros autores que establecen que una vez que el metal es absorbido, se une a la metalotioneína (Yamada y Koizumi 1991), al inducir la actividad de estas proteínas, altera los niveles homeostáticos de cobre y zinc (Kennish 1992); de manera que al exceder la capacidad de proteína ligada, el cadmio ejerce un efecto tóxico, induciendo alteraciones fisiológicas (Croute *et al.* 2000, Leoni *et al.* 2002, Marcano *et al.* 2001, Marcano *et al.* 2006). Al analizar el efecto del metal sobre la proliferación se observó una diferencia significativa ($P < 0,01$) entre el grupo experimental y el grupo control, lo cual corrobora los resultados presentados en las pruebas de viabilidad. El análisis de regresión reporta una correlación negativa altamente significativa entre las concentraciones de cadmio y la proliferación, donde el porcentaje de coeficiente de determinación fue superior al 80%, es decir un alto % de las variaciones observadas se deben al efecto del metal para ambas concentraciones. También se pudo establecer el efecto del metal sobre la actividad mitogénica, observándose que aun en presencia de mitógeno, el metal es capaz de bloquear significativamente la

proliferación celular, lo cual difiere con los reportes de Tsangaris y Tzortzatou (1998). Ellos, utilizando linfocitos activados con mitógeno, reportaron la presencia de cadmio unido a una proteína parecida a las metalotioneínas, en virtud de lo cual, si el linfocito es activado por mitógeno, se produce un incremento en la síntesis de estas proteínas que captan el cadmio, observándose un menor efecto tóxico sobre las células que pareciera revertir el efecto del cadmio. Yamada y Koizumi, (1991) y Curtis *et al.* (1999) también revelaron que las metalotioneínas son proteínas intracelulares y que los mitógenos inducen otras proteínas parecidas a esta, que protegen contra la toxicidad del cadmio. Posiblemente, la discordancia de los resultados obtenidos podría explicarse por la especificidad de activación del mitógeno utilizado para la población linfocitaria analizada y/o a las concentraciones del metal expuesto. De hecho, Lohman y Beyersmann (1993), reportaron un efecto dual del Cd^{+2} en cultivo de células hepáticas, estableciendo que el metal a concentraciones micromolar induce la activación de proteínas similares a las metalotioneínas capaces de “secuestrarlo”, pero a concentraciones mayores el catión es capaz de sobrepasar los niveles de las proteínas ejerciendo toxicidad. Por otro lado, Borella y Bargellini (1993) reportaron una inhibición de la proliferación inducida por Fitohemaglutinina (PHA) por efecto del Cd^{+2} lo cual coincide con los resultados encontrados en esta investigación y los reportes de otros autores quienes establecen que el cadmio presenta un alto poder inmunotóxico en diversas especies (Daum *et al.* 1993, El Azzouzi *et al.* 1994, Esquifito 2003).

Resultados similares se han reportados por otros autores que establecen un efecto tóxico del cadmio evidenciado por un bloqueo en el crecimiento o proliferación celular en diversos sistemas biológicos (Marcano *et al.* 1998, Wenbin y Baosheng 2005, Marcano *et al.* 2006)

Los resultados revelaron una acumulación en los cultivos no expuestos experimentalmente (0 ppm), tanto en presencia como en ausencia del mitógeno. Esto permite inferir una exposición al cadmio ambiental de la población en general, pudiendo presentar niveles de $0,3970 \times 10^{-2} \mu\text{g} / \text{dl}$, valores aunque inferiores a los considerados como permisibles según la WHO (2003), pueden incrementarse en los individuos expuestos ocupacionalmente o residentes en zonas consideradas de mayor contaminación ambiental (Nordberg 2004).

Los procesos metabólicos implicados en la captación del metal a nivel intracelular no están bien dilucidados, lo que sí se ha establecido es su capacidad de acumulación (Goering 1995, Nordberg 2004, Taiyi *et al.* 2004) y

que, una vez absorbido, se une específicamente a la proteína metalotioneína (Yamada y Koizumi 1991). Al sobrepasar el metal los niveles intracelulares de esta enzima, comienza a acumularse hasta alcanzar un umbral a partir del cual ejerce su efecto tóxico causando las alteraciones descritas, lo que coincide con los reportados por otros autores (Goyer *et al.* 1984, Marcano *et al.* 2001, Marcano *et al.* 2006).

En el caso de los cultivos expuestos al Cd^{+2} en presencia de mitógeno, se observa un aumento significativo ($P < 0,01$) del metal acumulado proporcional a la concentración agregada en el medio; en este caso la diferencia es altamente significativa entre el control y la concentración seleccionada y entre 15 y 20 ppm, entre sí. Esto podría ser explicado debido a que los linfocitos en presencia de mitógenos inducen una mayor proliferación, por lo que aumenta el número de células capaces de captar el metal. Esto se corresponde con los resultados obtenidos relacionados con los efectos del Cd^{+2} acumulado sobre la viabilidad y proliferación celular, donde se observó que éste es más deletéreo en presencia de mitógeno que en ausencia del mismo, posiblemente por un mayor número de células sobre las cuales ejerce su toxicidad. El alto poder de penetración y capacidad de acumulación del metal ha sido reportado por otros autores en diversos sistemas biológicos (Goering 1995, Nordberg 2004, Taiyi *et al.* 2004).

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten establecer una correlación entre la acumulación del cadmio en los cultivos de células mononucleares y su efecto sobre la viabilidad y proliferación celular, lo cual podría sugerir un mecanismo inhibitorio del sistema inmunológico inducido por el metal, que se vería reflejado en la respuesta inmunitaria de los individuos que por una u otra causa, presentan niveles del metal considerados como indicadores contaminantes.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento de esta investigación.

LITERATURA CITADA

ASMUS, M., L. MULLENDERS, H. EKER Y A. HARTWIG. 2000 Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis* 21: 2097–2104.

- BODENSEWERK, Z. 1984. Analytical techniques for Grafite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry Perkin-Elmer GMGH. Veberlinge, Republic Federal of Germany, 36 pp.
- BORELLA, P. Y A. BARGELLINI. 1993. Effects of trace elements on immune system: results in cultured human lymphocytes. *J. Trace. Elem. Electrolytes. Health. Dis.* 7: 231–233.
- BOYÜM, A. 1968. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21: 9–50.
- CARAGEORGIOU, H., V. TZOTZES, C. PANTOS, C. MOUROUZIS, A. ZARROS Y S. TSAKIRIS. 2004. In vivo and in vitro effects of cadmium on adult rat brain total antioxidant status, acetylcholinesterase, (Na⁺, K⁺)-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities: protection by L-cysteine. *Basic Clin Pharmacol. Toxicol.* 94(3): 112–118.
- CROUTE, F., B. BEAU, C. ARRABIT, Y. GAUBIN, J. DELMAS Y J. SOLEILHAVOUP. 2000. Patter of stress protein expression in human lung cell-line A 549 after short- or long- term exposure to Cadmium. *Environ. Health. Perspec.* 108(1): 55–60.
- CURTIS, D. K., L. JIE Y C. H. SUPRATIM. 1999. Metallothionein: An intracellular protein to protect against Cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 267–294.
- DAUM, J. R., M. D. SHEPERD Y R. J. NOELLE. 1993. Immunotoxicology of cadmium and mercury on B-lymphocytes, I: effect on lymphocyte functions. *Int. J. Immunopharmacol.* 15: 383–394.
- DING, W. Y D. M. TEMPLETON. 2000. Activation of parallel mitogen activated protein kinase cascades and induction of c-fos by cadmium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162: 93–99.
- EL AZZOUZI, B., G. T. TSANGARIS, O. PELLEGRINI, Y. MANUEL, J. BENVENISTE. Y Y. THOMAS. 1994. Cadmium induces apoptosis in a human T cell line. *Toxicology.* 88: 127–139.
- ESQUIFITO, A., A. LAFUENTE, A. GONZÁLEZ Y A. ROMERO. 2003. Effect of cadmium on lymphocyte subsets distribution in thymus and spleen. *J. Physiology And Biochemistry* 59(1): 43–48.
- GOERING, P. L., M. P. WAALKES Y C. D. KLAASEN. 1995. Toxicology of cadmium. Pp. 189–214, *en* R. A. Goyer, M. G. Cherian (eds.), *Handbook of experimental pharmacology: Toxicology of metals*. Springer, Berlin.
- GOYER, A., G. CHERIAN Y R. DELAQUERRIERE. 1984. Correlations of parameters of cadmium exposure with onset of cadmium-induce neuropathy in rats. *J. Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 5: 89–100.
- LEONI, G., L. BOGLIOLO, G. DEINA, F. BERLINGUER, I. ROSATI, P. PINTUS, S. LEDDA Y S. NAITANA. 2002. Influence of cadmium exposure on in vitro gamete dysfunction. *Reprod. Toxicol.* 16(4): 371–377.
- LIGNER, J. Y T. CECH. 1998. Telomerase and chromosome and maintenance. *Current Opinion in Genetics and Development.* 8: 226–232.
- LOHMAN, R. D. Y D. BEYERSMANN. 1993. Cadmium and zinc mediated changes of Ca²⁺-dependent endonuclease in apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 1097–1103.

- MARCANO, L., I. CARRUYO., C FARÍA. Y X. MONTIEL. 2006. Citotoxicidad del cadmio en hepatocitos de ratón albino y sus posibles implicaciones en ambientes tropicales. *Rev. Biol. Trop.* 54(2): 257–263.
- MARCANO, L., I CARRUYO Y X. MONTIEL. 2001. Alteraciones citológicas inducidas por el Cadmio en meristemos radiculares de cebolla (*Allium cepa* L.). *Rev. Fac. Agron. LUZ.* 18: 247–257.
- MARCANO, L., X. MONTIEL., I. CARRUYO, M. BRACHO Y L. ATENCIO. 1998. Efectos mitotóxicos y genotóxicos del cadmio en células meristemáticas de cebolla (*Allium cepa* L.). *Ciencia* 6: 93–99.
- NORDBERG, M. 2004. Environmental exposure and preventive measures in Sweden and USA. *Biometals* 17(5): 589–592.
- PILLET, S., M. D'ELIA, J. BERNIER, J. M. BOUQUEGNEAU, M. FOURNIER Y D. CYR. 2006. Immunomodulatory effects of estradiol and cadmium in adult female rats. *Toxicological Sciences* 92(2): 423–432.
- POTTS, R. J., R. D. WATKIN Y B. A. HART. 2003. Cadmium exposure down-regulates 8-oxoguanine DNA glycosylase expression in rat lung and alveolar epithelial cells. *Toxicology* 3: 184(2–3): 189–202.
- SHIMODA, R., N. TAKEAKI, T. HITOSHI, M. MASATOMO Y M. WAALKES. 2001. Induction of apoptosis in cells by Cadmium: Quantitative negative correlation between basal or induced metallothionein concentration and apoptotic rate. *Toxicol. Sci.* 64: 208–215.
- TAIYI, J., K. QINGHU, Y. TINGTING, W. XUNWE Y G. F. NORDBERG. 2004. Renal dysfunction of cadmium-exposed workers residing in a cadmium-polluted environment. *Biometals* 17: 513–518.
- TSANGARIS, G. T Y F. TZORTZATOU-STATHOPOULOU. 1998. Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines. *Toxicology* 128: 143–50.
- (USEPA) United States Environmental Protection Agency. 2001. Chronic toxicity summary. Cadmium and cadmium compounds. CAS Registry Number: 7440-43-9.
- WENBIN, Z. Y Q. BAOSHENG. 2005. Effects of cadmium hyperaccumulation on physiological characteristics of *Sedum alfredii* Hance (Crassulaceae). *Plant Science* 169(4): 737–745.
- WHO 2003. Cadmium Review. Environmental Health Criteria 134. World Health Organisation, International Programme on Chemical Safety (IPCS), Geneva, Switzerland. 04: 1-24.
- YAMADA, H. Y S. KOIZUMI. 1991. Metallothionein induction in human peripheral blood lymphocytes by heavy metals. *Chem. Biol. Interact.* 78: 347–354.