

Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular

Cadmium: effects on health. Cellular and molecular response

Martínez Flores, Karina; Souza Arroyo, Verónica*; Bucio Ortiz, Leticia;
Gómez Quiroz, Luis Enrique; Gutiérrez Ruiz, María Concepción

Laboratorio de Fisiología Celular, Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Avenida San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, Iztapalapa, México D. F. 09340. Tel/ Fax 58044730.

*veso@xanum.uam.mx

Recibido: 15 de mayo de 2012

Aceptado: 2 de agosto de 2012

Resumen. El cadmio (Cd) es un metal que se encuentra principalmente en la corteza terrestre y siempre se presenta en combinación con el zinc. Es ampliamente utilizado en la industria. Se considera un contaminante y es liberado al ambiente como subproducto de la extracción de cobre, hierro y zinc. La exposición al Cd puede producir una variedad de efectos adversos tanto en el humano como en los animales. Una vez absorbido se acumula en el organismo por tiempos largos. Dependiendo de la dosis, fuente y tipo de exposición puede dañar varios órganos como el hígado, riñón, pulmón, hueso, testículos y placenta. Los seres humanos están expuestos al Cd principalmente a través de la ingesta de alimentos, del humo del cigarro, así como del agua y aire contaminados con el metal. La entrada de Cd a las células no es uniforme en todos los sistemas y puede ser mediada por transporte pasivo o activo, o por canales de calcio. Se considera que uno de los mecanismos de toxicidad de este metal es debido, en parte, a las especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden actuar como segundos mensajeros y por tanto alterar diferentes vías de señalización. Por todo lo expuesto el objetivo de esta revisión es analizar los efectos del Cd sobre la salud, así como sobre la respuesta celular y molecular.

Palabras clave: Cadmio; Metalotioneína; Especies reactivas de oxígeno; Cascadas de señalización.

Abstract. Cadmium (Cd) is a metal found in the earth's crust, always as part of several, mainly zinc-rich, ores. Cd is considered as an environmental pollutant, it is widely used in the industry. It coexists with other metals and its release into the environment is carried out in parallel with the release of copper, iron and zinc. Cd is known to have numerous undesirable effects on health in both humans and animals. Once absorbed, it is efficiently retained in the body, where it accumulates throughout life. Depending on the dose, source and type of exposure it could damage several organs as the liver, kidney, lung, bones, testes and placenta. Important sources of human intoxication are food, cigarette smoke as well as contaminated water and air. Cd cell uptake is not uniform across all systems. This could be mediated by passive or active transport, or via calcium channels. It is known that the toxicity produced by this metal is due, in part to reactive oxygen species, which could act as second messengers that may alter different signaling cascades. The aim of this review is to analyze the effects of Cd on health, as well as on cellular and molecular response.

Key words: Cadmium; Metallothionein; Reactive oxygen species; Signaling pathways.

INTRODUCCIÓN

El cadmio (Cd), es un metal pesado que se obtiene como subproducto del procesamiento de metales como el zinc (Zn) y el cobre (Cu). Se acumula en el ambiente como resultado de las actividades industriales (Farkas y col. 2007; Pan y col. 2009), que involucran la fabricación de baterías níquel-cadmio, la quema de combustibles fósiles, la generación de polvos por el proceso de fabricación de cemento y fertilizantes fosfatados. Se utilizan

pigmentos a base de Cd para crear tintes, pinturas, plásticos y cerámica. Estas actividades industriales son consideradas como una gran fuente de emisión a la atmósfera y de contaminación para mantos acuíferos y suelos. Los ríos contaminados con Cd pueden irrigar tierras de cultivos, además de que el Cd es capaz de combinarse con otros elementos y formar compuestos tales como cloruros, óxidos, sulfuros y de esta manera unirse fuertemente a las partículas del suelo. A nivel mundial se

ha estimado que el uso de Cd en la actividad industrial se ha incrementado de 18400 toneladas en 2003 a 20400 toneladas en el 2007 (Moulis y Thévenod 2010). Se considera que la mayor cantidad de Cd en el suelo proviene del uso de fertilizantes de fosfatos para la agricultura, lo cual produce que se acumule a lo largo de la cadena alimenticia en plantas y animales. Es por ello que la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR), tiene al Cd catalogado entre los 275 materiales más peligrosos (ATSDR 2007). Moulis y Thévenod (2010), mencionan que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha establecido algunas medidas preventivas para disminuir la contaminación por Cd del medio ambiente y la transferencia a través de la cadena alimenticia hasta el ser humano. Estas medidas, involucran reducir la disponibilidad de Cd en el suelo y las plantas mediante la neutralización de acidez del suelo; además de mantener una dieta rica en hierro para que la absorción intestinal de Cd se reduzca. La exposición crónica al Cd puede causar efectos adversos en riñón, hígado, pulmón, páncreas, testículos, placenta y hueso (Satarug y col. 2010); sin embargo este metal puede disparar mecanismos adaptativos, así como generar especies reactivas de oxígeno (ERO) que actúan como mediadores de señalización celular y respuesta anti-apoptótica. Esta respuesta tiene importancia médica ya que este tipo de exposición se ha asociado con varios tipos de cánceres (Liu y col. 2009). Basado en estudios epidemiológicos y experimentales, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), ha clasificado al Cd como un carcinógeno en la categoría I (IARC 1993). Es por ello que el objetivo de esta revisión es analizar los efectos del Cd en la salud, así como sobre la respuesta celular y molecular.

EFFECTOS EN LA SALUD

Los efectos de la toxicidad por Cd dependen del tipo de exposición, ya sea a través de la inhalación de aire contaminado, particularmente cerca de fundidoras y las incineradoras o del humo del cigarro, consumo de alimentos y agua contaminados. Además la deficiencia de metales esenciales como el hierro (Fe), Cu, Zn y calcio (Ca) en el cuerpo humano facilita la absorción de Cd, por lo tanto sus órganos blanco son el riñón (especialmente la corteza renal), hígado, pulmón, hueso y placenta. Se estima que entre un 10-50% de Cd se absorbe

en pulmón, mientras que a nivel gastrointestinal la absorción es del 8%. Así, en fumadores, se ha encontrado que la concentración de Cd en la sangre es de 1-4 µg/l, un valor de 4 a 5 veces más alto que en los no fumadores. Se sabe que un cigarro contiene entre 0,5-3 µg de Cd por gramo de tabaco, dando como resultado una absorción de 3 µg diarios por vía respiratoria. Además del tabaco, alimentos como mariscos tienen altas concentraciones de Cd (Storelli 2009; Ololade y col. 2011). El Cd asimilado, es captado por el hígado donde forma complejos con pequeños péptidos como el glutatión (GSH) (Cd-GSH) o con proteínas de bajo peso molecular como la metalotioneína (MT) (Cd-MT) y es secretado en la bilis o bien liberado a la circulación. Estos complejos son una forma importante de transporte y almacenamiento del metal dentro del organismo, explicando así su larga vida biológica entre los 10-30 años (EFSA 2009).

Inflamación

La exposición al Cd, ya sea ocupacional o ambiental, está asociada con inflamación. La respuesta inflamatoria inducida por el Cd, involucra la producción y liberación de citocinas tales como la interleucina-1β (IL-1β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) (Bakshi y col. 2008; Kataranovski y col. 2009; Lag y col. 2010). Se conoce que la respuesta mediada por el TNF-α, involucra la infiltración de células inflamatorias, la generación de ERO y la regulación de la expresión de otras citocinas. Lag y col. (2010), encontraron un comportamiento diferencial en la expresión y liberación de citocinas en fibroblastos, células epiteliales y macrófagos de pulmón de ratas expuestas a Cd. El Cd puede inducir inflamación, pero las bases moleculares no se conocen con exactitud. Se ha propuesto que las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos), específicamente la cinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 (Erk 1/2) y la p38 están involucradas en la inducción del TNF-α en monocitos y macrófagos expuestos a Cd (Haase y col. 2010). Cormet-Boyaka y col. (2012), demostraron que la secreción de IL-8 en células epiteliales alveolares expuestas a Cd, disminuye cuando se inhibe la expresión de la Erk 1/2 con el RNA de silenciamiento o de interferencia (siRNA). Recientemente, se ha determinado que la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) contribuye a la

respuesta inflamatoria que el Cd induce en células de pulmón (A549) de origen humano (Kundu y col. 2011). Asimismo, el Cd activa varios factores de transcripción, tales como la proteína activadora-1 (AP-1) (Souza y col. 2004b) y el factor nuclear- κ B (NF- κ B) (Freitas y Fernandes 2011), que están involucrados en la expresión de varios mediadores inflamatorios.

Riñón

El Cd es nefrotóxico (L'Azou y col. 2007) y el daño renal se manifiesta con proteinuria (No-gué y col. 2004), que se determina por un incremento de proteínas de bajo peso molecular como transferrina, albúmina, N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) y β 2-microglobulina en la orina que son utilizadas como marcadores de daño renal. La continua exposición a Cd, además de causar disfunción tubular, también puede progresar a daño glomerular con una disminución en la filtración glomerular (GFR) (Mortensen y col. 2011). Además de la proteinuria, el Cd también puede provocar nefrotoxicidad severa que se manifiesta como glucosaturia, aminoacidonuria e hipercalcemia. Recientemente, se ha determinado que la toxicidad renal por el Cd, puede estar relacionada con el incremento en los niveles de la enzima sintetasa de óxido nítrico (NOS) que afecta la fisiología del órgano (Soyupek y col. 2011). La NOS es la responsable de la síntesis de óxido nítrico (ON) que puede reaccionar con el radical libre anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), generando peroxinitrito (ONOO-) que produce toxicidad celular. La exposición al Cd también ha sido asociada con el desarrollo de osteoporosis. El grupo de Chen y col. (2009) encontró que el Cd disminuye la viabilidad celular, inhibe la formación de hueso y la actividad de fosfatasa alcalina en osteoblastos de rata. Un estudio reciente, demostró que existe una correlación entre la densidad mineral ósea y una disfunción renal causada por el Cd (Chen y col. 2011).

Cáncer

Se ha asociado la exposición a Cd con una alta mortalidad por cáncer (Akeson y col. 2008). Recientemente, se ha identificado que el Cd regula la expresión del gene AEG-1, cuya proteína codificada podría ser importante para el desarrollo del tumor, progresión y metástasis a través del factor NF- κ B en células de cáncer de mama (MDA-MB231) (Luparello y col. 2012). Sin embargo, el mecanismo molecular carcinogénico del Cd no se conoce con exactitud.

INGRESO CELULAR

La entrada de Cd a la célula puede llevarse a cabo por diversas vías, dependiendo del tipo celular y de las condiciones fisiológicas. Es por ello que los mecanismos responsables de la acumulación se deben a la competencia que el Cd genera con metales esenciales como el Cu, Zn, Ca y Fe que tienen un sistema de transporte específico. Fotakis y Timbrell (2006), señalan que una tercera parte del Cd entra al hepatocito por canales de Ca y sugieren que la presencia de antagonistas de canales de Ca como la nifedipina y verapamilo, reducen la entrada de Cd, confirmando una interferencia con el transporte de Ca. Debido a que el Ca y Cd tienen un radio iónico y carga similar se puede explicar por qué los dos elementos tienen rutas similares de entrada en la célula (Fotakis y Timbrell 2006). El Fe es transportado por la proteína transportadora 1 de metales divalentes (DMT1) o por la proteína transportadora 8 relacionada a Zn y Fe (ZIP8). Dichas proteínas son utilizadas por el Cd para su entrada a la célula. Esto fue demostrado en las líneas celulares epiteliales derivadas de pulmón humano (H441 y A549) que fueron expuestas a Cd, encontrándose incrementado tanto la acumulación de Cd, como la expresión de los transportadores Zip8 y DMT1 (Mantha y col. 2011). Lo antes dicho se apoya en experimentos con células basófilas (RBL-2H3) de rata, transfectadas con el siRNA para disminuir la expresión del transportador ZIP8, demostrando una reducción en la entrada de Cd (Fujishiro y col. 2011). Recientemente se demostró, que en células epiteliales de pulmón, el Cd incrementó, tanto el ARNm como la expresión del transportador ZIP8 de manera dependiente del factor NF- κ B (Napolitano y col. 2012). Por otro lado, el grupo de Wolff y col. (2011) evaluó la participación del factor-1-ADP-ribosilación (Arf1), en la entrada de complejos metal-proteína incluyendo el complejo Cd-MT. El Arf1 es una proteína que participa en la regulación del tráfico vesicular y la sobre-expresión del mutante Arf1 en células renales está relacionada con la reducción en la toxicidad inducida por el complejo Cd-MT. El Cd también puede formar complejos con el GSH, a nivel de sus grupos sulfhidrilo (-SH) y por medio de transportadores específicos, parecidos a las proteínas de resistencia a drogas 1 y 2 (MRP1, MRP2), se puede transportar el Cd-GSH al medio extracelular. En células derivadas de intestino humano (TC7), se de-

terminó un mecanismo para el transporte de Cd en la membrana basolateral y se sugirió la participación de las MRP1 y MRP2 (Carriere y col. 2011). Una vez acumulado, este metal es capaz de afectar los patrones de actividad transcripcional y señalización celular que pueden llevar a respuestas de adaptación o sobrevivencia (Thijssen y col. 2007), proliferación celular (Liu y col. 2008) o puede culminar en la muerte celular vía apoptosis o necrosis (Zhang y col. 2010; Brama y col. 2012).

ESTRÉS OXIDATIVO

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar el daño inducido por el Cd en el organismo y las ERO son consideradas como mediadores importantes en esta respuesta. Se conocen a las ERO como moléculas radicales o no radicales que son consideradas como agentes oxidantes. Los radicales libres, se caracterizan por tener un electrón desapareado, lo que los hace muy reactivos, debido a que tienden a sustraer un electrón de moléculas estables con la finalidad de alcanzar su estabilidad electroquímica. Las ERO comprenden al: radical $O_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH^{\cdot-}$) y lipoperóxidos que se han relacionado con una variedad de enfermedades. Estudios han demostrado que el Cd puede generar ERO de manera indirecta, provocando daño en el ADN (Nzengue y col. 2008), en proteínas, en membranas y alterando la cadena de electrones mitocondrial (Belyaeva y col. 2004; Belyaeva y col. 2008; Liu y col. 2011; Mao y col. 2011). Para explicar el papel indirecto del Cd en la generación de los radicales libres, se ha planteado que este metal puede reemplazar al Fe y Cu en varias proteínas de membrana y citosólicas como la ferritina, generando un incremento en el radical $OH^{\cdot-}$ vía la reacción de Fenton. Un estudio reciente en células C6 (glioma de rata), expuesto con 20 μM de $CdCl_2$, reveló que la alteración en la homeostasis de Cu, Zn y la inhibición en las enzimas antioxidantes están involucradas en el estrés inducido por el Cd (Nzenque y col. 2012). La mitocondria es un blanco intracelular para diferentes estresores, incluyendo el Cd, sin embargo los mecanismos de daño mitocondrial generados por el metal, no están bien definidos. Dorta y col. (2003), mencionan una secuencia de eventos para explicar la alteración funcional de la mitocondria inducida por el Cd: primero, una interacción del Cd con los grupos $-SH$ de las proteínas de la

membrana mitocondrial disipando el potencial de membrana ($\Delta\psi$), que provoca un desacoplamiento y segundo, una inhibición de la cadena respiratoria con la generación de ERO que causan lipoperoxidación mitocondrial. Belyaeva y col. (2004), proponen que el Cd genera ERO a través de una inhibición selectiva en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En células de hepatoma de rata (AS-30D) tratadas con Cd, encontraron un efecto bifásico en la generación de ERO; un incremento a tiempos cortos de exposición y una disminución a tiempos largos con altas concentraciones de Cd así como inhibición en la respiración celular y disipación del $\Delta\psi$ (Belyaeva y col. 2008). Un estudio reciente en células embrionarias humanas de riñón (HEK293), propone que el Cd puede inducir disfunción mitocondrial de manera directa; incluyendo un incremento en la permeabilidad, inhibición en la respiración y provocando estrés oxidativo (Mao y col. 2011). La acumulación de ERO afecta el potencial de membrana mitocondrial y activa una serie de eventos incluyendo la apoptosis. Por otro lado, se ha demostrado que el Cd induce la expresión de la NADPH oxidasa (NOXs) en riñón (Thijssen y col. 2007), en neuronas (Chen y col. 2011) y la actividad en hepatocitos (Souza y col. 2009). Las NOXs son una familia de enzimas transmembranales que generan ERO e incluyen: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2. Las NOXs se activan a través de una serie de fosforilaciones y de interacciones de la subunidad p22 con proteínas citosólicas que son la p40, p47, p67 y una GTPasa Rac. En hepatocitos (Souza y col. 2009) y en neuronas (Chen y col. 2011), el Cd induce la producción de ERO vía la NOX por regular la expresión de la subunidad regulatoria p47. Se ha relacionado la actividad de esta oxidasa en la activación de ciertas vías de señalización sensibles al estado redox y un exceso en la producción de ERO por las NOXs ha sido implicado en una variedad de desordenes que resulta en la muerte celular por apoptosis. El estrés oxidativo inducido por el Cd, causa lipoperoxidación y los lipoperóxidos producidos pueden reaccionar con el ADN y las proteínas alterando las funciones celulares. En un estudio con ratas Wistar expuestas a Cd, se evaluó la lipoperoxidación, dando como resultado una elevada cantidad de malondialdehído (MDA) e hidropéroxidos lipídicos y una disminución en el contenido de GSH (Prabu y col. 2010). Se ha

sugerido que el estrés oxidativo inducido por el Cd, está relacionado con la inhibición de enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), la glutatión reductasa (GR), la glutatión peroxidasa (GPX), la ascorbato peroxidasa y la superóxido dismutasa (SOD) dando como resultado la acumulación de ERO. En la línea celular (CRL-1439) derivadas de hígado de rata (Ikediobi y col. 2004) y en cultivo primario de hepatocitos de rata (Liu y col 2011) expuestas a Cd, encontraron un incremento en la generación de ROS y una disminución tanto en el contenido de GSH como en las actividades de la GPX, CAT y GR. Por otro lado, en células neuronales expuestas con 10 μM de CdCl_2 durante 24 h, se asociaron cambios en la conformación de la superóxido dismutasa dependiente de Cu-Zn (Cu-Zn-SOD) con una disminución en su actividad enzimática y apoptosis inducida por estrés oxidativo (Huang y col. 2006). Un estudio reciente en la línea celular derivada de riñón de mono africano (COS7) tratada con Cd, reveló una disminución en la expresión y contenido de la superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD) pero no en las otras isoenzimas y una reducción con el inhibidor de la cinasa p38 (SB203580) (Obara y col. 2011). Con estos resultados concluyen que la reducción de la EC-SOD no está regulada directamente por la cinasa p38 sino en parte por la activación o inactivación de factores de transcripción que reprimen su transcripción. Por otra parte, estudios *in vitro* revelan que el Cd induce el rompimiento de la cadena de ADN (Haldsrud y Krokje 2009), sin embargo el mecanismo de daño no está muy claro. Nzenge y col. (2008), demostraron en queratinocitos humanos (HaCaT), que el daño en ADN y los efectos tóxicos inducidos por el Cd, es consecuencia de una disminución en el contenido de GSH alterando el estado redox de la célula. El grupo de Lei y col. (2008), menciona que las transformaciones morfológicas encontradas en células epiteliales de origen bronquial humano (16HBE) por el Cd, están relacionadas con un incremento en la expresión del factor de iniciación de la traducción eucariótica 3 (eIF3). Un estudio reciente en trabajadores expuestos a Cd, demostró una correlación positiva entre la concentración de Cd en orina y la expresión de los factor eIF3 y factor de elongación 1 δ (eEF-1 δ) (Wei y col. 2012). Estos investigadores sugieren que la sobre-expresión del factor eEF-1 δ en sangre, podría ser usado como un biomarcador mole-

cular de exposición poblacional al Cd. Por otro lado, un estudio en la línea celular K562 derivada de leucemia mieloide humana, señaló que el Cd a concentraciones bajas inhibe la actividad de la DNA topoisomerasa II α por interaccionar con los grupos -SH de la enzima (Wu y col. 2011) y que este efecto fue reducido por el glutatión. Así mismo, el grupo de Nemmiche y col. (2011), indicaron que el daño inducido en el ADN de células Jurkat T derivada de leucemia linfóide humana, expuestas a Cd está asociado más a la alteración en la homeostasis redox que al contenido de elementos traza intracelular. Recientemente en células epiteliales 16HBE expuestas a Cd, se ha señalado un incremento progresivo en la metilación del ADN con la sobre-expresión de la enzima ADN metiltransferasa y esto podría explicar parcialmente la carcinogénesis inducida por el Cd (Zhou y col 2012). De igual forma, en hígado de rata encontraron que el Cd induce hipermetilación del promotor de la caspasa 8 y un incremento en la proliferación celular. Con esto explican que el silenciamiento de la caspasa 8 por hipermetilación resulta en la ausencia de la expresión de la proteína con ausencia en la muerte celular por apoptosis mediada por receptor y descontrol en el crecimiento celular (Wang y col. 2012).

SEÑALIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES

La exposición al Cd puede alterar varias cascadas de señalización y la expresión de genes. Sin embargo, los mecanismos moleculares que llevan a la desregulación de genes por este metal y las alteraciones celulares que desencadena su toxicidad son poco entendidas. Diversos reportes en la literatura han contribuido a ampliar la lista de genes que responden al Cd; entre ellos los del ciclo celular, respuesta inmune, metabolismo, oncogenes y transportadores (Kawata y col. 2007; Badisa y col. 2008; Yamada y col. 2009; Tokumoto y col. 2011; Wang y col. 2012). Sin embargo, se ha determinado que los genes más expresados son los relacionados con las metalotioneínas (MTs), las proteínas de choque térmico (Hsp) y la apoptosis. Además, se sugiere que la identificación de estos genes puede ser candidata para evaluar el riesgo a la salud por la exposición al metal. Las MTs inicialmente fueron reportadas como proteínas de unión al Cd, comprenden una familia de proteínas de bajo peso molecular (6-7 kDa) compuestas de más de diez isoformas en humanos. Se en-

cuentran subdivididas en 4 grupos: MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV, siendo las isoformas MT-I y MT-II las más distribuidas. Las MTs se caracterizan por tener en su estructura regiones ricas en cisteína, lo que les confiere una alta capacidad de unión a metales pesados como el Cd (Ejnik y col. 2010) y protección contra el daño oxidativo. En diversos tipos celulares se ha demostrado que el Cd induce la expresión de la MT-I (Urani y col. 2007; Nzungue y col. 2009; Banni y col. 2010) y de su mRNA por RT-PCR (Mukhopadhyay y col. 2009; Zhang y col. 2012), la cual está asociada con un mecanismo de resistencia (Honda y col. 2010). La expresión de la MT, puede estar regulada en parte por el factor de transcripción-1 que responde a metales (MTF-1). Estudios indican que el MTF-1 puede ser fosforilado por la proteína cinasa C (PKC) o por la cinasa c-Jun N-terminal (Jnk), sin embargo el uso de los inhibidores de estas cinasas no afectan la unión del MTF-1 al promotor de la MT inducido por el Cd (Jiang y col. 2004). Ellos sugieren que en esta regulación pueden estar involucradas múltiples cascadas de señalización que pueden estar cambiando los estados de fosforilación del MTF-1. Por otro lado, Li y col. (2008), demostraron por co-inmunoprecipitación la formación de un complejo multiproteico formado por el MTF-1, la histona acetiltransferasa p300/CBP y el factor de transcripción Sp1 en respuesta al Zn o Cd. Estos autores mencionan que al silenciar p300 con siRNA y por mutagénesis en el dominio de transactivación del MTF-1, la transcripción del gen de MT-1 disminuye. Por otra parte, el grupo de Okumura y col. 2011, propone que el mecanismo por el cual el MTF-1 regula la transcripción del gen de la MT involucra una rápida exclusión del nucleosoma del promotor de la MT en respuesta al Zn. Recientemente, el grupo de Zhang y col. (2012), determinaron que el Cd induce un incremento en los niveles de Zn en hígado y riñón que se correlaciona con la expresión del ARNm y la síntesis de la MT, dándole al Zn un papel positivo. El Zn interacciona con el factor de transcripción MTF-1 formando un complejo que se une a elementos ARE en la región promotora del gen de la MT para inducir su expresión. Además, estudios recientes sugieren que la fosfatasa y tensina homólogo (PTEN), regula la actividad transcripcional del factor MTF-1, ya que una disminución en el contenido de la PTEN, reduce la expresión de la MT y promueve la sensibilidad a

la toxicidad del Cd (Lin y col. 2012). Otra de las proteínas que se inducen en respuesta a la exposición de Cd es la Hsp70 (Urani y col. 2007; Cardin y col. 2009; Selim y col. 2012) que se activa rápidamente en respuesta al estrés y tiene gran importancia en la protección y tolerancia al Cd. Como molécula chaperona, la Hsp70 tiene la capacidad para unirse a proteínas en proceso de desnaturalización y así prevenir su degradación. Estudios realizados en células de hepatoma humano (HepG2) (Souza y col. 2004b) y fibroblastos de ratón (NIH3T3) (Ridley y col. 2010), indicaron que el Cd aumenta la producción de Hsp70 de manera dependiente del tiempo de exposición y de la dosis (Valbonesi y col. 2008; Gerspacher y col. 2009) y que las cinasas Erk 1/2 y Jnk están involucradas (Nishitai y Matsuoka 2008; Escobar y col. 2009), confiriéndole protección celular contra el daño por el metal. Además, señalaron una represión en la expresión de la Hsp70 inducidos por el Cd en células transfectadas con el siRNA para las cinasa Jnk, p38 y Erk 1/2 (Nishitai y Matsuoka 2008). Así, se asume que el patrón de expresión para la Hsp70 fue diferente y la inducción de esta chaperona puede ser considerada como una respuesta adaptativa inducida por el Cd, permitiendo a las células realizar sus funciones esenciales para sobrevivir. La producción de la proteína Hsp70 es regulada por el factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF-1) que se une a elementos de choque térmico (HSE) localizados en el promotor de la Hsp70. El HSF-1 se encuentra como un monómero inactivo y se activa por fosforilación en parte por las MAPK, en respuesta al estrés inducido por la acumulación de proteínas dañadas. La activación de estas MAPK (Erk 1/2, p38, Jnk) requiere de mecanismos de fosforilación por las cinasas MEK, MKK o SEK. Así, la cinasa Erk 1/2 es fosforilada por las MEK1 y MEK2, la p38 por MKK3 y MKK6, y la Jnk por SEK1 (conocida como MKK4 y MKK7). En base a estas consideraciones, en células de origen embrionario (ES) de ratón, fueron silenciados los genes para las cinasa SEK1 y MKK7 y expuestas a Cd (Nishitai y Matsuoka 2008). Se encontró disminuida la fosforilación del factor HSF-1 sólo cuando las células ES fueron silenciadas para SEK1. Estos resultados sugieren que la cinasa SEK1 puede activar, mientras que la cinasa MKK7 puede suprimir la actividad transcripcional de la proteína Hsp70, a través de la regulación de la fosforilación del

factor HSF-1. La hsp70 también puede ser regulada por otros factores de transcripción como AP-1 o el Stat-3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3). Esto fue demostrado en células HepG2 que fueron pretratadas con el péptido inhibidor para el Stat-3, indicando una disminución en la producción de la proteína Hsp70 inducida por el Cd (Souza y col. 2009). Diversos estudios, han demostrado que el Cd induce la activación de AP-1, Stat-3 y que son regulados por las MAPK. En células HepG2 expuestas a Cd, se ha reportado que la activación de AP-1 es dependiente de la dosis y sensible al estrés oxidante (Souza y col. 2004b). Esta activación puede ser mediada por las MAPK (Hsiao y Stapleton 2004; Escobar y col. 2009) o por cambios a nivel transcripcional de los miembros de la familia Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) inducidos por el Cd (Iwatsuki y col. 2011). En células HK-2 de origen renal expuestas a Cd se encontró un incremento progresivo en la proteína c-fos y no en su RNAm, sugiriendo una posible estabilidad en la fosforilación de c-fos. Además, las cinasas Erk 1/2 y p38 pueden estar involucradas en la regulación de la expresión de c-fos y en la fosforilación de la proteína c-Fos (Iwatsuki y col. 2011). Se han identificado seis proteínas de la familia de los Stat; Stat-1, Stat-2, Stat-3, Stat-4, Stat-5a, Stat-5b, Stat6 que son activados en respuesta a varias citocinas, factores de crecimiento y estresores como el Cd. Estudios en células epiteliales de riñón (LLC-PK1) y en HepG2, indicaron que la activación de Stat3 es dependiente del tiempo de exposición, de la dosis (Nakagawa y col. 2007) y que es sensible a las ERO procedente de la NADPH oxidasa activada por Cd (Souza y col. 2009). Los Stat son fosforilados en residuos de tirosina por las cinasas Jak (Janus cinasa) o en serina por las MAPK para una máxima actividad transcripcional. Se ha determinado que la cinasa p38 fosforila al factor Stat-3 inducido por el Cd en células LLC-PK1 (Nakagawa y col. 2007) y en células HepG2 fue mediada por la Erk 1/2 (Souza y col. 2009). Asimismo, diversos estudios, han demostrado que la activación de las MAPK por el Cd, es dependiente del tiempo de exposición (Valbonesi y col. 2009; Iwatsuki y col. 2011), de la dosis (Leal y col. 2007) y que es sensible a las ERO generadas por la NADPH oxidasa (Souza y col. 2009). Sin embargo, el tiempo en que permanecen activadas las MAPK, parece ser importante para la respuesta celular ya sea

proliferación, diferenciación o muerte celular. Estudios en cultivo de células de pulmón de rata tratadas con Cd, encontraron un incremento en la activación de Erk 1/2, p38 y Jnk, sin embargo la prolongada activación de p38 parece estar involucrada en el proceso de apoptosis ya que sólo el inhibidor de p38 disminuyó parcialmente la apoptosis inducida por el Cd (Lag y col. 2005). La apoptosis inducida por Cd, involucra vías intrínsecas y extrínsecas. La vía intrínseca es mediada por señales de estrés celular (daño al ADN) con la activación de la caspasa-9 y la extrínseca implica la activación de receptores de muerte Fas con la activación de la caspasa-8. La caspasa-8 y 9 activan a la caspasa efectora 3 y 7, que participan en la muerte celular. Por lo tanto, la generación de ERO, la alteración del potencial de membrana mitocondrial y la activación de la caspasa-9, representan los principales elementos de la vía apoptótica mitocondrial. Estudios demuestran que el Cd induce apoptosis vía caspasas (Pham y col. 2006; Lasfer y col. 2008; Lawal y Ellis 2011; Brama y col. 2012). El estudio de Pham y col. (2006), reveló un incremento en la actividad de la caspasa 9 y 3 dependiente del tiempo y la concentración de Cd, así como del factor inductor de apoptosis (AIF) en hepatocitos de rata. Ellos sugieren que la apoptosis inducida por el Cd involucra un evento primario dependiente de la mitocondria pero no necesariamente por las caspasas. Asimismo, el grupo de Kim y Soh (2009), indicaron que el Cd induce la translocación de AIF desde la mitocondria al núcleo y que las ERO son las responsables de este evento en células de testículo de rata. Se ha determinado la participación de la fosfolipasa C (PLC) y de las MAPK en la activación de las caspasas inducidas por el Cd. Esto fue demostrado en células HEK 293 tratadas con Cd, encontrando un incremento tanto en el contenido de Ca como en la actividad de la calpaína y en la activación de la caspasa 3, los cuales fueron inhibidos cuando usaron el inhibidor de PLC (U73122). Estos resultados indican que la vía de señalización mediada por la PLC está involucrada en la apoptosis inducida por Cd (Lawal y Ellis 2011). Se conoce que la vía de señalización mediada por la cinasa Erk 1/2 está implicada en procesos de proliferación celular, sin embargo hay estudios que proponen la activación de esta cinasa con procesos de apoptosis. Esto fue apoyado por los estudios realizados por Chen y col. (2008)

en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), en los cuales la inhibición de las cinasa Erk 1/2 y Jnk pero no de p38, previene parcialmente la apoptosis inducida por el Cd. Por otro lado, estudios realizados en osteoblastos que fueron pre-tratados con el inhibidor de la cinasa Erk 1/2 (PD98058), señalan una disminución en la apoptosis inducida por el Cd (Arbon y col. 2011). Se ha reportado que varios metales pesados incluyendo al Cd pueden activar la vía de señalización de la cinasa serina/treonina mTOR provocando la muerte por apoptosis. Los estudios del grupo de Chen y col. (2008), indicaron que el Cd induce la fosforilación de la cinasa serina/treonina mTOR y de sus efectores. Además, con el inhibidor de mTOR (rapamicina), se encontró disminuida tanto la fosforilación de la cinasa S6K1 como del factor de iniciación eucariótico de unión a proteína 1 (4E-BP1) con una inhibición parcial de escisión de la caspasa 3. Esto indica que la señalización por las MAPK y del mTOR está asociada a la apoptosis inducida por el Cd (Chen y col. 2008). Sin embargo, no es bien conocido el mecanismo mediante el cual los metales activan a mTOR, pero se propone que el Cd induce la generación de ERO que contribuyen a la activación de la señalización por mTOR, lo que fue evaluado por el antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) (Chen y col. 2011). Además, el mismo grupo determinó que el Cd induce la generación de ERO vía la NADPH oxidasa, que podría estar participando en la activación de mTOR, llevando a la muerte celular, en parte por la activación de la cinasa IP3K y por la inhibición de la fosfatasa PTEN. En células hepáticas (Xie y col. 2010) y neuronales (Xu y col. 2011), se demostró que el Cd eleva los niveles de calcio intracelular $[Ca^{+2}]_i$, induciendo apoptosis por la activación de las MAPK y la cinasa mTOR a través de la fosforilación de la proteína cinasa II dependiente de calmodulina /calcio (CaMKII) (Chen y col. 2011) ya que al silenciar la proteína CaMKII, disminuye la activación de la vía MAPK/mTOR y la muerte celular. Por otro lado, el Cd induce apoptosis a través de la activación p53. En células JB6 de origen epidérmico de ratón, el Cd incrementó la expresión de p53 dependiente de la concentración. Además, al transfectar las células JB6 con el siRNA para la cinasa Jnk1 o Jnk2, la expresión de p53 disminuyó más con Jnk2 que con Jnk1, así como también la toxicidad inducida por el Cd (Son y col. 2010). Recientemente, en células epiteliales

de próstata tratadas con Cd, se relacionó la inhibición en la proliferación celular con la acumulación de p53. Además, el silenciamiento de p53 mediante el siRNA, señaló que el Cd induce apoptosis y se sugiere que una mutación en p53, podría contribuir a la resistencia inducida por Cd en la carcinogénesis (Aimola y col. 2012). Se ha asociado la apoptosis inducida por el Cd vía estrés del RE (Yokouchi y col. 2008). En células H4-II-E-C3 derivadas de hepatoma de rata, se estudiaron los cambios transcripcionales mediante análisis de microarreglos, encontrando alterados los genes relacionados al estrés del RE y la apoptosis por el Cd (Permenter y col. 2011). El RE tiene un papel muy importante en el plegamiento y transporte de las proteínas, así como en la regulación de Ca intracelular. Sin embargo, si las funciones del RE son severamente dañadas, las células son removidas. El estrés del ER, es definido como la acumulación de proteínas mal plegadas y la respuesta celular a este fenómeno se denomina “respuesta a proteínas mal plegadas” (UPR) que tiene la función de transmitir la información obtenida a través de los sensores de estrés al núcleo. Esto provoca una disminución en la carga proteica que entra al retículo, así como un aumento en la capacidad del retículo para manejar las proteínas mal plegadas y por último si la homeostasis no puede ser restablecida, activar la maquinaria de muerte celular. Tres sensores de estrés del ER se han identificado en la membrana del RE; una cinasa dependiente de ARN ligada al RE (PERK), el activador del factor de transcripción 6 (ATF-6) y la proteína reclutadora de inositol 1 (IRE1). La apoptosis se puede dar por la activación de la vía IRE1 y ATF6 que promueven la expresión del factor de transcripción Chop (proteína homóloga a C/EBP). El factor Chop, la cinasa Jnk y las caspasas han sido involucradas en la activación de la apoptosis, ya que Chop disminuye la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl2. Estudios con células NIH 3T3, encontraron que el Cd provoca muerte celular vía la activación de la caspasa-12 (Biagioli y col. 2008). Mientras que en células LLC-PK1, el proceso de apoptosis provocado por el Cd fue sugerido por el factor Chop vía el ATF6 y por la activación de la cinasa Jnk vía la IRE1 (Yokouchi y col. 2008). Un estudio reciente, relaciona al estrés del RE con la señalización mitocondrial en la apoptosis inducida por el Cd. En él se ha descrito que el Cd incrementa la fosforilación del factor de

iniciación de la traducción eucariótica 2 α (eIF2 α) y la expresión del factor Chop, indicando que la vía PERK es activada por el metal. Asimismo, se indica que Chop promueve la translocación de Bax del citosol a la mitocondria provocando la liberación del citocromo c inducido por el Cd (Ji y col. 2011). Sin embargo, dependiendo de la concentración de Cd, la célula puede desarrollar respuestas de adaptación a la apoptosis inducida por el metal. Esto se evaluó en las células de linfoma humano (U937) que fueron expuestas a dosis bajas de Cd (Cui y col. 2011). Estos autores sugirieron, que el mecanismo molecular involucrado en la respuesta adaptativa, es una inhibición tanto en la generación intracelular de ERO como en la activación de la cinasa Jnk, así como una modulación en el balance entre la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Mcl-1 y pro-apoptóticas como Bim. (Figura 1).

RESPUESTA ANTIOXIDANTE

Las células cuentan con una variedad de antioxidantes endógenos de tipo enzimático y no enzimático para controlar las ERO generadas durante el estrés oxidativo. Entre los antioxidantes no enzimáticos tenemos al ácido ascórbico (vitamina C), el α -tocoferol (vitamina E), la albúmina, la MT, el GSH, por mencionar algunos. El de mayor relevancia y abundancia en la célula es el GSH que mantiene el estado de óxido reducción y es cofactor de enzimas antioxidantes como la GPX, GR, GST. El GSH es considerado como un antioxidante importante, debido a que ayuda a mantener los grupos -SH de las proteínas en estado reducido y también ayuda a remover peróxidos tóxicos. En cultivo de hepatocitos tratados con piridoxina (vit. B6), encontraron incrementado el contenido de GSH y disminuida la lipoperoxidación. Asimismo, las enzimas antioxi-

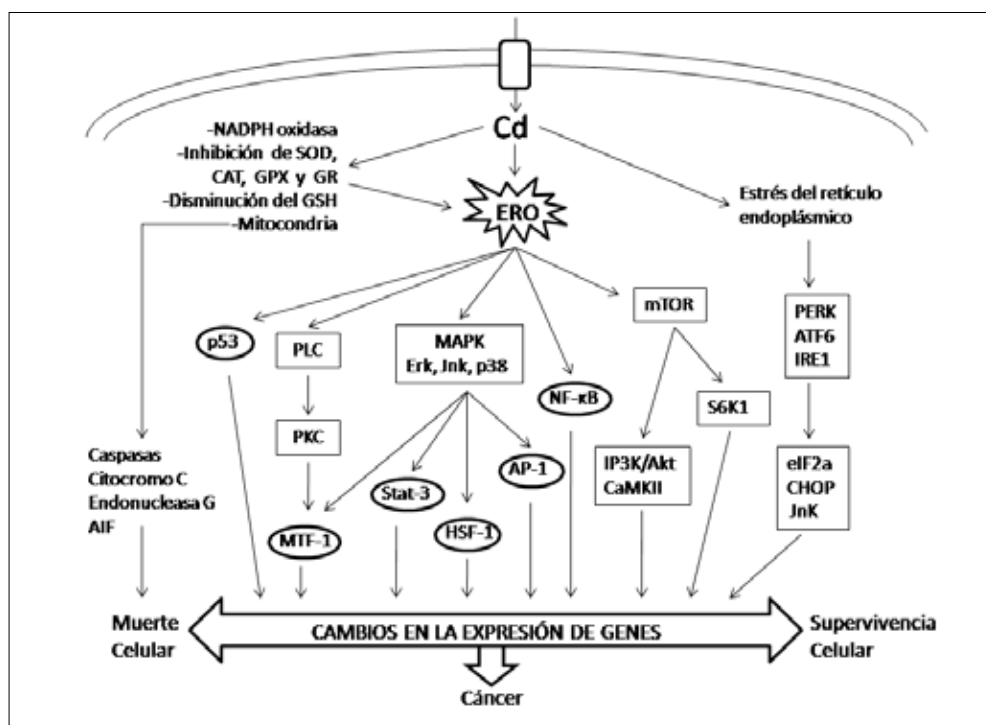


Figura 1. Efecto del cadmio en la señalización y expresión de genes. El Cd propicia la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) vía la mitocondria o la NADPH oxidasa, pero también por la inhibición de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), la glutatión reductasa (GR) o por la disminución en el contenido de glutatión (GSH). El Cd activa diferentes cascadas de señalización que son sensibles a las ERO como la fosfolipasa C (PLC), la proteína cinasa C (PKC), las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), cinasa serina/treonina mTOR, cinasa S6K1, cinasa II dependiente de calmodulina /calcio (CaMKII), cinasa dependiente de ARN ligada al RE (PERK), proteína reclutadora de inositol 1 (IRE1) y la cinasa trifosfato inositol/proteína cinasa B (PI3K/Akt). El daño en la mitocondria, así como el estrés del retículo endoplásmico y las cascadas de señalización, favorecen la activación de diversos factores de transcripción como el factor de transcripción-1 que responde a metales (MTF-1), factor de transcripción de choque térmico-1 (HSF-1), transductor de señal y activador de la transcripción-3 (Stat-3), proteína activadora-1 (AP-1), factor nuclear- κ B (NF- κ B), activador del factor de transcripción 6 (ATF-6), factor de transcripción Chop (proteína homóloga a C/EBP), factor de iniciación de la traducción eucariótica 2 α (eIF2 α), factor inductor de apoptosis (AIF) y p53 que inducen la transcripción de genes blanco que participan en varios procesos celulares tales como supervivencia, protección, cáncer o muerte celular.

dantes se recuperaron a niveles control (Wen y col. 2010). Estudios previos demuestran que las enzimas antioxidantes como la SOD, CAT, GPX, GR y GST son determinantes en la respuesta celular al estrés oxidativo y protegen a las células de la apoptosis inducida por el Cd. En células HEK293 que sobre-expresan GST, se demostró una inhibición en la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, en la liberación del citocromo c y en la activación de la caspasa 3, suprimiendo la apoptosis vía las MAPK inducida por Cd (Zhang y col. 2010). Estudios con α -tocoferol, han demostrado que colabora contra el estrés oxidante (Kara y col. 2008) y que revierte la alteración metabólica de los lípidos provocada por el Cd (Prabu y col. 2010). De igual forma se ha propuesto que el Se y el Zn pueden actuar como antioxidantes y proteger del daño inducido por el Cd. En células estelares de origen hepático (CFSC-2G) (Souza y col. 2004a), el Zn disminuyó la toxicidad inducida por el Cd por incrementar tanto el contenido de GSH como del gen de la MT y disminuir la lipoperoxidación. Por otro lado, en ratas tratadas con Se, se mantuvieron estables los niveles de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos mono y poli-insaturados alterados por el Cd (Newairy y col. 2007) y con el Zn se restauraron los niveles de GSH/GSSG y de las enzimas antioxidantes SOD, GPX (Jihen y col. 2011). Recientemente, el grupo de Galazyn y col. (2012), sugirió una correlación positiva entre la actividad de la GPX, la concentración de Se y el índice de lipoperoxidación. De igual forma, se le ha asignado al magnesio (Mg) un papel protector, especialmente en los parámetros de estrés oxidativo. La administración de Mg provocó una disminución tanto en el contenido de Cd como en los niveles de ERO y del MDA. Asimismo, la actividad de la SOD se restableció en hígado de rata, lo que podría explicar su efecto positivo (Matović y col. 2012). Por otro lado, el NAC puede bloquear la apoptosis dependiente de caspasas, por inhibir la generación de ERO generado por el Cd (Oh y Lim 2006) y por incrementar significativamente la viabilidad celular, los niveles de las enzimas CAT, GPX, GR en células hepáticas (Liu y col. 2011; Odewumi y col. 2011). Se le ha dado un papel neuroprotector a la melatonina porque disminuye los niveles de marcadores de estrés oxidativo como la lipoperoxidación y la carbonilación de proteínas inducidas por el Cd en cerebro de rata y también incrementa la

actividad de la acetilcolinesterasa (Shagirtha y col. 2011). Por otro lado, la dexametasona, una hormona que tiene varios efectos farmacológicos, incluyendo anti-inflamatorios, disminuye la formación de ERO. En cultivo de hepatocitos, la dexametasona previene el daño oxidativo a las membranas y evita cambios en el cociente GSH/GSSH inducido por el Cd (Ferrigno y col. 2010). Recientemente, el grupo de Rennolds y col. (2012), demostró que la curcuma, un antioxidante natural puede tener un efecto anti-inflamatorio, disminuyendo la secreción de la IL-6 por la vía del factor NF- κ B y la secreción de la IL-8 por la cinasa Erk 1/2 inducido por el Cd en células epiteliales. Recientemente, el grupo de Komoike y col. (2012), determinó que el salubrial suprime el daño y la muerte por apoptosis inducida por Cd en células HK-2 de origen renal humano. Estos autores señalan que el salubrial inhibe la desfosforilación tanto del factor eIF2 α , como de las cinasas Jnk, p38 y además disminuye la activación de la caspasa 3 y de la polimerasa. Aunque, no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de los antioxidantes, éstos pueden prevenir o retardar la oxidación de un sustrato biológico y en algunos casos revertir el daño oxidativo de las moléculas afectadas.

CONCLUSIÓN

El Cd es un metal altamente tóxico, por lo tanto es considerado como un contaminante ambiental muy peligroso, porque es utilizado en la manufactura de productos como pilas, pinturas, fertilizantes, galvanizado de tubos, cerámica entre otros. El Cd afecta diferentes tejidos y órganos como el hígado, riñón, pulmón, testículos y hueso. Puesto que estos efectos traen como consecuencia un problema muy grave a nivel de salud, se ha tratado de proponer estrategias para evitar la contaminación por este metal a nivel mundial. Sin embargo, el organismo puede activar diferentes cascadas de señalización que están relacionadas con respuestas de adaptación y sobrevivencia ante la presencia del metal, mecanismos que dependen tanto del tipo celular como de las condiciones de exposición.

Agradecimientos: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Aimola P., Carmignani M., Volpe AR., Di Benedetto A., Claudio L., Waalkes M.P., van Bokhoven A., Tokar E.J., Claudio P.P. Cad-

mium Induces p53-Dependent Apoptosis in Human Prostate Epithelial Cells. *PLoS One*. 2012;7(3):e33647.

Akesson A., Julin B., Wolk A. Long-term dietary cadmium intake and postmenopausal endometrial cancer incidence: a population-based prospective cohort study. *Cancer Res*. 2008;68:6435-6441.

Arbon K.S., Christensen C.M., Harvey W.A., Heggland S.J. Cadmium exposure activates the ERK signaling pathway leading to altered osteoblast gene expression and apoptotic death in Saos-2 cells. *Food Chem Toxicol*. 2011;50:198-205.

Agency for toxic substance and disease registry (ATSDR). U.S. Toxicological profile for cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta. 2007.

Badisa V.L., Latinwo L.M., Odewumi C.O., Ikediobi C.O., Badisa R.B., Brooks-Walter A., Lambert A.T., Nwoga J. Cytotoxicity and stress gene microarray analysis in cadmium-exposed CRL-1439 normal rat liver cells. *Int J Mol Med*. 2008;22:213-219.

Bakshi S., Zhang X., Godoy-Tundidor S., Cheng R.Y., Sartor M.A., Medvedovic M., Ho S.M. Transcriptome analyses in normal prostate epithelial cells exposed to low-dose cadmium: oncogenic and immunomodulations involving the action of tumor necrosis factor. *Environ Health Perspect*. 2008;116(6):769-76.

Banni M., Messaoudi I., Said L., El Heni J., Kerkeni A., Said K. Metallothionein gene expression in liver of rats exposed to cadmium and supplemented with zinc and selenium. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2010;59(3):513-519.

Belyaeva E.A., Dymkowska D., Wieckowski M.R., Wojtczak L. Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-30D cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;231:34-42.

Belyaeva E.A., Glazunov V.V., Korotkov S.M. Cd²⁺ versus Ca²⁺-produced mitochondrial membrane permeabilization: a proposed direct participation of respiratory complexes I and III. *Chem Biol Interact*. 2004;150(3):253-70.

Biagioli M., Pifferi S., Ragghianti M., Bucci S., Rizzuto R., Pinton P. Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis. *Cell Calcium*. 2008; 43:184-195.

Brama M., Politi L., Santini P., Migliaccio S., Scandurra R. Cadmium-induced apoptosis and necrosis in human osteoblasts: role of caspases and mitogen-activated protein kinases pathways. *J Endocrinol Invest*. 2012;35(2):198-208.

Cardin G.B., Mantha M., Jumarie C. Resistance to cadmium as a function of Caco-2 cell differentiation: role of reactive oxygen species in cadmium- but not zinc-induced adaptation mechanisms. *Biometals*. 2009;22:752-769.

Carrière P., Mantha M., Champagne-Paradis S., Jumarie C. Characterization of basolateral-to-apical transepithelial transport of cadmium in intestinal TC7 cell monolayers. *Biometals*. 2011;24(5):857-74.

Chen L., Liu L., Luo Y., Huang S. MAPK and mTOR pathways are involved in cadmium-induced neuronal apoptosis. *J Neurochem*. 2008;105:251-261.

Chen L., Xu B., Liu L., Luo Y., Zhou H., Chen W., Shen T., Han X., Kontos C.D., Huang S. Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death. *Free Radic Biol Med*. 2011;50:624-32.

Chen S., Xu Y., Xu B., Guo M., Zhang Z., Liu L., Ma H., Chen Z., Luo Y., Huang S., Chen L. CaMKII is involved in cadmium activation of MAPK and mTOR pathways leading to neuronal cell death. *J Neurochem*. 2011;119(5):1108-18.

Chen X., Zhu G., Gu S., Jin T., Shao C. Effects of cadmium on osteoblasts and osteoclasts *in vitro*. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009;28(2):232-6.

Chen X., Zhu G., Jin T., Lei L., Liang Y. Bone mineral density is related with previous renal dysfunction caused by cadmium exposure. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2011;32(1):46-53.

Cornet-Boyaka E., Jolivet K., Bonnegarde A., Rennolds J., Hassan F., Mehta P., Tridanda-

pani S., Webster-Marketon J., Boyaka P.N. An NF- κ B-independent and Erk1/2-dependent mechanism controls CXCL8/IL-8 responses of airway epithelial cells to cadmium. *Toxicol Sci.* 2012;125(2):418-29.

Cui Z.G., Ogawa R., Piao J.L., Hamazaki K., Feril L.B., Shimomura A., Kondo T., Inadera H. Molecular mechanisms involved in the adaptive response to cadmium-induced apoptosis in human myelomonocytic lymphoma U937 cells. *Toxicol In vitro.* 2011;25(8):1687-93.

Dorta D.J., Leite S., DeMarco K.C., Prado I.M., Rodrigues T., Mingatto F.E., Uyemura S.A., Santos A.C., Curti C. A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *J Inorg Biochem.* 2003;97:251-257.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on cadmium in food. *EFSA J.* 2009;980:1-139.

Ejnik J., Shaw C.F., Petering D.H. Mechanism of cadmium ion substitution in mammalian zinc metallothionein and metallothionein alpha domain: kinetic and structural studies. *Inorg Chem.* 2010;49(14):6525-34.

Escobar M del C., Souza V., Bucio L., Hernández E., Gómez-Quiroz L.E., Gutiérrez Ruiz M.C. MAPK activation is involved in cadmium-induced Hsp70 expression in HepG2 cells. *Toxicol Mech Methods.* 2009;19(8):503-9.

Farkas A., Erratico C., Viganó L. Assessment of the environmental significance of heavy metal pollution in surficial sediments of the River Po. *Chemosphere.* 2007;68:761-768.

Ferrigno A., Gregotti C., Richelmi P., Vairetti M. Dexamethasone protects cultured rat hepatocytes against cadmium toxicity: involvement of cellular thiols. *In vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010;46(5):445-9.

Fotakis G., Timbrell J. Role of trace elements in cadmium chloride uptake in hepatoma cell lines. *Toxicol Lett.* 2006;164(2):97-103.

Freitas M., Fernandes E. Zinc, cadmium and nickel increase the activation of NF- κ B and the release of cytokines from THP-1 monocytic

cells. *Metallomics.* 2011;3(11):1238-43.

Fujishiro H., Doi M., Enomoto S., Himeno S. High sensitivity of RBL-2H3 cells to cadmium and manganese: an implication of the role of ZIP8. *Metallomics.* 2011;3(7):710-718.

Galażyn-Sidorczuk M., Brzóska M.M., Rogalska J., Roszczenko A., Jurczuk M. Effect of zinc supplementation on glutathione peroxidase activity and selenium concentration in the serum, liver and kidney of rats chronically exposed to cadmium. *J Trace Elem Med Biol.* 2012;26(1):46-52.

Gerspacher C., Scheuber U., Schiera G., Proia P., Gygyax D., Di Liegro I. The effect of cadmium on brain cells in culture. *Int J Mol Med.* 2009;24(3):311-8.

Haase H., Ober-Blöbaum J.L., Engelhardt G., Hebel S., Rink L. Cadmium ions induce monocytic production of tumor necrosis factor- α by inhibiting mitogen activated protein kinase dephosphorylation. *Toxicol Lett.* 2010;198(2):152-8.

Haldsrud R., Krøkje A. Induction of DNA double-strand breaks in the H4IIE cell line exposed to environmentally relevant concentrations of copper, cadmium, and zinc, singly and in combinations. *J Toxicol Environ Health.* 2009;72(3-4):155-63.

Honda A., Komuro H., Hasegawa T., Seko Y., Shimada A., Nagase H., Hozumi I., Inuzuka T., Hara H., Fujiwara Y., Satoh M. Resistance of metallothionein-III null mice to cadmium-induced acute hepatotoxicity. *J Toxicol Sci.* 2010;35(2):209-15.

Hsiao C.J., Stapleton S.R. Characterization of Cd-induced molecular events prior to cellular damage in primary rat hepatocytes in culture: activation of the stress activated signal protein JNK and transcription factor AP-1. *J Biochem Mol Toxicol.* 2004;18(3):133-42.

Huang Y.H., Shih C.M., Huang C.J., Lin C.M., Chou C.M., Tsai M.L., Liu T.P., Chiu J.F., Chen C.T. Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *J Cell Biochem.* 2006;98(3):577-89.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Cadmium and cadmium compounds evaluation. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Scientific Publications, Lyon. 1993;58:119.

Ikediodi C.O., Badisa V.L., Ayuk-Takem L.T., Latinwo L.M., West J. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. *Int J Mol Med*. 2004;14(1):87-92.

Iwatsuki M., Inageda K., Matsuoka M. Cadmium induces phosphorylation and stabilization of c-Fos in HK-2 renal proximal tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;251(3):209-16.

Ji Y.L., Wang H., Zhao X.F., Wang Q., Zhang C., Zhang Y., Zhao M., Chen Y.H., Meng X.H., Xu D.X. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway mediates cadmium-induced germ cell apoptosis in testes. *Toxicol Sci*. 2011;124(2):446-59.

Jiang H., Fu K., Andrews G.K. Gene- and cell-type-specific effects of signal transduction cascades on metal-regulated gene transcription appear to be independent of changes in the phosphorylation of metal-response-element-binding transcription factor-1. *Biochem J*. 2004;382:33-41.

Jihen el H., Sonia S., Fatima H., Mohamed Tahar S., Abdelhamid K. Interrelationships between cadmium, zinc and antioxidants in the liver of the rat exposed orally to relatively high doses of cadmium and zinc. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2011;74(7):2099-104.

Kara H., Cevik A., Konar V., Dayangac A., Servi K. Effects of selenium with vitamin E and melatonin on cadmium-induced oxidative damage in rat liver and kidneys. *Biol Trace Elem Res*. 2008;125(3):236-44.

Kataranovski M., Mirkov I., Belij S., Nikolic M., Zolotarevski L., Ciric D., Kataranovski D. Lungs: remote inflammatory target of systemic cadmium administration in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009;28(2):225-31.

Kawata K., Yokoo H., Shimazaki R., Okabe S. Classification of heavy metal toxicity by human DNA microarray analysis. *Environ. Sci. Technol*. 2007;41:3769.

Kim J., Soh J. Cadmium-induced apoptosis is mediated by the translocation of AIF to the nucleus in rat testes. *Toxicol Lett*. 2009;188(1):45-51.

Komoike Y., Inamura H., Matsuoka M. Effects of salubrinal on cadmium-induced apoptosis in HK-2 human renal proximal tubular cells. *Arch Toxicol*. 2012;86(1):37-44.

Kundu S., Sengupta S., Bhattacharyya A. EGFR upregulates inflammatory and proliferative responses in human lung adenocarcinoma cell line (A549), induced by lower dose of cadmium chloride. *Inhal Toxicol*. 2011;23(6):339-48.

L'Azou B, Dubus I, Ohayon-Courtès C, Cambar J. Human glomerular mesangial IP15 cell line as a suitable model for *in vitro* cadmium cytotoxicity studies. *Cell Biol Toxicol*. 2007;23(4):267-78.

Lag M., Refsnes M., Lilleaas E.M., Holme J.A., Becher R., Schwarze P.E. Role of mitogen activated protein kinases and protein kinase C in cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells. *Toxicology*. 2005;211:253-264.

Lag M., Rodionov D., Ovrevik J., Bakke O., Schwarze P.E., Refsnes M. Cadmium-induced inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity: Expression and release of cytokines in fibroblasts, epithelial cells and macrophages. *Toxicol Lett*. 2010;193(3):252-60.

Lasfer M., Vadrot N., Aoudjehane L., Conti F., Bringuier A.F., Feldmann G., Reyl-Desmars F. Cadmium induces mitochondria-dependent apoptosis of normal human hepatocytes. *Cell Biol Toxicol*. 2008;24(1):55-62.

Lawal A.O., Ellis E.M. Phospholipase C Mediates Cadmium-Dependent Apoptosis in HEK 293 Cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;110(6):510-7.

Leal R.B., Posser T., Rigon A.P., Oliveira C.S., Goncalves C.A., Gelain D.P., Dunkley P.R. Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology*. 2007;234(1-2):34-43.

Lei Y.X., Wei L., Wang M., Wu G.R, Li M. Malignant transformation and abnormal expres-

sion of eukaryotic initiation factor in bronchial epithelial cells induced by cadmium chloride. *Biomed Environ Sci.* 2008;21(4):332-8.

Li G.Y., Kim M., Kim J.H., Lee M.O., Chung J.H., Lee B.H. Gene expression profiling in human lung fibroblast following cadmium exposure. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:1131.

Lin M.C., Liu Y.C., Tam M.F., Lu Y.J., Hsieh Y.T., Lin L.Y. PTEN interacts with metal-responsive transcription factor 1 and stimulates its transcriptional activity. *Biochem J.* 2012;441(1):367-77.

Liu J., Qu W., Kadiiska M.B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;238:209-214.

Liu T., He W., Yan C., Qi Y., Zhang Y. Roles of reactive oxygen species and mitochondria in cadmium-induced injury of liver cells. *Toxicol Ind Health.* 2011;27(3):249-56.

Liu Z., Yu X., Shaikh Z.A. Rapid activation of ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells by cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;228:286-294.

Luparello C., Longo A., Vetrano M. Exposure to cadmium chloride influences astrocyte-elevated gene-1 (AEG-1) expression in MDA-MB231 human breast cancer cells. *Biochimie.* 2012;94(1):207-13.

Mantha M., El Idrissi L., Leclerc-Beaulieu T., Jumarie C. Fe- and Zn-induced inhibition of Cd uptake in human lung cell lines: Speciation studies with H441 and A549 cells. *Toxicol In vitro.* 2011;25(8):1701-1711.

Mao W.P., Zhang N.N., Zhou F.Y., Li W.X., Liu H.Y., Feng J., Zhou L., Wei C.J., Pan Y.B., He Z.J. Cadmium directly induced mitochondrial dysfunction of human embryonic kidney cells. *Hum Exp Toxicol.* 2011;30(8):920-9.

Matović V., Buha A., Bulat Z., Dukić-Ćosić D., Miljković M., Ivanišević J., Kotur-Stevuljević J. Route-dependent effects of cadmium/cadmium and magnesium acute treatment on parameters of oxidative stress in rat liver. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(3-4):552-557.

Mortensen M.E., Wong L.Y., Osterloh J.D. Smoking status and urine cadmium above levels associated with subclinical renal effects in U.S. adults without chronic kidney disease. *Int J Hyg Environ Health.* 2011;214(4):305-10.

Moulis J.M., Thévenod F. New perspectives in cadmium toxicity: an introduction. *Biometals.* 2010;23(5):763-768.

Mukhopadhyay D., Mitra A., Nandi P., Varghese A.C., Murmu N., Chowdhury R, Chaudhuri K., Bhattacharyya A.K. Expression of metallothionein-1 (MT-1) mRNA in the rat testes and liver after cadmium injection. *Syst Biol Reprod Med.* 2009;55(5-6):188-92.

Nakagawa J., Nishitai G., Inageda K., Matsuoka M. Phosphorylation of Stats at Ser727 in renal proximal tubular epithelial cells exposed to cadmium. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2007;24(3):252-9.

Napolitano J.R., Liu M.J., Bao S., Crawford M., Nana-Sinkam P., Cormet-Boyaka E., Knoell D.L. Cadmium-mediated toxicity of lung epithelia is enhanced through NF- κ B transcriptional activation of the human zinc transporter ZIP8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302(9):L909-18 .

Nemmiche S., Chabane-Sari D., Kadri M., Guiraud P. Cadmium chloride-induced oxidative stress and DNA damage in the human Jurkat T cell line is not linked to intracellular trace elements depletion. *Toxicol In vitro.* 2011;25(1):191-198.

Newairy A.A., El-Sharaky A.S., Badreldeen M.M., Eweda S.M., Sheweita S.A. The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. *Toxicology.* 2007;242(1-3):23-30.

Nishitai G., Matsuoka M. Differential regulation of Hsp70 expression by the JNK kinases SEK1 and MKK7 in mouse embryonic stem cells treated with cadmium. *J Cell Biochem.* 2008;104(5):1771-1780.

Nogué S., Sanz-Gallén P., Torras A., Boluda F. Chronic overexposure to cadmium fumes associated with IgA mesangial glomerulonephritis. *Occup Med.* 2004;54:265-7.

Nzengue Y., Lefebvre E., Cadet J., Favier A., Rachidi W., Steiman R., Guiraud P. Metallothionein expression in HaCaT and C6 cell lines exposed to cadmium. *J Trace Elem Med Biol.* 2009;23(4):314-23.

Nzengue Y., Steiman R., Garrel C., Lefebvre E., Guiraud P. Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: role of glutathione in the resistance to cadmium, *Toxicology.* 2008;243:193-206.

Nzengue Y., Steiman R., Rachidi W., Favier A., Guiraud P. Oxidative Stress Induced by Cadmium in the C6 Cell Line: Role of Copper and Zinc. *Biol Trace Elem Res.* 2012;146(3):410-419.

Obara A., Kamiya T., Izumi M., Hara H., Yamada H., Adachi T. Extracellular-Superoxide Dismutase expression in COS7 cells exposure to cadmium chloride. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(9):1443-1447.

Odewumi C.O., Badisa V.L., Le U.T., Latinwo L.M., Ikediobi C.O., Badisa R.B., Darling-Reed S.F. Protective effects of N-acetylcysteine against cadmium-induced damage in cultured rat normal liver cells. *Int J Mol Med.* 2011;27(2):243-8.

Oh S.H., Lim S.C. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;212(3):212-23.

Okumura F., Li Y., Itoh N., Nakanishi T., Isobe M., Andrews G.K., Kimura T. The zinc-sensing transcription factor MTF-1 mediates zinc-induced epigenetic changes in chromatin of the mouse metallothionein-I promoter. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1809(1):56-62.

Ololade I.A., Lajide L., Olumekun V.O., Oloade O.O., Ejelonu B.C. Influence of diffuse and chronic metal pollution in water and sediments on edible seafoods within Ondo oil-polluted coastal region, Nigeria. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2011;46(8):898-908.

Pan J., Plant J.A., Voulvoulis N., Oates, C.J., Ihlenfeld C. Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environ Geochem Health.* 2009;32:1-12.

Permenter M.G., Lewis J.A., Jackson D.A. Exposure to nickel, chromium, or cadmium causes distinct changes in the gene expression patterns of a rat liver derived cell line. *PLoS One.* 2011;6(11):e27730.

Pham T.N.D., Marion M., Denizeau F., Jumarie C. Cadmium-induced apoptosis in rat hepatocytes does not necessarily involve caspase-dependent pathways. *Toxicol In vitro.* 2006;20(8):1331-42.

Prabu S.M., Shagirtha K., Renugadevi J. Amelioration of cadmium-induced oxidative stress, impairment in lipids and plasma lipoproteins by the combined treatment with quercetin and α -tocopherol in rats. *J Food Sci.* 2010;75(7):T132-T140.

Rennolds J., Malireddy S., Hassan F., Triandapani S., Parinandi N., Boyaka P.N., Cormet-Boyaka E. Curcumin regulates airway epithelial cell cytokine responses to the pollutant cadmium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417(1):256-261.

Ridley W., Nishitai G., Matsuoka M. HSP110 expression is induced by cadmium exposure but is dispensable for cell survival of mouse NIH3T3 fibroblasts. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010;29(3):260-5.

Satarug S., Garrett S.H., Sens M.A., Sens D.A. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ Health Perspect.* 2010;118:182-190.

Selim M.E., Rashed el H.A., Aleisa N.A., Daghestani M.H. The protection role of heat shock protein 70 (HSP-70) in the testes of cadmium-exposed rats. *Bioinformation.* 2012;8(1):58-64.

Shagirtha K., Muthumani M., Prabu S.M. Melatonin abrogates cadmium induced oxidative stress related neurotoxicity in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(9):1039-50.

Son Y.O., Lee J.C., Hitron J.A., Pan J., Zhang Z., Shi X. Cadmium induces intracellular Ca^{2+} - and H_2O_2 -dependent apoptosis through JNK-

and p53-mediated pathways in skin epidermal cell line. *Toxicol Sci.* 2010;113(1):127-37.

Souza V., Escobar M.C., Bucio L., Hernández E., Gómez-Quiroz L.E. Guitiérrez-Ruiz. NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced- Stat3 activation in HepG2 cells. *Toxicol Lett.* 2009;187:180-186.

Souza V., Escobar M.C., Bucio L., Hernández E., Gutiérrez-Ruiz M.C. Zinc pretreatment prevents hepatic stellate cells from cadmium-produced oxidative damage. *Cell Biol Toxicol.* 2004a;20:241-251.

Souza V., Escobar M. C., Gómez-Quiroz L., Bucio L., Hernández E., Chávez Cossio E., Gutiérrez-Ruiz M.C. Acute cadmium exposure enlases AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology.* 2004b;197:213-228.

Soyupek S., Oksay T., Sütçü R., Armağan A., Gökalp O., Perk H., Delibas N. The effect of cadmium toxicity on renal nitric oxide synthase isoenzymes. *Toxicol Ind Health.* 2012;28(7):624-8.

Storelli M.M. Intake of essential minerals and metals via consumption of seafood from the Mediterranean Sea. *J Food Prot.* 2009;72(5):1116-20.

Thijssen S., Cuypers A., Maringwa J., Smeets K., Horemans N., Lambrichts L., Van Kerkhove E. Low cadmium exposure triggers a biphasic oxidative stress response in mice kidneys. *Toxicology.* 2007;236(1-2):29-41.

Tokumoto M., Ohtsu T., Honda A., Fujiwara Y., Nagase H., Satoh M. DNA microarray analysis of normal rat kidney epithelial cells treated with cadmium. *J Toxicol Sci.* 2011;36(1):127-9.

Uenishi R., Gong P., Suzuki K., Koizumi S. Cross talk of heat shock and heavy metal regulatory pathways. *Bioch Biophys Res Commun.* 2006;341:1072-1077.

Urani C., Melchiorretto P., Canevali C., Morazzoni F., Gribaldo L. Metallothionein and hsp70 expression in HepG2 cells after prolonged cadmium exposure. *Toxicol In vitro.* 2007;21(2):314-9.

Valbonesi P., Ricci L., Franzellitti S., Biondi C., Fabbri E. Effects of cadmium on MAPK signalling pathways and HSP70 expression in a human trophoblast cell line. *Placenta.* 2008;29(8):725-33.

Wang B., Li Y., Tan Y., Miao X., Liu X.D., Shao C., Yang X.H., Turdi S., Ma L.J., Ren J., Cai L. Low-Dose Cd Induces Hepatic Gene Hypermethylation, along with the Persistent Reduction of Cell Death and Increase of Cell Proliferation in Rats and Mice. *PLoS One.* 2012;7(3):e33853.

Wei L., Lei Y.X., Wu L., Wang M., Lu Q., He C.C. Alterations in the expression of translation factors as molecular markers in cadmium-exposed workers. *Biomarkers.* 2012;17(1):78-84.

Wen Y.F., Zhao J.Q., Bhadauria M., Nirala S.K. Pyridoxine mitigates cadmium induced hepatic cytotoxicity and oxidative stress. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010;30(2):169-174.

Wolff N.A., Lee W.K., Thévenod F. Role of Arf1 in endosomal trafficking of protein-metal complexes and cadmium-metallothionein-1 toxicity in kidney proximal tubule cells. *Toxicol Lett.* 2011;203(3):210-218.

Wu X., Yalowich J.C., Hasinoff B.B. Cadmium is a catalytic inhibitor of DNA topoisomerase II. *J Inorg Biochem.* 2011;105(6):833-8.

Xie Z., Zhang Y., Li A., Li P., Ji W., Huang D. Cd-induced apoptosis was mediated by the release of Ca²⁺ from intracellular Ca storage. *Toxicol Lett.* 2010;192(2):115-8.

Xu B., Chen S., Luo Y., Chen Z., Liu L., Zhou H., Chen W., Shen T., Han X., Chen L., Huang S. Calcium signaling is involved in cadmium-induced neuronal apoptosis via induction of reactive oxygen species and activation of MAPK/mTOR network. *PLoS One.* 2011;6(4):e19052.

Yamada H., Uenishi R., Suzuki K., Koizumi S. Cadmium-induced alterations of gene expression in human cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2009;28(1):61-9.

Yokouchi M., Hiramatsu N., Hayakawa K., Okamura M., Du S., Kasai A., Takano Y., Shitamura A., Shimada T., Yao J., Kitamura M. Involvement of selective reactive oxygen species

upstream of proapoptotic branches of unfolded response. *J Biol Chem*. 2008;283:4252-4260.

Zhang C., Yuan X., Mao W., Yue L., Kong X., Gao Y., Luo L., Yin Z. Inhibition of cadmium-induced apoptosis by glutathione S-transferase P1 via mitogen-activated protein kinases and mitochondrial pathways. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2010;30(2):202-208.

Zhang D., Gao J., Zhang K., Liu X., Li J. Effects of Chronic Cadmium Poisoning on Zn, Cu, Fe, Ca, and Metallothionein in Liver and Kidney of Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2012;149(1):57-63.

Zhou Z.H., Lei Y.X., Wang C.X. Analysis of aberrant methylation in DNA repair genes during malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by cadmium. *Toxicol Sci*. 2012;125(2):412-7.