

BOLETÍN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

EFFECTO DEL CADMIO SOBRE LOS NIVELES DE ZINC, TAURINA, AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISORES, PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS Y ACTIVIDAD DE LA LACTATO DESHIDROGENASA EN LA RETINA DE RATAS	
Sonia Nusetti, Jesús González, Osmar Nusetti, Edgar Zapata, Francisco Obregón y Lucimey Lima.....	95
DENSIDAD POBLACIONAL DE <i>CARDISOMA GUANHUMI</i> (LATREILLE, 1825) CRUSTACEA: BRACHYURA: GERCARCINIDAE) EN EL PARQUE NACIONAL CIÉNAGA DE ZAPATA, CUBA	
Enrique Giménez Hurtado, Yuliesky Garcés Rodríguez, Yosmel González Delgado y Andrés Hurtado Consuegra.....	110
DIATOMEAS DEL GÉNERO <i>NAVICULA</i> EN EL SISTEMA DE INUNDACIÓN DEL RÍO CAURA, VENEZUELA	
José G. Delgado, Luzmila Sánchez y Yinett M. Reverol.....	125
INVENTARIO DE ANFIBIOS Y REPTILES EN LA AGROPECUARIA SAN SEBASTIÁN, TIERRAS BAJAS DE MACHÍQUES DE PERIJÁ, ESTADO ZULIA, VENEZUELA	
Edwin Infante-Rivero y Pablo Velozo.....	138
Comunicación breve	
LISTA DE REPTILES DEL ESTADO LARA, VENEZUELA	
José Gonzalo Vázquez Rodríguez, Carlos Luis Vargas Suárez y Yamil Salim Madi Tojeiro.....	151
Nota científica	
LEUCISMO EN LA SERPIENTE RABO AMARILLO (<i>DRYMARCHON CORAIS</i>) (BOIE, 1827), (SERPENTES: COLUBRIDAE), ESTADO LARA, VENEZUELA	
Carlos Vargas.....	174
INSTRUCCIONES A LOS AUTORES.....	179

Vol.49, Nº 2, Agosto 2015

UNA REVISTA INTERNACIONAL DE BIOLOGÍA
PUBLICADA POR LA
UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA



Efecto del cadmio sobre los niveles de zinc, taurina, aminoácidos neurotransmisores, peroxidación de lípidos y actividad de la lactato deshidrogenasa en la retina de ratas

Sonia Nusetti¹, Jesús González¹, Osmar Nusetti², Edgar Zapata², Francisco Obregón³ y Lucimey Lima³

¹Laboratorio de Bioquímica, Postgrado de Biología Aplicada

²Laboratorio de Ecotoxicología, Departamento de Biología, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Venezuela

³Laboratorio de Neuroquímica, Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas
snusetti@yahoo.com

Resumen

Este estudio evaluó el efecto de dosis subletales de cadmio (Cd) sobre los niveles de zinc (Zn), ácido gamma aminobutírico (GABA), glicina, glutamato, taurina, peroxidación de lípidos de membrana y actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en la retina de ratas macho, Sprague-Dawley. Se emplearon cuatro grupos de ratas: uno de control y tres tratados con 10, 30 y 60 ppm de CdCl₂, en el agua de beber durante 30 días, respectivamente. El Cd y el Zn fueron cuantificados mediante espectroscopía de emisión óptica inductivamente acoplado a plasma (ICP-OES), niveles de los aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), LDH y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico "TBARS" a través de espectrometría de luz visible. El Cd se acumuló en la retina a partir de 10 ppm (0,14±0,06 ppb) con máximo valor a 30 (0,27±0,06 ppb) y 60 ppm (0,21±0,05 ppb) de CdCl₂, sin alteración de los niveles de Zn, GABA y glicina. Las dosis más altas de Cd ejercieron efectos diferenciales significativos sobre los aminoácidos, TBARS y LDH. Los niveles de taurina disminuyeron a partir de 30 ppm y los de glutamato a los 60 ppm de CdCl₂. La actividad de LDH disminuyó a 60 ppm y los contenidos de TBARS aumentaron a partir de 30 ppm de CdCl₂. En general, el cadmio generó estrés oxidativo y alteró la concentración de aminoácidos importantes en los procesos de señalización de la función de la retina, además, causó variaciones en la LDH que implica anomalías en el metabolismo energético del tejido.

Palabras clave: Aminoácidos; cadmio; lactato deshidrogenasa; rata; retina; TBARS; zinc.

Effects of cadmium on the levels of zinc, taurine, neurotransmitter amino acids, membrane lipid peroxidation and lactate dehydrogenase in rat retina

Abstract

This study examined the sublethal effects of changing cadmium (Cd) doses on the levels of zinc (Zn), gamma amino butyric acid (GABA), glycine, glutamate, taurine, membrane lipid peroxidation and lactate dehydrogenase activity (LDH) in the retina of male rats, Sprague Dawley. The rats were divided into four groups: a control, and three groups treated with 10, 30 and 60 ppm CdCl₂ in the drinking water, respectively, for 30 days. Cd and Zn in the tissue were measured by optical emission spectroscopy inductively coupled to plasma (ICP-OES). Glycine, GABA, glutamate, taurine were determined by high performance liquid chromatography (HPLC); the activity of LDH and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration by visible light spectrometry. Cadmium accumulated in the retina reaching maximal value at 30 and 60 ppm CdCl₂, without alteration of Zn, GABA and glycine levels. Higher doses of CdCl₂ exerted significant differential effects on other biochemical parameters. Taurine levels decreased from 30 ppm CdCl₂, while glutamate decreased at a dose of 60 ppm CdCl₂. The LDH activity decreased at a dose of 60 ppm CdCl₂ and TBARS levels increased in correspondence to the higher CdCl₂ concentration. In conclusion, Cd generates oxidative stress, changing concentrations of important amino acids for signaling and function of the rat retina, and alteration in the LDH activity, which may have dysfunctional implications in the tissue.

Key words: Amino acids; cadmium; lactate dehydrogenase; rat; retina; TBARS; zinc.

Introducción

El cadmio (Cd) es un metal pesado, considerado como un contaminante ambiental de peligrosidad para la salud pública (Pérez y Azcona 2012). La bioacumulación de Cd en los tejidos puede resultar en una sobreproducción de radicales libres (RL), especialmente las especies reactivas de oxígeno (EROS), que generan daños a nivel molecular y celular (Cuypers *et al.* 2010). El metal también puede actuar desplazando a otros iones metálicos, principalmente zinc (Zn²⁺) en metaloenzimas y estructuras biológicas que contienen grupos-SH, alterando la estructura y función de las macromoléculas, y concomitante disfunción celular o muerte celular programada (apoptosis) (Moullis 2010).

La exposición humana al Cd resulta en una acumulación del metal en diversos tejidos, lo que genera un amplio espectro de efectos tóxicos que incluyen: hepatotoxicidad,

nefrotoxicidad, toxicidad pulmonar, pancreática, testicular y trastornos degenerativos del sistema nervioso central (SNC) (Pérez y Azcona 2012). En la retina, la acumulación de Cd se ha vinculado con el desarrollo de distintas patologías tales como: degeneración macular asociada con la edad (ARMD), glaucoma, cataratas y pérdida de la visión (Cheng *et al.* 2000). La neurotoxicidad generada por la exposición al Cd se ha asociado al efecto global del estrés oxidativo y a una serie de perturbaciones en el metabolismo del cerebro (Caride *et al.* 2010).

En diferentes regiones cerebrales de diversas especies de animales, de distintas edades expuestos a Cd se han detectado alteraciones en el metabolismo de las aminos biógenas (dopamina, serotonina y norepinefrina) (Lafuente *et al.* 2005), de los aminoácidos neurotransmisores (ácido gamma aminobutírico (GABA), glicina y glutamato) (Fernández-Pérez *et al.* 2010) y de los neuromoduladores taurina y zinc (Brzóska y Moniuszko-Jakoniuk 2001, Fernández-Pérez *et al.* 2010).

En la retina de ratas expuestas a Cd se ha evidenciado aumento en la tasa de peroxidación lipídica y alteración ultraestructural en la capa de los fotorreceptores; daños estructurales que generan anomalías en los sistemas que modulan las concentraciones y actividades de los neurotransmisores y neuromoduladores en el tejido (Roozbehi *et al.* 2007). Cualquier desequilibrio en la composición neuroquímica de la retina origina alteraciones funcionales que pueden ocasionar la muerte neuronal o enfermedades degenerativas en el tejido (Gaucher *et al.* 2012). Estos problemas representan un área de la neurotoxicología que actualmente requiere ser estudiada para determinar posibles riesgos de impacto del cadmio sobre la función de la retina.

En general, las alteraciones del metabolismo celular han sido investigados como base para la evaluación de la toxicidad del Cd (Cuypers *et al.* 2010). Este metal se ha asociado con la interrupción de los procesos metabólicos dependientes de Zn, tales como la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, y con una alteración en la actividad de enzimas que requieren al Zn como cofactor, tales como acetilcolinesterasa, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida en el cerebro de ratas (Brzóska y Moniuszko-Jakoniuk 2001). Una de las enzimas que se ha modificado en presencia del Cd es la lactato deshidrogenasa (LDH; EC 1.1.1.27), la cual ha sido utilizada para examinar anomalías en la vía glucolítica (Karthikeyan y Bavani 2009).

La producción de lactato es la ruta usual del metabolismo de la glucosa, aún bajo condiciones normales de aporte de oxígeno y glucosa en cerebro y retina (Khai *et al.* 2015). El lactato experimenta oxidación mitocondrial como fuente de energía importante en estos tejidos. La disminución de la actividad o alteración en la distribución de estas isoenzimas se ha asociado con procesos degenerativos en la retina, promovidos por el desarrollo de estrés oxidativo (Acosta y Kalloniatis 2005).

En la retina se desconocen los efectos del Cd sobre los neuromoduladores, aminoácidos neurotransmisores y la actividad de la lactato deshidrogenasa; enzima importante en el control del metabolismo energético del SNC. Las modificaciones de estos parámetros bioquímicos y de la estabilidad de las membranas por estrés oxidativo se han relacionado con enfermedades degenerativas del SNC.

El objetivo de este estudio fue evaluar la bioacumulación de Cd en la retina y su posible impacto sobre los niveles de zinc, taurina, aminoácidos neurotransmisores, actividad de la LDH y la peroxidación de membranas, cuyas alteraciones podrían revelar posibles factores etiológicos asociados al desarrollo de neuropatologías en la retina.

Materiales y métodos

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas machos de la especie *Rattus norvegicus*, cepa Sprague-Dawley, de 20 días de nacidas (150-200 g), provenientes del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Los animales se trasladaron al Laboratorio de Fisiología Animal del Departamento de Biología de la Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, donde permanecieron durante ocho días, alimentadas con ratarina (marca Protinal) y agua de beber *ad libidum*, hasta el inicio del experimento.

Exposición a cadmio

Se emplearon tres grupos de animales, cada uno conformado por 16 ratas, las cuales fueron tratadas con cloruro de cadmio anhidro (CdCl_2) a una dosis subletal de 10, 30 y 60 ppm, correspondiente a 8, 20 y 40 mg/L de Cd respectivamente, colocada en el agua de beber durante 30 días. El grupo control estuvo integrado por la misma cantidad de animales, al cual no se le suministró CdCl_2 .

Extracción de retinas

Al finalizar el tiempo de exposición de los animales al Cd, las ratas fueron anestesiadas con éter dietílico y sacrificadas por decapitación. Inmediatamente se les realizó la enucleación del ojo, y dichos órganos fueron colocados en buffer fosfato salino (BFS) 50 mM, pH 7,4 a 4° C. Luego se procedió a la disección de la retina; las del lado derecho fueron colocadas en BFS a 4° C para las determinaciones de los aminoácidos, LDH y peroxidación de membranas, y las del lado izquierdo en agua a 4° C para evaluar el contenido de cadmio y zinc.

Determinación de metales

Las retinas fueron homogeneizadas en una relación de 0,1 g/mL en agua nanopura desionizada con un homogeneizador de vidrio tipo Potter-Elvehjem. Al volumen total del homogeneizado se le realizó la digestión con 1 mL de ácido nítrico (HNO_3) concentrado en un bloque digestor a 60° C por un tiempo de 18 h. Seguidamente, aun en el bloque, se agregaron 500 μL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30% (v/v) por un tiempo de 6 h. El volumen final fue ajustado hasta 20 mL y las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta el momento de su análisis. De igual manera, se preparó un

blanco y patrones certificados de 4 ppb de Cd y 30 ppb de Zn, para verificar la pérdida de este metal durante el proceso de digestión.

La cuantificación de Cd y Zn se realizó a través de un equipo de espectroscopía de emisión óptica inductivamente acoplada a plasma (ICP-OES) modelo 5300 DV Perkin Elmer. El Cd se midió a una longitud de onda de 228,80 nm y para la calibración se emplearon patrones de Cd desde 0,1 hasta 1 ppb a un límite de detección (LD) de 0,01 ppb.

El Zn se cuantificó a una longitud de onda de 206,20 nm, se prepararon patrones del metal desde 25 hasta 1000 ppb para la calibración y el LD fue 0,1 ppb. Los resultados fueron expresados en ppb por gramos de masa húmeda del tejido.

Determinación de aminoácidos

La cuantificación de los aminoácidos en la retina se realizó conforme al protocolo descrito por Lima *et al.* (1998). Las retinas disecadas y pesadas fueron colocadas en BFS 0,1 M, a pH 7,4 y a 4°C, luego se homogeneizaron en 50 µL de ácido sulfosalicílico al 20% (v/v) y 300 µL de solución amortiguadora borato 0,4 M, pH 10,4 a 4°C. El homogeneizado se centrifugó a 35.000 g a 4°C por 20 min y el sobrenadante fue analizado por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con un detector de fluorescencia (módulo de separación Waters 2690 y el detector de fluorescencia Shimadzu RF-551); también se utilizó una columna Sulpeco LC-18,5 µm, dimensiones: 15 cm x 4,6 mm. Las concentraciones de los patrones de los distintos aminoácidos fueron de 20 a 45 ppb.

Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos fue estimada por el método de análisis de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), como indicador de daños oxidativos de membranas, con algunas modificaciones del método propuesto por Nusetti *et al.* (2001). Las retinas fueron homogeneizadas en BFS 50 mM a una concentración de 0,05 g/mL a 4°C, seguido por una centrifugación a 2.200 g por 15 min. Alícuotas de 250 µL del sobrenadante fueron añadidos en tubos eppendorf y transferidos a baño de María por 10 min a 37°C, llevados luego a un baño de hielo. Inmediatamente, se les adicionaron 250 µL de ácido tricloroacético al 20% en HCl 1 M en frío y 500 µL de ácido tiobarbitúrico al 1%, se agitaron y llevaron a un segundo baño de María a 90°C durante 10 min con agitación suave y constante. Luego, los tubos se colocaron en un baño de hielo por 10 min y fueron centrifugados a 1.000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a una celda del espectrofotómetro y se leyó la absorbancia a 532 nm a temperatura ambiente.

Lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27)

Las retinas fueron homogeneizadas en solución tampón fosfato potásico 50 mM (BF) de pH 7,4 a 4°C en una proporción de 0,05 g por mL. El homogeneizado fue

centrifugado durante 10 min a 4.000 g y el sobrenadante representó el extracto enzimático de LDH fracción citosólica. La actividad máxima de la LDH fue determinada a 25° C en seguimiento de la oxidación del NADH por piruvato a 340 nm (coef. Ext.: 6,22 mM.cm⁻¹) (Acosta y Kalloniatis 2005).

La mezcla de reacción consistió: BF 50 mM pH 7,4; NADH 0,2 mM y el extracto enzimático en un volumen de final de 1 mL a 24° C. La reacción se inició por la adición de piruvato a concentración final 0,33 mM, y se registró la absorbancia usando el espectrofotómetro PerkinElmerUV/VIS Lambda 2. La actividad de la LDH del tejido se expresó como unidad de actividad enzimática (U) por gramos de masa húmeda (U/g.m.h).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados en promedio \pm la desviación estándar de la muestra (DS) y se analizaron con el programa estadístico GraphPad V2.05. Se utilizó el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para TBARS y el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Kw) para metales, aminoácidos y actividad de la LDH. Se aceptó como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$ (Sokal y Rohlf 1981).

Resultados

Concentración de metales

Los niveles de Cd (ppb) en la retina de ratas se muestran en la figura 1. La mayor acumulación del metal se produjo en los grupos expuestos a 30 ppm ($0,27 \pm 0,06$ ppb) y 60 ppm ($0,21 \pm 0,05$ ppb) de CdCl₂, los cuales no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$, Kw=0,25). En la dosis de 10 ppm se acumuló $0,14 \pm 0,06$ ppb diferentes de 30 y 60 ppm ($*p < 0,05$, Kw=17,87).

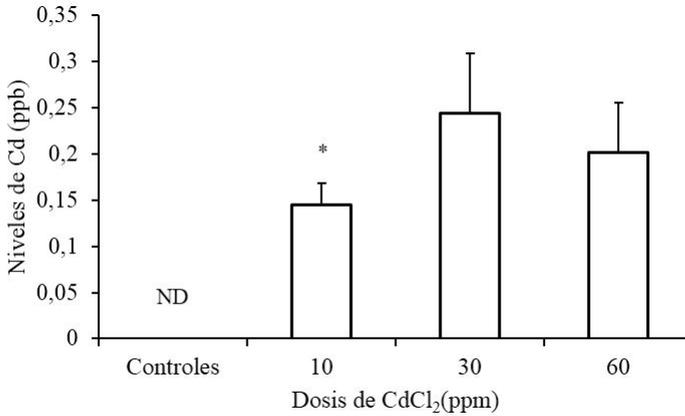


Figura 1. Niveles de cadmio en la retina de ratas expuestas a CdCl₂ en dosis de 10, 30 y 60 ppm durante un periodo de 30 días. ND: no detectable.* $p < 0,05$ diferencia significativa respecto a las dosis de 30 y 60 ppm de CdCl₂, Kw = 17, 87.

El grupo control presentó los niveles de Cd por debajo del límite de detección a través de la ICP-OES (ND). Las concentraciones de Zn (ppb) en la retina de las ratas tratadas con 10, 30 y 60 ppm de CdCl₂ no se diferenciaron de los controles, $p > 0,05$ (Fig. 2).

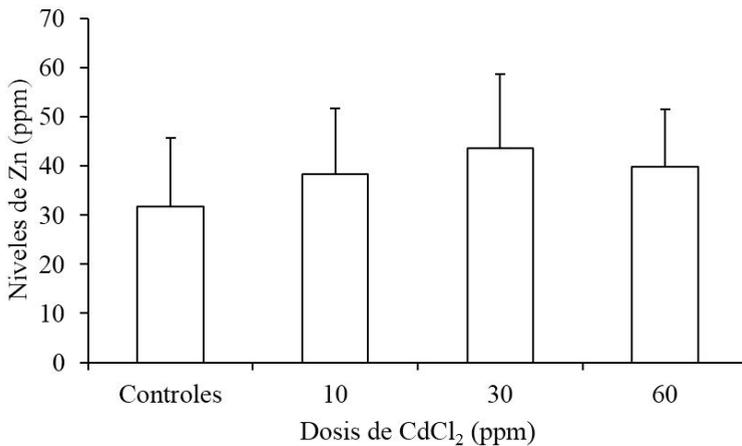


Figura 2. Niveles de zinc en la retina de ratas expuestas a CdCl₂ en dosis de 10, 30 y 60 ppm durante un periodo de 30 días.

Niveles de los aminoácidos

Los niveles de taurina disminuyeron significativamente a dosis mayores de 10 ppm de CdCl_2 con respecto al control ($*p < 0,05$, $Kw=12,55$), y no se evidenciaron diferencias significativas entre 30 y 60 ppm del metal pesado (Fig. 3A).

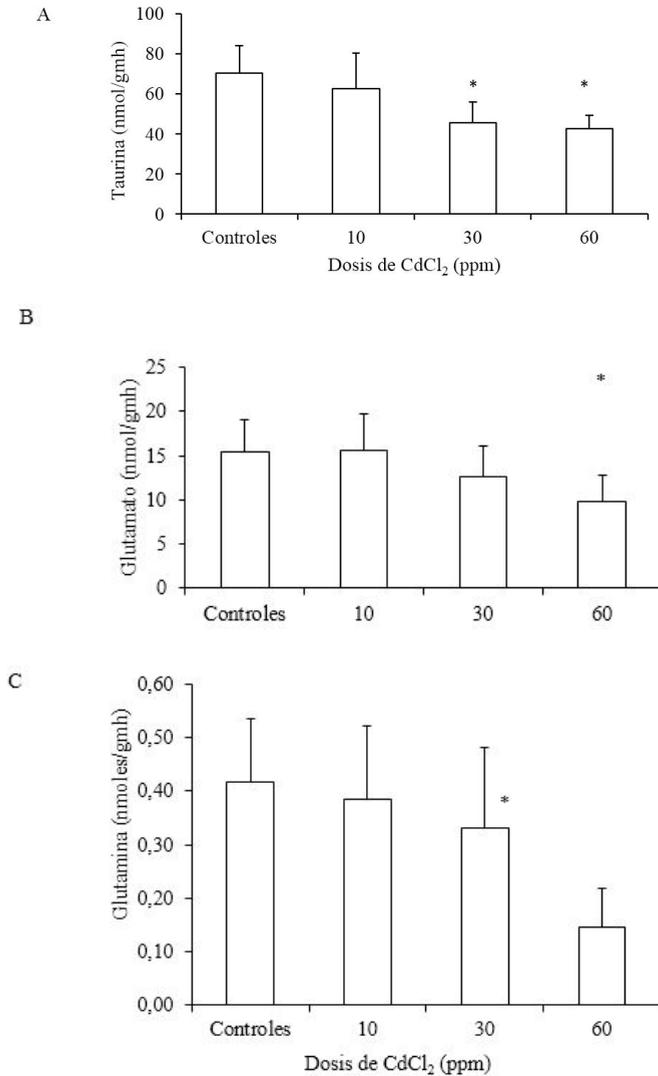


Figura 3. Concentraciones de taurina (A), glutamato (B) y glutamina (C) en retinas de ratas expuestas a CdCl_2 en dosis de 10, 30 y 60 ppm durante un periodo de 30 días.
* $p < 0,05$, diferencia significativa con respecto al control.

Los valores del glutamato y la glutamina disminuyeron con respecto al control a la dosis más alta de exposición (60 ppm). El glutamato mostró valores de $15,42 \pm 3,60$ vs $9,77 \pm 2,99$ nmoles/g.m.h, (Fig. 3B, $*p < 0,05$, Kw=10,26) y la glutamina alcanzó concentraciones de $0,42 \pm 0,18$ vs $0,15 \pm 0,08$ nmoles/g.m.h, (Fig. 3C, $*p < 0,05$, Kw=8,55). Las concentraciones de GABA y glicina no fueron modificadas por la exposición a CdCl_2 (Fig. 4).

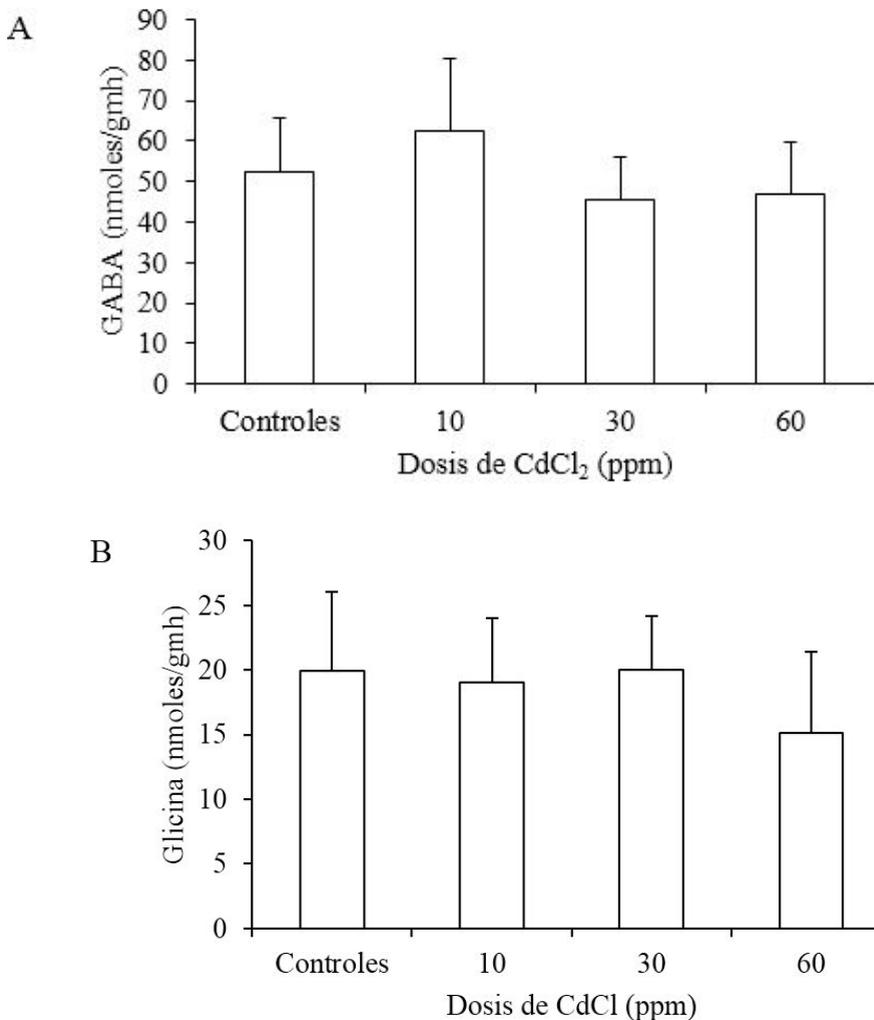


Figura 4. Concentraciones del ácido gamma aminobutírico (GABA) (A) y de glicina (B) en retinas de ratas expuestas a CdCl_2 en dosis de 10, 30 y 60 ppm durante un periodo de 30 días.

Peroxidación de lípidos

El contenido de TBARS en retina de ratas aumentó significativamente en los grupos expuestos a 30 ppm ($115,52 \pm 21,73$) y 60 ppm de Cd ($123,39 \pm 41,75$) nmoles/g.m.h. con respecto al grupo control $81,25 \pm 21,45$ nmoles/g.m.h., (** $p < 0,01$, $F_s = 7,98$); sin presentar diferencias significativas entre las dosis 30 y 60 ppm de Cd (Fig. 5).

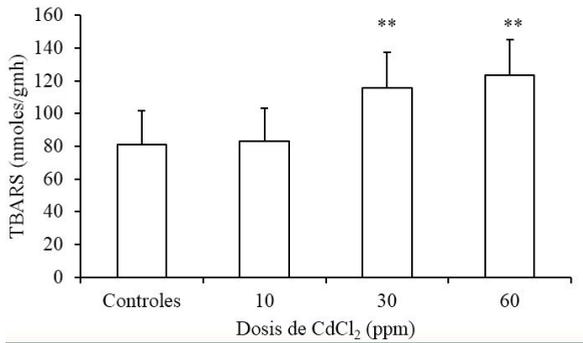


Figura 5. Valores de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en retinas de ratas expuestas a CdCl₂ en dosis de 10, 30 y 60 ppm durante un periodo de 30 días. ** $p < 0,001$ diferencia significativa con respecto al control, $F_s = 7,98$.

Actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH)

La actividad de LDH mostró una tendencia de disminución a partir de 30 ppm siendo significativa a 60 ppm (Fig. 6), con una media de $21,54 \pm 11,38$ U/g.m.h. con respecto al grupo control ($52,11 \pm 3,94$ U/g.m.h., ** $p < 0,001$; $K_w = 12,55$).

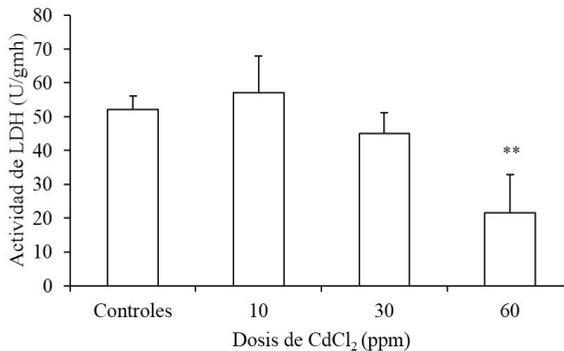


Figura 6. Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en retinas de ratas expuestas a CdCl₂ en dosis de 10, 30 y 60 ppm durante un periodo de 30 días. ** $p < 0,001$ diferencia significativa con respecto al control, $K_w = 12,55$.

Discusión

La exposición a dosis subletales de Cd, por vía oral durante 30 días, resultó en la acumulación del metal pesado en la retina de ratas. El Cd es un metal no esencial, y es poco probable que posea mecanismos de transporte específicos para entrar en las células; no obstante, se ha reportado que probablemente el Cd utiliza canales o transportadores específicos para iones esenciales u otras biomoléculas para ingresar al espacio intracelular (Brzoska y Moniuszko-Jakoniuk 2001). Se ha propuesto que el Cd se concentra en el SNC por su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), la cual permeabiliza durante la exposición crónica al metal, permitiendo su paso y concentración en el tejido (Sinha *et al.* 2008).

Una vez en el tejido cerebral, el Cd usa transportadores o canales encargados de mantener la homeostasis del Zn y de otros cationes como el calcio (Ca), cobre (Cu), hierro (Fe) y magnesio (Mg), y canales de Ca sensibles al voltaje (Himeno *et al.* 2009). En la retina también se encuentran estos transportadores que podrían ser utilizados por el Cd para acumularse en este tejido, suposición que concuerda con lo reportado por Wills *et al.* (2008).

La acumulación del Cd en la retina de las ratas fue no dosis dependiente; no se detectó diferencia significativa entre 30 y 60 ppm de Cd. No obstante, en la dosis más alta, se observó la menor actividad de la LDH, disminución en los niveles de taurina, glutamato y glutamina, y aumento en los niveles de TBARS; lo que representa un riesgo potencial de degeneración del tejido.

Los cambios bioquímicos en la retina a 30 y 60 ppm de Cd sugieren que ocurrió una distribución diferencial de este metal dentro de las células, reflejadas en las diferentes manifestaciones de toxicidad, independiente de la carga total de Cd en el tejido. Posiblemente, mecanismos homeostáticos encargados de mantener niveles tolerables del ion Cd^{+2} se activaron a fin de evitar que su acción tóxica alcanzara impactos críticos asociados con un desequilibrio en la función de la retina.

En concordancia con este criterio, se ha señalado en diversos sistemas biológicos la participación de proteínas, péptidos o aminoácidos con ligandos específicos para el metal y bombas de expulsión para controlar la toxicidad asociada con su bioacumulación en el tejido (Calabrese *et al.* 2007), además, metalotioneinas (MTs), proteínas ricas en grupos sulfhidrilos, forman complejos metal-tiolatos con el Cd y otros metales pesados, los cuales posteriormente son almacenados en lisosomas, gránulos o vesículas membranosas y de esta manera se protege la célula de la toxicidad del metal (Calabrese *et al.* 2007). Similarmente, se ha descrito la participación de sistemas de eflujo constituidas por proteínas de resistencia a múltiples drogas (MPRP) y ATPasas tipo P para aminorar la bioconcentración del Cd (Terlouw *et al.* 2002).

En relación a los análisis de los aminoácidos en la retina, se evidenció que la acumulación de Cd en las ratas modificó algunos aminoácidos en el tejido. Los

cambios en las concentraciones de taurina pueden estar asociados con una disminuida capacidad de su captación en el tejido, debido al desarrollo del daño oxidativo celular en los individuos expuestos a 30 y 60 ppm de Cd. La acumulación corporal del Cd alcanzó un umbral de concentración capaz de promover daños oxidativos en la retina, expresados por los incrementos de TBARS.

La peroxidación de lípidos de membrana puede provocar una alteración de la relación topológica entre la membrana celular y el transportador de taurina, limitando la captación del aminoácido. En concordancia con esta observación, existen evidencias que el estrés oxidativo ejerce efectos inhibitorios sobre los mecanismos de regulación del transporte activo de la taurina en cultivo de células del epitelio pigmentario de la retina (Nakashima *et al.* 2005). Similarmente, se ha descrito perturbación de la captación de taurina por condición de estrés oxidativo en células de la barrera hematoencefálica (Kang 2006).

Respecto al glutamato y a la glutamina en la retina, se observó una disminución de sus valores en las ratas expuestas a la dosis de 60 ppm de Cd, sugiriendo anomalías en la función de los transportadores o enzimas participantes en el metabolismo de los respectivos aminoácidos.

En este sentido, es factible que a la más alta concentración de Cd haya ocurrido un efecto inhibitorio de la glutamina sintetasa y glutaminasa, limitando la capacidad de producción intracelular de glutamina y glutamato respectivamente. Estas enzimas son importantes en el mantenimiento de las reservas de glutamato para su desempeño como neurotransmisor, además, es interesante destacar que Oganessian *et al.* (1994) mostraron sensibilidad de las enzimas glutaminasa y glutamina sintetasa en cerebro de ratas tras la exposición al Cd, lo cual debilita las defensas antioxidantes del tejido, puesto a que sus actividades son requeridas en la síntesis del glutatión (Aoyama *et al.* 2008, Bringmann *et al.* 2013). La posible relación de la alteración de estas enzimas con la potencial toxicidad oxidativa del Cd en la retina es un aspecto abierto a la investigación.

Alternativamente, el decrecimiento en los contenidos de estos aminoácidos puede estar asociado a un aumento de su utilización como sustratos energéticos en compensación de la deficiencia metabólica de lactato por la depresión de la actividad de la LDH.

La disminución de la actividad de la LDH afecta la disponibilidad de la glucosa como sustrato metabólico mitocondrial (Zeevalk y Nicklas 2000), en consecuencia la glutamina y glutamato experimentan una mayor tasa de oxidación en el ciclo de Krebs para sostener la demanda celular de ATP, en detrimento de la disponibilidad necesaria de estas moléculas para la función normal de diversos procesos bioquímicos en la retina (Bui *et al.* 2004, Magistretti 2009).

El aumento en la utilización del glutamato y glutamina como sustratos metabólicos puede alterar el pool de neurotransmisores y por ende desencadenar complicaciones en el impulso nervioso y funciones del tejido (Bui *et al.* 2004, Bringmann *et al.* 2013)

Adicionalmente, Bui *et al.* (2004) demostraron en retinas de ratas que una disminución en el aporte de lactato altera la prueba funcional de la retina denominada electroretinograma y que esta disfunción puede ser revertida por la administración de glutamato y glutamina.

En este estudio se demostró como la acumulación del cadmio causó estrés oxidativo y afectó distintos mecanismos bioquímicos necesarios para el mantenimiento de la función de la retina. La perturbación de los parámetros estudiados puede desencadenar disfunción y degeneración de la retina, con la progresión o desarrollo de enfermedades asociadas a la neurodegeneración.

Agradecimiento

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por financiar este proyecto CI-2-040102-1558-09 y al Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA) de la Universidad de Oriente por la cuantificación de los metales. Al Laboratorio de Neuroquímica, Centro de Biofísica-Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas por la determinación de los aminoácidos.

Literatura citada

- ACOSTA, M. Y M. KALLONIATIS. 2005. Short- and long-term enzymatic regulation secondary to metabolic insult in the rat retina. *J. Neurochem.* 92: 1350-1362.
- AOYAMA, K., M. WATABE Y T. NAKAKI. 2008. Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J. Pharmacol. Sci.* 108: 227-238.
- BRINGMANN, A., A. GROSCHE, T. PANNICKE Y A. REICHENBACH. 2013. GABA and glutamate uptake and metabolism in retinal glial (Müller) cells. *Front. Endocrinol.* 4: 1-14.
- BRZÓSKA, M. Y J. MONIUSZKO-JAKONIUK. 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem. Toxicol.* 39: 967-980.
- BUI, B., M. KALLONIATIS Y A. VINGRYS. 2004. Retinal function loss after monocarboxylate transport inhibition. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45: 584-593.
- CALABRESE, E., K. BACHMANN, A. BAILER, P. BOLGER, J. BORAK, L. CAI, N. CEDERGREEN, M. CHERIAN, C. CHIUEH, T. CLARKSON, R. COOK, D. DIAMOND, D. DOOLITTLE, D. DORATO, S. DUKE, L. FEINENDEGEN, D. GARDNER, R. HART, K. HASTINGS, A. HAYES, G. HOFFMANN, J. IVES, L. SPEAR, D. STEVENSON, Y. THOMAS, M. TUBIANA Y M. MATTSON. 2007. Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hermetic dose-response framework. *Toxicol. App. Pharmacol.* 222: 122-128.
- CARIDE, A., B. FERNÁNDEZ-PÉREZ, T. CABALEIRO, G. BERNÁRDEZ Y A. LAFUENTE. 2010. Cadmium chloride exposure modifies amino acid daily pattern in the mediobasal hypothalamus in adult male rat. *J. Appl. Toxicol.* 30:84-90.

- CHENG, A., C. PANG, A. LEUNG, J. CHUA, D. FAN Y D. LAM. 2000. The association between cigarette smoking and ocular diseases. *Hong Kong Med. J.* 6:195-202.
- CUYPERS, A., M. PLUSQUIN, T. REMANS, M. JOZEFCAK, E. KEUNEN, H. GIELEN, K. OPDENAKKER, A. NAIR, E. MUNTERS, T. ARTOIS, T. NAWROT, J. VANGRONSVELD Y K. SMEETS. 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals* 23: 927-940.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ, B., A. CARIDE, T. CABALEIRO Y A. LAFUENTE. 2010. Cadmium effects on 24h changes in glutamate, aspartate, glutamine, GABA and taurine content of rat striatum. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 24: 212-218.
- GAUCHER, D., E. ARNAULT, Z. HUSSON, N. FROGER, E. DUBUS, P. GONDOUIN, D. DHERBÉCOURT, J. DEGARDIN Y M. SIMONUTTI. 2012. Taurine deficiency damages retinal neurones: cone photoreceptors and retinal ganglion cells. *Amino Acids* 43:1979-1993
- HIMENO, S., T. YANAGIYA Y H. FUJISHIRO. 2009. The role of zinc transporters in cadmium and manganese transport in mammalian cells. *Biochemie* 91:1218-1222.
- KANG, Y. 2006. The effect of oxidative stress on the transport of taurine in an *in Vitro* model of the blood-brain barrier. *Adv. Exp. Med. Biol.* 583: 291-298.
- KARTHIKEYAN, J. Y G. BAVANI. 2009. Effect of cadmium on lactate dehydrogenase isoenzyme, succinate dehydrogenase and Na(+)-K(+)-ATPase in liver tissue of rat. *J. Environ. Biol.* 30: 895-898.
- KHAI, S., J. WOOD, G. CHIDLOW, G. HAN, T. KITIPASSORN, D. PEET Y R. CASSON. 2015. Cancer-like metabolism of the mammalian retina. *Clin. Experim. Ophthalmol.* 43: 367-376.
- LAFUENTE, A., A. GONZÁLEZ-CARRACEDO, A. CABALEIRO, T. ROMERO Y A. ESQUIFINO. 2005. Toxic effects of cadmium on the regulatory mechanism of dopamine and serotonin on prolactin secretion in adult male rats. *Toxicol. Lett.* 155: 87-96.
- LIMA, L., F. OBREGON Y P. MATUS. 1998. Taurine, glutamate and GABA modulate the outgrowth from goldfish retinal explants and its concentrations are affected by the crush of the optic nerve. *Amino Acids.* 15:195-209.
- MAGISTRETTI, P. 2009. Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *Am. J. Clin. Nutr.* 90: 875-880.
- MOULIS J. 2010. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biometals* 23:877-896.
- NAKASHIMA, E., P. RODICA, R. TOWNS, T. THOMAS, Y. HOSAKA, J. NAKAMURA, D. GREENE, P. KILLEN, J. SCHROEDER, D. LARKIN, Y. LAM HO Y M. STEVENS. 2005. Regulation of the human taurine transporter by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells stably transformed to overexpress aldose reductase. *Antioxid. Redox Signal.* 7: 1530-1542.
- NUSETTI, O., M. ESCLAPÉS, G. SALAZAR, S. NUSETTI Y S. PULIDO. 2001. Bio-markers of oxidative stress in the polychaete *Eurythoe complanata* (Amphinomidae) under short term copper exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66: 576-581.
- OGANESIAN, V., G. BUNIATIAN, K. MIKIRTUMOVA Y R. AIRAPETIAN. 1994. Effect of thiol reagents on cerebral glutaminase activity. *Vopr. Biokhim. Mozga* 9: 5-16.

- PÉREZ, P. Y M. AZCONA. 2012. Los efectos del cadmio en la salud. *Rev. Esp. Méd. Quir.* 17: 199-205.
- ROOZBEHI, A., S. ALMASI-TORK, A. PIRYASEE Y Y. SADEGHI. 2007. Effects of cadmium on photoreceptors and ganglionic cells of retinal layer in mice embryo ultrastructural study. *Ind. J. Exp. Biol.* 45: 469-474.
- SINHA, M., P. MANNA Y P. SIL. 2008. Cadmium-induced neurological disorders: prophylactic role of taurine. *J. Appl. Toxicol.* 28: 974-986.
- SOKAL, R. Y F. ROHLF. 1981. *Biometría: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Blume, Madrid, España. 775 pp.
- TERLOUW, S., C. GRAEFF Y P. SMEETS. 2002. Short and long term influences of heavy metals on anionic drug efflux from renal proximal tubule. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 301: 578-585.
- WILLS, N., V. RAMANUJAM, J. CHANG, N. KALARIYA, J. LEWIS, T. WENG Y F. KUIJK. 2008. Cadmium accumulation in the human retina: effects of age, gender, and cellular toxicity. *Exp. Eye Res.* 86: 41-51.
- ZEEVALK, G. Y W. NICKLAS. 2000. Lactate prevents the alterations in tissue amino acids, decline in ATP, and cell damage due to aglycemia in retina. *J. Neurochem* 75: 1027-1034.



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

**BOLETÍN DEL CENTRO DE
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

Vol.49 N° 2 _____

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada
en agosto de 2015, por el Fondo Editorial Serbiluz,
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve