

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Efectos neurotóxicos del cadmio sobre el sistema colinérgico a nivel del sistema nervioso central de la rata y su implicación en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Emma Sola Vendrell**

DIRECTORES

**Javier del Pino**  
**María Isabel Peligros Gómez**  
**María Teresa Frejo Moya**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

**Efectos neurotóxicos del cadmio sobre el sistema colinérgico a nivel del sistema nervioso central de la rata y su implicación en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

EMMA SOLA VENDRELL

DIRECTOR

**Javier Del Pino Sans, María Isabel Peligros Gómez, María Teresa Frejo Moya**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Programa De Doctorado en Investigación en**

**Ciencias Médico-Quirúrgicas**

**Departamento De Toxicología y Legislación Sanitaria**



**EFFECTOS NEUROTÓXICOS DEL CADMIO SOBRE EL SISTEMA  
COLINÉRGICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA  
RATA Y SU IMPLICACIÓN EN LAS ENFERMEDADES  
NEURODEGENERATIVAS**

**EMMA SOLA VENDRELL**

**Javier del Pino Sans, María Isabel Peligros Gómez, María Teresa Frejo Moya**

**Madrid, 2020**





**D. JAVIER DEL PINO SANS** Profesor Contratado Doctor del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria, **Dña. MARÍA ISABEL PELIGROS GÓMEZ**, Profesor Asociado del Departamento de Medicina Legal, Psiquiatría y Patología de la Facultad de Medicina y **Dña. MARÍA TERESA FREJO MOYA**, Profesor Titular del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Complutense de Madrid

**CERTIFICAN:** Que D. EMMA SOLA VENDRELL ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado: “EFECTOS NEUROTÓXICOS DEL CADMIO SOBRE EL SISTEMA COLINÉRGICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA Y SU IMPLICACIÓN EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS”, el cual consideramos que reúne las condiciones y la calidad científica deseadas para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste se expide el presente certificado en Madrid, a 10 de Julio de dos mil veinte.

El Director

La Directora

La Directora

Fdo.: Javier del Pino Sans

Fdo.: M<sup>a</sup> Isabel Peligros Gómez

Fdo.: M<sup>a</sup> Teresa Frejo Moya



**Deseo expresar mi agradecimiento:**

- Al Prof. Dr. Javier Del Pino Sans, por la dirección de esta Memoria, por su infinita paciencia, por proponerme el tema del proyecto, por su orientación y por el empuje recibido a lo largo de estos tres años de formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.
- A la Prof. Dra. María Isabel Peligros Gómez, por el apoyo recibido a lo largo de mi formación y en especial por la ayuda ofrecida para que pudiera realizar esta Tesis Doctoral.
- A la Prof. Dña. María Teresa Frejo Moya, por la dirección de esta Memoria, por las puntualizaciones y matices, por todas las enseñanzas y el apoyo recibido a lo largo de este período de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.



*A Lucas y Anna*



## **DEDICATORIAS**

Muchas gracias a todas las personas que me han ayudado en el desarrollo de este proyecto.

Muy especialmente a Adela, por darme el empujón que necesitaba hace tres años para empezar este viaje.

A Marisa y José Manuel, personal del laboratorio del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Gregorio Marañón, que me han ayudado con mucha comprensión, paciencia y amabilidad; y sin los que hubiera tirado la toalla más de una vez.

A mi jefa María Jesús, por compartir su experiencia, apoyarme y aconsejarme.

A mi familia, en especial a mis padres y mi marido, por su ayuda incondicional, y sin los que no hubiera sido posible llevar a cabo este proyecto.



# INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| RESUMEN.....   | 7         |
| SUMMARY .....  | 19        |
| INDICE DE ABREVIATURAS.....                            | 31        |
| <b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>                           | <b>39</b> |
| 1.1. Generalidades.....                                | 41        |
| 1.2. Cadmio .....                                      | 45        |
| 1.2.1. Características generales                       |           |
| 1.2.2. Propiedades fisicoquímicas                      |           |
| 1.2.3. Fuentes de emisión de cadmio                    |           |
| 1.2.3.1. Fuentes naturales                             |           |
| 1.2.3.2. Fuentes antropogénicas del cadmio             |           |
| 1.2.4. Fuentes de exposición                           |           |
| 1.2.4.1. Exposición laboral                            |           |
| 1.2.4.2. Exposición en población general               |           |
| 1.2.5. Vías de exposición                              |           |
| 1.2.5.1. A través del aire                             |           |
| 1.2.5.2. A través del agua                             |           |
| 1.2.5.3. A través de los alimentos                     |           |
| 1.3. Toxicocinética.....                               | 55        |
| 1.3.1. Absorción                                       |           |
| 1.3.1.1. Absorción dérmica                             |           |
| 1.3.1.2. Absorción pulmonar                            |           |
| 1.3.1.3. Absorción oral                                |           |
| 1.3.2. Distribución                                    |           |
| 1.3.3. Metabolismo                                     |           |
| 1.3.4. Excreción y eliminación                         |           |
| 1.4. Mecanismo de acción.....                          | 60        |
| 1.4.1. Transportadores de membrana y canales de calcio |           |
| 1.4.2. Neurotransmisión                                |           |
| 1.4.3. Metalotioneínas                                 |           |
| 1.4.4. Generación de radicales libres                  |           |
| 1.4.5. Inhibición de la reparación de ADN              |           |

|   |            |
|---|------------|
| 1.4.6. Reparación de la rotura de las bases (BER)   |            |
| 1.4.7. Reparación de la escisión de nucleótidos (NER)   |            |
| 1.4.8. Reparación incorrecta (MMR)  |            |
| 1.5. Toxicidad.....   | 68         |
| 1.5.1. Toxicidad renal  |            |
| 1.5.2. Toxicidad ósea   |            |
| 1.5.3. Toxicidad pulmonar   |            |
| 1.5.4. Toxicidad hepática   |            |
| 1.5.5. Toxicidad para la reproducción   |            |
| 1.5.6. Toxicidad endocrina  |            |
| 1.5.6.1. Toxicidad sobre las hormonas sexuales  |            |
| 1.5.6.2. Toxicidad sobre el sistema tiroideo  |            |
| 1.5.7. Neurotoxicidad   |            |
| 1.5.7.1. Neurotoxicidad durante el período de desarrollo del sistema nervioso   |            |
| *Alteración de la neurotransmisión  |            |
| *Alteración de las metalotioneínas  |            |
| 1.5.7.2. Efectos neurotóxicos del cadmio en la etapa adulta: alteraciones de la función cognitiva                       |            |
| *Daño sobre las neuronas colinérgicas   |            |
| *Alteración de la neurotransmisión colinérgica  |            |
| *Disfunción de la enzima GSK-3 $\beta$ , de los receptores muscarínicos y de la producción de proteínas A $\beta$ y Tau |            |
| <b>2.- JUSTIFICACIÓN.....</b>   | <b>101</b> |
| <b>3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>   | <b>109</b> |
| 3.1. Hipótesis.....   | 111        |
| 3.2. Objetivos.....   | 111        |
| <b>4.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>  | <b>113</b> |
| 4.1. Tipo de estudio.....   | 115        |
| 4.2. Sujetos del estudio.....   | 115        |
| 4.3. Protocolo experimental.....  | 116        |
| 4.4. Productos químicos.....  | 117        |
| 4.5. Administración.....  | 118        |
| 4.6. Procedimiento para la obtención de muestras.....   | 119        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.6.1. Estudios anatomopatológicos  |            |
| 4.6.1.1. Selección de las secciones y límites anatómicos de interés   |            |
| 4.6.2. Estudios para determinación de mecanismos moleculares de toxicidad   |            |
| 4.6.2.1. Prosencéfalo basal   |            |
| 4.6.2.2. Plasma   |            |
| 4.7. Criterios de evaluación de las variables resultado.....  | 124        |
| 4.7.1. Aspectos anatomopatológicos  |            |
| 4.7.1.1. Variables morfológicas   |            |
| 4.7.1.2. Variables inmunohistoquímicas  |            |
| 4.7.1.3. Análisis de las variables morfológicas e inmunohistoquímicas   |            |
| 4.7.2. Estudios de mecanismos moleculares de toxicidad  |            |
| 4.7.2.1. Análisis de la actividad de la ChAT  |            |
| 4.7.2.2. Análisis de la actividad de la AChE  |            |
| 4.7.2.3. Análisis de la concentración neuronal de ACh   |            |
| 4.7.2.4. Análisis de la inducción neuronal de estrés oxidativo  |            |
| 4.7.2.5. Análisis de bloqueo neuronal de los receptores muscarínicos M1   |            |
| 4.7.2.6. Análisis del contenido neuronal de proteínas beta-amiloides y Tau  |            |
| 4.7.2.7. Análisis del contenido de hormonas tiroideas   |            |
| 4.7.2.8. Análisis de la expresión génica  |            |
| 4.8. Análisis estadístico.....  | 141        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>   | <b>143</b> |
| 5.1. Estudio histológico de las variables morfológicas sobre la región del<br>prosencéfalo basal de ratas expuestas de manera única o continuada a cadmio.<br>Implicación de las hormonas tiroideas sobre dichas<br>alteraciones..... | 145        |
| 5.1.1. Análisis descriptivo   |            |
| 5.1.1.1. Necrosis neuronal  |            |
| 5.1.1.2. Espongiosis  |            |
| 5.1.1.3. Gliosis  |            |
| 5.1.2. Análisis de asociación   |            |
| 5.1.2.1. Necrosis neuronal  |            |
| 5.1.2.2. Espongiosis  |            |
| 5.1.2.3. Gliosis  |            |

|   |     |
|---|-----|
| 5.2. Estudio de las variables inmunohistoquímicas sobre la región del prosencéfalo basal de ratas expuestas de manera única o continuada a cadmio. Implicación de las hormonas tiroideas sobre dichas alteraciones..... | 165 |
| 5.2.1. Análisis descriptivo   |     |
| 5.2.1.1. Neuronas NeuN+   |     |
| 5.2.1.2. Neuronas ChAT+   |     |
| 5.2.1.3. Neuronas ChAT+ necróticas  |     |
| 5.2.2. Análisis de asociación   |     |
| 5.2.2.1. Neuronas NeuN+   |     |
| 5.2.2.2. Neuronas ChAT+   |     |
| 5.2.2.3. Neuronas ChAT+ necróticas  |     |
| 5.2.2.4. Neuronas ChAT+ necróticas y neuronas necróticas totales  |     |
| 5.3. Estudio de mecanismos moleculares de toxicidad a nivel del prosencéfalo basal en ratas expuestas de manera única o continuada a cadmio. Implicación de las hormonas tiroideas sobre dichas alteraciones.....       | 176 |
| 5.3.1. Actividad de la enzima ChAT  |     |
| 5.3.2. Actividad de la enzima AChE  |     |
| 5.3.3. Concentración neuronal de ACh  |     |
| 5.3.4. Inducción neuronal de estrés oxidativo   |     |
| 5.3.4.1. Concentración tisular de MDA   |     |
| 5.3.4.2. Concentración tisular de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   |     |
| 5.3.5. Bloqueo neuronal de los receptores muscarínicos M1   |     |
| 5.3.6. Contenido neuronal de proteínas beta-amiloides   |     |
| 5.3.6.1. Proteínas beta-amiloides   |     |
| 5.3.6.2. Proteína A $\beta$ 1-40 (KMB3481)  |     |
| 5.3.6.3. Proteína A $\beta$ 1-42 (KMB3441)  |     |
| 5.3.7. Contenido de proteínas Tau   |     |
| 5.3.7.1. Proteínas Tau  |     |
| 5.3.7.2. Proteínas Tau totales (tTau)   |     |
| 5.3.7.3. Proteínas Tau fosforiladas (pTau)  |     |

|  |            |
|--|------------|
| 5.3.8. Contenido de hormonas tiroideas a nivel plasmático y del PSB  |            |
| 5.3.8.1. TSH   |            |
| 5.3.8.2. Hormona T3  |            |
| 5.3.8.3. Hormona T4  |            |
| 5.4. Estudio de cambios en la expresión génica a nivel del prosencéfalo basal en ratas expuestas de manera única o continuada a cadmio. Implicación de las hormonas tiroideas sobre dichas alteraciones..... | 192        |
| 5.4.1. Ruta colinérgica  |            |
| 5.4.2. GSK-3 $\beta$   |            |
| 5.4.3. Factor de transcripción NRF2  |            |
| 5.4.4. Enzima HO-1   |            |
| 5.4.5. Enzima GPx  |            |
| 5.4.6. Receptores muscarínicos   |            |
| 5.4.6.1. Receptor muscarínico M2 (RM2)   |            |
| 5.4.6.2. Receptor muscarínico M3 (RM3)   |            |
| 5.4.6.3. Receptor muscarínico M4 (RM4)   |            |
| <b>6. DISCUSION.....</b>   | <b>203</b> |
| <b>7. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>233</b> |
| <b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>  | <b>239</b> |



# **RESUMEN**



# **Efectos neurotóxicos del cadmio sobre el sistema colinérgico a nivel del sistema nervioso central de la rata y su implicación en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas**

## **INTRODUCCIÓN**

El cadmio (Cd) es uno de los principales agentes tóxicos asociado a contaminación ambiental e industrial, que ocasiona el hombre un elevado número de intoxicaciones al año, produciendo efectos tóxicos en distintos órganos (ATSDR, 2012). A nivel del sistema nervioso central (SNC) produce alteraciones neuropatológicas y neuroquímicas que pueden conducir a una disfunción cognitiva de la que no se conocen, hasta el momento, los mecanismos implicados (Chin-Chan et al., 2015).

Se sabe que los procesos de aprendizaje y memoria son regulados por el sistema colinérgico del prosencéfalo basal (PSB), por lo que el bloqueo de la transmisión colinérgica o muerte de neuronas colinérgicas a dicho nivel podría estar relacionado con el deterioro de memoria inducido por el Cd, como se ha observado en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA). En este sentido se ha descrito que el Cd, además de alterar la transmisión colinérgica, induce una muerte neuronal no selectiva pero más pronunciada en cultivos de neuronas colinérgicas SN56 procedentes del PSB (Del Pino et al., 2014). Estas alteraciones están mediadas, en parte, por la inducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y por el bloqueo del receptor muscarínico M1 (MR1) (Del Pino et al., 2018), que a su vez desencadenan una alteración de las variantes de la acetilcolinesterasa (AChE), las cuales inducen la sobreexpresión de la enzima glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK-3  $\beta$ ) y el aumento de proteínas beta

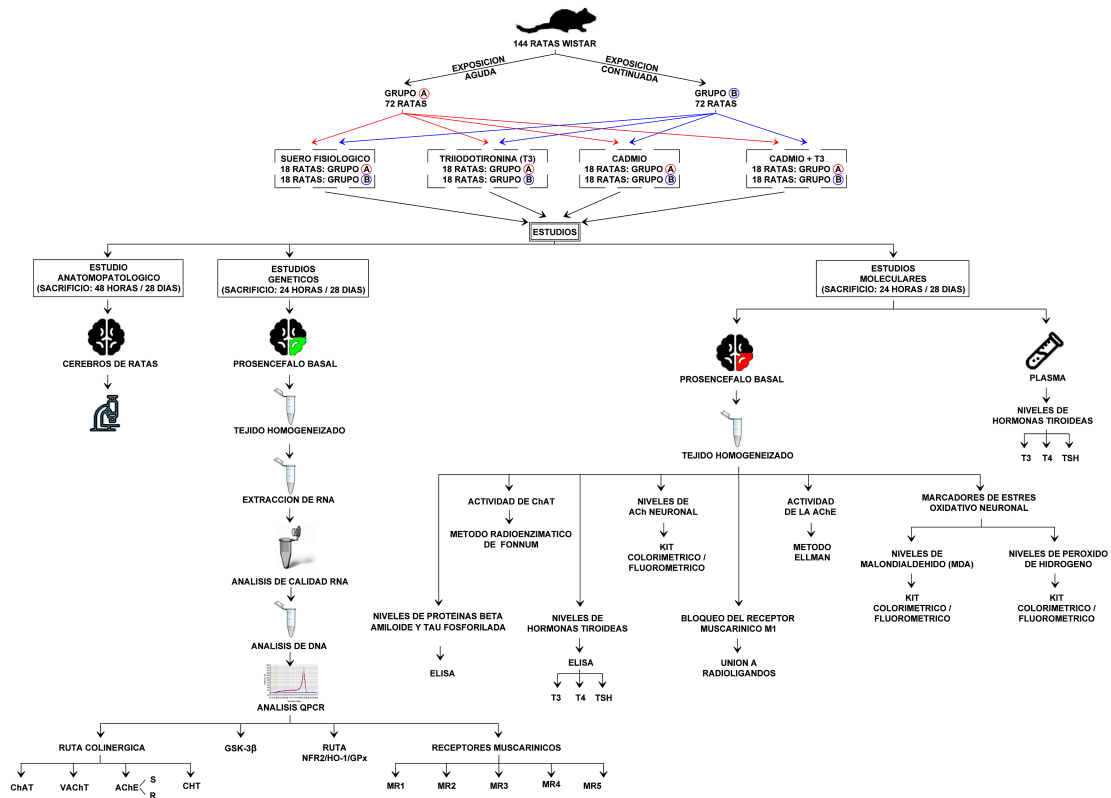
amiloideas (A $\beta$ ), Tau totales y fosforiladas (Del Pino et al., 2016a; Del Pino et al., 2016b). Por lo tanto, la reproducción de estos mecanismos *in vivo* podría confirmar su participación en las alteraciones cognitivas descritas.

Por otra parte, las hormonas tiroideas (HT) participan en el mantenimiento de las neuronas colinérgicas en el PSB (Patel et al., 1987), así como de las funciones cognitivas (Connor et al., 1991; Dubois et al., 1985), por lo que los trastornos clínicos del tiroides se asocian a deterioro cognitivo y demencia (Connor et al., 1991; Dubois et al., 1985). En este sentido, se ha descrito que existe una interrelación entre las HT y el sistema colinérgico (Mafrica et al., 2008), mediante la estimulación del metabolismo de la acetilcolina (ACh), el aumento de actividad de la AChE, así como la recaptación de la ACh liberada (Sarkar et al., 2001). Además, se ha descrito que la disminución de HT induce muerte neuronal en el PSB (Patel et al., 1987), por lo que la alteración de las HT puede desencadenar una alteración de la transmisión colinérgica que dé lugar a las alteraciones cognitivas descritas.

Se ha descrito que la exposición a Cd produce una reducción de los niveles séricos de hormonas tiroideas (HT) en ratas adultas (Mohamed et al., 2015). En consecuencia, la reducción de los niveles de HT a nivel cerebral inducidos por el Cd, podría ser la causa de la alteración de la transmisión colinérgica e inducción de muerte de las neuronas colinérgicas, produciendo los efectos cognitivos observados tras la exposición a éste.

## MATERIAL Y METODOS

Para probar nuestra hipótesis se utilizaron 144 ratas que fueron repartidas en dos grupos, de 72 animales cada uno, en función de que el experimento tuviera una duración de 24/48 horas o 28 días, respectivamente. Dentro de cada uno de estos grupos, a su vez, las ratas se separaron en cuatro subgrupos de experimentación, según recibieran tratamiento con cadmio (Cd), Cd y triiodotironina (T3), suero fisiológico o T3 (6 animales por subgrupo). Dentro de cada uno de los grupos de experimentación, un tercio de los animales (24 animales) fueron empleados para estudios anatomopatológicos, otro tercio para estudios de expresión génica y el último tercio para determinación de diferentes parámetros biomoleculares. La figura 1 representa el diseño experimental seguido en la investigación.



**Figura 1.** Representación esquemática del diseño experimental de la investigación.

Aunque existe poca información sobre la concentración de Cd que alcanza el sistema nervioso central (SNC), tras la exposición aguda o crónica al mismo, para nuestro estudio elegimos las dosis de 0,1 mg/kg y 1 mg/kg de peso corporal [equivalentes a 1/55 y 1/20 de la DL50 (la DL50 media se calculó previamente, datos no mostrados)] porque se ha descrito previamente que se corresponden con los valores observados *in vitro* que inducen muerte celular y que son las mínimas concentraciones descritas que producen alteraciones cognitivas en ratas (ATSDR, 2012; Gonçalves et al., 2010). Respecto a la dosis elegida de T3 (40 µg/kg/día por vía intraperitoneal), ésta es segura y revierte los efectos cognitivos según trabajos previos (Seyedhosseini et al., 2019).

A nivel histológico se evaluó el efecto del Cd, sólo o en co-tratamiento con T3 sobre los núcleos del PSB (núcleo septal medial, banda diagonal de Broca y núcleo basal de Meynert). Las variables evaluadas fueron la necrosis neuronal, tanto total como de neuronas colinérgicas [evaluadas con el marcador inmunohistoquímico (IHQ) ChAT (colina acetiltransferasa)], viabilidad neuronal, evaluada mediante el marcador IHQ NeuN, gliosis [evaluada con el marcador IHQ PGFA (proteína gliofibrilar ácida)] y espongiosis.

A nivel molecular las dosis seleccionadas fueron relevantes para estudiar los efectos del Cd solo o en contratamiento con T3 sobre el contenido celular, a nivel del homogeneizado de PSB, de ACh, malondialdehído (MDA), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), proteínas Aβ, proteínas Tau totales (tTau) y fosforiladas (pTau); el contenido tanto a nivel plasmático como del PSB de T3, T4 y TSH; la actividad de AChE y ChAT, así como el bloqueo MR1.

A nivel genético se evaluó la expresión de las variantes de la AChE, del transportador de colina de alta afinidad (CHT), del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), del factor de transcripción NRF2 (factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2), de los receptores muscarínicos (MR) M1-M5, y de las enzimas GSK-3 $\beta$ , ChAT, hemoxygenasa-1 (HO-1) y el antioxidante glutatión peroxidasa (GPx).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El presente estudio demuestra que la exposición a Cd, tanto de manera única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), produce una disminución significativa de hormonas T3 y T4, así como un aumento significativo de TSH, tanto a nivel plasmático como del PSB. Estos resultados muestran que el Cd es un disruptor del sistema tiroideo a las dosis y tiempos de exposición, con las consecuentes alteraciones de las funciones fisiológicas que controlan dichas hormonas.

Además, el presente estudio demuestra por primera vez que la exposición a Cd, tanto de manera única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg) induce un aumento, a nivel del PSB, del porcentaje de neuronas necróticas, tanto totales como ChAT+, siendo este efecto más pronunciado sobre las neuronas ChAT+, lo que indica que las neuronas colinérgicas son más sensibles a la toxicidad inducida por el Cd, de igual manera que se observa esta selectividad a nivel de los cuernos ventrales de la médula espinal (Sarchielli et al., 2012). Aunque nuestros resultados mostraron un aumento significativo de neuronas necróticas, tanto totales como ChAT+, no se observó una reducción significativa en el número de neuronas totales o ChAT+, ni en el grupo de ratas expuestas de manera única ni en el grupo expuesto de manera continuada. Esto significa que a la dosis y tiempos de

exposición a Cd en nuestro estudio, el daño es selectivo a nivel neuronal, sin presencia de daño difuso con desaparición de las poblaciones celulares.

Respecto a la evaluación de neuronas NeuN+, observamos una disminución significativa de neuronas NeuN+ a nivel del PSB, tanto en el caso de exposición única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg); resultados compatibles con los descritos por Sarchielli et al. (2012) en cultivos de explantes de médula espinal fetal y que se relacionan con una menor viabilidad celular, sin llegar a producirse necrosis neuronal.

La evaluación de la espongiosis y gliosis a nivel del PSB, puso de manifiesto un aumento del grado de espongiosis en los grupos de ratas expuestos a Cd, tanto de manera única como continuada. Aunque estos hallazgos están descritos en la literatura, en exposiciones continuadas y a dosis mayores que en nuestro estudio, no se han encontrado estudios que evalúen esta variable tras exposición única a Cd. A nivel del núcleo basal de Meynert, en ratas expuestas de manera única a Cd, el aumento del grado de espongiosis no fue directamente proporcional a la necrosis neuronal observada, lo que podría explicarse porque el Cd no alcance, tras dosis única, la concentración mínima necesaria para producir daño. Respecto a la gliosis, observamos un aumento del grado en todos los grupos de ratas expuestos a Cd, tanto de manera única como continuada. Este hallazgo es concordante con los observando en estudios previos, incluso a dosis de exposición menores que las utilizadas en nuestro estudio, lo que hace de la gliosis un marcador de neurotoxicidad al Cd.

Respecto a los resultados observados tras la exposición al co-tratamiento Cd+T3, la exposición tanto única como continuada puso de manifiesto una reversión parcial del

porcentaje de neuronas necróticas, tanto totales como ChAT+, así como de neuronas NeuN+ (en este caso solo tras la exposición única). Respecto a la gliosis y espongiosis, también se observó una reversión parcial del grado de las mismas, que únicamente fue significativo en el grupo expuesto de manera única y a nivel del núcleo septal medial, indicando la participación de la disrupción de las HTs sobre la neurodegeneración producida.

La exposición a Cd, tanto en el grupo expuesto de manera única, como continuada, produjo una disminución en los niveles de ACh, así como en la actividad de AChE y ChAT; no observándose cambios en la actividad de ChT ni VACHT. Estos efectos son corroborados por estudios *in vitro* sobre cultivos de neuronas colinérgicas SN56 del PSB (Del Pino et al., 2014), lo que apoya nuestros resultados. También observamos que tanto la exposición única como continuada a Cd produjo un bloqueo de los MR1, así como una disminución de la expresión génica de los MR2, MR3 y MR4 a nivel del PSB. Estos hallazgos son corroborados por los resultados publicados en otros estudios (Del Pino et al., 2016; Gupta et al., 2016). Por último, el co-tratamiento con Cd y T3 revertió parcialmente estos efectos, demostrando que el Cd altera la transmisión colinérgica a través de la disfunción de las HT.

En nuestro estudio, el Cd produjo un incremento en la generación de ERO y de la peroxidación lipídica, así como una disminución de la expresión de NRF-2, HO-1 y GPx a nivel del PSB, lo que condujo a la generación de estrés oxidativo a nivel del PSB, hecho no descrito en estudios previos *in vivo*, pero sí en otras regiones cerebrales (Gonçalves et al., 2010; Thévenod, 2009). Lo que sí está descrito, a este respecto, es que el tratamiento con Cd durante 24 horas, en cultivos de neuronas colinérgicas SN56 del PSB, produce un

incremento de ERO y peroxidación lipídica (Moyano et al., 2018), lo que confirma nuestros resultados. El estrés oxidativo se ha asociado al bloqueo de RM1 (Del Pino et al., 2016), a la inducción de muerte neuronal a nivel de la corteza frontal e hipocampo (Gupta et al., 2016), así como a la inducción de muerte de neuronas colinérgicas tanto *in vivo* como *in vitro* (Moyano et al., 2018; Traver et al., 2005). Respecto al co-tratamiento con T3 y Cd, tanto de forma única como continuada, se observó una reversión parcial de la generación de ERO, así como una menor reducción de la expresión de enzimas reguladas por NRF2, lo que indica que la generación de estrés oxidativo se encuentra en parte mediada por la disminución en los niveles de HT.

La exposición a Cd, tanto de manera única como continuada, produjo un aumento de la expresión de la variante AChE-S y una disminución de la expresión de la variante AChE-R a través de la disminución de las HT. Estos resultados son corroborados por los estudios de Del Pino et al. (2016) en neuronas colinérgicas SN56 del PSB, donde la alteración de las variantes de AChE se ha relacionado con la inducción de trastornos cognitivos (Cohen et al., 2008; Farchi et al., 2007), por lo que los resultados de nuestro estudio podrían mediar el trastorno cognitivo relacionado con la inducción de degeneración de las neuronas colinérgicas del PSB.

Por último, en nuestro estudio observamos un aumento del nivel de proteínas A $\beta$  1-40, A $\beta$  1-42, pTAu y tTAu, así como la expresión de la enzima GSK3 $\beta$  en el grupo de ratas expuesto a cadmio de manera única y continuada, a través de la disminución de las HTs. El incremento de proteínas A $\beta$  y pTAu se ha relacionado con la inducción de muerte celular a nivel de las neuronas colinérgicas del PSB y el desarrollo de alteraciones cognitivas (Avila et al., 2004; Beharry et al., 2014; Del Pino et al., 2016; Kar et al., 2004),

por lo que estas alteraciones observadas en nuestro estudio podrían estar relacionadas con las alteraciones en los procesos de aprendizaje y memoria descritos por la exposición al Cd.

## **CONCLUSIONES**

En función de todo lo expuesto se puede concluir que el Cd, tanto por exposición única como continuada, induce una alteración de la transmisión colinérgica, gliosis y neurodegeneración más pronunciada, pero no selectiva, de las neuronas colinérgicas del PSB, mediada en parte por la reducción de las HT. El Cd además produjo la inducción de ERO, el bloqueo de los receptores muscarínicos M1 y la alteración de la expresión de los receptores M2, M3, y M4, la alteración de las variantes de la AChE, la sobreexpresión de GSK-3 $\beta$ , y un aumento en las proteínas A $\beta$ , Tau totales y fosforiladas a través de la disrupción de las HT. Se ha demostrado que todos estos mecanismos alterados por el cadmio median la muerte neuronal de las neuronas colinérgicas del PSB *in vitro*, e inducen alteraciones cognitivas, por lo que podrían estar mediando estos efectos *in vivo*. Sería importante desarrollar estudios posteriores que corroboren que las HT median, a través de los mecanismos indicados, la neurodegeneración observada sobre las neuronas colinérgicas, así como los trastornos cognitivos descritos. Nuestros resultados son de gran relevancia porque aportan nuevos datos que ayudan a explicar los mecanismos de neurotoxicidad del cadmio sobre la transmisión colinérgica y neurodegeneración; necesarios tenerlos en cuenta en la evaluación del riesgo del mismo y para proporcionar nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de la intoxicación.



# **SUMMARY**



# **Neurotoxic effects of cadmium on the cholinergic system on the central nervous system of the rat and their implication in neurodegenerative diseases**

## **INTRODUCTION**

Cadmium (Cd) is one of the main toxic agents associated with environmental and industrial pollution, that causes a large number of intoxications in humans every year, producing toxic effects in several organs (ATSDR, 2012). Cd produces neuropathological and neurochemical alterations, leading to cognitive dysfunction in central nervous system (Chin-Chan et al., 2015). However, the mechanisms involved are unknown.

Learning and memory processes are regulated by the cholinergic system of the basal forebrain (BF), so the blocking of the cholinergic transmission or the induction of cell death in BF cholinergic neurons could be related to the memory deterioration observed after cadmium exposure. These dysfunctions have been observed in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. In this regard, cadmium has been described to alter cholinergic transmission and induce a non-selective neurological cell death that is more pronounced in primary cholinergic neuron from BF (Del Pino et al., 2014). These alterations are partly produced by the induction of reactive oxygen species and by the blocking of muscarinic receptors M1, which trigger a modification in the acetylcholinesterase (AChE) variants expression (Del Pino et al., 2018). These alterations lead to the over-expression of the glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 $\beta$ ) and the increase of beta amyloid (A $\beta$ ), total and phosphorylated Tau proteins (Del Pino et al., 2016a; Del Pino et al., 2016b). Therefore, the reproductions of

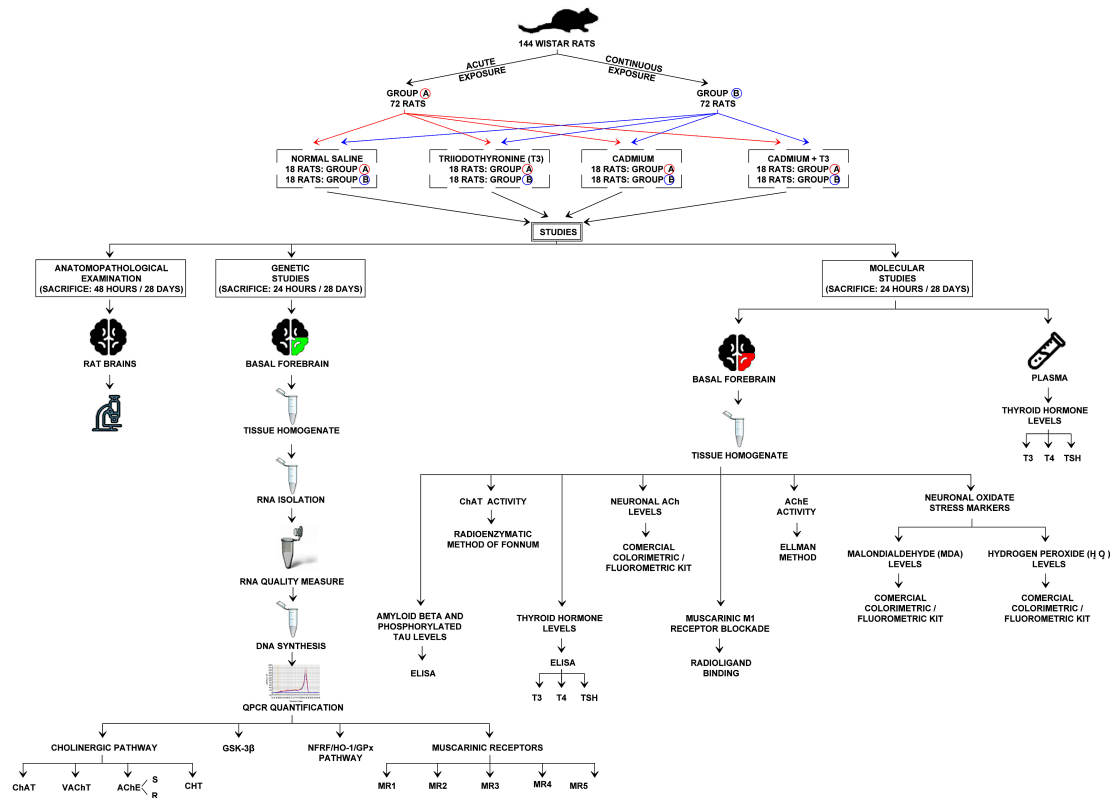
these mechanisms *in vivo* could confirm their participation in the cognitive modifications described.

On the other hand, thyroid hormones participate in the maintenance of basal forebrain cholinergic neurons (Patel et al., 1987), as well as of the cognitive functions (Connor et al., 1991; Dubois et al., 1985). Hence, thyroid clinical disorders are associated with dementia and cognitive deterioration (Connor et al., 1991; Dubois et al., 1985). In this way, an interrelation between thyroid hormones and the cholinergic system (Mafrica et al., 2008), through the stimulation of the acetylcholine (ACh) metabolism, the increase of AChE activity, as well as on ACh released has been described (Sarkar et al., 2001). It has also been described that the decrease in thyroid hormones induces neuronal death in the basal forebrain (Patel et al., 1987). Thus, thyroid hormones disruption could trigger an alteration of the cholinergic transmission, which may induce the cognitive alteration described.

It has been found that Cd exposure—produces a reduction in the serum levels of thyroid hormones in adult rats (Mohamed et al., 2015). Thus, the reduction of thyroid hormone levels at in the brain induced by Cd, could be the cause of the alteration in the cholinergic transmission and the induction of cholinergic neurons cell death, producing the cognitive effects observed after Cd exposure.

## MATERIAL AND METHODS

To test our hypothesis, we used 144 rats that were divided into two groups, 72 animals in each one, depending on whether the experiment lasted 24/48 hours or 28 days, respectively. At the same time, within each of these groups, the rats were separated into four experimentation subgroups, depending on whether they were treated with cadmium, cadmium and triiodothyronine (T3), vehicle, or T3 (6 animals per subgroup). Each one of these experimental groups was subdivided in three subgroups: animals (24 animals) used for anatomic-pathological studies, for gene expression studies, and for the determination of different biomolecular parameters. Figure 1 represents the experimental design followed in the research.



**Figure 1.** Summarizes the protocol and experimental design.

Although there is little information on the cadmium concentration that reaches the central nervous system after acute or chronic exposure, for our study we chose the doses of 0.1 and 1 mg/Kg of body weight [equivalents to 1/55 and 1/20 of the LD<sub>50</sub> (LD<sub>50</sub> average was calculated previously, data not shown)] because they have been previously described to correspond to the values that induce cell death *in vitro* and because they are the minimum concentrations described to produce cognitive alterations after Cd exposure in rats (ATSDR, 2012; Gonçalves et al., 2010). The T3 dose chosen (40 ug/kg/day intraperitoneally) was selected because it is a safe dose and it reverses the cognitive effects according to previous studies (Seyedhosseini et al., 2019).

We evaluated the histological effects of cadmium, by itself or after co-treatment with T3, on the nuclei of the basal forebrain (medial septal nuclei, diagonal band of Broca and basal nucleus of Meynert). The variables evaluated were neuronal necrosis, both on all types of neurons and only on the cholinergic neurons [evaluated with the immunohistochemical marker ChAT (choline acetyltransferase)]; neuronal viability, evaluated with the immunohistochemical marker NeuN, gliosis [evaluated with the immunohistochemical marker GFAP (glial fibrillary acidic protein)] and spongiosis.

Otherwise, we studied, at a molecular level, the Cd effects, alone or in combination with T3, on the cell content of ACh, malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), A $\beta$  proteins and total (tTau) and phosphorylated Tau (pTau) proteins; the content of T3, thyroxine (T4) and thyroid stimulating hormone (TSH) both in plasma and BF; the activity of AChE and ChAT enzymes, as well as the blockage of muscarinic receptor MR1.

Finally, we evaluated the expression of the AChE variants, the presynaptic choline transporter (CHT), the vesicular acetylcholine transporter (VAChT), the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), muscarinic receptors (MR) M1-M5, and of the GSK3 $\beta$ , ChAT, hemo oxygenase 1 (HO-1) and the glutathione peroxidase antioxidant (GPx) enzymes.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The present study proves that after acute (1mg/Kg) or continuous (0,1mg/Kg) Cd exposure, a significant increase of TSH levels in plasma and BF is produced. These results show that Cd is a thyroid system disruptor at these doses and times of exposure, with the consequent alterations of the physiological functions that said hormones control.

Our results prove also, for the first time, that Cd exposure after one (1mg/Kg) or continuous (0,1mg/Kg) treatment, induces an increase in the percentage of total and ChAT+ necrotic neurons, in BF; showing that the cholinergic neurons are more sensitive to the toxicity induced by Cd, as previously described in ventral horns of the spinal cord (Sarchielli et al., 2012). Although our results showed a significant increase of total and ChAT+ necrotic neurons, a significant reduction in the number of total or ChAT+ neurons was not observed, neither in the group of rats exposed to one dose nor in the group exposed continuously. This means that at the doses and times of Cd exposure in our study, the damage is selective at neuronal level, without induction of diffused damage and cell populations loss.

Regarding the evaluation of NeuN<sup>+</sup> neurons, we observe a substantial decrease of NeuN<sup>+</sup> neurons after single (1mg/Kg) and continuous treatment (0,1 mg/Kg) in BF, as previously described by Sarchielli et al. (2012) in explant cultures of fetal spinal cord, and related with a reduction of cellular viability, but not reaching a significant neuronal necrosis.

The evaluation of spongiosis and gliosis in BF, revealed an increase in spongiosis after single and repeated Cd exposure. Although these findings are described in the literature, after continuous exposures and at higher doses than in our study, no studies have evaluated this variable after unique Cd exposure. After single Cd treatment, the increase in spongiosis was not directly proportionate to the neuronal necrosis observed in Meynert's basal nucleus, which could be explained because Cd does not reach, after a single dose, the minimum concentration necessary to produce damage. Besides, we observed an increase of gliosis in all the groups after single and repeated Cd exposure. This finding is consistent with those observed in previous studies, even with a lower dose of Cd exposure than those used in our study, which turns gliosis into a marker for Cd neurotoxicity.

Following single and repeated co-treatment with Cd and T3, we observed a partial reversion of the percentage of total and ChAT<sup>+</sup> necrotic neurons, as well as NeuN<sup>+</sup> neurons (in this case only after acute exposure). Besides, we observed a partial reversion of gliosis and spongiosis, that was only significant after acute exposure in the medial septal nucleus, denoting the involvement of thyroid hormones disruption on the neurodegeneration produced.

Otherwise, single and repeated Cd exposure produced a decrease in the Ach levels, as well as in the AChE and ChAT activity, but no changes were observed in ChT or VAChT activity. These effects are corroborated by studies *in vitro* in SN56 cholinergic neuron from BF (Del Pino et al., 2014), which support our results. We also observed that following single and repeated Cd treatment a blockage of MR1, as well as the gene expression decrease of MR2, MR3 and MR4 was produced in BF. These findings are supported by the results published in other studies (Del Pino et al., 2016; Gupta et al., 2016). Finally, the co-treatment with Cd and T3 partially reversed these effects showing that Cd alters the cholinergic transmission through the thyroid hormone dysfunction.

Besides, Cd produced an increase in ROS generation lipid peroxidation, as well as a decrease in NRF-2, HO-1 and GPx expression, which led to oxidative stress generation in BF, a fact that has not been previously described *in vivo* in this region, although it has been observed in other brain regions (Goncalves et al., 2010, Thevenod, 2009). In this sense, Cd single treatment was reported to induce an increase of ROS generation and lipid peroxidation in SN56 cholinergic neurons from BF (Moyano et al., 2018), which confirms our results. Oxidative stress has been associated to the blocking of MR1 (Del Pino et al., 2016), the neuronal cell death induction in frontal cortex and hippocampus (Gupta et al., 2016), as well as cholinergic neuronal cell death both *in vivo* and *in vitro* (Moyano et al., 2018; Traver et al., 2005).

Lastly, single and long-term Cd co-treatment with T3 produced a partial reversion of ROS generation, as well as a smaller reversion in the altered expression of the enzymes regulated by NRF2, which indicates that oxidative stress generation is produced, in part, through the thyroid hormones decrease.

Acute and long-term Cd treatment produced also an increase in the expression of the AChE-S variant and a decrease in the expression of the AChE-R variant mediated by the thyroid hormones decrease. These results are corroborated by Del Pino et al. (2016) studies in SN56 cholinergic neurons from BF. The alterations of the AChE variants have been associated with the induction of cognitive dysfunctions (Cohen et al., 2008; Farchi et al., 2007), so the AChE variants alteration observed in our study could mediate the cognitive dysfunction through the induction of cholinergic neurons degeneration in BF.

Finally, we observed an increase in A $\beta$  1-40, A $\beta$  1-42, and pTAu protein levels, as well as in the expression of the GSK3 $\beta$  enzyme after single and repeated cadmium exposure mediated by the decrease of thyroid hormones. The increase of A $\beta$  and pTAu proteins has been related to the induction of cholinergic neuronal cell death in BF and cognitive alterations (Avila et al., 2004; Beharry et al., 2014; Del Pino et al., 2016; Kar et al., 2004), so the alterations observed in our study could be related to the alterations in learning and memory described after Cd exposure.

## **CONCLUSIONS**

Based on the above, we can conclude that Cd, after acute and chronic exposure, induces an alteration of the cholinergic transmission, gliosis and neurodegeneration that is more pronounced, but not selective, on basal forebrain cholinergic neurons, mediated in part by the reduction of thyroid hormones. Cadmium also produced an induction of ROS generation, the blockage of the muscarinic MR1 receptors, the alteration of MR2, MR3 and MR4 receptors expression, the AChE variants and GSK-3 $\beta$  enzymes expression, and an increase in total and phosphorylated A $\beta$  Tau proteins formation

through the disruption of thyroid hormones. All these mechanisms, altered by Cd, have been shown to mediate the basal forebrain cholinergic neuronal cell death *in vitro*, and induce cognitive alterations, so they could be mediating these effects *in vivo*. It would be important to develop further studies that corroborated that thyroid hormones mediate, through the indicated mechanisms, the neurodegeneration observed on cholinergic neurons and the cognitive disorder described. Our results are of great interest because they provide new data and could lead to a better understanding of the mechanisms of the cadmium neurotoxicity on cholinergic transmission and neurodegeneration that should be taken into account in the risk assessment of this compound and may provide new therapeutic strategies for the treatment of its intoxication.



## **INDICE DE ABREVIATURAS**



|  |  |
|--|--|
| <b>A<math>\beta</math>:</b>                        | Proteína beta amiloide                                     |
| <b>ACT<math>\beta</math>:</b>                      | Gen de la beta actina                                      |
| <b>ACh:</b>  | Acetilcolina   |
| <b>AChE:</b>                                       | Acetilcolinesterasa  |
| <b>ADN:</b>  | Ácido desoxirribonucleico                                  |
| <b>AhR:</b>  | Receptor de hidrocarburos aromáticos                       |
| <b>AP:</b>   | Sitios apurínicos-apirimidínicos                           |
| <b>ARN:</b>  | Ácido ribonucleico   |
| <b>As:</b>   | Arsénico   |
| <b>ATSDR:</b>                                      | Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades |
| <b><math>\beta</math>APP:</b>                      | Proteína precursora beta amiloidea                         |
| <b>BALF:</b>                                       | Líquido de lavado broncoalveolar                           |
| <b>BER:</b>  | Reparación de la ruptura de las bases                      |
| <b>BF:</b>   | Basal forebrain  |
| <b>BHE:</b>  | Barrera hematoencefálica                                   |
| <b>C:</b>  | Citosina   |
| <b>Ca:</b>   | Calcio   |
| <b>CAS:</b>  | Chemical Abstracts Service                                 |
| <b>CAT:</b>  | Catalasa   |
| <b>Cd:</b>   | Cadmio   |
| <b>(Cd<sub>2</sub>)<sup>+</sup>:</b>               | Cadmio iónico  |
| <b>Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>:</b>             | Nitrato de cadmio  |
| <b>Cd<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>:</b> | Ortofosfato de cadmio                                      |
| <b>CdBr<sub>2</sub>:</b>                           | Bromuro de cadmio  |
| <b>CdCl<sub>2</sub>:</b>                           | Cloruro de cadmio  |

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <b>CdCO<sub>3</sub>:</b>   | Carbonato de cadmio                              |
| <b>CdF<sub>2</sub>:</b>    | Fluoruro de cadmio                               |
| <b>CdI<sub>2</sub>:</b>    | Ioduro de cadmio                                 |
| <b>Cd-MT:</b>              | Cadmio unido a metalotioneínas                   |
| <b>CdO:</b>                | Oxido de cadmio                                  |
| <b>Cd(OH)<sup>2</sup>:</b> | Hidróxido de cadmio                              |
| <b>CdSO<sub>4</sub>:</b>   | Sulfato de cadmio                                |
| <b>CdS:</b>                | Sulfuro de cadmio                                |
| <b>Cu:</b>                 | Cobre  |
| <b>ChAT:</b>               | Colina acetiltransferasa                         |
| <b>HACHT:</b>              | Transportador de colina de alta afinidad         |
| <b>DAB:</b>                | Tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina       |
| <b>DE:</b>                 | Desviación estándar                              |
| <b>DEn:</b>                | Disruptor endocrino                              |
| <b>DMT1:</b>               | Proteína transportadora de metales divalentes    |
| <b>EA:</b>                 | Enfermedad de Alzheimer                          |
| <b>EFSA:</b>               | Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria       |
| <b>EIA:</b>                | Enzimoimmunoanálisis                             |
| <b>EP:</b>                 | Enfermedad de Parkinson                          |
| <b>EPA:</b>                | Agencia de Protección Ambiental Estadounidense   |
| <b>EPOC:</b>               | Enfermedad pulmonar obstructiva crónica          |
| <b>ER:</b>                 | Receptor de estradiol                            |
| <b>ERK:</b>                | Proteína quinasa regulada por señal extracelular |
| <b>ERO:</b>                | Especies reactivas de oxígeno                    |

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <b>FAO:</b>                        | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura |
| <b>Fe:</b>                         | Hierro  |
| <b>Fpg:</b>                        | Formamidopirimidina   |
| <b>GABA:</b>                       | Acido gamma aminobutírico   |
| <b>GPx:</b>                        | Antioxídante glutatión peroxidasa   |
| <b>GSH:</b>                        | Glutatión   |
| <b>GSK-3β:</b>                     | Glucógeno sintetasa quinasa 3   |
| <b>GSSG:</b>                       | Glutatión disulfuro   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> | Peróxido de Hidrógeno   |
| <b>HO-1:</b>                       | Hemooxigenasa 1   |
| <b>hOGG1:</b>                      | 8-oxoguanina ADN N-glicosilasa 1 humana                                   |
| <b>HT:</b>                         | Hormonas tiroideas  |
| <b>IARC:</b>                       | Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer                    |
| <b>IHQ:</b>                        | Inmunohistoquímica  |
| <b>IL-1β:</b>                      | Interleuquina-1beta   |
| <b>IMAC-1:</b>                     | Moléculas de adhesión intercelular-1                                      |
| <b>IP3R1:</b>                      | Receptor de inositol trifosfato 1   |
| <b>JECFA:</b>                      | Comité de Expertos de la OMS para los Aditivos Alimentarios               |
| <b>LCR:</b>                        | Líquido cefalorraquídeo   |
| <b>LDH:</b>                        | Lactato deshidrogenasa  |
| <b>LPO:</b>                        | Lipoperoxidación  |
| <b>MDA:</b>                        | Malondialdehído   |
| <b>MMR:</b>                        | Reparación incorrecta   |
| <b>MR:</b>                         | Receptor muscarínico  |

|               |   |
|---------------|---|
| <b>MT:</b>    | Metalotioneínas   |
| <b>NER:</b>   | Reparación de la escisión de nucleótidos                                |
| <b>NGF:</b>   | Factor de crecimiento neural  |
| <b>Ni:</b>    | Níquel  |
| <b>NF-kβ:</b> | Factor nuclear kapa beta  |
| <b>NRF2:</b>  | Factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 |
| <b>OSHA:</b>  | Administración de seguridad y salud ocupacional                         |
| <b>P53:</b>   | Proteína tumoral 53   |
| <b>Pb:</b>    | Plomo   |
| <b>PGE2:</b>  | Prostaglandina E2   |
| <b>PGFA:</b>  | Proteína gliofibrilar ácida   |
| <b>PKC:</b>   | Proteína quinasa C  |
| <b>PSB:</b>   | Prosencéfalo basal  |
| <b>PTMI:</b>  | Límite provisional tolerable de ingesta                                 |
| <b>PVC:</b>   | Cloruro de polivinilo   |
| <b>QPCR:</b>  | Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa                    |
| <b>RBP:</b>   | Proteína de unión a retinol   |
| <b>Se:</b>    | Selenio   |
| <b>SNC:</b>   | Sistema nervioso central  |
| <b>SOD:</b>   | Superoxidodismutasa   |
| <b>T3:</b>    | Triiodotironina   |
| <b>T4:</b>    | Tiroxina  |
| <b>TNFα:</b>  | Factor de necrosis tumoral alfa   |
| <b>TR:</b>    | Receptor nuclear tiroideo   |
| <b>TRH:</b>   | Hormona liberadora de tirotropina                                       |

|                |  |
|----------------|--|
| <b>TSH:</b>    | Hormona estimulante del tiroides           |
| <b>TTR:</b>    | Proteína transportadora de transtiretina   |
| <b>TWI:</b>    | Ingesta semanal tolerable                  |
| <b>U:</b>      | Uracilo                                    |
| <b>UV:</b>     | Ultravioleta                               |
| <b>VACHT:</b>  | Transportador de la acetilcolina vesicular |
| <b>VCAM-1:</b> | Moléculas de adhesión celular vascular-1   |
| <b>XPA:</b>    | Proteína xeroderma pigmentoso A            |
| <b>XPC:</b>    | Proteína nuclear C de xeroderma pigmentoso |
| <b>ZIP8:</b>   | Transportador de cinc humano 8             |
| <b>Zn:</b>     | Cinc                                       |
| <b>ZTL1:</b>   | Transportadores apicales de cinc           |



# **INTRODUCCIÓN**



# 1.- INTRODUCCIÓN

## 1.1. Generalidades

El cadmio (Cd) es uno de los principales agentes tóxicos asociados a contaminación ambiental e industrial, pues reúne cuatro de las características más temidas de un tóxico: capacidad de producir toxicidad en el ser humano, bioacumulación, persistencia en el medio ambiente y capacidad de “viajar” grandes distancias a través del viento y los cursos del agua.

Según el ranking de la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR) del año 2017, se trata del séptimo contaminante ambiental más tóxico. Se trata de un contaminante muy extendido en el medio ambiente, bien de forma natural asociado a minerales de cinc, cobre o plomo, o bien de forma artificial debido a sus múltiples usos y aplicaciones industriales (baterías de níquel-cadmio, la industria de los pigmentos, los estabilizadores químicos, revestimientos metálicos y aleaciones).

El Cd en el ser humano se almacena predominantemente en tejidos blandos (principalmente hígado y riñones), con el agravante de tener una semivida biológica extremadamente prolongada (aproximadamente 20-30 años en humanos) y una baja tasa de excreción del cuerpo (Branca et al., 2018). Es un elemento extremadamente tóxico, con un valor medio de toxicidad aguda oral  $DL_{50}$  para ratones y ratas de 100 mg/kg de peso corporal, y por vía inhalatoria de 500 mg/m<sup>3</sup> en ratas y 700 mg/m<sup>3</sup> en ratones (Baer and Benson, 1987; Basinger et al., 1988; Kostial et al., 1978; Kotsonis and Klaassen, 1978; Shimizu and Morita, 1990).

Los niveles ambientales de Cd han aumentado debido a la industrialización progresiva en los países en desarrollo, alcanzando una producción anual de cerca de 13.000 toneladas en todo el mundo (Flora et al., 2008). Aunque las emisiones en el medio ambiente han disminuido notablemente en la mayoría de los países industrializados, usos tan diversos y su larga vida media no permiten un reciclaje adecuado, lo que conlleva a que se acumule progresivamente en el ambiente, generando una gran preocupación sobre los trabajadores de las industrias, así como sobre las poblaciones que viven en zonas contaminadas, especialmente en los países menos desarrollados (Govil et al., 2008).

La principal fuente de exposición al Cd para la población general es la ingesta de alimentos contaminados con este elemento (hojas de vegetales, granos, cereales, frutas, vísceras animales y pescado) (Nava-Ruiz y Méndez-Armenta, 2011), suponiendo aproximadamente un 70% de todo el Cd que entra en el organismo. Esto es debido a que el Cd contribuye en gran medida a la contaminación de las tierras agrícolas y es absorbido selectivamente por ciertos alimentos comestibles (Anetor, 2012). Este porcentaje se ve modificado en la población fumadora, donde los niveles de Cd en sangre son 4-5 veces mayores que en la población no fumadora (Munisamy et al., 2013).

Otra fuente importante de exposición al Cd es la vía inhalatoria, durante la realización de actividades industriales en personas laboralmente expuestas o a través de los cigarrillos, cuyo nivel de Cd está asociado al suelo en el que crece el tabaco (Yue, 1992).

En algunos países de Europa y Norte América la ingesta diaria de Cd varía entre 10 y 40  $\mu\text{g}/\text{día}$ , en personas laboralmente expuestas la concentración puede alcanzar

valores superiores a 50  $\mu\text{g/l}$  y en personas fumadoras los valores de Cd en sangre se encuentran en niveles que oscilan de 1,4 a 4  $\mu\text{g/l}$  (Navarro-Aviñó et al., 2007; Nava-Ruiz y Méndez-Armenta, 2011), comparado con los niveles de 0,4 a 1,0  $\mu\text{g/l}$  que se observan en personas no fumadoras.

La característica de mayor peligrosidad del Cd es su efecto acumulativo, almacenándose a lo largo del tiempo debido a su larga vida biológica (Hideaki et al., 2008). Una vez absorbido se deposita principalmente en el hígado y el riñón (Anetor, 2012). Debido al tiempo de vida media tan largo que presenta el Cd (30 años), se produce un acúmulo irreversible en diferentes tejidos que produce una diversidad de efectos tóxicos que incluyen neurotoxicidad, nefrotoxicidad, carcinogénesis, teratogénesis, toxicidad endocrina y reproductiva; todos ellos daños irreversibles aún a concentraciones reducidas (Rani et al., 2013).

La concentración de Cd en sangre en el ser humano varía enormemente en función de la edad, sexo, dieta, lugar de residencia y que sea o no fumador (ATSDR, 2017). El efecto a la exposición del Cd es dosis-dependiente: a altas dosis el Cd puede producir daño celular, muerte celular y fallo orgánico, a bajas dosis puede modular mecanismos específicos sin necesidad de producir una toxicidad celular evidente (López-Alonso et al., 2003; Pacini et al., 2009).

La relación entre la exposición al Cd y sus efectos tóxicos fue descrita primero en trabajadores industriales, en los que se publicaron los primeros informes de lesiones pulmonares, óseas y renales por exposición al Cd a finales de la década de 1930-40 del siglo pasado (Bulmer et al., 1938; Friberg, 1950; Nicaud et al., 1942). En la década de

1960, el Cd fue identificado como la principal causa en la enfermedad de Itai-Itai, una afección que sufrieron los japoneses residentes en la Prefectura de Toyama y cuya exposición al Cd estaba aumentada debido a su dieta a base de arroz y agua contaminada con Cd en la cuenca del río Jinzu, que procedía de una antigua mina de plomo y zinc. La población sufría una osteomalacia con diversos grados de osteoporosis, que podía llegar a producir fracturas óseas y que se acompañaba de una severa enfermedad tubular renal (Ishizaki, 1969). A partir de estos primeros informes sobre intoxicación grave por Cd, se realizaron en todo el mundo múltiples estudios epidemiológicos y experimentales para caracterizar la toxicidad del Cd y evaluar cuáles son los niveles de exposición a los que este contaminante generalizado puede llegar a amenazar la salud humana. Gracias a estos estudios se consiguió demostrar que este metal puede causar diversos efectos tóxicos. El Cd se acumula y produce un cuadro de toxicidad que afecta al riñón, hígado, pulmones, hueso, cerebro, testículos, corazón y SNC. Además, el Cd puede causar osteoporosis, anemia, enfisema no hipertrófico, eosinofilia, anosmia y rinitis crónica (Valko et al., 2005). Aparte de los efectos citotóxicos directos, el cadmio ha estado implicado en el desarrollo del cáncer y ha sido clasificado como un carcinógeno de tipo I por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC 1993, 2014; Arroyo et al., 2012).

Los efectos tóxicos del Cd en el SNC han sido descritos por diversos autores, que han demostrado que el Cd produce alteraciones neuropatológicas y neuroquímicas que pueden conducir a una encefalopatía, una neuropatía periférica o hemorragia (Jackson et al., 2008). También se ha descrito que la exposición al Cd puede estar relacionada con un déficit de atención, una disfunción olfatoria o un déficit de memoria (Wang et al., 2013). No se conocen por el momento, con exactitud, los mecanismos fisiopatológicos de la

toxicidad del cadmio a nivel del SNC (Chin-Chan et al., 2015), aunque parece que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos más importantes (Renugadevi et al., 2010).

También se ha relacionado este metal con la inducción de enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Parkinson y la EA, ya que la exposición al Cd produce una sintomatología similar a ambas enfermedades a nivel neurológico. Esta relación de causalidad es difícil de establecer debido a que el periodo de latencia entre la exposición y la aparición de la enfermedad es largo y además no se conocen biomarcadores de inducción temprana de la enfermedad que ayuden a identificar el inicio de la generación de la misma antes de que ésta sea clínicamente evidente (Chin-Chan et al., 2015).

## **1.2. Cadmio**

El cadmio fue descubierto en 1817, como impureza en minerales de cinc (Zn), por el químico alemán Friedrich Stormeyer (1776-1835), en Göttingen (Saldivar et al., 1997). Su nombre procede de la palabra latina “cadmia” y de la palabra griega “kadmeia”, que significan “calamina” (carbonato de cinc).

### **1.2.1. Características generales**

El cadmio es un elemento químico que forma parte de los metales de transición del grupo 12, subgrupo IIb (que incluye el Zn y el mercurio), dentro de los elementos de la tabla periódica. Su número atómico es el 48, tiene una masa atómica de 112,40 g/mol y su símbolo es Cd. El número de registro en el Chemical Abstracts Service (CAS) del

Cd es 7440-43-9. Se puede encontrar como mineral en la greenockita (CdS), pero lo más común es que se encuentre asociado a sulfuros de Zn y en menor cantidad como impureza del plomo (Pb) o del cobre (Cu) (Morrow, 2001).

### 1.2.2. Propiedades fisicoquímicas

El Cd es un metal blando, dúctil, de color blanco plateado o blanco azulado, con un punto de fusión de 321,07°C, y punto de ebullición de 767°C (Nriagu, 1980). Presenta dos estados de oxidación, +1 y +2, siendo el estado +2 el más común, ya que no experimenta reacciones de oxido-reducción, siendo de este modo muy resistente a la corrosión. El Cd metálico es esencialmente insoluble en agua, pero varios de sus compuestos como el cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>), bromuro de cadmio (CdBr<sub>2</sub>), yoduro de cadmio (CdI<sub>2</sub>), nitrato de cadmio [Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] y sulfato de cadmio (CdSO<sub>4</sub>) son muy solubles en agua (Budavari et al., 1989; Weast, 1986). Los compuestos insolubles en agua, como el óxido de cadmio (CdO), el sulfuro de cadmio (CdS), el carbonato de cadmio (CdCO<sub>3</sub>), el ortofosfato de cadmio [Cd<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] y el fluoruro de cadmio (CdF<sub>2</sub>) (Weast, 1986), pueden solubilizarse en condiciones de fuerte oxidación o en medios ácidos (WHO, 1992).

### 1.2.3. Fuentes de emisión de cadmio

Las principales fuentes de emisión de Cd a nivel mundial se encuentran en Asia (41%), América (16%), Europa (15%) y Australia (3%) (WHO, 2006).

### 1.2.3.1. Fuentes naturales

De forma natural, el Cd es liberado al medio ambiente a través de la descomposición de las rocas (fundamentalmente rocas sedimentarias), incendios forestales y erupciones volcánicas (Pacyna y Pacyna, 2001). Es un metal poco frecuente, que no se encuentra en la naturaleza como elemento puro, sino que se asocia por afinidad química a otros metales como el Zn, el Pb, el Cu o a elementos como el oxígeno (óxido de cadmio), cloro (cloruro de cadmio) o azufre (sulfato o sulfuro de cadmio) (Madeddu, 2011).

### 1.2.3.2. Fuentes antropogénicas del cadmio

Las emisiones de Cd de origen antropogénico exceden considerablemente a las fuentes y fenómenos naturales (Dell’Omo et al., 1999), siendo la actividad industrial la principal fuente de liberación del mismo a la atmósfera (Breen et al., 1995).

El principal uso del Cd es la fabricación de componentes activos en las baterías de Ni-Cd (Níquel-Cadmio) (83% del uso de Cd), aunque también se utiliza como pigmento, estabilizador de plásticos y en ciertas aleaciones (Arena et al., 1997). Existen diversas sales de Cd con aplicación industrial. La más importante es el *estearato de cadmio*, que se utiliza como estabilizador térmico y protector frente a la luz en la fabricación de plásticos como el cloruro de polivinilo (PVC) (Buchet et al., 1990). El *sulfuro de cadmio* y *sulfoseleniuro de cadmio* se utilizan como pigmentos en plásticos, cerámicas, cristales, esmaltes y tintes, y se combinan para crear colores desde amarillos y naranjas a rojos y marrones (Buchet et al., 1990). El *teluro* y *sulfuro de cadmio* se

utilizan recientemente en la fabricación de placas solares, al ser más eficiente, barato y dúctil que el silicio, acogiéndose a la exención de la prohibición de uso del Cd en la industria de energías renovables (Directiva ROHS del Parlamento Europeo, 2010). El  $\text{CdCl}_2$  se emplea como fungicida, componente de los baños galvanoplásticos, colorante en pirotecnia, aditivo en las soluciones de estañado y mordiente en la tinción e impresión de textiles (Buchet et al., 1990). También se utiliza para la producción de determinadas películas fotográficas, fabricación de espejos especiales y para el recubrimiento de tubos electrónicos de vacío (Buchet et al., 1990). El  $\text{CdO}$  se utiliza como agente para galvanoplastia, como materia prima para los estabilizadores térmicos de PVC y componente de las aleaciones de plata, pigmentos fosforescentes y semiconductores, así como para el endurecimiento de cristales o el vitrificado de cerámica (Buchet et al., 1990).

A pesar de que el consumo de Cd por parte de las baterías ha crecido constantemente desde la década de 1980, representando actualmente el 83% de su producción, los otros usos de este metal están decayendo desde mediados de los años 90, ya que el Cd representa un peligro para la salud y el medio ambiente y muchos países han adoptado medidas legislativas para reducir su uso y la consiguiente dispersión ambiental del mismo (Bush et al., 2000).

En este sentido, la Unión Europea, en la Directiva 96/62/CE del Consejo, de 27 de septiembre de 1996, sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente, estableció con carácter general el régimen jurídico sobre la contaminación atmosférica en el ámbito de la Unión Europea, mediante la adopción de criterios para la armonización de las técnicas de evaluación y definió los objetivos de calidad que debían alcanzarse mediante una planificación adecuada. Esta planificación se ha materializado en la

adopción de la Directiva 2004/107/CD del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de diciembre de 2004, relativa al arsénico, el Cd, el mercurio (Hg), el Ni y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire.

En España, el RD 812/2007, de 22 de junio, transcribe la Directiva 2004/107/CD, de 15 de diciembre de 2004, con el objetivo de definir y establecer un valor objetivo de la concentración de Cd en el medio ambiente, para así garantizar el mantenimiento de la calidad del aire donde sea buena y mejorarla en otros casos, a fin de evitar, prevenir o reducir sus efectos perjudiciales en la salud humana y en el medio ambiente en su conjunto.

#### 1.2.4. Fuentes de exposición

##### *1.2.4.1. Exposición laboral*

La principal fuente de exposición al Cd es la laboral, ya que el Cd presenta un elevado uso a nivel industrial (Cerna et al., 1997). Esto se debe a que se trata de un metal relativamente barato, que se obtiene como producto secundario en la producción de otros metales más valiosos como el Cu o el Zn y a que es muy resistente a la corrosión y por lo tanto se utiliza para su electrodeposición en otros metales (Cerna et al., 1997).

Los niveles más altos de exposición laboral al Cd ocurren en aquellas actividades que implican un calentamiento de productos que contengan este metal, tales como la fundición y refinación de metales, soldaduras, electrodeposición y galvanización, ya que estos procesos generan vapores de óxido de Cd que se absorben fácilmente a través de la

vía respiratoria (WHO, 1992; ATSDR, 2012). También se produce un nivel alto de exposición al Cd en operaciones asociadas a la producción de polvos de Cd (Cerny et al., 2003), así como por la ingesta accidental de polvo procedente de manos contaminadas (Cornelis et al., 1994).

Históricamente, los niveles de Cd en el lugar de trabajo han mejorado considerablemente con el reconocimiento de su potencial toxicidad en los seres humanos y el desarrollo de normativas de seguridad e higiene en el trabajo. En la actualidad, según la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA), los niveles permitidos de Cd en el ambiente laboral son de  $5 \mu\text{g}/\text{m}^3/8$  horas día/ 40 horas semana y las normas laborales establecen valores desde 2 a  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (WHO, 1992; ATSDR, 2012).

#### *1.2.4.2. Exposición en la población general*

En cuanto a la población general, ésta puede estar expuesta al Cd a través de la ingesta de comida y agua, o bien a través de la inhalación de partículas procedentes del aire o del humo de tabaco. En la población no fumadora, la comida es la principal fuente de exposición a Cd (Coyle, 2004), sobre todo a través de los suelos de cultivo, bien de forma natural o a partir de fuentes antropogénicas como el uso de fertilizantes y abonos (Brockhaus et al., 1983; De Burbure et al., 2003), mientras que en la población fumadora la principal fuente de exposición es el consumo de tabaco (Dalledonne et al., 1997).

### 1.2.5. Vías de exposición

#### 1.2.5.1. *A través del aire*

Los principales compuestos de Cd que se encuentran en el aire son el CdO, el CdCl<sub>2</sub> y el CdS. Todos ellos sufren una transformación mínima en la atmósfera (Arena et al., 1997), siendo su principal destino el transporte y el depósito. El Cd puede viajar largas distancias a través del aire, para después depositarse en suelos y agua, lo que se traduce en niveles elevados de Cd, incluso en lugares lejanos de su emisión (Brozoka et al., 2001). Aunque el Cd se libera al aire tanto a partir de fuentes naturales como antropogénicas, la actividad industrial es la principal fuente de liberación del mismo a la atmósfera (Breen et al., 1995), excediendo de manera considerable a las fuentes naturales (Dell’Omo et al., 1999).

Actualmente, gracias a los avances en la tecnología de control de la contaminación, la inhalación de Cd del aire ambiental no es una fuente importante de exposición, excepto para aquellos individuos que vivan cerca de industrias donde se realice aleación, fundición o refinación de metales o aquellos que vivan cerca de plantas incineradoras de residuos urbanos. En los últimos 50 años las emisiones de Cd antropogénicas han disminuido por encima del 90% y no se espera que aumenten, a pesar del incremento del número de industrias emisoras de Cd (Dohi et al., 1993).

#### *1.2.5.2. A través del agua*

En el agua, el Cd se presenta principalmente como ión cadmio ( $\text{Cd}_2^+$ ), así como complejos de hidróxido de cadmio [ $\text{Cd}(\text{OH})_2$ ] y  $\text{CdCO}_3$ . Existen compuestos de Cd, como el CdS, el  $\text{CdCO}_3$  y el CdO, que son insolubles en agua. Sin embargo, estos compuestos insolubles se pueden transformar en solubles al interactuar con ácidos, luz u oxígeno (ATSDR, 2012).

El Cd se puede liberar al agua procedente de instalaciones industriales o plantas de tratamiento de aguas residuales, por depósito directo desde la atmósfera o a través de filtraciones procedentes de vertederos, suelo o fertilizantes fosfatados (Breen et al., 1995; Brockhaus et al., 1983). Las aguas cercanas a industrias emisoras de Cd, estén o hayan estado en funcionamiento en el pasado, muestran una elevación marcada de Cd en los sedimentos y organismos acuáticos (Eaker et al., 2004; Elinder et al., 1983).

La concentración media de Cd en los océanos oscila entre  $<5$  y  $110$  ng/l, siendo los niveles más elevados en las zonas cercanas a la costa y en los fosfatos y fosforitas marinos (Brockhaus et al., 1983). La minería se considera la principal fuente antropogénica de Cd liberado al agua, si bien una gran proporción del Cd liberado procede de múltiples fuentes más que de sitios puntuales de contaminación (Dell'Omo et al., 1999; Domínguez, 2003).

La contaminación del agua potable es una preocupación menor, excepto en zonas próximas a industrias emisoras de Cd o incineradoras, ya que el Cd es apartado de las aguas residuales mediante precipitación a compuestos carbonados o hidróxidos y

posterior separación (Arena et al., 1997). La Agencia de Protección Ambiental Estadounidense (EPA) establece a los proveedores de agua una concentración de Cd en agua  $<5$  ng/l.

#### *1.2.5.3. A través de los alimentos*

Las principales fuentes de Cd en el suelo incluyen las emisiones atmosféricas y las deposiciones directas, siendo las más importantes las debidas al uso de fertilizantes fosfatados y los lodos procedentes de aguas residuales (Arena et al., 1997).

Los fertilizantes fosfatados son una fuente importante de depósito de Cd en los suelos de cultivo (Breen et al., 1995). Los fosfatos presentan de manera natural una concentración de Cd de entre 3 y 100  $\mu\text{g/g}$  (Breen et al., 1995; Elliott y Nuzum, 1934). Se estima que en Estados Unidos, en el año 2012, se consumieron más de un millón de toneladas de fertilizantes fosfatados (Erzen et al., 2004). Los factores que influyen en la incorporación de Cd desde el suelo a los cultivos son principalmente el pH y el tipo de suelo. Un suelo con un pH bajo (algo cada vez más común en varias partes del mundo debido a la lluvia ácida) favorece la absorción de Cd por parte de las plantas (Erzen et al., 2003; Fisher et al., 2003). Un suelo arenoso hace que el Cd esté más soluble y disponible para su incorporación en la planta que un suelo arcilloso (Frery et al., 1993).

Los alimentos contaminados son la primera fuente de exposición a Cd para la población no fumadora, donde representan aproximadamente el 90% del Cd absorbido (Hogervorst, 2007). El Cd se encuentra presente en la mayoría de los alimentos, pero sus concentraciones varían dependiendo del tipo de alimento y de la contaminación externa.

Los principales alimentos básicos que contribuyen a la exposición de Cd son los cereales y las verduras, estimándose que más del 80% del Cd consumido a través de alimentos es de origen vegetal. Cereales como el arroz, el trigo y las plantas de tabaco concentran niveles de Cd de 10-150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Las vísceras de animales tales como riñón e hígado pueden presentar altas concentraciones de Cd debido a que este se concentra en dichos órganos (Olsson et al., 2002). Los alimentos marinos, fundamentalmente los moluscos y crustáceos, también concentran altas cantidades de Cd (Olsson et al., 2002).

Menos del 10% de la exposición total de la población no fumadora es debida a la inhalación de Cd atmosférico (Vahter et al., 1996) y a través del agua de bebida (Olsson et al., 2002). Las ingestas totales diarias de Cd procedente de todas las fuentes en América del Norte y Europa se encuentran entre 10 y 30  $\mu\text{g}$  de Cd/día. De esta cantidad solo el 10% o menos es absorbido (Järup et al., 1998). En 2009 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) llevó a cabo una evaluación del riesgo de Cd en los alimentos y estableció una ingesta semanal tolerable (TWI) de 2,5 microgramos por kilogramo de peso corporal. En 2010 la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y el Comité de Expertos de la OMS para los Aditivos Alimentarios (JECFA), establecieron un límite provisional tolerable de ingesta (PTMI) de cadmio mensual de 25  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corporal, un valor guía en el agua de bebida de 3  $\mu\text{g}/\text{l}$  y una concentración en el aire de 5  $\text{ng}/\text{m}^3$  (valor medio anual). La exposición en la dieta promedio actual de Cd para adultos está cerca de este valor, sin embargo, la exposición de algunos subgrupos, como los niños, vegetarianos y personas que viven en zonas altamente contaminadas, podría superar el PTMI (EFSA, 2009).

### **1.3. Toxicocinética**

El Cd metálico y las sales de Cd no se absorben bien. Aproximadamente un 25%, 1-10% y <1% de la dosis se absorbe tras la exposición respiratoria, oral o dérmica, respectivamente (Díaz et al., 2012).

Tras la absorción, independientemente de la vía de entrada, el Cd se distribuye ampliamente por el organismo, concentrándose principalmente en el hígado y riñón (Díaz et al., 2012). No se ha descrito que el Cd sufra ningún tipo de conversión metabólica tales como oxidación, reducción o alquilación. Una vez absorbido, el Cd se excreta muy lentamente, siendo la excreción urinaria la principal vía de eliminación (Díaz et al., 2012).

#### **1.3.1. Absorción**

El Cd se puede absorber por vía inhalatoria, oral o dérmica, en función de la vía de exposición, independientemente de su forma química.

##### *1.3.1.1. Absorción dérmica*

La absorción dérmica es relativamente insignificante. Resultados de numerosos estudios sobre esta vía de absorción, realizados en modelos animales, sugieren que la absorción dérmica es lenta y debería preocupar únicamente en aquellas situaciones en las que la exposición por esta vía fuera prolongada en el tiempo y con soluciones con alta concentración de Cd (Gachot et al., 1992; García-Morales et al., 1994).

### *1.3.1.2. Absorción pulmonar*

La vía inhalatoria es la principal vía de exposición ocupacional y de la población fumadora (ATSDR, 2012). El Cd y sus sales presentan una baja volatilidad y se encuentran en el aire como materia finamente particulada (Järup, 2002). Cuando son inhaladas, una parte de estas partículas se deposita en el tracto respiratorio y los pulmones, mientras que el resto son exhaladas. Las partículas de mayor tamaño (mayores de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro) se depositan por impacto en la parte superior del tracto respiratorio y se eliminan en gran parte gracias al sistema mucociliar. Las partículas de menor tamaño (0,1  $\mu\text{m}$ ) tienden a penetrar en los alveolos y en función de la solubilidad de las mismas, se absorben y distribuyen por el organismo (Nordberg et al., 1985). Por lo tanto, el tamaño de partícula determina la absorción pulmonar.

En el caso del humo de tabaco, la absorción elevada de Cd que se produce es debida al pequeño tamaño de las partículas, con el consiguiente depósito de Cd a nivel alveolar (Nordberg et al., 1985; Takenaka et al., 2004). Además, cuando se compara la carga corporal de Cd en la población fumadora y no fumadora, parece que la absorción de Cd procedente de los cigarrillos es superior a la absorción de Cd que se ha observado en estudios en animales procedente de aerosoles (Nordberg et al., 1985). Sin embargo, es probable que la forma química del Cd en el humo del cigarrillo sea similar a la producida por otros procesos de combustión, principalmente aerosoles de CdO (Nordberg et al., 1985). Los datos presentados en estudios en animales indican que la retención pulmonar es mayor tras la exposición a corto plazo (5-20% tras 15 minutos a 2 horas de exposición) (Barrett et al., 1947; Henderson et al., 1979; Moore et al., 1973; Rusch et al., 1986). Tras

largos periodos de exposición inhalatoria al Cd, se encuentran menores depósitos a nivel pulmonar (Glaser et al., 1986).

### *1.3.1.3. Absorción oral*

La fuente principal de Cd en la población no fumadora es la ingesta de alimentos contaminados, limitándose su absorción gastrointestinal a un 5-10% de la cantidad ingerida (Friberg, 1971). La carga corporal de hierro (Fe) influye en la absorción de Cd, observándose en sujetos con bajas reservas de Fe una absorción de Cd de entre 6 y 8%, mientras que en aquellos con reservas de Fe adecuadas, la absorción oscila entre 2,3 y 2,4% (Friberg et al., 1983). Así pues, la absorción tras la exposición oral a Cd va a depender de la fisiología del individuo (edad, reservas de Fe, niveles de calcio (Ca), Zn, embarazos, etc), así como de la presencia o no de otros iones o componentes de la dieta (Arenas et al., 1997).

La absorción intestinal tiene lugar en el duodeno y parte inicial del yeyuno, a nivel de la membrana apical y basolateral de los enterocitos (Andersen et al., 1994). Si el Cd se encuentra unido a metalotioneínas (Cd-MT) atraviesa el epitelio intestinal y se incorpora a la circulación portal a través de los capilares sanguíneos en la lámina propia de la mucosa intestinal (Sugawara y Sugawara, 1991). Para que esto ocurra, el complejo Cd-MT cruza la membrana apical por zonas permeables de las uniones intercelulares entre enterocitos adyacentes (Tallkvist et al., 2001). Posteriormente es transportado a los capilares sanguíneos a través de la membrana basolateral por un mecanismo de exocitosis o directamente favoreciendo la muerte del enterocito. El Cd también puede penetrar en el enterocito unido a aminoácidos u oligopéptidos presentes en el epitelio intestinal por un

mecanismo de endocitosis (Cannon et al., 2001). En relación con el transporte basolateral del cadmio hacia los capilares sanguíneos de la lámina propia, se sugiere que el Cd utiliza la proteína transportadora de metales divalentes (DMT1) presente en la membrana apical (Arnich et al., 2004). También, se ha propuesto una vía alternativa a través de los transportadores apicales de cinc (ZTL1) presentes en la membrana apical de los enterocitos (Cragg et al., 2002).

### 1.3.2. Distribución

Una vez absorbido, el Cd se une a las células sanguíneas de la serie roja y a la albúmina u otras proteínas de mayor peso molecular y se distribuye ampliamente por el organismo, concentrándose principalmente en hígado y riñón, donde el Cd induce la síntesis de metalotioneínas (MT), unas proteínas de unión a metales de bajo peso molecular (Goyer, 2008; Klaassen et al., 1999), cuya producción depende de la disponibilidad de elementos de la dieta, como el Zn o selenio (Se), y de aminoácidos, como la histidina y cisteína (Gaspa et al., 1991). Por lo tanto, las MT juegan un papel crítico en la toxicocinética y toxicidad del Cd. El Cd es acumulado en hígado como Cd-MT y puede ser liberado del hígado y transportado, vía sanguínea, al riñón donde es reabsorbido y degradado en los lisosomas de las células de los túbulos renales. Cerca de 50-75% de Cd retenido se encuentra en el hígado y los riñones. El Cd tiene una vida media muy larga (17-30 años) en seres humanos, lo que se puede explicar por su capacidad de inducir la síntesis de MT (Achanzar et al., 2001; Glauser et al., 1976).

Los niveles de Cd en sangre de seres humanos con una exposición no ocupacional, y en no fumadores, son inferiores a 1 µg/l. El Cd puede penetrar en el cerebro desde la

sangre, atravesando la barrera hematoencefálica (BHE) o a través de los plexos coroideos, entrando en el líquido cefalorraquídeo (LCR). De este modo consigue alcanzar diversas regiones del parénquima cerebral (Yokel, 2006). Para cruzar la BHE, el Cd utiliza transportadores iónicos e imita el comportamiento de nutrientes esenciales (Manton et al., 1984). Estudios *in vivo* han demostrado que el Cd es capaz de penetrar y acumularse en el cerebro de ratas tanto adultas, como en desarrollo (Méndez-Armenta y Ríos, 2007).

Es importante recordar que el Cd entra al organismo por vía inhalatoria, es transportado a lo largo de las neuronas olfatorias primarias hasta las terminaciones nerviosas, evitando así la BHE. La vía inhalatoria, por tanto, debe tenerse en cuenta para la evaluación de riesgos laborales para este metal (Czarnecki, 2011; Tjälve y Henriksson, 1999).

### 1.3.3. Metabolismo

El Cd no sufre ninguna conversión metabólica directa tales como oxidación, reducción o alquilación, una vez absorbido en el organismo. Así pues, el Cd no se biotransforma en el sentido clásico del término, sino que una vez absorbido es eliminado muy lentamente. Sin embargo, sí existen mecanismos biológicos de defensa para reducir su potencial tóxico. En este sentido juega un papel clave la afinidad de las MT al cadmio, transformándolo en inerte desde el punto de vista toxicológico mientras el complejo permanece intracelular (Cabrera et al., 1998). Por tanto, la toxicidad del Cd se neutraliza gracias a su almacenamiento a largo plazo y no por biotransformación o aumento de la eliminación.

#### 1.3.4. Excreción y eliminación

Una vez absorbido, el Cd se excreta en pequeña cantidad y de manera muy lenta, lo que explica la larga vida biológica media de este metal. Tras la absorción, la principal vía de eliminación de Cd es a través de la orina, por lo que se considera el nivel de Cd urinario un reflejo objetivo de la carga corporal de Cd (Cabrera et al., 1998).

### **1.4. Mecanismos de acción**

Aunque los mecanismos moleculares involucrados en la toxicidad del Cd no se conocen por completo, está descrito que el Cd afecta a la proliferación y diferenciación celular, a la progresión celular y a la síntesis de ADN (ácido desoxirribonucleico), entre otras actividades celulares (Aimola et al., 2012).

#### 1.4.1. Transportadores de membrana y canales de calcio

Estudios con animales han descrito que el Cd puede interactuar con transportadores de membrana involucrados en el transporte de metales esenciales, tales como Fe y Zn a nivel del tracto gastrointestinal. El Cd mimetiza a estos cationes divalentes en el sitio de unión a los transportadores o en los canales situados en la membrana celular y de esta manera desplaza a estos metales y consigue introducirse en el epitelio intestinal (Bridges y Zalups, 2005).

Otra de las entradas principales de Cd a la célula se produce a través de los canales de Ca. Puesto que el Cd y el Ca tienen un radio iónico similar, esto hace que el Cd pueda

introducirse libremente por esta vía a las células (Flora et al., 2008; Goyer, 2008; Méndez-Armenta et al., 2001), alterando la homeostasis del Ca intracelular lo que conlleva una liberación de calcio mitocondrial y del retículo endoplásmico. Esta alteración de la homeostasis del Ca produce cambios importantes en el metabolismo celular. Se han descrito interferencias con las vías de señalización dependientes de Ca, con señales de transducción entre las células, con el consiguiente daño a las membranas, bloqueo de canales dependientes de voltaje, alteraciones de la regulación génica y bloqueo de la liberación de neurotransmisores (Gutiérrez-Reyes et al., 1998; Méndez-Armenta y Ríos, 2007; Viarengo y Nicotera, 1991).

#### 1.4.2. Neurotransmisión

La liberación de neurotransmisores, como la serotonina y la noradrenalina, se ve alterada en animales en desarrollo que han sido expuestos a Cd (Lafuente et al., 2001; Lafuente et al., 2003). También, se ha descrito que el Cd puede modificar el contenido de taurina y ácido gamma aminobutírico (GABA) en el hipotálamo, núcleo estriado y corteza prefrontal de ratas en desarrollo (Esquifino et al., 2001).

#### 1.4.3. Metalotioneínas

Las MT son una superfamilia de polipéptidos de bajo peso molecular que se describieron por primera vez en 1957 gracias al descubrimiento de una proteína rica en cisteína que se encontraba unida al Cd. Hoy en día se conoce que los principales metales

unidos a las MT son el Zn, el Cd, el Hg y el Cu, con una estabilidad creciente de la unión en el orden mencionado (Ebadi et al., 1995; Hidalgo et al., 2001; Kille et al., 1994, Nordberg y Nordberg, 2000).

Dado que el Zn y el Cu juegan un papel importante como oligoelementos fisiológicos, las funciones de las MT se han asociado a la regulación de estos dos metales. El Zn ha sido el metal más ampliamente estudiado en relación a las MT. Se trata de un metal identificado como componente central de más de 300 enzimas involucradas en el metabolismo celular, así como un elemento estructural esencial en toda una clase de factores de transcripción (Betz y Goldestein, 1986). Todas las isoformas de MT unidas al Zn son agentes antioxidantes debido a que el grupo cinc-azufre es sensible a los cambios en el estado redox celular. Por lo tanto, las propiedades redox de los complejos Zn-MT son cruciales como protectores contra el efecto citotóxico de las especies reactivas del oxígeno (Maret y Valle, 1998; Sato y Bremner, 1993).

Otras funciones atribuidas a las MT, incluyen el secuestro y la dispersión de iones metálicos en la homeostasis de Cu y Zn, especialmente para el control de los factores de transcripción dependientes del Zn, la protección contra las radiaciones ionizantes, la resistencia a fármacos y mutágenos electrofílicos anticancerosos y la desintoxicación de metales (Aschner et al., 1997; Hidalgo et al., 1990; Hidalgo y Carrasco, 1998; Nishimura et al., 1992).

Las hormonas, citocinas y metales son inductores de las MT, lo que implica que pueden actuar en la proliferación y diferenciación celular, así como en mecanismos de defensa celular (Aschner et al., 1997; Kille et al., 1994). En este sentido, se ha descrito

que el Cd induce la expresión de los genes de las MT en el hígado y el cerebro de ratones y ratas tras su exposición, pudiendo inducir alterar estos procesos.

#### 1.4.4. Generación de radicales libres

El Cd es un agente generador de radicales libres en cerebro y otros órganos, con la consiguiente inducción de lipoperoxidación (LPO) (Manca et al., 1991). Se ha descrito en diversos estudios *in vitro e in vivo*, que el Cd, al desplazar al Fe y Cu, hace que éstos queden libres e ingresen al ciclo de Haber Weiss, catalizando la reacción de Fenton, que provoca una generación de radicales libre e induce la LPO (Flora et al., 2008). Los radicales libres generados pueden ser eliminados a través de la activación de mecanismos de defensa antioxidante tanto en el cerebro como en otros órganos. Sin embargo, diversos estudios han mostrado que la actividad de los sistemas antioxidantes glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), y superóxidodismutasa (SOD) están disminuidas en presencia de Cd (Antonio et al., 2003; Flora et al., 2008; Valko et al., 2005), por lo que el daño producido por los radicales es más pronunciado.

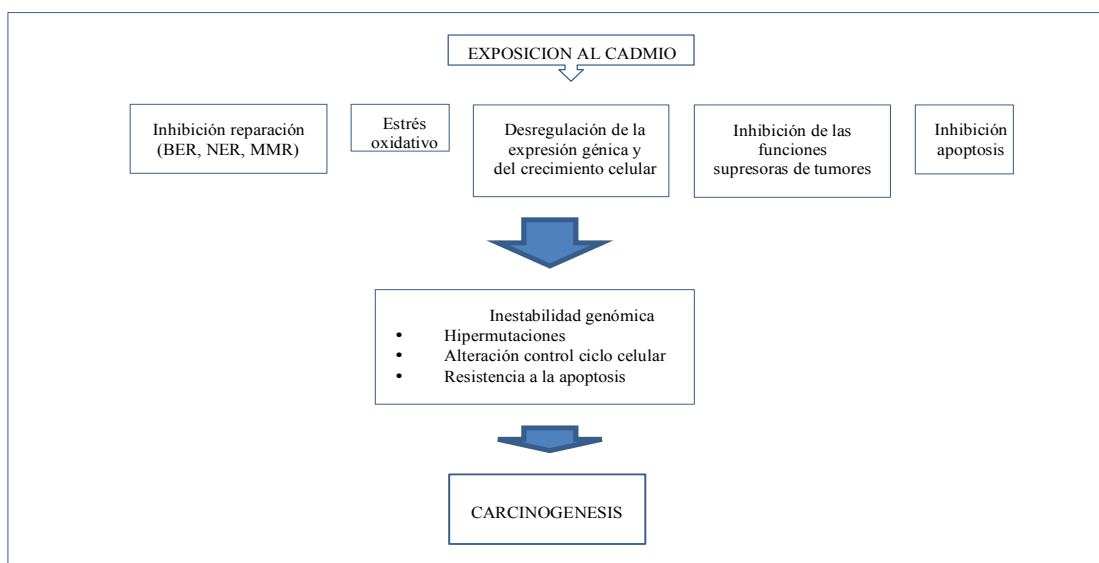
La generación de radicales libres por el Cd afecta a numerosos componentes celulares como el ADN, los lípidos y las proteínas (Figueiredo-Pereira et al., 1998; Rajanna et al., 1990), induciendo fenómenos de apoptosis y necrosis celular (Kondoh et al., 2002; Risso-de Faverney et al., 2001; Yuan et al., 2013).

En este sentido, Li et al. (2000) sugirieron que la entrada de Cd en las células se produce a través de canales de Ca voltaje dependiente y regula la expresión del receptor de inositol trifosfato (IP3R1), aumentando la liberación de Ca del retículo endoplásmico.

El Ca, a su vez, activa la calpaína e induce la fragmentación del ADN y la apoptosis. Por otra parte, el Cd activa la 8-caspasa que directamente activa las caspasas efectoras (caspasa 3 y 7), responsables de muchos de los efectos bioquímicos y morfológicos implicados en los fenómenos de apoptosis. Otros estudios mostraron que el tratamiento de células HL-60 con Cd induce el citocromo C, un potente activador de la caspasa 9, en el citosol. La activación de la caspasa 9, desencadenada por el citocromo C, es un potente activador de las caspasas efectoras, como la caspasa 3 (Kondoh et al., 2002). El Cd puede inducir apoptosis por alteración de la actividad de varios factores de transcripción sensibles al estrés oxidativo, que son responsables de la regulación de la expresión de genes apoptóticos (Watkin et al., 2003). Uno de estos factores es el factor nuclear kapa beta (NF- $\kappa$ B) con una importante función en el balance celular entre muerte/supervivencia hacia la supervivencia. Los metales pesados, como el Hg, arsénico (As), Zn y Cd, que tienen gran afinidad por los grupos -SH e inhiben el NF- $\kappa$ B unido al ADN *in vitro* (Shumilla et al., 1998), pudiendo inducir muerte celular.

#### 1.4.5. Inhibición de la reparación de ADN

Se ha descrito que el Cd inhibe la reparación del ADN (Giaginis et al., 2006; Hartwig, 2010), lo que representa una causa de inestabilidad genómica (una condición asociada con el proceso de tumorigénesis) actuando como un producto genotóxico (Waisberg et al., 2003). Este mecanismo, junto con la generación de radicales libres, la activación de proto-oncogenes, la alteración en la metilación de ADN y la desregulación en la expresión génica se han propuesto como mecanismos inductores de carcinogénesis (Figura 2) (Bertin y Averbeck 2006; Beyersmann y Hechtenberg 1997; Joseph, 2009).



**Figura 1.** Mecanismos de inducción de carcinogénesis por cadmio (Hartwig y Schwerdtle, 2002).

El Cd puede inhibir los procesos de reparación del daño del ADN [reparación de la rotura de las bases (BER), reparación de la escisión de nucleótidos (NER) y reparación incorrecta (MMR)], mecanismo responsable de su carcinogenicidad (Giaginis et al., 2006). El cadmio es co-mutagénico y aumenta la mutagenicidad de las radiaciones ultra violeta (UV), la alquilación y oxidación en células de mamíferos (Filipič et al., 2006).

#### 1.4.6. Reparación de la rotura de las bases (BER)

El Cd a bajas concentraciones genera un daño oxidativo que inhibe la reparación de la rotura de bases del ADN en células de mamífero (Dally y Hartwig, 1997; Fatur et al., 2003). En este sentido, la exposición de las células humanas a concentraciones sub-letales de Cd disminuye la actividad de la enzima 8-oxoguanina ADN N-glicosilasa 1 humana (hOGG1), principal responsable de la reparación de la 8-oxoguanina, una forma

mutagénica de la guanina oxidada. El estudio de Bravard et al. (2009) confirma que parte del efecto inhibitorio, a baja dosis, del Cd en la actividad de la hOGG1 podría atribuirse a su transcripción reducida (Youn et al., 2005). Estos resultados, junto con el efecto observado de inhibición indirecta de hOGG1 por oxidación, apoyan la hipótesis de que los efectos sobre la vía BER son fundamentalmente consecuencia del desequilibrio redox celular, más que de la interacción directa con las proteínas de dicha vía. Por otra parte, la exposición al Cd inhibe y modifica algunas proteínas de la vía BER como la formamidopirimidina glicosilasa (Fpg), en la que la sustitución de una cisteína en el Zn localizado en el extremo C terminal de dicha proteína puede inhibir la unión de la misma al ADN para facilitar su labor de reparación (O'Connor, 1993).

Con respecto a otras bases, Candéias et al. (2010) demostraron que el Cd inhibe la reparación del uracilo (U) en el ADN, resultado tanto de la mala incorporación como de la desaminación de la citosina (C). Estas lesiones, como las de los sitiosapurínicos-apirimidínicos (AP), son comunes en cualquier célula y deben ser reparadas constantemente para evitar efectos mutagénicos. Esta consecuencia genotóxica de la exposición al Cd podría dar lugar a la desregulación de los procesos celulares fisiológicos alterando el patrón de expresión génica, y aumentando la tasa de mutación, interfiriendo con el control normal del crecimiento y división celular.

#### 1.4.7. Reparación de la escisión de nucleótidos (NER)

Con respecto a la vía NER, el Cd interfiere con la eliminación de los dímeros de timina después de la irradiación UV, al inhibir el primer paso de esta reparación (Fatur et al., 2003). Además, tanto la asociación como la disociación de proteínas esenciales de la

vía NER se alteran en presencia de Cd. En este sentido, se ha observado una disminución de las concentraciones de la proteína nuclear C de xeroderma pigmentoso (XPC) por daño sobre el ADN inducido por la radiación UV-C en cultivos celulares tras la incubación a una concentración no citotóxica de Cd. Curiosamente, la proteína supresora de tumores p53 también contiene un dominio de unión al Zn, que es esencial para la unión al ADN y la función de dicha proteína en el mecanismo de transcripción. En este contexto, Meplan et al. (1999) demostraron que el CdCl<sub>2</sub> altera la conformación de p53 en células MCF7 e inhibe su unión al ADN. El factor p53 actúa como factor de transcripción para genes importantes de la vía NER, como son XPC y P48, por lo tanto, el cambio conformacional de p53 inducido por el Cd también podría provocar alteración de la vía NER (Adimoolam y Ford, 2002). El Cd también inhibe la proteína xeroderma pigmentoso A (XPA) de la vía NER. La capacidad de unión a ADN de XPA se reduce fuertemente tras la intoxicación con Cd (Hartmann y Hartwig, 1998; Hartwig et al., 2002).

#### 1.4.8. Reparación incorrecta (MMR)

En el año 2003, Jin et al. describieron que el Cd era capaz de inhibir la vía MMR en extractos de tejidos humanos dejando aproximadamente del 20-50% del ADN sin reparar. El Cd inhibe la unión del trifosfato de adenosina y la hidrólisis del complejo MSH2-MSH6, lo que conduce a la propagación de los errores celulares. También se ha descrito en diversos estudios que los animales expuestos al Cd tienen mayor número de células con rotura de una sola cadena de ADN y que el daño en el ADN celular es significativamente mayor. Los defectos genéticos y polimorfismos en los genes de los componentes de reparación del ADN (por ejemplo, ERCC1, MGMT, MLH1, MSH2, MSH6 y XRCC4) están fuertemente asociados con el desarrollo de cáncer en humanos

(Ford et al., 2000), por lo que las deficiencias heredadas o adquiridas en estos sistemas de reparación son una causa de inicio de desarrollo de tumores malignos, debido a una proliferación celular aberrante y/o a una apoptosis imperfecta.

El fenómeno de apoptosis celular, en general, tiene una función anticarcinogénica como mecanismo de defensa fundamental contra la proliferación incontrolada de células con mutaciones. Sin embargo, diversos estudios sugieren que no todas las células expuestas al Cd sufren apoptosis, como cabría esperar, sino una fracción de células expuestas adquieren una resistencia celular a la misma (Waisberg et al., 2003). Esta resistencia hace que las células sean más propensas a la acumulación de mutaciones y a la transformación neoplásica (Achanzar et al., 2002; Hart et al., 2001). La resistencia celular adquirida a la apoptosis es un sello general del cáncer y se considera crítica en el desarrollo y progresión de tumores malignos (Hanahan y Weinberg, 2000).

## **1.5. Toxicidad**

El Cd es un elemento ultratraza, contaminante ambiental y ocupacional, que induce efectos tóxicos en el ser humano, produciendo daños en diversos órganos (Friberg et al., 1986; Morselt, 1991). Es extremadamente tóxico y presenta efectos biológicos en concentraciones menores que otros metales (Godt et al., 2006). Todos los seres humanos estamos expuestos a niveles bajos de Cd y la aparición de efectos adversos y su severidad van a depender de la dosis y el tiempo de exposición (Friberg et al., 1986).

La intoxicación aguda se caracteriza por dolor abdominal agudo, náuseas, vómitos, diarrea, cefalea, vértigo y puede producir muerte por lesión hepática o renal. El

nivel sin efecto observable (NOAEL) de una dosis única oral se estima en 3 mg de Cd (Zarros et al., 2008). Los síntomas de toxicidad crónica incluyen alteraciones respiratorias y cardiovasculares, disfunción renal, alteraciones en el metabolismo óseo y neurotoxicidad (Zarros et al., 2008).

#### 1.5.1. Toxicidad renal

El riñón, y en especial la corteza renal, es el órgano diana del Cd en exposiciones prolongadas a las cantidades relativamente pequeñas que pueden encontrarse en alimentos y agua (Lemaire et al., 2020). La alteración a nivel renal más común, observada tras la exposición oral o inhalatoria crónica al Cd, es la necrosis de las células del túbulo proximal (Hagman et al., 1986; Hassau et al., 2004). Esta necrosis conlleva la aparición de diversas manifestaciones clínicas que incluyen proteinuria, aminoaciduria y glucosuria, frecuentemente acompañadas por un aumento de Cd en orina (Hagman et al., 1986; Hassau et al., 2004). La proteinuria se caracteriza por la presencia de proteínas de bajo peso molecular en orina, que en condiciones normales serían reabsorbidas a nivel del túbulo proximal. Dentro de estas proteínas, la beta<sub>2</sub>-microglobulina es la más afectada, aunque también se ven involucradas la lisozima y la proteína de unión a retinol (RBP) (Hagman et al., 1986; Hassau et al., 2004).

La disfunción renal por exposición al Cd ha sido descrita en múltiples estudios. En este sentido, en el estudio realizado por Järup (2002) sobre 1700 sujetos (de 20 a 80 años) de cuatro áreas de Bélgica con diferentes grados de contaminación por Cd se confirmó una probabilidad del 10% de disfunción tubular cuando la excreción de Cd supera 2-3 µg/g de creatinina. Un estudio similar realizado en habitantes de Kalmar (de

20 a 79 años) sugirió un aumento del riesgo de enfermedad renal a niveles relativamente bajos de exposición al Cd. En este estudio, el lugar de residencia de la población se utilizó como un factor de medida cruda de la exposición, ya que las personas que vivían cerca de las plantas contaminantes de cadmio (plantas que producen baterías de níquel-cadmio) tenían niveles elevados de Cd urinario en comparación con las personas que vivían más alejadas de dichas fuentes (Hellström et al., 2001). Otros estudios han confirmado un aumento de la mortalidad general en personas que viven en áreas contaminadas con cadmio y que presentan altos niveles de Cd urinario y/o proteinuria tubular (Iwata et al., 1991, 1992).

Hay varios estudios que describen los cambios renales que se observan tras la exposición crónica al Cd, confirmando una relación entre la exposición crónica al Cd y la nefrotoxicidad (Lemaire et al., 2020). Las primeras etapas de la nefrotoxicidad del Cd se caracterizan por cambios a nivel de las células del túbulo proximal. Se observan alteraciones en la adhesión de las células, se activan diversas cascadas de señalización celular y se producen fenómenos autofágicos; todas ellas alteraciones que anteceden a la necrosis o apoptosis de las células del túbulo proximal (Prozialeck y Edwards, 2012).

Una vez el Cd entra en el torrente sanguíneo, es transportado al hígado donde induce la síntesis de MT, que se unen al Cd amortiguando sus efectos tóxicos. Sin embargo, a medida que progresa la muerte de los hepatocitos, ya sea debido a un proceso fisiológico o como resultado del efecto lesivo del Cd a nivel celular, el complejo Cd-MT se libera al torrente sanguíneo (Jin et al., 1998; Klaassen et al., 2009). Aunque el complejo Cd-MT no es tóxico para la mayoría de los órganos, puede ser filtrado en el glomérulo y el Cd puede entrar en las células epiteliales del túbulo proximal. En esta situación, el complejo Cd-MT puede tener el efecto paradójico de facilitar la entrega de Cd del hígado al riñón,

y se ha sugerido que el Cd-MT puede mediar en realidad algunos de los efectos tóxicos de Cd en el túbulo proximal (Klaassen y Liu, 1997). En este sentido, el edema mitocondrial observado en las células del túbulo proximal renal parece ser consecuencia del daño que produce el propio complejo Cd-MT durante su reabsorción (Ohta et al., 2000).

Otros estudios, sin embargo, indican que en realidad es el Cd<sup>2+</sup>, y no los complejos Cd-MT, el que daña las células epiteliales de los túbulos proximales (Goyer et al., 1989; Klaassen et al., 2009), ya que el Cd no unido a las MT es liberado en el riñón, y este exceso de Cd (Nogawa, 1986; Nomiyama y Nomiyama, 1986), interactúa con las membranas celulares, causa peroxidación lipídica y/o desplaza metales esenciales de las MT, privándolas de cofactores esenciales (Stacey et al., 1980). Además, que los animales MT-nulos sean sensibles a la lesión del tubo proximal inducida por Cd proporciona evidencia indiscutible para estos autores de que los complejos Cd-MT no juegan un papel tan importante, como otros autores han descrito en sus estudios, en la mediación directa de los efectos nefrotóxicos de Cd (Liu et al., 1998).

El principal problema con el que se han encontrado los investigadores, a la hora de identificar en estudios *in vivo* los mecanismos moleculares por los cuales el Cd ingresa en el interior de las células del túbulo proximal, es que todo el Cd circulante en plasma está unido a proteínas u otras moléculas. El Cd circulante puede estar estrechamente unido a proteínas de unión de metal específicas, tales como las MT (Klaassen y Liu, 1997; Klaassen et al., 2009), o puede estar asociado de forma libre con moléculas, tales como albúmina, aminoácidos o grupos sulfhidrilo de bajo peso molecular, tales como el glutatión (GSH) o la cisteína (Bridges y Zalups, 2005; He et al., 2009).

Los resultados de varios estudios demuestran que el Cd puede entrar en las células del túbulo proximal a través de una variedad de mecanismos (He et al., 2009). Como se ha indicado anteriormente, el Cd-MT circulante puede ser filtrado en el glomérulo y captado por el epitelio del túbulo proximal en un proceso que involucra el transporte mediado con megalina en la membrana apical (Klaassen et al., 2009; Squibb y Fowler, 1984). Otros estudios han demostrado que hay una captación de conjugados Cd-tiol de menor peso molecular (cisteína y GSH) por las células del túbulo proximal (Bridges y Zalups, 2005). Hay evidencia, también, de que el Cd puede ingresar a las células tubulares renales a través de una variedad de canales y transportadores para iones, tales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (Bridges y Zalups, 2005; He et al., 2009).

He et al. (2009) han proporcionado recientemente pruebas convincentes de que la familia de transportadores de Zn humanos 8 (ZIP8) juegan un papel especialmente importante en la captación celular de Cd en el riñón (He et al., 2009).

En conjunto, los resultados de todos los estudios sugieren que, con patrones típicos de exposición, existen numerosos mecanismos que contribuyen a la captación de Cd en las células del túbulo proximal *in vivo* (Prozialeck y Edwards, 2012).

La dosis, la duración, la forma química del Cd en el tejido renal e intestinal y la vía de exposición del Cd son factores importantes en la evaluación de los efectos crónicos tras la administración prolongada del mismo. Cuando los niveles de Cd en el tejido exceden una concentración crítica de aproximadamente 150  $\mu\text{g/g}$  de tejido, las defensas intracelulares tales como la MT y el GSH se reducen y las células sufren lesiones y comienzan a morir (Gobe y Crane, 2010; Prozialeck y Edwards, 2012). Los efectos

tempranos observados a nivel celular, debidos a la toxicidad del Cd, son la formación de vesículas picnóticas a nivel de la superficie luminal, seguida de cambios mitocondriales focales, que pueden variar desde un edema leve hasta un edema más severo (Cherian et al., 1976; Dorian et al., 1995; Fowler y Nordberg, 1978; Goyer et al., 1984; Murakami et al., 1983; Vestergaard y Shaikh, 1994; Webb y Etienne, 1977). Cuando las dosis de Cd son altas (30-60 mg/kg), se observan alteraciones analíticas tales como proteinuria de bajo peso molecular, glucosuria y aminoaciduria, acompañadas de cambios histopatológicos en forma de un leve engrosamiento membranoso a nivel del glomérulo (Ohta et al., 2000). Cuando las lesiones a nivel renal son avanzadas, se observan cambios histopatológicos tales como atrofia, fibrosis intersticial, esclerosis glomerular y necrosis (Salińska et al., 2012).

#### 1.5.2. Toxicidad ósea

La intoxicación por Cd puede afectar gravemente la homeostasis y metabolismo del Ca. La osteomalacia y la osteoporosis, acompañadas de dolor óseo, forman parte de la enfermedad de Itai-Itai, descubierta a finales de 1940 y que afectaba de manera más intensa a mujeres, en asociación a otros trastornos, como la malnutrición, el embarazo, la lactancia o la ooforectomía (Nogawa et al., 1981).

Los efectos del Cd sobre el hueso normalmente aparecen tras el daño renal y son secundarios a cambios en el metabolismo del Ca, fósforo y vitamina D (Arena et al., 1997). Los efectos sobre el hueso se han estudiado principalmente tras la exposición a elevados niveles de Cd, ya sea en trabajadores o en población residente en áreas contaminadas. No obstante, también se han encontrado en población general expuesta a

bajos niveles de Cd (Arena et al., 1993). El Cd se deposita en el hueso en una concentración mucho más baja que la alcanzada en otros órganos como el riñón o el hígado, pero las concentraciones a partir de las cuales tienen lugar efectos tóxicos son mucho más bajas. Se estima que la resistencia ósea se encuentra disminuida a una concentración de 0,1 µg/g de peso seco óseo (Ogoshi et al, 1992). Comparativamente es necesaria una concentración de 200 µg/g para producir daño renal (Friberg et al, 1986). Como ya se ha comentado, la toxicidad ósea aumenta en mujeres con algunos trastornos asociados (Nogawa, 1981).

Dependiendo de los estudios que analicemos, podemos encontrar diversos estudios que describen que la exposición a largo plazo de Cd en los seres humanos puede producir un aumento de la fragilidad esquelética y una disminución de la densidad mineral ósea. Sin embargo, otros estudios describen que la pérdida de Ca por parte del hueso aparece a bajas concentraciones y es una respuesta precoz. Cuando revisamos los estudios de cultivos de tejido óseo, el Cd a bajas concentraciones actúa directamente sobre las células óseas para provocar tanto la disminución de la formación ósea como el aumento de la resorción ósea. (Bhattacharyya, 2009).

El estudio que más sujetos ha evaluado en relación a la asociación entre la exposición a dosis bajas de Cd y la densidad mineral ósea en individuos expuestos medioambientalmente y ocupacionalmente se realizó en las comunidades de Fliseryd, Oskarshamn y Linköping, con un total de 1064 sujetos de entre 16 y 80 años. Los resultados mostraron que incluso con un bajo nivel de exposición al Cd, éste puede conducir a la osteoporosis (Alfvén et al., 2000).

Hay que tener en cuenta que la sensibilidad de las células a los efectos del Cd está relacionada en primer lugar con la capacidad de captación y los niveles de acumulación celular. Como el Cd es un metal no esencial, la existencia de sistemas de transporte de membrana específicamente dedicados a la captación celular de Cd es improbable y generalmente se cree que el Cd puede usar mecanismos de transporte para metales esenciales. Se ha demostrado que los canales de calcio dependientes del voltaje son responsables de la captación de Cd en las células renales, pituitarias y hepáticas (Endo et al., 2002; Hinkle et al., 1987). Además, el Cd inhibe la actividad de la enzima 1-hidroxicolecalciferol hidroxilasa, responsable del metabolismo en el riñón que convierte la 25-(OH) D<sub>3</sub> a la 1,25-(OH) D<sub>3</sub>, que es la forma activa de la vitamina D<sub>3</sub> (Chertok et al., 1981). La presencia en el intestino de la forma activa de la vitamina D<sub>3</sub> es esencial para la absorción de iones Ca (Chertok et al., 1981).

El Cd altera el metabolismo óseo a través de dos mecanismos, uno de ellos directo, en el que el Cd actúa directamente sobre los osteoclastos u osteoblastos estimulando la resorción ósea o inhibiendo la formación de hueso. El otro es un mecanismo indirecto y corresponde a un efecto secundario que aparece sobre el hueso debido al daño producido por el Cd en el riñón u órganos gastrointestinales (Kjellström, 1992).

El Cd, además, puede bloquear la actividad de los osteoblastos y favorecer la liberación de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que activaría la acción de los osteoclastos (Bodo et al., 2010; Coonse et al., 2007; Regunathan et al., 2003). Sin embargo, Coonse et al. (2007) advirtieron que la exposición al Cd puede afectar directamente a los osteoblastos induciendo la muerte apoptótica mediante la activación de la caspasa-3 (Conse et al.,

2007) y contribuyendo a la pérdida ósea neta, lo que conduciría a una enfermedad ósea (Xing y Boyce, 2004).

Hoy en día se conocen múltiples cascadas de señalización implicadas en la capacidad del Cd para interrumpir la función celular, incluida la apoptosis (Thévenod, 2009). Se estima que dos vías de señalización se activan en respuesta a la exposición al Cd en varios tipos de células. Estas dos vías son la vía de la proteína quinasa C (PKC) y la vía de la proteína quinasa regulada por una señal extracelular (ERK) (Kalariya et al., 2009; Låg et al., 2005; Mantha y Jumarie, 2010; Martin et al., 2006). Tradicionalmente, ERK se considera una vía de proliferación celular con una capacidad para proteger las células contra la apoptosis (Santos et al., 2007; Martin et al., 2009). Sin embargo, estudios recientes indican que la activación de ERK puede conducir a la inducción de la muerte celular (Martin et al., 2006, 2009; Rasola et al., 2010). En este sentido, Martin et al. (2006) describieron que la exposición al Cd conduce a la activación sostenida de ERK durante varios días y finalmente a la apoptosis mediante la activación de caspasa-3 y -8 en células de riñón embrionario humano HEK293.

La exposición a Cd también se ha relacionado con la vía de la PKC, que es activada en células de riñón de rata y de riñón humano tras exposición a éste (Låg et al., 2005). Además, se ha demostrado que la PKC regula negativamente la activación sostenida de ERK en células HEK, haciendo que el ERK activado sea regulado negativamente cuando está presente PKC fosforilada (Martin et al., 2009). Las vías ERK y PKC, además de la apoptosis, regulan muchas funciones celulares, incluyendo la regulación de la formación, maduración y diferenciación de osteoblastos, ya sea

inhibiendo o estimulando la expresión de genes osteoblásticos clave (Addison et al., 2007; Chen et al., 2008; Nakura et al., 2011; Prouillet et al., 2004; Zhang et al., 2011).

### 1.5.3. Toxicidad pulmonar

En seres humanos, la exposición a altas concentraciones de vapores y/o polvo de Cd tiene un efecto irritativo a nivel del tracto respiratorio, con un periodo de latencia relativamente largo hasta la aparición de síntomas. Los síntomas que aparecen de manera aguda (hasta 2 horas tras la exposición) son tos e irritación de garganta y mucosas. Desde las 4 hasta las 10 horas de exposición, aparecen síntomas similares a los de un proceso gripal, incluyendo tos, opresión, dolor torácico, disnea, malestar generalizado, sudoración, escalofríos, mialgias y artralgias. Desde las 8 horas hasta 7 días de exposición, aparecen daños avanzados a nivel pulmonar con síntomas como disnea, sibilancias, dolor torácico, constricción precordial, tos persistente, debilidad y malestar general, anorexia, náuseas, diarrea, dolor abdominal y hemoptisis. La exposición aguda a niveles elevados de Cd puede ser fatal y aquellos individuos que sobreviven presentan trastornos de la función pulmonar durante años, incluso tras un único episodio agudo.

El pulmón también se considera como uno de los órganos diana de la toxicidad por Cd. El Cd entra en el pulmón a través del polvo doméstico, la exposición ocupacional y/o el tabaquismo (Hogervorst et al., 2007), que es la principal fuente de intoxicación por este metal. El pulmón humano reabsorbe del 40 al 60% del Cd presente en el humo del tabaco (Elinder et al., 1976; Godt et al., 2006).

Varios estudios han evaluado los efectos de la exposición al Cd a nivel pulmonar. Lampe et al. (2008) examinaron a un grupo de 96 hombres fumadores y no fumadores que se sometieron a pruebas de función pulmonar entre 1994 y 2002. Estos autores encontraron una relación directa entre la reducción del volumen espiratorio forzado en un segundo (un reflejo de la función pulmonar) y el aumento de Cd urinario entre la subpoblación fumadora (Sarkar et al., 2013).

Estudios con líneas de células epiteliales de pulmón de rata mostraron que el Cd puede inducir apoptosis en estas células, como mecanismo subyacente a la inducción de ERO. Estos resultados se basan en el hecho de que la exposición de estas líneas de células a 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durante 24 horas da lugar a un aumento de cuatro veces el grupo GSH oxidado (glutathion disulfuro: GSSG), alterando así la homeostasis del GSH. Además, el Cd (10-50  $\mu\text{M}$  durante 1-3 días) disminuye la expresión de la proteína reguladora de conductancia transmembrana de la fibrosis quística en las células epiteliales de las vías respiratorias humanas (Calu3) con la consiguiente disminución del transporte de cloruro en la célula (Nair et al., 2013; Rennolds et al., 2010).

Además, se ha demostrado que el Cd es una causa de estrés oxidativo pulmonar, enfisema e inflamación persistente de las vías respiratorias en modelos de ratas que reflejan las condiciones observadas en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Hart et al., 1999). Las ratas Sprague-Dawley que recibieron Cd nebulizado por inhalación (0,1 %  $\text{CdCl}_2$  en NaCl al 0,9 %) durante una sola exposición de 1 hora mostraron un aumento agudo de GSSG en su líquido de lavado broncoalveolar (BALF), que se equilibró con un aumento simultáneo de GSH. Los grupos de animales que sufrieron exposición repetida a Cd (1 hora durante 35 semanas) mostraron un

aumento progresivo de BALF-GSH, lo que está de acuerdo con los hallazgos observados en pacientes con EPOC (Kirschvink et al., 2006).

Diversos estudios también han demostrado el papel del Cd en el desarrollo de cáncer de pulmón en los seres humanos. Estudios longitudinales como el de Verougstraete et al. (2003) han demostrado que los trabajadores expuestos a Cd o a los compuestos de Cd tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. Otro estudio poblacional que analizaba los efectos de la exposición ambiental al Cd, demostró una asociación positiva entre los niveles de Cd en orina de 24 horas (duplicación de la excreción) y el cáncer de pulmón (Nawrot et al., 2006).

#### 1.5.4. Toxicidad hepática

El Cd, tras ser absorbido vía gastrointestinal, entra al hígado a través de la circulación portal, ligado principalmente a la albúmina. Una vez en los capilares sinusoidales hepáticos, entra en los hepatocitos gracias a los transportadores de membrana sinusoidal específicos como DMT1, ZIP8 y ZIP14, que participan en la captación de Cd a nivel de los hepatocitos (Fujishiro et al., 2009; Liuzzi et al., 2006). El Cd en el interior de los hepatocitos forma complejos con péptidos pequeños y proteínas, como el GSH o la familia de proteínas de unión a metal de alta afinidad MT-I y MT-II, a través de grupos sulfhidrilo (Arroyo et al., 2012). Las MT son beneficiosas para el hígado, ya que se unen al Cd en el citosol hepático y lo convierte en "inerte". Sin embargo, el complejo Cd-MT es nefrotóxico y se ha propuesto como responsable de la intoxicación crónica por Cd (Klaassen y Liu, 1997).

Se han descrito dos vías implicadas en la hepatotoxicidad aguda por Cd, una inicial debida a los efectos directos del Cd y otra posterior debida a la inflamación (Tzirogiannis et al., 2003). La lesión primaria está causada por la unión del Cd a grupos sulfhidrilo a nivel mitocondrial, así como por la inactivación del grupo tiol, provocando estrés oxidativo, transición de la permeabilidad y disfunción mitocondrial (Alhazza, 2008). Aunque el Cd puede producir daño directo en los hepatocitos, hay razones convincentes para creer que la lesión hepatocelular se produce *in vivo* como resultado de la isquemia causada por el daño a las células endoteliales (Liu et al., 1992). Se cree que la lesión secundaria por la exposición aguda al Cd se produce por la activación de las células de Kupffer y una cascada de eventos que implican varios tipos de células a nivel hepático, así como un gran número de mediadores inflamatorios y citotóxicos (Rikans y Yamano, 2000).

#### Mecanismos implicados en la hepatotoxicidad inducida por cadmio

El Cd es un metal no redox que, indirectamente, puede causar estrés oxidativo por el agotamiento de los niveles celulares de GSH (Alhazza, 2008). La lesión hepática está asociada a la unión del Cd con grupos sulfhidrilo, induciendo daños sobre proteínas de membrana, proteínas citoplasmáticas y enzimas (Rikans y Yamano, 2000). El Cd se une a los grupos sulfhidrilo con mayor afinidad que los grupos fosfato, cloruro, carboxilo o amino (Rikans y Yamano, 2000). El Cd, además, compite con metales esenciales como el Zn, Se, Cu y Ca, que interfieren con diversos procesos celulares como el transporte de membrana y metabolismo energético (Martelli et al., 2006).

La exposición al Cd perturba la homeostasis de diversos metales esenciales y, recíprocamente, los efectos del Cd dependen del estado corporal de los metales esenciales como el Fe y el Zn (Moulis, 2010). La función de muchas MT depende en gran medida de su interacción con un metal, usualmente uno de transición, tal como el Cu, Fe y Zn. De esta manera, la sustitución de metales esenciales por Cd es propuesta como el principal mecanismo molecular de hepatotoxicidad por este metal (Arroyo et al., 2012).

El Cd afecta a varias funciones celulares, tales como actividades enzimáticas, sistemas de reparación de ADN, estado redox de la célula y transducción de señales (Van Kerkhove et al., 2010). La inactivación de tioles proteicos y no proteicos podría producir toxicidad al interrumpir el estado redox intracelular, lo que a su vez podría afectar a una serie de procesos biológicos importantes (Rikans y Yamano, 2000). El estrés oxidativo, definido como el estado de desequilibrio entre las concentraciones de ERO y el mecanismo de defensa antioxidante, contribuye al desarrollo de daño hepático (Rikans y Yamano, 2000).

El Cd, además, modifica la adhesión célula-célula, desmontando el complejo E-cadherina/beta-catenina (Bruscalupi et al., 2009). El Cd también estimula a las células de Kupffer, que una vez activadas liberan una serie de mediadores inflamatorios (ERO, óxido nítrico y citoquinas) (Rikans y Yamano, 2000). Se ha descrito que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleuquina-1beta (IL-1 $\beta$ ) estimulan la expresión de moléculas de adhesión intercelular-1 (IMAC-1), las moléculas de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), la E-selectina, la P-selectina y la B2-integrina en el hígado (Mousa, 2004), las cuales inician una cascada de respuestas celulares y humorales que

conducen a inflamación y daño hepático secundario durante la hepatotoxicidad inducida por el Cd (Yamano et al., 2000).

De todos los mecanismos propuestos, la producción de mediadores inflamatorios y moléculas de adhesión, la homeostasis de metales esenciales, así como la inactivación de los grupos sulfhidrilo, son los que parecen más importantes en el origen de la lesión hepática inducida por Cd.

#### 1.5.5. Toxicidad para la reproducción

Se ha demostrado que el cadmio produce numerosos efectos perjudiciales en la función reproductiva de los mamíferos, relacionados con alteraciones en las hormonas sexuales (Chedrese et al., 2006).

Los estudios sobre el efecto del Cd en el aparato reproductor describen que altera el ciclo ovárico normal y el mantenimiento del embarazo por medio de la alteración de la progesterona. Por lo tanto, se ha mostrado que el Cd ejerce efectos significativos sobre la función ovárica y la exposición al mismo durante el embarazo se ha relacionado con prematuridad y bajo peso al nacer debido a una biosíntesis de progesterona disminuida por el trofoblasto placentario (Miceli et al., 2005).

La exposición al Cd también se ha relacionado con un retraso de la implantación y una posible pérdida precoz del embarazo, producido por causas como un retraso de la proliferación y desarrollo trofoblástico, necrosis placentaria, supresión de la biosíntesis de esteroides y manejo alterado de los metales esenciales por la placenta (Thompson y

Bannigan, 2008). El Cd se acumula en los embriones desde la etapa de mórula en adelante. Cuanto mayor sea la dosis de exposición, más probabilidad de que se inhiba la progresión a la fase de blastocisto, debido a fenómenos de apoptosis y alteración de la adhesión celular (Thompson y Bannigan, 2008).

La concentración de Cd en el ovario aumenta con la edad, asociándose con una alteración en el desarrollo de los ovocitos y una inhibición de la ovulación (Thompson y Bannigan, 2008). Además, el Cd altera la expresión de moléculas de adhesión celular, lo que conlleva una ineficaz recogida del ovocito por parte los cilios tubáricos (Thompson y Bannigan, 2008).

Aunque se ha descrito que las mujeres tienen un mayor riesgo de anomalías reproductivas asociadas con la exposición, como se ha demostrado en numerosos estudios (Benoff et al., 2009; Taha et al., 2013), la exposición al Cd también produce anomalías a nivel de la función testicular. En este sentido, los efectos tóxicos del Cd en el parénquima testicular incluyen alteraciones en el endotelio vascular, en las células de Leydig y Sertoli y en las uniones intercelulares. Entre los mecanismos de toxicidad que conducen a estos efectos se incluyen la inducción del estrés oxidativo, un deterioro de los mecanismos de defensa antioxidantes y una activación severa de la respuesta inflamatoria, lo que da lugar a cambios morfológicos y funcionales, tales como la inhibición de la síntesis de testosterona y el deterioro de la espermatogénesis (Benoff et al., 2009; Taha et al., 2013). Además de estas alteraciones a nivel del aparato reproductor masculino, el Cd también tiene efectos a nivel prostático, alterando su actividad hormonal y favoreciendo la infertilidad en los hombres (Sarkar et al., 2013). A nivel testicular diversos estudios describen que el tabaco produce un aumento de los niveles de Cd en el plasma del líquido

seminal, asociándose a una disminución del tamaño testicular (Jurasovic et al., 2004), a un aumento de los niveles séricos de hormonas reproductivas y a una disminución de la concentración (Chia et al., 1994) y motilidad espermática (Telisman et al., 2000).

#### 1.5.6. Toxicidad endocrina

El Cd es uno de los metales pesados incluido entre los disruptores endocrinos (ATSDR, 2012). Un disruptor endocrino (DEn) se define como un producto o mezcla de productos químicos exógenos que interfiere con cualquier mecanismo hormonal endógeno (Schug et al., 2011).

##### *1.5.6.1. Toxicidad sobre las hormonas sexuales*

A día de hoy, las publicaciones en la literatura describen resultados contradictorios, encontrando estudios donde el Cd ejerce un efecto agonista sobre las hormonas sexuales (Brama et al., 2007; García-Morales et al., 1994; Höfer et al., 2009, Johnson et al., 2003; Stoica et al., 2000) y otros donde el efecto es antagonista (Höfer et al., 2009; Rider et al., 2009; Silva et al., 2006).

A pesar de haberse estudiado de una manera extensa, el mecanismo exacto por el cual el Cd actúa sobre el aparato reproductor es desconocido (Nasiadek et al., 2018). Según lo publicado, parece estar mediado por una interacción directa con el receptor del estradiol (ER) (Johnson et al., 2003) o por una alteración del receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR), presente a nivel uterino y mediado, a su vez, por el ER.

Se ha demostrado que el Cd puede alterar los índices de esteroidogénesis ovárica y placentaria (Chedrese et al., 2006). El Cd también altera la biosíntesis de la progesterona (Miceli et al., 2005).

Estudios con cultivos de células de mamíferos sugieren que el Cd activa una conformación agonista de los ER, induciendo la expresión de genes diana de estrógenos a través de la activación de cinasas citoplasmáticas (Fechner et al., 2011; Zang et al., 2009).

#### *1.5.6.2. Toxicidad sobre el sistema tiroideo*

El sistema tiroideo juega un papel importante en el organismo, bien en el mantenimiento de la homeostasis, bien en el control del crecimiento corporal o en el correcto funcionamiento del sistema nervioso, cardiovascular o reproductivo (Danzi y Klein, 2012; Williams, 2008; Yazbeck, 2012).

La función tiroidea se encuentra controlada por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides y regulada por la hormona liberadora de tirotropina (TRH), la hormona estimulante del tiroides (TSH), la tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) (Kelly, 2000). El efecto de las HT depende, fundamentalmente, de la concentración intracelular de T3, que es la forma biológicamente activa, unida al receptor nuclear tiroideo (TR). La mayor parte de T3 circulante es generada gracias a la deiodinación extratiroidea de T4, que ocurre principalmente en el hígado (Harvey, 2002).

Los trastornos de la glándula tiroides son los más frecuentes dentro del sistema endocrino e incluyen el hipotiroidismo, hipertiroidismo, bocio y otros trastornos por déficit de yodo, como la tiroiditis de Hashimoto y el cáncer de tiroides (Bajaj et al., 2016). En las últimas décadas ha aumentado la prevalencia de enfermedades tiroideas autoinmunes y cáncer de tiroides (Nie, 2017) que se sitúa, en la actualidad, el quinto en frecuencia entre mujeres jóvenes (Pellegriti et al., 2012).

Respecto a los efectos principales que tiene el déficit de HT sobre el desarrollo del SNC, estudios experimentales han podido demostrar el efecto directo que tienen las HT sobre la proliferación celular, diferenciación neuronal y elaboración del árbol dendrítico (Thompson y Cline, 2016). A este respecto se han publicado múltiples estudios que han estudiado el efecto directo del déficit de HT sobre el sistema nervioso en desarrollo, encontrando una reducción en la expansión de células progenitoras (Bernal, 2017), una disminución en la migración neuronal (Bernal, 2017), así como un retraso en la proliferación (Bernal, 2017) y diferenciación neuronal (Moog et al., 2017).

A nivel de la corteza cerebral, el déficit de HT se relaciona con una reducción en el grosor de la misma (Bernal J, 2017), displasia cortical (Bernal, 2017) y una disposición anómala de las diferentes capas corticales (Flamant et al., 2017). Finalmente, varios estudios han observado que el déficit de HT interrumpe el desarrollo de axones y dendritas (Sawano et al., 2013; Wallis et al., 2008), disminuye la expresión de proteínas responsables de la plasticidad sináptica (Sawano et al., 2013; Wallis et al., 2008) y retrasa la mielinización axonal fisiológica (Moog et al., 2017).

Respecto a las HT y sistema colinérgico, T3 y T4 influyen de manera significativa sobre el desarrollo del hipocampo, corteza cerebral, PSB y cerebelo, observándose en caso de déficit de las mismas, un retraso en la maduración del sistema colinérgico (Patel et al., 1980; Patel et al., 1986; Patel et al., 1987; Patel et al., 1988). Las neuronas colinérgicas de los núcleos del PSB proyectan hacia el hipocampo y corteza temporal, occipital, frontal, parietal y cingulada (Fibiger, 1982; Hjorth-Simonsen y Jeune, 1972; Lehman et al., 1980; Sofreniew et al., 1987), todas ellas áreas relacionadas con el aprendizaje (sobre todo tareas espaciales) y la memoria (Eichenbaum et al., 1994; Scoville y Milner, 1957), pero en especial la vía septo-hipocampal (O'Keefe y Dostrovsky, 1971).

Patel et al. (1987) observaron en sus estudios sobre el PSB de ratas, que los efectos del hipotiroidismo sobre la función colinérgica son irreversibles, a pesar de que se administren HT durante largos periodos de tiempo, excepto a nivel del PSB, donde los efectos son reversibles. Sin embargo, cuando se exponen neuronas colinérgicas de la corteza cerebral de embriones de rata, a NGF (Factor de crecimiento neural) o a T3, se observa un aumento dosis-dependiente de ChAT y AChE, así como un aumento en la densidad de espinas dendríticas (Garza et al., 1990).

Respecto a los déficits de aprendizaje y memoria relacionados con el déficit de HT, varios estudios relacionan estos efectos fundamentalmente con afectación del PSB o de la vía septo-hipocampal. Por ejemplo, estudios en ratas donde se lesionaba el núcleo basal de Meynert, se observaban alteraciones en el aprendizaje (sobre todos en tareas espaciales) de las mismas (Connor et al., 1991; Dubois et al., 1985). Por otra parte, Ammassari-Teule et al. (1993), no observaron una correlación directa entre el déficit

colinérgico a nivel cortical (tras lesiones químicas o mecánicas) y un déficit en el aprendizaje de las ratas en estudio. Estos estudios han demostrado la importancia de la vía septo-hipocampal en las funciones de aprendizaje y memoria (O'Keefe y Dostrovsky, 1971).

En relación a los compuestos químicos que pueden producir alteraciones en el sistema tiroideo, los estudios en seres humanos son difíciles de interpretar debido fundamentalmente al amplio rango fisiológico de las hormonas TSH y HT, que hace que haya una gran variabilidad en sus niveles entre los individuos (Boas et al., 2012). Los compuestos químicos que actúan sobre el sistema tiroideo lo hacen, de forma mayoritaria, interfiriendo a nivel del receptor de la TSH, hormona que actúa estimulando todos los pasos de producción de las HT (Boas et al., 2012).

Dentro de los DEN que actúan sobre el sistema tiroideo encontramos, en la literatura, los siguientes: (a) los bifenoles policlorados y las dioxinas, compuestos con una estructura similar a la T4 (Boas et al., 2012) que, en estudios en seres humanos, han demostrado actuar disminuyendo los niveles de HT y aumentando los de la TSH, bien por alteraciones del transporte o bien del metabolismo (Abdelouahab et al., 2008; Hagmar et al., 2001; Osius et al., 1999; Persky et al., 2001; Schell et al., 2008; Turyk et al., 2007); (b) los retardantes de llama bromados, con una estructura similar a la T4 (Boas et al., 2012). Estos compuestos interfieren sobre la función tiroidea a diferentes niveles, bien interaccionando con los receptores tiroideos (Fini et al., 2007; Jagnytsch et al., 2006; Kitamura et al., 2005), actuando como antagonistas de las HT (Hofmann et al., 2009), induciendo la producción de enzimas hepáticas que actúan sobre la glucuronidación (Hallgren et al., 2001) o disminuyendo la actividad de la proteína transportadora de

transtiretina (TTR), así como el transporte transmembrana de las HT (Richardson et al., 2008); (c) pesticidas, compuestos químicos estudiados ampliamente, tanto *in vivo* como *in vitro*, que han demostrado una asociación negativa entre los niveles de las HT y la exposición a pesticidas (Boas et al., 2012). En ratas, varios estudios han demostrado que la exposición a DDT (Scollon et al., 2004), HCB (Alvarez et al., 2005; Foster et al., 1993; Rozman et al., 1986; van Raaij et al., 1993a; van Raaij et al., 1993b) y mezclas de ambos (den Besten et al., 1993; Rawlings et al., 1998), producen una disminución en los niveles de las HT (Scollon et al., 2004); (d) los químicos perfluorados, compuestos químicos con propiedades para la protección de superficies, que interfieren con el metabolismo de las hormonas tiroideas, tanto *in vivo* (Chang et al., 2007; Chang et al., 2008; Lau et al., 2003; Luebker et al., 2005; Martin et al., 2007; Seacat et al., 2003; Thibodeaux et al., 2003; Yu et al., 2009b) como *in vitro* (Yu et al., 2009a; Weiss et al., 2009); (e) los ftalatos, que, según estudios experimentales, actúan mediante diferentes mecanismos en la homeostasis tiroidea. Algunos de ellos interfieren en la actividad del co-transportador de yoduro de sodio (Breous et al., 2005), otros inhiben la captación de T3 por parte de las células (Shimada y Yamauchi, 2004), otros se unen de manera competitiva a la TTR (Ishihara et al., 2003) y por último algunos inhiben la expresión del gen TR-beta (Sugiyama et al., 2005); (f) el bisfenol A, compuesto ampliamente utilizado en productos plásticos (Calafat et al., 2008; Ye et al., 2008). Los estudios en animales son controvertidos. En ratas adultas, no se han encontrado alteraciones en los niveles de las HT tras la exposición a bisfenol A (Nieminen et al., 2002b; Nieminen et al., 2002a; Xu et al., 2007). En estudios prenatales y en crías de animales se han encontrado, sin embargo, alteraciones de los niveles de las HT (Freitas et al., 2010; Iwamuro et al., 2003; Kudo and Yamauchi, 2005;; Moriyama et al., 2002; Nieminen et al., 2002a; Nieminen et al., 2002b; Schmutzler et al., 2007; Sun et al., 2009; Zoeller et al., 2005). En seres humanos hay escasos estudios que

evalúen el efecto del bisfenol A sobre el sistema tiroideo, por lo que son necesarios más experimentos, sobre todo a nivel de fetos y niños (Boas et al., 2012); (g): el perclorato, es un compuesto químico con efectos antitiroideos bien conocidos, que actúa inhibiendo el co-transportador de yoduro de sodio, comprometiendo la captación de yodo por las células foliculares (Tonacchera et al., 2004).

Pocos estudios han evaluado el efecto de los metales pesados en el sistema tiroideo (Boas et al., 2006; Pearce y Braverman, 2009). El Pb, el Hg y el Cd son tóxicos medioambientales conocidos, pero hay muy pocos estudios que hayan estudiado su asociación con alteraciones en los niveles de T3, T4 y TSH (Dundar et al., 2006; Jin et al., 2006; Lamb et al., 2008; Pearce y Braverman, 2009; Robins et al., 1983; Schell et al., 2008).

El Cd, además de acumularse en órganos como el hígado, riñón y músculo, se deposita en la glándula tiroidea, gracias a la presencia intracelular de proteínas ricas en cisteína y MT, que se unen al Cd y actúan como potentes bloqueadores (Klaassen et al., 2009). Se ha descrito que el Cd daña la glándula tiroidea tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. En este sentido, se ha observado en la línea celular tiroidea '8505C' el efecto tóxico del cadmio, con concentraciones relativamente bajas de 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$  (Kobayashi et al., 2017; Kobayashi et al., 2005). Además, se observó que el efecto tóxico del Cd sobre la glándula tiroidea se debe al daño directo que produce sobre las células foliculares y parafoliculares (Pilat-Marcinkiewicz et al., 2003). El Cd se acumula en las mitocondrias de las células epiteliales foliculares, lo que reduce el mecanismo de fosforilación oxidativa a dicho nivel, inhibiendo así la síntesis y liberación de HT (Yoshizuka et al., 1991).

No existen muchos estudios que evalúen en efecto del Cd sobre el sistema tiroideo, pero su exposición en ratas se relacionó con una disminución en los niveles séricos de T4 debido a alteraciones en la deiodinación (Hammouda et al., 2008; Mori et al., 2006). Un estudio japonés, que comparaba los niveles de las HT en residentes de un área contaminada de cadmio, con los residentes de un área no contaminada, observaron que los niveles de T4 eran menores en mujeres expuestas, pero que los niveles de T3 eran mayores en residentes expuestos de ambos sexos (Nishijo et al., 1994).

Sin embargo, estudios en neonatos y niños con exposición ambiental a Cd, refieren resultados con escasa consistencia (Iijima et al., 2007; Maervoet et al., 2007; Osius et al., 1999). Estos estudios miden el nivel de Cd a nivel plasmático, un biomarcador adecuado para exposiciones recientes, pero el nivel de Cd urinario es un indicador más útil para exposiciones a largo plazo (Järup y Akesson, 2009).

#### 1.5.7. Neurotoxicidad

##### *1.5.7.1. Neurotoxicidad durante el periodo de desarrollo del sistema nervioso*

La neurotoxicidad por Cd es mayor en recién nacidos que en adultos, debido en gran parte a la inmadurez de la BHE, permitiendo que éste pase con más facilidad al sistema nervioso (Wong y Klaasen, 1982), donde produce cambios neuropatológicos tales como edema, picnosis, así como hemorragia y necrosis en corteza parietal, cerebelo, putamen y núcleo caudado (Méndez-Armenta et al., 2001; Provias et al., 1994).

La neurotoxicidad por Cd durante el desarrollo embrionario se relaciona con alteraciones en el comportamiento, alteraciones neuroquímicas, neurohistológicas, y/o alteraciones morfológicas del SNC, que aparecen en los descendientes de madres expuestas durante la gestación y la lactancia (Lazarini et al., 2001).

Hay pocos estudios que hayan determinado el daño neurológico que se produce debido a la exposición al Cd. En este sentido, Thatcher et al. (1982) describieron en un estudio epidemiológico realizado sobre escolares, una asociación entre los niveles altos de Cd en el cabello y la dificultad en el aprendizaje, hiperactividad y cambios conductuales. Sin embargo, en el estudio realizado por Hart et al. (1989) se demostró que la exposición ocupacional al cadmio estaba asociada con disminución en la atención, velocidad psicomotora, aprendizaje asociativo y memoria.

Aunque el mecanismo por el que se producen los efectos neurotóxicos en el desarrollo no se conoce, los posibles mecanismos que pueden inducir estos efectos son:

#### Alteración de la neurotransmisión

Se sabe que los neurotransmisores en el sistema nervioso inmaduro actúan como factores tróficos que median procesos durante el desarrollo tales como la diferenciación y proliferación celular y su alteración durante este periodo puede conducir a alteraciones de desarrollo del mismo. Estudios recientes describen que los neurotransmisores pueden mediar la dirección de migración neuronal y el crecimiento axonal durante la formación de circuitos neuronales (Ruediger y Bolz, 2007). Neurotransmisores tales como catecolaminas o ACh aparecen en el embrión de animales vertebrados e invertebrados

incluso antes de que las neuronas se hayan diferenciado (Pendleton et al., 1998). Muchos neurotransmisores cambian su papel funcional en el SNC durante el desarrollo. La misma molécula puede ser crucial para la diferenciación, crecimiento neuronal y el establecimiento de las redes neuronales en el SNC inmaduro, mientras que en el SNC maduro cambia su función hacia un papel modulador de la comunicación sináptica entre neuronas (Herlenius y Lagercrantz, 2001). En este sentido se sabe que los neurotransmisores monoaminérgicos juegan un papel importante durante el desarrollo, definido como “morfo-genético” (Buznikov et al., 1996; Levitt et al., 1997; Nicotra y Senatori, 1989; Nicotra y Shatten, 1990). Por lo tanto, una alteración en los niveles de alguno de los neurotransmisores puede modificar la diferenciación y proliferación celular a nivel del sistema nervioso (Lauder, 1985; Lakshmana y Raju, 1994).

Se ha descrito que el Cd es capaz de alterar los niveles de diferentes tipos de neurotransmisores (Esquifino et al., 2001), por lo que éste podría ser uno de los mecanismos implicados en su papel neurotóxico. También se ha publicado que el Cd puede afectar a las síntesis y reparación del ADN, puede alterar el metabolismo del Ca y otros metales esenciales, puede generar ERO y alterar los mecanismos de muerte celular programada que son esenciales en los procesos de desarrollo (Méndez-Armenta y Ríos, 2007), por lo que cualquiera de estos mecanismos puede contribuir a los efectos neurotóxicos observados.

#### Alteración de las metalotioneínas

En el sistema nervioso, las MT I y II están presentes en astrocitos, células endoteliales, células ependimarias y oligodendroglía, mientras que las MT III están

presentes en las neuronas (Aschner et al., 1997; Ebadi et al., 1996; Nishimura y Dwyer, 1996; Nishimura et al., 1992). Las MT III específicas del cerebro poseen una actividad inhibitoria del crecimiento de las células neuronales, que no puede ser imitada por las otras isoformas de las MT (Kille et al., 1994; Nishimura et al., 1992; Palmitier et al., 1992).

El Cd puede alterar la expresión de las isoformas de las MT. Los niveles de Cd y su distribución a nivel cerebral van a determinar la expresión de las isoformas MT-I y III en diferentes etapas de desarrollo (Choudhuri et al., 1996). Esta modificación de la expresión de las MT parece ser una de las causas de neurotoxicidad durante el desarrollo y una de las causas que condiciona diferencias en los cambios por observados el desarrollo y durante la etapa adulta.

#### *1.5.7.2. Efectos neurotóxicos del cadmio en la epata adulta: alteración de la función cognitiva*

El Cd atraviesa la BHE y se acumula en el cerebro (Gutiérrez-Reyes et al., 1998), produciendo alteraciones en los procesos de aprendizaje y memoria, similares a las observados en la EA (Wang y Du, 2013). En este sentido, se ha sugerido que el Cd es un posible factor etiológico de enfermedades neurodegenerativas, como la EA (Jiang et al., 2007). Sin embargo, el mecanismo a través del cual se producen dichas alteraciones no se conoce.

Los posibles mecanismos que pudieran dar lugar a las alteraciones neurotóxicas en general y las alteraciones cognitivas en particular pueden ser:

## Daño sobre las neuronas colinérgicas

Las neuronas colinérgicas y sus proyecciones están ampliamente distribuidas por todo el SNC, con un papel esencial en la regulación de muchas funciones vitales, como el aprendizaje, la memoria, la organización cortical del movimiento y el control del flujo sanguíneo cerebral (Mesulam et al., 2002). La región del PSB es una de las regiones colinérgicas centrales más importantes (Voytko, 1996), cuyas neuronas colinérgicas proyectan sus axones a lo largo de la formación del hipocampo y el neocórtex y regulan los procesos de aprendizaje y memoria (Ward y Hagg, 2000). Así, el bloqueo de la transmisión colinérgica o la pérdida de neuronas colinérgica en esta región, como ocurre en la EA, podrían relacionarse con el deterioro que el Cd induce sobre los procesos de aprendizaje y memoria, entre otras acciones (Andersson et al., 1997). De hecho, la intensidad en el déficit de memoria en la EA está fuertemente correlacionada con el grado de pérdida de células colinérgicas (Bierer et al., 1995).

En este sentido, el Cd inhibe la actividad de la ChAT (Dwivedi, 1983), reduce la liberación de ACh neuronal (Alberts et al., 1985; Hayashi y Takayama, 1978) y altera la actividad de la AChE (Gkanti et al., 2014), pudiendo bloquear la transmisión colinérgica. Además, se ha descrito que el tratamiento con Cd induce una disminución significativa, dosis-dependiente, de las células ChAT positivas (neuronas motoras) en los cuernos ventrales de la médula espinal fetal humana, mientras que no se observa pérdida neuronal en el ganglio de la raíz dorsal (Sarchielli et al., 2012), lo que sugiere una acción selectiva sobre el sistema colinérgico a nivel periférico. Recientemente se ha descrito que el Cd induce una muerte no selectiva pero más pronunciada de neuronas colinérgicas en

cultivos primarios procedentes del PSB de rata (Del Pino et al., 2014), requiriéndose estudios *in vivo* que corroboren estos resultados.

#### Alteración de la neurotransmisión colinérgica

El mecanismo por el que se produce esta selectividad tóxica sobre las neuronas colinérgicas es desconocido, pero podría estar relacionado con los efectos del Cd sobre los niveles de ACh, por alteración de las actividades de la ChAT o la AChE. Sin embargo, en estudios *in vitro* sobre neuronas SN56, no se ha observado una correlación entre la alteración de la transmisión colinérgica y la viabilidad celular (Del Pino et al., 2014). Este efecto también podría deberse a una alteración de la expresión génica de las variantes de la AChE. En este sentido, diferentes estudios han indicado que la AChE tiene funciones alternativas no relacionadas con la neurotransmisión colinérgica (Silman y Sussman, 2005; Soreq y Seidman, 2001) o su actividad catalítica (Dori et al., 2005; Grisaru et al., 2006). Existen diferentes variantes de AChE, siendo las principales las variantes AChE-S y AChE-R (Campanari et al., 2014). La variante sináptica AChE-S (también llamada AChE-T con "T" que indica cola en inglés) es la variante principal expresada en el sistema nervioso (Evron et al., 2007) y su sobreexpresión está relacionada con la inducción de cambios neurodegenerativos (Birikh et al., 2003) y muerte celular a través de mecanismos de apoptosis y necrosis (Greenberg et al., 2010; Toiber et al., 2009). Por otra parte, se ha atribuido un papel neuroprotector a la variante AChE-R en la degeneración neuronal dependiente del envejecimiento, así como en enfermedades neurodegenerativas como la EA, inducida por las proteínas A $\beta$  (Berson et al., 2008).

En este sentido en estudios sobre neuronas colinérgicas SN56 del PSB se ha demostrado que la alteración de las variantes de la AChE media la inducción de muerte neuronal (Del Pino et al., 2016a). Por lo tanto, de confirmarse *in vivo*, estos efectos podrían ser la causa la toxicidad selectiva del Cd sobre las neuronas colinérgicas y ser responsables de los déficits de aprendizaje y memoria, así como los síntomas observados en la toxicidad de Cd similares a los descritos en enfermedades neurodegenerativas.

#### Disfunción de la enzima GSK-3 $\beta$ , de los receptores muscarínicos y de la producción de proteínas A $\beta$ y Tau

Se ha descrito que el Cd activa la enzima GSK-3 $\beta$  (Wang et al., 2009), aumenta la producción de proteína a partir de la  $\beta$ APP (Li et al., 2012; Smedman et al., 1997) y aumenta la formación de filamentos Tau (Jiang et al., 2007) en diferentes regiones cerebrales diferentes del PSB, efectos que han sido corroborados en neuronas colinérgicas SN56 del PSB (Del Pino et al., 2016a). Estos efectos se han relacionado con la inducción de la muerte celular en las neuronas colinérgicas del PSB y la EA (Hawkes et al., 2005; Kar et al., 2004; Zheng et al., 2002).

Además, el Cd puede bloquear los MR en el cerebro de rata (1-10  $\mu$ M) *in vivo* (Hedlund et al., 1979) e *in vitro* (50-100  $\mu$ M) (Hedlund y Bartfai, 1979), y se ha descrito que bloquea selectivamente los MR1 de los anillos aórticos en ratas macho, pero no los MR2 ni MR3 (Bilgen et al., 2003). También, se ha descrito que el Cd es capaz de bloquear de forma selectiva el MR1 en neuronas colinérgicas SN56 del PSB (Del Pino et al., 2016a). El bloqueo del MR1 se ha demostrado que induce deterioro de la memoria en

ratas y seres humanos, que imita el déficit de memoria observado en la EA (Anagnostaras et al., 2003; Atri et al., 2004) e induce muerte celular (Graham et al., 2013).

Por otra parte, se ha observado que la estimulación agonista de los receptores colinérgicos MR1 conducen al bloqueo de la enzima GSK-3 $\beta$  (Fisher, 2012; Lahmy et al., 2013), al procesamiento de la  $\beta$ APP a productos no amiloidogénicos, a una disminución en la fosforilación de proteínas Tau y a una reducción del deterioro cognitivo en ratones transgénicos. (Graham et al., 2013; Pavia et al., 1998). Corroborando estos hallazgos, la delección de MR1 conduce a un aumento en la generación de proteínas A $\beta$  y la formación de placas amiloideas en un modelo de ratón de EA (Davis et al., 2010), la reducción en la actividad de ChAT (Park et al., 2004), y la inducción de la patología Tau (Fisher, 2012). El MR1 también desempeña un papel esencial en la expresión de las variantes de la AChE. En este sentido, los antagonistas del MR1 disminuyen los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de AChE-R (Salmon et al., 2005), por lo que el bloqueo del MR1 por el Cd podría mediar todos estos mecanismos. En este sentido se ha descrito que el bloqueo del MR1 por el Cd induce la producción de proteínas A $\beta$  y Tau, de las variantes de AChE y de la actividad de la ChAT en la línea celular SN56 (Del Pino et al., 2016a)

Además, la sobreexpresión de AChE-S está relacionada con el fenómeno de neurodegeneración a través de la activación de GSK-3 $\beta$ , Bax y caspasas (Birikh et al., 2003). GSK-3 $\beta$  se asocia con el deterioro cognitivo y la muerte neuronal (Bhat et al., 2004; DaRocha-Souto et al., 2012), que se invierte por inhibición de la GSK-3 $\beta$  o por la inhibición o silenciamiento de la AChE. Por otra parte, la sobreexpresión de AChE-S se ha observado en la EA, mostrando una correlación positiva con la hiperfosforilación de

las proteínas Tau (Toiber et al., 2009). Mientras la AChE-S facilita la formación de placa amiloideas, la AChE-R las inhibe (Berson et al., 2008; Berson y Soreq, 2010). Además, se ha descrito que las proteínas A $\beta$  reducen la actividad de la ChAT (Li et al., 2013), por lo que la sobreexpresión de AChE-S podría reducir indirectamente la actividad de la ChAT a través del aumento de la producción de proteínas A $\beta$ . Por lo tanto, la toxicidad selectiva inducida por el Cd sobre el sistema colinérgico podría estar producida por el bloqueo de MR1 a través de la alteración de las variantes de la AChE.

En este sentido, se ha descrito que el Cd induce la alteración de las variantes de AChE a través del bloqueo del MR1, lo que conduce a la sobreexpresión de la enzima GSK-3 $\beta$ , la producción de proteínas A $\beta$  y Tau, y a la disminución de la actividad de la ChAT en la línea celular SN56 (Del Pino et al., 2016b). Por lo tanto, de confirmarse estos resultados *in vivo*, podrían ayudar a explicar los mecanismos de muerte de las neuronas colinérgicas del PSB y la disfunción cognitiva producida por el Cd.

### Estrés oxidativo

Por otra parte, los déficits cognitivos descritos tras la exposición a Cd han sido también relacionados con la inducción de estrés oxidativo y el tratamiento antioxidante mejora estos déficits (Gonçalves et al., 2010). Además, se ha descrito que el estrés oxidativo puede inducir la muerte celular en las neuronas colinérgicas septales (Traver et al., 2005), así como cambios en la expresión de las variantes de la AChE (Bond et al., 2006).

Se ha descrito que el Cd puede inducir estrés oxidativo debido a un aumento de la formación de ERO, el agotamiento de las defensas antioxidantes y la disminución de la expresión de las enzimas antioxidantes mediadas por alteración del NRF2, regulador maestro de las rutas de estrés oxidativo (Méndez-Armenta y Rios, 2007). Además, se ha descrito que el estrés oxidativo puede alterar la expresión de las variantes de la AChE, la producción de proteínas A $\beta$  y Tau, la activación de la enzima GSK-3 $\beta$  y la actividad de los receptores muscarínicos (Bond et al. 2006; Giraldo et al., 2014; Rojo et al., 2008; Tamagno et al., 2005; Wang et al., 2009).

Recientemente se ha descrito que el Cd induce la formación de ERO en la línea celular colinérgica SN56 procedente del PSB y este mecanismo media, en parte, la disminución de la actividad del MR1 y de la alteración de las variantes de la AChE (Del Pino et al., 2018). De confirmarse este efecto *in vivo* en la región del PSB, también podría mediar los mecanismos comentados en la toxicidad selectiva del Cd sobre el sistema colinérgico y la alteración de los procesos cognitivos.

# **JUSTIFICACIÓN**

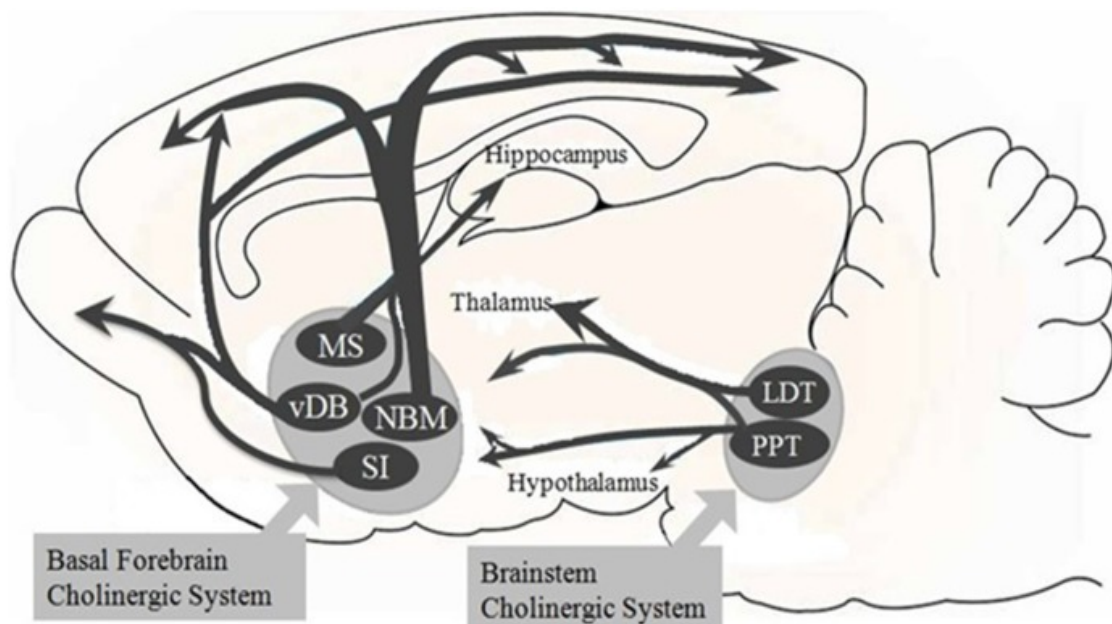


## 2.- JUSTIFICACION

En la población se está produciendo un aumento muy elevado en el número de personas con enfermedades crónicas neurodegenerativas incapacitantes, como la enfermedad de Alzheimer (EA), lo cual presenta unas consecuencias sociales y económicas muy negativas debido las discapacidades generadas. Las alteraciones genéticas, infecciones o el aumento de la esperanza de vida no pueden explicar todas las alteraciones producidas, siendo los factores medioambientales entre las principales causas implicadas. En este sentido, se ha relacionado la exposición a diversos compuestos químicos medioambientales, fundamentalmente por el aumento de la contaminación ambiental, con especial relevancia en algunas áreas geográficas del mundo, con la inducción o empeoramiento de enfermedades neurodegenerativas como la EA, tanto en estudios *in vitro* y en animales como en estudios epidemiológicos (Chin-Chan et al., 2015; Yegambaram et al., 2015). Dentro de estos compuestos encontramos el cadmio (Cd), que es un metal pesado ampliamente utilizado a nivel industrial y que se acumula en el organismo originando múltiples efectos tóxicos entre los cuales se encuentran trastornos del aprendizaje y memoria con una sintomatología similar al Alzheimer (Del Pino et al., 2016; Del Pino et al., 2014) Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales induce estos efectos, así como las dosis a partir de las cuales puede generarlos no se conocen.

En este sentido, se ha descrito en estudios *in vitro* en cultivos primario de prosencéfalo basal (PBS) que el Cd inducen daño y degeneración sobre las neuronas colinérgicas de esta región (Del Pino et al., 2014). Las neuronas colinérgicas y sus proyecciones están ampliamente distribuidas en el SNC con un papel esencial en la regulación de muchas funciones vitales, tales como el aprendizaje, la memoria, la

organización cortical de movimiento y el control de flujo sanguíneo cerebral (Mesulam et al., 2002). El PSB es una de las regiones colinérgicas centrales más importantes, que presenta más del 80% de los cuerpos neuronas de las neuronas colinérgicas y desde la cual dichas neuronas proyectan sus axones a lo largo de la formación del hipocampo y el neocórtex regulando los procesos de aprendizaje y memoria (Figura 1) (Villano et al., 2017; Ward et al., 2000). La degeneración de las neuronas colinérgicas del PBS, como se observa en la EA y otras enfermedades neurodegenerativas, da lugar a la pérdida de la modulación colinérgica de los circuitos sinápticos del hipocampo que conduce a los déficits de memoria (Scheiderer et al., 2006). De hecho, la gravedad del déficit de memoria está fuertemente correlacionada con el grado de pérdida de células colinérgicas (Bierer et al., 1995). Por lo tanto, la alteración de la transmisión colinérgica o la pérdida neuronal colinérgica en esta región, de confirmarse *in vivo*, podría estar relacionada con el deterioro cognitivo entre otras acciones.



**Figura 2.** Principales núcleos y vías de proyección del sistema colinérgico en el SNC de ratas Sprague-Dawley (Villano et al., 2017).

En estudios *in vitro* realizados sobre neuronas colinérgicas SN56 procedentes del PSB se observó que el cadmio altera la transmisión colinérgica fundamentalmente por alteración de la actividad de las enzimas colina acetiltransferasa (ChAT) y de la acetilcolinesterasa (AChE) y produce muerte celular (Del Pino et al., 2014). La muerte celular fue medida, en parte, por la inducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y por el bloqueo del receptor muscarínico M1 (Del Pino et al., 2018), que a su vez desencadenan la alteración de las variantes de la AChE, las cuales inducen la sobreexpresión de la enzima glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK-3  $\beta$ ) y el aumento en las proteínas beta amiloideas (A $\beta$ ), Tau totales y fosforiladas, que dan lugar finalmente a la muerte neuronal. (Del Pino et al., 2016a; Del Pino et al., 2016b). Aunque se ha descrito *in vivo* que el Cd puede alterar la transmisión colinérgica, inducir muerte neuronal selectiva sobre las neuronas colinérgicas a nivel periférico, así como producir en otras regiones cerebrales los mecanismos descritos que conducen a la muerte neuronal sobre las neuronas colinérgicas SN56 procedentes del PSB, no existen estudios *in vivo* en la región del PSB que puedan corroborar estos efectos observados *in vitro*. Por lo tanto, son necesarios estudios *in vivo* que confirmen si se produce un daño sobre el sistema colinérgico del PSB que regulan los procesos de aprendizaje y memoria y si este daño es selectivo sobre este sistema. De confirmarse estos resultados *in vivo*, podrían explicar las alteraciones cognitivas descritas.

Por otra parte, se ha descrito que la exposición a cadmio produce una reducción de los niveles séricos de hormonas tiroideas (HT) en ratas adultas (Mohamed et al., 2015). También se ha descrito que las HT participan en el mantenimiento de las funciones cognitivas, y los trastornos clínicos del tiroides se asocian con deterioro cognitivo y

demencia. Además, existe una evidencia cada vez más creciente que apoya una amplia interrelación entre las hormonas tiroideas y el sistema colinérgico (Mafrica et al., 2008).

Se ha descrito que las hormonas tiroideas modulan el sistema colinérgico en el cerebro adulto de mamíferos a través de la estimulación del metabolismo de la acetilcolina (ACh) mediante el aumento de actividad de la AChE, así como la recaptación de la ACh liberada (Sarkar et al., 2001). Además, se ha descrito que las HT aumentan la expresión de la ChAT en el PSB de ratas neonatas. La deficiencia de HT en la vida temprana provoca una alteración selectiva y permanente de la actividad de la ChAT, de la recaptación de colina, y de la concentración de los receptores muscarínicos en las neuronas colinérgicas del PSB de las ratas (Patel et al., 1988). Estos cambios se pueden prevenir mediante el tratamiento con HT durante el período neonatal. En el hipotiroidismo, se ha descrito que la actividad de AChE está alterada y se producen problemas del aprendizaje y la memoria observados en ratas y en humanos (Carageorgiou et al., 2007). Además, en roedores, el hipotiroidismo se asocia con aumento de la expresión génica de la proteína precursora de beta-amiloide (APP), lo que podría dar lugar a una mayor acumulación de proteína beta-amiloide (O'Barr et al., 2006). En consecuencia, la alteración de los niveles de HT a nivel cerebral por Cd podría ser la causa de la alteración de la transmisión colinérgica y de los mecanismos descritos que conducen a la inducción de muerte neuronal de las neuronas colinérgicas, produciendo los efectos cognitivos observados tras la exposición a estos.

El interés de este trabajo se basa en aportar nuevos datos sobre la neurotoxicidad inducida por el cadmio sobre el sistema colinérgico del PSB del SNC, que puedan explicar los efectos cognitivos producidos por la exposición al mismo, así como los

mecanismos a través de los que se produce. La confirmación y determinación de la dosis a las que se produce la alteración colinérgica y la neurodegeneración de las neuronas colinérgicas del PSB, su carácter selectivo y los mecanismos que la producen, puede permitir establecer una nueva evaluación del riesgo de dicho compuesto para determinar niveles de exposición seguros, y en el caso de que se produzca la exposición, establecer una estrategia terapéutica que permita reducir los daños en la población expuesta.



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



### **3.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1. Hipótesis**

De acuerdo con todo lo expuesto, hipotetizamos que estos compuestos podrían inducir alteración de la transmisión colinérgica y pérdida de neuronas colinérgicas en el PSB a través de la disrupción de las hormonas tiroideas, que podría desencadenar los mecanismos previamente descritos en los estudios *in vitro*, conducentes a dicha neurodegeneración e inducción de alteraciones cognitivas.

#### **3.2. Objetivos**

Para probar esta hipótesis, nuestros objetivos fueron determinar los efectos del Cd, tras exposición única o exposición continuada (repetida cada 24 h durante 28 días), sobre:

- 1- La alteración del sistema tiroideo, manifestado en cambios en las concentraciones de HT en plasma y en la región del PSB.
- 2- La inducción de alteraciones histológicas en la región del PSB:
  - 2.1. Inducción de necrosis neuronal selectiva sobre las neuronas colinérgicas
  - 2.2. Inducción de espongiosis a nivel del PSB
  - 2.3. Inducción de gliosis a nivel del PSB
- 3- La implicación de las hormonas tiroideas sobre las alteraciones histológicas inducidas por el cadmio a nivel del PSB

- 4- La disfunción de la transmisión colinérgica, a través de la alteración de
  - 4.1. Los niveles de ACh y de las enzimas AChE, ChAT, HAChT y VAChT
  - 4.2. Los receptores muscarínicos MR1-MR5
- 5- La implicación de las hormonas tiroideas sobre la disfunción de la transmisión colinérgica inducida por el cadmio a nivel del PSB.
- 6- La generación de estrés oxidativo, a través de la alteración de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA, NRF-2, HO-1 y GPx en el PSB
- 7- La implicación de las hormonas tiroideas sobre la inducción de estrés oxidativo a nivel del PSB.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **4.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1. Tipo de estudio**

Estudio experimental en modelo murino.

### **4.2. Sujetos del estudio**

La fase experimental se desarrolló en el Animalario de la Universidad Complutense de Madrid. Se siguieron la Directiva de la Unión Europea (2010/63/EU) y las reglamentaciones españolas (BOE-A-2013-1337) con respecto al uso de animales de laboratorio durante la experimentación con animales. Se utilizaron ratas Wistar macho (*Rattus norvegicus*), de 60 días de vida, cada una con un peso de 200-210 g (Charles River, Barcelona, España), que se alojaron individualmente y se mantuvieron en una habitación con la temperatura y luz controladas, con comida y agua disponible *ad libitum*. La temperatura del animalario fue de 22 °C (DE 2) y los animales se mantuvieron con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luz de 8:00 a 20:00). Todos los experimentos fueron autorizados por el comité de experimentación de la Universidad Complutense de Madrid.

Se ha elegido la rata como modelo animal experimental, porque los roedores tienen ventajas para los estudios toxicológicos, sobre todo su pequeño tamaño, fácil manejo, resistencia a las infecciones y corto ciclo de vida. Además, es un modelo animal aceptado en la comunidad científica para proporcionar datos que puedan ser incorporados a la evaluación del riesgo para el hombre. En los estudios anatomopatológicos del SNC, la rata tiene la ventaja de que, por el tamaño de su encéfalo, permite una buena

localización de las distintas regiones encefálicas y además se dispone de atlas que detallan la anatomía de su sistema nervioso (Paxinos y Watson, 2013).

### **4.3. Protocolo experimental**

Se emplearon 144 ratas que fueron repartidas en dos grupos, de 72 animales cada uno, en función de que el experimento tuviera una duración de 24/48 horas o 28 días, respectivamente. Dentro de cada uno de estos grupos, a su vez, las ratas se separaron en cuatro subgrupos de experimentación, según recibieran tratamiento con Cd y T3, suero fisiológico o T3 (6 animales por subgrupo). Dentro de cada uno de los grupos de experimentación, un tercio de los animales (24 animales) fueron empleados para estudios anatomopatológicos (fueron sacrificados tras exposición única a las 48 h), otro tercio para estudios de expresión génica y el último tercio para determinación de diferentes parámetros biomoleculares (fueron sacrificados tras exposición única a las 24 horas). El estudio sobre los niveles hormonales plasmáticos se realizó sobre 6 animales tomados al azar del total de animales de cada grupo experimental (sacrificados a las 24 horas o 28 días).

El sacrificio de los animales para realización de estudios anatomopatológicos se hizo a las 48 horas en base a estudios previos encontrados en la literatura en los que se describe que la aparición de cambios celulares a nivel del SNC varía en función del neurotóxico, pero no es hasta 48 horas después de la exposición al mismo que se pueden encontrar cambios a nivel histológico (Bolon y Butt, 2011).

La selección de estos animales para asignación a cada tipo de estudio fue realizada de forma aleatorizada. La figura 3 representa el diseño experimental seguido en la investigación.

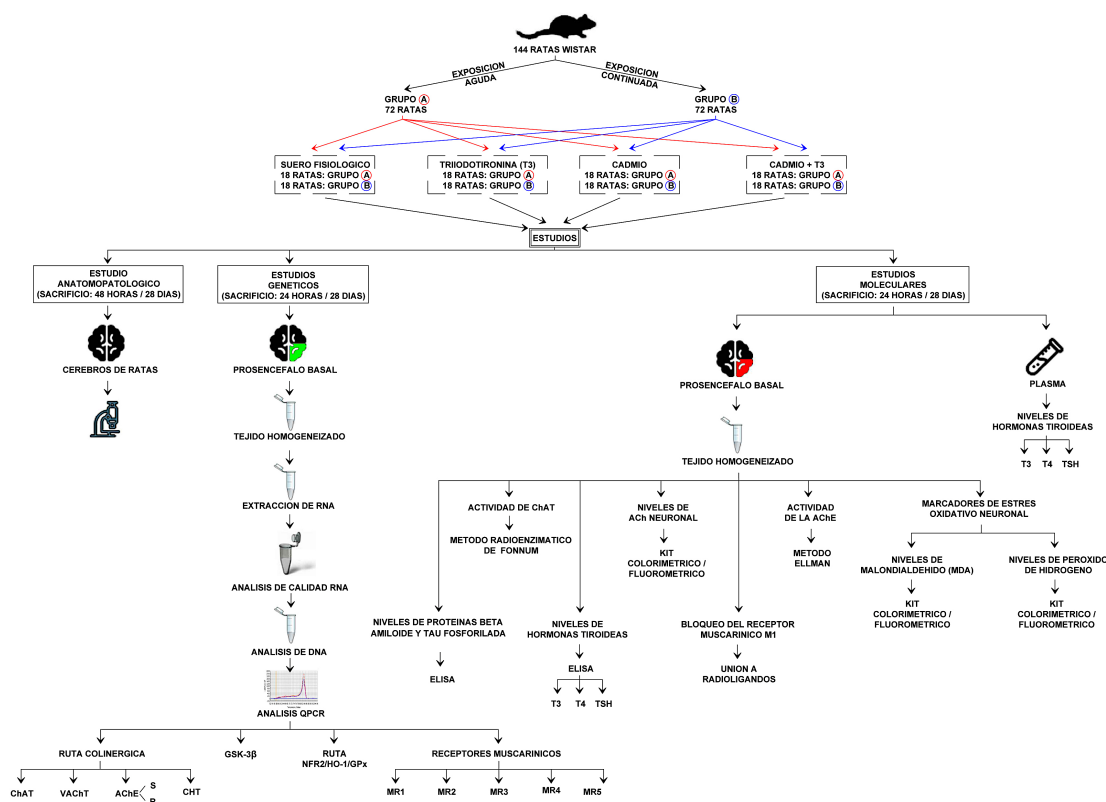


Figura 3. Representación esquemática del diseño experimental.

#### 4.4. Productos químicos

Los compuestos CdCl<sub>2</sub> (99,99%), Ach, acetilticolina y T3 se obtuvieron de Sigma (Madrid, España). [14C] acetil-CoA y [3H] pirenzepina se obtuvieron de Perkin Elmer (Madrid, España). Los filtros GF/B Whatman de fibra de vidrio fueron obtenidos

de Millipore (Madrid, España). Todos los demás productos químicos fueron de grado reactivo de la pureza más alta disponible de laboratorio.

#### **4.5. Administración**

Los animales fueron tratados por vía intraperitoneal con suero fisiológico como vehículo, T3 (40 µg/kg de peso corporal en exposición única o continuada durante 28 días) o Cd a las dosis de 1 mg/kg (exposición única) y de 0,1 mg/kg (exposición continuada durante 28 días) de peso corporal con o sin T3. A los animales se les permitió agua *ad libitum*.

Se eligieron las dosis de 0,1 mg/kg y 1 mg/kg de peso corporal [equivalentes a 1/55 y 1/20 de la DL50 (la DL50 media se calculó previamente, datos no mostrados)] porque se ha descrito previamente que se corresponden con los valores observados *in vitro* que inducen muerte celular y que son las mínimas concentraciones descritas que producen alteraciones cognitivas en ratas (ATSDR, 2012; Gonçalves et al., 2010). La dosis elegida de T3 (40 µg/kg/día por vía intraperitoneal) es segura y revierte los efectos cognitivos según trabajos previos (Seyedhosseini et al., 2019). Por lo tanto, las dosis seleccionadas son relevantes para estudiar los efectos del Cd solo o en contratamiento con T3 sobre: 1) el contenido celular de ACh, malondialdehído (MDA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de proteínas Aβ y Tau totales (tTau) y fosforiladas (pTau); 2) el contenido plasmático y en el PSB de T3, T4 y TSH; 3) la actividad de la AChE y la ChAT, y el bloqueo del MR1; 4) la expresión de las variantes de la AChE, del transportador de colina de alta afinidad (HACHT), del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), del factor de transcripción NRF2, de los MR1-MR5, y de las enzimas GSK-3β, ChAT, hemo oxigenasa 1 (HO-1) y GPx; y 5) el daño neuronal en estudios anatomopatológicos.

#### 4.6. Procedimiento para la obtención de las muestras

Tras los periodos de tratamiento, los animales fueron sacrificados por inhalación de CO<sub>2</sub> en una cabina de eutanasia e inmediatamente después del sacrificio se aislaron los encéfalos.

##### 4.6.1. Estudios anatomopatológicos

Los encéfalos destinados a estudios anatomopatológicos fueron introducidos en recipientes debidamente identificados y fijados en formaldehído tamponado al 10% con una proporción tejido-formol entre 1:10 y 1:20 durante 3 días.

Transcurridos tres días, se pesó cada cerebro en una balanza de precisión digital (Sartorius 1501 B MP8-1) y se hicieron fotografías tanto de la superficie dorsal (Figura 4) como de la ventral de cada uno de ellos (Figura 5).



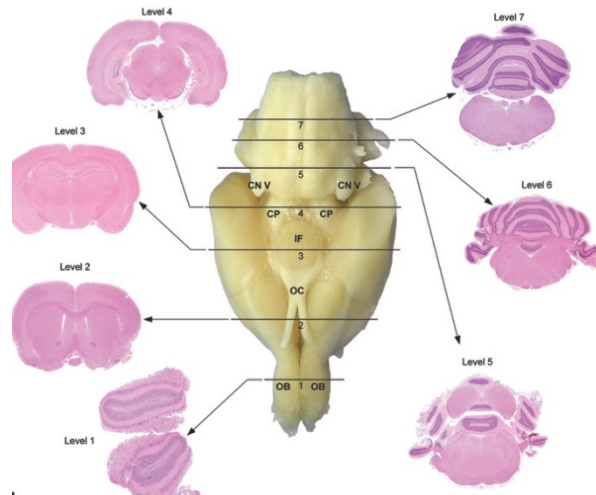
**Figura 4**



**Figura 5**

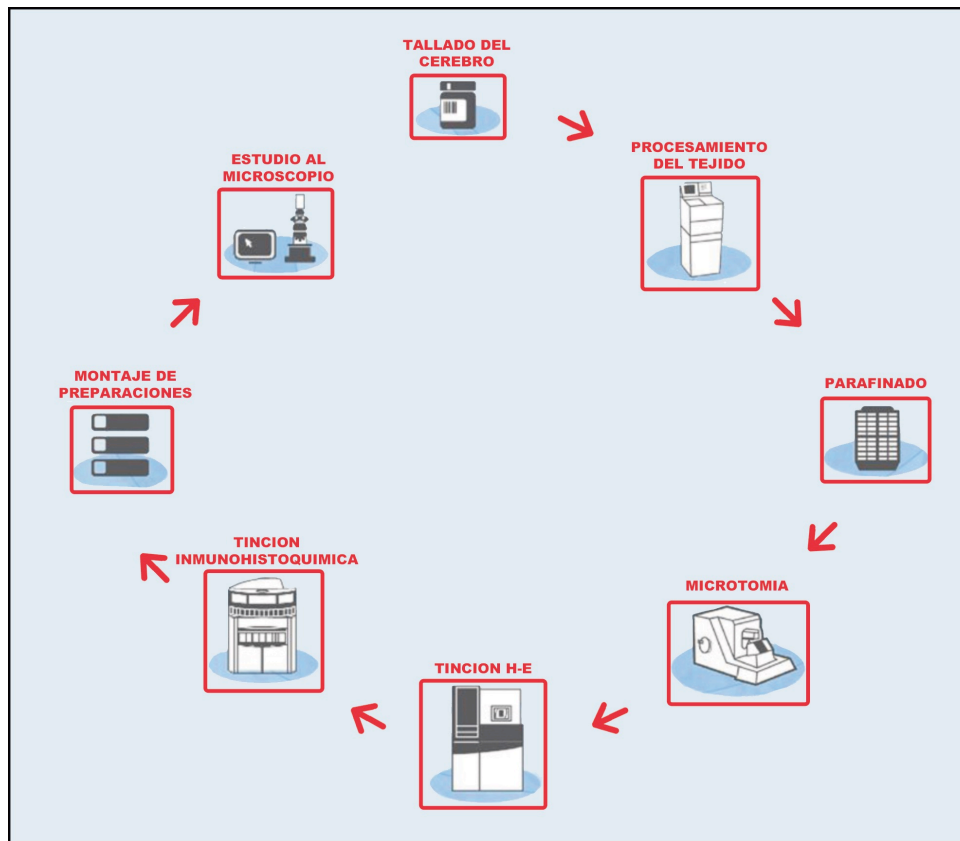
Posteriormente se realizaron secciones coronales (Figura 6), tomando como referencia los planos de sección descritos en el “Protocolo de tallado de cerebros de roedores para estudios de neurotoxicidad”, publicado por el Programa Toxicológico

Nacional de EE.UU. (Rao et al., 2014), y que utiliza como referencia los atlas de cerebro de rata y ratón de Paxinos y Watson del año 2013.



**Figura 6.** Figura representativa de las secciones coronales propuestas por el Protocolo de tallado de cerebros de roedores para estudios de neurotoxicidad (Rao et al., 2014).

Tras la fijación, se procedió a la deshidratación de las muestras, en una escala creciente de alcoholes con posterior aclarado con xileno e inclusión de las muestras en parafina (punto de solidificación 65°C, Leica). Las muestras se cortaron en un microtomo (Microm HM310) en secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor. Posteriormente fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H-E; Coverstainer, Dako) y estudiadas con un microscópico óptico (Nikon E200) (Figura 7).

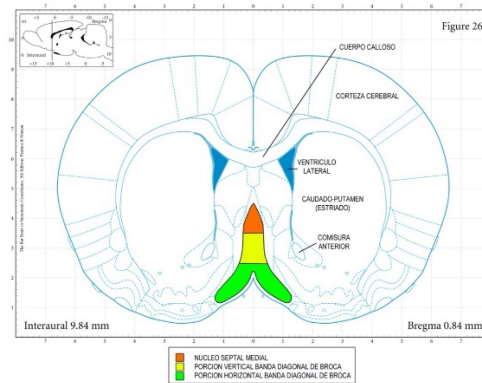


**Figura 7.** Representación esquemática del procesamiento de muestras

#### 4.6.1.1. Selección de las secciones y límites anatómicos de interés

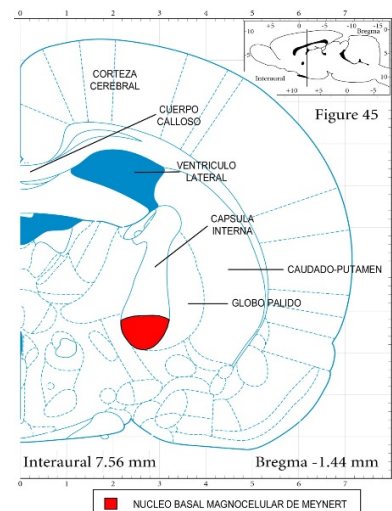
De las preparaciones que se revisaron histológicamente, se eligieron para nuestro estudio aquellas en las que se identificaron los núcleos y estructuras del PSB, basándonos en el atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson, 2013. Se realizaron cinco cortes seriados, de 5  $\mu\text{m}$  de espesor y separados 50  $\mu\text{m}$  entre sí, para el análisis de las variables a estudio. Las secciones elegidas para el estudio histológico e inmunohistoquímico fueron:

\*La sección a nivel de Bregma +0.84 mm para el estudio del núcleo septal medial y de la porción horizontal y vertical de la banda diagonal de Broca (Figura 8).



**Figura 8.** Representación de un corte en el plano coronal del encéfalo de la ratona Wistar (Bregma 0.84 mm) en el que se aprecian el núcleo septal medial y las porciones vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca. Modificada de Paxinos y Watson (2013).

\*La sección a nivel de Bregma -1.44 mm para el estudio del núcleo basal magnocelular de Meynert (Figura 9).



**Figura 9.** Representación de un corte en el plano coronal del encéfalo de la ratona Wistar (Bregma -1.44 mm) en el que se aprecia el núcleo basal magnocelular de Meynert. Modificada de Paxinos y Watson (2013).

Una vez seleccionadas las preparaciones, se delimitaron y estandarizaron los límites anatómicos de las regiones a estudio, a partir de los trabajos publicados en la literatura (Lee et al., 2013; Paxinos y Watson, 2013; Traissard et al., 2007) (Figura 10).



**Figura 10.** Secciones coronales del encéfalo de la rata Wistar (a nivel +0.84 mm y -1.4 mm de Bregma; según Paxinos y Watson (2013)). Los límites anatómicos de las áreas a estudio corresponden a las líneas de color rojo (septo medial), verde (porción horizontal y vertical de la banda diagonal de Broca) y azul (núcleo basal de Meynert).

#### 4.6.2. Estudio para determinación de mecanismos moleculares de toxicidad

##### 4.6.2.1. *Prosencéfalo basal*

Para la obtención de tejido del PSB, se realizó una disección del mismo bajo un estereomicroscopio (Olympus SZ51, Barcelona, España) a 4°C (Glowinski e Iversen, 1966). Las muestras de tejido se pesaron rápidamente y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis. La mitad de las muestras se destinaron a los estudios de expresión génica y la otra mitad para el resto de estudios moleculares.

#### 4.6.2.2 *Plasma*

Las muestras de plasma se recogieron en tubos de centrifuga con heparina como anticoagulante y se centrifugaron 1000 x g durante 15 minutos a 4 °C.

### 4.7. Criterios de evaluación de las variables resultado

#### 4.7.1. Aspectos anatomopatológicos

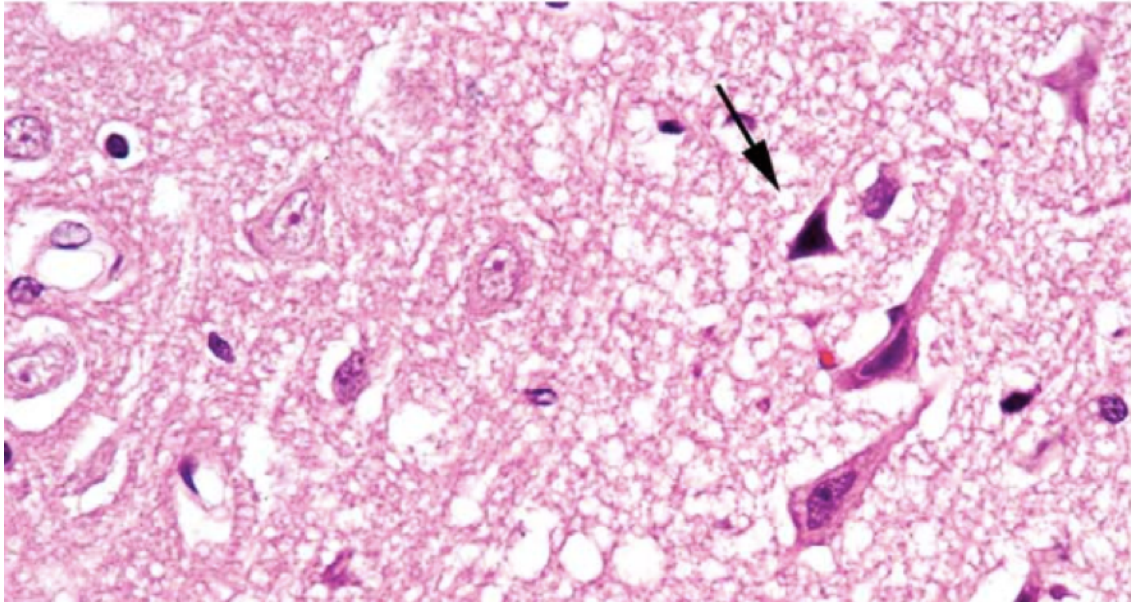
##### 4.7.1.1. *Variables morfológicas*

Se valoraron variables morfológicas relacionadas con agentes neurotóxicos (Bolon y Butt, 2011) en cada una de las áreas de interés, previamente delimitadas con el objetivo de 4x/0.10 (Nikon E200).

Los criterios utilizados para la valoración de cada una de estas variables fueron los siguientes:

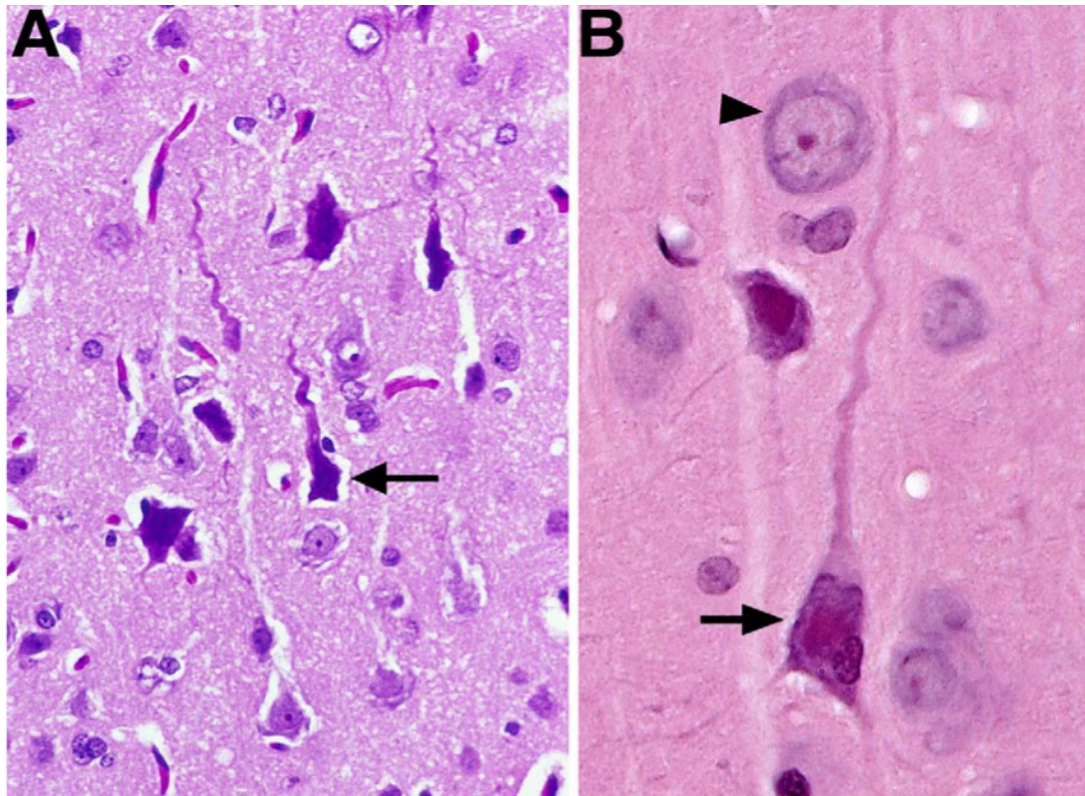
**Necrosis neuronal:** una neurona fue considerada necrótica cuando presentaba un citoplasma rojo brillante y retraído, pérdida de la sustancia de Nissl y un núcleo picnótico, triangular, de pequeño tamaño (Garman, 2011). También se contabilizaron aquellas neuronas con núcleo picnótico, sin presencia de citoplasma eosinófilo, si se encontraban entremezcladas con neuronas de iguales características a las descritas anteriormente o si se observaban, además, cambios histológicos asociados como un aumento del número de células gliales, la presencia de microglía activada, un aumento de la vascularización, con

vasos ramificados, revestidos por un endotelio hipertrófico (Jubb y Huxtable, 1993) o la vacuolización del neuropilo (Figura 11).



**Figura 11.** Neuronas necróticas (punta de flecha) con citoplasma rojo brillante y retraído, pérdida de la sustancia de Nissl y núcleo picnótico, triangular, de pequeño tamaño. Neurona necrótica con núcleo picnótico (flecha larga) (Garman, 2011).

Cabe destacar que, para un patólogo, es un reto importante definir una neurona como necrótica y saber diferenciarla de las denominadas “*dark neurons*” (Cammermeyer, 1978; Jortner, 2006), neuronas que aparecen como un artefacto histológico común, producido principalmente por la manipulación post-mortem del tejido cerebral. Se trata de neuronas de aspecto monótono, con citoplasmas y núcleos retraídos, de bordes irregulares y densamente basófilos, siendo en ocasiones difícil distinguir el núcleo del citoplasma. Las dendritas apicales pueden adoptar una forma irregular, “*en sacacorchos*” (Figura 12).



**Figura 12.** Imagen A (H-E x200) e imagen B (H-E x400). Las flechas señalan neuronas con citoplasmas y núcleos retraídos e hiper cromáticos (“dark neurons”). Las dendritas apicales presentan una forma irregular, “en sacacorchos” (Jortner, 2006).

**Gliosis:** se define como una acumulación anómala de cualquiera de los tres tipos de células gliales (astrocitos, oligodendrocitos o células microgliales) (Kim y Vellis, 2005; Napoli y Neumann, 2009), en respuesta a un daño a nivel del SNC.

En nuestro estudio se definió como “gliosis”, la presencia de un aumento en el número y tamaño de los astrocitos, así como un aumento del grosor y morfología irregular de sus prolongaciones (Jubb y Huxtable, 1993; Montgomery, 1994). Para evaluar el grado de gliosis se empleó la tinción IHQ para la proteína glial fibrilar ácida (PGFA), que tiñe tanto los citoplasmas de los astrocitos como sus prolongaciones (Ludwin, 1985; Pekny y Pekna, 2004).

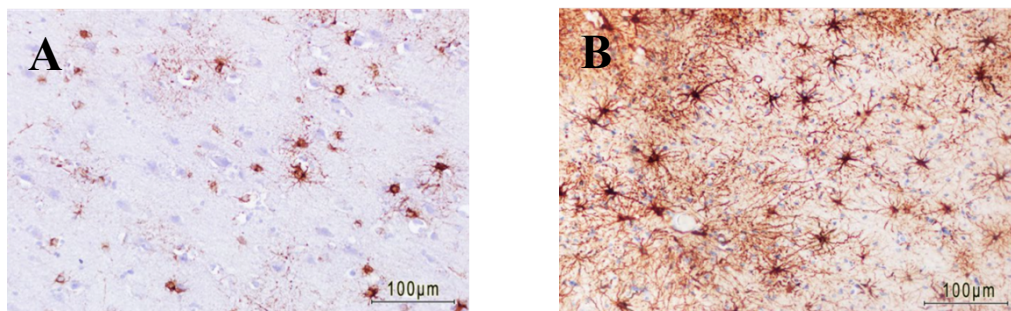
El análisis semi-cuantitativo de las preparaciones inmunoteñidas se hizo con un microscopio óptico (Nikon E200), basándonos en el *score inmunorreactivo* (IRS) de Remmele y Stegner (1987), que adjudica un valor 0, 1, 2 y 3, dependiendo de la intensidad de tinción (Figura 13).

Score 0: ausencia de tinción

Score 1: tinción suave de los cuerpos celulares

Score 2: tinción moderada de los cuerpos celulares. Tinción focal a nivel de las prolongaciones

Score 3: tinción fuerte de los cuerpos celulares, con presencia de una granulación densa central. Tinción difusa de las prolongaciones.



**Figura 13.** Tinción inmunohistoquímica para proteína glial fibrilar ácida (GFAP). En la imagen de la izquierda (A) se observa una tinción suave de los cuerpos celulares (score 1). En la imagen de la derecha (B) se observa una tinción fuerte de los cuerpos celulares y difusa de las prolongaciones (score 3) (Trautz et al., 2019).

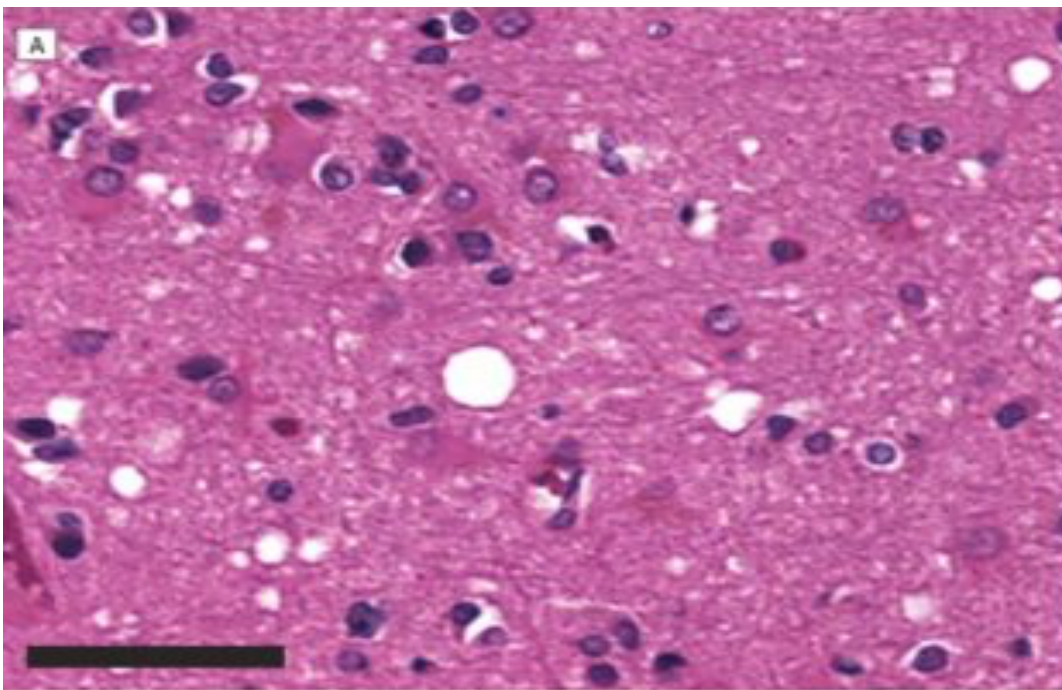
**Espongiosis:** se define como una degeneración microquística del tejido nervioso, con un parénquima expandido, con vacuolas o espacios vacíos de tamaño variable, que aparecen como consecuencia de la vacuolización de las prolongaciones neuronales, la hinchazón de los citoplasmas astrocitarios o la transformación vesicular de la mielina (Jubb y Huxtable, 1993).

El análisis semi-cuantitativo de las preparaciones teñidas con H-E se hizo con un microscopio óptico (Nikon E200) y utilizamos una escala de gradación modificada del *score inmunorreactivo* (IRS) de Remmele y Stegner (1987), adjudicando un valor 0, 1 y 2, en función del porcentaje de vacuolas observadas en las áreas a estudio (Figura 14).

Score 0: no se observan vacuolas

Score 1: presencia de vacuolas en menos del 50% del área a estudio

Score 2: presencia de vacuolas en el 50% o más del área a estudio



**Figura 14.** Ejemplo de parénquima cerebral con espongiosis, con presencia de vacuolas de diferente tamaño (flechas), en un caso de enfermedad por priones (Glatzel et al., 2005).

#### *4.7.1.2. Variables inmunohistoquímicas*

Para cada una de las determinaciones se obtuvieron secciones de 4 µm que se dispusieron sobre portaobjetos con carga electrostática y se hornearon durante 30 min a 60°C para una adecuada adhesión del tejido al portaobjetos.

Se utilizó el sistema automatizado de inmunotinción Benchmark XT (Ventana Medical System Inc., Tucson, Arizona, EEUU), para la detección de la proteína glial fibrilar ácida (PGFA), la proteína de localización nuclear específica neuronal (NeuN) y la enzima colin acetiltransferasa (ChAT) sobre las secciones seleccionadas.

El proceso comienza con la desparafinización de la muestra y la recuperación antigénica, aplicando una solución que se denomina CC1 a un pH 8,4. El siguiente paso es el bloqueo de la actividad peroxidasa endógena. Posteriormente la muestra se incuba con los diferentes anticuerpos primarios durante 30 min a 37°C y 30 min más con un polímero conjugado con peroxidasa que actúa a modo de anticuerpo secundario. El procedimiento automatizado se completa con el revelado de la reacción, utilizando como cromógeno el tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Las muestras se contratiñen con hematoxilina fuera ya del procesador (3 segundos en hematoxilina de Harris). Para acabar se deshidrata el tejido con etanol a concentraciones crecientes y se montan las preparaciones con cubreobjetos.

En la Tabla 1 se detallan los anticuerpos primarios utilizados y las diluciones empleadas.

| <b>Anticuerpo</b> | <b>Clon</b> | <b>Fuente</b>                              | <b>Dilución</b> |
|-------------------|-------------|--|-----------------|
| <b>NeuN</b>       | A60         | Millipore, Burlington, Massachusetts, EEUU | 1/100           |
| <b>PGFA</b>       | EP672Y      | Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU      | Ready to use    |
| <b>ChAT</b>       | JA67-11     | NovusBio, Centennial, EEUU                 | 1/100           |

**Tabla 1:** Proteínas analizadas y características de los anticuerpos primarios utilizados.

Se evaluó la expresión proteica en la población celular a estudio y se obvió cualquier tipo de positividad cuyo patrón morfológico pudiera corresponder a otro tipo celular. La interpretación de los patrones de tinción para los diferentes anticuerpos se basó en los trabajos publicados en la literatura. Esta interpretación fue siempre una estimación visual de la intensidad de la tinción y no se utilizaron sistemas de digitalización de imagen para análisis automatizados.

**NeuN:** la proteína NeuN es una proteína asociada, exclusivamente, con el tejido nervioso. Se localiza en el núcleo y citoplasma perinuclear de la mayoría de neuronas maduras (postmitóticas) del SNC en los animales mamíferos (Gusel'nikova y Korzhevskiy, 2015). Se consideró positiva cualquier célula que mostrase tinción nuclear, con o sin tinción citoplasmática (Gusel'nikova y Korzhevskiy, 2015).

**ChAT:** la colina-acetiltransferasa es una enzima responsable de la biosíntesis del neurotransmisor ACh. Se expresa en neuronas colinérgicas del sistema nervioso central y periférico (Jeon et al., 1998). Se consideraron positivas aquellas neuronas que mostrasen una tinción citoplasmática difusa o focal (Butcher y Woolf, 2004; Mesulam et al., 1983; Robertson et al., 1998).

Todas las preparaciones inmunoteñidas se analizaron con un microscopio Nikon E200 y las imágenes se capturaron con un microscopio Leica DM3000, utilizando el software Leica LAS EZ.

#### *4.7.1.3. Análisis de las variables morfológicas e inmunohistoquímicas*

Se realizó un análisis cuantitativo y semicuantitativo visual en las áreas a estudio de ambos hemisferios, previamente delimitadas con el objetivo de 4x/0.10 (Nikon E200). Al no observar diferencias entre los valores obtenidos en cada hemisferio, se decidió calcular un valor total, de cada variable a estudio y de cada uno de los núcleos, a partir de la suma de los valores obtenidos en cada uno de los hemisferios.

Tras la revisión de trabajos publicados en la literatura en los que se realizan estudios anatomopatológicos del PSB de rata, se decidió adaptar el método de análisis cuantitativo utilizado por Lee et al. (2013) en su trabajo sobre el efecto de factores neurotróficos en las neuronas colinérgicas del PSB de ratas.

Las áreas a estudio en cada uno de los núcleos de interés fueron las siguientes:

\*A nivel del septo medial, se realizó un análisis cuantitativo y semicuantitativo, de las variables a estudio en 10 campos de gran aumento (x40/0.65), que corresponden, con el microscopio Nikon E200 que se utilizó, un área de 1,96 mm<sup>2</sup>.

\*A nivel de la porción vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca, se realizó un análisis cuantitativo y semicuantitativo en 15 campos de gran aumento (x40/0.65), 5 campos a nivel de la porción vertical y 10 campos a nivel de la porción horizontal que, con el microscopio Nikon E200 corresponden a un área total de 2,94 mm<sup>2</sup>.

\*A nivel del núcleo basal magnocelular de Meynert, el análisis cuantitativo y semicuantitativo se realizó en 10 campos de gran aumento (x40/0.65), 5 campos a nivel del núcleo basal derecho y 5 campos a nivel del núcleo basal del lado izquierdo, que en conjunto corresponden, con el microscopio Nikon E200 que se utilizó, un área de 1,96 mm<sup>2</sup>.

Los resultados obtenidos en cada uno de los núcleos fueron representativos de la totalidad del PSB en los animales estudiados

En la Tabla 2 se detallan las variables morfológicas e inmunohistoquímicas a estudio.

| <b>VARIABLE</b>              | <b>TIPO DE PREPARACION</b>      | <b>ANALISIS</b>  |
|------------------------------|---------------------------------|------------------|
| Neuronas necróticas          | Hematoxilina-Eosina             | Cuantitativo     |
| Neuronas NeuN+               | Inmunoteñida con anti-NeuN      | Cuantitativo     |
| Neuronas ChAT+               | Inmunoteñida con anti-ChAT      | Cuantitativo     |
| Neuronas ChAT+<br>necróticas | Inmunoteñida con anti-<br>ChAT+ | Cuantitativo     |
| Gliosis                      | Inmunoteñida con anti-PGFA      | Semicuantitativo |
| Espongiosis                  | Hematoxilina-Eosina             | Semicuantitativo |

**Tabla 2.** Tipos de preparaciones y análisis de las variables morfológicas e inmunohistoquímicas a estudio.

#### 4.7.2. Estudios de mecanismos moleculares de toxicidad

##### 4.7.2.1. *Análisis de la actividad de la ChAT*

La enzima ChAT cataliza la transferencia de un grupo acetilo de la coenzima A, acetil-CoA, a la colina, dando lugar a la ACh. La actividad de la ChAT se midió en el homogenizado de las muestras de PSB por medio del método radio-enzimático de Fonnum (Fonnum, 1975), con una modificación que implica la incorporación de [ $C^{14}$ ] acetil-CoA en la ACh (Mennicken y Quirion, 1997; Zheng et al., 2002). Las muestras de tejido se homogenizaron mediante sonicación en 100  $\mu$ l de tampón de lisis frío (Tris 50 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%), y a continuación se

centrifugaron a 10.000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante se decantó en un tubo nuevo (Zheng et al., 2002). La radioactividad correspondiente al producto de reacción ( $[C^{14}]$  ACh) se midió por medio de un medidor de cuentas. Los valores de actividad se normalizaron frente a la concentración total de proteína determinada a través del uso kit BCA (ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain). Todos los valores de actividad de la ChAT, obtenidos por triplicado para cada muestra, se expresaron como pmol de ACh sintetizada/h/mg de proteína.

#### *4.7.2.2. Análisis de la actividad enzimática de la AChE*

Se determinó la actividad de la AChE tras 24 horas y 28 días de exposición a cadmio, usando el método estándar Ellman de tiocolina (Ellman et al., 1961), con modificaciones menores (Hartl et al., 2011; Zimmermann et al., 2008), y los valores de actividad se normalizaron frente a la concentración total de proteína determinada a través del uso kit BCA (ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain). Brevemente, al final de los tratamientos, los tejidos se homogenizaron mediante sonicación como acabamos de describir más arriba y del sobrenadante se tomaron alícuotas (10  $\mu$ l) que se pipetearon sobre una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía tampón Ellman, así como iso-OMPA, (concentración final 100 mM). El ensayo cinético se inició por adición de acetiltiocolina y ácido ditionitrobenzoico (1 mM y 500 mM concentraciones finales, respectivamente). La absorbancia se leyó usando un lector de placas (412 nm). Todas las muestras se realizaron por triplicado. La actividad de la AChE se calculó como nmol/min/mg de proteína y se representa como porcentaje respecto al control. La actividad de butirilcolinesterasa fue inhibida por iso-OMPA.

#### *4.7.2.3. Análisis de la concentración neuronal de ACh*

Para determinar la concentración de ACh en las muestras de tejido homogeneizado se usó un kit comercial colorimétrico/fluorimétrico (Abcam, Cambridge, Reino Unido) (Reale et al., 2012) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras se mezclaron con tampón de lisis y a continuación se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante se decantó en un tubo nuevo. 50 µL de la muestra se mezclaron con 50 µL de solución de reacción que incluye tampón de ensayo para la colina, la sonda de colina y AChE de acuerdo con las instrucciones. Cada muestra se ensayó por triplicado, y todo el experimento se llevó a cabo por triplicado. El nivel de ACh (pmol/pocillo) se calculó mediante la gráfica de la fluorescencia de cada muestra frente a las concentraciones estándar de colina. La medición de la fluorescencia se determinó a  $\lambda$  Ex/Em 535/587 nm.

#### *4.7.2.4. Análisis de la inducción neuronal de estrés oxidativo*

Para determinar la inducción de estrés oxidativo tras la exposición a cadmio medimos la concentración de MDA (indicador de la peroxidación de lípidos) y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (indicador de la inducción de radicales libres). La concentración intracelular de MDA se cuantificó después de 24 horas o 28 días de exposición a Cd con o sin T3, usando el kit MDA Assay Kit (Abcam, Cambridge, Reino Unido), siguiendo el protocolo del fabricante. Tras el tratamiento se homogenizaron las muestras en tampón de lisis (300 µl) en hielo, y se centrifugaron durante 15 minutos a 10000 x g. La muestra (200 µl) o estándar (200 µl de MDA) se mezcló con 600 µl de solución de terbutanol (TBA), se incubó a 95°C durante 50 min y se enfrió a temperatura ambiente en un baño de hielo

durante 10 min. Se añadió cada muestra y estándar (200  $\mu$ l) (duplicado) a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 532 nm usando un lector de microplacas. La concentración de malondialdehído fue determinada como nmol/mg de proteína y se representa como porcentaje respecto al control.

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es una de las especies de oxígeno reactivas (ERO) producidas bajo condiciones de estrés oxidativo. El contenido de  $H_2O_2$  se midió usando el kit Hydrogen Peroxide Assay Kit (Abcam, Cambridge, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, después del tratamiento con Cd con o sin T3, las muestras de tejido se recogieron en tampón de ensayo de  $H_2O_2$  y luego se centrifugó durante 15 minutos a 10000 x g. Un total de 50  $\mu$ l del sobrenadante se mezcló con 50  $\mu$ l de la mezcla de reacción (tampón de ensayo: 46  $\mu$ l; sonda OxiRed: 2  $\mu$ l; HRP: 2  $\mu$ l) y después se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. La densidad óptica se leyó a 570 nm con un lector de microplacas y la concentración de  $H_2O_2$  se calculó de acuerdo con una curva de concentración estándar. El contenido de  $H_2O_2$  en las muestras se expresa en nanomoles por mililitro y se representa como porcentaje respecto al control.

#### *4.7.2.5. Análisis de bloqueo neuronal de los receptores muscarínicos M1*

Para llevar a cabo el análisis del bloqueo de los MR1 por el cadmio, las muestras de tejido se lavaron con solución salina tamponada con tampón fosfato en frío. A continuación, se adicionó el tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100) y a continuación se liso el tejido por ultrasonidos. El lisado se centrifugó a 10000 x g durante 15 minutos a 4°C y el sedimento se resuspendió en el

mismo tampón a una concentración de proteína de 3 mg/ml. Estas preparaciones se usaron inmediatamente o se almacenaron a -80°C. La afinidad del Cd por los MR1 se evaluó determinando el desplazamiento de la unión de [<sup>3</sup>H] pirenzepina (Perkin Elmer, Madrid, España) a los MR1 de las membranas neuronales. Los ensayos se llevaron a cabo con [<sup>3</sup>H] pirenzepina 10 nM, 5 mg de lisado y una de las concentraciones de cadmio a evaluar (incluida cero) en cada tubo. Se ensayó cada concentración de Cd por triplicado. La reacción se inició con la adición del lisado con las membranas celulares y los tubos se incubaron a 22°C durante 60 min. La incubación se terminó mediante la adición de 5 ml de tampón enfriado en hielo y la filtración rápida a través de un papel de filtro de fibra de vidrio Whatman GF/B (previamente endurecido en polietilenoimina al 0,5%). Los filtros se lavaron dos veces con 5 ml de tampón enfriado en hielo y se transfirieron a viales de conteo de cuentas a los que se añadieron 3 ml de cóctel de conteo de cuentas Beckman Ready Safe. Los valores de unión obtenidos (pmol) se normalizaron por los valores de concentración de proteína dando una unidad final de pmol/mg y se presentaron como porcentaje de control sin tratar.

#### *4.7.2.6. Análisis del contenido neuronal de proteínas beta-amiloides y Tau*

Las muestras de tejido se lavaron con solución salina tamponada con tampón fosfato 0.01M y a continuación se homogeneizaron en 100 µl de tampón de lisis en frío (Tris 50 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%), por homogenización manual y por ultrasonidos. A continuación, los homogenizados se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante resultante se le adiciono inhibidores de proteasas y almacenó para el análisis. Se analizaron los sobrenadantes para determinar los niveles totales de proteínas Tau (KMB7011) y Tau

fosforiladas (KMB7041), y los niveles de proteínas A $\beta$  1-40 (KMB3481) y A $\beta$  1-42 (KMB3441) utilizando kits ELISA comerciales (Invitrogen, Madrid, España), siguiendo los protocolos del fabricante. Para tener en cuenta en dichos análisis la concentración de proteínas, se midió la concentración de proteína total presente en los lisados celulares mediante el kit BCA (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los valores obtenidos en los test de ELISA (pg/ml) fueron normalizados con la concentración intracelular total de proteínas ( $\mu$ g/ml), dando lugar a una unidad final de pg/ $\mu$ g y presentada como porcentaje de control no tratado

#### *4.7.2.7. Análisis del contenido de hormonas tiroideas*

El contenido de T4, T3 y TSH se midió en plasma y PSB de animales tratados con Cd para determinar si dichas hormonas se alteran por la exposición al Cd. El contenido de T4, T3 y TSH se midió usando kits comerciales de inmunoensayo enzimático específicos para cada hormona (MBS261867, MBS700273 y MBS729687, respectivamente, MyBioSource, Madrid, Spain) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de plasma se recogieron en tubos de centrifuga con heparina como anticoagulante y se centrifugaron 1000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Las muestras de tejidos se homogeneizaron en 500  $\mu$ L de solución salina tamponada con fosfato 0,01 M de forma mecánica y por sonicación. Los homogeneizados se centrifugaron a 1500 x g durante 15 minutos a 4 °C. Se usaron 100  $\mu$ l de las muestras para enzimoanálisis (EIA) por duplicado. Se obtuvieron valores de ELISA (ng/ml) y se corrigieron por el volumen plasmático (ml/ml) o el peso del tejido (mg/ml), produciendo una unidad final de pg/ml o pg/mg, respectivamente, y se presentaron como porcentaje del control sin tratamiento.

#### 4.7.2.8. Análisis de la expresión génica

Para la realización de la determinación de los cambios en la expresión génica tras la exposición al cadmio se realizó una reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa (qPCR). El ARN total fue extraído mediante el método del Trizol (Invitrogen, Madrid, España). La concentración final de ARN se determinó usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) y la calidad de las muestras del ARN total se evaluó utilizando el LabChip Experion (Bio-Rad, Madrid, España). La síntesis del ADN complementario del ARN se realizó con 1.000 ng de ARN usando el kit de síntesis PCR Array First Strand-Synthesis Kit (C02; SuperArray Bioscience, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante, incluyendo un paso de eliminación de ADN genómico y controles de ARN externos.

Después se realizó la qPCR utilizando conjuntos de cebadores prevalidados de los genes en estudio incluyendo una etapa de eliminación de ADN genómico y controles de ARN externos. Después de la transcripción inversa, se realizó una qPCR utilizando conjuntos de cebadores prevalidados (SuperArray Bioscience) que codifican para el ARNm de ChAT (PPR55620A), VACHT (PPR44602A), HACHT (PPR49836A), AChE (PPR06784B), NRF2 (PPR45094A), HO-1 (PPR57718A), GPX (PPR45366A), RM1 (PPR06806A), RM2 (PPR06780B), RM3 (PPR06829B), RM4 (PPR06779A), RM5 (PPR49739B), GSK-3 $\beta$  (PPR44848A),  $\beta$ APP (PPR06788A) y ACTB (PPR06570C). Los cebadores para ambas isoformas de la AChE, R y S, (Tabla 3) se tomaron de Jameson et al. (2007). Las reacciones se realizaron en un CFX96 mediante Real-Time PCR SYBR Green Master Mix PA-012 (SuperArray Bioscience). Los parámetros del termociclador fueron 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y

72°C durante 30 segundos. Se utilizó el gen de la beta actina (ACTB) como un control interno para la normalización. Los cambios relativos en la expresión génica se calcularon utilizando el método de Ct (ciclo umbral). Los datos de expresión se presentan como múltiplos de cambio reales (Livak y Schmittgen, 2001).

| Abreviatura | Gen                 | Referencia            | Cebadores Sentido (S) y Antisentido (R)                    |
|-------------|---------------------|-----------------------|--|
| AChE-S      | Acetilcolinesterasa | Jameson et al. (2007) | S-ccctcactgaactacaccgtggag<br>A- cggccttcactggcgctcc       |
| AChE-R      | Acetilcolinesterasa | Jameson et al. (2007) | S- ccctcactgaactacaccgtggag<br>A- gtccttccaacccttgccgccttg |

**Tabla 3.** Cebadores usados para la determinación de la expresión génica de las variantes de la AChE.

Elegimos el estudio de los genes ChAT, VACHT, y AChE para determinar el efecto del Cd sobre la transmisión colinérgica, debido a que el neurotransmisor ACh es sintetizado por la enzima ChAT (Oda, 1999) y la enzima HACHT media la recaptación de la colina a nivel presináptico como paso limitante de la velocidad de síntesis de la ACh (Bazalakova y Blakely, 2006). VACHT es responsable del transporte de la acetilcolina desde el citoplasma a las vesículas sinápticas, siendo este un paso limitante en la liberación de ACh (Oda, 1999). Por último, la AChE descompone la ACh, terminando, por lo tanto, el proceso de neurotransmisión (Ballard et al., 2005).

#### 4.8. Análisis estadístico

Los datos recogidos de todas las variables a estudio se almacenaron en una base de datos (aplicación informática Microsoft Excel). El análisis estadístico se planteó en dos fases:

*Análisis descriptivo:* Frecuencias para las variables cualitativas y media (desviación estándar) para las cuantitativas (si cumplían criterios de normalidad) o la mediana (rango) si no los cumplían.

*Análisis de asociación:* para valorar la asociación entre las variables cualitativas del estudio se planteó la realización de la prueba Chi cuadrado, con la corrección de Fisher en caso necesario.

La asociación entre las variables cuantitativas se analizó mediante la prueba t de Student para datos apareados, para determinar las diferencias significativas entre un tratamiento y su control y el análisis ANOVA de una vía para la determinación de diferencias significativas entre diferentes tratamientos o entre los diferentes cuadrantes, seguido por la prueba post-hoc de Tukey. La diferencia estadística fue aceptada cuando  $p \leq 0,05$ . El análisis estadístico de los datos fue realizado con el programa GraphPad.



## **RESULTADOS**



## 5.- RESULTADOS

### 5.1. Estudio histológico de las variables morfológicas sobre la región del prosencéfalo basal de ratas expuestas de manera única o continuada a cadmio. Implicación de las hormonas tiroideas sobre dichas alteraciones.

#### 5.1.1. Análisis descriptivo

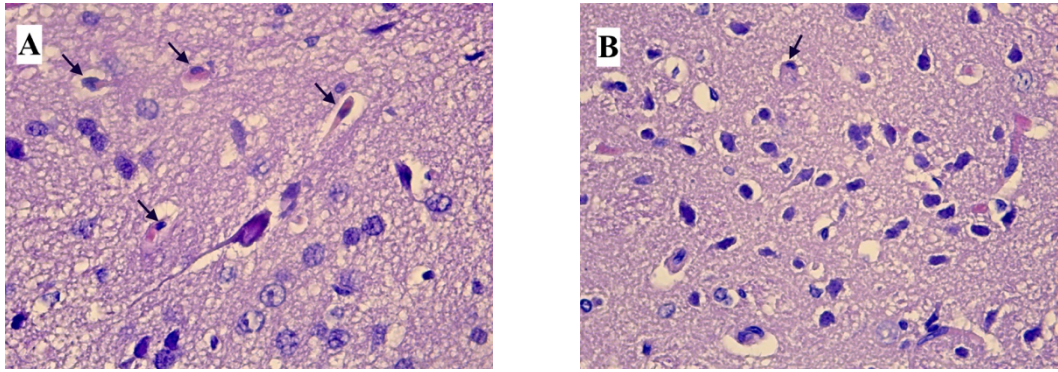
##### 5.1.1.1. *Necrosis neuronal*

Se contabilizaron las neuronas necróticas a nivel de los núcleos del PSB, comprobando que cumplían los criterios histológicos descritos en el apartado “material y métodos” (Figura 15). Al no haberse encontrado diferencias significativas entre el núcleo septal, la banda diagonal de Broca y el núcleo basal de Meynert, los valores reflejados a continuación (Tabla 4) representan la media de los tres núcleos en cada grupo de animales estudiados.

**Tabla 4.** Datos de media, DE y cambio porcentual respecto al control en los diferentes grupos de ratas expuestas de manera única y continuada.

| NECROSIS NEURONAL                   | MEDIA | DE   | PORCENTAJE RESPECTO AL CONTROL (%) |
|-------------------------------------|-------|------|------------------------------------|
| <b><i>EXPOSICION UNICA</i></b>      |       |      |                                    |
| Control                             | 1,41  | 0,90 | 100                                |
| T3                                  | 1,5   | 0,83 | 106,38                             |
| Cadmio                              | 5,41  | 1,67 | 383,38                             |
| Cadmio+T3                           | 4     | 1,07 | 283,68                             |
| <b><i>EXPOSICION CONTINUADA</i></b> |       |      |                                    |
| Control                             | 1,5   | 0,85 | 100                                |
| T3                                  | 1,6   | 0,92 | 106,66                             |
| Cadmio                              | 5,81  | 1,28 | 362,57                             |
| Cadmio+T3                           | 4,12  | 1,32 | 283,68                             |

DE: desviación estándar.



**Figura 15.** Septo medial de rata expuesta a cadmio de manera única. En la imagen de la izquierda (A) se observa la presencia de cuatro neuronas necróticas (flecha) y en la imagen de la derecha (B) todas las neuronas excepto una (flecha) corresponden a neuronas con artefacto histológico o “dark neurons”. H-E x400.

#### 5.1.1.2. *Espongiosis*

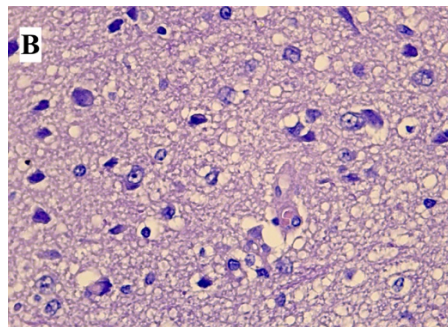
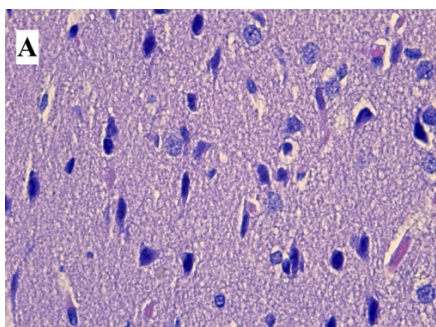
En las tablas y figuras a continuación se indican el score o grado de espongiosis (conforme a lo definido en el apartado “material y métodos”) y porcentaje para cada núcleo del PSB y para cada grupo de ratas expuestas de manera única o continuada a cadmio y cadmio+T3.

##### 5.1.1.2.1. Septo medial

A nivel del septo medial no se observó, en ninguno los grupos control, la presencia de espongiosis (score 0). Sin embargo, en todos los grupos expuestos de manera única (1mg/Kg) o continuada (0,1mg/Kg) a cadmio o a cadmio+T3, se observó la presencia de un parénquima nervioso expandido, con vacuolas o espacios vacíos (Figura 16), que suponen menos del 50% del área a estudio (score 1) o más del 50% de dicho área (score 2). El porcentaje de espongiosis score 1 ó 2 en los diferentes grupos de ratas expuestas se describe en la tabla 5, así como en las figuras 17 y 18.

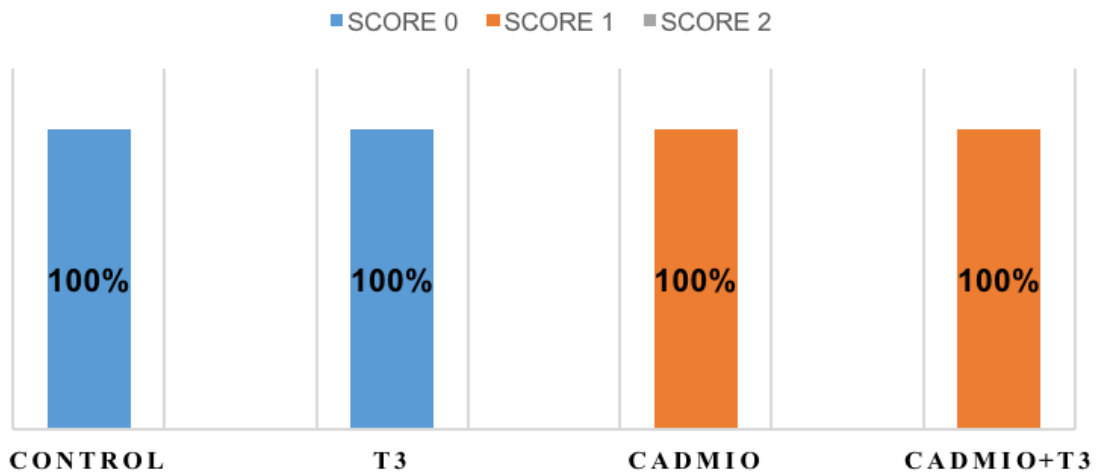
**Tabla 5.** Grado de espongirosis (score) y porcentaje observado a nivel del septo medial en los distintos grupos de ratas con exposición única y continuada.

| ESPONGIOSIS                  | SCORE | PORCENTAJE (%) |
|------------------------------|-------|----------------|
| <b>EXPOSICION UNICA</b>      |       |                |
| Control                      | 0     | 100            |
| T3                           | 0     | 100            |
| Cadmio                       | 1     | 100            |
| Cadmio+T3                    | 1     | 100            |
| <b>EXPOSICION CONTINUADA</b> |       |                |
| Control                      | 0     | 100            |
| T3                           | 0     | 100            |
| Cadmio                       | 1     | 50             |
|                              | 2     | 50             |
| Cadmio+T3                    | 0     | 33,3           |
|                              | 1     | 66,6           |



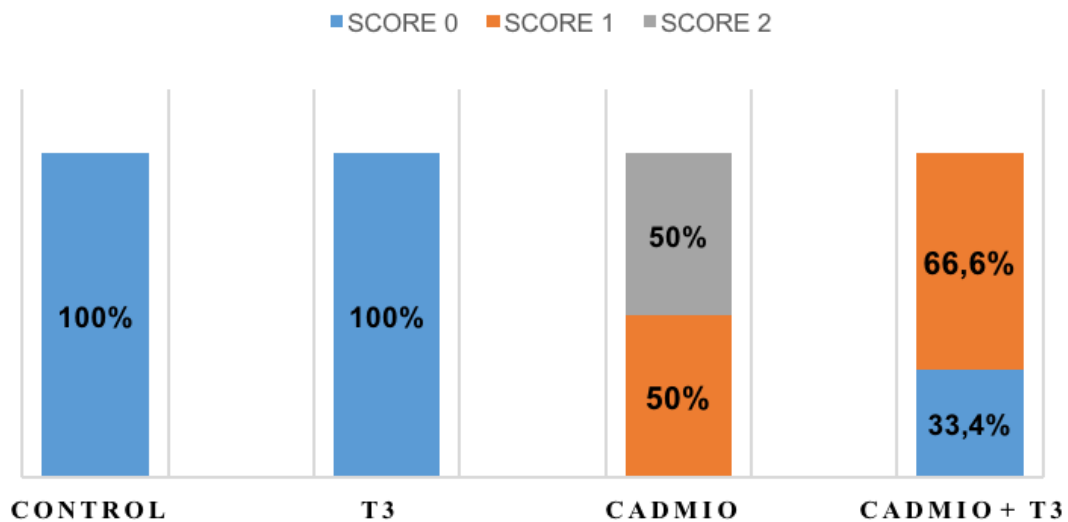
**Figura 16.** Núcleo septal de rata control, sin presencia de espongirosis (Imagen A, H-E x400) y rata expuesta de manera única a cadmio, con presencia de espongirosis (Imagen B, H-E x400).

**ESPONGIOSIS**  
**48 Horas**  
*SEPTO MEDIAL*



**Figura 17.** Porcentaje del grado de espongiosis a nivel del septo medial en los diferentes grupos de ratas expuestas a cadmio y cadmio+T3 de manera única.

**ESPONGIOSIS**  
**28 Días**  
*SEPTO MEDIAL*



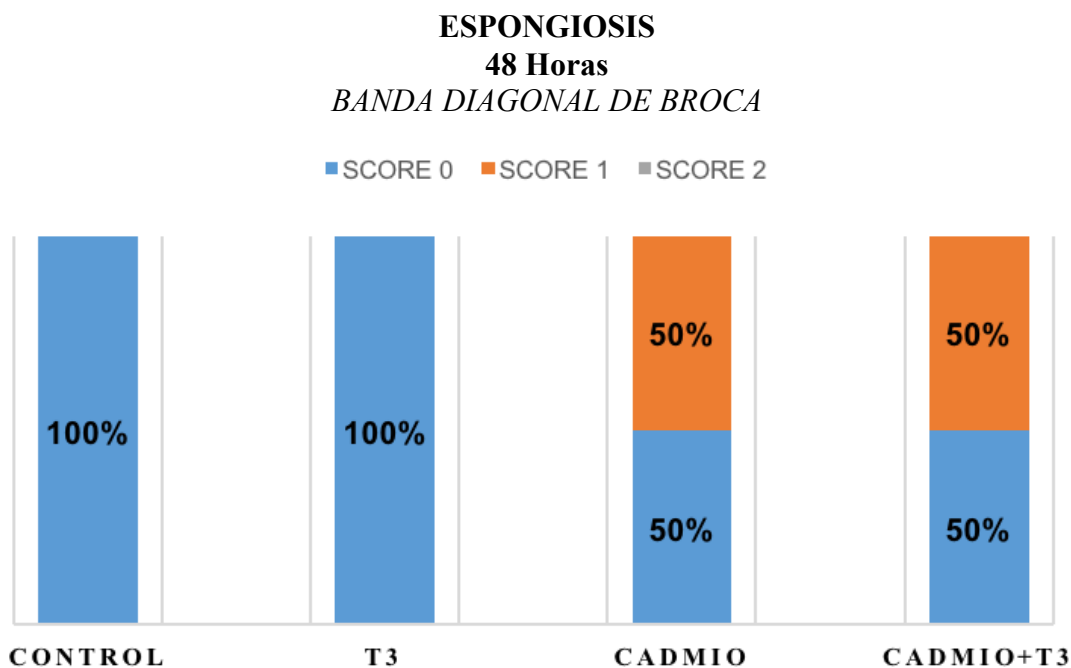
**Figura 18.** Porcentaje del grado de espongiosis a nivel del septo medial en los diferentes grupos de ratas expuestas a cadmio y cadmio+T3 de manera continuada.

5.1.1.2.2. Banda diagonal de Broca

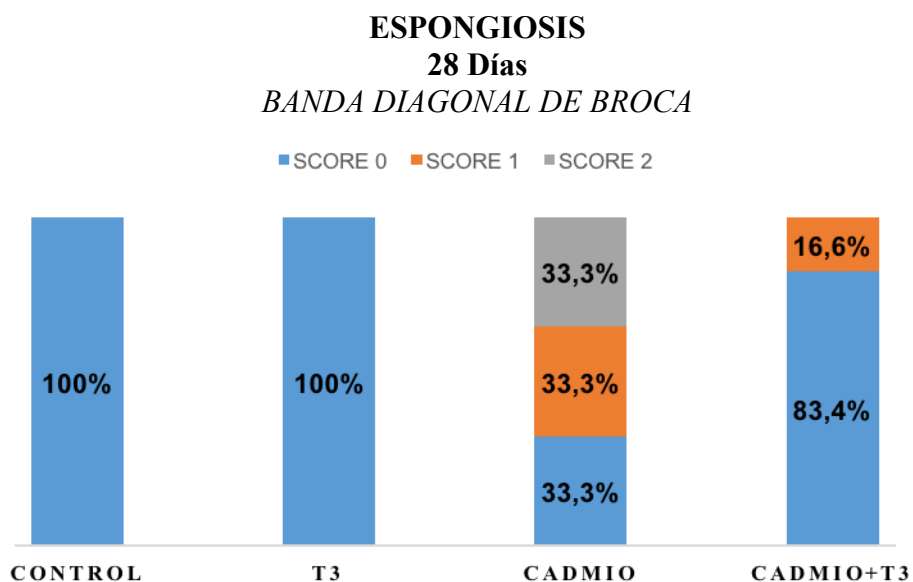
A nivel de la banda diagonal de Broca se observó la presencia de espongiosis únicamente en los grupos expuestos a cadmio o cadmio+T3, de manera única (1mg/Kg) o continuada (0,1mg/Kg). Los datos del porcentaje de ratas con presencia o no de espongiosis, así como si la espongiosis corresponde a un área mayor o menor del 50% del parénquima a estudio, se encuentran representados en la tabla 6, así como en las figuras 19 y 20.

**Tabla 6.** Grado de espongiosis (score) y porcentaje observado a nivel de la banda diagonal de Broca, en los distintos grupos de ratas con exposición única y continuada.

| ESPONGIOSIS                         | SCORE | PORCENTAJE (%) |
|-------------------------------------|-------|----------------|
| <b><i>EXPOSICION UNICA</i></b>      |       |                |
| Control                             | 0     | 100            |
| T3                                  | 0     | 100            |
| Cadmio                              | 0     | 50             |
|                                     | 1     | 50             |
| Cadmio+T3                           | 0     | 50             |
|                                     | 1     | 50             |
| <b><i>EXPOSICION CONTINUADA</i></b> |       |                |
| Control                             | 0     | 100            |
| T3                                  | 0     | 100            |
| Cadmio                              | 0     | 33,3           |
|                                     | 1     | 33,3           |
|                                     | 2     | 33,3           |
| Cadmio+T3                           | 0     | 83,4           |
|                                     | 1     | 16,6           |



**Figura 19.** Porcentaje del grado de espongiosis a nivel de la banda diagonal de Broca en los diferentes grupos de ratas expuestas a cadmio y cadmio+T3 de manera única.



**Figura 20.** Porcentaje del grado de espongiosis a nivel de la banda diagonal de Broca en los diferentes grupos de ratas expuestas a cadmio y cadmio+T3 de manera continuada.

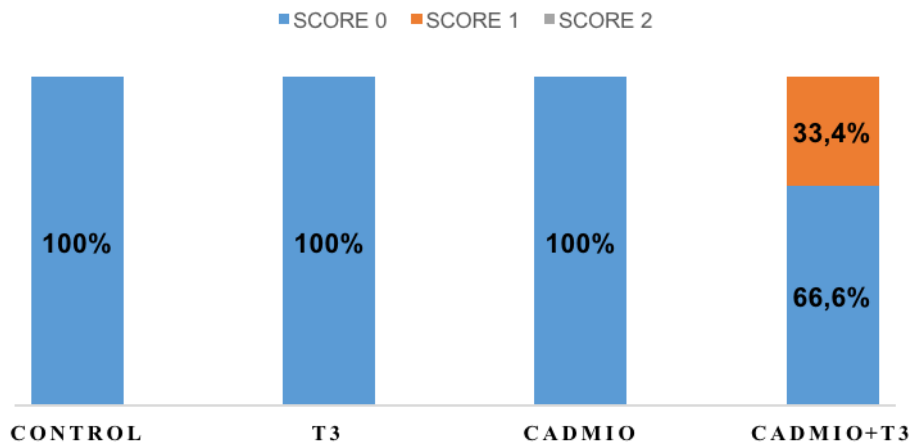
### 5.1.1.2.3. Núcleo basal de Meynert

A nivel del núcleo basal de Meynert destaca la ausencia de espongiosis tanto en los grupos control como en el grupo expuesto a cadmio de manera única (1mg/Kg). Los datos del porcentaje y score de espongiosis se encuentran representados en la tabla 7, figuras 21 y 22.

**Tabla 7.** Grado de espongiosis (score) y porcentaje observado a nivel del núcleo basal de Meynert en los distintos grupos de ratas con exposición única y continuada.

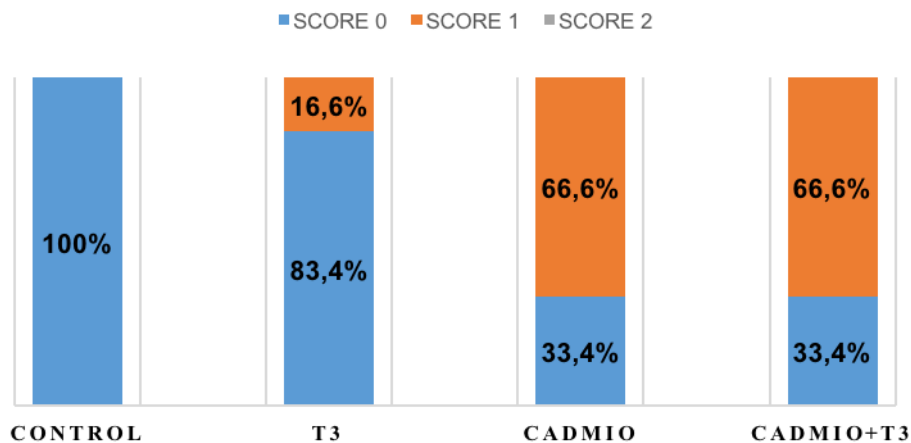
| ESPONGIOSIS                  | SCORE | PORCENTAJE (%) |
|------------------------------|-------|----------------|
| <b>EXPOSICION UNICA</b>      |       |                |
| Control                      | 0     | 100            |
| T3                           | 0     | 100            |
| Cadmio                       | 0     | 100            |
| Cadmio+T3                    | 0     | 66,6           |
|                              | 1     | 33,3           |
| <b>EXPOSICION CONTINUADA</b> |       |                |
| Control                      | 0     | 100            |
| T3                           | 0     | 100            |
| Cadmio                       | 0     | 33,3           |
|                              | 1     | 66,6           |
| Cadmio+T3                    | 0     | 33,3           |
|                              | 1     | 66,6           |

**ESPONGIOSIS**  
**48 Horas**  
*NÚCLEO BASAL DE MEYNERT*



**Figura 21.** Porcentaje del grado de espongiosis a nivel del núcleo basal de Meynert en los diferentes grupos de ratas expuestas a cadmio y cadmio+T3 de manera única.

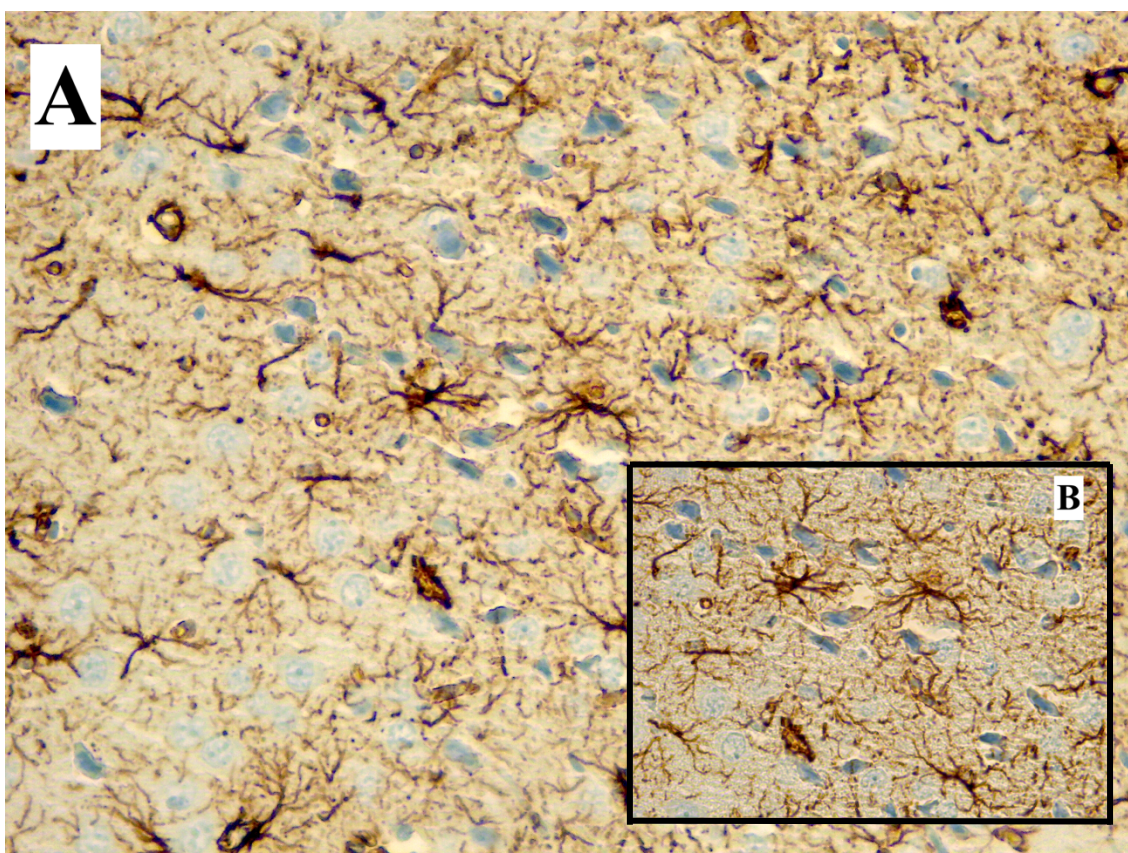
**ESPONGIOSIS**  
**28 Días**  
*NÚCLEO BASAL DE MEYNERT*



**Figura 22.** Porcentaje del grado de espongiosis a nivel del núcleo basal de Meynert en los diferentes grupos de ratas expuestas a cadmio y cadmio+T3 de manera continuada.

### 5.1.1.3. Gliosis

En las tablas y figuras a continuación se indican el score o grado de gliosis (conforme a lo definido en el apartado “material y métodos”) y frecuencia para cada núcleo del PSB (Figura 23) y para cada grupo de ratas expuestas de manera única o continuada a cadmio y cadmio+T3.



**Figura 23.** Gliosis grado 2, definida por técnica inmunohistoquímica, a nivel del núcleo septal de rata expuesta a cadmio de manera única (Imagen A, IHQ GFAP x200). Detalle, a mayor aumento, de astrocitos con aumento de grosor y morfología irregular de sus prolongaciones (Imagen B, IHQ GFAP x400).

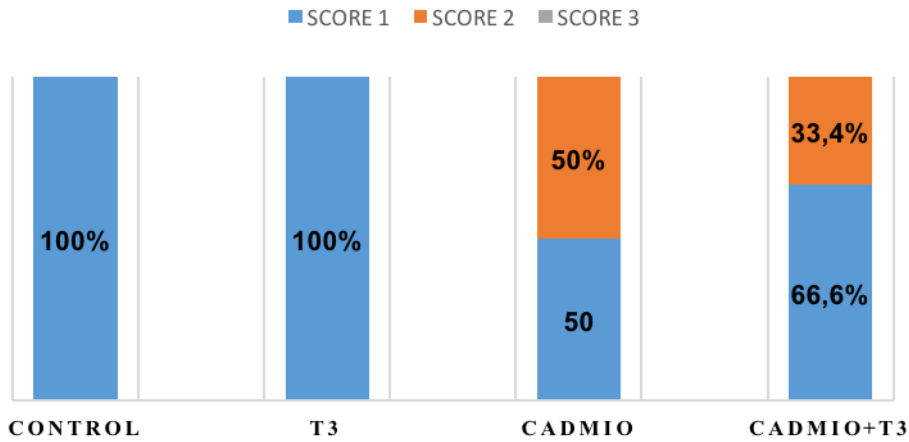
### 5.1.1.3.1. Septo medial

A nivel del septo medial se observó, en todos los grupos de ratas, tanto control como expuestas a cadmio y cadmio+T3 (1mg/Kg y 0,1mg/Kg), la presencia de gliosis. El porcentaje y score para cada grupo se describen en la tabla 8, así como en las figuras 24 y 25.

**Tabla 8.** Grado de gliosis (score) y porcentaje observado a nivel del septo medial en los distintos grupos de ratas con exposición única y continuada.

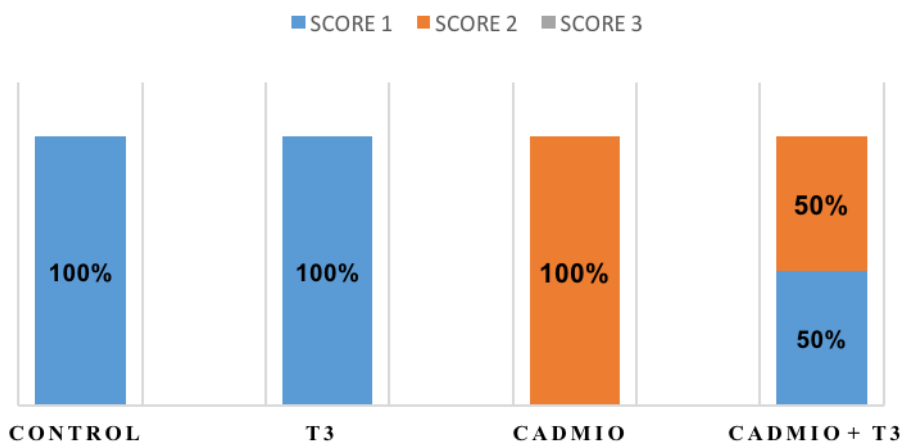
| GLIOSIS                      | SCORE | PORCENTAJE (%) |
|------------------------------|-------|----------------|
| <b>EXPOSICION UNICA</b>      |       |                |
| Control                      | 1     | 100            |
| T3                           | 1     | 100            |
| Cadmio                       | 1     | 50             |
|                              | 2     | 50             |
| Cadmio+T3                    | 1     | 66,6           |
|                              | 2     | 33,3           |
| <b>EXPOSICION CONTINUADA</b> |       |                |
| Control                      | 1     | 100            |
| T3                           | 1     | 100            |
| Cadmio                       | 1     | 100            |
| Cadmio+T3                    | 1     | 50             |
|                              | 2     | 50             |

**GLIOSIS**  
**48 Horas**  
*SEPTO MEDIAL*



**Figura 24.** Porcentaje del grado de gliosis a nivel del núcleo septal en los diferentes grupos de ratas expuestas a cadmio y cadmio+T3 de manera única.

**GLIOSIS**  
**28 Días**  
*SEPTO MEDIAL*



**Figura 25.** Porcentaje del grado de gliosis a nivel del núcleo septal en los diferentes grupos de ratas expuestas a cadmio y cadmio+T3 de manera continuada.

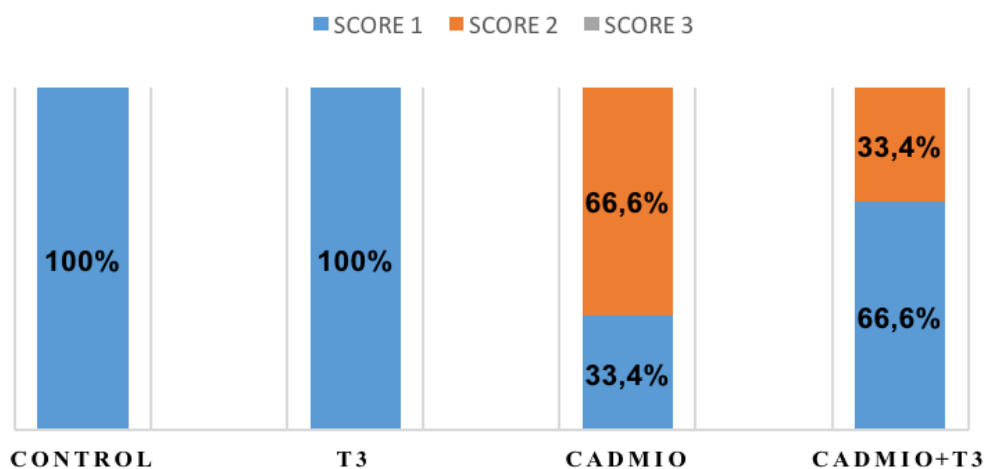
5.1.1.3.2. Banda diagonal de Broca

A nivel de la banda diagonal de Broca se observó, en todos los grupos control, la presencia de gliosis score 1. En los grupos expuestos a cadmio y cadmio+T3 de manera única (1mg/Kg) o continuada (0,1mg/Kg), se observó un porcentaje de ratas con un score mayor que el grupo control. Todos los datos en relación al porcentaje y score de gliosis para cada grupo se describen en la tabla 9, así como en las figuras 26 y 27.

**Tabla 9.** Grado de gliosis (score) y porcentaje observado a nivel de la banda diagonal de Broca en los distintos grupos de ratas con exposición única y continuada.

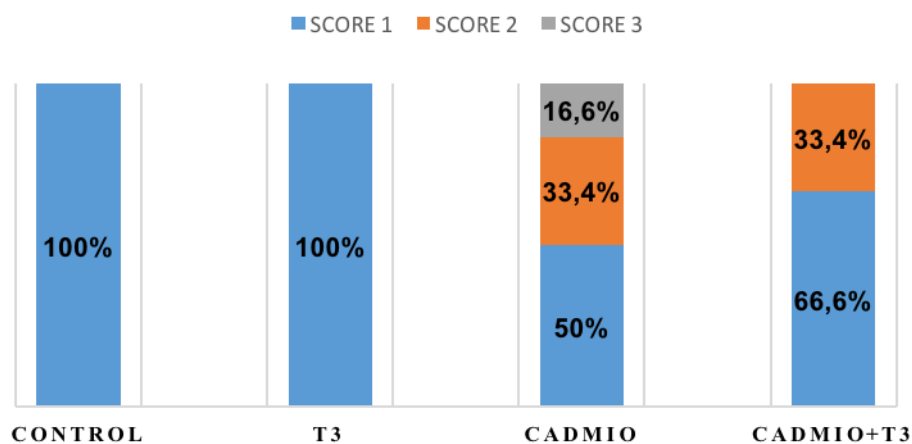
| GLIOSIS                             | SCORE | PORCENTAJE (%) |
|-------------------------------------|-------|----------------|
| <b><i>EXPOSICION UNICA</i></b>      |       |                |
| Control                             | 1     | 100            |
| T3                                  | 1     | 100            |
| Cadmio                              | 1     | 33,3           |
|                                     | 2     | 66,6           |
| Cadmio+T3                           | 1     | 66,6           |
|                                     | 2     | 33,3           |
| <b><i>EXPOSICION CONTINUADA</i></b> |       |                |
| Control                             |       |                |
| T3                                  | 1     | 100            |
| Cadmio                              | 1     | 100            |
|                                     | 1     | 50             |
|                                     | 2     | 33,3           |
|                                     | 3     | 16,6           |
| Cadmio+T3                           | 1     | 66,6           |
|                                     | 2     | 33,3           |

**GLIOSIS**  
**48 Horas**  
*BANDA DIAGONAL DE BROCA*



**Figura 26.** Porcentaje del grado de gliosis a nivel de la banda diagonal de Broca en los diferentes grupos de ratas expuestas a cadmio y cadmio+T3 de manera única.

**GLIOSIS**  
**28 Días**  
*BANDA DIAGONAL DE BROCA*



**Figura 27.** Porcentaje del grado de gliosis a nivel de la banda diagonal de Broca en los diferentes grupos de ratas expuestas a cadmio y cadmio+T3 de manera continuada.

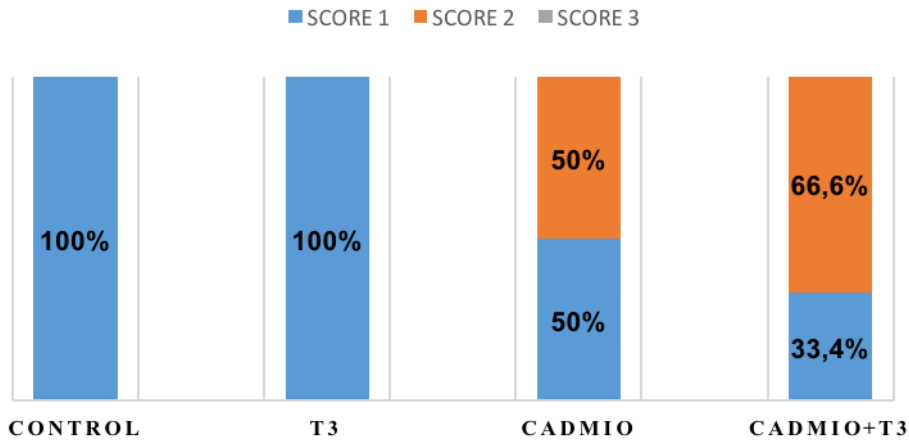
### 5.1.1.3.3. Núcleo basal de Meynert

A nivel del núcleo basal de Meynert, al igual que en los dos núcleos del PSB descritos anteriormente, se observa gliosis en todos los grupos de ratas estudiados. El porcentaje y score de gliosis para cada grupo se describen en la tabla 10, así como en las figuras 28 y 29.

**Tabla 10.** Grado de gliosis (score) y porcentaje observado a nivel del núcleo basal de Meynert en los distintos grupos de ratas con exposición única y continuada.

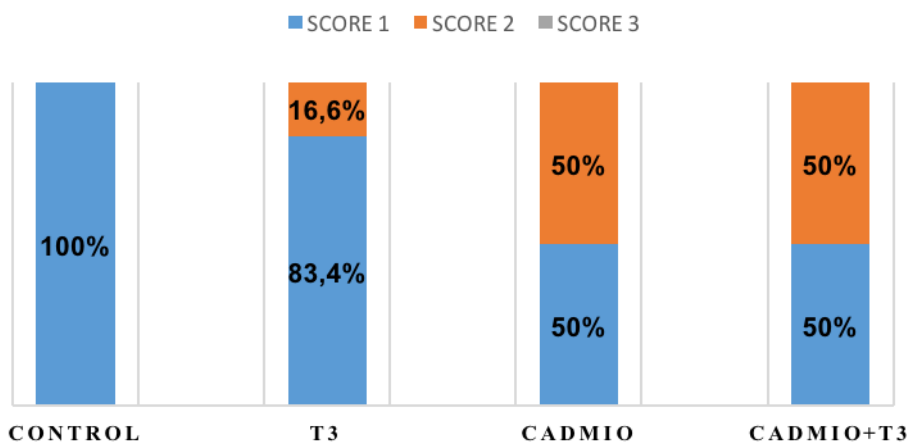
| <b>GLIOSIS</b>                      | <b>SCORE</b> | <b>PORCENTAJE (%)</b> |
|-------------------------------------|--------------|-----------------------|
| <b><i>EXPOSICION UNICA</i></b>      |              |                       |
| Control                             | 1            | 100                   |
| T3                                  | 1            | 100                   |
| Cadmio                              | 1            | 50                    |
|                                     | 2            | 50                    |
| Cadmio+T3                           | 1            | 33,3                  |
|                                     | 2            | 66,6                  |
| <b><i>EXPOSICION CONTINUADA</i></b> |              |                       |
| Control                             | 1            | 100                   |
| T3                                  | 1            | 83,3                  |
|                                     | 2            | 16,6                  |
| Cadmio                              | 1            | 50                    |
|                                     | 2            | 50                    |
| Cadmio+T3                           | 1            | 50                    |
|                                     | 2            | 50                    |

**GLIOSIS**  
**48 Horas**  
*NÚCLEO BASAL DE MEYNERT*



**Figura 28.** Porcentaje del grado de gliosis a nivel del núcleo basal de Meynert en los diferentes grupos de ratas expuestas a cadmio y cadmio+T3 de manera única.

**GLIOSIS**  
**28 Días**  
*NUCLEO BASAL DE MEYNERT*

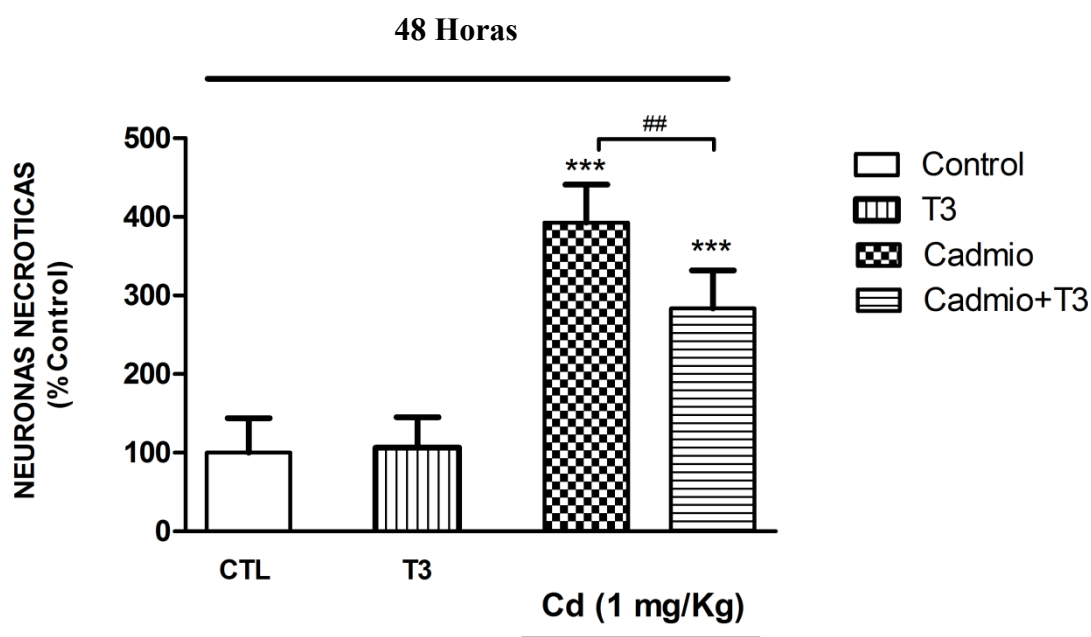


**Figura 29.** Porcentaje del grado de gliosis a nivel del núcleo basal de Meynert en los diferentes grupos de ratas expuestas a cadmio y cadmio+T3 de manera continuada.

## 5.1.2. Análisis de asociación

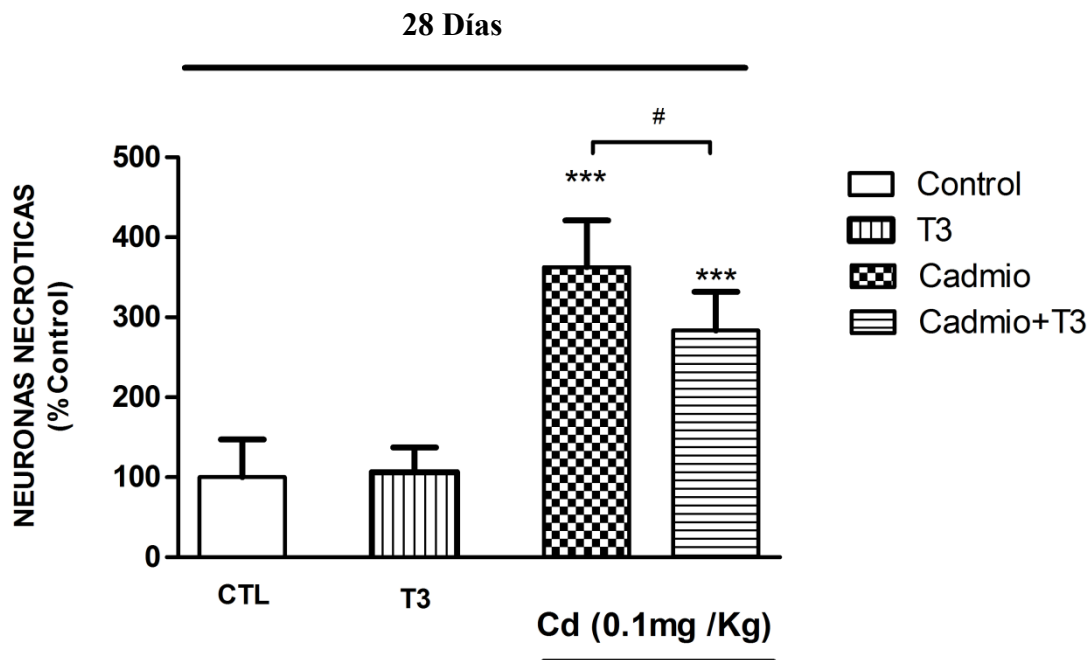
### 5.1.2.1. *Necrosis neuronal*

Tras exposición única a cadmio (1 mg/Kg), se encontró un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en el porcentaje de neuronas necróticas del PSB en comparación con el grupo control. El aumento del porcentaje de neuronas necróticas fue significativamente menor en el grupo con tratamiento combinado cadmio+T3, en comparación con el grupo tratado solo con cadmio ( $p < 0,01$ ), pero sin llegar a alcanzar el valor del grupo control (Figura 30).



**Figura 30.** Análisis del efecto del cadmio (1mg/Kg), con o sin T3 (40 µg/Kg), sobre la necrosis neuronal del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de neuronas necróticas respecto al control. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control; ## $p < 0,01$  comparado con el tratamiento con cadmio.

Tras exposición continuada a cadmio (0,1 mg/Kg), se encontró un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en el porcentaje de neuronas necróticas del PSB en comparación con el grupo control. El aumento del porcentaje de neuronas necróticas fue significativamente menor en el grupo con tratamiento combinado cadmio+T3 de manera continuada, en comparación con el grupo tratado solo con cadmio ( $p < 0,05$ ), pero sin llegar a alcanzar el valor del grupo control (Figura 31).



**Figura 31.** Análisis del efecto del cadmio (0,1mg/Kg), con o sin T3 (40 µg/Kg), sobre la necrosis neuronal del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de neuronas necróticas respecto al control. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control; # $p < 0,05$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.1.2.2. Espongiosis

Para analizar la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre los diferentes grupos de ratas, respecto a la variable espongiosis, se realizó un análisis estadístico con Chi cuadrado.

A continuación, se presentan las comparativas específicas a nivel de los diferentes núcleos del PSB, entre los diferentes grupos de ratas expuestos de manera única (Tabla 11) o continuada (Tabla 12) a cadmio y cadmio+T3, comparados con el grupo control.

**Tabla 11.** Análisis de asociación (Chi cuadrado) de la variable espongiosis, a nivel de los núcleos del PSB, entre los diferentes grupos de ratas expuestas de manera única.

|                         | Chi cuadrado<br>“p” |                  |             |
|-------------------------|---------------------|------------------|-------------|
|                         | Cd vs Control       | Cd+T3 vs Control | Cd vs Cd+T3 |
| Septo medial            | 0,0001              | 0,0001           | 1           |
| Banda diagonal de Broca | 0,01                | 0,01             | 0,67        |
| Núcleo basal de Meynert | 0,01                | 0,01             | 0,08        |

**Tabla 12.** Análisis de asociación (Chi cuadrado) de la variable espongiosis, a nivel de los núcleos del PSB, entre los diferentes grupos de ratas expuestas de manera continuada.

|                         | Chi cuadrado<br>“p” |                  |             |
|-------------------------|---------------------|------------------|-------------|
|                         | Cd vs Control       | Cd+T3 vs Control | Cd vs Cd+T3 |
| Septo medial            | 0,0015              | 0,016            | 0,01        |
| Banda diagonal de Broca | 0,0046              | 0,01             | 0,08        |
| Núcleo basal de Meynert | 0,01                | 0,01             | 0,67        |

Estos resultados confirman que las diferencias en el grado de espongirosis, observadas en los diferentes núcleos del PSB, tanto en el grupo de ratas expuesto a cadmio de manera única como continuada, comparado con los grupos control, son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a las diferencias en el grado de espongirosis, observadas entre los grupos expuestos a cadmio y aquellos expuestos a cadmio+T3, únicamente se confirmaron diferencias estadísticamente significativas a nivel del septo medial, en el grupo expuesto de manera continuada ( $p = 0,01$ ).

#### *5.1.2.3. Gliosis*

Para analizar la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre los diferentes grupos de ratas, respecto a la variable gliosis, se realizó un análisis estadístico con Chi cuadrado.

A continuación, se presentan las comparativas específicas a nivel de los diferentes núcleos del PSB, entre los diferentes grupos de ratas expuestos de manera única (Tabla 13) o continuada (Tabla 14) a cadmio y cadmio+T3, comparados con el grupo control.

**Tabla 13.** Análisis de asociación (Chi cuadrado) de la variable gliosis, a nivel de los núcleos del PSB, entre los diferentes grupos de ratas expuestas de manera única a cadmio y cadmio+T3, comparados con el grupo control.

|                         | Chi cuadrado<br>“p” |                  |             |
|-------------------------|---------------------|------------------|-------------|
|                         | Cd vs Control       | Cd+T3 vs Control | Cd vs Cd+T3 |
| Septo medial            | 0,016               | 0,06             | 0,3         |
| Banda diagonal de Broca | 0,001               | 0,1              | 0,07        |
| Núcleo basal de Meynert | 0,009               | 0,001            | 0,36        |

**Tabla 14.** Análisis de asociación (Chi cuadrado) de la variable gliosis, a nivel de los núcleos del PSB, entre los diferentes grupos de ratas expuestas de manera continuada a cadmio y cadmio+T3, comparados con el grupo control.

|                         | Chi cuadrado<br>“p” |                  |             |
|-------------------------|---------------------|------------------|-------------|
|                         | Cd vs Control       | Cd+T3 vs Control | Cd vs Cd+T3 |
| Septo medial            | 0,03                | 1                | 0,03        |
| Banda diagonal de Broca | 0,03                | 0,035            | 0,3         |
| Núcleo basal de Meynert | 0,009               | 0,01             | 0,67        |

Estos resultados confirman que las diferencias en el grado de gliosis, observadas en los diferentes núcleos del PSB, tanto en el grupo de ratas expuesto a cadmio de manera única como de manera continuada, comparado con los grupos control, son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a las diferencias en el grado de gliosis, observadas entre los grupos expuestos a cadmio y aquellos expuestos a cadmio+T3, únicamente se confirmaron diferencias estadísticamente significativas a nivel del septo medial, en el grupo expuesto de manera continuada ( $p=0,03$ ).

## **5.2. Estudio de las variables inmunohistoquímicas sobre la región del prosencéfalo basal de ratas expuestas de manera única o continuada a cadmio. Implicación de las hormonas tiroideas sobre dichas alteraciones.**

### 5.2.1. Análisis descriptivo

#### *5.2.1.1. Neuronas NeuN+*

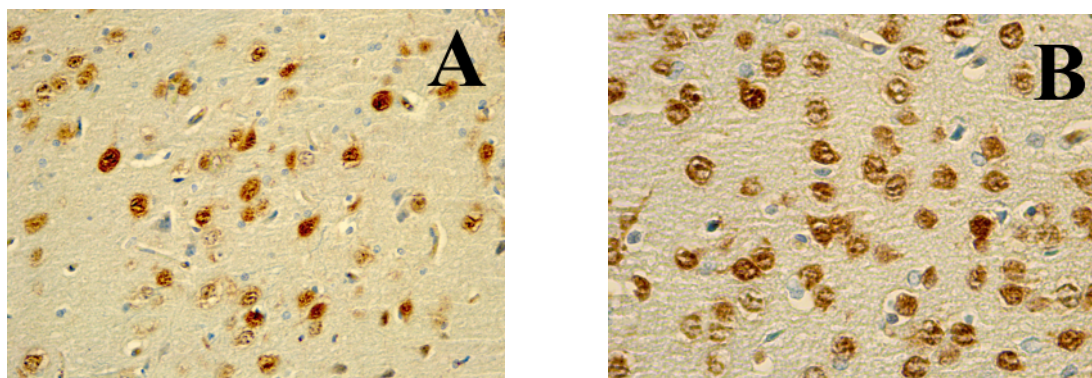
Se analizaron los núcleos septal, banda diagonal de Broca y núcleo basal de Meynert, previamente delimitados con el objetivo de 4x/0.10 (Nikon E200), en las preparaciones inmunoteñidas con el anticuerpo NeuN de cada uno de los grupos (exposición única y continuada) control, tratamiento con T3, tratamiento con cadmio y tratamiento combinado cadmio+T3 (Figura 32).

Al no haberse encontrado diferencias significativas entre el núcleo septal, la banda diagonal de Broca y el núcleo basal de Meynert, los valores reflejados a continuación representan la media de los tres núcleos en cada grupo de animales estudiados (Tabla 15).

**Tabla 15.** Datos de media, DE y cambio porcentual respecto al control en los diferentes grupos de ratas expuestas de manera única y continuada.

| NEURONAS NeuN+               | MEDIA  | D.E.  | PORCENTAJE RESPECTO AL CONTROL (%) |
|------------------------------|--------|-------|------------------------------------|
| <b>EXPOSICION UNICA</b>      |        |       |                                    |
| Control                      | 265,41 | 33,2  | 100                                |
| T3                           | 274,33 | 28,67 | 103,36                             |
| Cadmio                       | 224    | 22,62 | 84,39                              |
| Cadmio+T3                    | 256,66 | 30,59 | 96,70                              |
| <b>EXPOSICION CONTINUADA</b> |        |       |                                    |
| Control                      | 273,6  | 35,59 | 100                                |
| T3                           | 283    | 32,58 | 103,41                             |
| Cadmio                       | 221,41 | 12,7  | 80,90                              |
| Cadmio+T3                    | 243,5  | 29,65 | 89                                 |

D.E. Desviación Estándar.



**Figura 32.** Las microfotografías corresponden a cortes del septo medial del PSB, inmunoteñidos con anti-NeuN (x400). En la imagen de la izquierda, que corresponde al grupo expuesto de forma única a cadmio (A), se observa un menor número de neuronas NeuN+ que en el grupo expuesto de forma única a co-tratamiento con T3 (B).

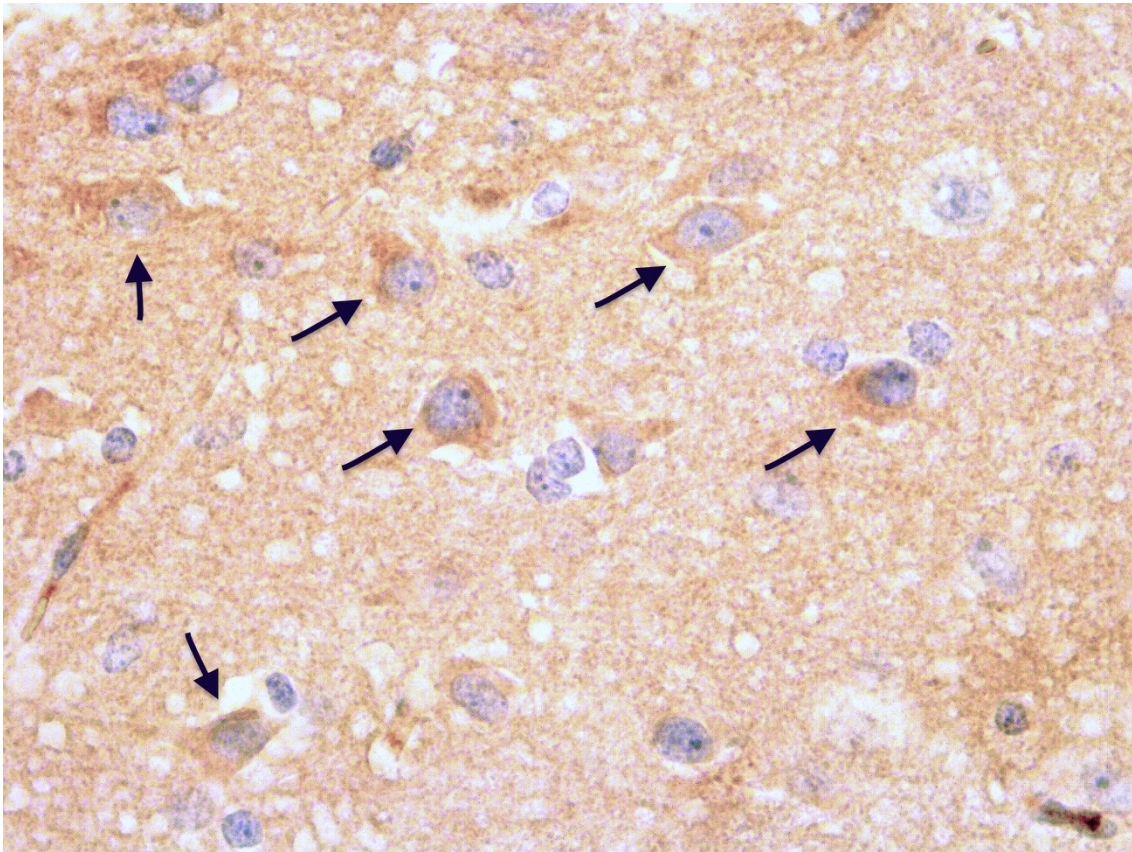
### 5.2.1.2. Neuronas ChAT+

Se contabilizaron las neuronas colinérgicas inmunoteñidas con el anticuerpo frente a la enzima ChAT en las preparaciones seleccionadas de cada uno de los grupos (exposición única y continuada) control, tratamiento con T3, tratamiento con cadmio y tratamiento combinado cadmio+T3 (Figura 33). Al no haberse encontrado diferencias significativas entre el núcleo septal, la banda diagonal de Broca y el núcleo basal de Meynert, los valores reflejados a continuación representan la media de los tres núcleos en cada grupo de animales estudiados (Tabla 16).

**Tabla 16.** Datos de media, DE y cambio porcentual respecto al control en los diferentes grupos de ratas expuestas de manera única y continuada.

| NEURONAS ChAT+                      | MEDIA  | D.E.  | PORCENTAJE RESPECTO AL CONTROL (%) |
|-------------------------------------|--------|-------|------------------------------------|
| <b><i>EXPOSICION UNICA</i></b>      |        |       |                                    |
| Control                             | 150,25 | 25,2  | 100                                |
| T3                                  | 156,66 | 26,37 | 104,30                             |
| Cadmio                              | 146,25 | 25,9  | 96,7                               |
| Cadmio+T3                           | 150,33 | 26,44 | 100                                |
| <b><i>EXPOSICION CONTINUADA</i></b> |        |       |                                    |
| Control                             | 153,75 | 20    | 100                                |
| T3                                  | 155,83 | 26,63 | 106,30                             |
| Cadmio                              | 144,58 | 27,34 | 95,33                              |
| Cadmio+T3                           | 150,16 | 28,81 | 97,6                               |

D.E. Desviación estándar.



**Figura 33.** La microfotografía corresponde a un corte, inmunoteñido con anti-ChAT, del septo medial del PSB de una rata expuesta a cadmio de forma única (IHQ x400). Las flechas señalan las neuronas colinérgicas ChAT+.

#### 5.2.1.3. *Neuronas ChAT+ necróticas*

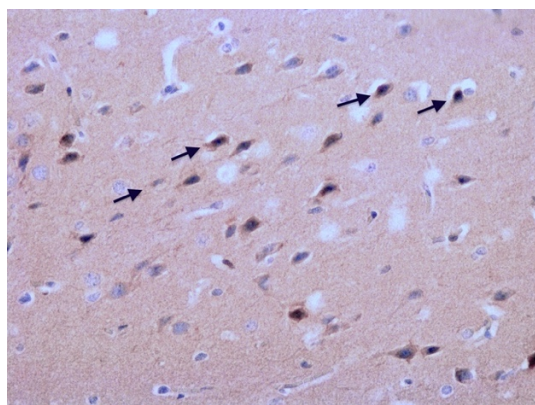
Se contabilizaron las neuronas colinérgicas inmunoteñidas con el anticuerpo frente a la enzima ChAT y con características histológicas de necrosis (explicado en el apartado “material y métodos”), en las preparaciones seleccionadas de cada uno de los grupos (exposición única y continuada) control, tratamiento con T3, tratamiento con cadmio y tratamiento combinado cadmio+T3 (Figura 34).

Al no haberse encontrado diferencias significativas entre el núcleo septal, la banda diagonal de Broca y el núcleo basal de Meynert, los valores reflejados a continuación (Tabla 17) representan la media de los tres núcleos en cada grupo de animales estudiados.

**Tabla 17.** Datos de media, DE y cambio porcentual respecto al control en los diferentes grupos de ratas expuestas de manera única y continuada.

| NEURONAS ChAT+<br>NECRÓTICAS | MEDIA | D.E. | PORCENTAJE<br>RESPECTO AL<br>CONTROL (%) |
|------------------------------|-------|------|--|
| <b>EXPOSICION UNICA</b>      |       |      |  |
| Control                      | 1,3   | 0,56 | 100                                      |
| T3                           | 0,83  | 0,45 | 80,72                                    |
| Cadmio                       | 5,08  | 1,02 | 491,56                                   |
| Cadmio+T3                    | 3,97  | 1,10 | 340,96                                   |
| <b>EXPOSICION CONTINUADA</b> |       |      |  |
| Control                      | 1,17  | 0,67 | 100                                      |
| T3                           | 1,18  | 0,84 | 100                                      |
| Cadmio                       | 4,25  | 0,97 | 455,04                                   |
| Cadmio+T3                    | 2,36  | 0,76 | 270,95                                   |

D.E. Desviación estándar.

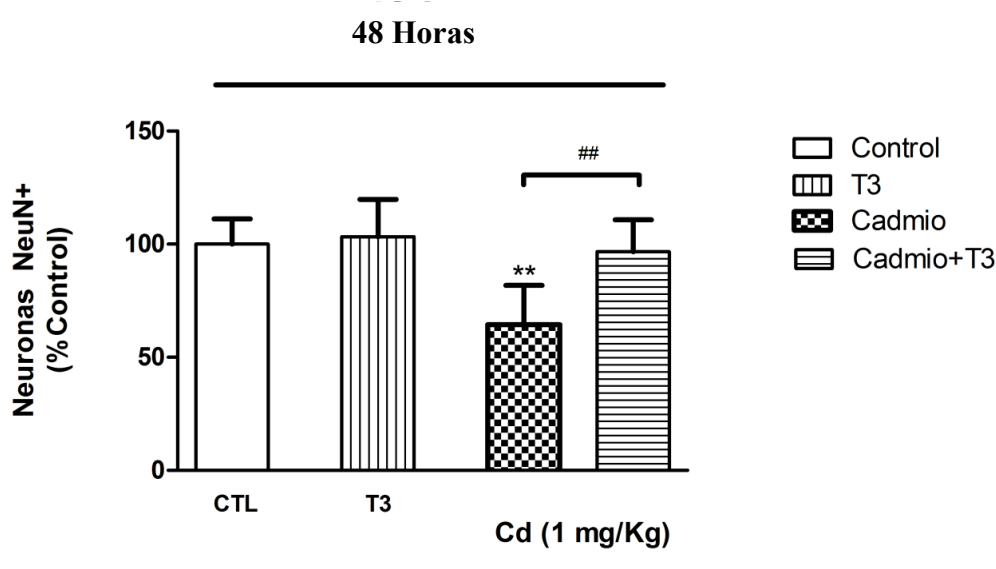


**Figura 34.** La microfotografía corresponde a un corte, inmunoteñido con anti-ChAT, del septo medial del PSB de una ratita expuesta a cadmio de forma única (IHQ x200). Las flechas señalan las neuronas colinérgicas y con características necróticas ChAT+.

## 5.2.2. Análisis de asociación

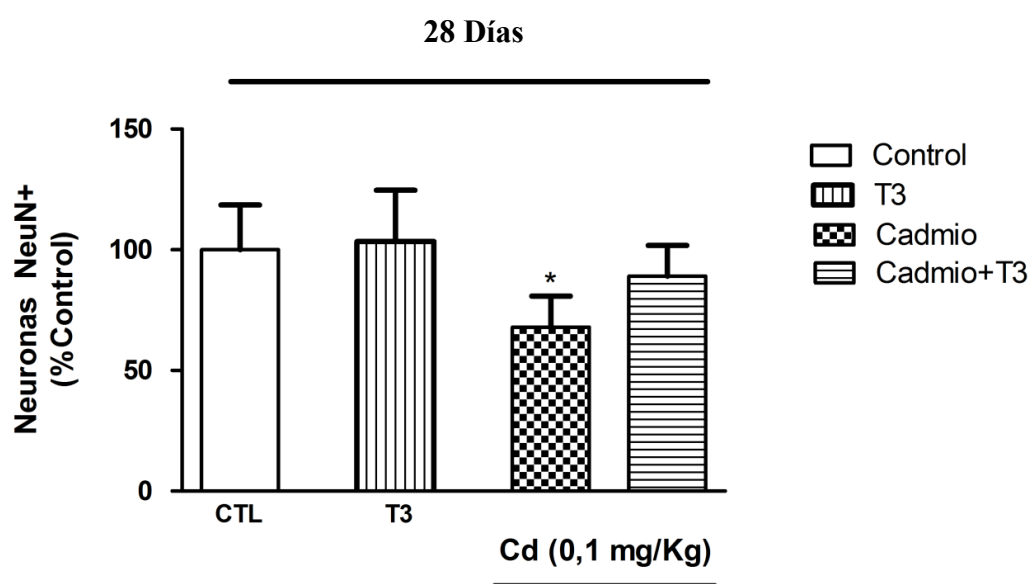
### 5.2.2.1. *Neuronas NeuN+*

Tras exposición única a cadmio (1 mg/Kg), se encontró una reducción significativa ( $p < 0,01$ ) en el porcentaje de neuronas NeuN+ del PSB en comparación con el grupo control. La disminución del porcentaje de neuronas NeuN+ fue significativamente menor en el grupo con tratamiento combinado cadmio+T3 en exposición única, en comparación con el grupo tratado solo con cadmio ( $p < 0,001$ ), pero sin llegar a alcanzar el valor del grupo control (Figura 35).



**Figura 35.** Análisis del efecto del cadmio (1mg/Kg), con o sin T3 (40  $\mu$ g/Kg), sobre las neuronas NeuN+ del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de neuronas necróticas respecto al control. \*\* $p < 0,01$  comparado con el control; ## $p < 0,01$  comparado con el tratamiento con cadmio.

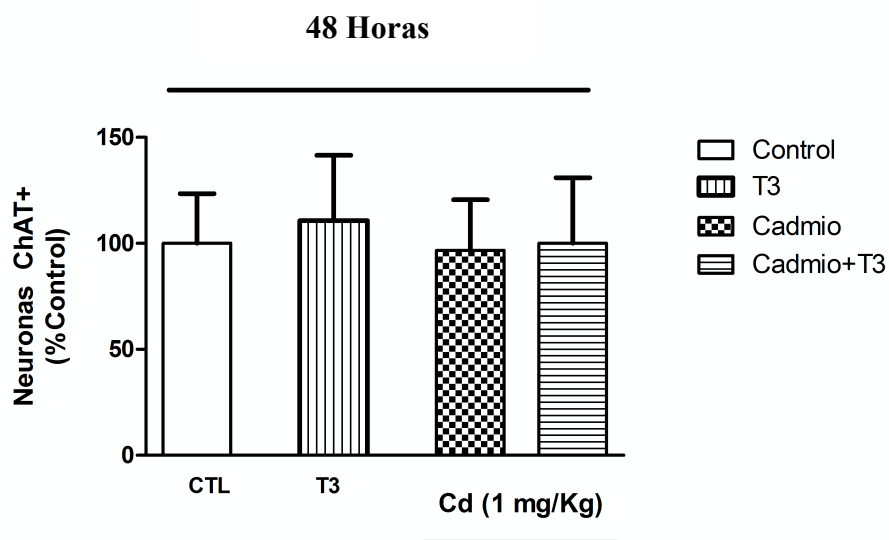
Tras 28 días de tratamiento con cadmio (0,1 mg/Kg), se encontró una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) en el porcentaje de neuronas NeuN+ del PSB en comparación con el grupo control. Esta disminución en el porcentaje de neuronas NeuN+ fue menor en el grupo con tratamiento combinado cadmio+T3 a los 28 días, en comparación con el grupo tratado solo con cadmio, pero sin llegar a ser estadísticamente significativo (Figura 36).



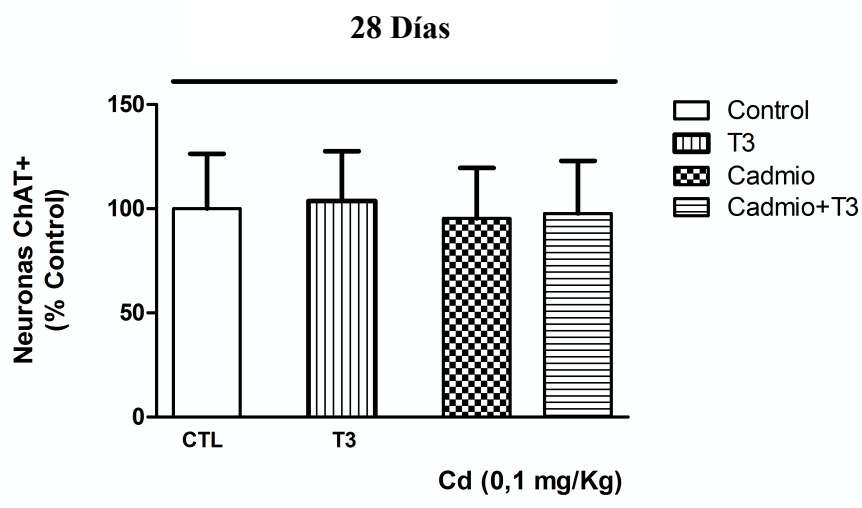
**Figura 36.** Análisis del efecto del cadmio (0,1mg/Kg), con o sin T3 (40  $\mu$ g/Kg), sobre las neuronas NeuN+ del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de neuronas necróticas respecto al control. \*  $p < 0,05$  comparado con el control.

#### 5.2.2.2. Neuronas ChAT+

La comparación del porcentaje de neuronas ChAT+ a nivel del PSB no ha permitido encontrar diferencias estadísticamente significativas en relación a la exposición a cadmio de manera única ( $p=0,82$ ) o continuada ( $p=0,88$ ) (Figuras 37 y 38).



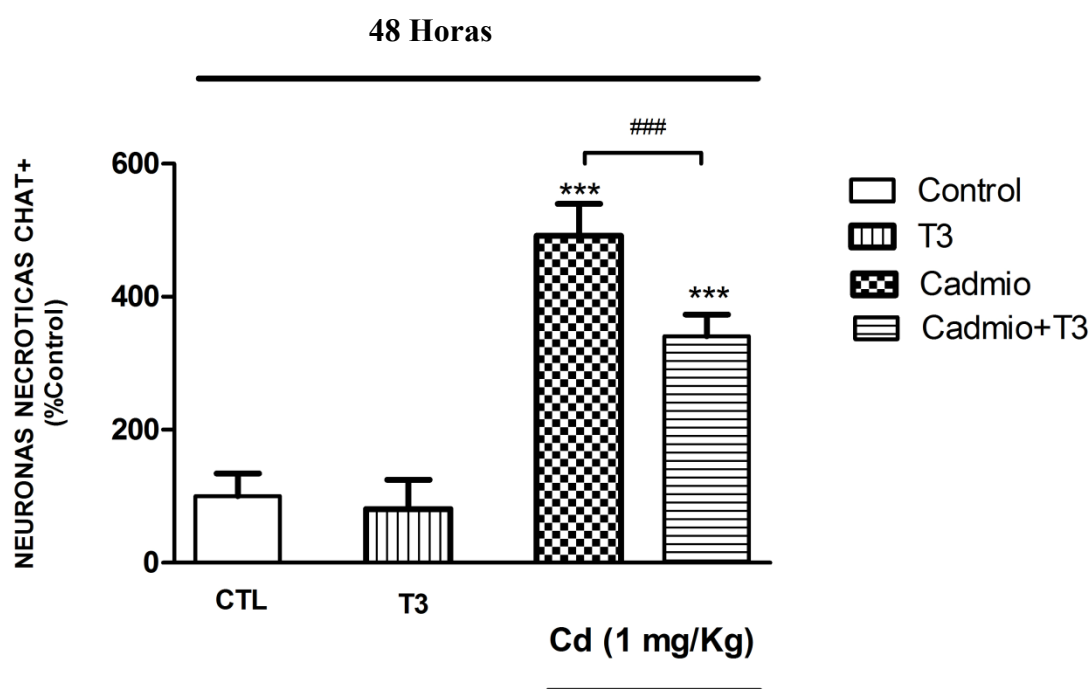
**Figura 37.** Análisis del efecto del cadmio (1 mg/Kg) con o sin T3 (40  $\mu$ g/Kg), sobre las neuronas ChAT+ del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de neuronas ChAT+ respecto al control.



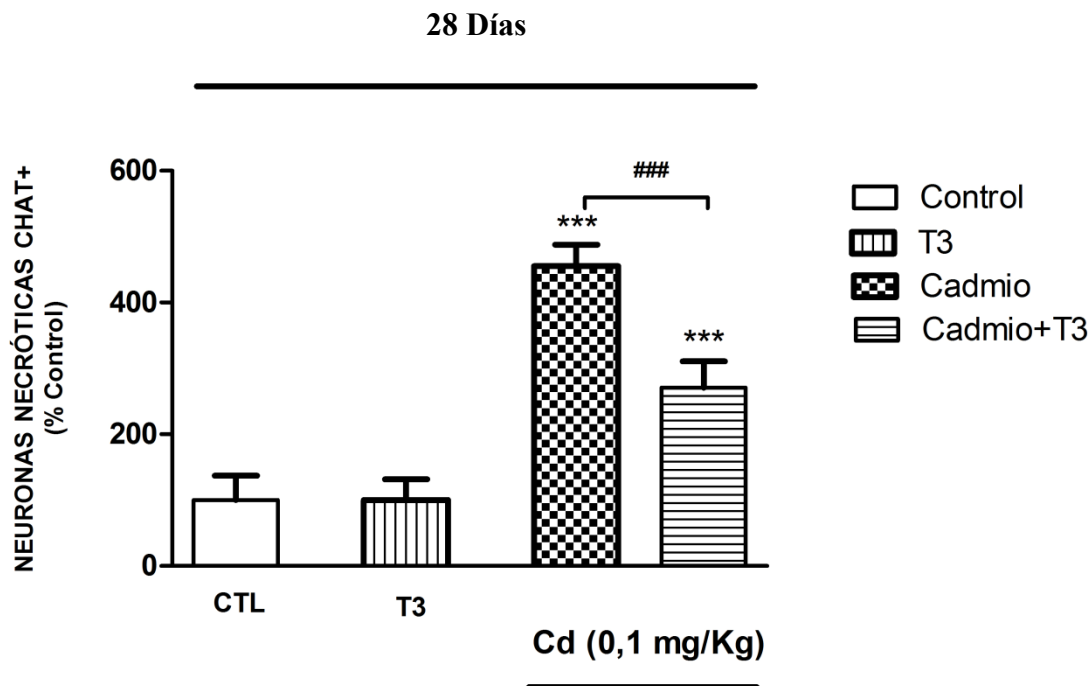
**Figura 38.** Análisis del efecto del cadmio (0,1 mg/Kg), con o sin T3 (40  $\mu$ g/Kg), sobre las neuronas ChAT+ del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de neuronas ChAT+ respecto al control.

### 5.2.2.3. Neuronas ChAT+ necróticas

Tras exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en el porcentaje de neuronas ChAT+ necróticas del PSB en comparación con el grupo control. El aumento del porcentaje de neuronas ChAT+ necróticas fue significativamente menor en el grupo con tratamiento combinado cadmio+T3, tanto en exposición única como continuada, en comparación con el grupo tratado solo con cadmio ( $p < 0,001$ ), pero sin llegar a alcanzar el valor del grupo control (Figuras 39 y 40).



**Figura 39.** Análisis del efecto del cadmio (1 mg/Kg), con o sin T3 (40  $\mu$ g/Kg), sobre las neuronas ChAT+ necróticas del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de neuronas ChAT+ necróticas respecto al control. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el control; ###  $p < 0,001$  comparado con el tratamiento con cadmio.



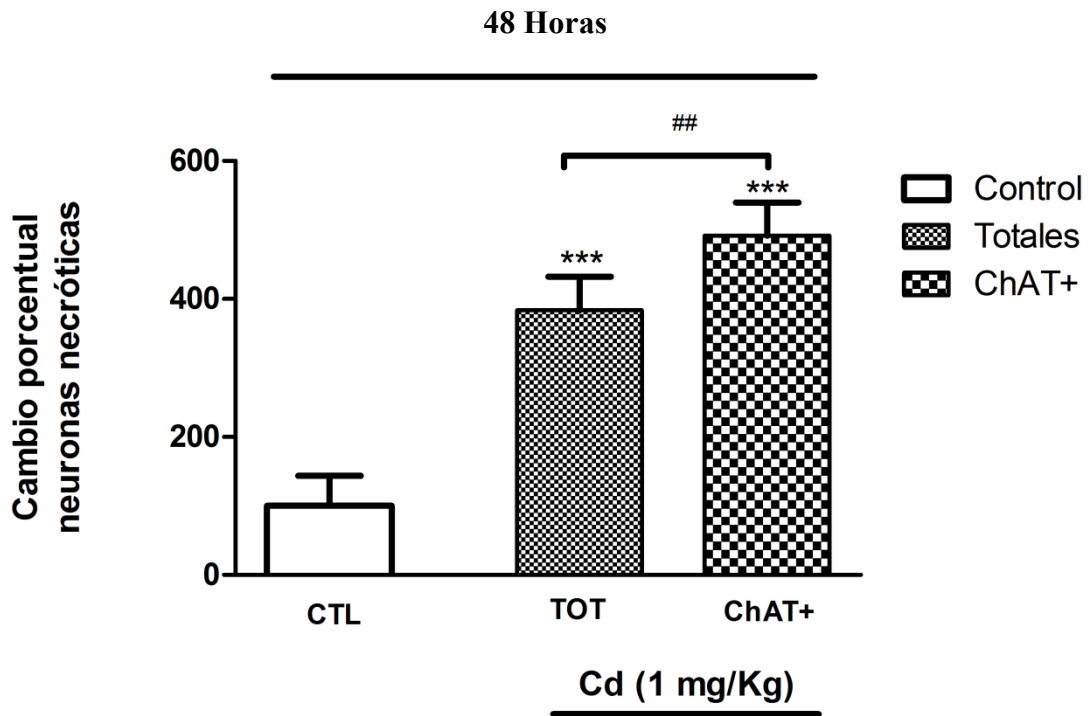
**Figura 40.** Análisis del efecto del cadmio (0,1 mg/Kg), con o sin T3 (40 µg/Kg), sobre las neuronas ChAT+ necróticas del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media ± DE del porcentaje de neuronas ChAT+ necróticas respecto al control. \*\*\*p<0,001 comparado con el control; ###p<0,001 comparado con el tratamiento con cadmio.

#### 5.2.2.4. Neuronas ChAT+ necróticas y neuronas necróticas totales

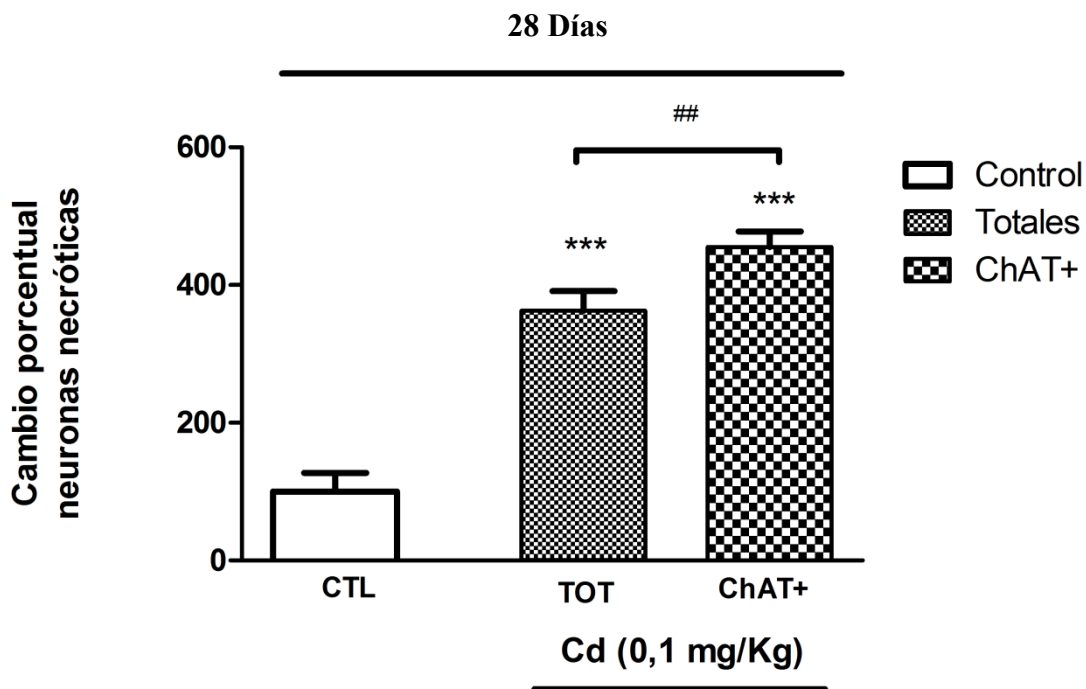
Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en el porcentaje de neuronas necróticas totales y neuronas ChAT+ necróticas del PSB en comparación con el grupo control.

En el grupo expuesto a cadmio de manera única, el aumento del porcentaje de neuronas ChAT+ necróticas fue significativamente mayor ( $p < 0,01$ ), comparado con el porcentaje de neuronas necróticas totales.

En el grupo expuesto de manera continuada, a pesar de observarse un aumento en el porcentaje de neuronas ChAT+ necróticas, éste no fue significativo al compararse con el porcentaje de neuronas necróticas totales (Figuras 41 y 42).



**Figura 41.** Análisis del efecto del cadmio (1 mg/Kg), sobre las neuronas necróticas totales y neuronas ChAT+ necróticas del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media ± DE del porcentaje de neuronas necróticas totales y neuronas ChAT+ necróticas respecto al control. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control; ## $p < 0,01$  comparado con las neuronas necróticas totales.



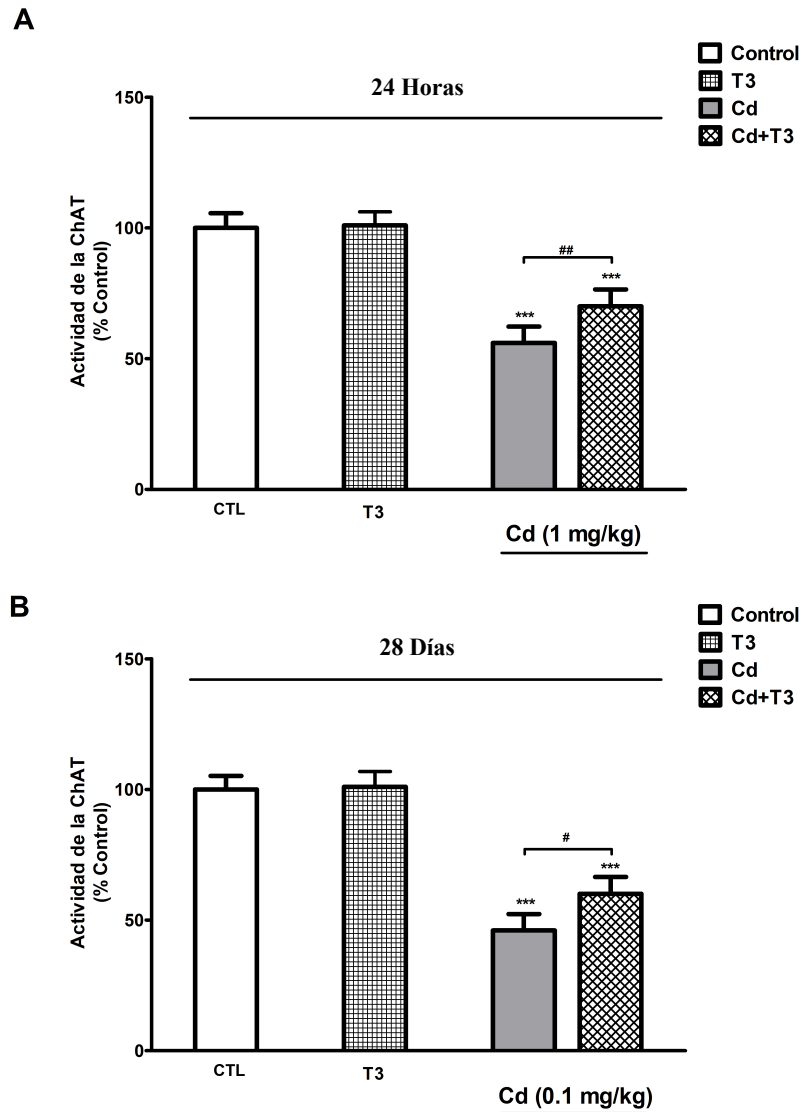
**Figura 42.** Análisis del efecto del cadmio (0,1 mg/Kg), sobre las neuronas necróticas totales y neuronas ChAT+ necróticas del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de neuronas necróticas totales y neuronas ChAT+ necróticas respecto al control. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control; ## $p < 0,01$  comparado con las neuronas necróticas totales.

### 5.3. Estudio de mecanismos moleculares de toxicidad a nivel del prosencéfalo basal en ratas expuestas de manera única o continuada a cadmio. Implicación de las hormonas tiroideas sobre dichas alteraciones.

#### 5.3.1. Actividad de la enzima ChAT

Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) en la concentración de la enzima ChAT del PSB, en comparación con el grupo control. Esta disminución en la concentración enzimática fue significativamente menor ( $p < 0,001$  en el grupo expuesto

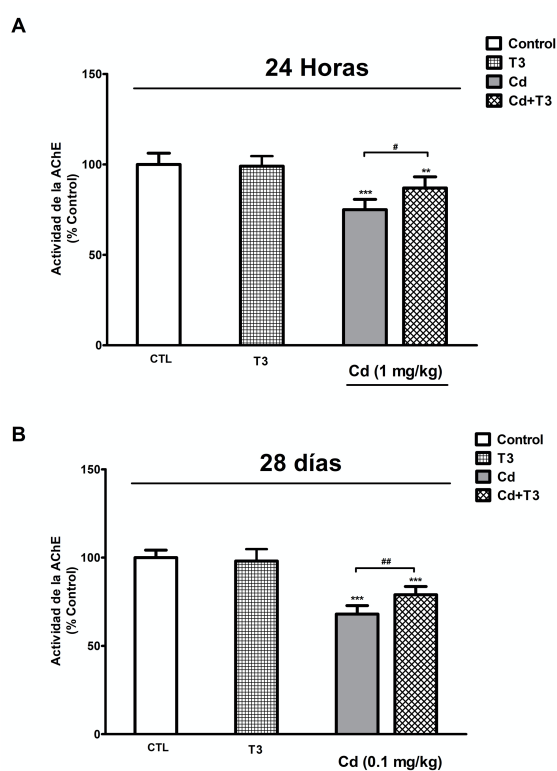
de manera única y  $p < 0,05$  en el grupo expuesto de manera continuada) en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3, comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 43).



**Figura 43.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 ( $40 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ), sobre la actividad de la enzima ChAT a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de enzima ChAT respecto al control. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control; ## $p < 0,01$  y # $p < 0,05$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.3.2. Actividad de la enzima AChE

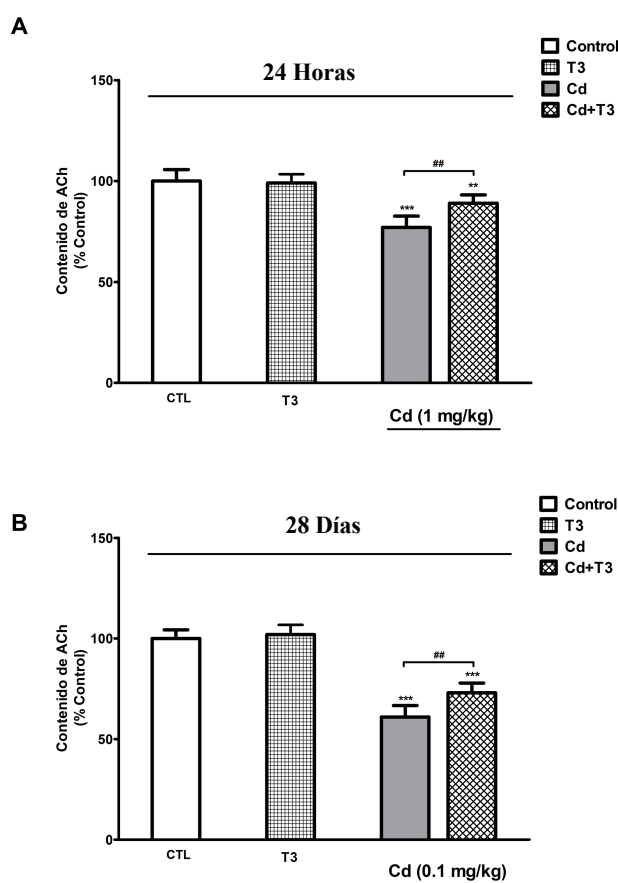
Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) en la concentración de la enzima AChE del PSB, en comparación con el grupo control. Esta disminución en la concentración enzimática fue significativamente menor ( $p < 0,05$  en el grupo expuesto de manera única y  $p < 0,01$  en el grupo expuesto de manera continuada) en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3, comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 44).



**Figura 44.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu\text{g/Kg}$ ), sobre la actividad de la enzima AChE a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de enzima AChE respecto al control. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control; # $p < 0,05$  y ### $p < 0,01$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.3.3. Concentración neuronal de ACh

Tras exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) en el contenido de ACh a nivel del PSB, en comparación con el grupo control. Esta disminución en la concentración enzimática fue significativamente menor ( $p < 0,001$ ) en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3, comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 45).



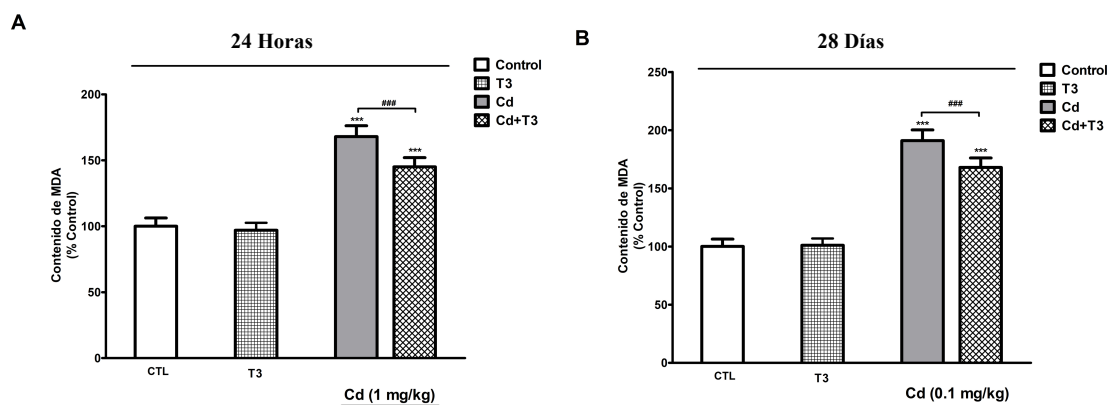
**Figura 45.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu\text{g/Kg}$ ), sobre la concentración de ACh a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de concentración de ACh respecto al control. \*\*\* $p < 0,001$  y \*\* $p < 0,01$  comparado con el control; ## $p < 0,01$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.3.4. Inducción neuronal de estrés oxidativo

Para determinar la inducción neuronal de estrés oxidativo tras la exposición a cadmio, se midió la concentración de MDA (indicador de la peroxidación de lípidos) y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (indicador de la inducción de radicales libres).

#### 5.3.4.1. *Concentración tisular de MDA*

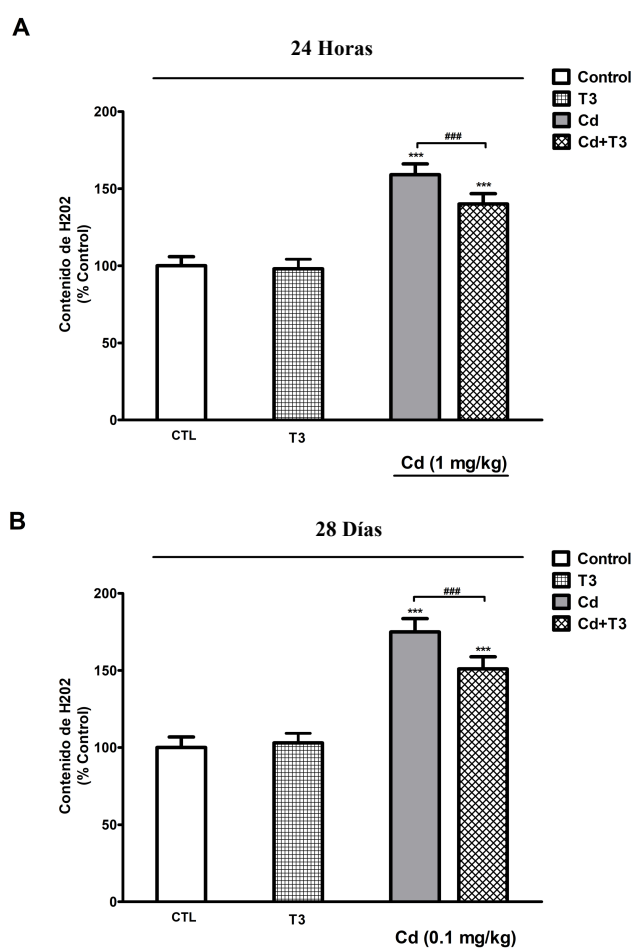
Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) en la concentración de MDA del PSB, en comparación con el grupo control. Esta disminución en la concentración enzimática fue significativamente menor ( $p < 0,001$ ) en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3, comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 46).



**Figura 46.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu\text{g/Kg}$ ), sobre la concentración de MDA a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de MDA respecto al control. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el control; ###  $p < 0,001$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.3.4.2. Concentración tisular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del PSB, en comparación con el grupo control. Esta disminución en la concentración enzimática fue significativamente menor ( $p < 0,001$ ) en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3, comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 47).

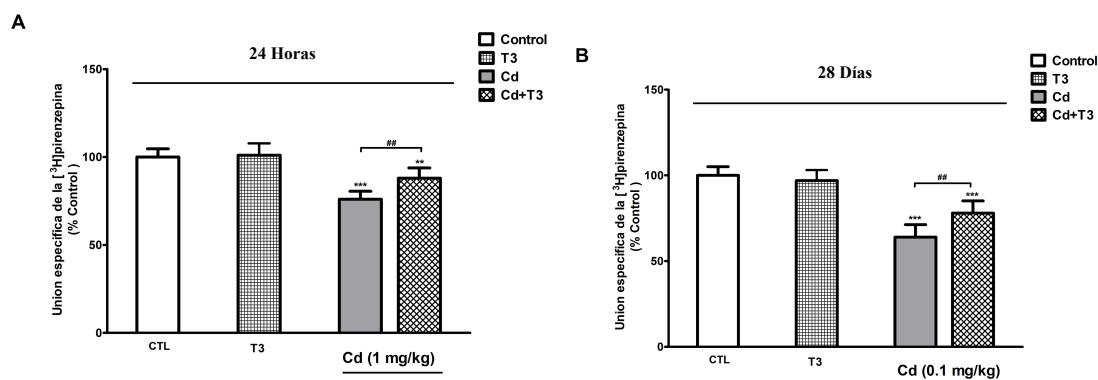


**Figura 47.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu$ g/Kg), sobre la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto al control. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el control; ###  $p < 0,001$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.3.5. Bloqueo neuronal de los receptores muscarínicos M1

La afinidad del cadmio por los receptores muscarínicos M1 se estudió, según se describe en el apartado 4.7.2.4., mediante la determinación del desplazamiento de la unión de [<sup>3</sup>H] pirenzepina a los RM1 de las membranas neuronales.

Tras exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) en la concentración de [<sup>3</sup>H] pirenzepina a nivel del PSB, en comparación con el grupo control. Esta disminución en la concentración de [<sup>3</sup>H] pirenzepina fue significativamente menor ( $p < 0,001$ ) en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3, comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 48).

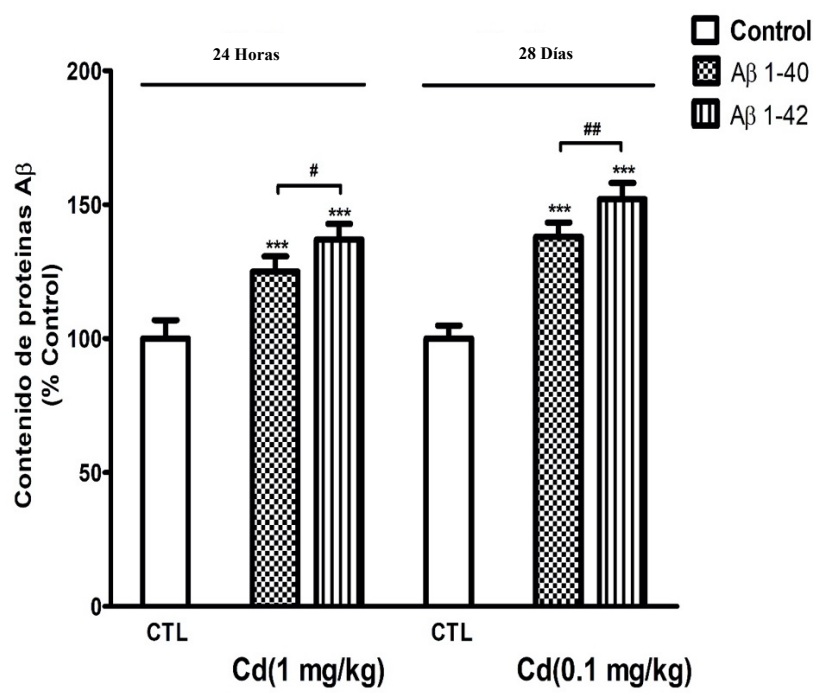


**Figura 48.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu$ g/Kg), sobre la concentración de [<sup>3</sup>H] pirenzepina a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de [<sup>3</sup>H] pirenzepina respecto al control. \*\*\*  $p < 0,001$  y \*\*  $p < 0,01$  comparado con el control; ##  $p < 0,01$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.3.6. Contenido neuronal de proteínas beta-amiloides

#### 5.3.6.1. *Proteínas beta-amiloides*

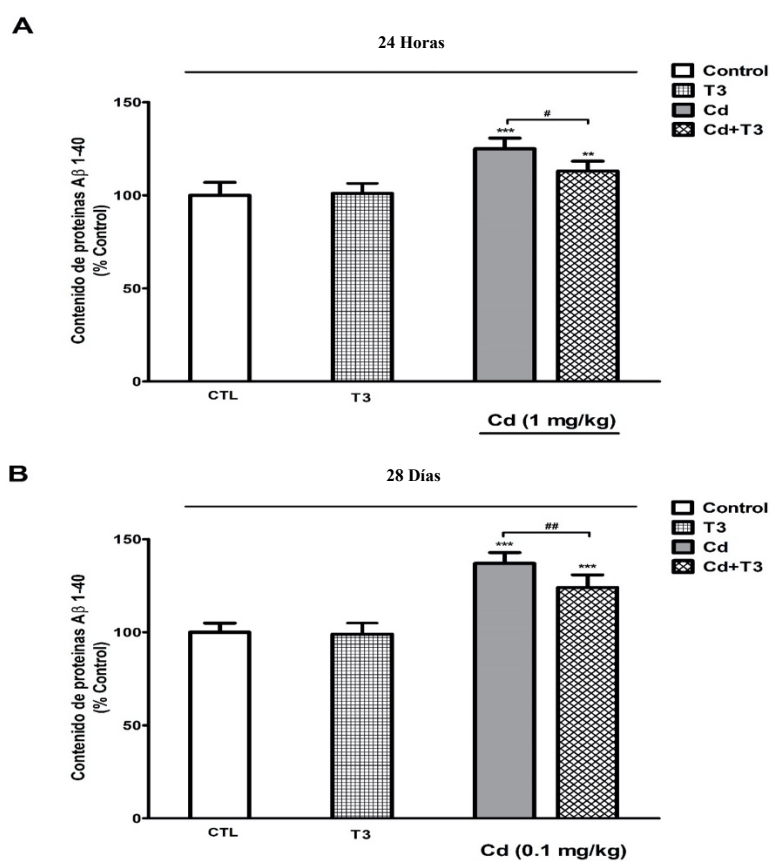
Tras exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en la concentración de proteínas beta-amiloides a nivel del PSB, en comparación con el grupo control. Este aumento en la concentración de proteínas beta-amiloides fue significativamente menor en las proteínas A $\beta$  1-40 frente a las proteínas A $\beta$  1-42, tanto en el grupo expuesto de manera única ( $p < 0,05$ ), como de manera continuada ( $p < 0,01$ ) (Figura 49).



**Figura 49.** Análisis del efecto del cadmio (1mg/Kg y 0,1mg/Kg), con o sin T3 (40  $\mu$ g/Kg), sobre la concentración de proteínas beta-amiloides a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de proteínas beta-amiloides respecto al control. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control; ## $p < 0,01$  y # $p < 0,05$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.3.6.2. Proteína A $\beta$ 1-40 (KMB3481)

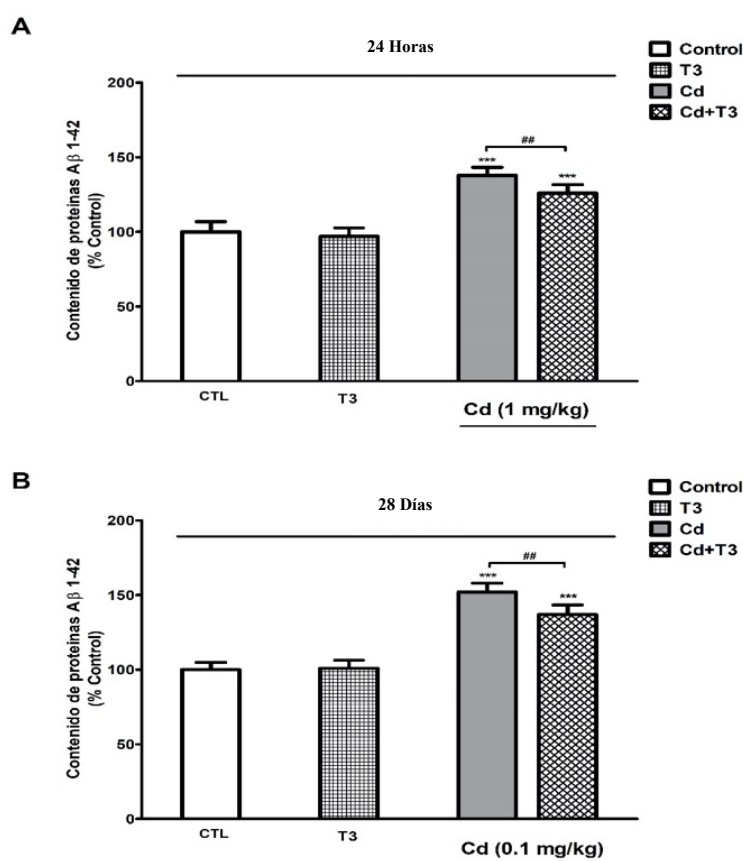
Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en la concentración de la proteína A $\beta$  1-40 a nivel del PSB, en comparación con el grupo control. Este aumento en la concentración de proteínas beta-amiloides fue significativamente menor, tanto en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3 de manera única ( $p < 0,05$ ), como de manera continuada ( $p < 0,01$ ), comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 50).



**Figura 50.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu$ g/Kg), sobre la concentración de la proteína A $\beta$  1-40 a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de la proteína A $\beta$  1-40 respecto al control. \*\*\*  $p < 0,001$  y \*\*  $p < 0,01$  comparado con el control; ##  $p < 0,01$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.3.6.3. Proteína A $\beta$ 1-42 (KMB3441)

Tras exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en la concentración de la proteína A $\beta$  1-42 a nivel del PSB, en comparación con el grupo control. Este aumento en la concentración de proteínas beta-amiloides fue significativamente menor ( $p < 0,01$ ) en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3, comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 51).

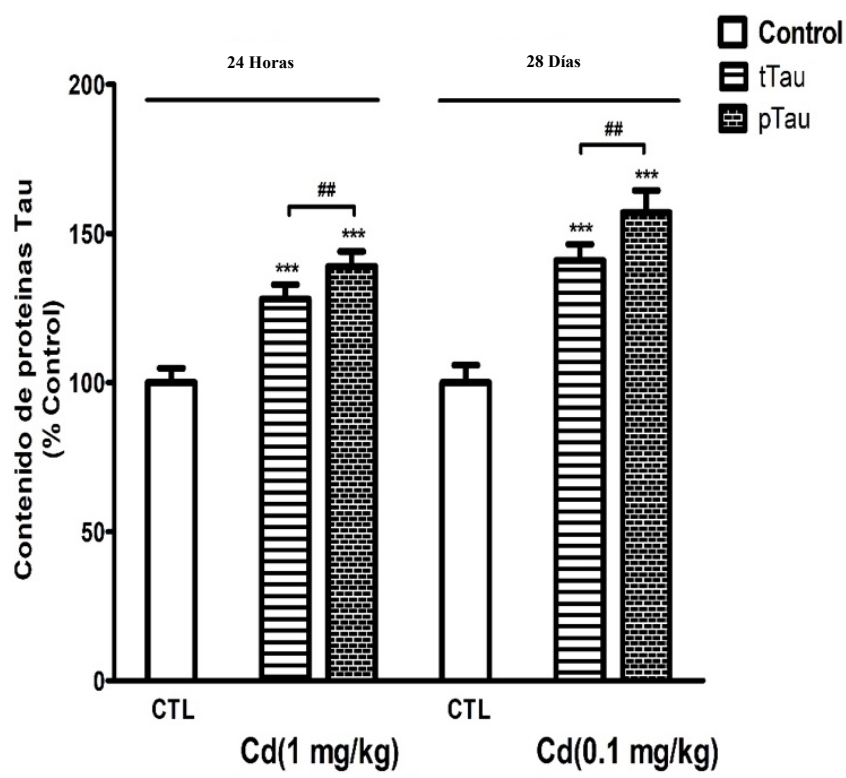


**Figura 51.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu$ g/Kg), sobre la concentración de la proteína A $\beta$  1-42 a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de la proteína A $\beta$  1-42 respecto al control. \*\*\*  $p < 0,001$  y \*\*  $p < 0,01$  comparado con el control; ##  $p < 0,01$  comparado con el tratamiento con cadmio

### 5.3.7. Contenido de proteínas Tau

#### 5.3.7.1. Proteínas Tau

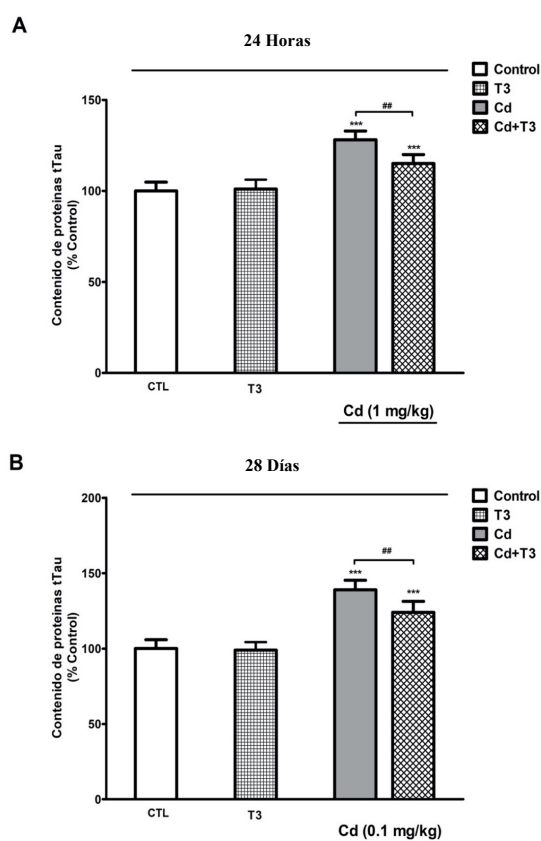
Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en la concentración de proteínas Tau a nivel del PSB, en comparación con el grupo control. Este aumento en la concentración de proteínas beta-amiloides fue significativamente menor en las proteínas  $A\beta$  1-40 frente a las proteínas  $A\beta$  1-42, tanto en el grupo expuesto de manera única ( $p < 0,01$ ), como de manera continuada ( $p < 0,01$ ) (Figura 52).



**Figura 52.** Análisis del efecto del cadmio (1mg/Kg y 0,1mg/Kg), con o sin T3 (40  $\mu$ g/Kg), sobre la concentración de proteínas tTau y pTau a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de proteínas tTau respecto al control. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el control; ##  $p < 0,01$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.3.7.2. Proteínas Tau totales (tTau)

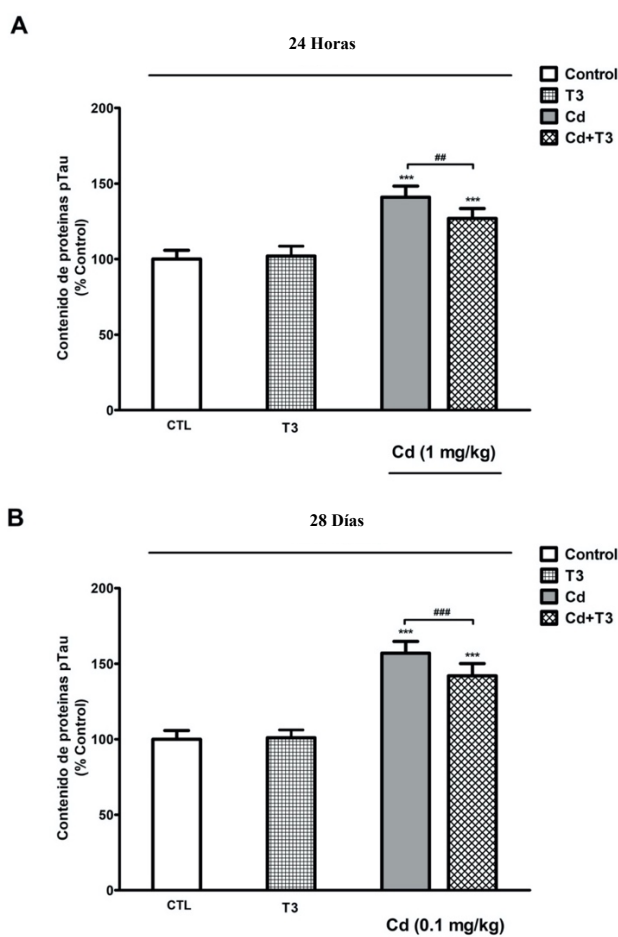
Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en la concentración de proteínas tTau a nivel del PSB, en comparación con el grupo control. Este aumento en la concentración de proteínas tTau fue significativamente menor ( $p < 0,01$ ) en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3, comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 53).



**Figura 53.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu\text{g/Kg}$ ), sobre la concentración de proteínas tTAU a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de proteínas tTAU respecto al control. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el control; ##  $p < 0,01$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.3.7.3. Proteínas Tau fosforiladas (pTau)

Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en la concentración de proteínas pTau a nivel del PSB, en comparación con el grupo control. Este aumento en la concentración de proteínas pTau fue significativamente menor, tanto en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3 de forma única ( $p < 0,01$ ) como de forma continuada ( $p < 0,001$ ), comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 54).

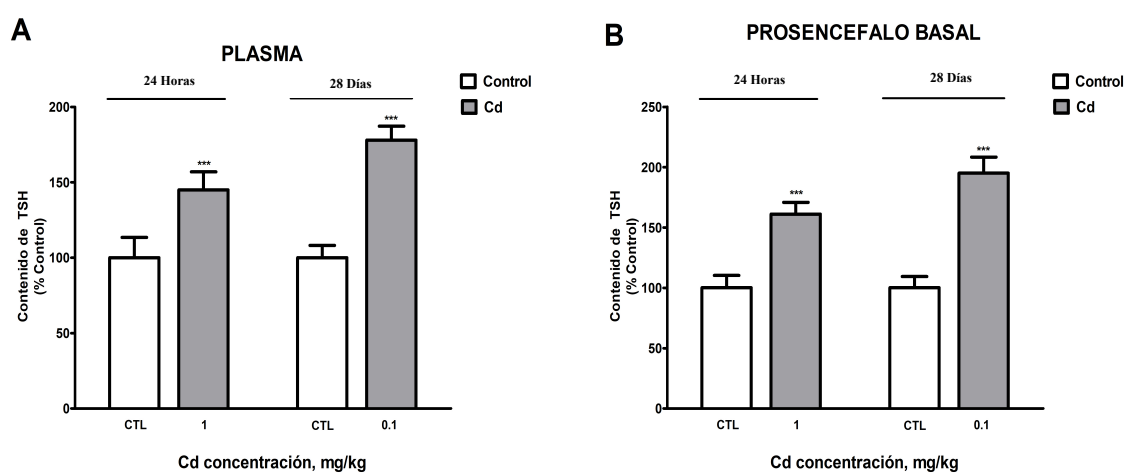


**Figura 54.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), sobre la concentración de proteínas pTAU a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de proteínas pTAU respecto al control. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el control; ###  $p < 0,001$  y ##  $p < 0,01$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.3.8. Contenido de hormonas tiroideas a nivel plasmático y del PSB

#### 5.3.8.1. TSH

Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en la concentración de concentración de hormona TSH a nivel plasmático y del PSB, en comparación con el grupo control (Figura 55).

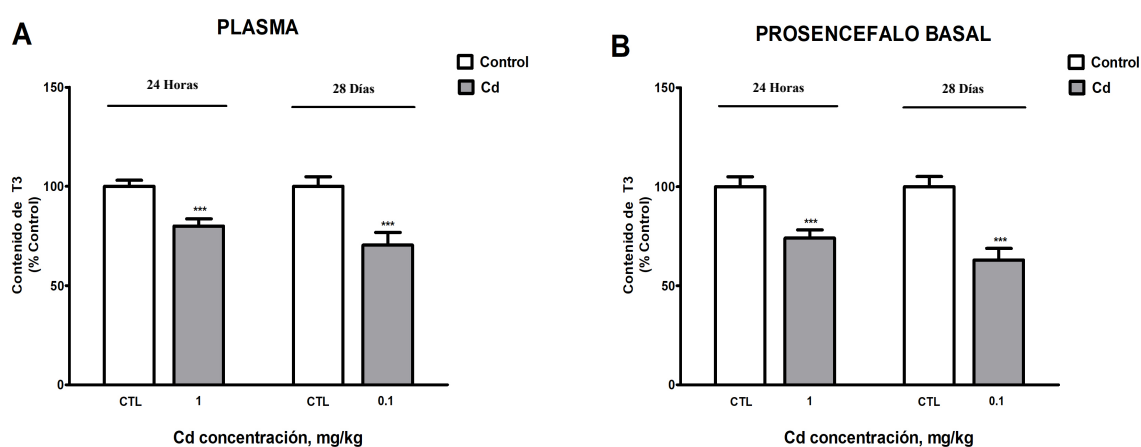


**Figura 55.** Análisis del efecto del cadmio (1mg/Kg y 0,1mg/Kg) sobre la concentración de hormona TSH a nivel plasmático (A) y del PSB (B) en ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de hormona T3 respecto al control. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el control.

### 5.3.8.2. *Hormona T3*

Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en la concentración de hormona T3 a nivel plasmático y del PSB, en comparación con el grupo control (Figura 56).

Al comparar el porcentaje de disminución de hormona T3 a nivel plasmático y del PSB, se observa que esta disminución de la concentración es ligeramente mayor a nivel plasmático, comparado con el PSB.

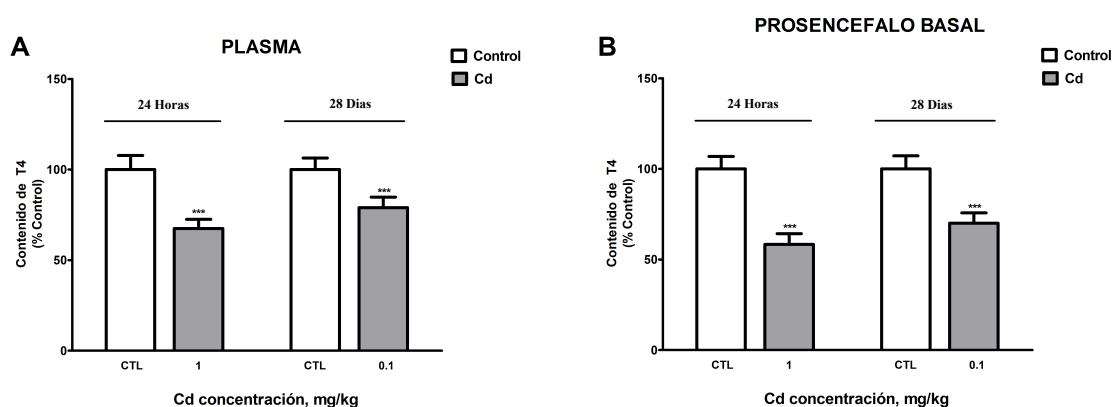


**Figura 56.** Análisis del efecto del cadmio (1mg/Kg y 0,1mg/Kg) sobre la concentración de hormona T3 a nivel plasmático (A) y del PSB (B) en ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de hormona T3 respecto al control. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el control.

### 5.3.8.3. Hormona T4

Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en la concentración de hormona T4 a nivel plasmático y del PSB, en comparación con el grupo control (Figura 57).

Al comparar el porcentaje de disminución de hormona T4 a nivel plasmático y del PSB, se observa, al igual que con la hormona T3, que la disminución es ligeramente mayor a nivel plasmático en comparación con el PSB.

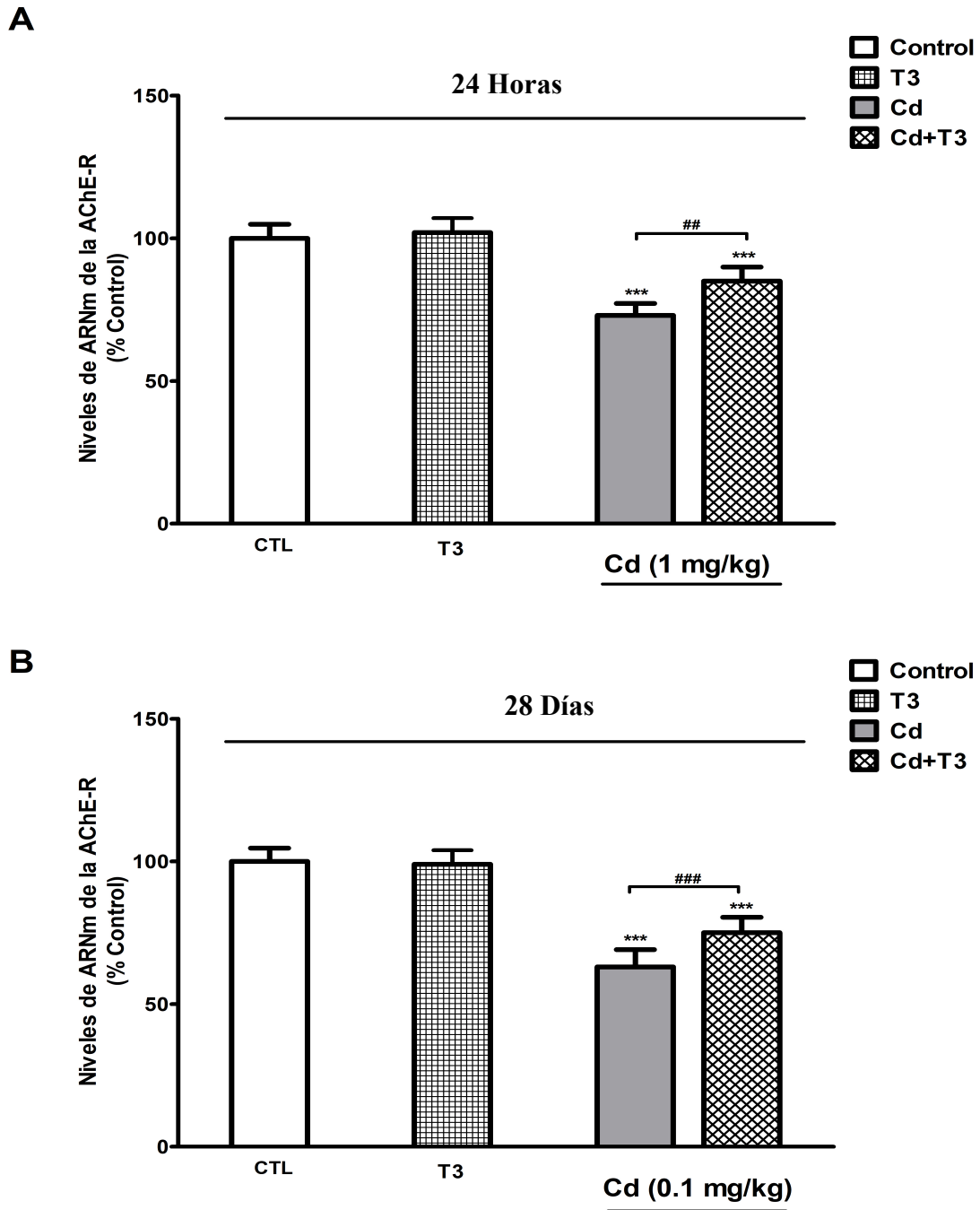


**Figura 57.** Análisis del efecto del cadmio (1mg/Kg y 0,1mg/Kg) sobre la concentración de hormona T4 a nivel plasmático (A) y del PSB (B) en ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de hormona T3 respecto al control. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el control.

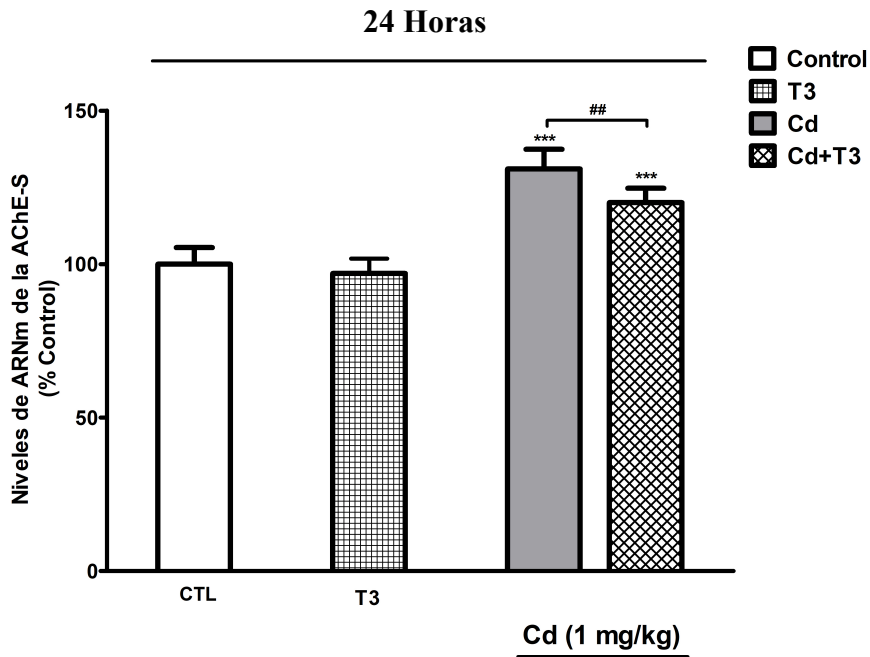
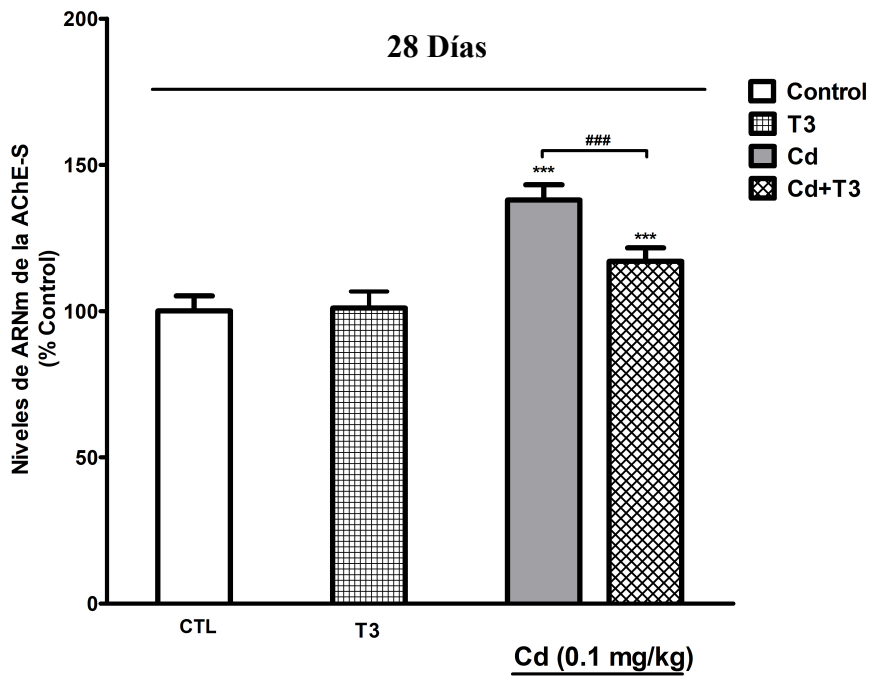
#### **5.4. Estudio de cambios en la expresión génica a nivel del prosencéfalo basal en ratas expuestas de manera única o continuada a cadmio. Implicación de las hormonas tiroideas sobre dichas alteraciones.**

##### **5.4.1. Ruta colinérgica**

Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), no se observó una alteración en la expresión de HAcHt, VAChT y ChAT (datos no mostrados). Sin embargo, si se encontró un incremento significativo ( $p < 0,001$ ) en la expresión génica de la variante S (Figura 50) y una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) de la variante R (Figura 51). Este aumento en la expresión de la variante S y la disminución de la expresión de la variante R fue significativamente menor, tanto en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3 de forma única ( $p < 0,01$ ) como de forma continuada ( $p < 0,001$ ), comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figuras 58 y 59).



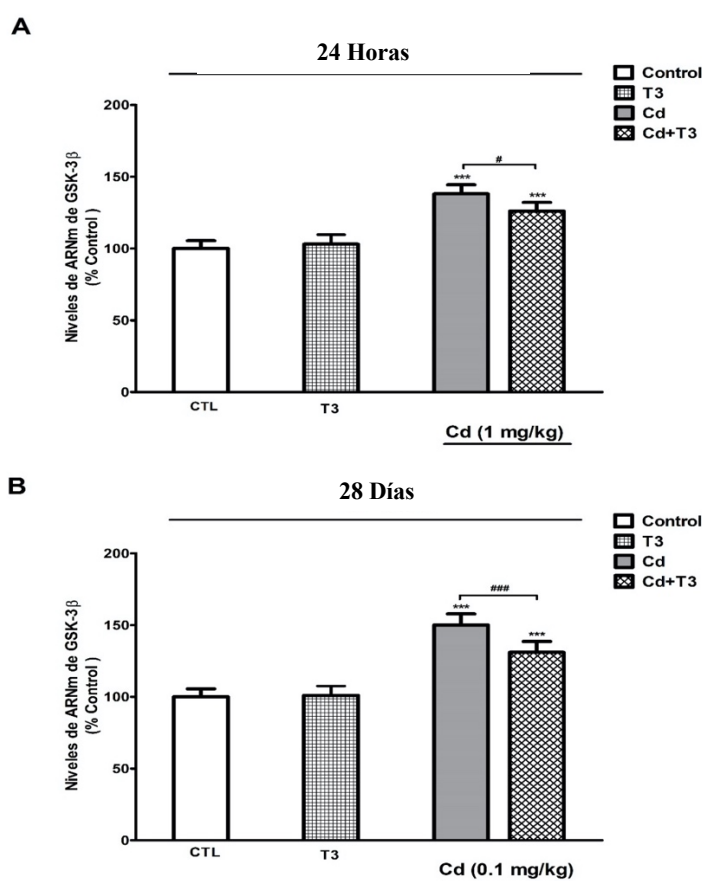
**Figura 58.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), sobre la expresión de la AChE-R a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control; ### $p < 0,001$  y ## $p < 0,01$  comparado con el tratamiento con cadmio.

**A****B**

**Figura 59.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu\text{g/Kg}$ ), sobre la expresión de la AChE-S a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el control; ###  $p < 0,001$  y ##  $p < 0,01$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.4.2. GSK-3 $\beta$

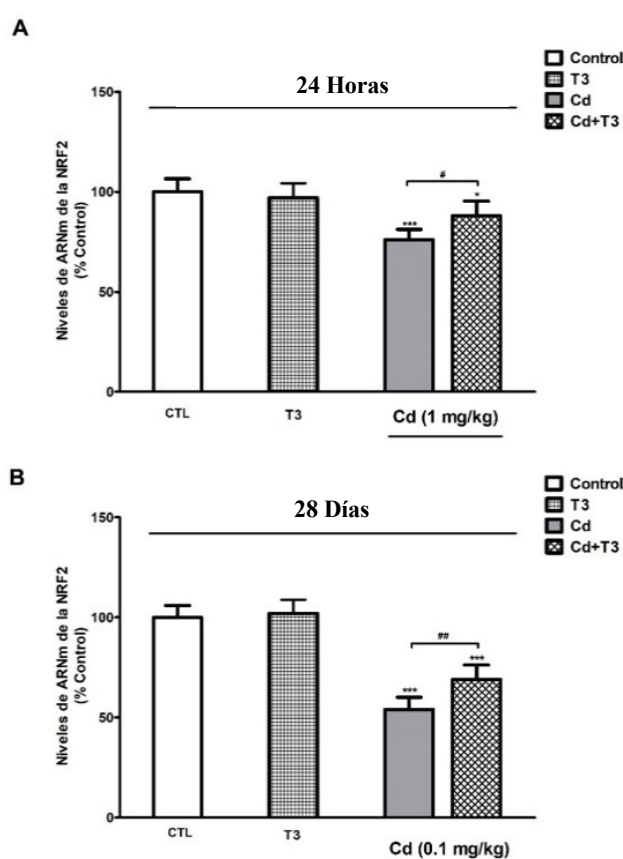
Tras exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró un incremento significativo ( $p < 0,001$ ) en la expresión de GSK-3 $\beta$ . Este aumento en la expresión fue significativamente menor, tanto en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3 de forma única ( $p < 0,05$ ) como de forma continuada ( $p < 0,001$ ), comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 60).



**Figura 60.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu$ g/Kg), sobre la expresión de GSK-3 $\beta$  a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de expresión de GSK-3 $\beta$  respecto al control. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control; ### $p < 0,001$  y # $p < 0,05$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.4.3. Factor de transcripción NRF2

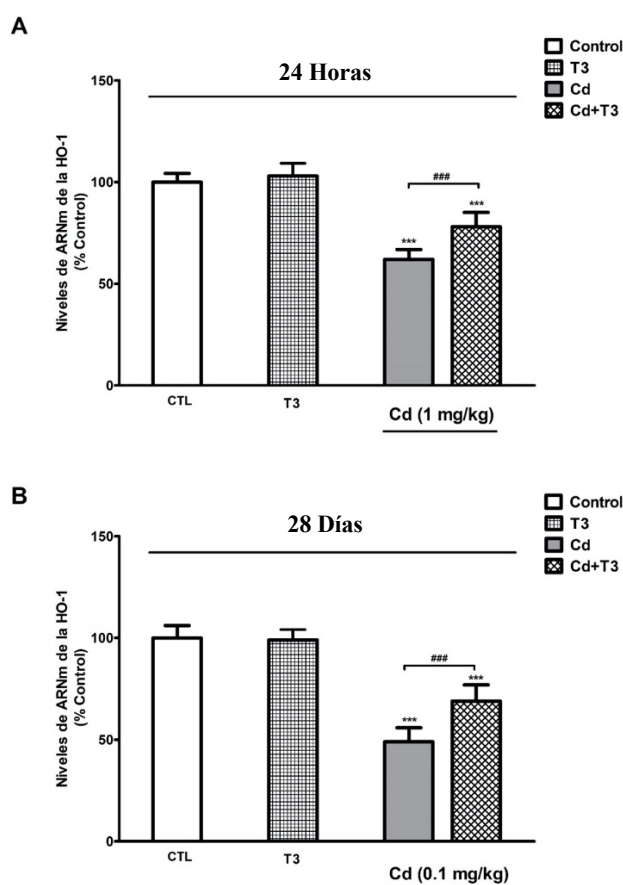
Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en la expresión de NRF2. Esta disminución en la expresión fue significativamente menor, tanto en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3 de forma única ( $p < 0,05$ ) como de forma continuada ( $p < 0,001$ ), comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 61).



**Figura 61.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu\text{g/Kg}$ ), sobre la expresión de NRF2 a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de expresión de NRF2 respecto al control. \*\*\* $p < 0,001$  y \* $p < 0,05$  comparado con el control; ### $p < 0,01$  y # $p < 0,05$  comparado con el tratamiento con cadmio.

#### 5.4.4. Enzima HO-1

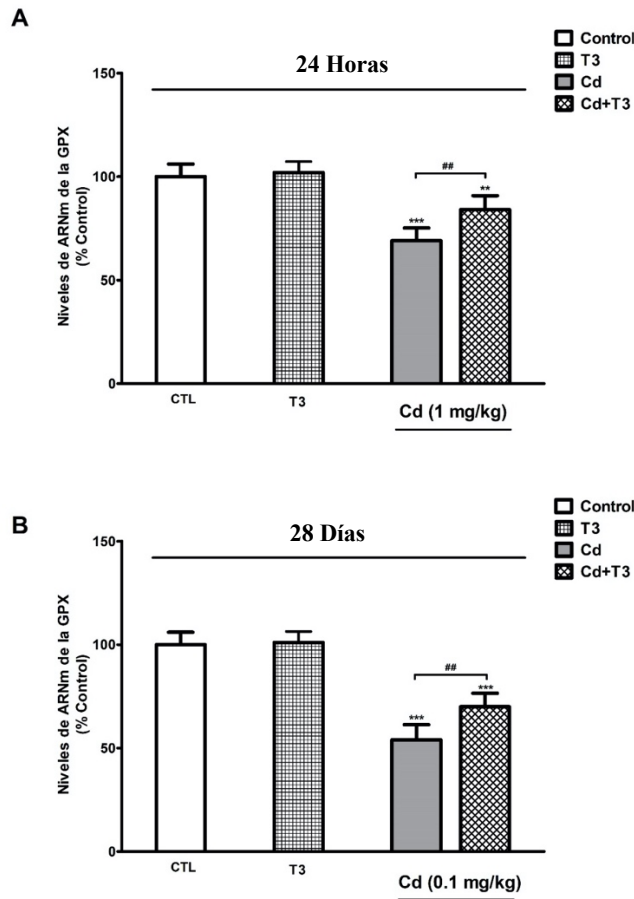
Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en la expresión de HO-1. Esta disminución en la expresión fue significativamente menor, tanto en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3 de forma única ( $p < 0,001$ ) como de forma continuada ( $p < 0,001$ ), comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 62).



**Figura 62.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu\text{g/Kg}$ ), sobre la expresión de HO-1 a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de expresión de HO-1 respecto al control. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control; ##### $p < 0,001$  comparado con el tratamiento con cadmio.

#### 5.4.5. Enzima GPx

Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en la expresión de GPx. Esta disminución en la expresión fue significativamente menor ( $p < 0,01$ ), tanto en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3 de forma única como de forma continuada, comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 63).



**Figura 63.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu\text{g/Kg}$ ), sobre la expresión de GPx a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de expresión de GPx respecto al control. \*\*\*  $p < 0,001$  y \*\*  $p < 0,01$  comparado con el control; ##  $p < 0,01$  comparado con el tratamiento con cadmio.

#### 5.4.6. Receptores muscarínicos

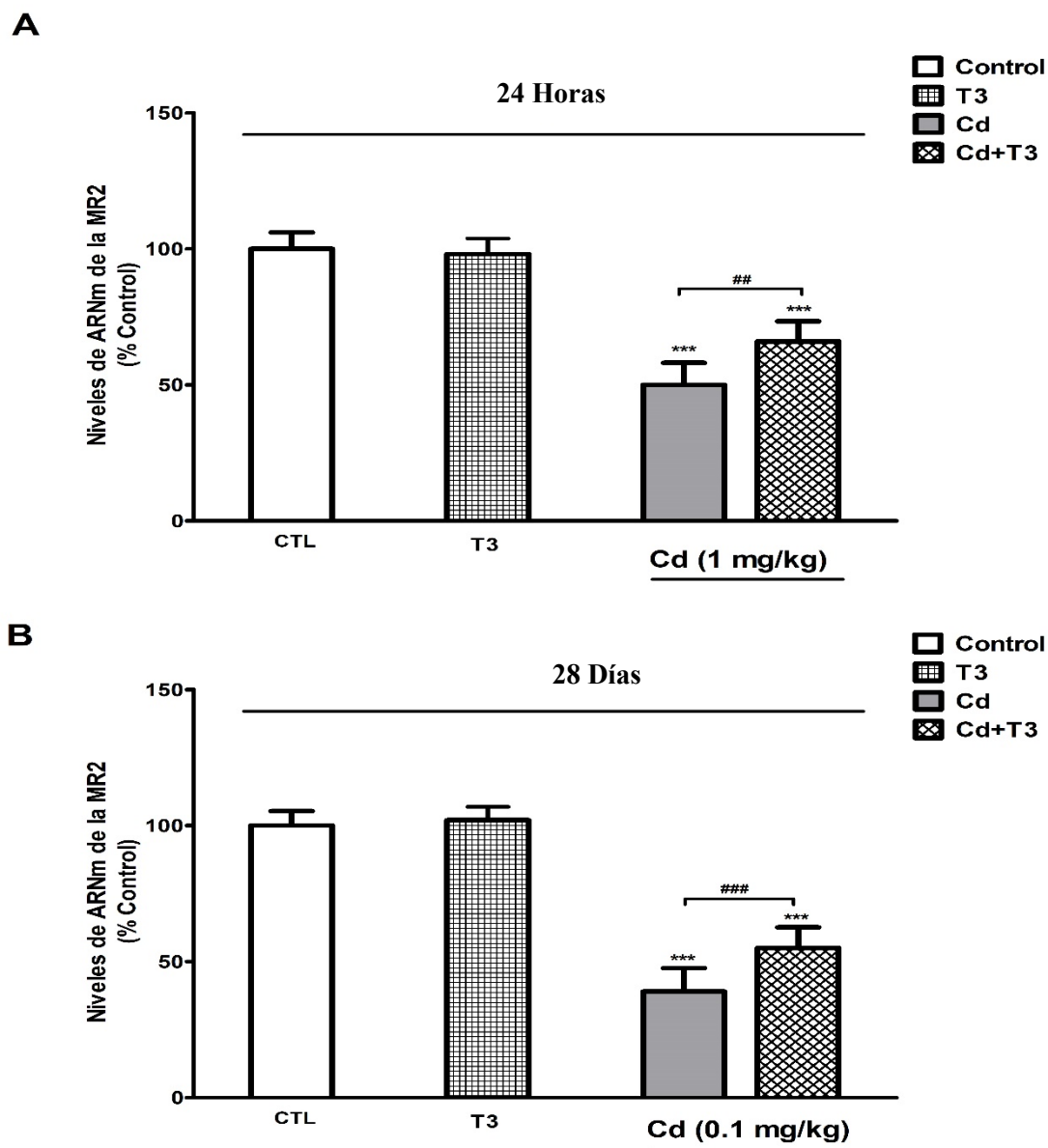
Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), no se observó una alteración en la expresión de los receptores muscarínicos M1 y M5 (datos no mostrados).

##### 5.4.6.1. *Receptor muscarínico M2 (RM2)*

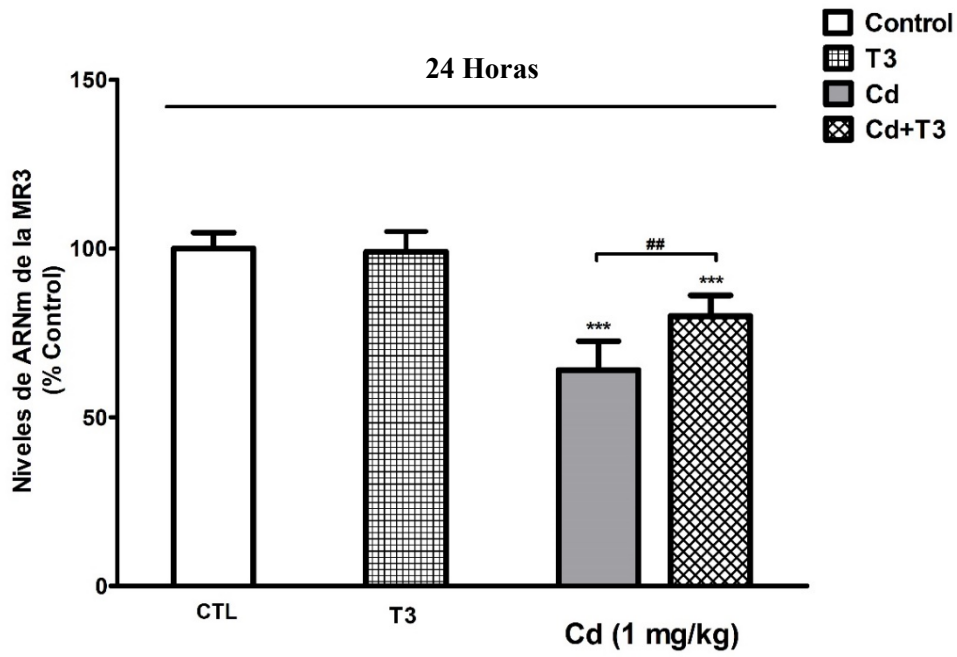
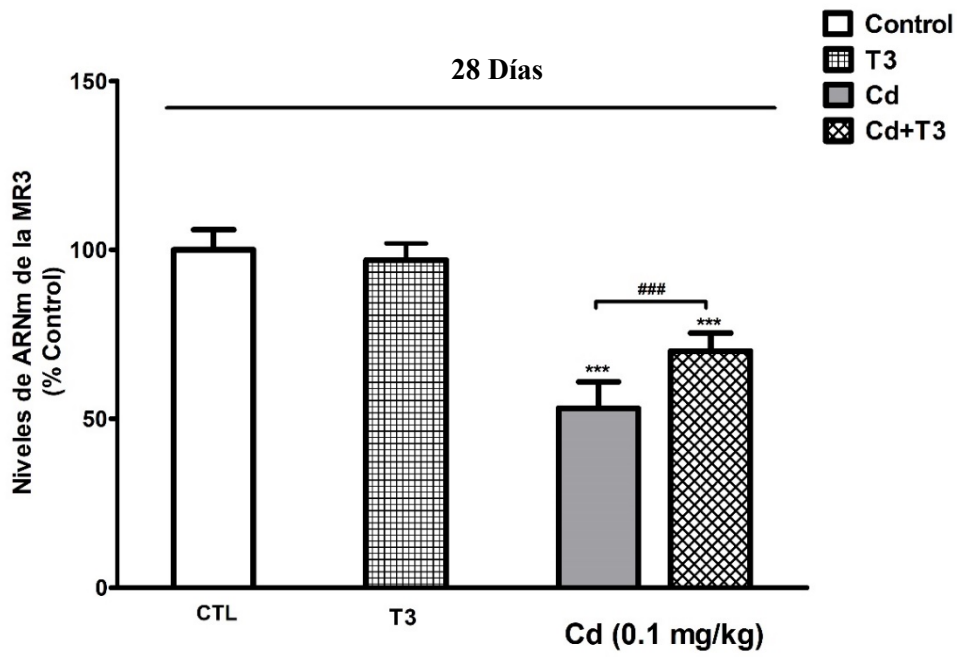
Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en la expresión de RM1. Esta disminución en la expresión fue significativamente menor, tanto en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3 de forma única ( $p < 0,01$ ) como de forma continuada ( $p < 0,001$ ), comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 64).

##### 5.4.6.2. *Receptor muscarínico M3 (RM3)*

Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en la expresión de RM3. Esta disminución en la expresión fue significativamente menor, tanto en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3 de forma única ( $p < 0,01$ ) como de forma continuada ( $p < 0,001$ ), comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 65).



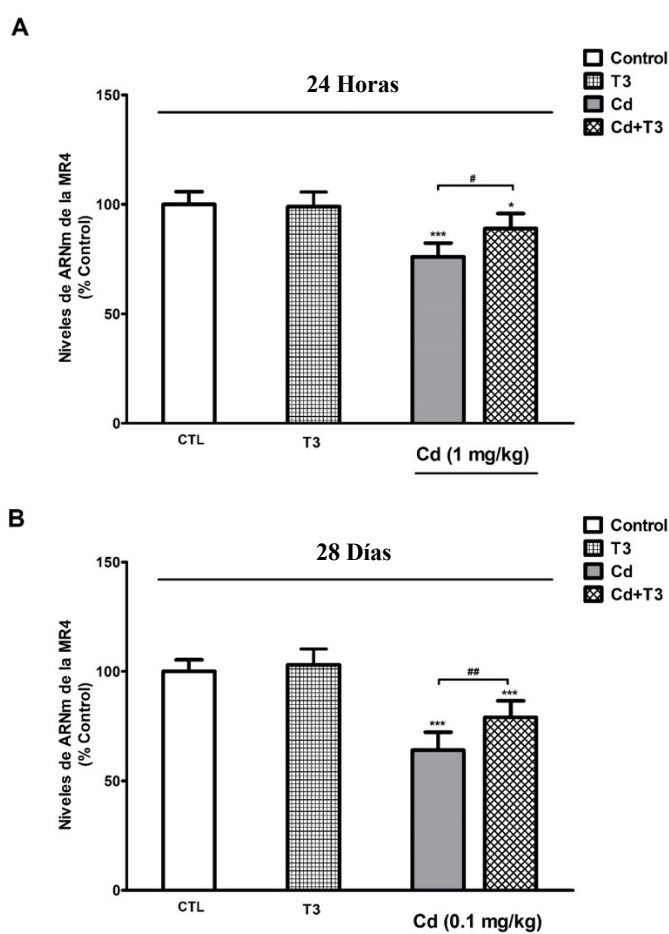
**Figura 64.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), sobre la expresión de MR2 a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de expresión de MR2 respecto al control. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control; ## $p < 0,01$  y ### $p < 0,001$  comparado con el tratamiento con cadmio.

**A****B**

**Figura 65.** Análisis del efecto del cadmio tras la exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), sobre la expresión de MR3 a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de expresión de MR3 respecto al control. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control; ## $p < 0,01$  y ### $p < 0,001$  comparado con el tratamiento con cadmio.

### 5.4.6.3. Receptor muscarínico M4 (RM4)

Tras la exposición única y continuada a cadmio (1 mg/Kg y 0,1 mg/Kg, respectivamente), se encontró una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en la expresión de RM3. Esta disminución en la expresión fue significativamente menor, tanto en el grupo expuesto a tratamiento combinado cadmio+T3 de forma única ( $p < 0,05$ ) como de forma continuada ( $p < 0,01$ ), comparado con el grupo tratado solo con cadmio (Figura 66).



**Figura 66.** Análisis del efecto del cadmio tras exposición única (A) o continuada (B), con o sin T3 (40  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), sobre la expresión de MR4 a nivel del PSB de ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de expresión de MR4 respecto al control. \*\*\* $p < 0,001$  y \* $p < 0,05$  comparado con el control; # $p < 0,05$  y ## $p < 0,01$  comparado con el tratamiento con cadmio.

# **DISCUSIÓN**



## 6.- DISCUSION

Desde el inicio de la Era Industrial, y especialmente después de la II Guerra Mundial, el hombre vive expuesto a sustancias químicas contaminantes. En este sentido, uno de los mayores agentes tóxicos asociado a contaminación ambiental es el cadmio.

El cadmio (Cd) es un metal pesado que se encuentra en el medioambiente de forma natural asociado a minerales de cinc, cobre o plomo, por lo que es un subproducto inevitable en las actividades mineras relacionadas con estos metales. Tiene muchas aplicaciones industriales por lo que su liberación al medio ambiente se ve incrementada por la acción del hombre y por el uso de fertilizantes a base de fosfatos y de lodos residuales. Es uno de los metales tóxicos emitidos al medio ambiente que más tiende a acumularse en los alimentos, sobre todo a través de la ingesta de vegetales contaminados por la fácil transferencia del suelo a los vegetales, apareciendo también en alimentos de origen animal entre los que destacan crustáceos, peces y los moluscos bivalvos.

A pesar de su toxicidad, todavía hoy en día no se han descubierto todos los mecanismos por los cuales ejerce sus efectos sobre todo a nivel del sistema endocrino y el SNC, principalmente en los implicados en la memoria y el aprendizaje, por lo que este estudio intenta dar respuesta a estas incógnitas.

En primer lugar, el presente estudio muestra que el tratamiento con cadmio, tanto de manera única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg) produjo una disminución significativa en el nivel de hormonas T3 y T4, así como un aumento significativo del nivel de TSH, tanto a nivel plasmático como del PSB. En la literatura no hemos encontrado

estudios realizados de los efectos del Cd sobre los niveles de HT a nivel del PSB u otra región cerebral. Por el contrario, se ha referido que el Cd se acumula en la glándula tiroides, produciendo un efecto tóxico directo sobre dicha glándula que da lugar a la alteración de su morfología y función (Kobayashi et al., 2017; Kobayashi et al., 2005). Como resultado del efecto tóxico del Cd sobre la glándula tiroides se ha descrito que se producen alteraciones de los niveles plasmáticos de las hormonas TSH, T3 y T4, aunque existen discrepancias en el sentido de dichas alteraciones. En este sentido, se ha descrito que exposiciones continuadas (de 28 a 35 días) a Cd (50 mg/Kg y 200 mg/Kg) por vía oral en ratas produce una disminución de T3 y T4 y un aumento de TSH (Hammouda et al., 2008; Mohamed et al., 2015). En estudios realizados solamente sobre los niveles plasmáticos de TSH, se observó también su incremento tras la exposición durante un mes a Cd por vía oral a dosis de entre 1,5 y 100 mg/Kg (Caride et al., 2010; Lafuente et al., 2003). Estos resultados son concordantes con los hallazgos de nuestro estudio. Sin embargo, aunque en otros estudios también han observado una disminución de los niveles T3 y T4, por el contrario, observaron una disminución de los niveles de TSH tras la exposición continuada a Cd (28 y 84 días) por vía oral en un rango de dosis entre 1,4 y 15 mg/Kg (Curcic et al., 2012; Zienab y Heba, 2009). Por último, se ha detallado que el tratamiento con Cd en ratas por vía oral a dosis de 0.75 o 7.5 mg/kg durante 12 meses produjo solamente una disminución de niveles de T4, manteniéndose sin alteraciones los niveles de T3 y TSH a la dosis de 7,5 mg/Kg (Pilat-Marcinkiewicz, 2003), lo cual parece indicar que solo a partir de determinadas dosis se produce un daño que conduce a la alteración de la producción de dicha hormona. No existen estudios en roedores de los efectos de la exposición única al Cd sobre las HT, aunque sí en otros animales en los que también se muestran discrepancias en el signo del efecto (Buha et al., 2018). Las diferencias observadas entre estos estudios, así como con nuestros resultados, puede

deberse a las diferencias en el tiempo de tratamiento, peso de los animales, sexo, edad y ruta o la manera de administración del Cd.

Estas discrepancias también se han descrito en la literatura, en estudios que evalúan los cambios en los niveles de T3, T4 y TSH relacionados con la exposición ambiental u ocupacional a Cd en humanos (Jurdziak et al., 2018; Meeker et al., 2009; Rosati et al., 2016; Sherif et al., 2017). Las discrepancias observadas en los estudios epidemiológicos podrían ser explicadas por la variabilidad tanto a la hora de seleccionar los pacientes a estudio, como en los niveles de T3, T4 y TSH previos (Buha et al., 2018). Es importante tener en cuenta que el sexo del sujeto a estudio (de manera específica los niveles de estrógenos y progesterona), así como las características físicas (peso, porcentaje de grasa, agua corporal, función renal y hepática, edad), pueden tener un efecto importante sobre el efecto tóxico del Cd (Buha et al., 2018).

El incremento de la hormona TSH que observamos en nuestros resultados parece ser debido al intento de compensar la disminución de las hormonas T3 y T4 a nivel plasmático, pero debido al daño que induce el Cd sobre la glándula tiroides que da lugar a la disminución de su síntesis, aunque esta aumente no puede conseguir su fin. Nuestros resultados muestran que el Cd es un disruptor del sistema tiroideo a las dosis y tiempos de exposición estudiados, pudiendo producir la alteración de diversas funciones fisiológicas que controlan las HT.

Además, el presente estudio demuestra por primera vez que la exposición al Cd, tanto de manera única (1mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg) induce un aumento, a nivel del PSB, en el porcentaje de neuronas necróticas, tanto totales como ChAT+, siendo

este efecto más pronunciado sobre las neuronas ChAT+, lo que indica que las neuronas colinérgicas son más sensibles a la toxicidad inducida por el Cd. En la literatura no hemos encontrado ningún trabajo que describa dichas alteraciones, así como ningún cambio histológico relacionado con la exposición única o prolongada al Cd, a nivel del PSB.

Sin embargo, sí se ha descrito en la literatura que el Cd induce cambios histológicos, fundamentalmente a nivel de la corteza cerebral, en ratas expuestas a diferentes dosis y tiempos de exposición. Yang et al. (2015) describieron la presencia de degeneración vacuolar y apoptosis neuronal a nivel de la corteza cerebral frontal del lado izquierdo, predominantemente en la capa granular cortical, acompañada de congestión vascular y separación de las cubiertas meníngeas en ratas expuestas a CdCl<sub>2</sub> de manera oral durante 10 días y a una dosis de 1,87 mg/Kg. Sin embargo, Affi y Embaby (2016) observaron que tras la administración de Cd a una dosis de 5 mg/Kg durante 2 meses, la capa piramidal de la corteza es la más afectada, con presencia de neuronas de morfología irregular, pérdida de sus prolongaciones y aparición de hipercromatismo nuclear; todo ello compatible con apoptosis neuronal. Chen et al. (2014) también describieron que el Cd a dosis de 1 mg/Kg, por vía oral y durante 6 semanas, produjo un importante daño a nivel de la corteza cerebral, con desorganización de las capas y pérdida de los límites de las mismas. Diversos estudios han mostrado que la exposición prolongada al Cd por vía intraperitoneal produce muerte neuronal por apoptosis (1- 6,5 mg/Kg) en las regiones de la corteza frontal e hipocampo de rata (Almeer et al., 2019; Khan et al., 2019; Mahdavi et al., 2018) o por necrosis (20 mg/Kg) (Ivanova et al., 2017). Además, se ha descrito que por exposición única al Cd (1.5-3.5 mg/Kg) por vía intraperitoneal induce muerte celular por apoptosis en el hígado, testículos y timo de rata (Krichah et al., 2003; Tzirogiannis et al., 2003), o que por exposición por vía intravenosa induce muerte neuronal por apoptosis

a la dosis de 4 mg/kg y necrosis a la dosis de 8 mg/Kg en las neuronas de la parte rostral ventrolateral del bulbo raquídeo de rata (Chen et al., 2019). Estos estudios apoyan los resultados mostrados en nuestro estudio.

A pesar de que no se ha descrito en los estudios *in vivo* alteraciones selectivas o más pronunciadas sobre diferentes tipos de neuronas, tanto por exposiciones únicas como prolongadas a Cd, nosotros encontramos en nuestro estudio que el daño neuronal a nivel del PSB se produce de manera más pronunciada sobre las neuronas colinérgicas, tanto en exposiciones únicas como continuadas. Esto puede ser debido a que no se han desarrollado estudios *in vivo* tanto por exposición a Cd a dosis únicas o prolongadas que valoren el daño neuronal sobre diferentes líneas neuronales. Sin embargo, sí que encontramos en la literatura estudios *in vitro* que observan una mayor sensibilidad o selectividad en el daño neuronal inducido por el Cd sobre las neuronas colinérgicas. En este sentido, nuestros resultados son concordantes con lo descrito en estudios *in vitro* sobre neuronas colinérgicas SN56 procedentes del PSB, en las que se observó que el Cd producía una muerte no selectiva, pero sí más pronunciada tras exposición única (Del Pino et al., 2014), lo cual apoya nuestros resultados. Por otra parte, se ha descrito que el tratamiento con Cd (10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) de explantes de médula espinal fetal humana cultivada durante 24 horas produce una pérdida selectiva de neuronas motoras colinérgicas en los cuernos ventrales de la médula espinal, mientras no se observa pérdida neuronal sobre ningún tipo de neuronas en el ganglio de la raíz dorsal (Sarchielli et al., 2012), lo que sugiere una acción selectiva sobre las neuronas colinérgicas en los cuernos ventrales de la médula espinal. La diferencia observada entre el efecto toxico más pronunciado, pero no selectivo, del Cd sobre las neuronas colinérgicas del PSB tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* con el efecto toxico selectivo sobre las neuronas

colinérgicas a nivel del sistema nervioso periférico puede estar relacionada con diferencias en la distribución y acumulación del Cd en distintas regiones, de igual manera que se observan estas diferencias dentro de la médula espinal.

Nuestros resultados también muestran que, aunque el Cd indujo un aumento significativo de neuronas necróticas, tanto totales como ChAT+, no produjo un incremento significativo de reducción del número de neuronas totales o ChAT+ tanto por exposición única como prolongada. En nuestro estudio, a la hora de contabilizar el número de neuronas totales y ChAT+, se incluyeron todas las neuronas independientemente de que tuvieran o no alteraciones morfológicas, cambios compatibles con apoptosis o necrosis. Estos resultados significan que el daño producido por el Cd a nivel neuronal es selectivo a las dosis y tiempos de exposición de nuestro estudio, no observándose un daño difuso del parénquima cerebral con desaparición de las poblaciones celulares que lo constituyen. Sin embargo, se ha descrito que el Cd por vía intraperitoneal reduce el número de neuronas de la parte rostral ventrolateral del bulbo raquídeo de rata por exposición única (4 y 8 mg/kg) (Chen et al., 2019), o por exposición prolongada (5 mg/Kg) en ratón (Khan et al., 2019). La diferencia entre nuestros resultados y dichos estudios puede deberse a que las dosis empleadas fueron mayores que las usadas en nuestro estudio, por lo cual en nuestro estudio vemos un estadio inicial del daño, sin reducción del número de neuronas, que se produciría a mayores dosis.

Al evaluar el número total de neuronas NeuN+, también observamos que el tratamiento con Cd, tanto de manera única como continuada, indujo una disminución significativa en el porcentaje de neuronas NeuN+ a nivel del PSB. En la literatura no hemos encontrado ningún trabajo *in vivo* que describa los efectos del Cd sobre el número

de neuronas NeuN+. Sin embargo, Sarchielli et al. (2012) describieron, en su estudio sobre cultivos de explantes de médula espinal fetal, tratados con Cd (10 y 100  $\mu$ M) durante 24 horas, una disminución, directamente proporcional a la concentración de Cd, de las neuronas NeuN+ y ChAT+ a nivel de los cuernos ventrales de la médula espinal, apoyando nuestros resultados. A diferencia de nuestro estudio, los autores no evaluaron si la disminución de neuronas ChAT+ era significativamente mayor que la de neuronas NeuN+ o si el aumento de células apoptóticas era significativamente mayor en la subpoblación ChAT+.

La tinción inmunohistoquímica NeuN es un marcador neuronal asociado al daño, pero no a la muerte neuronal. En este sentido, se ha descrito que dicha tinción se encuentra completamente ausente a nivel del núcleo estriado en ratas con isquemia cerebral (Kirik et al., 2009; Korzhevskii et al., 2009). También se ha descrito que la proteína nuclear NeuN desaparece de las neuronas piramidales dañadas a nivel del hipocampo (Korzhevskii et al., 2006), así como de las neuronas presentes en regiones cerebrales con daño cerebral asociado (Davoli et al., 2002; Igarashi et al., 2001; Unal-Cevik et al., 2004).

Por lo tanto, la reducción del número de NeuN+ observada en nuestros resultados parecen indicar que el Cd, tanto de manera única (1mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), está produciendo un daño sobre las neuronas a nivel del PSB que está produciendo degeneración de las mismas, aunque este daño no es suficiente a las dosis estudiadas para producir una reducción significativa del número de neuronas. El Cd, en función de la dosis no solo se relaciona con necrosis neuronal, sino que además reduce la viabilidad celular (López et al., 2003; Del Pino et al., 2016), lo cual apoya nuestros resultados.

También estudiamos el efecto de la exposición a Cd, tanto de manera única (1mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg) sobre el neuropilo a nivel del PSB, observando un aumento en el grado de espongiosis en el grupo de ratas expuestas, tanto a nivel del núcleo septal como de la banda diagonal de Broca. A nivel del núcleo basal de Meynert únicamente se observó un aumento en el grado de espongiosis en el grupo de ratas expuesto de manera continuada. En este sentido existen varios estudios *in vivo* que describen cambios histológicos a nivel cerebral, fundamentalmente a nivel cortical, región que ha centrado la mayor parte de estudios de neurotoxicidad asociados a Cd. Los estudios que describen cambios de espongiosis a nivel cortical, también describen una necrosis neuronal asociada, en ratas expuestas de manera continuada (entre 7 días y 2 meses) a Cd, tanto vía oral como intraperitoneal. La descripción que hacen los autores de la espongiosis en la corteza por exposición continuada (entre 7 días y 2 meses) a Cd (3.74-6.5 mg/Kg) es debida a la presencia de espacios vacíos perineuronales o a la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas a nivel glial o neuronal (Afifi y Embaby, 2016; Almeer et al., 2019; Ivanova et al., 2017; Yang et al., 2015). La espongiosis, descrita en relación con la exposición a agentes neurotóxicos (Bolon y Butt, 2011), es indicativa de muerte neuronal y se describe en estadios precoces de isquemia, hipoxia e hipoglucemia (Auer et al., 2002). En nuestro caso, observamos la presencia de espongiosis a nivel del PSB a dosis de Cd menores que las descritas en la literatura. No se han encontrado estudios que evalúen la presencia de espongiosis a nivel cerebral tras una dosis única de Cd.

En nuestro estudio, la presencia de espongiosis estuvo directamente relacionada con el aumento de necrosis neuronal, compatible con lo descrito en la literatura, excepto a nivel del núcleo basal de Meynert, en el grupo de ratas expuesto de manera única a Cd.

En el núcleo basal de Meynert más del 90% de las neuronas se ha descrito que son colinérgicas (Mesulam et al., 1983), por lo que de producirse un daño inducido por el Cd, al ser éste más pronunciado sobre las neuronas colinérgicas, este núcleo sería más sensible que los otros del PSB y se debería observar la espongiosis aquí también tras la exposición única al Cd. El hecho de que no sea así, puede deberse a que el Cd alcance mayores concentraciones en los otros subnúcleos del PSB y que conforme se continúa la exposición al mismo, éste se acumule alcanzando la concentración mínima necesaria para producir este daño.

Finalmente estudiamos el efecto de la exposición a Cd, tanto de manera única (1mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg) sobre la gliosis a nivel del PSB, observando un aumento en el grado de gliosis en el grupo de ratas expuestas, a nivel de los tres núcleos del PSB mediante el uso del marcador PGFA. La PGFA, componente de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos (Sofroniew, 2009), es considerada para muchos autores un marcador específico de daño astrocitario y neurotoxicidad (O'Callaghan JP et al., 1995; O'Callaghan y Sriram, 2005). Según Panickar y Norenberg (2005), los astrocitos son las primeras células diana ante la exposición al Cd, con afectación de los mismos antes de que se observe afectación neuronal. El aumento de tamaño de los astrocitos se debe a un proceso de peroxidación lipídica que conlleva a un aumento de permeabilidad al sodio, acumulación intracitoplasmática y consiguiente edema intracelular (Emanuel, 2001; Panickar y Norenberg, 2005). Los astrocitos juegan un papel importante en el metabolismo y captación de neurotransmisores, expresión de receptores de neurotransmisores y en la secreción de factores neurotróficos, así como proteínas de matriz extracelular (Panickar y Norenberg, 2005).

El aumento en el grado de gliosis observado en nuestro estudio a nivel del PSB, puede deberse tanto a un efecto directo del cadmio sobre dichas células como a un efecto secundario al daño neuronal observado, ya que la gliosis se observa frecuentemente como consecuencia de daño a nivel del SNC (Kim et al., 2015; Napoli y Neumann, 2009). En la literatura no hemos encontrado ningún trabajo que describa, tanto a nivel del PSB de ratas expuestas de manera única como continuada a Cd, la presencia de espongiosis o gliosis. Por el contrario, sí existen diferentes trabajos que estudian la gliosis tras la exposición a Cd tanto de manera única como continuada. En este sentido, Omotoso et al. (2019) describieron que el tratamiento con Cd (3.5 mg/Kg) por vía intraperitoneal en ratas produjo gliosis marcada, con aumento de la expresión de PGFA, a nivel de la corteza frontal, así como hipertrofia e hiperplasia de los astrocitos. También se ha descrito la inducción de gliosis tras la exposición a Cd en ratas, con un aumento de PGFA a diferentes niveles del SNC (cerebelo, tálamo, corteza e hipocampo), tras exposición continuada a Cd, vía intragástrica (1 µg/Kg), subcutánea (2 mg/Kg) o intraperitoneal (5 mg/Kg), durante 37 días (Kovalchuk et al., 2015), seis semanas (Areba et al., 2019), o dos semanas (Khan et al., 2019), respectivamente. Sarchielli et al. (2012) también describieron una astrogliosis, con aumento de la proteína PGFA, directamente proporcional al aumento de dosis a la que se exponían los explantes de médula espinal fetales al Cd. Estos estudios confirman nuestros resultados, mostrando que incluso a dosis inferiores a las ensayadas en nuestro estudio por exposición prologada se produce un daño a nivel de los astrocitos antes de que se produzca un daño neuronal con las consiguientes alteraciones funcionales, pudiendo ser éste un marcador de daño por exposición a Cd. Sin embargo, otros estudios han observado una disminución de la expresión de PGFA. En este sentido, Favorito et al. (2017) y Monaco et al. (2016) describen una disminución de la expresión de PGFA en diferentes regiones del cerebro de lagartija y pez cebra

expuestos a Cd vía oral (1mg/L) o intraperitoneal (2 mg/Kg) durante 16 días. Estos estudios son contradictorios con los resultados obtenidos en el nuestro. La astrogliosis, definida como una sobreexpresión de proteína PGFA, se debe principalmente a una hipertrofia y proliferación de astrocitos (Allen y Barres, 2009), pero en el caso de la lagartija y pez cebra, las células gliales principales son las denominadas “glia radial”, células de morfología bipolar, que se extienden por la corteza cerebral y cerebelar, actuando como guía de las neuronas durante su migración. Estas células, positivas para PGFA, se encuentran vinculadas con los astrocitos, pudiendo llegar a convertirse o derivar en éstos (Allen y Barres, 2009; Malatesta y Gotz, 2013). Esta diferencia entre la glia predominante en el cerebro de mamíferos y no mamíferos, hace que los resultados sean diferentes. Además, hay que indicar que la PGFA presenta las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$  y  $\varepsilon$  en el cerebro (Sarkar et al., 1997). Kovalchuk et al. (2015) observaron un descenso de la expresión de la forma soluble de la PGFA y un aumento de la forma filamentosa, que es la principal forma de la PGFA, que marca la activación de los astrocitos y la inducción de gliosis. Por lo tanto, es posible que la disminución la expresión de la PGFA observada en los estudios antes descritos pueda ser debida a las diferencias de expresión que induce el Cd sobre las isoformas de la PGFA. Nuestros resultados, a nivel histológico, corroboran que el Cd está produciendo un daño sobre las neuronas del PSB, que a su vez puede estar induciendo una pérdida de funcionalidad que conduce a la inducción de las alteraciones cognitivas descritas en el mismo rango de dosis en ratas.

Cuando las ratas se expusieron al co-tratamiento de cadmio y T3, tanto de forma única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), se observó una reversión parcial en el aumento del porcentaje de neuronas necróticas, tanto totales como ChAT+, así como de la reducción de neuronas NeuN+, pero en este caso solo tras la exposición única, a nivel

del PSB. Estos hallazgos indican que la disminución de HT media en parte el daño inducido por el Cd sobre las neuronas del PSB, y en particular sobre las neuronas colinérgicas. No hay estudios en la literatura que describan la participación de las HT sobre los cambios observados a nivel del PSB tras la exposición a Cd. Las HT son esenciales para mantener la viabilidad celular, especialmente de las neuronas colinérgicas del PSB y la reducción de las mismas conduce a neurodegeneración y muerte neuronal (Patel et al., 1980; Patel et al., 1985; Patel et al., 1987; Patel et al., 1988), lo cual confirma que la reducción observada de las mismas participa en el fenómeno de neurodegeneración observado (Ammassari-Teule et al., 1993; O'Keefe y Dostrovsky, 1971). La razón por la que no observamos reversión de la disminución de neuronas NeuN+ tras el co-tratamiento con cadmio y T3 en el grupo expuesto de manera continuada, puede ser debida a que la dosis de hormona T3 administrada es la misma durante los 28 días de tratamiento, pero la disminución durante el periodo de tratamiento de la hormona T3 es progresiva, por lo que a los 28 días esta dosis podría ser insuficiente para revertir dichos daños, por lo que se debería aumentar la dosis de manera progresiva para alcanzar la dosis fisiológica que compense dichos daños.

El co-tratamiento con cadmio y T3 produjo una reversión parcial de la disminución en el grado de gliosis y espongirosis observado en aquellas ratas que habían recibido cadmio, pero esta reversión solo fue significativa en el grupo expuesto de manera continuada (0,1 mg/Kg) a nivel del septo medial. La causa de que el co-tratamiento con T3 solo consiguiera revertir estos efectos en el septo medial, que es el núcleo del PSB con menor porcentaje de neuronas colinérgicas ChAT+, podría ser debida a que la dosis de T3 que alcanza los núcleos del PSB no sea suficiente para conseguir bloquear la activación de las células de microglía y astrocitos a nivel de la banda diagonal de Broca

y núcleo basal de Meynert [regiones con mayor porcentaje de neuronas colinérgicas (Mesulam et al., 1983)], pero sí sería una dosis de T3 suficiente a nivel del septo medial, núcleo del PSB con menor porcentaje de neuronas colinérgicas (Liu AKL et al., 2018).

La disminución de HT se ha relacionado con la inducción de una respuesta inflamatoria y con la activación de las células de microglía y astrocitos. En este sentido, Chaalal et al. (2019) describieron en un modelo de rata hipotiroidea, que la presencia de unos niveles disminuidos de HT favorece una reacción pro-inflamatoria con activación de la microglía y astrocitos, así como un aumento de citoquinas (IL 1 $\beta$ , IL6 y TNF $\alpha$ ) a nivel del hipocampo. Todos estos cambios, sin embargo, revirtieron cuando a las ratas se les administró 150  $\mu$ g/Kg cada 24 horas de T3 vía intraperitoneal. La presencia de citoquinas pro-inflamatorias elevadas a nivel cerebral se asocia con déficits de memoria (Delpech et al., 2015; Yirmiya y Goshen, 2011), por lo tanto la disminución de dichas hormonas podría desencadenar la neurodegeneración producida por el Cd sobre las neuronas del PSB e inducción de alteraciones cognitivas a través de la activación de las células de la microglía y astrocitos, induciendo así una respuesta inflamatoria.

También observamos que el tratamiento con Cd, tanto de forma única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), produjo una disminución significativa en el contenido de ACh a nivel del PSB y de las actividades de la AChE y de la ChAT. Sin embargo, no observamos ningún efecto sobre la expresión de los transportadores HACHT y VACHT. En este sentido, se ha descrito que el Cd inhibe la actividad de la ChAT *in vivo* (Dwivedi, 1983). No hemos encontrado ningún estudio experimental *in vivo* que evalúe una posible relación entre la exposición a Cd y un posible cambio en los niveles o actividad de

HAcHt y VAcHt que pueda corroborar nuestros datos, lo cual puede deberse a que al no haber encontrado ningún efecto no se haya publicado.

Tampoco hemos encontrado en la literatura ningún estudio *in vivo* que describa una disminución de la actividad de la enzima AChE a nivel del PSB. Sin embargo, existen varios estudios en diferentes modelos animales, que describen efectos contrapuestos del Cd sobre la actividad de la AChE, observándose tanto un aumento como una disminución de su actividad. En este sentido, se ha descrito que la actividad cerebral de la AChE disminuyó en ratas expuestas a 1, 2 o 5 mg / kg de Cd durante 8 h (Carageorgiou et al., 2004), así como en ratones expuestos por vía subcutánea a una dosis de 1.83 mg/Kg, 5 veces a la semana durante 4 semanas (Luchese et al., 2007). También se observó una disminución de la actividad de la AChE en las regiones del hipocampo, cerebelo e hipotálamo de ratas tratadas con 2 mg/kg de Cd por sonda cada dos días durante 30 días (Gonçalves et al., 2010). Estos resultados son concordantes con lo que nosotros hemos observado en nuestro estudio. Sin embargo, también se ha descrito que la actividad de AChE aumenta en el cerebro de ratas expuestas a 1 mg/kg de Cd por vía intraperitoneal durante 14 días o vía intramuscular durante 4 meses (Carageorgiou et al., 2004, 2005). Además, Fasitsas et al. (1991) describieron la existencia de un carácter bifásico de la actividad de la AChE, produciéndose un efecto opuesto en función del tiempo que pasa tras la exposición al Cd. En dicho estudio, las ratas expuestas a una única dosis de CdCl<sub>2</sub> vía intraperitoneal (5 mg/Kg), mostraron, a las 6 horas post-exposición, una disminución de la actividad de la AChE a nivel cerebral que, sin embargo, aumentaba progresivamente a las 12, 18 y 24 horas post-exposición. Estas diferencias observadas entre nuestro estudio y estudios previos podrían explicarse por el hecho de que en dichos estudios se ha realizado la determinación de las actividades a nivel cerebral y no por regiones, lo cual

puede enmascarar efectos contrapuestos sobre la actividad según la región. También, podrían deberse dichas diferencias a los diferentes tiempos y a las diferentes vías y dosis de exposición a Cd. Son necesarios posteriores estudios para confirmar la ampliación de estos factores sobre la actividad de la AChE.

Además, se ha mostrado en estudios sobre cultivos de neuronas colinérgicas SN56 procedentes del PSB efectos similares a los observados en nuestro estudio sobre el contenido de ACh, la expresión HACHT y VACHT y sobre las actividades de la AChE y de la ChAT tras el tratamiento con Cd durante 24 horas (Del Pino et al., 2014), todo lo cual apoya nuestros resultados. La disminución en el contenido de ACh no puede ser explicado a través de la disminución observada en la actividad de la AChE, lo cual parece explicarse por la reducción de la actividad de la ChAT, dando lugar a una disminución de la producción de ACh. Sin embargo, no podemos descartar la participación de otros mecanismos como puede ser una reducción en la liberación de la ACh. En este sentido, se ha descrito que el Cd reduce la liberación de ACh (Alberts et al., 1985; Hayashi y Takayama, 1978). La disminución observada en el contenido de ACh o de las actividades enzimáticas comentadas, así como del resto de parámetros estudiados podrían estar relacionados con la reducción del número de neuronas, por lo que realizamos una normalización de nuestros resultados con las concentraciones totales de proteínas, para evitar dicho factor de confusión.

Nuestros resultados también muestran que el tratamiento con Cd, tanto de forma única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), produjo un bloqueo de los MR1. Además, el tratamiento con Cd no afectó la expresión génica de los receptores MR1 y MR5, sin embargo, disminuyó la expresión génica de los receptores MR2, MR3 y MR4 en el PBS.

En este sentido, se ha descrito que el Cd bloquea los MR, sugiriéndose que podría bloquear selectivamente los RM1 (Ghelardini et al., 1999). Además, se ha descrito que el tratamiento con Cd durante 24 horas bloquea el MR1 en las neuronas colinérgicas SN56 del PSB (Del Pino et al., 2016), así como el tratamiento con el mismo durante 28 días bloquea los MR1 y disminuye la expresión de los receptores MR1, MR2 y MR4 en la corteza frontal e hipocampo de ratas (Gupta et al., 2016), lo que en parte apoya nuestros resultados. Las diferencias observadas entre nuestros resultados y los de Gupta et al. (2016) sobre la expresión de los MR1, MR3 y MR5, podría deberse a las diferencias en la región estudiada, al vehículo en el que se administró el Cd (suero fisiológico en nuestro estudio vs agua destilada) y la dosis (0,1 vs 5 mg/Kg mg/Kg), respectivamente. La disminución de la actividad de la ChAT podría estar mediada por el bloqueo del RM1. En este sentido, se ha descrito que el bloque del MR1 reduce la actividad de la ChAT (Park et al., 2004) y fue corroborado en neuronas colinérgicas SN56 del PSB (Del Pino et al., 2016b). La reducción del contenido de ACh así como el bloqueo del receptor M1 y la disminución de la expresión de los receptores M2, M3 y M4 producida por el Cd, tanto de forma única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), indican que el Cd altera la transmisión colinérgica, pudiendo producir de esta manera las alteraciones cognitivas descritas tras la exposición al mismo. En este sentido, se ha mostrado que los receptores muscarínicos M1-M4 regulan los procesos de aprendizaje y memoria (Atri et al., 2004; Bainbridge et al., 2008; Bubser et al., 2014; Galloway et al., 2014; Zheng et al., 2012), lo que apoya que dichas alteraciones podrían mediar los trastornos cognitivos inducidos después de la exposición al Cd.

La ACh desempeña un papel en la supervivencia celular a través de la activación del receptor colinérgico (Resende y Adhikari, 2009), por lo tanto, la reducción en sus

niveles, así como el bloqueo del MR1 o la disminución en la expresión de los receptores MR2, MR3 y MR4 podría ser la causa del daño y muerte neuronal descrito. Sin embargo, en estudios previos *in vitro* sobre neuronas colinérgicas SN56 procedentes del PSB se observó que la disminución de la concentración de ACh inducida por Cd no fue determinante para mediar la muerte celular inducida sobre dichas neuronas, sino que fue el bloqueo del receptor MR1 y la reducción en la expresión del receptor MR3 los que mediaron este efecto entre otros mecanismos (Del Pino et al., 2016; Moyano et al., 2018). Por último, cabe destacar que cuando las ratas fueron co-tratadas con cadmio y T3, tanto de forma única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), se observó que los efectos producidos sobre el contenido de ACh, la actividad de las enzimas AChE y ChAT y sobre los receptores muscarínicos fueron revertidos parcialmente. En este sentido, se ha descrito que las HT regulan la expresión de la enzima ChAT en las neuronas del SNC y especialmente en las neuronas colinérgicas del núcleo septal del PSB (Hefti et al., 1986; Honegger y Lenoir, 1980), mostrándose que cuando se produce un déficit de HT, éste conduce a una disminución en la actividad de ChAT en diferentes áreas cerebrales (Kaleria y Prince, 1985; Kojima et al., 1981; Valcana, 1971). También se ha descrito que las HT regulan la actividad de la AChE y la expresión y afinidad de los MR, observándose un aumento en la actividad AChE (Sarkar y Ray, 2011; Moskovkin et al., 1989) y en la expresión de los MR tras el tratamiento con T3 (Moskovkin et al., 1989). Estos estudios corroboran los efectos observados en nuestro estudio.

El tratamiento con Cd, tanto de forma única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), también produjo un incremento en la generación de ERO, de la peroxidación lipídica, así como una disminución de la expresión de NRF-2, HO-1 y GPx en el PSB, que

condujo a la generación de estrés oxidativo en parte mediado por la generación de radicales libres, así como por la disminución de la expresión de las enzimas antioxidantes.

Aunque se ha mostrado que el Cd induce la formación de ERO y aumenta la peroxidación de lípidos en diferentes regiones cerebrales (Gonçalves et al. 2010; Thévenod 2009), no existen estudios sobre la generación de estrés oxidativo por exposición al Cd a nivel del PSB. Sin embargo, se describió que tras 24 horas de tratamiento con Cd en cultivos de células colinérgicas SN56 del PSB originó un incremento de ERO y peroxidación lipídica (Moyano et al., 2018), lo cual confirma nuestros resultados. El Cd induce estrés oxidativo no solo debido a la generación de ERO, sino también por agotamiento de las defensas antioxidantes y alteración de la vía NRF2 que regula la expresión de las enzimas antioxidantes (Méndez-Armenta y Ríos, 2007). En este sentido, se ha descrito que el Cd induce peroxidación lipídica y disminuye la expresión de la enzima antioxidante SOD-1, regulada por NRF2, tanto por exposición única (Ashour y El- Shemi, 2014; Buha et al., 2012; Matovic et al., 2015) como continuada (El- Boshy et al., 2015). Además, Buha et al. (2012) observaron que la disminución de los niveles plasmáticos de SOD-1 era más pronunciada en función de la vía de tratamiento. Sin embargo, Galazyn-Sidorczuk et al. (2012) advirtieron que la actividad de la GPx, aumentaba en aquellas ratas a las que se administraba Cd vía oral, durante 6 meses a una dosis de 0,75 mg/Kg y sin embargo disminuía en aquellas ratas en las que se administraba una dosis de 7,5 mg/Kg, lo cual indica un posible efecto dual en la respuesta antioxidante inducida por Cd en función de la dosis. También se ha observado que el Cd (5-6,5 mg/kg) disminuye la expresión del factor NRF2 y de las enzimas HO-1 y GPX en diferentes regiones cerebrales tras la administración repetida por vía intraperitoneal en ratones (Almeer et al., 2019; Khan et al., 2019). Además, se ha descrito

que el Cd, tras exposición única, reduce la expresión del factor NRF2 en el hígado de rata a la dosis de 4 mg/Kg administrado por vía intraperitoneal (Liu et al., 2020). Por el contrario, se ha descrito que el Cd por exposición única incrementa la expresión del factor NRF2 y de las enzimas antioxidantes reguladas por él, en el riñón de rata a las dosis entre 1.8 y 3.6 mg/kg administrado por vía intraperitoneal (Chen et al., 2019). Los diferentes resultados observados se pueden explicar por la variabilidad en la dosis, tiempo de exposición, o tipo de compuesto de cadmio administrado. También se han observado resultados contradictorios en estudios *in vitro*, observándose un incremento inicial de la expresión de la ruta NRF2, pero a más largo plazo una disminución de la misma (Zheyi et al., 2007). Estos estudios parecen indicar que la vía NRF2 podría ser inducida a bajas dosis o tiempos cortos de exposición como un mecanismo de defensa, pero a mayores dosis o tiempos más prolongados esta vía es reprimida conduciendo a un daño mayor.

Finalmente, el co-tratamiento con T3 y cadmio, tanto de forma única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), se observó una reversión parcial en la generación de estrés oxidativo a través de la reducción de la generación de ERO y de una menor reducción de la expresión de las enzimas reguladas por NRF2, lo cual indica que la reducción de HT media en parte la generación de estrés oxidativo. Se ha descrito que la reducción de hormona T3 en el hipotiroidismo conduce a la generación de estrés oxidativo a través del incremento en la formación de ERO y la reducción de la capacidad antioxidante, especialmente en las regiones del hipocampo y la amígdala cerebral (Cano-Europa et al., 2008; Chakrabarti et al., 2016; Torres-Manzo et al., 2018). Además, se ha descrito que la hormona T3 regula la expresión del factor NRF2 (Romanque et al., 2011). Todos estos datos apoyan nuestros resultados.

La generación de estrés oxidativo se ha relacionado con la inducción de daño a nivel de las proteínas, que se desnaturalizan o dañan, conduciendo a la pérdida de su función (Fawcett et al., 2002). Por lo tanto, la inducción de estrés oxidativos por el Cd podría mediar en parte los efectos observados sobre la actividad de la AChE, ChAT, el bloqueo de MR1, así como la funcionalidad de otras proteínas. En este sentido se ha descrito que el tratamiento con Cd en cultivos de células colinérgicas SN56 del PSB media en parte el bloqueo del MR1 a través de la generación de estrés oxidativo. Además, Gupta et al. (2016), demostraron que en ratas expuesta a cadmio durante 28 días se indujo estrés oxidativo, mediado en parte por el bloqueo de MR1 y la disminución de la expresión de los receptores MR1, MR2 y MR4 a nivel de la corteza frontal e hipocampo (Gupta et al., 2016). Estos datos indican que la alteración de la transmisión colinérgica observada por el tratamiento con Cd puede estar mediada a través de la disminución de HT, que a su vez desencadena la generación de estrés oxidativo y éste los efectos observados a continuación.

Además, la generación de estrés oxidativo se ha asociado a la inducción de muerte neuronal. En particular se ha descrito que el Cd induce muerte neuronal en la corteza frontal e hipocampo tras 28 días de exposición ( $\text{CdCl}_2$  5 mg/Kg/24 horas), mediado en parte por la generación de estrés oxidativo (Gupta et al., 2016). También, fue descrito tanto *in vivo* como *in vitro* que el cadmio induce muerte neuronal sobre las neuronas colinérgicas a través de la generación de estrés oxidativo (Moyano et al., 2018; Traver et al., 2005). La inducción de muerte neuronal y la alteración de la transmisión colinérgica a través de la generación de estrés oxidativo podrían mediar las alteraciones cognitivas descritas. En este sentido, Gupta et al. (2016) mostraron que co-tratamiento del antioxidante quercetina con Cd revierte las disfunciones cognitivas inducidas por él

mismo (Gonçalves et al., 2010; Maodaa et al., 2016), lo que sugiere que este mecanismo podría mediar el efecto observado después del tratamiento con Cd en los procesos de memoria y aprendizaje.

El tratamiento con Cd, tanto de forma única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), también produjo un aumento de la expresión de la variante AChE-S y disminuyó la expresión de la variante de AChE-R de la enzima AChE y el co-tratamiento con T3 revertió en parte este efecto. Se ha descrito que el tratamiento con Cd durante 24 horas sobre neuronas colinérgicas SN56 del PSB produjo un incremento de la expresión de la variante AChE-S y una disminución de la expresión de la variante de AChE-R (Del Pino et al., 2016), lo que apoya nuestros resultados *in vivo*. Estos efectos fueron inducidos, en parte, a través de la reducción de la expresión del receptor MR3 y del bloqueo del receptor MR1, mediado por la generación de estrés oxidativo (Del Pino et al., 2016; Moyano et al., 2018). En este sentido, se ha descrito que el estrés oxidativo podría alterar la expresión de las variantes de la AChE (Bond et al. 2006; Härtl et al. 201; Toiber y Soreq 2005). Además, se ha observado que la hormona T3 induce la expresión de la AChE en células Neuro-2a de ratón (Lebel et al., 1994). Estos resultados sugieren que el Cd altera la expresión de las variantes de la AChE debido a la disminución del nivel de HT que a su vez genera estrés oxidativo, dando lugar a la alteración de los MR, desencadenando finalmente la alteración de la expresión de dichas variantes.

Se ha descrito que la sobreexpresión de la variante AChE-S induce la reducción de la actividad de ChAT (Li et al., 2013), por lo cual la reducción observada de ChAT podría ser mediada a través de la sobreexpresión de dicha variante. La expresión disminuida de la variante AChE-R, que presenta un papel neuroprotector en el proceso

neurodegenerativo (Berson et al. 2008), con un exceso de expresión de la variante AChE-S sináptica se ha asociado a cambios neurodegenerativos (Birikh et al. 2003). En este sentido, Del Pino et al. (2016a) demostraron que la sobreexpresión de la variante AChE-S y la disminución en la expresión de la variante AChE-R, inducía, en parte, la muerte neuronal de las neuronas colinérgicas SN56 del PSB, lo cual indica que dichas alteraciones mediadas por la reducción de HT pueden mediar, en parte, la neurodegeneración observada en nuestros resultados. La alteración de las variantes de AChE también se ha relacionado con la inducción de trastornos cognitivos (Cohen et al., 2008; Farchi et al. 2007), por lo que su alteración, inducida tras la exposición a Cd, podría mediar el trastorno cognitivo a través de la degeneración de neuronas colinérgicas a nivel del PSB.

Por último, en nuestro estudio observamos un aumento en el nivel de proteínas A $\beta$  1-40, A $\beta$  1-42, pTau y tTau, siendo mayor el aumento de las proteínas A $\beta$  1-42 con respecto a las proteínas A $\beta$  1-40, así como de la expresión de la enzima GSK3 $\beta$  en ratas expuestas a Cd, tanto de manera única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg) y el co-tratamiento con T3 revertió parcialmente estos efectos. Se ha descrito que el Cd aumenta la producción de proteína A $\beta$  a partir de la proteína  $\beta$ APP (Li et al., 2012; Smedman et al., 1997), la activación de la enzima GSK-3 $\beta$ , que induce la hiperfosforilación de las proteínas Tau (Wang et al., 2009) y la formación de filamentos Tau (Jiang et al., 2007). Además se observó que el tratamiento con Cd durante 24 horas en cultivos de neuronas colinérgicas SN56 del PSB también aumentó los niveles de A $\beta$  1-40 y A $\beta$  1-42, con un mayor incremento en los niveles de A $\beta$  1-42, que se ha descrito que es más fibrilogénico y muestra una mayor neurotoxicidad *in vivo* que el péptido A $\beta$  1-40 (Klein et al., 1999), así como un aumento de los niveles de proteínas tTau y pTau y de la expresión de la

enzima GSK-3 $\beta$ , que indujo una hiperfosforilación de proteínas Tau (Del Pino et al., 2016a). Todos estos hallazgos apoyan nuestros resultados. Del Pino et al. (2016b) mostraron que el bloqueo del MR1 produce un incremento en la formación de dichas proteínas a través de la sobreexpresión de la variante AChE-S, lo cual sugiere que éste podría ser también el mecanismo a través del cual se medía este efecto. La estimulación del MR3 se relaciona con una reducción en la formación de proteínas A $\beta$  (Nitsch et al., 1992) y la reducción de su expresión podría inducir su formación, contribuyendo así al efecto observado. La generación de ERO también se ha relacionado con la alteración de la expresión génica de la enzima GSK-3 $\beta$ , la producción de A $\beta$  y la fosforilación anormal de Tau (Bond et al., 2006; Giraldo et al., 2014; Rojo et al., 2008; Tamagno et al., 2005; Wang et al., 2009), lo que también podría contribuir a explicar el incremento observado a través de su efecto sobre los receptores muscarínicos MR1 y MR3, que mediarían su acción a través de la sobreexpresión de la variante de la AChE-S. Además, se ha descrito que las proteínas A $\beta$  reducen la expresión del MR2 en el hipocampo (González et al. 2008), por lo que el incremento de las proteínas A $\beta$  podría mediar el efecto observado a nivel del MR2, así como en el resto de los receptores muscarínicos. Por último, se ha descrito que la reducción de hormona T3, en un modelo de rata hipotiroidea, indujo el incremento de los niveles del péptido A $\beta$  1-42, así como un aumento de citoquinas pro-inflamatorias en el hipocampo. Sin embargo, la suplementación con T3 hasta niveles fisiológicos consiguió revertir completamente este efecto (Chaalal A et al., 2019). Además, se ha observado que la hormona T3 regula la expresión de la enzima GSK-3 $\beta$  (Goulart-Silva et al., 2013; Prieto-Almeida F et al., 2017) y la producción de proteínas pTau en ratas (Prieto-Almeida F et al., 2017). Estos resultados indican que el Cd induce a través de la disminución de las HT la generación de estrés oxidativo y alteración en los

receptores MR1 y MR3, que a su vez conducen a la sobreexpresión de la variante AChE-S que media la producción de las proteínas pTau y A $\beta$ .

El incremento de las proteínas A $\beta$  y de las pTau se han relacionado con la inducción de la muerte celular en las neuronas colinérgicas del PSB, así como con el desarrollo de alteraciones cognitivas (Avila et al., 2004; Beharry et al., 2014; Del Pino et al., 2016b; Kar et al., 2004), por lo tanto, el incremento de dichas proteínas observado en nuestro estudio podría mediar la neurodegeneración observada y conducir a las alteraciones de los procesos de aprendizaje y memoria descritos por exposición a Cd. Además, las proteínas Tau tienen la capacidad de unirse y activar los receptores muscarínicos MR1 y MR3, cuya activación prolongada induce muerte celular (Díaz-Hernández et al., 2010; Gómez-Ramos et al., 2008). En este sentido, el bloqueo del receptor MR1 por el Cd induce un aumento de proteínas Tau y éstas podrían ser las responsables de sobreactivar MR3 y producir una muerte selectiva de las neuronas colinérgicas a nivel del PSB.

Los estudios realizados *in vitro* sobre la inducción de muerte celular de las neuronas colinérgicas SN56 del PSB sugieren que, aparte de los mecanismos estudiados, otros mecanismos podrían también estar contribuyendo a producir este efecto. A este respecto, se ha descrito que el Cd es un bloqueante de los canales de Ca (Saroj et al., 2017; Zhou et al., 2015), y un bloqueo de los mismos podría inducir muerte celular (Choong et al., 2014; Zhou et al., 2015), que también podría contribuir al efecto observado en el PSB. Las HT regulan la expresión de canales de calcio (Watanabe et al., 2005; Chenet et al., 2011), por lo que el Cd, a través de la reducción de dichas hormonas, puede alterar la expresión de los canales de Ca y contribuir a la inducción de muerte neuronal.

Además, se ha mostrado que el Ca bloquea los receptores estrogénicos (RE) (Chouchene et al.2016). Los RE están presentes en las neuronas colinérgicas del PSB, siendo ER $\alpha$  y GPR30 los subtipos predominantes (Hammond et al., 2011; Miettinen et al., 2002; Shughrue et al., 2000). Dichos receptores, que son necesarios para mantener el estado redox y la viabilidad celular del PSB, se ha descrito que cuando son bloqueados o se produce una disminución de los mismos se genera ERO, muerte celular y trastornos cognitivos (Kwakowsky et al., 2016; Lichtenfels et al., 2017; Mladenović et al., 2014; Wassmann et al., 2001), por lo que este mecanismo también podría estar involucrado.

También se ha descrito que el estradiol es capaz de modular la neurotransmisión colinérgica a nivel cerebral (Gibbs, 1996; McMillan et al., 1996). A nivel del núcleo basal de Meynert y banda diagonal de Broca, la disminución del nivel de estradiol, tras la realización de una ooforectomía en animales, conduce a una menor afinidad en la captación de colina, así como a una disminución de la expresión y actividad de ChAT (Gibbs et al., 1994; Luine et al., 1975; Luine et al., 1986; Singh et al., 1993). Estos efectos se revierten tras la administración de estradiol exógeno (Yamamoto et al., 2007). A nivel del hipotálamo, el estradiol es capaz de modificar la expresión de los MR (Cardoso et al., 2010), de la afinidad por ellos (Dohanich et al., 1982), así como de aumentar la actividad de la AChE a dicho nivel (Luine y Rhodes, 1983). Por lo tanto, la disrupción estrogénica también puede contribuir a la alteración de la transmisión colinérgica y a la mediación de muerte neuronal que contribuyen a la aparición de disfunción cognitiva.

Dentro de las **limitaciones** del estudio, el no haber encontrado una reversión completa de las variables a estudio en las ratas expuestas a cadmio y T3, hace necesario desarrollar posteriores estudios con el objetivo de corroborar que las HT median los

mecanismos comentados y que estos mecanismos median la neurodegeneración más pronunciada observada en las neuronas colinérgicas. Además, sería necesario emplear en la exposición continuada dosis superiores de T3 para determinar si la dosis que se administra consigue alcanzar los valores normales presentes en el PSB y revertir la disminución del número neuronas NeuN o de la gliosis y espongirosis en la banda diagonal de Broca y en el núcleo basal de Meynert, así como el empleo de dosis inferiores y superiores a las empleadas con el objetivo de determinar la dosis inferior que no causaría dichas alteraciones o a partir de que dosis se produce una pérdida significativa de los distintos tipos de neuronas. También, es necesario determinar la distribución y acumulación del Cd en distintas regiones cerebrales para poder explicar si existen diferencias en estos parámetros entre distintas regiones que puedan explicar las diferencias observadas en los efectos del cadmio en las regiones cerebrales estudiadas. Finalmente, son necesarios más estudios para determinar el resto de mecanismos que pudieran contribuir a la neurodegeneración del PSB, todos los procesos que conducen a desencadenar los mecanismos estudiados o que son mediados por ellos, así como corroborar *in vivo* que estos mecanismos median los trastornos cognitivos observados tras la exposición al Cd. Por otra parte, el modelo de la rata es ampliamente aceptado para la investigación de los mecanismos que causan neurodegeneración y alteraciones cognitivas por exposición a agentes tóxicos, sin embargo es necesario tener cierta precaución a la hora de realizar la extrapolación de los resultados obtenidos al hombre dadas las diferencias fisiológicas, metabólicas, y bioquímicas que puedan existir.

En función de todos lo expuesto y en **respuesta a la hipótesis que planteamos**, se puede concluir que el Cd, tanto por tratamiento único como prolongado, induce una alteración de la transmisión colinérgica, gliosis y una neurodegeneración más

pronunciada pero no selectiva sobre las neuronas colinérgicas del PSB, mediada en parte por la reducción de las HT. El Cd induce la generación de ERO, reducción de la expresión de enzimas antioxidantes reguladas por NRF2, bloqueo de los MR1, alteración de las variantes de la AChE, sobreexpresión de la enzima GSK-3 $\beta$  y un aumento de las proteínas A $\beta$ , tTau totales y pTau. Todos estos mecanismos están regulados gracias a las HT y su disminución podría favorecer la generación de los mismos.

Las neuronas colinérgicas del PSB, que se proyectan al hipocampo y al neocórtex, son las más gravemente afectadas en la EA. Se ha sugerido que la alteración de la transmisión colinérgica y la pérdida de las inervaciones colinérgicas corticales e hipocampales del PSB contribuyen a los déficits cognitivos progresivos observados en pacientes con EA (Auld et al., 2002; Kar et al., 2004; Kesner et al., 1989; Madziar et al., 2005; Schliebs, 2005). Por lo tanto, los efectos observados sobre las neuronas colinérgicas del PSB pueden ser, en parte, responsables de los déficits de aprendizaje observados en la toxicidad mediada por el Cd. Por otra parte, aunque se han encontrado niveles más altos de Cd en los tejidos cerebrales de los pacientes con EA que en personas sanas y además, se ha relacionado como un posible factor de riesgo para la EA, todavía no se ha demostrado su implicación. Sin embargo, nuestros resultados podrían apoyar su posible implicación, porque el Cd alteró los principales marcadores de la EA, aunque también podrían sugerir que la toxicidad al Cd puede compartir algunos mecanismos con la EA, induciendo la aparición de síntomas que comparten.

Estos resultados son de gran interés porque podrían conducir a una mejor comprensión de los mecanismos responsables de producir las alteraciones cognitivas inducidas por el Cd.



## **CONCLUSIONES**



## 7.- CONCLUSIONES

1. Los resultados de nuestra investigación demuestran que la exposición a cadmio, tanto de manera única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg) produce una disminución significativa en el nivel de hormonas T3 y T4, así como un aumento significativo del nivel de TSH, tanto a nivel plasmático como del prosencéfalo basal.
2. La exposición a cadmio, tanto de manera única (1mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg) induce un aumento, a nivel del prosencéfalo basal, en el porcentaje de neuronas necróticas, tanto totales como ChAT+, siendo este efecto más pronunciado sobre las neuronas ChAT+, lo que indica que las neuronas colinérgicas son más sensibles a la toxicidad inducida por el cadmio.
3. La exposición a cadmio, tanto de manera única (1mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg) produce un aumento del grado de espongirosis a nivel del núcleo septal y de la banda diagonal de Broca. Este aumento se observa únicamente en exposiciones continuadas a cadmio a nivel del núcleo basal de Meynert.
4. La exposición a cadmio, tanto de manera única (1mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg) produce un aumento en el grado de gliosis a nivel del prosencéfalo basal.

5. El co-tratamiento de cadmio y T3, tanto de forma única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), produce una reversión parcial en el aumento del porcentaje de neuronas necróticas, tanto totales como ChAT+, así como una reversión parcial de la gliosis y espongiosis (únicamente en caso de exposición continuada a nivel del septo medial).
6. El tratamiento con cadmio, tanto de forma única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), produce una disminución significativa en el contenido de ACh a nivel del prosencéfalo basal y de las actividades de la AChE y de la ChAT. Sin embargo, no produce ningún efecto sobre la expresión de los transportadores HAChT y VAChT.
7. Nuestros resultados también muestran que el tratamiento con cadmio, tanto de forma única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), produce un bloqueo de los MR1, sin observarse alteración de la expresión génica de los receptores MR1 y MR5, pero sí una disminución de la expresión génica de los receptores MR2, MR3 y MR4 a nivel del prosencéfalo basal.
8. Respecto al co-tratamiento con cadmio y T3, tanto de forma única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), los resultados muestran que los efectos producidos sobre el contenido de ACh, la actividad de las enzimas AChE y ChAT, así como sobre los receptores muscarínicos, fueron parcialmente revertidos.

9. El tratamiento con Cd, tanto de forma única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), produce un incremento en la generación de ERO, de la peroxidación lipídica, así como una disminución de la expresión de NRF-2, HO-1 y GPx en el prosencéfalo basal, lo que indica que la generación de estrés oxidativo, es mediada, en parte, por la generación de radicales libres, así como por la disminución de la expresión de enzimas antioxidantes.
  
10. Finalmente, el co-tratamiento con T3 y cadmio, tanto de forma única (1 mg/Kg) como continuada (0,1 mg/Kg), produce una reversión parcial en la generación de estrés oxidativo a través de la reducción de la generación de ERO y de una menor reducción de la expresión de las enzimas reguladas por NRF2, lo cual indica que la reducción del nivel de hormonas tiroideas media, en parte, la generación de estrés oxidativo.



# **BIBLIOGRAFÍA**



## 8.- BIBLIOGRAFIA

Abdelouahab N, Mergler D, Takser L, Vanier C, St-Jean M, Baldwin M et al. Gender differences in the effects of organochlorines, mercury, and lead on thyroid hormone levels in lakeside communities of Quebec (Canada). *Environ Res* 2008;107:380-92.

Achanzar WE, Webber MM, Waalkes MP. Altered apoptotic gene expression and acquired apoptotic resistance in cadmium-transformed human prostate epithelial cell. *Prostate* 2002;52:236-44.

Addison WN, Azari F, Sørensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Bio Chem* 2007;282:15872-83.

Adimoolam S, Ford JM. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:12985-90.

Afifi OK, Embaby AS. Histological Study on the Protective Role of Ascorbic Acid on Cadmium Induced Cerebral Cortical Neurotoxicity in Adult Male Albino Rats. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 2016;4(1):36-45.

Aimola P, Carmignani M, Volpe AR, Di Benedetto A, Claudio L, Waalkes MP et al. Cadmium induces p53-dependent apoptosis in human prostate epithelial cells. *PLOS One* 2012;7(3):e33647.

Alberts P, Ogren V, Sellstrom A. Cadmium inhibition of [3H] acetylcholine secretion in guinea-pig ileum myenteric plexus. *Acta Physiol Scand* 1985;124:313-6.

Alfvén T, Elinder CG, Carlsson MD, Grubb A, Hellström L, Persson B et al. Low-level cadmium exposure and osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2000;15:1579-86.

Alhazza IM. Cadmium-Induced Hepatotoxicity and Oxidative Stress in Rats: Protection by Selenium. *Research Journal of Environmental Sciences* 2008;2:305-9.

Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia: more than just brain glue. *Nature* 2009;457(7230):675-7.

Almeer RS, Kassab RB, AlBasher GI, Alarifi S, Alkahtani S, Ali D, Abdel Moneim AE. Royal jelly mitigates cadmium-induced neuronal damage in mouse cortex. *Mol Biol Rep* 2019;46(1):119-31.

Alvarez L, Hernandez S, Martinez-de-Mena R, Kolliker-Frers R, Obregon MJ, Kleiman de Pisarev DL. The role of type I and type II 50 deiodinases on hexachlorobenzene-induced alteration of the hormonal thyroid status. *Toxicology* 2005;207:349–62.

Ammassari-Teule M, Amoroso D, Forloni GL, Rossi-Arnaud C, Consolo S. Mechanical deafferentation of basal forebrain-cortical pathways and neurotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis: comparative effect on spatial learning and cortical acetylcholine release in vivo. *Behav Brain Res* 1993;54:145-52.

Anagnostaras SG, Murphy GG, Hamilton SE, Mitchell SL, Rahnama NP, Nathanson NM et al. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nat Neurosci* 2003;6,:51–8.

Andersen O, Nielsen JB, Sorensen JA, Scherrebeck L. Experimental Localization of Intestinal Uptake Sites for Metals (Cd, Hg, Zn, Se) In Vivo in Mice. *Environ Health Perspect* 1994;102(3):199-206.

Andersson H, Petersson-Grawe K, Lindqvist E, Luthman J, Oskarsson A, Olson L. Low-level cadmium exposure of lactating rats causes alterations in brain serotonin levels in the offspring. *Neurotoxicol Teratol* 1997;19(2):105–15.

Anetor JI. Rising environmental cadmium levels in developing countries: threat to genome stability and health. *Niger J Physiol Sci* 2012;27(2):103-15

Antonio MT, Corredor L, Leret ML. Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. *Toxicol Lett* 2003;143:331-40.

Areba GO, Khalid R, Ngure RM, Maloba F, Nyaga N, Moseti KO et al. Neuroprotective Effects of Tea against Cadmium Toxicity. *Bioact Comp Health Dis* 2019;2(12):230-46.

Arena N, Alia EE, Demontis MP, Fattaccio MC, Madeddu R, Deiana. Metodica alternativa per il monitoraggio ambientale dell'assunzione di metalli pesanti in sistemi biologici animale e vegetali. *Bioch Clin Suppl* 1993;17:16-7.

Arena N, Madeddu R, Marchal J.A., Prados J, Melguizo C, Aranega A. Perinuclear chromatin regions are elective sites for Cadmium in tissue and in vitro cells. *Eur Micr Analysis* 1997;5:5-7.

Arnich N, Cunat L, Lanhers MC, Burnel D. Comparative in situ study of the intestinal absorption of aluminium, manganese, nickel, and lead in rats. *Biol. Trace. Element Research* 2004;99:157-172.

Arroyo VS, Flores KM, Ortiz LB, Gómez-Quiroz LE, Gutiérrez-Ruiz MC. Liver and cadmium toxicity. *J Drug Metab Toxicol* 2012;5:1.

Aschner M, Cherian GM, Klaassen DC, Palmitier DR, Erickson CJ, Bush IA. Metallothioneins in brain-the role in physiology and pathology. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;142:229-42.

Ashour, T, El-shemi, A. Caffeic acid phenyl ester prevents cadmium intoxication induced disturbances in erythrocyte indices and blood coagulability, hepatorenal dysfunction and oxidative stress in rats. *Acta Haematologica Polonica* 2014;45.

Atri A, Sherman S, Norman KA, Kirchhoff BA, Nicolas MM, Greicius MD et al. Blockade of central cholinergic receptors impairs new learning and increases proactive interference in a word paired-associate memory task. *Behav Neurosci* 2004;118:223-36.

ATSDR. Toxicological Profile for Cadmium. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Eds.; Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Atlanta, GA, USA, 2012.

ATSDR. Toxicological Profile for Cadmium. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Eds.; Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Atlanta, GA, USA, 2017.

Auer RN and Sutherland GR. Greenfield's Neuropathology. 7th Edition. London: Arnold. Hypoxia and related conditions 2002; P: 233

Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol* 2002;68:209-45.

Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of Tau protein,  $\beta$ -amyloid and Tau protein levels. *Arch Toxicol* 2004;90:1081-92.

Baer KN and Benson WH. Influence of chemical and environmental stressors on acute cadmium toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1987;22(1):35-44

Bainbridge KE, Hoffman HJ, Cowie CC. Diabetes and hearing impairment in the United States: audiometric evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. *Ann Intern Med* 2008;149:1-10

Bajaj J.K., Salwan P., Salwan S. Various possible toxicants involved in thyroid dysfunction: A review. *J Clin Diagn Res* 2016;10:1-3.

Ballard C, Greig N, Guillozet-Bongaarts AL, Enz A, Darvesh S. Cholinesterases: Roles in the Brain During Health and Disease. *Current Alzheimer Research* 2005;2:307.

Barrett HM, Irwin DA, Semmons E. Studies on the toxicity of inhaled cadmium. I. The acute toxicity of cadmium oxide by inhalation. *J Ind Hyg Toxicol* 1947;29:279-85.

Basinger MA, Jones MM, Holscher MA, Vaughn WK. Antagonists for acute oral cadmium chloride intoxication. *J Toxicol Environ* 1988;23:77-89.

Bazalakova, M.H. & Blakely, R.D. The high-affinity choline transporter: a critical protein for sustaining cholinergic signaling as revealed in studies of genetically altered mice. *Handb Exp Pharmacol* 2006;175:525–44.

Beharry C, Cohen LS, Di J, Ibrahim K, Briffa-Mirabella SA, Adel C. Tau-induced neurodegeneration: mechanisms and targets. *Neurosci Bull* 2014;30(2):346-58.

Benoff S, Hauser R, Marmar J, Hurley I, Napolitano B, Centola G. Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: correlations with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial insemination donors, and unselected volunteers). *Mol Med* 2009;15:248–62.

Bernal J. Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3:249–59.

Berson A, Knobloch M, Hanan M, Diamant S, Sharoni M, Schuppli D et al. Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology. *Brain* 2008;131:109–19.

Berson A, Soreq H. It all starts at the ends: multifaceted involvement of C- and N-terminally modified cholinesterases in Alzheimer's disease. *Rambam Maimonides Med* 2010;1:14.

Bertin G, Averbeck D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 2006;88:1549–59.

Betz AL, Goldestein GW. Specialized properties and solute transport in brain capillaries. *Annu Rev Physiol* 1986;48:241–50.

Beyersmann D, Hechtenberg S. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;144:247–61.

Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 2004;89:1313–7.

Bhattacharyya MH. Cadmium osteotoxicity in experimental animals: mechanisms and relationship to human exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;238:258–65.

Bierer LM, Haroutunian V, Gabriel S, Knott PJ, Carlin LS, Purohit DP et al. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J Neurochem* 1995;64(2):749–60.

Bilgen I, Oner G, Edremitlioglu M, Alkan Z, Cirrik S. Involvement of cholinceptors in cadmium-induced endothelial dysfunction. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2003;14(1):55–76.

Birikh KR, Sklan EH, Shoham S, Soreq H. Interaction of “readthrough” acetylcholinesterase with RACK1 and PKCbeta II correlates with intensified fear-induced conflict behavior. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(1):283–8.

Boas M, Feldt-Rasmussen U, Main KM. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2012;355:240-8.

Bodo M, Balloni S, Lumare E, Bacci M, Calvitti M, Dell'Omo M, Murgia N, Marinucci L. Effects of sub-toxic Cadmium concentrations on bone gene expression program: results of an in vitro study. *Toxicol In Vitro* 2010;6:1670–80.

Bolon B, Butt MT. *Fundamental Neuropathology for Pathologists and Toxicologists: Principles and Techniques*. 2011.

Bond CE, Patel P, Crouch L, Tetlow N, Day T, Abu-Hayyeh S, Williamson C, Greenfield SA. Astroglia up-regulate transcription and secretion of ‘readthrough’ acetylcholinesterase following oxidative stress. *Eur J Neurosci* 2006; 24(2):381–6.

Branca JJV, Morucci G, Pacini A. Cadmium-induced neurotoxicity: still much ado. *Neural Regen Res* 2018;13(11):1879-82.

Bravard A, Campalans A, Vacher M, Gouget B, Levalois C, Chevillard S, Radicella JP. Inactivation by oxidation and recruitment into stress granules of hOGG1 but not APE1 in human cells exposed to sub-lethal concentrations of cadmium. *Mutat Res* 2009;685:61–9.

Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxy radicals with DNA. *Free Rad Biol Mes* 1995;18:1033-77.

Breous E, Wenzel A, Loos U. The promoter of the human sodium/iodide symporter responds to certain phthalate plasticisers. *Mol Cell Endocrinol* 2005;244:75–8.

Bridges CC, Zalups RK. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204:274–308.

Brockhaus A, Freier I, Ewers U, Jermann E, Dolgner R. Levels of cadmium and lead in blood in relation to smoking, sex, occupation, and other factors in an adult population of FRG. *Int Arch Occup Environ Health* 1983;52:167-75.

Brozoka MM, Moniuszko Jakoniuk J. Interaction between cadmium and zinc in organism. *Food Clin Tox* 2001;39:967-80.

Bruscalupi G, Massimi M, Devirgiliis LC, Leoni S. Multiple parameters are involved in the effects of cadmium on prenatal hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 2009;23:1311–8.

Bubser T M, Bridges DD, Robert WG, Grannan MJ, Noetzel AL, Colleen M et al. Selective Activation of M4 Muscarinic Acetylcholine Receptors Reverses MK-801-Induced Behavioral Impairments and Enhances Associative Learning in Rodents. *Michael ACS Chemical Neuroscience* 2014;5(10):920-42

Buchet JP, Lauwerys R, Roels H, Bernard A, Bruaux P, Claeys F et al. Renal effects of cadmium body burden of the general population. *The Lancet* 1990;336(8717):699-702.

Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE. 1989. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals Rahway, NJ: Merck and Company Inc.

Buha A, Bulat Z, Dukić-Ćosić D, Matović V. Effects of oral and intraperitoneal magnesium treatment against cadmium-induced oxidative stress in plasma of rats. *Arh Hig Rada Toksikol* 2012;63(3):247-54.

Bulmer FMR, Rothwell HE, Frankish ER. Industrial cadmium poisoning. *Can Public Health J* 1938;29:19-26

Bush PG, Mayhew TM, Abramovich DR, Aggett PJ, Burke MD, Page KR. A Quantitative Study on the Effects of Maternal Smoking on Placental Morphology and Cadmium Concentration. *Placenta* 2000;21(2-3):247-56.

Butcher LL, Woolf NJ. Cholinergic neurons and networks revisited. The Rat Nervous System. *Elsevier Academic Press* 2004:1257-68.

Buznikov GA, Shmukler YB, Lauder JM. From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? *Cell Mol Neurobiol* 1996;16(5):537-59.

Cabrera C, Ortega E, Lorenzo ML, Lopez MC. Cadmium contamination of vegetable crops, farmlands and irrigation waters. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 154. Springer, New York. USA. 1998.

Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect* 2003;116:39-44.

Cammermeyer J. Is the solitary dark neuron a manifestation of postmortem trauma to the brain inadequately fixed by perfusion? *Histochemistry* 1978;56(2):97-115.

Campanari ML, Garcia-Ayllon MS, Belbin O, Galceran J, Lleo A, Saez-Valero J. Acetylcholinesterase modulates presenilin-1 levels and gamma-secretase activity. *J Alzheimer's Dis* 2014;41(3):911–24.

Candéias S, Pons B, Viau M, Caillat S, Sauvaigo S. Direct inhibition of excision/synthesis DNA repair activities by cadmium: analysis on dedicated biochips. *Mutat Res* 2010;694:53–9.

Cannon VT, Zalups RK, Barfuss DW. Amino acid transporters involved in luminal transport of mercury conjugates of cysteine in rabbit proximal tubule. *J Pharmacol Exp Therapeutics* 2001;298:780-9.

Cano-Europa E, Pérez-Severiano F, Vergara P, Ortiz-Butrón R, Ríos C, Segovia J, Pacheco-Rosado J. Hypothyroidism induces selective oxidative stress in amygdala and hippocampus of rat. *Metabolic Brain Disease* 2008;23(3):275-87.

Carageorgiou H, Tzotzes V, Pantos C, Mourouzis C, Zarros A, Tsakiris S. In vivo and in vitro effects of cadmium on adult rat brain total antioxidant status, acetylcholinesterase, (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase activities: protection by L- cysteine. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology* 2004;94:112-8.

Carageorgiou H, Tzotzes V, Sideris A, Zarros A, Tsakiris S. Cadmium effects on brain acetylcholinesterase activity and antioxidant status of adult rats: modulation by zinc, calcium and L-cysteine co-administration. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;97(5):320-4

Carageorgiou H, Pantos C, Zarros A, Stolakis V, Mourouzis I, Cokkinos D et al. Changes in acetylcholinesterase, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, and Mg<sup>2+</sup>-ATPase activities in the frontal cortex and the hippocampus of hyper- and hypothyroid adult rats. *Metabolism* 2007;56(8):1104-10.

Caride A, Fernández-Pérez B, Cabaleiro T, Bernárdez G, Lafuente A. Cadmium chloride exposure modifies amino acid daily pattern in the mediobasal hypothalamus in adult male rat. *J Appl Toxicol* 2010;30(1):84-90.

Cardoso CC, Ricardo VP, Frussa-Filho R, Porto CS, Abdalla FM. Effects of 17 $\beta$ -estradiol on expression of muscarinic acetylcholine receptor subtypes and estrogen receptor alpha in rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 2010;634(1-3):192-200.

Casteldi MR, Calzaferri G, Odone P, Dell'Orto A, Zocchetti C, Alessio L. Behaviour of cadmium biological indicators in subjects living in the Milan area. *Med Lav* 1983;74:442-52.

Cerna M, Spevackova V, Cejchanova M, Benes B, Rossner P, Bavorova H et al. Population based monitoring in the Czech Republic – the system and selected results. *Sci Total Environ* 1997;204:263-70.

Cerny EA, Bhattacharyya MIL. Low-volume high-sensitivity assay for cadmium in blood and urine using conventional atomic absorption spectrophotometry. *Anal Biochem* 2003;314:180-93.

Chaalal O, Hank D, Soliman AM, Embaby A, Benyahya F. A Novel Membrane Bioreactor System for Nitrification. Inhibition by Cadmium. *International Journal of Environmental Monitoring and Analysis. Special Issue: Environmental Science and Treatment Technology* 2014;2(6-1):35-41.

Chadderton A, Villeneuve DJ, Gluck S, Kirwan-Rhule AF, Gannon BR, Blais DE, Parissenti AM. Role of specific apoptotic pathways in the restoration of paclitaxel-induced apoptosis by valsopodar in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2000;59:231-44.

Chakrabarti SK, Ghosh S, Banerjee S, Mukherjee S, Chowdhury S. Oxidative stress in hypothyroid patients and the role of antioxidant supplementation. *Indian J Endocrinol Metab.* 2016;20(5):674-8.

Chang, SC, Thibodeaux, JR, Eastvold, ML, Ehresman, DJ, Bjork, JA, Froehlich, JW et al. Thyroid hormone status and pituitary function in adult rats given oral doses of perfluorooctanesulfonate (PFOS). *Toxicology* 2008;243:330–9.

Chang, SC, Thibodeaux, JR, Eastvold, ML, Ehresman, DJ, Bjork, JA, Froehlich, JW. et al. Negative bias from analog methods used in the analysis of free thyroxine in rat serum containing perfluorooctanesulfonate (PFOS). *Toxicology* 2007;234:21–33.

Chedrese PJ, Piasek M, Henson MC. Cadmium as an endocrine disruptor in the reproductive system. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* 2006;6:27–35.

Chen ZJ, Chen JX, Wu LK, Li BY, Tian YF, Xian M et al. Induction of Endoplasmic Reticulum Stress by Cadmium and Its Regulation on Nrf2 Signaling Pathway in Kidneys of Rats. *Biomed Environ Sci* 2019;32(1):1-10.

Chen L, Liu L, Huang S. Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5. *Free Radic Biol Med* 2008;45:1035–44.

Chen YY, Zhu JY, Chan KM. Effects of cadmium on cell proliferation, apoptosis, and proto-oncogene expression in zebrafish liver cells. *Aquat Toxicol* 2014;157:196-206.

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;32:46-53.

Cherian MG, Goyer RA, Delaquerriere RL. Cadmium-metallothionein induced nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1976;38:399–408.

Chertok RJ, Sasser LB, Callahan MF, Jarboe GE. Influence of cadmium on the intestinal uptake and absorption of calcium in the rat. *J Nutr* 1981;111:631–8.

Chia SE, Xu B, Ong CN, Tsakok FM, Lee ST. Effect of cadmium and cigarette smoking on human semen quality. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1994;39:292–8.

Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders. Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci* 2015;9:124.

Choong G, Liu Y, Templeton DM. Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. *Chem Biol Interact* 2014;211:54-65

Chouchene L, Pellegrini E, Gueguen MM, Hinfray N, Brion F, Piccini B, et al. Inhibitory effect of cadmium on estrogen signaling in zebrafish brain and protection by zinc. *J Appl Toxicol* 2016;36:863-71.

Choudhuri S, Liu W, Berman N, Klaassen C. Cadmium accumulation and metallothionein expression in brain of mice at different stages of development. *Toxicology Letters* 1996;84(3):127-33.

Cohen JE, Zimmerman G, Melamed-Book N, Friedman A, Dori A, Soreq H. Transgenic inactivation of acetylcholinesterase impairs homeostasis in mouse hippocampal granule cells. *Hippocampus* 2008;18(2):182-92

Connor DJ, Langlais PJ, Thal LJ. Behavioural impairments after lesions of the nucleus basalis by ibotenic acid and quisqualic acid. *Brain Res* 1991;555:84-90.

Coonse KG, Coonts AJ, Morrison EV, Heggland SJ. Cadmium induces apoptosis in the osteoblast-like cell line, Saos-2. *J. Toxicol Environ Health* 2007;70:575–81.

Cornelis R, Sabbioni E, Van der Venne MT. Trace elements reference values in tissues from inhabitants of European Community. *Sci Total Environ* 1994;158:191-6.

Coyle YM. The effect of environment on breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2004;84:273-88.

Cragg RA, Christie GR, Phillips SR, Russi RM, Küry S, Mathers JC, Taylor PM, Ford D. A novel zinc-regulated human zinc transport hZTLA, is localized to enterocyte apical membrane. *J Biolol Chem* 2002;277:22789-97.

Curčić M, Janković S, Jačević V, et al. Combined effects of cadmium and decabrominated diphenyl ether on thyroid hormones in rats. *Arh Hig Rada Toksikol* 2012;63(3):255-62.

Czarnecki LA , Moberly AH, Rubinstein T, Turkel DJ, Pottackal J, McGann JP. In vivo visualization of olfactory pathophysiology induced by intranasal cadmium instillation in mice. *NeuroToxicology* 2011;32(4):441–9.

Dalledonne I, Milzani A, Colombo R. Actin assembly by cadmium ions. *Biochem Biophys Acta* 1997;1357:5-17.

Dally H, Hartwig A. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 1997;18:1021–6.

Danzi S., Klein I. Thyroid Hormone and the Cardiovascular System. *Med Clin N Am* 2012;96:257–68.

DaRocha-Souto B, Coma M, Perez-Nievas BG, Scotton TC, Siao M, Sanchez-Ferrer P et al. Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates beta-amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2012;45:425–37.

Davis AA, Fritz JJ, Wess J, Lah JJ, Levey AI. Deletion of M1 muscarinic acetylcholine receptors increases amyloid pathology in vitro and in vivo. *J Neurosci* 2010;30:4190–6.

De Burbure C, Buchet JP, Bernard A, Leroyer A, Nisse C, Haguenoer JM et al. Biomarkers of renal effects in children and adults with low environmental exposure to heavy metals. *J Toxicol Environ Health* 2003;66:783-98.

Del Pino J, Díaz MJ, Moyano P, Frejo MT, Gómez G, Anadón MJ et al. Cadmium induces cholinergic transmission disruption in SN56 cholinergic neurons from basal forebrain. *J Clin Toxicol* 2016a;6:6.

Del Pino J, Zeballos G, Anadon MJ, Capo MA, Díaz MJ, Garcia J et al. Higher sensitivity to cadmium induced cell death of basal forebrain cholinergic neurons: a cholinesterase dependent mechanism. *Toxicology* 2014;325:151-9.

Del Pino J, Zeballos G, Anadón MJ, Moyano P, Díaz MJ, García JM et al. Cadmium-induced cell death of basal forebrain cholinergic neurons mediated by muscarinic M1 receptor blockade, increase in GSK-3 $\beta$  enzyme,  $\beta$ -amyloid and tau protein levels. *Arch Toxicol* 2016b;90(5):1081-92.

Delpech P, Bornes S, Alaterre E, Bonnet M, Gagne G, Montel MC et al. Staphylococcus aureus transcriptomic response to inhibition by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing Lactococcus garvieae. *Food Microbiol* 2015;51:163–70.

Dell'Omo M, Muzi G, Piccinini R, Gambelunghe A, Morucci P, Fiordi T, et al. Blood cadmium concentrations in the general population of Umbria, central Italy. *Sci Total Environ* 1999;226:57–64.

Den Besten C, Bennik MH, Bruggeman I, Schielen P, Kuper F, Brouwer A et al. The role of oxidative metabolism in hexachlorobenzene-induced porphyria and thyroid hormone homeostasis: a comparison with pentachlorobenzene in a 13-week feeding study. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;119:181–94.

Díaz A, González-Estecha M, Trasobares Iglesias EM, Morales Bayle C, Fuentes Ferrer M, Fernández Pérez C. Cadmio en sangre y su relación con el consumo de tabaco en una población laboral hospitalaria. *Rev salud ambient* 2012;12(2):102-9.

Diaz-Hernandez M, Gomez-Ramos A, Rubio A, Gomez-Villafuertes R, Naranjo JR, Miras-Portugal MT et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau. *J Biol Chem* 2010;285:32539–48

Dohanich GP, Witcher JA, Weaver DR, Clemens LG. Alteration of muscarinic binding in specific brain areas following estrogen treatment. *Brain Res* 1982;241(2):347-50.

Dohi Y, Sugimoto K, Yoshikawa T, Ohgushi H, Katsuda T, Tabata S, Moriyama T. Effect of cadmium on osteogenesis within diffusion chambers by bone marrow cells: biochemical evidence of decreased bone formation capacity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;120:274-80.

Domínguez JF, Marchal JA, Correa A, Carrillo E, Boulaiz H, Aranega A et al. Synthesis and evaluation of new 5-FU antitumor cell differentiating derivatives. *Biorg Med Chem* 2003;11:315-23.

Dori A, Cohen J, Silverman WF, Pollack Y, Soreq H. Functional manipulations of acetylcholinesterase splice variants highlight alternative splicing contributions to murine neocortical development. *Cereb Cortex* 2005;15(4):419–30.

Dorian C, Gattone IIVH, Klaassen CD. Discrepancy between the nephrotoxic potencies of cadmium-metallothionein and cadmium chloride and the renal concentration of cadmium in the proximal convoluted tubules. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;130:161–8.

Dubois B, Mayo W, Agid Y, Le Moal M, Simon H. Profound disturbances of spontaneous and learned behaviours following lesions of the nucleus basalis magnocellularis in the rat. *Brain Res* 1985;338:249-58.

Dwivedi C. Cadmium-induced sterility: possible involvement of the cholinergic system. *Arch Environ Contam Toxicol* 1983;12:151–6.

Eaker SS, Hawles TS, Ramezani A, Hawley RG. Detection and enrichment of hematopoietic stem cells by side population phenotype. *Methods Mol Biol* 2004;263:161-80.

Ebadi M, Iversen PL, Hao R, Cerutis DR, Rojas P, Happe HK et al. Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem Int* 1995;27:1–22.

Ebadi M, Perini F, Mountjoy K, Garvey JS. Amino acid composition, immunoreactivity, sequence analysis, and function of bovine hippocampal metallothionein isoforms. *J Neurochem* 1996;66(5):2121-7.

Eichenbaum H, Otto T, Cohen NJ. Two functional components of the hippocampal memory system. *Behav Brain Sciences* 1994;17:449-518.

El-Boshy ME, Risha EF, Abdelhamid FM, Mubarak MS, Hadda TB. Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. *J Trace Elem Med Biol* 2015;29:104-10.

Elinder CG, Kjellström T, Lind B, Linnman L, Piscator M, and Sundstedt K. Cadmium exposure from smoking cigarettes: variations with time and country where purchased. *Environ Res* 1983;32:220-7.

Elinder CG, Lind B, Kjellstrom T, Linnman L, Friberg L. Cadmium in kidney cortex, liver, and pancreas from Swedish autopsies. Estimation of biological half time in kidney cortex, considering calorie intake and smoking habits. *Arch Environ Health* 1976;31:292-302.

Elliott AH, Nuzum FR. The urinary excretion of a depressor substance (Kallikrein of Frey and Kraut) in arterial hypertension. *Endocrinology* 1934;18:462-74.

Emanuel R. Essential Pathology. 3rd edition, Lippincot Williams&Wilkins.Chap.1. Cell injury 2001;P:1

Endo T, Kimura O, Sakata M. Effects of P-glycoprotein inhibitors on cadmium accumulation in cultured renal epithelial cells, LLC-PK1, and OK. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;185:166-71.

Erzen I, Zaletel-Kragelj L. Cadmium measurements in blood and hair of occupationally non-exposed military recruits and in the food of plants origin produced in Slovenia. *Croat Med J* 2003;44:538-44.

Erzen I, Zaletel-Kragelj L. Exposure assessment of male recruits in Slovenia to cadmium and lead due to biological monitoring. *J Expo Anal Environ Epidem* 2004;14: 385-90.

Esquifino AI, Seara R, Fernández-Rey E, Lafuente A. Alternate cadmium exposure differentially affects the content of gamma aminobutyric acid (GABA) and Taurine within the hypothalamus, median eminence, striatum and prefrontal. *Arch Toxicol* 2001;75:127-33.

European Safety Authority (EFSA). Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on cadmium in food. *EFSA Journal* 2009;7(3):1831-4732.

European Safety Authority (EFSA). Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal* 2012;10:2551-88.

Evron T, Greenberg D, Mor TS, Soreq H. Adaptive changes exacerbate Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Am J Exp Toxicol* 2007;15(5):400–5.

Farchi N, Ofek K, Podoly E, Dong H, Xiang Y, -Y, Diamant S, Livnah O, Li J, Hochner B, Lu W, -Y, Soreq H: Peripheral Site Acetylcholinesterase Blockade Induces RACK1-Associated Neuronal Remodeling. *Neurodegener Dis* 2007;4:171-84

Fasitsas CD, Theocharis SE, Zoulas D, Chrissimou S, Deliconstantinos G. Time-dependent cadmium-neurotoxicity in rat brain synaptosomal plasma membranes. *Comp Biochem Physiol C* 1991;100:271-5

Fatur T, Tusek M, Falnoga I, Scancar J, Lah TT, Filipič M. Cadmium inhibits repair of UV-, methyl methanesulfonate- and N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 2003;529:109–16.

Favorito R, Monaco A, Grimaldi MC, and Ferrandino I. Effects of cadmium on the glial architecture in lizard brain. *Eur J Histochem* 2017;61:2734.

Fawcett JR, Bordayo EZ, Jackson K, Liu H, Peterson J, Svitak A, Frey WH. Inactivation of the human brain muscarinic acetylcholine receptor by oxidative damage catalyzed by a low molecular weight endogenous inhibitor from Alzheimer's brain is prevented by pyrophosphate analogs, bioflavonoids and other antioxidants. *Brain Res* 2002;950(1-2):10-20.

Fechner P, Damdimopoulou P, Gauglitz G. Biosensors paving the way to understanding the interaction between cadmium and the estrogenic receptor alpha. *PLoS ONE* 2011;6:e23048.

Fibiger HC. The organization and some projections of cholinergic neurons of the mammalian forebrain. *Brain Res Rev* 1982;4:327–8.

Figueiredo-Pereira ME, Yakushin S, Cohen G. Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells. *J Biol Chem* 1998;273(21):12703-9.

Filipič M, Fatur T, Vudrag M. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Human & Experimental Toxicology* 2006;25(2):67–77

Fini JB, Le MS, Turque N, Palmier K, Zalko D, Cravedi JP, Demeneix BA. An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ Sci Technol* 2007;41:5908-14.

Fisher A. Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: perspectives and challenges in treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2012;120(1):22–33.

Fisher AB., Gerorgieva R, Nikolova V, Halkova J, Bainova V, Hristeva V, Penkov D, Alandjisk D. Health risk for children from lead and cadmium near a non-ferrous smelter in Bulgaria. *Int J Hyg Environ Health* 2003;20:25-38.

Flamant F, Cheng SY, Hollenberg AN, et al. Thyroid Hormone Signaling Pathways: Time for a More Precise Nomenclature. *Endocrinology* 2017;158(7):2052-57.

Flora SJS, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res* 2008;128:501–23.

Fonnum, F. A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *Journal of Neurochemistry* 1975;24:407-9.

Ford BN, Ruttan CC, Kyle VL, Brackley ME, Glickman BW. Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis* 2000;21:1977–81.

Foster WG, Pentick JA, McMahon A, Lecavalier PR. Body distribution and endocrine toxicity of hexachlorobenzene (HCB) in the female rat. *J Appl Toxicol* 1993;13:79–83.

Fowler BA, Nordberg GF. The renal toxicity of cadmium-metallothionein: morphometric and X-ray microanalytical studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978;46:609–23.

Freitas J, Cano P, Craig-Veit C, Goodson ML, David FJ, Murk AJ. 2010. Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable in vitro reporter gene assay. *Toxicol In Vitro*.

Frery N, Nessmann C, Girard F, Lafond J, Moreau T, Blot P et al. Environmental exposure to cadmium and human birthweight. *Toxicology* 1993;79:109-80.

Friberg L. 1950 Health Hazards in the manufacture of alkaline accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning. *Acta Med Scand* 1950;138(240):1–124.

Friberg L, Kjellström T, Nordberg GF. Cadmium. Handbook on the toxicology of metals. Elsevier. 1986;2:130–84.

Friberg L, Vahter M. Assessment of exposure to lead and cadmium through biological monitoring: results of a UNEP/WHO global study. *Environ Res* 1983;30:95-128.

Friberg L, Piscator M, Nordberg G. Cadmium in the Environment. CRC Press Cleveland, USA. 1971.

Fujishiro H, Okugaki S, Kubota K, Fujiyama T, Miyataka H, Himeno S. The role of ZIP8 down-regulation in cadmium-resistant metallothionein-null cells. *J Appl Toxicol* 2009;29:367–73.

Gachot B, Poujeol P. Effects of cadmium and copper on zinc transport kinetics by isolated renal proximal cells. *Biol Trace Elem Res* 1992;35:93-103

Galazyn-Sidorczuk M, Brzóska 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. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 2011;26:46-52

Galloway CR, Lebois EP, Shagarabi SL, Hernandez NA, Manns JR. Effects of selective activation of m1 and m4 muscarinic receptors on object recognition memory performance in rats. *Pharmacology* 2014;93:57–64.

Garcia-Morales P, Saceda M, Kenney N, Kim N, Salomon DS, Gottardis MM et al. Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem* 1994;269:16896-901.

Garman RH. Histology of the central nervous system. *Toxicol Pathol* 2011;39:22–35.

Garza R, Puymirat J, Dussault JH. Influence of soluble environmental factors on the development of foetal brain acetylcholinesterase-positive neurons cultured in a chemically defined medium: comparison with the effects of L-tri-iodothyronine (L-T3). *Dev Brain Res* 1990;56:160-8.

Gaspa L, Madeddu R, Arena N, Alia FA, Fighetti MA, Alia EE. Osservazioni quantitative e qualitative di metallic mediante l'uso di un nuovo microscopio electronice. *IX Congr Soc It Biof Pure e Appl* 1991;109-11.

Ghelardini C, Galeotti N, Matucci R, Bellucci C, Gualtieri F, Capaccioli S, Quattrone A, Bartolini A. Antisense 'knockdowns' of M1 receptors induces transient anterograde amnesia in mice. *Neuropharmacology* 1999;38:339-48.

Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;213:282–90.

Gibbs RB. Fluctuations in relative levels of choline acetyltransferase mRNA in different regions of the rat basal forebrain across the estrous cycle: effects of estrogen and progesterone. *J Neurosci* 1996;16:1049–55

Gibbs RB, Wu D, Hersh LB, Pfaff DW. Effects of estrogen replacement on relative levels of ChAT, TrkA and nerve growth factor messenger RNAs in the basal forebrain and hippocampal formation of adult rats. *Exp Neurol* 1994;129:70–80

Giraldo E, Lloret A, Fuchsberger T, Vina J. Abeta and Tau toxicities in Alzheimer's are linked via oxidative stress-induced p38 activation: protective role of vitamin E. *Redox Biol* 2014;2:873–7.

Gkanti V, Stolakis V, Kalafatakis K, Liapi C, Zissis KM, Zarros A, Tsakiris S. Postnuclear supernatants of rat brain regions as substrates for the in vitro assessment of cadmium-induced neurotoxicity on acetylcholinesterase activity. *Biol Trace Elem Res* 2014;158(1):87–9.

Glaser T, Klöppel H, Hochrainer D. Bioavailability indicators of inhaled cadmium compounds. *Ecotoxicol Environ Saf* 1986;11:261-71.

Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, Lührs T, Aguzzi A. Human Prion Diseases: Molecular and Clinical Aspects. *Arch Neurol* 2005;62(4):545–52.

Glauser SC, Bello CT, Glauser EM. Blood cadmium levels in normotensive and untreated hypertensive humans. *Clin Exp Lancet* 1976;7:17-18.

Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain-I. *Journal of Neurochemistry* 1966;13:655-69.

Gobe G, Crane D. Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. *Toxicol Lett* 2010;198:49-55.

Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg DA. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol* 2006;10(1):22

Gómez-Ramos A, Díaz-Hernández M, Rubio A, Miras-Portugal MT, Avila J. Extracellular Tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 2008;37:673-81.

Gonçalves JF, Fiorenza AM, Spanevello RM, Mazzanti CM, Bochi GV, Antes FG et al. N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. *Chem Biol Interact* 2010;186(1):53-60.

Goulart-Silva FL, Serrano-Nascimento C, Texeira SS, Nunes MT. 2013. Triiodothyronine (T3) induces proinsulin gene expression by activating PI3K: possible roles for GSK-3 $\beta$  and the transcriptional factor PDX-1. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2013;121(1):14-9.

Govil PK, Sorlie JE, Murthy MN, Sujatha D, Reddy GLN, Rudolph-Lund K et al. Soil contamination of heavy metals in the Katedan Industrial Development Area, Hyderabad, India. *Environmental Monitoring and Assessment* 2008;140:313-23

Goyer RA. Toxic effects of metals. The basic Science of poisons. McGraw-Hill. New York. 2008:811-67.

Goyer RA, Cherian MG, Delaquerriere-Richardson L. Correlation of parameters of cadmium exposure with onset of cadmium-induced nephropathy in rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1984;5:89–100.

Goyer RA, Miller CR, Zhu SY, Victory W. Non-metallothionein-bound cadmium in the pathogenesis of cadmium nephrotoxicity in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989;101:232–44.

Graham ES, Woo KK, Aalderink M, Fry S, Greenwood JM, Glass M, Dragunow M. M1 muscarinic receptor activation mediates cell death in M1-HEK293 cells. *PLoS One* 2013;8:72011.

Greenberg DS, Toiber D, Berson A, Soreq H. Acetylcholinesterase variants in Alzheimer's disease: from neuroprotection to programmed cell death. *Neurodegener Dis* 2010;7(1-3):60-3.

Grisaru D, Pick M, Perry C, Sklan EH, Almog R, Goldberg I et al. Hydrolytic and nonenzymatic functions of acetylcholinesterase comodulate hemopoietic stress responses. *J Immunol* 2006;176(1):27-35.

Gupta R, Shukla RK, Chandravanshi LP, Srivastava P, Dhuriya YK, Shanker J et al. Protective Role of Quercetin in Cadmium-Induced Cholinergic Dysfunctions in Rat Brain by Modulating Mitochondrial Integrity and MAP Kinase Signaling. *Mol Neurobiol* 2017;54:4560-4583.

Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae* 2015;7(2):42-7.

Gutiérrez-Reyes EY, Albores A, Ríos C. Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone-induced metallothionein. *Toxicology* 1998;131(2-3):145-54.

Hagman U, Bruce A, Persson Le, Samuelson G, Sjölin S. Food habits and nutrient intake in childhood in relation to health and socio-economics conditions. *Acta Paediatr Scan* 1986;75:1-56.

Hagmar L, Bjork J, Sjodin A, Bergman A, Erfurth EM. Plasma levels of persistent organohalogen and hormone levels in adult male humans. *Arch Environ Health* 2001;56:138-43.

Hallgren S, Sinjari T, Hakansson H, Darnerud PO. Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice. *Arch Toxicol* 2001;75:200-8.

Hammond R, Gibbs RB. GPR30 is positioned to mediate estrogen effects on basal forebrain cholinergic neurons and cognitive performance. *Brain Res* 2011;1379:53-60

Hammouda F., Messaoudi I., El Hani J., Baati T., Saïd K., Kerkeni A. Reversal of cadmium-induced thyroid dysfunction by selenium, zinc, or their combination in rat. *Biol Trace Elem Res* 2008;126:194-203.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.

Hart BA, Lee CH, Shukla GS, Shukla A, Osier M, Eneman JD, Chiu JF. Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology* 1999;133:43-58

Hart BA, Potts RJ, Watkin RD. Cadmium adaptation in the lung- a double-edged sword? *Toxicology* 2001;160:65-70.

Hart RP, Rose CS, Hamer RM. Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. *J Clin Experim Neuropsych* 1989;11:933-43.

Härtl R, Gleinich A, Zimmermann M. Dramatic increase in readthrough acetylcholinesterase in a cellular model of oxidative stress. *J Neurochem* 2011;116:1088–96.

Hartmann M, Hartwig A. Disturbance of DNA damage recognition after UV irradiation by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 1998;19:617–21.

Hartwig A. Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights. *Biometals* 2010;23:951–60.

Hartwig A, Asmuß M, Blessing H, Hoffmann S, Jahnkem G, Khandelwal S et al. Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1179–84.

Hartwig A, Schwerdtle T. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicology Lett* 2002;127(1–3):47-54.

Harvey CB, Williams GR. Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid* 2002;12:441-6

Hassau MY, Kosanovic P, Fabim MA, Adem A, Petroianu G. Trace metal profiles in hair samples from children in urban and rural regions of the United Arab Emirates. *Vet Hum Toxicol* 2004;46:119-21.

Hawkes C, Jhamandas JH, Kar S. Selective loss of basal forebrain cholinergic neurons by 192 IgG-saporin is associated with decreased phosphorylation of Ser glycogen synthase kinase-3beta. *J Neurochem* 2005;95(1):263-72.

Hayashi H, Takayama K. Inhibitory effects of cadmium on the release of acetylcholine from cardiac nerve terminals. *Jpn J Physiol* 1978;28:333–45.

He L, Wang B, Hay EB, Nebert DW. Discovery of ZIP transporters that participate in cadmium damage to testis and kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;238:250–7.

Hedlund B, Bartfai T. The importance of thiol- and disulfide groups in agonist and antagonist binding to the muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* 1979;15(3):531-44.

Hedlund B, Gamarra M, Bartfai T. Inhibition of striatal muscarinic receptors in vivo by cadmium. *Brain Res* 1979;168:216–8.

Hellström L, Elinder CG, Dahlberg B, Lundberg M, Järup L, Persson B, Axelson O. Cadmium exposure and end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001;38:1001-8.

Henderson RF, Rebar AH, Pickrell JA, Newton GJ. Early damage indicators in the lung. III. Biochemical and cytological response of the lung to inhaled metal salts. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979;50:123-36.

Herlenius E, Lagercrantz H. Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. *Early Human Development* 2001;65:21-37.

Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasák M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull* 2001;55:133-145.

Hidalgo J, Borrás M, Garvey JS, Armario A. Liver, brain and heart metallothionein induction by stress. *J Neurochem* 1990;55:651-4.

Hidalgo J, Carrasco J. Regulation of the synthesis of brain metallothioneins. *Neurotoxicology* 1998;19:661-6.

Hideaki S, Yasutake A, Hirashima T, Takamura Y, Kitano T, Waalkes MP, Imamura Y. Strain difference of cadmium accumulation by liver slices of inbred Wistar-Imamichi and Fischer 344 rats. *Toxicology in Vitro* 2008;22:338-43

Hinkle PM, Kinsella PA, Osterhoudt KC. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *J Biol Chem* 1987;262:16333-7.

Hjorth-Simonsen A, Jeune B. Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J Comp Neurol* 1972;144:215-231.

Hofmann PJ, Schomburg L, Kohrle J. Interference of endocrine disrupters with thyroid hormone receptor-dependent transactivation. *Toxicol Sci* 2009;110:125-37

Hogervorst J, Plusquin M, Vangronsveld J, Nawrot T, Cuypers A, Van Hecke E. House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population. *Environ Research* 2007;103:30-7.

Hefti F, Hartikka J, Eckenstein F, Gnahn H, Heumann R, Schwab M. Nerve growth factor (NGF) increases choline acetyltransferase but not survival or fiber growth of cultured septal cholinergic neurons. *Neuroscience* 1985;14:55-68

Honegger P and Lenoir D. Triiodothyronine enhancement of neuronal differentiation in aggregating fetal rat brain cells cultured in a chemically defined medium. *Brain Research* 1980;1:425-34.

Iijima K, Otake T, Yoshinaga J, Ikegami M, Suzuki E, Naruse H et al. Cadmium, lead, and selenium in cord blood and thyroid hormone status of newborns. *Biol Trace Elem Res* 2007;119:10-8

Ishihara A, Nishiyama N, Sugiyama S, Yamauchi K. The effect of endocrine disrupting chemicals on thyroid hormone binding to Japanese quail transthyretin and thyroid hormone receptor. *Gen Comp Endocrinol* 2003;134:36–43.

Ishizaki A. On the so called Itai-itai disease. *J Jpn Med Soc* 1969;62:242–9.

Ivanova J, Petrova E, Kamenova K, Gluhcheva Y. 2017. Comparative effects of meso-2,3- dimercaptosuccinic acid, monensin, and salinomycin on cadmium-induced brain dysfunction in cadmium-intoxicated mice. *Interdiscip Toxicol* 2017;10(3):107-13.

Iwamuro S, Sakakibara M, Terao M, Ozawa A, Kurobe C, Shigeura, T et al. Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *Gen Comp Endocrinol* 2003;133:189–98.

Iwata K, Saito H, Moriyama M, Nakano A. Association between renal tubular dysfunction and mortality among residents in a cadmium-polluted area, Nagasaki Tohouku. *J Exp Med* 1991;164:93-102.

Iwata K, Saito H, Moriyama M, Nakano A. Follow up study of renal tubular dysfunction and mortality in residents of an area polluted with cadmium. *Br J Ind Med* 1992;49:736–7.

Jackson LW, Zullo MD, Goldberg JM. The association between heavy metals, endometriosis and uterine myomas among premenopausal women: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Hum Reprod* 2008;23:679–87.

Jagnytsch O, Opitz R, Lutz I, Kloas W. Effects of tetrabromobisphenol on larval development and thyroid hormone-regulated biomarkers of the amphibian *Xenopus laevis*. *Environ Res* 2006;101:340-8.

Jameson RR, Seidler FJ, Slotkin TA. Nonenzymatic functions of acetylcholinesterase splice variants in the developmental neurotoxicity of organophosphates: chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon, and diazinon. *Environ Health Perspect* 2007;15(1):65-70.

Järup L. Cadmium overload and toxicity. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(2):35-9.

Järup L, Afven T, Persson B, Toss G, Elinder CG. Cadmium may be a risk factor for osteoporosis. *Occup Environ Med* 1998;55:435-9.

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

Jeon CJ, Strettoi E, and Masland RH. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 1998;18:8936-46.

Jiang LF, Yao TM, Zhu ZL, Wang C, Ji LN. Impacts of Cd (II) on the conformation and self-aggregation of Alzheimer's Tau fragment corresponding to the third repeat of microtubule-binding domain. *Biochim Biophys Acta* 2007;11(21):24.

Jin T, Lu J, Nordberg M. Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. *Neurotoxicology* 1998;19:529–35.

Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, Al-Refai H, Taylor JA, Kunkel TA, Resnick MA, Gordenin DA. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet* 2003;34:326–9.

Johnson MD, Kenney N, Stoic A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G et al. Cadmium mimics in vitro effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med* 2003;9:1081-84

Jones, MM, Basinger, MA, Topping, RJ et al. Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid and sodium N-benzyl-N-dithiocarboxy-D-glucamine as antagonists for cadmium intoxication. *Arch Toxicol* 1988;62:29–36.

Jortner BS. The return of the dark neuron. A histological artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation. *NeuroToxicology* 2006;27(4):628-34.

Joseph P. Mechanism of cadmium carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;238:272-9.

Jubb KVF, Huxtable CR. The nervous system. Jubb, Kennedy & Palmer's pathology of domestic animals. 4th Edition. Academic Press, San Diego, California. 1993;1:267–439.

Jurasovic J, Cvitkovic P, Pizent A, Colak B, Telisman S. Semen quality and reproductive endocrine function with regard to blood cadmium in Croatian male subjects. *Biometals* 2004;17:735–43.

Kalaria RN and Prince AK. The effects of neonatal thyroid deficiency on acetylcholine synthesis and glucose oxidation in rat corpus striatum. *Dev Brain Res* 1985;20:271-9.

Kalariya NM, Wills NK, Ramana KV, Srivastava SK, Van Kuijk FJGM. Cadmium-induced apoptotic death of human retinal pigment epithelial cells is mediated by MAPK pathway. *Exp Eye Res* 2009;89:494–502.

Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, Mount HT. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatr Neurosci* 2004;29:427–41.

Kelly G. Peripheral metabolism of thyroid hormones: A review. *Altern Med Rev* 2000;5:306-33.

Kesner RP, Adelstein TB, Crutcher KA. Equivalent spatial location memory deficits in rats with medial septum or hippocampal formation lesions and patients with dementia of the Alzheimer's type. *Brain Cogn* 1989;9:289-300.

Khan A, Ikram M, Muhammad T, Park J, Kim MO. Caffeine Modulates Cadmium-Induced Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Cognitive Impairments by Regulating Nrf-2/HO-1 In Vivo and In Vitro. *J Clin Med* 2019;8(5):E680

Kille P, Hemmings A, Lunney EA. Memories of metallothionein. *Biochim Biophys Acta* 1994;1205(2):151-61.

Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 2005;81 302-13.

Kim HJ, Ahn HJ, Lee S, Kim JH, Park J, Jeon SH, Kim SH. Intrinsic dorsoventral patterning and extrinsic EGFR signaling genes control glial cell development in the Drosophila nervous system. *Neuroscience* 2015;307:242-52

Kirschvink N, Martin N, Fievez L, Smith N, Marlin D, Gustin P. Airway inflammation in cadmium-exposed rats is associated with pulmonary oxidative stress and emphysema. *Free Radic Res* 2006;40:241-50.

Kjellström T. Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium. IARC. *Sci Publ* 1992;18:301-10.

Kitamura S, Jinno N, Suzuki T, Sugihara K, Ohta S, Kuroki H, Fujimoto N. Thyroid hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture. *Toxicology* 2005;208:377-87.

Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:267-94.

Klaassen CD, Liu J, Diwan BA Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;238:215-20.

Klaassen CD, Liu J. Role of metallothionein in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Drug Metab Rev* 1997;29:79–102.

Kobayashi J, Ikeda K, Sugiyama H. Cytotoxicity of Heavy Metals to A Thyroid Carcinoma Cell Line. *J Environ Anal Toxicol* 2017;7:1-3.

Kobayashi, E, Suwazono, Y, Uetani, M, Inaba T, Oishi M, Kido T et al. Association Between Lifetime Cadmium Intake and Cadmium Concentration in Individual Urine. *Bull Environ Contam Toxicol* 2005;74:817–21.

Kojima M, Kim JS, Uchimura H, Hirano M, Nakahara T, Matsumoto T. Effect of thyroidectomy on choline acetyltransferase in rat hypothalamic nuclei. *Brain Research* 1981;2:227-30

Kondoh M, Araragi S, Sato K, Higashimoto M, Takiguchi M, Sato M. Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60 cells. *Toxicology* 2002;170:111–7.

Kostial K, Kello D, Jugo S, Rabar I, Malijkovic T. Influence of age on metal metabolism and toxicity. *Environ Health Perspect* 1978;25:81-6.

Kotsonis FN and Klaasen CD. The relationship of metallothionein to the toxicity of cadmium after prolonged oral administration to rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978; 46:39-54.

Kovalchuk YP, Prischepa IV, Si U et al. Distribution of glial fibrillary acidic protein in different parts of the rat brain under cadmium exposure. *Ukr Biochem J* 2015;87(3):116-23.

Krichah R, Rhouma KB, Hallègue D, Tébourbi O, Joulin V, Couton D, Sakly M. Acute Cadmium Administration Induces Apoptosis in Rat Thymus and Testicle, but not Liver. *Polish Journal of Environmental Studies* 2003;12(5):589-94.

Kudo Y, Yamauchi K. In vitro and in vivo analysis of the thyroid disrupting activities of phenolic and phenol compounds in *Xenopus laevis*. *Toxicol Sci* 2005;84: 29–37.

Kwakowsky A, Potapov K, Kim S, Peppercorn K, Tate WP, Abraham IM. Treatment of beta amyloid 1-42 (A $\beta$ (1-42))-induced basal forebrain cholinergic damage by a non-classical estrogen signaling activator in vivo. *Sci Rep* 2016;6:21101

Lafuente A, Fernández-Rey E, Seara R, Pérez-Lorenzo M, Esquifino AI. Alternate cadmium exposure differentially effects amino acid metabolism within the hypothalamus, median eminence, striatum and prefrontal cortex of male rats. *Neurochem Int* 2001;39:187-92.

Lafuente A, González-Carracedo A, Romero A, Esquifino AI. Effect of cadmium on 24-h variations in hypothalamic dopamine and serotonin metabolism in adult male rats. *Exp Brain Res* 2003;149:200-8.

Låg M, Refsnes M, Lilleaas EM, Holme JA, Becher R, Schwarze PE. Role of mitogen activated protein kinases and protein kinase C in cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lungcells. *Toxicology* 2005;211:253–64.

Lahmy V, Meunier J, Malmstrom S, Naert G, Givalois L, Kim SH, Villard V, Vamvakides A, Maurice T. Blockade of Tau hyperphosphorylation and A $\beta$ <sub>1-42</sub> generation by the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX2-73, a mixed muscarinic and  $\sigma_1$  receptor agonist, in a nontransgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 2013;38(9):1706–23.

Lakshmana MK1, Raju TR. Endosulfan induces small but significant changes in the levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the developing rat brain and deficits in the operant learning performance. *Toxicology* 1994;91(2):139-50.

Lampe BJ, Park SK, Robins T, Mukherjee B, Litonjua AA, Amarasiriwardena C, M. Weisskopf, D. Sparrow, H. Hu. Association between 24-hour urinary cadmium and pulmonary function among community-exposed men: the VA normative aging study. *Environ Health Perspect* 2008;116:1226–30.

Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, Rogers JM, Grey BE, Stanton ME et al. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II: postnatal evaluation. *Toxicol Sci* 2003;74:382–92.

Lauder JM. Roles for neurotransmitters in development: possible interaction with drugs during the fetal and neonatal periods. *Prog Clin Bio l Res* 1985;163:375-80.

Lazarini CA, Florio JC, Lemonica IP, Bernardi MM. Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. *Neurotoxicol Teratol* 2001;23(6):665-73.

Lebel JM, Dussault JH, Puymirat J. Overexpression of the beta 1 thyroid receptor induces differentiation in neuro-2a cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(7):2644-8.

Lee YS, Danandeh A, Baratta J, Lin CY, Yu J, Robertson RT. Neurotrophic factors rescue basal forebrain cholinergic neurons and improve performance on a spatial learning test. *Exp Neurol* 2013;249:178–86.

Lehman J, Nagy JL, Atmadja S, Fibiger HC. The nucleus basalis magnocellularis: the origin of a cholinergic projection to the neocortex of the rat. *Neurosci* 1980;5:1161-74

Lemaire J, Van der Hauwaert C, Savary G, Dewaeles E, Perrais M, Lo Guidice JM, Cauffiez C. Cadmium-Induced Renal Cell Toxicity Is Associated with MicroRNA Deregulation. *International Journal of Toxicology* 2020;39(2):103-14

Levitt P, Eagleson KL, Chan AV, Ferri RT, Lillien L. Signaling pathways that regulate specification of neurons in developing cerebral cortex. *Dev Neurosci* 1997;19(1):6-8.

Li G, Klein J, Zimmermann M. Pathophysiological amyloid concentrations induce sustained upregulation of readthrough acetylcholinesterase mediating anti-apoptotic effects. *Neuroscience* 2013;240:349-60.

Li M, Kondo T, Zhao QL, Li FJ, Tanabe K, Arai Y et al. Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca<sup>2+</sup>-calpain and caspase-mitochondria-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275:39702-9

Li X, Lv Y, Yu S, Zhao H, Yao L. The effect of cadmium on A $\beta$  levels in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Ther Med* 2012;4(1):125–30.

Lichtenfels M, Dornelles ADS, Petry FDS, et al. The anticancer estrogen receptor antagonist tamoxifen impairs consolidation of inhibitory avoidance memory through estrogen receptor alpha. *J Neural Transm (Vienna)* 2017;124(11):1331-9

Liu J, Kershaw WC, Liu YP, Klaassen CD. Cadmium-induced hepatic endothelial cell injury in inbred strains of mice. *Toxicology* 1992;75(1):51-62.

Liu AKL, Lim EJ, Ahmed I, Chang RCC, Pearce RKB, Gentleman SM. Revisiting the human cholinergic nucleus of the diagonal band of Broca. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2018;44:647-62

Liu J, Liu Y, Habeebu SS, Klaassen CD. Susceptibility of MT-null mice to chronic CdCl<sub>2</sub> induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. *Toxicol Sci* 1998;46:197–203.

Liu C, Zhu Y, Lu Z, Guo W, Tumen B, He Y et al. Cadmium Induces Acute Liver Injury by Inhibiting Nrf2 and the Role of NF- $\kappa$ B, NLRP3, and MAPKs Signaling Pathway. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17(1).pii: E138.

Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:13612-17.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta$ C(T)) method. *Methods* 2001;25:402-8.

Lopez-Alonso, M, Montaña, F, Miranda, M, Castillo, C, Hernández, J, Benedito, J. Cadmium and lead accumulation in cattle in NW Spain. *Veterinary and human toxicology* 2003;45:128-30.

Luchese C, Brandao R, de Oliveira R, Nogueira CW, Santos FW. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. *Toxicol Lett* 2007;173(3):181-90.

Ludwin SK. Reaction of oligodendrocytes and astrocytes to trauma and implantation. *Lab Invest* 1985;52:20-30.

Luebker DJ, York RG, Hansen KJ, Moore JA, Butenhoff JL. Neonatal mortality from in utero exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) in Sprague-Dawley rats: dose-response, and biochemical and pharmacokinetic parameters. *Toxicology* 2005;215:149–69.

Luine VN, Khylichevskaya RI, McEwen BS. Effect of gonadal steroids on activities of monoamine oxidase and choline acetylase in rat brain. *Brain Res* 1975;86:293–306

Luine VN, Renner KJ, McEwen BS. Sex-dependent differences in estrogen regulation of choline acetyltransferase are altered by neonatal treatments. *Endocrinology* 1986;119:874–8

Luine VN, Rhodes JC. Gonadal hormone regulation of MAO and other enzymes in hypothalamic areas. *Neuroendocrinology* 1983;36:235-41.

Madeddu R, Solinas G, Forte G, et al. Diet and nutrients are contributing factors that influence blood cadmium levels. *Nutrition Research* 2011;31(9):691-7.

Madziar B, Lopez-Coviella I, Zemelko V, Berse B. Regulation of cholinergic gene expression by nerve growth factor depends on the phosphatidylinositol- 30-kinase pathway. *J Neurochem* 2005;92:767-79.

Maervoet J, Vermeir G, Covaci A, Van Larebeke N, Koppen G, Schoeters G, et al. Association of thyroid hormone concentrations with levels of organochlorine compounds in cord blood of neonates. *Environ Health Perspect* 2007;115:1780–6.

Mafrica F, Fodale V. Thyroid function, Alzheimer's disease and postoperative cognitive dysfunction: a tale of dangerous liaisons? *J Alzheimers Dis* 2008;14(1):95-105.

Mahdavi S, Khodarahmi P, Roodbari NH. Effects of cadmium on Bcl-2/ Bax expression ratio in rat cortex brain and hippocampus. *Hum Exp Toxicol* 2018;37(3):321-8

Malatesta P, Gotz M. Radial glia-From boring cables to stem cell stars. *Development* 2013;140:483–6

Manca D, Ricard AC, Trottier B, Chevalier G. Studies for lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology* 1991;67:303-23.

Mantha M, Jumarie C. Cadmium-induced hormetic effect in differentiated Caco-2 cells: ERK and p38 activation without cell proliferation stimulation. *J Cell Physiol* 2010;224:250–61.

Manton WI, Kirkpatrick JB , Cocinero JD. Does the choroid plexus really protect the brain from lead? *Lancet* 1984;2(8398):351.

Maodaa SN, Allam AA, Ajarem J, Abdel-Maksoud MA, Al-Basher GI, Wang ZY. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*, Apiaceae) juice against cadmium neurotoxicity in albino mice (*Mus musculus*). *Behav Brain Funct* 2016;12(1):6

Maret W, Valle BL. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:3478–82.

Martelli A, Rousselet E, Dycke C, Bouron A, Moulis JM. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* 2006;88:1807-14.

Martin P, Boulukos KE, Poggi MC, Pognonec P. Long-term extracellular signal-related kinase activation following cadmium intoxication is negatively regulated by a protein kinase C-dependent pathway affecting cadmium transport. *FEBS J* 2009;276:1667-79.

Martin MT, Brennan RJ, Hu W, Ayanoglu E, Lau C, Ren H et al. Toxicogenomic study of triazole fungicides and perfluoroalkyl acids in rat livers predicts toxicity and categorizes chemicals based on mechanisms of toxicity. *Toxicol Sci* 2007;97:595-613.

Martin P, Poggi MC, Chambard JC, Boulukos KE, Pognonec P. Low dose cadmium poisoning results in sustained ERK phosphorylation and caspase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;350:803-7.

McMillan PJ, Singer CA, Dorsa DM. The effects of ovariectomy and estrogen replacement on trkA and choline acetyltransferase mRNA expression in the basal forebrain of the adult female Sprague-Dawley rat. *J Neurosci* 1996;16:1860-5

Mendez-Armenta M, Rios C. Cadmium neurotoxicity. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007;23:350-8.

Méndez-Armenta M., Barroso-Moguel R, Villeda-Hernández J, Nava-Ruiz C, Ríos C. Histopathological alterations in the brain regions of rats after perinatal combined treatment with cadmium and dexamethasone. *Toxicology* 2001;161:189-199.

Mennicken F, Quirion R Interleukin-2 increases choline acetyltransferase activity in septal-cell cultures. *Synapse* 1997;26:175-183.

Meplan C, Richard MJ, Hainaut P. Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochem Pharmacol* 1999;59:25-33.

Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 2002;110:627-39.

Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, and Levey AI. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 1983;10:1185–201.

Miceli F, Minici F, Tropea A, Catino S, Orlando M, Lamanna G et al. Effects of nicotine on human luteal cells in vitro: a possible role on reproductive outcome for smoking women. *Biol Reprod* 2005;72:628-32.

Miettinen RA, Kalesnykas G, Koivisto EH. Estimation of the total number of cholinergic neurons containing estrogen receptor- $\alpha$  in the rat basal forebrain. *J Histochem Cytochem* 2002;50:891–902.

Mladenović J, Ognjanović B, Dorđević N, et al. Protective effects of oestradiol against cadmium-induced changes in blood parameters and oxidative damage in rats. *Arh Hig Rada Toksikol* 2014;65(1):37-46

Mohamed TM, Salama AF, El Nimr TM, El Gamal DM. Effects of phytate on thyroid gland of rats intoxicated with cadmium. *Toxicol Ind Health* 2015;31(12):1258-68.

Monaco A, Grimaldi MC, Ferrandino I. Neuroglial alterations in the zebrafish brain exposed to cadmium chloride. *J Appl Toxicol* 2016;36(12):1629-38

Montgomery, DL. Astrocytes: Form, Functions, and Roles in Disease. *Veterinary Pathology* 1994;31(2):145–67.

Moog NK, Entringer S, Heim C, Wadhwa PD, Kathmann N, Buss C. Influence of maternal thyroid hormones during gestation on fetal brain development. *Neuroscience* 2017;342:68-100.

Moore W Jr, Stara JF, Crocker WC, Malanchuk M, Iltis R. Comparison of <sup>115</sup>Cd retention in rats following different routes of administration. *Environ Res* 1973;6:473-8.

Mori K, Yoshida K, Hoshikawa S, Ito S, Yoshida M, Satoh M et al. Effects of perinatal exposure to low doses of cadmium or methylmercury on thyroid hormone metabolism in metallothionein-deficient mouse neonates. *Toxicology* 2006;228(1):77–84.

Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N et al. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:5185–90.

Morselt AF. Environmental pollutants and diseases. A cell biological approach using chronic cadmium exposure in the animal model as a paradigm case. *Toxicology* 1991;70(1):1-3.

Morrow H. Cadmium and Cadmium Alloys. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 5<sup>th</sup> ed. 2001; Vol. 4. New York: John Wiley & Sons, pp. 471–507.

Moskovkin GN, Kalman M, Kardos J, Yarigin KN, Hajos F. Effect of triiodothyronine on the muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity of developing rat brain. *Int J Neurosci* 1989;44:83-9

Moulis JM. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biometals* 2010;23:877–96.

Mousa SA. Expression of adhesion molecules during cadmium hepatotoxicity. *Life Sci* 2004;75:93–105.

Moyano P, de Frias M, Lobo M, Anadon MJ, Sola E, Pelayo A et al. Cadmium induced ROS alters M1 and M3 receptors, leading to SN56 cholinergic neuronal loss, through AChE variants disruption. *Toxicology* 2018a;1(394):54-62.

Moyano P, García JM, Lobo M, Anadón MJ, Sola E, Pelayo A et al. Cadmium alters heat shock protein pathways in SN56 cholinergic neurons, leading to A $\beta$  and phosphorylated Tau protein generation and cell death. *Food and Chemical Toxicology* 2018b;121:297-308.

Munisamy R, Norkhadijah Syed Ismail S, Praveena SM. Cadmium Exposure Via Food Crops: A Case Study of Intensive Farming Area. *American Journal of Applied Sciences* 2013;10(10):1252-62.

Murakami M, Cain K, Webb M. Cadmium-metallothionein-induced nephropathy: A morphological and autoradiographic study of cadmium distribution, the development of tubular damage and subsequent cell regeneration. *J Appl Toxicol* 1983;3:237.

Nair AR, Degheselle O, Smeets K, Van Kerkhove E, Cuypers A. Cadmium-induced pathologies: where is the oxidative balance lost (or not)? *Int J Mol Sci* 2013;14:6116–43.

Nakura A, Higuchi C, Yoshida K, Yoshikawa H. PKC $\alpha$  suppresses osteoblastic differentiation. *Bone* 2011;48:476–84.

Napoli I, Neumann H. Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Exp Neurol* 2009;225:24–28.

Nasiadek M, Danilewicz M, Sitarek K et al. The effect of repeated cadmium oral exposure on the level of sex hormones, estrous cyclicity, and endometrium morphometry in female rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018;25(28):28025-38.

Nava-Ruiz C, Méndez-Armenta M. Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch Neurocién (Mex)* 2011;16(3):140-7.

Navarro-Aviñó, J, Aguilar I, López, JR. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* 2007;16.

Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L et al. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *Lancet Oncol* 2006;7:119–26.

Nicaud P, Lafitte A, Gros A. Symptoms of chronic cadmium intoxication. *Arch Mal Prof Med Trav Secur Soc* 1942;4:192–202

Nicotra A, Schatten G. Propranolol, a beta-adrenergic receptor blocker, affects microfilament organization, but not microtubules, during the first division in sea urchin eggs. *Cell Motil Cytoskeleton* 1990;16(3):182-9.

Nicotra A, Senatori O. Some characteristics of mitochondrial monoamine oxidase activity in eggs of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol C* 1989;92(2):401-4.

Nie X, Chen Y, Chen Y, Chen C, Han B, Li Q et al. Lead and cadmium exposure, higher thyroid antibodies and thyroid dysfunction in Chinese women. *Environ Pollut* 2017;230:320-8.

Nieminen P, Lindstrom-Seppa P, Juntunen M, Asikainen J, Mustonen AM, Karonen SL et al. In vivo effects of bisphenol A on the polecat (*Mustela putorius*). *J Toxicol Environ Health A* 2002;65:933-45.

Nieminen P, Lindstrom-Seppa P, Mustonen AM, Mussalo-Rauhamaa H, Kukkonen JV. Bisphenol A affects endocrine physiology and biotransformation enzyme activities of the field vole (*Microtus agrestis*). *Gen Comp Endocrinol* 2002b;126:183-9.

Nishijo M, Nakagawa H, Morikawa Y, Tabata M, Senma M, Miura K, et al. A study of thyroid hormone levels of inhabitants of the cadmium-polluted Kakehashi River basin. *Nihon Eiseigaku Zasshi* 1994;49(2):598-605.

Nishimura N, Nishimura H, Ghaffar A, Tohyama CH. Localization of metallothionein in the brain of rat and mouse. *J Histochem Cytochem* 1992;40:309-15.

Nishimura RN, Dwyer BE. Evidence for different mechanisms of induction of HSP70i: a comparison of cultured rat cortical neurons with astrocytes. *Brain Res Mol* 1996;36(2):227-39.

Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 1992;258(5080):304-7.

Nogawa K, Honda R, Yamada Y, Kido T, Tsuritani I, Ishizaki M, Yamaya H. Critical concentration of cadmium in kidney cortex of humans exposed to environmental cadmium. *Environ Res* 1986;40(2):251-60.

Nogawa K, Kobayashi E, Konishi F. Comparison of bone lesions in chronic cadmium intoxication and vitamin D deficiency. *Environ Res* 1981;23:233-49.

Nomiyama K, Nomiyama H. Critical concentration of “unbound” cadmium in the rabbit renal cortex. *Experientia* 1986;42:149.

Nordberg GF, Friberg L, Elinder C, Kjellstrom T. Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal. 1985;Volume 1: Exposure, dose and metabolism. Boca Raton, FL. CRC Press.

Nordberg M, Nordberg FG. Toxicological aspects of metallothionein. *Cell Mol Biol* 2000;46:451-63.

Nriagu JO. Production, Uses, and Properties of Cadmium. Cadmium in the Environment. Part 1 Ecological Cycling. Nriagu JO. (Editor), Wiley and Sons, Toronto, Ont. 1980;35-70.

O'Barr SA, Oh JS, Ma C, Brent GA, et al. Thyroid hormone regulates endogenous amyloid-beta precursor protein gene expression and processing in both in vitro and in vivo models. *Thyroid* 2006;16(12):1207-13.

O'Connor TR. Purification and characterization of human 3-methyladenine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* 1993;21:5561-9.

O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map: preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Brain Res* 1971;34:171-5.

Oda Y. Choline acetyltransferase: The structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathology International* 1999;49:921-37

Ogoshi K, Nanzai Y, Moriyama T. Decrease in bone strength of cadmium-treated young and old rats. *Arch Toxicol* 1992;66:315-20.

Ohta H, Yamauchi Y, Nakakita M, Tanaka H, Asami S, Seki Y, Yoshikawa H. Relationship between renal dysfunction and bone metabolism disorder in male rats after long-term oral quantitative cadmium administration. *Indust Health* 2000;38:339-55.

Olsson IM, Bensryd I, Lundh T, Ottosson H, Skerfving S and Oskarsson A. Cadmium on the conformation and self-aggregation of Alzheimer's Tau on the proton gradient of synaptic vesicles and glutamate transport. *Neurochem Int* 2002;59:272-79.

Omotoso OD, Olumorin OI, Sunday A, Aderemi AS, Ogbonna E. Neuroprotective properties of Moringa Oleifera in cadmium and herbal alcoholic beverage induced frontal cortex damage in Wistar Rats. *Ind J Neurosci* 2019;5(4):206-13.

Osius N, Karmaus W, Kruse H, Witten J. Exposure to polychlorinated biphenyls and levels of thyroid hormones in children. *Environ Health Perspect* 1999;107:843-9.

Pacini S, Punzi T, Morucci G, Gulisano M, Ruggiero M. A paradox of Cadmium: A carcinogen that impairs the capability of human breast cancer cells to induce angiogenesis. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 2009;28(1):85-8

Pacyna JM, Pacyna EG. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environ Rev* 2001;9:269-98.

Palmitier RD, Findley SD, Withmore TE, Durnam DM. MT-III, a brain specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:6333-7.

Panickar KS, Norenberg MD. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia* 2005;50(4):287-98

Park SE, Kim ND, Yoo YH. Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Res* 2004;64:2652-5.

Patel AJ, Balizs R, Smith RM, Kingsbury AE, and Hunt A. Thyroid hormone and brain development, in *Multidisciplinary Approach to Brain Development* (Di Benedetto C., Balizs R., Gombos G., and Porcellati G., eds). 1980. pp. 261-277. Elsevier, Amsterdam.

Patel AJ, Hayashi M, and Hunt A. Elective persistent reduction in choline acetyltransferase activity in basal forebrain of the rat after thyroid deficiency during early life. *Brain Res* 1987; 422:182-5.

Patel AJ, Hayashi M, Hunt A. Role of thyroid hormone and nerve growth factor in the development of choline acetyltransferase and other cell-specific marker enzymes in the basal forebrain of the rat. *J Neurochem* 1988;50(3):803-11.

Patel A.J, Hayashi M, Hunt A, Balizs R. A specific interaction between the effects of nerve growth factor (NGF) and thyroid hormone on cholinergic neurones. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1986;12:611-2.

Pavia J, De Ceballos ML, Sanchez de la Cuesta F. Alzheimer's disease: relationship between muscarinic cholinergic receptors, beta amyloid and Tau proteins. *Fundam Clin Pharmacol* 1998;12(5):473-81.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press; 2013.

Pearce EN, Braverman LE. Environmental pollutants and the thyroid. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009;23(6):801-13

Pekny, M. and Pekna, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol* 2004;204:428-37.

Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: Update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol* 2013;2013:965212

Pendleton RG, Rasheed A, Roychowdhury R, Hillman R. A new role for catecholamines: ontogenesis. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19(7):248-51.

Persky V, Turyk M, Anderson HA, Hanrahan LP, Falk C, Steenport DN et al. The effects of PCB exposure and fish consumption on endogenous hormones. *Environ Health Perspect* 2001;109:1275-83.

Piłat-Marcinkiewicz B, Brzóska M, Sawicki B, Moniuszko-Jakoniuk J. Structure and function of thyroid follicular cells in female rats chronically exposed to cadmium. *Bull Vet Inst Pulawy* 2003;47:157-163

Prakash P, Kumar PG, Laloraya M, Javeri T, Parihar MS. Superoxide anion radical production as a cadmium-mediated mechanism of toxicity in avian thyroid: An electron spin resonance study by spin trapping. *Comp Biochem Physiol Part C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1997;118:89–95.

Prieto-Almeida F, Panveloski-Costa AC, Crunfli F, da Silva Teixeira S, Nunes MT, Torrão ADS. Thyroid hormone improves insulin signaling and reduces the activation of neurodegenerative pathway in the hippocampus of diabetic adult male rats. *Life Sci* 2018;192:253-8

Prouillet C, Mazière J, Mazière C, Wattel A, Brazier M, Kamel S. (2004). Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaepferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1307-13.

Provias JP, Ackerley CA, Smith C, Becker LE. Cadmium encephalopathy: a report with elemental analysis and pathological findings. *Acta. Neuropathol Berl* 1994;88:583-86.

Prozialeck WC, Edwards JR. Mechanisms of cadmium-induced proximal tubule injury: new insights with implications for biomonitoring and therapeutic interventions. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;343:2-12.

Rajanna B, Hobson M, Boykin M, Chetty CS. Effects of chronic treatment range of a lead smelting plant. *Nahrung* 1990;23(9–10):875-90.

Rani A, Kumar A, Lal A, Pant M. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International Journal of Environmental Health Research* 2014;24(4):378-99.

Rao DB, Little PB, Sills RC. Subsite awareness in neuropathology evaluation of National Toxicology Program (NTP) studies: a review of select neuroanatomical structures with their functional significance in rodents. *Toxicol Pathol* 2014;42(3):487–509.

Rasola A, Sciacovelli M, Chiara F, Pantic B, Brusilow WS, Bernardi P. (2010). Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of permeability transition. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:726–31.

Rawlings NC, Cook SJ, Waldbillig D. Effects of the pesticides carbofuran, chlorpyrifos, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2, 4-D, and pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. *J Toxicol Environ Health A* 1998;54:21–36.

Reale M, De Angelis F, Di Nicola M, Capello E, Di Ioia M, Luca G, Lugaresi A, Tata AM. (2012). Relation between pro-inflammatory cytokines and acetylcholine levels in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci* 2012;13:12656–64.

Regunathan A, Glesne DA, Wilson AK, Song J, Nicolae D, Flores T, Bhattacharyya MH. Microarray analysis of changes in bone cell gene expression early after cadmium gavage in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;191:272–93.

Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe* 1987;8:138–140.

Rennolds J, Butler S, Maloney K, Boyaka PN, Davis IC, Knoell DL, Parinandi NL, Cornet-Boyaka E. Cadmium regulates the expression of the CFTR chloride channel in human airway epithelial cells. *Toxicol Sci* 2010;116:349–58.

Renugadevi, J, Milton Prabu, S. Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective effect of naringenin. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2010;62(2):171-81.

Resende RR, Adhikari A. Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation. *Cell Commun Signal* 2009;7:20.

Richardson VM, Staskal DF, Ross DG, Diliberto JJ, DeVito MJ, Birnbaum LS. Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47, a major polybrominated diphenyl ether congener. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;226:244-50.

Rikans LE, Yamano T. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol* 2000;14:110–17.

Risso de Faverney C, Devaux A, Lafaurie M, Girard JP, Bailly B, Rahmani R. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquat Toxicol* 2001;53:65–76.

Robertson RT, Gallardo KA, Claytor KJ, Ha DH, Ku KH, Yu BP et al. Neonatal treatment with 192 IgG-saporin produces long-term forebrain cholinergic deficits and reduces dendritic branching and spine density of neocortical pyramidal neurons. *Cereb Cortex* 1998;8:142–155.

Rojo AI, Sagarra MR, Cuadrado A. GSK-3 $\beta$  down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem* 2008;105(1):92–202.

Romanque P, Cornejo P, Valdés S, Videla LA. Thyroid hormone administration induces rat liver Nrf2 activation: suppression by N-acetylcysteine pretreatment. *Thyroid* 2011;21(6):655-62

Rozman K, Gorski JR, Rozman P, Parkinson A. Reduced serum thyroid hormone levels in hexachlorobenzene-induced porphyria. *Toxicol Lett.* 1986;30:71–8.

Ruediger T, Bolz J. Neurotransmitters and the development of neuronal circuits. *Adv Exp Med Biol* 2007;621:104-15

Rusch GM, O'Grodnick JS, Rinehart WE. Acute inhalation study in rat of comparative uptake, distribution and excretion of different cadmium containing materials. *Am Ind Hyg Assoc* 1986;47:754-63.

Saldívar Osorio, L, Tovar Tovar, A, Fortoul van der Goes, T. Contaminantes inorgánicos: cadmio. 1997. México.

Salińska A, Włostowski T, Zambrzycka E. Effect of dietary cadmium and/or lead on histopathological changes in the kidneys and liver of bank voles *Myodes glareolus* kept in different group densities. *Ecotoxicology* 2012;21(8):2235-43.

Salmon A, Erb C, Meshorer E, Ginzberg D, Adani Y, Rabinovitz I et al. Muscarinic modulations of neuronal anticholinesterase responses. *Chem Biol Interact* 2005;157–158:105–13.

Santos SD, Verveer PJ, Bastiaens PI. Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat Cell Biol* 2007;9:324-30.

Sarchielli E, Pacini S, Morucci G, Punzi T, Marini M, Vannelli GB, Gulisano M. Cadmium induces alterations in the human spinal cord morphogenesis. *Biometals* 2012;25(1):63–74.

Sarkar A, Ravindran G, Krishnamurthy V. A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level. *Int J Biotech* 2013; 3:17–36.

Sarkar PK, Ray AK. Involvement of L-triiodothyronine in acetylcholine metabolism in adult rat cerebrocortical synaptosomes. *Horm Metab Res* 2001;33(5):270-5.

Sarkar S, Yadav P, Bhatnagar D. Cadmium induced lipid peroxidation and the antioxidant system in rat erythrocytes: the role of antioxidants. *J Trace Elem Med Biol* 1997;11(1):8-13.

Saroj VK, Nakade UP, Sharma A et al. Dose-Dependent Differential Effects of In Vivo Exposure of Cadmium on Myometrial Activity in Rats: Involvement of VDCC and Ca<sup>2+</sup>-Mimicking Pathways. *Biol Trace Elem Res* 2017;181:272–80.

Sato M, Bremner I. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Rad Biol Med* 1993;14:325–37.

Sawano E, Takahashi M, Negishi T. and Tashiro, T. Thyroid hormone-dependent development of the GABAergic pre- and post-synaptic components in the rat hippocampus. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2013;31:751-61.

Scoville WB, Milner BM. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1957;20:11-21

Scollon EJ, Carr JA, Cobb GP. The effect of flight, fasting and p,p'-DDT on thyroid hormones and corticosterone in Gambel's white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelli*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2004;137:179-89.

Scheiderer CL, Mc Cutchen E, Thacker EE, Kolasa K, et al. Sympathetic sprouting drives hippocampal cholinergic reinnervation that prevents loss of a muscarinic receptor-dependent long-term depression at CA3-CA1 synapses. *J Neurosci* 2006;26:3745–56.

Schliebs R. Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease—interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. *Neurochem* 2005;30:895–908.

Schell LM, Gallo MV, Denham M, Ravenscroft J, DeCaprio AP, Carpenter DO. Relationship of thyroid hormone levels to levels of polychlorinated biphenyls, lead, p,p'-DDE, and other toxicants in Akwesasne Mohawk youth. *Environ Health Perspect* 2008;116:806-13.

Schmutzler C, Gotthardt I, Hofmann PJ, et al. Endocrine disruptors and the thyroid gland—a combined in vitro and in vivo analysis of potential new biomarkers. *Environ Health Perspect*. 2007;115 Suppl 1(Suppl 1):77-83.

Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;127:204-15.

Seacat AM, Thomford PJ, Hansen KJ, Clemen LA, Eldridge SR, Elcombe CR, Butenhoff J. Sub-chronic dietary toxicity of potassium perfluorooctanesulfonate in rats. *Toxicology* 2003;183:117–31.

Seyedhosseini TSM, Beirami E, Ahmadiani A, Dargahi L. Thyroid hormone treatment alleviates the impairments of neurogenesis, mitochondrial biogenesis and memory performance induced by methamphetamine. *NeuroToxicology* 2019;74:7-18.

Shati AA. Resveratrol protects against cadmium chloride-induced hippocampal neurotoxicity by inhibiting ER stress and GAAD 153 and activating sirtuin 1/AMPK/Akt. *Environ Toxicol* 2019;34(12):1340-53.

Shimada N, Yamauchi K. Characteristics of 3,5,3'-triiodothyronine (T3)-uptake system of tadpole red blood cells: Effect of endocrine-disrupting chemicals on cellular T3 response. *J Endocrinol* 2004;183:627-37.

Shimizu M and Morita S. Effects of fasting on cadmium toxicity, glutathione metabolism, and metallothionein synthesis in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1990;103(1):28-39.

Shughrue PJ, Scrimo PJ, Merchenthaler I. Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) in the cholinergic neurons of the rat basal forebrain. *Neuroscience* 2000;96:41–9

Shumilla JA, Wetterhahn KE, Barchowsky A. Inhibition of NF-kappa B binding to DNA by chromium, cadmium, mercury, zinc, and arsenite in vitro: evidence of a thiol mechanism. *Arch Biochem Biophys* 1998;349:356–62.

Sifakis S., Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: Effects on the male and female reproductive systems. *Environ Toxicol Pharmacol* 2017;51:56–70.

Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5(3):293–302.

Singh M, Meyer EM, Millard WJ, Simpkins JW. Ovarian steroid deprivation results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female Sprague-Dawley rats. *Brain Res* 1994;644:305–12

Smedman M, Potempska A, Rubenstein R, Ju W, Ramakrishna N, Denman RB. Effects of cadmium, copper, and zinc on beta APP processing and turnover in COS-7 and PC12 cells. Relationship to Alzheimer disease pathology. *Mol Chem Neuropathol* 1997;31(1):13-28.

Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009;32(12):638-47

Sofroniew MV, Pearson RCA, Powell TPS. The cholinergic nuclei of the basal forebrain of the rat: normal structure, development and experimentally induced degeneration. *Brain Res* 1987;411:310-31.

Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase: new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(4):294–302.

Squibb KS, Fowler BA. Intracellular metabolism and effects of circulating cadmium-metallothionein in the kidney. *Environ Health Perspect* 1984;54:31-5.

Stacey NH, Cantilena LR, Klaassen CD. Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980;53:470–80.

Sugawara, N and Sugawara C. Gastrointestinal absorption of Cd-metallothionein and cadmium chloride in mice. *Arch Toxicology* 1991;65:689-92.

Sugiyama S, Shimada N, Miyoshi H, Yamauchi K. Detection of thyroid system-disrupting chemicals using in vitro and in vivo screening assays in *Xenopus laevis*. *Toxicol Sci* 2005; 88:367–74.

Sun H, Shen OX, Wang XR, Zhou L, Zhen SQ, Chen XD. 2009. Anti-thyroid Hormone Activity of Bisphenol A, Tetrabromobisphenol A and Tetrachlorobisphenol A in an improved Reporter Gene Assay. *Toxicol In Vitro* 2009; 23(5):950-4

Taha EA, Sayed SK, Ghandour NM, Mahran AM, Saleh MA, Amin MM, Shamloul R. Correlation between seminal lead and cadmium and seminal parameters in idiopathic oligoasthenozoospermic males. *Cent Eur J Urol* 2013;66:84-92.

Takenaka S, Karg E, Kreyling WG, Lentner B, Schulz H, Ziesenis A, et al. Fate and toxic effects of inhaled ultrafine cadmium oxide particles in the rat lung. *Inhal Toxicol* 2004;16:83-92

Tallkvist J, Bowlus CL, Lönnerdal B. DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicol. Lett* 2001;122:171-7.

Tamagno E, Parola M, Bardini P, Piccini A, Borghi R, Guglielmotto M, et al. Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *J Neurochem* 2005;92(3):628–36.

Telisman S, Cvitkovic P, Jurasovic J, Pizent A, Gavella M, Rocic B. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc and copper in men. *Environ Health Perspect* 2000;108:45–53.

Thatcher RW, Lester ML, McAlaster R, Horst R. Effects of low levels of cadmium and lead on cognitive function in children. *Arch Environ Health* 1982;37:159-166.

Thévenod F. Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;238:221–39.

Thibodeaux JR, Hanson RG, Rogers JM, Grey BE, Barbee BD, Richards JH et al. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. I: maternal and prenatal evaluations. *Toxicol Sci* 2003;74:369–81.

Thompson J, Bannigan J. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod Toxicol* 2008;25(3):304–15.

Thompson CK, Cline HT. Thyroid Hormone Acts Locally to Increase Neurogenesis, Neuronal Differentiation, and Dendritic Arbor Elaboration in the Tadpole Visual System. *J Neurosci* 2016;36(40):10356-75

Tjälve H, Henriksson J. Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *NeuroToxicology* 1999;20(2-3):181-95.

Toiber D, Greenberg DS, Soreq H. Pro-apoptotic protein-protein interactions of the extended N-AChE terminus. *J Neural Transm* 2009;116(11):1435-42.

Toiber D, Soreq H. Cellular stress reactions as putative cholinergic links in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2005;30(6-7):909-19

Tonacchera M, Pinchera A, Dimida A, Ferrarini E, Agretti P, Vitti P. et al. Relative potencies and additivity of perchlorate, thiocyanate, nitrate, and iodide on the inhibition of radioactive iodide uptake by the human sodium iodide symporter. *Thyroid* 2004;14:1012–9.

Torres-Manzo AP, Franco-Colín M, Blas-Valdivia V, Pineda-Reynoso M, Cano-Europa E. Hypothyroidism Causes Endoplasmic Reticulum Stress in Adult Rat Hippocampus: A Mechanism Associated with Hippocampal Damage. *Oxid Med Cell Longev* 2018;20:2089404.

Traissard, N, Herbeaux, K, Cosquer, B et al. Combined Damage to Entorhinal Cortex and Cholinergic Basal Forebrain Neurons, Two Early Neurodegenerative Features Accompanying Alzheimer's Disease: Effects on Locomotor Activity and Memory Functions in Rats. *Neuropsychopharmacol* 2007;32: 851–71.

Trautz, F, Franke, H, Bohnert, S, Hammer, N, Müller, W, Stassart, R, Tse, R, Zwirner, J, Dressler, J, Ondruschka, B. Survival-time dependent increase in neuronal IL-6 and

astroglial GFAP expression in fatally injured human brain tissue. *Scientific Reports* 2019;9:11771.

Traver S, Salthun-Lassalle B, Marien M, Hirsch EC, Colparert F, Michel PP. The neurotransmitter noradrenaline rescues septal cholinergic neurons in culture from degeneration caused by low-level oxidative stress. *Mol Pharmacol* 2005;67(6):1882-91.

Turyk ME, Anderson HA, Persky VW. Relationships of thyroid hormones with polychlorinated biphenyls, dioxins, furans, and DDE in adults. *Environ Health Perspect* 2007;115:1197-1203.

Tzirogiannis, KN, Panoutsopoulos, GI, Demonakou, MD et al. Time-course of cadmium-induced acute hepatotoxicity in the rat liver: the role of apoptosis. *Arch Toxicol* 2003;77:694–701.

Vahter M, Berglund M, Nermell B, Åkesson A. Bioavailability of Cadmium from Shellfish and Mixed Diet in Women. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1996;136(2):332-41

Valcana T. Effect of neonatal hypothyroidism on the development of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activity in rat brain. In D.H. Ford (Ed.), *Influence of Hormones on The Nervous System*. S.Karger, Basel,1971;pp.174-84

Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005;12:1161–1208.

Van Kerkhove E, Pennemans V, Swennen Q. Cadmium and transport of ions and substances across cell membranes and epithelia. *Biometals* 2010;23:823–55.

Van Raaij JA, Frijters CM, van den Berg KJ. Hexachlorobenzene-induced hypothyroidism. Involvement of different mechanisms by parent compound and metabolite. *Biochem. Pharmacol* 1993a;46:1385–1391.

Van Raaij JA, Kaptein E, Visser TJ, Van den Berg KJ. Increased glucuronidation of thyroid hormone in hexachlorobenzene-treated rats. *Biochem. Pharmacol* 1993b;45:627–31.

Verougstraete V, Lison D, Hotz P. Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data. *J Toxicol Environ Health* 2003;6:227–55.

Vestergaard P, Shaikh ZA. The nephrotoxicity of intravenously administered cadmium-metallothionein: effect of dose, mode of administration and pre-existing renal calcium burden. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;126(2):240-7

Viarengo A, Nicotera P. Possible role of Ca<sup>2+</sup> in the heavy metal cytotoxicity. *Comp Biochem Physiol* 1991;100:81-4.

Villano I, Messina A, Valenzano A, Moscatelli F, et al. Basal Forebrain Cholinergic System and Orexin Neurons: Effects on Attention. *Front Behav Neurosci* 2017;11(10):1-11.

Voytko ML. Cognitive functions of the basal forebrain cholinergic system in monkeys: memory or attention? *Behavioural Brain Research* 1996;75(1-2):13-25

Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003;192:95–117.

Wallis K, Sjögren M, van Hogerlinden M, Silberberg G, Fisahn A, Nordström K et al. Locomotor Deficiencies and Aberrant Development of Subtype-Specific GABAergic Interneurons Caused by an Unliganded Thyroid Hormone Receptor  $\alpha 1$ . *Journal of Neuroscience* 2008;28(8)1904-15

Wang B, Du Y. Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxid Med Cell Longev* 2013;1-12.

Wang SH, Shih YL, Kuo TC, Ko WC, Shih CM. Cadmium toxicity toward autophagy through ROS-activated GSK-3 $\beta$  in mesangial cells. *Toxicol Sci* 2009;108:124–31.

Ward NL, Hagg T. BDNF is needed for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons in vivo. *Exp Neurol* 2000;162(2):297–310.

Wassmann S, Bäumer AT, Strehlow K et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2001;103(3):435-41

Watanabe H, Washizuka T, Komura S, et al. Genomic and non-genomic regulation of L-type calcium channels in rat ventricle by thyroid hormone. *Endocr Res* 2005;31(1):59-70.

Watkin RD, Nawrot T, Potts RJ, Hart BA. Mechanisms regulating the cadmium-mediated suppression of Sp1 transcription factor activity in alveolar epithelial cells. *Toxicology* 2003;184:157–78.

Weast RC. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 1985-1986. CRC Press. Inc, Boca Raton, Florida.

Webb M and Etienne AT. Studies on the toxicity and metabolism of cadmium-thionein. *Biochem Pharmacol* 1977;26:25

Weiss JM, Andersson PL, Lamoree MH, Leonards PE, van Leeuwen SP, Hamers T. Competitive binding of poly- and perfluorinated compounds to the thyroid hormone transport protein transthyretin. *Toxicol Sci* 2009;109:206–16.

WHO (World Health Organization). Environmental Health Criteria 135: Cadmium-Environmental Aspects. Geneva, Switzerland. 1992;156.

World Health Organization . World Health Report 2006—Working Together for Health. WHO; Geneva, Switzerland: 2006.

Williams GR. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *J Neuroendocrinol* 2008;20:784–94.

Wong KL, Klaassen CD. Neurotoxic effects of cadmium in young rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982;63:330-7.

Xing L, Boyce BF. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;328:709-20.

Xu X, Liu Y, Sadamatsu M, Tsutsumi S, Akaike M, Ushijima H, Kato N. Perinatal bisphenol A affects the behavior and SRC-1 expression of male pups but does not influence on the thyroid hormone receptors and its responsive gene. *Neurosci Res* 2007;58:149–55.

Yamano T, DeCicco LA, Rikans LE. Attenuation of cadmium-induced liver injury in senescent male fischer 344 rats: role of Kupffer cells and inflammatory cytokines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;162:68–75.

Yang XF, Fan GY, Liu DY, Zhang HT, Xu ZY, Ge YM, Wang ZL. Effect of Cadmium Exposure on the Histopathology of Cerebral Cortex in Juvenile Mice. *Biol Trace Elem Res* 2015;165:167–72

Yazbeck S. Thyroid Disorders During Pregnancy. *Med Clin N Am* 2012;96:235-56.

Ye X, Pierik FH, Hauser R, Duty S, Angerer J, Park MM et al. Urinary metabolite concentrations of organophosphorous pesticides, bisphenol A, and phthalates among pregnant women in Rotterdam, the Netherlands: the Generation R study. *Environ Res* 2008;108:260-7.

Yegambaram M, Manivannan B, Beach TG, Halden RU. Role of environmental contaminants in the etiology of Alzheimer's disease: a review. *Curr Alzheimer Res* 2015;12(2):116-46.

Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun* 2011;25:181-213

Yokel RA. Blood brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal induced neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 2006;10(2–3):223–53.

Yoshizuka M, Mori N, Hamasaki K, Tanaka I, Yokoyama M, Hara K et al. Cadmium toxicity in the thyroid gland of pregnant rats. *Exp Mol Pathol* 1991;55:97–104.

Youn CK, Kim SH, Lee do Y, Song SH, Chang IY, Hyun JW et al. Cadmium down-regulates human OGG1 through suppression of Sp1 activity. *J Bio Chem* 2005;280:25185–95.

Yu WG, Liu W, Jin YH. Effects of perfluorooctane sulfonate on rat thyroid hormone biosynthesis and metabolism. *Environ Toxicol Chem* 2009a;28:990–6.

Yu WG, Liu W, Jin YH, Liu XH, Wang FQ, Liu L et al. Prenatal and postnatal impact of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on rat development: a cross-foster study on chemical burden and thyroid hormone system. *Environ Sci Technol*. 2009b;43:8416-22.

Yuan Y, Jiang CY, Xu H, Sun Y, Hu FF, Bian JC et al. Cadmium-induced apoptosis in primary rat cerebral cortical neurons culture is mediated by a calcium signaling pathway. *PLoS One* 2013;8:e64330.

Yue L. Cadmium in tobacco. *Biomed Environ Sci* 1992;5:53-6.

Zang Y, Odwin-Dacosta S, Yager JD. Effects of cadmium on estrogen receptor mediated signaling and estrogen induced DNA synthesis in T47D human breast cancer cells. *Toxicol Lett* 2009;184:134–8.

Zarros A, Skandali N, Al-Humadi H, Liapi C. Cadmium (Cd) as a carcinogenetic factor and its participation in the induction of lung cancer. *Pneumon* 2008;21:172-7.

Zhang Y, Yu J, Bu X, Ren T, Liu X, Yao L. An essential role of discoidin domain receptor 2 (DDR2) in osteoblast differentiation and chondrocyte maturation via modulation of Runx2 activation. *J Bone Miner Res* 2011;26:604–17.

Zheng WH, Bastianetto S, Mennicken F, Ma W, Kar S. Amyloid beta peptide induces Tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience* 2002;115(1):201–11

Zheng F, Wess J, Alzheimer C. M-2 muscarinic acetylcholine receptors regulate long-term potentiation at hippocampal CA3 pyramidal cell synapses in an input-specific fashion. *Journal of neurophysiology* 2012;108:91-100

Zheyi H, Ye J, Yu R. 2007. Long-term cadmium exposure impairs activation of Nrf2-mediated defense mechanism. *Cancer Res May* 2007;67(9):4999

Zhou X, Hao W, Shi H, Hou Y, Xu Q. Calcium homeostasis disruption - a bridge connecting cadmium-induced apoptosis, autophagy and tumorigenesis. *Oncol Res Treat* 2015;38(6):311-5

Zoeller RT, Dowling AL, Vas AA. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls exerts thyroid hormone-like effects on the expression of RC3/neurogranin and myelin basic protein messenger ribonucleic acids in the developing rat brain. *Endocrinology* 2000;141:181–9.

