



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

**“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE MICRONUTRIENTES
Y TERAPIA DE QUELACIÓN EN LA INTOXICACIÓN
RENAL CON MERCURIO”**

T E S I S

Para obtener el título de:

LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta:

DAVID CRUZ VICTORIANO

Directora de tesis:

Dra. LETICIA G. NAVARRO MORENO

Codirector de tesis:

Dr. JESÚS BERNARDINO VELÁZQUEZ FERNÁNDEZ

Tuxtepec, Oaxaca. Octubre de 2021



Universidad del Papaloapan

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax. a 19 de septiembre del 2021
Asunto: Autorización de impresión de tesis

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
VICERRECTOR-ACADÉMICO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
P R E S E N T E

Sirva la presente para informarle que los miembros de la Comisión Revisora del trabajo de tesis del pasante de la Licenciatura en Ciencias Químicas CRUZ VICTORIANO DAVID con número de matrícula 10060001, revisó y aprobó el trabajo de investigación denominado "Efecto de la Administración de Micronutrientes y terapia de quelación en la en la intoxicación renal con mercurio" mismo que será presentado como prueba escrita del acto de recepción profesional, para obtener el Título de Licenciado en Ciencias Químicas.

Por lo anterior y de acuerdo a los lineamientos institucionales, se le da trámite legal para que proceda a su impresión el trabajo presentado.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta

BØu Lo-tama, chi ji jü

Dra. Roxana Martínez Pascual
Jefa de Carrera
Licenciatura en Ciencias Químicas



C.e.p. M. E. Yesenia Barreros Arenal, -Jefa de Servicios Escolares
C.e.p. David Cruz Victoriano, -sustentante
C.e.p. Dra. Leticia Navarro Moreno- asesora
C.e.p. archivo



Universidad del Papaloapan

Tuxtepec, Oaxaca a 22 de septiembre de 2021

ASUNTO: Designación de sinodales

M. E. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno CRUZ VICTORIANO DAVID (Matrícula 10060001) "Efecto de la Administración de Micronutrientes y terapia de quelación en la en la intoxicación renal con mercurio", para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en Ciencias Químicas, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.


El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dra. Alma Xochil Avila Alejandre	UNPA	Presidenta
Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno	UNPA	Vocal
Dr. Oscar Abelardo Ramirez Marroquín.	UNPA	Secretario
Dra. María de Jesús Santa Gutiérrez Ponce	UNPA	1 ^{er} Suplente
Mtra. Lina María Reyes Pérez	UNPA	2 ^o Suplente

Sin más por el momento, le envío cordiales saludos.

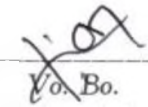
Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

Keubel Navarro
24 Sept 2021




UNPA
Dra. Roxana Martínez Pascual
Jefa de Carrera
Licenciatura en Ciencias Químicas
Universidad del Papaloapan


LIENCIATURA EN CIENCIAS QUÍMICAS
CAMPUS TUXTEPEC
C.e.p. Dra. Leticia G. Navarro Moreno—Directora de Tesis
C.e.p. David Cruz Victoriano, sustentante
C.e.p. Archivo de la Jefatura



Vo. Bo.
M. en C. Héctor López Arjona
Vicerrector Académico
Universidad del Papaloapan



UNPA
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú
OAXACA
VICE-RECTORIA
ACADEMICA



UNIVERSIDAD DEL
24 SET. 2021
DEPARTAMENTO DE SERVICIOS
ESCOLARES CAMPUS TUXTEPEC

Estamos espiritual y culturalmente paralizados, incapaces de enfrentarnos a la inmensidad, de aceptar que no somos el centro y de encontrar nuestro verdadero sitio en la estructura de la naturaleza. Maltratamos este planeta como si tuviésemos algún otro a donde ir. El hecho de que todavía hagamos ciencias es un atisbo esperanzador de salud mental, sin embargo, no basta con aceptar intelectualmente estos conceptos mientras nos aferramos a una ideología espiritual que no solo no tiene sus raíces en la naturaleza, sino que, en muchos aspectos, desprecia lo que es natural. La ciencia es un camino que conduce a niveles de conciencia de otro modo inaccesibles; que, llevando la contraria a la tendencia propia de nuestra cultura, la única gratificación que la ciencia nos niega es el engaño.



Ann Druyan.
Prólogo del libro
"La diversidad de la ciencia"
Carl Sagan, 2007

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios por darme una segunda oportunidad de vida, por darme fuerza en los momentos difíciles y la sabiduría que me brinda siempre.

Un agradecimiento muy especial a mis padres y a mi familia quienes me han brindado su apoyo incondicional y su cariño y por darme la oportunidad de formarme como profesionista, educarme y ser lo que hoy soy.

A mí asesora de tesis la Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno, por aceptarme y ser parte de su grupo de investigación, por su gran amistad aprendiendo mucho más que este trabajo, apoyo, confianza, asesoramiento, por la orientación y ayuda que me brindó para la realización de esta tesis, por la paciencia durante mi formación profesional. Por apoyarme en todos esos momentos que, por algún tiempo, pensé me alejarían de alcanzar este logro académico.

Quiero agradecer al Dr. Bernardino Velázquez Fernández por enseñarme que nunca hay que darse por vencido en la vida y por aceptarme como Co-asesor y por su valioso tiempo para que este trabajo se enriqueciera más.

A los sinodales: Dra. María de Jesús, Dra. Xochil, Dr. Oscar y Mtra. Lina María por corregir y orientarme para que este trabajo tuviera el crédito correspondiente.

También quiero agradecer de manera especial a la Familia Gutiérrez Cortes (al Profesor Silverio Gutiérrez Nolasco que Dios lo tenga en su santa gloria por abrirme las puertas de su casa y ser como un padre en mi vida dándome valores que tendré siempre presente en toda mi vida) y la familia Gutiérrez Jiménez por considerarme un miembro más en la familia y por todo el apoyo que me brindaron durante toda mi estancia tendiéndome la mano en los momentos buenos y malos para poder lograr este sueño de mi vida.

A la familia Guzmán Cortés por su gran amistad y apoyo que me brindan.

Agradezco de corazón a todos (as) mis amigos (as), compañeros (as) de aulas, compañeros de laboratorios, y por todos los buenos momentos que pasamos juntos.

De la misma manera quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas y a todos los profesores de la UNPA de las Licenciaturas en Ciencias Químicas, Ing. En Biotecnología, Ing. De Alimentos, Ciencias Empresariales y Lic. En Enfermería y a todo el personal de laboratorio que de alguna u otra manera colaboraron para el desarrollo de este trabajo.

*Agradezco el apoyo institucional de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec (UNPA), por la beca **PROMEP** clave **DSA/103.5/15/11096** otorgada y el financiamiento para concluir el trabajo.*

DEDICATORIA

La presente tesis va dedicada a mis abuelos: Juvencio+, Carmen+, Gregoria+ y Francisco+ que me han enseñado que la vida se gana a través de muchos sacrificios y que tus sueños se hacen una realidad si luchas todos los días sin importar de dónde eres o de donde vienes; todos (as) tenemos la misma oportunidad si la deseas con todo el corazón.

Dedico este trabajo, en especial, a los seres más maravillosos, mis padres: Medardo y Rufina gracias por los valores, la enseñanza, el amor, el cariño y por educarme, lo que es el tesoro más valioso para mí. Quiero que sepan que este logro también es suyo, siempre serán mi mayor fuerza y motor motivacional para cumplir cualquier meta que me proponga en el camino, porque a pesar que no terminaron ni la primaria supieron enseñarme, apoyarme y acompañarme siempre durante esta trayectoria para formarme y ser un profesionalista.

A mis familias: Cruz Martínez y Carlos Cruz por sus buenos consejos y motivación para superarme. A mis hermanos; Celerino por su apoyo para que saliera adelante, Mi Hermana Virginia por apoyarme en las buenas y las malas y a mi hermano Elías por no abandonarme y apoyarme siempre.

RESUMEN

Este trabajo está dirigido a la implementación de diversos esquemas de tratamiento orientados a contrarrestar los efectos tóxicos que el Mercurio inorgánico ejerce sobre la bioquímica y la fisiología renal.

La intoxicación con metales pesados representa un grave problema de salud, el cual se extiende cada vez más debido a que, de forma cada vez más frecuente, las personas viven en contacto directo con ellos por medio de la comida, el agua, el suelo, el aire, las fábricas, las actividades diarias, las exposiciones ocupacionales y no ocupacionales, entre otras cosas. Este problema no cuenta con algún tratamiento adecuado el cual pueda contrarrestar la gran variedad de efectos tóxicos que los metales pesados ocasionan en muchos organismos.

En el caso del Mercurio se han llevado a cabo algunos estudios con antioxidantes o con micronutrientes que han proporcionado resultados interesantes. Sin embargo, también se ha documentado la necesidad de implementar más experimentos relacionados con la atenuación, la prevención y el tratamiento de la gran variedad de efectos tóxicos que este metal ocasiona en el riñón. Se sabe que este padecimiento puede ser ocasionado por la presencia del Mercurio en el riñón. La Enfermedad Renal Crónica (ERC), es una de las 10 enfermedades de mayor mortalidad a nivel mundial y se relaciona directamente con la Diabetes Mellitus y las Enfermedades Cardiovasculares (ENSANUT, 2012). En relación con lo anterior el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) prevé que los pacientes con insuficiencia renal aumentarán del 1.1% en 2011 al 14.3% en 2050 (Hernández, 2019).

Debido a lo anterior y teniendo en cuenta el conocimiento de todo el daño que el Mercurio causa en los seres vivos, nació el interés de estudiar el efecto de posibles esquemas de tratamiento basados en el uso de un compuesto quelante (ácido dimercaptosuccínico, DMSA) y dos micronutrientes (Selenio y Zinc) sobre la intoxicación renal con Mercurio.

Dentro de los procesos toxicológicos existen indicadores de diferentes tipos, entre los cuales se encuentran los de exposición, los de susceptibilidad y aquellos que se relacionan directamente con algún efecto específico del agente tóxico. El grupo de investigación dirigido por la Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno en la Universidad del Papaloapan ha podido establecer, con base en estudios en animales y microorganismos expuestos a Plomo una relación entre la presencia del metal, el aumento de las Especies Reactivas de Oxígeno y la actividad de la enzima Glutación S-Transferasa (GST).

En este trabajo de Tesis se experimentó con ratas macho de la raza Wistar con peso promedio de 200 gramos. Se formaron diferentes grupos (intoxicados con Mercurio; tratados con un agente

quelante; tratados con micronutrientes y tratados con mezclas de los tres anteriores) incluyendo los controles necesarios. Los grupos estuvieron integrados por seis ratas.

En esta investigación se usó la actividad de la enzima como indicador de daño ocasionado por la intoxicación con xenobióticos en la presencia de Especies Reactivas de Oxígeno. También evaluaron las actividades de las enzimas Catalasa y Superóxido Dismutasa que forman parte del sistema antioxidante. Entre los resultados obtenidos se observó que el Mercurio genera el aumento de Especies Reactivas del Oxígeno y de la actividad de la enzima GST. Cuando se administraron los diferentes tratamientos se observó que el uso de los microelementos Selenio [35.45 ± 4.35 pmol/mg]; y Zinc [38.12 ± 4.39 pmol/mg], causaron la disminución de 15 y 12 unidades de Especies Reactivas de Oxígeno respectivamente en relación con el grupo intoxicado con Mercurio [50.66 ± 6.21 pmol/mg]; normalizaron la actividad de la enzima GST, así como la de las enzimas antioxidantes. Lo anterior se reflejó en la actividad fisiológica del riñón, la cual fue recobrada al usar la mezcla de los micronutrientes empleados. Los tratamientos con el agente quelante DMSA mostraron también resultados benéficos al ser administrado junto con el metal pesado [29.93 ± 38.63 pmol/mg], a comparación de cuando los animales son intoxicados solo por Mercurio [50.66 ± 6.21 pmol/mg]. Cuando se llevaron a cabo las determinaciones usando en forma conjunta los micronutrientes y el agente quelante se observó que, de forma general, existió una mejor protección contra el daño ocasionado por el metal.

Los resultados obtenidos pueden ampliar el panorama relacionado con posibles alternativas de tratamiento y resolver preguntas de investigación, aportando y contribuyendo a complementar el estudio de la importancia de conocer el papel de los micronutrientes y los agentes quelantes no agresivos (como el DMSA) para poder ayudar a disminuir los daños causados por la presencia excesiva de Mercurio en los seres vivos. En área de Salud, así como en las áreas Biológicas y la Bioquímica, estudios como los llevados a cabo en este trabajo podría contribuir a los mecanismos por los cuales los micronutrientes utilizados con o sin el agente quelante disminuirá el efecto tóxico del Mercurio en el riñón.

Se debe recordar que una falla metabólica conlleva a una o varias fallas fisiológicas que al final de cuentas conducen a la aparición de enfermedades, cuya intensidad dependerá de cuáles mecanismos celulares se hayan dañado. Al conocer lo anterior se podrán establecer posibles esquemas de ayuda para contrarrestar los daños ocasionados. Este trabajo se fundamentó en la idea anterior y en el afán de ayudar a comprender la enfermedad renal ocasionada por la exposición aguda a Mercurio.

ÍNDICE

Resumen

	Pág.
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1. CONTAMINANTES AMBIENTALES	2
1.1 Mercurio	2
1.2 Usos del Mercurio	3
1.3 Contaminación por Mercurio en México	4
1.3.1 <i>Ubicación: minerales que contienen las minas de Mercurio en México</i>	7
1.3.2 <i>Producción de Mercurio en México</i>	7
1.3.3 <i>Legislación, reglamentos y normas federales</i>	8
1.4 Métodos de detección.....	10
1.5 Mercurio en el ambiente	10
1.5.1 <i>Efectos de la intoxicación con Mercurio en los seres vivos</i>	12
1.6 Mercurio inorgánico en los organismos	12
1.7 Estrés Oxidativo	16
1.8 Toxicidad del Mercurio en células eucariontes	17
1.9 Tratamientos contra la intoxicación con Mercurio.....	19
1.9.1 <i>Terapia de quelación</i>	19
1.10 Ácido dimercaptosuccínico (DMSA)	19
1.10.1 <i>Uso de micronutrientes</i>	21
1.10.2 <i>Metabolismo del Selenio</i>	21
1.10.3 <i>Metabolismo del Zinc</i>	23
1.11 Distribución y transporte de Zinc	25
CAPÍTULO 2	26
ANTECEDENTES	26
2.1. Daño por estrés oxidativo	27
2.2. Zinc y estrés oxidativo.....	32
2.3. Protección del Selenio y el Zinc contra la toxicidad inducida por metales pesados.....	33
2.4. Selenio en la intoxicación con Mercurio	34
2.5. Zinc y la desintoxicación del Mercurio.....	34
CAPÍTULO 3	36
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
CAPÍTULO 4	38
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	38
4.1. Justificación.....	39
4.2. Hipótesis.....	41
CAPÍTULO 5	42

OBJETIVOS	42
5.1. General.....	43
5.2. Particulares	43
CAPÍTULO 6	44
METODOLOGÍA	44
6.1. Medición de proteínas en suero, orina y homogenizado de riñón por método de Lowry.....	46
6.2. Medición de la actividad de la GST en muestras de riñón, suero y orina.....	47
6.3. Medición de Especies Reactivas de Oxígeno en muestras de corteza renal	48
6.4. Medición de la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT).....	49
6.4.1. <i>Medición de la actividad de la enzima SOD</i>	49
6.4.2. Medición de la actividad de CAT	49
6.5. Examen General de Orina	50
CAPÍTULO 7	53
RESULTADOS.....	53
7.1. Grupo Control y expuesto a Mercurio.....	54
7.2. Grupos tratados con micronutrientes	58
7.3. Grupo intoxicado con Mercurio y tratado con micronutrientes.....	63
7.4 Grupos tratados con DMSA y micronutrientes.....	71
7.5 Grupos intoxicados con Mercurio y tratados con DMSA y micronutrientes Selenio y Zinc	76
CAPÍTULO 8	83
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	83
CAPÍTULO 9	98
CONCLUSIONES	98
PERSPECTIVAS.....	99
APÉNDICE	100
TRABAJOS DERIVADOS DE ESTA TESIS PRESENTADOS EN CONGRESOS.	100
CAPÍTULO 10	103
REFERENCIAS.....	103

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. <i>Propiedades físicas y químicas de Mercurio.</i>	5
Tabla 2. <i>Lugares de la República Mexicana más afectados por la contaminación de metales pesados e indican los principales metales contaminantes, la concentración del metal y la referencia correspondiente, (Modificado de Covarrubias, 2017).</i>	6
Tabla 3. <i>Producción de Mercurio en diferentes estados de la República Mexicano (Ramírez, 2000).</i>	8
Tabla 4. <i>Normatividad del Mercurio en México (Tomado de Ramírez et al., 2000).</i>	9
Tabla 5. <i>Grupos de los compuestos quelantes.</i>	19
Tabla 6. <i>Las diez principales causas de mortalidad a nivel nacional y regional (Tomada de INEGI, 2020-2021).</i>	40
Tabla 7. <i>Peso Corporal de los roedores al inicio y al final del tiempo de experimentación (n=6).</i>	54
Tabla 8. <i>Peso de riñones y relación peso corporal pesos de riñones (n=6).</i>	54
Tabla 9. <i>Examen general de orina de animales no expuestos y expuestos a Mercurio (n=6).</i>	55
Tabla 10. <i>Pesos corporales de los roedores al inicio y al final de la experimentación (n=6).</i>	59
Tabla 11. <i>Peso de riñones y relación peso corporal peso de riñones (n=6).</i>	59
Tabla 12. <i>Examen general de orina de grupos control y tratados con Selenio, Zinc y la mezcla de Selenio más Zinc (n=6).</i>	60
Tabla 13. <i>Peso corporal al inicio y al final de los animales expuestos a Mercurio y tratados con diferentes esquemas basados en el uso de Selenio y Zinc (n=6).</i>	64

Tabla 14. <i>Peso del riñon y relación peso corporal y peso del riñon de los grupos intoxicados con Mercurio y tratados con diferentes esquemas basados en los elementos Selenio y Zinc (n=6).</i>	65
Tabla 15. <i>Examen general de orina de los grupos intoxicados con Mercurio y tratados con diferentes esquemas basados en los elementos Selenio y Zinc (n=6).</i>	66
Tabla 16. <i>Determinación de la actividad de la enzima GST en muestras de suero y orina de ratas expuestas a Mercurio y tratadas con Selenio y Zinc en los diferentes esquemas (n=6).</i>	70
Tabla 17. <i>Pesos corporales del grupo control, DMSA y tratadas con micronutrientes (n=6).</i>	71
Tabla 18. <i>Pesos de riñones de los roedores expuestos a los diferentes esquemas de tratamientos (n=6).</i>	72
Tabla 19. <i>Examen general de orina de los grupos experimentales (n=6).</i>	73
Tabla 20. <i>Pesos Corporales de los Roedores de los diferentes grupos de estudio (n=6).</i>	77
Tabla 21. <i>Peso corporal del riñon en los diferentes grupos de estudio (n=6).</i>	77
Tabla 22. <i>Examen general de orina de los diferentes grupos de estudio (n=6).</i>	78

ÍNDICES DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Formas químicas del Mercurio y principales compuestos contaminantes (Español Cano, 2001).	3
Figura 2. Principales yacimientos naturales de Mercurio en México (Castro, 2013).	7
Figura 3. Ciclo del Mercurio en el medio ambiente (Modificado de Zahir et al., 2005).	11
Figura 4. Modelo tóxico cinético del Mercurio inorgánico (Tomado de Ramírez, 2008).	13
Figura 5. Mecanismo de entrada del Mercurio a células de túbulo proximal de riñón (Modificado de Zalups, 2017).	15
Figura 6. Metabolismo de DMSA en células de túbulo proximal de riñón (Modificada de Bridges, 2008).	20
Figura 7. Mecanismo catalítico de la Glutación Peroxidasa (Modificada de Casals et al., 2005).	23
Figura 8. Distribución y Transporte de Zinc en células epiteliales (Tomado de Terrés, 1999).	25
Figura 9. Etapas que conforman el proceso carcinogénico en presencia de radicales libres (Modificado de Valko, 2006).	28
Figura 10. Papeles de GSH en la de los grupos sulfhidrilo de proteínas (Modificado de Valko, 2006).	29
Figura 11. Acción antioxidante del Selenio cómo cofactor de enzimas antioxidantes (Modificado de Navarro, 2004).	30
Figura 12. En muestras de corteza renal contenido de Especies Reactivas de Oxígeno en grupo control y expuestos a 2.5 mg de Mercurio por kg de peso (n=6).	56
Figura 13. Actividad de a) Glutación S-Transferasa, b) Catalasa y c) Superóxido Dismutasa en homogenados de riñones de control y expuestos a 2.5 mg de Mercurio por kg de peso (n=6).	57

Figura 14. Actividad de la GST en a) suero y b) orina en roedores de control y expuestos a 2.5 mg de Mercurio por kg de peso (n=6).	58
Figura 15. Especies Reactivas de Oxígeno en riñones de ratas control y expuestas a micronutrientes (n=6)	61
Figura 16. Actividad de a) GST, b) CAT y c) SOD en homogenados de riñones de los grupos control y expuestos a micronutrientes (n=6).	62
Figura 17. Actividad de GST de (a) orina y (b) suero de los grupos de micronutrientes y el grupo control por kg de pesos.	63
Figura 18. Especies Reactivas de Oxígeno en riñones de ratas expuestas a Mercurio y tratadas con diversos esquemas de micronutrientes (n=6).	68
Figura 19. Actividad de a) GST, b) CAT y c) SOD en homogenados de riñones de los grupos intoxicados con Mercurio y tratadas con micronutrientes en kg de peso (n=6).	69
Figura 20. Especies Reactivas de Oxígeno de los grupos control y los grupos tratados con DMSA; más Selenio y DMSA más Zinc.	74
Figura 21. Actividad de Glutación S-Transferasa, Catalasa y Superóxido Dismutasa en homogenados de riñón de los diferentes grupos de estudio (n=6).	75
Figura 22. Actividad de la enzima GST en muestras de suero y orina de los grupos de estudios.	76
Figura 23. Especies Reactivas de Oxígeno en los grupos experimentales (n=6).	79
Figura 24. Actividad de Glutación S-Transferasa, Catalasa y Superóxido Dismutasa en homogeneizados de riñón de los diferentes grupos de estudio (n=6).	80
Figura 25. Actividad de GST en suero y orina de los grupos de experimentación (n=6).	82
Figura 26. Efectos de la exposición por vía oral a 2.5 mg/kg de Cloruro de Mercurio en ratas Wistar macho por un periodo de 15 días. (Fuente: elaboración propia).	87
Figura 27. Efectos de la exposición por vía oral a 2.5 mg/kg de Cloruro de Mercurio en la actividad de las enzimas CAT, SOD Y GST de riñón de ratas Wistar macho. (Fuente: modificado de Zalups, 2017).	87
Figura 28. Efectos del tratamiento con micronutrientes Selenio y Zinc sobre la exposición por vía oral a 2.5 mg/kg de Cloruro de Mercurio en ratas Wistar macho por un periodo de 15 días. (Fuente: elaboración propia).	

- Figura 29.** Efecto del tratamiento con Se y Zn en la actividad de las enzimas CAT, SOD y GST en células renales expuestas a Mercurio (Fuente: modificado de Zalups, 2017). 92
- Figura 30.** Efecto del tratamiento con Se más Zn en las enzimas CAT, SOD y GST en células renales expuestas a Mercurio (Fuente: modificado de Zalups, 2017). 92
- Figura 31.** Efecto del pre-tratamiento con Se más Zn en las enzimas CAT, SOD y GST en células renales expuestas a Mercurio (Fuente: modificado de Zalups, 2017). 93
- Figura 32.** Efectos del tratamiento con el quelante DMSA y los micronutrientes Selenio y Zinc sobre la exposición por vía oral a 2.5 mg/kg de Cloruro de Mercurio en ratas Wistar macho por un periodo de 15 días. (Fuente: elaboración propia). 96
- Figura 33.** Efecto del tratamiento con DMSA y los micronutrientes Se y Zn en las enzimas CAT, SOD y GST en células renales expuestas a Mercurio (Fuente: modificado de Zalups, 2017). 97

ABREVIATURAS

DMSA.	Ácido Dimercaptosuccínico, ácido meso 2,3-Dimercaptosuccínico
MT.	Metalotioneína
MP.	Metales Pesados
EROS.	Especies Reactivas de Oxígeno
SOD.	Superóxido Dismutasa
GST.	Glutación S-Transferasa
CAT.	Catalasa
Hg.	Mercurio
Se.	Selenio
Zn.	Zinc
Cd.	Cadmio
Pb.	Plomo
Cr.	Cromo
HgCl₂.	Cloruro de mercurio (II)
Hg (CNO)₂.	Fulminato de mercurio (II)
HgS₂.	Sulfuro de mercurio (II)
ERN o NOS.	Especies Reactivas de Nitrógeno
ADN.	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
EDTA.	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA.	Ácido etilenglicol tetra acético
BAPTA.	Ácido amino fenoxieteno tetracético
BAL.	2,3-dimecaprol (anti lewisita)
Mi-ADMS.	Ácido meso monoisoamil 2,3-dimercaptosuccínico
Mm ADMSA.	Ácido meso monometil 2,3-dimercapto succínico
Mch ADMSA.	Ácido meso monociclohexil 2,3-dimercapto succínico
DMPS.	Ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. Contaminantes ambientales

Hoy en día, se habla mucho sobre el tema de la contaminación ambiental ocasionada por elementos o compuestos que resultan ser muy tóxicos y dañinos para la salud de los seres vivos debido a que ya forman parte de los diferentes componentes de los ecosistemas y ello les ha facilitado el contacto directo con muchas de las formas vivientes del planeta. Muchos elementos y compuestos se han clasificado como contaminantes del medioambiente. Ellos se encuentran en los desechos industriales, los provenientes de los hogares y algunos que se forman como residuo de otras actividades humanas como la alfarería. Entre los contaminantes, que debido a su persistencia en el ambiente y su poca capacidad de biodegradación, clasificados como peligrosos se encuentran los metales pesados Plomo (Pb), Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg) entre otros.

1.1 Mercurio

El Mercurio se libera en el medio ambiente a partir de fuentes naturales y antropogénicas. Este metal se presenta en tres formas básicas: elemental, inorgánica y orgánica como se muestra en la Figura 1. Dependiendo de la dosis, la vía de entrada, las características fisicoquímicas del metal, el estado de salud de los individuos, así como su estado nutricional, los compuestos de mercurio pueden ser dañinos para los seres humanos. El metilmercurio es la forma más tóxica a la que los seres humanos pueden ser expuestos principalmente a través del consumo de pescados, mariscos y setas. Los hijos de las mujeres en edad fértil que consumen estos alimentos se encuentran en mayor riesgo. El comité de expertos de la Organización para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud han realizado estudios sobre los aditivos alimentarios y han establecido como ingesta semanal tolerable en mujeres embarazadas 1.6 miligramos del metal por kilogramo de peso corporal, afirmando que dicha cantidad puede ser tolerable y no afectar el desarrollo del feto (Ferrer Dufol, 2003).

El Mercurio circula de forma natural en la biosfera, en donde de 30,000 a 50,000 toneladas son producidas por la desgasificación de la corteza terrestre y los océanos. Además, 20,000 toneladas de Mercurio se liberan en el medio ambiente cada año a través de las actividades humanas, como la combustión a base de combustibles fósiles y las emisiones industriales. Aproximadamente 2,000 toneladas de Mercurio al año se producen para uso industrial, y una pequeña parte se utiliza para la síntesis de compuestos orgánicos de Mercurio. La producción mundial de Mercurio para usos comerciales ha ido disminuyendo lentamente en los últimos 20 años, debido a los problemas ambientales y de salud que ha provocado su presencia descontrolada en el medio ambiente. En la

actualidad existe una prohibición de la exportación de Mercurio desde la Unión Europea al resto del mundo (Español Cano, 2001).

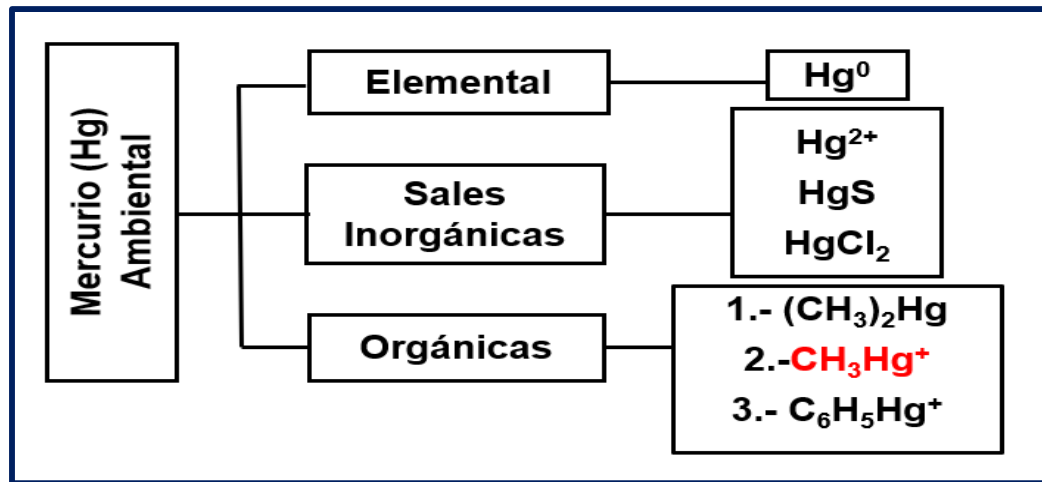


Figura 1. Formas químicas del Mercurio y principales compuestos contaminantes (Español Cano, 2001).

Las aguas superficiales ácidas pueden contener cantidades significativas de Mercurio. Cuando los valores de pH están entre cinco y siete, las concentraciones de Mercurio en el agua se incrementan debido a la movilización del metal en el suelo. Una vez que este elemento ha llegado a las aguas superficiales o a los suelos, los microorganismos lo pueden convertir en metilmercurio, una sustancia que puede ser absorbida rápidamente por la mayoría de organismos y que se sabe ocasiona daño severo al sistema nervioso central. Los peces son organismos que absorben grandes cantidades de metilmercurio de aguas superficiales cada día. Como consecuencia, el metilmercurio puede acumularse en peces y en las cadenas alimenticias en las que ellos forman parte. Por lo que el pescado contaminado constituye un problema muy grave en países industrializados.

1.2 Usos del Mercurio

El Mercurio (azogue) es el único metal líquido a las temperaturas usuales en la tierra. Es un metal de densidad elevada y color plateado. Mal conductor del calor, pero relativamente buen conductor de la electricidad. Por lo anterior posee un elevado uso en la industria, pero un mal manejo de residuos constituyéndolo, así como una gran fuente de contaminación ambiental.

El Mercurio metálico es tóxico por inhalación, ingestión o contacto, es por eso que está siendo reemplazado por otros compuestos menos tóxicos. Algunos ejemplos de compuestos de Mercurio que siguen usándose hasta el presente son los siguientes: Cloruro de Mercurio (HgCl_2), en medicina; Fulminato de Mercurio [$\text{Hg}(\text{CNO})_2$], que se emplea como detonador y es utilizado en explosivos; y

Sulfuro de Mercurio (II) (HgS) un pigmento de pintura de alto grado. Este metal posee otros usos dentro de varias industrias. Algunos ejemplos que ilustran las posibles consecuencias de su uso y su mal manejo al convertirse en residuo son los siguientes: a) Desde hace mucho tiempo el Cloruro de Mercurio (I) se usó como antihelmíntico, purgante y diurético mientras que el cloruro de Mercurio (II) fue empleado para curar la sífilis. Actualmente este último se usa como conservante de tejidos y catalizador de muchas reacciones químicas. En este caso el contacto es mayor con el ser humano y puede entrar al organismo de forma directa; b) El Mercurio líquido se ha utilizado en la fabricación de instrumentos de medición como termómetros y barómetros, aunque actualmente está siendo reemplazado en numerosos países. De esta forma el contacto se llevaba o se sigue llevando a cabo a través de la piel cuando alguno de estos instrumentos de medición se llega a romper (ATSDR, 1999).

La industria utiliza el Mercurio para la fabricación de electrodos líquidos utilizados en el proceso de fabricación de cloruro e hidróxido de sodio por electrólisis de salmuera. De la misma manera se usa para fabricar lámparas de vapor de Mercurio, lámparas fluorescentes y en motores de turbina, en la fabricación de rectificadores y termostatos. El óxido de Mercurio se usa en la fabricación de baterías secas de larga duración y como antiséptico. Como consecuencia de esta actividad, generalmente los vapores de Mercurio generados entran en contacto por vía respiratoria con los seres vivos. Los compuestos alquílicos de Mercurio siguen siendo usados en la agricultura como fungicidas y plaguicidas. Los compuestos fenil mercúricos se emplean como antisépticos en el tratamiento de maderas y granos (PNUMA, 2002).

En el pasado los compuestos de Mercurio se utilizaron como diuréticos, pero fueron reemplazados al haberse demostrado que producían daño renal. Finalmente, otro uso característico es su empleo en la preparación de amalgamas en odontología. Todos los usos anteriores aseguran la entrada de los compuestos del Mercurio por vías aérea, oral y cutánea (Español Cano, 2001). Actualmente se está reduciendo el uso de Mercurio en las amalgamas al emplear compuestos menos tóxicos. Las propiedades físicas y químicas del Mercurio responsables tanto de su demanda industrial como del daño que provoca en los seres vivos se muestran en la Tabla 1.

1.3 Contaminación por Mercurio en México

Se calcula que la contaminación mundial anual por metales pesados excede a la contaminación combinada por desechos radiactivos y orgánicos. Se han detectado valores tóxicos de metales pesados en las cercanías de sitios de desperdicio municipal e industrial y en diversos tipos de suelo, incluyendo los agrícolas. Siendo las minas las que generan todo tipo de metales y originan contaminación significativa de los suelos y aguas adyacentes.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de Mercurio.

Fuente: TermoFisher SCIENTIFIC, Ficha de Datos de Seguridad,2020.

CARACTERÍSTICA	
Estado físico	Líquido (fluido)
Color	Metálico
Umbral olfativo	Inodoro
Densidad	13.55 g/cm ³ a 20°C
Punto de fusión	-38.48 °C
Punto de ebullición	356.8 °C
Punto de inflamación	No aplicable
Radio iónico	0.11 nm
Presión de vapor	0.003 hPa a 25 °C
Densidad de vapor	6.93 (aire=1)
Tasa de evaporación	No existe datos disponibles
Hidrosolubilidad	Prácticamente insoluble
Estados de valencia	Hg ⁰ , Hg ⁺¹ , Hg ⁺²
Entalpía	2.295 KJ/mol
Propiedades explosivas	No se clasifica como explosiva

Uno de los sitios afectados por la contaminación de metales pesados es la laguna “La Zacatecana”, en el municipio de Guadalupe, Zacatecas. En esta zona desde la época virreinal hasta 1900 fueron depositados a través de los ríos que desembocaban en el área, los desechos del proceso de amalgamación de la plata, los cuales contenían altas concentraciones de Plomo, Arsénico y Mercurio (Santos-Santos et al. 2006). Estos desechos se acumularon en la laguna la cual se deseca completamente durante una época del año y es aprovechada para la agricultura, representando un posible vector de contaminación. Cálculos recientes estiman que a la fecha existen en el lugar entre 10 y 20 millones de toneladas de residuos mineros acumulados (Zetina-Rodríguez 2012). Actualmente en esta zona se cultivan importantes productos agrícolas de consumo humano como frijol y maíz, sobre los cuales existen reportes que indican la acumulación de Arsénico y Plomo (González-Dávila et al. 2012). Asimismo, se ha reportado la presencia de niveles elevados de Plomo y Cadmio en sangre, así como Arsénico en orina de niños del lugar (Trejo-Acevedo et al. 2009).

Respecto a los ambientes acuáticos, se ha reportado la acumulación de Mercurio en peces de consumo humano, en algunos casos se han encontrado concentraciones mayores a los límites establecidos en las normas nacionales (1 mg/kg) como es el caso específico del tiburón (García-Hernández et al. 2007). Otro ejemplo, es lo reportado por Velasco (Velasco-González et al. 2001) quién, al analizar la concentración de Mercurio en seis diferentes marcas de atún enlatado producido en México, encontraron que el 36 % de las muestras rebasaron la concentración de metal establecida por las normas mexicanas. En la Tabla 2 se mencionan casos reportados en la literatura donde existe una problemática por contaminación con metales pesados.

Tabla 2. Lugares de la República Mexicana más afectados por la contaminación de metales pesados e indican los principales metales contaminantes, la concentración del metal y la referencia correspondiente, (Modificado de Covarrubias, 2017).

Lugar	Estado	Metal	Afectación	Referencia
San Felipe, Nuevo Mercurio	Zac	Hg	En suelos (1569 mg/kg) y orina de niños (29.6 µg/gcrt)	Costilla-Salazar et al. 2010
San Joaquín, Sierra Gorda	Qro		En suelo (300 mg/kg) y cultivos de maíz	Martínez-Trinidad 2013, Hernández-Silva et al. 2012
Río Coatzacoalcos	Ver		En agua del río (6.96 mg/L)	Villanueva y Botello 1992
Sistema Lagunar Alvarado	Ver		Acumulación de baja a moderada personas por ingesta de mariscos	Guentzel et al. 2007
Zimapán	Hgo	As	En acuífero (1.09 mg/L), suelos (14 700 mg/kg), en cabello de personas (8.55 mg/kg)	Ongley et al. 2007, Armienta et al. 1997, Espinosa et al. 2009, Armienta et al. 2000
Santa María	SLP		En suelos (300 mg/kg)	Castro-Larragoitia et al. 1997
Villa de la Paz	SLP		En suelos (7200 mg/kg), agua (5.9 mg/L)	Razo et al. 2003, Yañez et al. 2003,
Milpillas, Minatitlán	SLP, Ver	Pb	En sangre de niños (SLP: 5.6 µg/dL, Ver: 5.5 µg/dL)	Trejo-Acevedo et al. 2009
Varias comunidades	Chih, SLP, Tlax		En suelos (400 mg/kg), en sangre de niños (Tlax: 52.3 µg/dL)	Flores-Ramírez et al. 2012
Vetagrande	Zac		En sangre de niños (>10 µg/dL)	González-Valdez et al. 2008
León	Gto	Cr	En suelos (12.960 mg/kg de Cr (III), 65.14 mg/ kg de Cr (VI))	Mauricio-Gutiérrez et al. 2010, Armienta et al. 1996, Robles-Camacho y Armienta 2000

Lo anterior resulta un indicativo de que el mal manejo de los residuos producidos por la industrialización de este metal podría tener un impacto negativo en todos los miembros vivientes de los ecosistemas, tomando en cuenta que el Mercurio es un metal no esencial del cual no se han reportado acciones fisiológicas en las células.

1.3.1 Ubicación: minerales que contienen las minas de Mercurio en México

Veintiún estados de la República Mexicana poseen yacimientos naturales de minerales que contienen Mercurio, sobre todo en las regiones del noroeste y centro-occidente de México. En estos yacimientos es posible encontrar: metacínabrio, onofrita, cinabrio, amalgama, livingstonita, guadalcazarita (metacínabrio con 4% de Zinc), montroyedita, terlinguaita, eglestonita y Mercurio nativo, presente en cantidades menores en forma de pequeños glóbulos líquidos alojados en lo alto de las grietas o en orificios de las menas de Mercurio. La Figura 2 muestra lo anterior.



Figura 2. Principales yacimientos naturales de Mercurio en México (Castro, 2013).

1.3.2 Producción de Mercurio en México

Los minerales de Mercurio se encuentran localizados principalmente en las siguientes entidades federativas (en particular en el noroeste y centro este del territorio nacional): Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, México, Morelos, Nuevo León, Querétaro, San

Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Zacatecas, ubicándose los principales yacimientos en los estados de San Luis Potosí, Zacatecas, Querétaro, Guanajuato y Guerrero. La Figura 2 muestra los principales yacimientos de Mercurio en la República Mexicana (Castro 2013). Se tienen registros de la producción de Mercurio en México desde 1891, y en los últimos años ha mostrado la misma tendencia descendente que la producción mundial. Entre 1920-1929 su producción fue mínima y alcanzó su máximo de 1,118 toneladas en 1942; en 1991 se produjeron 340 toneladas de Mercurio, mientras que en 1994 sólo 11 toneladas. Durante los últimos años en que se produjo Mercurio en nuestro país, se realizó principalmente en los estados de Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas. Sin embargo, la producción secundaria de Mercurio ha continuado, en particular, al recuperarlo como subproducto de la extracción de plata y oro a partir de jales mineros en el estado de Zacatecas, donde se producen alrededor de 20 toneladas anuales. Entre las plantas productoras de minerales metálicos registradas en la Cámara Minera de México, se aprecia la existencia de cuatro plantas que se dedican a producir Mercurio (de manera secundaria) a partir del beneficio de minerales y de jales de Mercurio, las cuales se encuentran ubicadas en los estados de San Luis Potosí, Durango y Zacatecas. La Tabla 3 muestra la producción de Mercurio en los diferentes estados de la República Mexicana.

Tabla 3. Producción de Mercurio en diferentes estados de la República Mexicana (Ramírez, 2000).

Estado	Minas que Producen Solo Hg	Minas que Producen Hg y otros metales	Minas que producen Hg
Chihuahua	6	1	7
Durango	6	9	15
Estado de México	2		2
Guanajuato	1		1
Guerrero	1	3	4
Querétaro	14	3	17
San Luis Potosí	18		18
Zacatecas	18	1	19
Total	66	17	83

1.3.3 Legislación, reglamentos y normas federales

La percepción de los riesgos del Mercurio no ha sido muy amplia en México, y aún no se han desarrollado normas muy precisas en cuanto al manejo de productos específicos. Sin embargo, hay elementos en las leyes que derivan de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, que permiten regular los usos y manejos de este contaminante. La Tabla 4 muestra la normatividad del Mercurio en México.

Tabla 4. Normatividad del Mercurio en México (Tomado de Ramírez et al., 2000).

Ley	Reglamento	Normas Oficiales Mexicanas	Entidad Responsable
Ley General del equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA)	Reglamento de Residuos Peligrosos	NOM-052-ECO-1993	SEMARNAP, INE, PROFEPA.
Ley de aguas de Salud	Reglamento de aguas Nacionales	NOM-031-ECOL-1993 NOM-071-ECOL-1994	SEMARNAP, INE, PROFEPA.
Ley General de Salud	Reglamento para el control sanitario de las actividades. Establecimientos, productos y servicios	NOM-010-STPS-1994	SSA
Ley Federal del Trabajo	Reglamento, Seguridad, Higiene y Medio ambiente del Trabajo	NOM-010-STPS-1994	STPS
Ley Federal Sanidad y Animal		NOM-016-ZOO-1994	SAGAR
Ley de caminos, puentes y autotransportes Federal	Reglamento para transportes terrestres de materiales y residuos peligroso	NOM.002-SCT2/1994	STC
Ley Federal de Armas y Explosivos	Reglamento de Armas y Explosivos	No existe un reglamento oficial mexicano. Sin embargo, el Art. 41 indica que el fulminato de mercurio está sujeto a los reglamentos de la secretaría de la Defensa Nacional	SEDENA
Ley de industrias mineras	Reglamento para actividades Mineras	No existe un reglamento oficial mexicano. Sin embargo, el Art. 41 indica que el fulminato de mercurio está sujeto a los reglamentos de la secretaría de la Defensa Nacional	SECOFI

De las leyes y los reglamentos, se derivan las Normas Oficiales Mexicanas (NOM), que son de aplicación federal y son redactadas con la participación de los diferentes sectores de gobierno, academia e industria y sometidas a consulta pública antes de su publicación definitiva; hasta la fecha se han publicado las normas listadas en la Tabla anterior.

La entidad encargada de vigilar el cumplimiento de estas normas, es la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) y cuenta con las oficinas generales en la Ciudad de México y representaciones en cada estado de la República Mexicana (Moreno, 1995).

1.4 Métodos de detección

El Mercurio se utiliza como Mercurio elemental y como compuestos orgánicos e inorgánicos (vapor de Mercurio, Mercurio líquido, sales de Mercurio, compuestos alquilmercurio de cadena corta, compuestos alcoxialquillmercuricos, y compuestos de fenilmercurio), todos con diferentes propiedades toxicológicas. El Mercurio total en agua, aire, y material biológico se puede determinar mediante métodos de absorción atómica de vapor frío y por análisis de activación de neutrones. Mediante estas técnicas, el Mercurio puede ser detectado a concentraciones bajas (décimas de nanogramo por gramo) en material especialmente el de origen biológico. El metilmercurio (MeHg) en muestras biológicas se puede detectar a niveles de unos pocos nanogramos por extracción con benceno después de fuerte acidificación con ácido clorhídrico, seguido por análisis cromatográfico de gases de metilmercurio. De forma adicional, se han establecido algunos métodos analíticos para determinar varias especies de sales de Mercurio inorgánico y varias de las formas organomercuriales. Estos métodos incluyen la espectrometría de masas por dilución isotópica, espectrometría de masas de tiempo de vuelo, cromatografía líquida de alto rendimiento acoplado inductivamente a espectrometría de masas (ICP) de plasma, electroforesis capilar-ICP, cromatografía de gases-ICP, y la espectroscopía de absorción de rayos X de estructura fina (Cabañero Ortíz, 2005).

1.5 Mercurio en el ambiente

Las emisiones de Mercurio a partir del humo de carbón constituyen la fuente principal de descarga antropogénica y de contaminación por Mercurio en la atmósfera. Se estima que las emisiones de Mercurio aumentarán a un ritmo del 5% anual (Zhang et al., 2002). El Mercurio en el aire con el tiempo pasa a los ríos, lagos y océanos después de viajar largas distancias junto con el viento para finalmente tener contacto con los seres vivos (Español Cano, 2001). También pueden contaminarse el agua, los alimentos, los productos farmacéuticos y los cosméticos. Lo anterior plantea serias preocupaciones ya que el metal persiste en el medio ambiente y se acumula en la cadena alimenticia, tal como se aprecia en la Figura 3. En ella se pueden observar las fuentes de emisión y las interacciones del mercurio con las diferentes partes de los ecosistemas: atmósfera, geósfera e hidrósfera. Al final de cuentas, los seres vivos que habitamos la Tierra estamos expuestos a todos y cada uno de los elementos y compuestos esenciales y no esenciales mediante las interacciones cíclicas que se muestran en esta Figura, por lo cual no es raro que todas las especies vivas estemos

expuestas a los agentes que, como el Mercurio, ocasionarán tarde o temprano algún efecto en el estado normal de los individuos. En el caso del Mercurio, la Figura 3 muestra el ciclo que este elemento lleva a cabo dentro del medio ambiente (Zahir *et al.*, 2005).

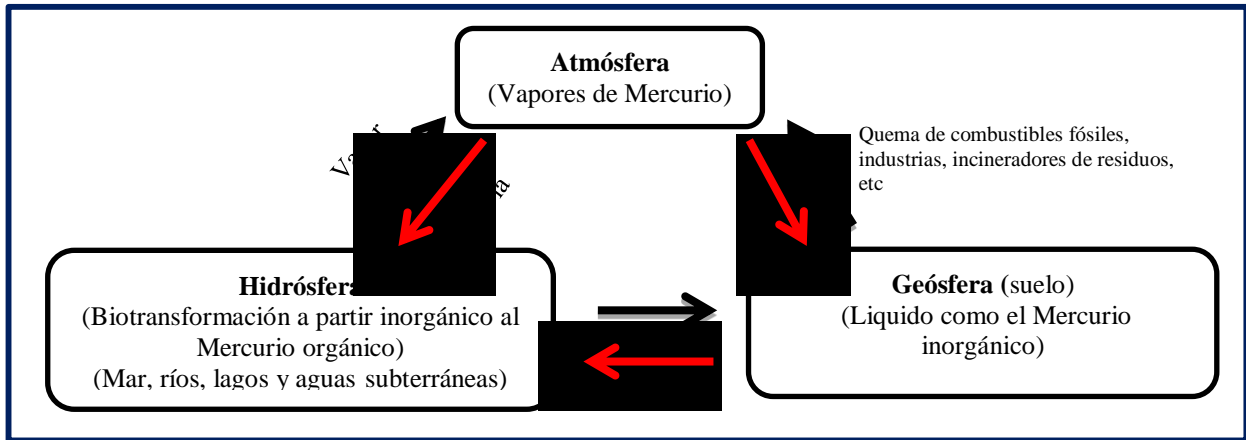


Figura 3. Ciclo del Mercurio en el medio ambiente (Modificado de Zahir *et al.*, 2005).

De las formas de Mercurio existentes, la orgánica resulta la más tóxica para los seres vivos debido a su solubilidad en los compuestos de naturaleza lipídica. Investigaciones recientes han demostrado la existencia de efectos adversos para la salud a dosis bajas de metilmercurio (Zahir *et al.*, 2005). Sin embargo, el daño causado por la intoxicación con este metal puede dar lugar al fenómeno conocido como estrés oxidativo, provocado por el aumento de especies químicas que poseen al menos un electrón desapareado conocidas como radicales libres. Debido a su gran inestabilidad, estas especies reaccionan rápidamente con especies ricas en electrones libres como los lípidos, los ácidos grasos y, en caso extremo, el ADN. Como consecuencia de lo anterior se puede provocar alteración en el metabolismo, generando diversos problemas ocasionados por la inhibición de las funciones de las enzimas antioxidantes.

Entre los efectos que el Mercurio tiene sobre los humanos se puede mencionar, como ejemplo, el ocasionado en la bahía de Minamata en Japón como consecuencia del desecho de residuos contaminados con el metal vertidos en el agua, lo que provocó que miles de personas murieran al consumir pescado contaminado con compuestos orgánicos de Mercurio (Zalups, 2017). Esta tragedia se debió a los efectos que el metal tiene a nivel celular en los diferentes órganos de los seres vivos. De manera interesante se pudo observar que los peces acumularon el metal sin presentar alteraciones visibles, mientras que el efecto en los seres humanos fue devastador. Algunos de los

daños que ocasiona el Mercurio se relacionan con el rompimiento de la estabilidad de muchas estructuras macromoleculares y fenómenos como el oxidativo, así como su acción ionoforética.

1.5.1 Efectos de la intoxicación con Mercurio en los seres vivos

El Mercurio produce intoxicación en los seres vivos. A este proceso se le conoce como hidrargiria, hidrargirismo o mercurialismo y es ocasionado, cuando el Mercurio, en cualquier estado de oxidación, entra a los organismos y ocasiona daño. Los efectos tóxicos de los compuestos de Mercurio dependen de su naturaleza. Los compuestos orgánicos (principalmente el metilmercurio) pueden afectar riñones, hígado, sangre, epitelio intestinal y pulmones, mientras que las sales inorgánicas tienen sus efectos principalmente en hígado, sistema nervioso, epitelio intestinal, riñón (en donde se acumulan de manera preferencial) y músculo (Mela, 2012). En cualquiera de estos casos, el Mercurio ocasiona daños debido a que puede interaccionar con grupos sulfhidrilo (SH) de proteínas, con el glutatión, y algunos casos con proteínas ricas en Azufre, como las Metalotioneínas. Lo anterior puede ocasionar que el contenido de grupos tiol disminuya su función y ello tenga como consecuencia un aumento en el estrés oxidativo debido al incremento de Especies Reactivas de Oxígeno y la disminución de los sistemas antioxidantes que dependen de glutatión y enzimas que requieren grupos SH. El Mercurio metálico y los vapores del metal son lipofílicos y por ello pueden atravesar las membranas, lo que lleva a su acumulación en varios órganos. De esta manera son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y la placentaria ocasionando daños neuro y fetos tóxicos (Guan & Dai, 2009).

1.6 Mercurio inorgánico en los organismos

En esta investigación se trabajó con Cloruro de Mercurio (HgCl_2), una sal que posee un mecanismo de toxicidad propio al de los compuestos inorgánicos de Mercurio. Las vías de entrada de este compuesto al organismo son tres. La primera es la respiratoria que es la más importante tanto para este compuesto como para el Mercurio elemental. La segunda es la digestiva, por esta vía los compuestos inorgánicos resultan menos absorbidos que los compuestos orgánicos de Mercurio. La tercera vía es la cutánea, misma que tiene poca importancia dentro del fenómeno de la intoxicación con Mercurio. Una vez que el metal ha ingresado al organismo su distribución dependerá de sus características fisicoquímicas. Se sabe que el 50% del Mercurio inorgánico absorbido se transporta por el plasma unido a la albúmina y que el equilibrio que se logra dentro del organismo es función de la dosis, la duración de la exposición, el grado de oxidación, la concentración en sangre, la concentración de grupos SH libres, su afinidad por compuestos celulares varios y de la velocidad de asociación/disociación del complejo Mercurio-proteína.

En relación a los procesos normales de biotransformación del metal, no se ha reportado ninguno en seres humanos. Sin embargo, en microorganismos y roedores se han detectado cuatro. El primero involucra la oxidación del Mercurio metálico por la enzima Hidrógeno peróxido Catalasa la cual se localiza en los peroxisomas de animales de laboratorio. El segundo es un proceso de reducción de Mercurio en estado 2+ por la enzima Xantina Oxidasa convirtiéndolo en Mercurio 0; este proceso se ha encontrado en ratas y ratones. El tercer proceso se ha encontrado en hígados de ratas y consiste en la metilación de Mercurio en estado 2+ a metilmercurio. Finalmente, el cuarto mecanismo involucra la biotransformación, en hígado, del metilmercurio a Mercurio 2+, también observado en ratas expuestas al metal (Ramírez, 2008).

Se ha reportado que existen tres vías de eliminación del metal. El primero se conoce como central e involucra a todos los órganos menos al riñón y al hígado. Al segundo se le ha llamado periférico y se ha dividido en riñón (en donde se acumula por periodos largos) y en hígado (en donde se acumula por periodos cortos). Los procesos involucrados en hígado y riñón incluyen la filtración glomerular, la secreción biliar y la secreción intestinal. Finalmente, el cuarto compartimento se da cuando existe un depósito antes de la salida del metal del organismo (orina, pelo, heces y uñas). La Figura 4 muestra el modelo tóxico cinético para Mercurio inorgánico (Ramírez, 2008).

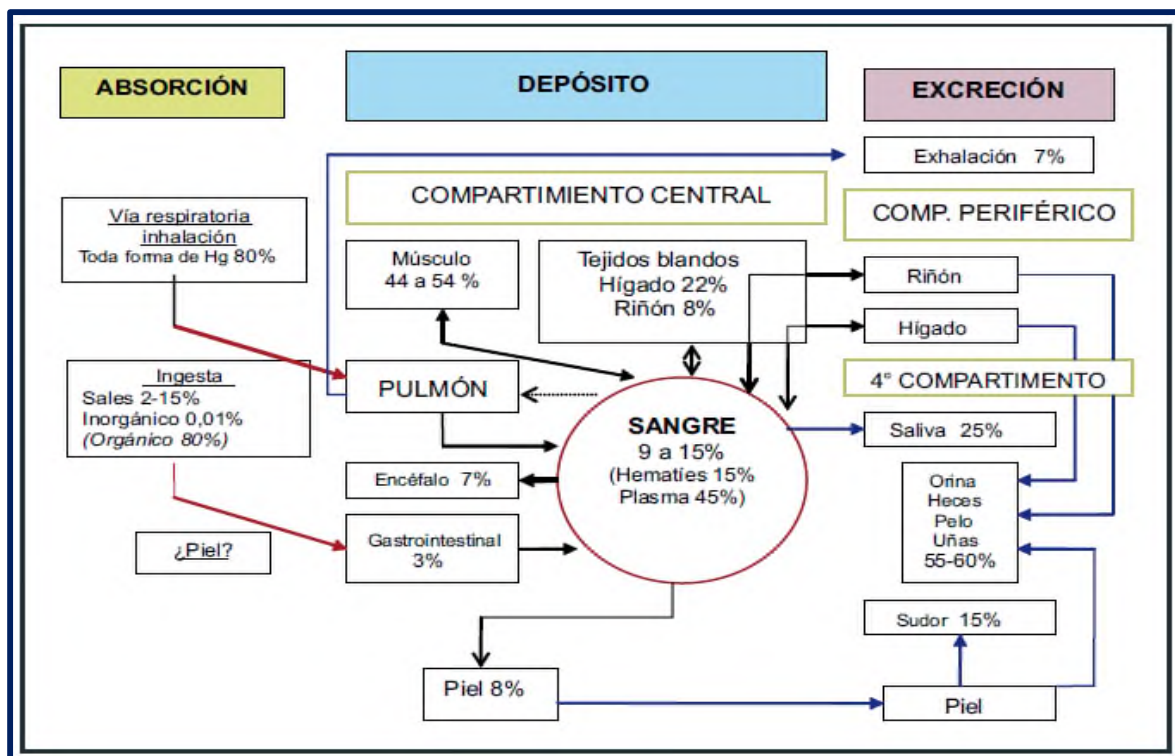


Figura 4. Modelo tóxico cinético del Mercurio inorgánico (Tomado de Ramírez, 2008).

Como se mencionó anteriormente, uno de los depósitos más comunes del Mercurio inorgánico es el riñón, por lo cual éste se ha convertido en blanco de estudio de la nefrotoxicidad ocasionada por la exposición a bajas dosis de este metal. En ratas expuestas de 1 a 25 mM de Mercurio por kilogramo de peso se reportaron una serie de daños histológicos en las células de túbulo proximal de riñones de ratas expuestas. Entre estas alteraciones se distinguieron pequeños cuerpos membranosos que posteriormente se identificaron como lisosomas anormales que aparecen en el lumen túbulo después de una exposición al metal. Adicionalmente y después de 12 horas de exposición se han detectado cambios mitocondriales, así como necrosis celular y tubular apareciendo gránulos anormales en los túbulos renales. Se ha observado que dosis mayores de Cloruro de Mercurio en humanos y animales puede producir anuria asociada con necrosis de la porción distal del túbulo proximal. De la misma manera se han reportado muchos casos de personas que han sufrido de insuficiencia renal aguda ocasionada por gran variedad de compuestos de Mercurio. Sin embargo, el estudio de la anuria ocasionada por la exposición a este metal no ha sido bien abordada y requiere de mayores investigaciones (kazantzis, 1970). En 2014, el equipo de Rice, reportó que la exposición a mercurio ocasiona necrosis tubular, glomerulonefritis, daño renal crónico, cáncer renal y síndrome nefrótico (Rice *et al.*, 2014). Cuando las células renales son sometidas a una intoxicación con Mercurio todos sus componentes se ven comprometidos y el metabolismo puede ser inhibido al ser atacadas las enzimas y demás macromoléculas participantes. Se sabe que cuando el Mercurio entra a las células y se encuentra en estado iónico se puede fijar a macromoléculas ricas en grupos sulfhidrilo (SH), lo que altera varios sistemas enzimáticos pertenecientes a los diferentes organelos o a las membranas celulares además de alterar las funciones energéticas de las mitocondrias. Se ha reportado que el Mercurio puede inhibir la actividad de la fosfatasa alcalina, el transporte de Potasio y la actividad de la ATPasa de la membrana celular (Tchounwou, 2012., Ramírez, 2008). De la misma manera se ha publicado que cualquier forma química de Mercurio puede ocasionar problemas celulares debido a la generación de estrés oxidativo, ya que el metal posee una elevada afinidad por los grupos sulfhidrilo libres de muchas macromoléculas participantes como las enzimas antioxidantes (Catalasa, Glutación Peroxidasa y Glutación Disulfuro Reductasa) y al Glutación (GSH). El metal se puede unir a los grupos SH (inhibiendo la actividad de muchas enzimas) o formar enlaces con el GSH depletado, de esta manera, a la célula del compuesto más importante dentro del metabolismo antioxidante. Se ha observado que también los niveles de ácido ascórbico y vitamina E (otros sistemas antioxidantes endógenos) son disminuidos en casos de intoxicación con el metal (Zalups, 2017., Farina *et al.*, 2013., Li *et al.*, 2008).

Para entender completamente la nefropatía ocasionada por la exposición a Mercurio en las células renales, hace falta realizar más estudios. Sin embargo, y a pesar de ello, se han propuesto dos mecanismos por medio de los cuales el metal puede ingresar a las células proximales, uno de ellos por la membrana luminal (borde en cepillo) y otro a través de la membrana basolateral. La Figura 5 muestra el mecanismo propuesto para la entrada de Mercurio por la membrana en borde de cepillo (luminal) y sus efectos dentro de las células del epitelio renal.

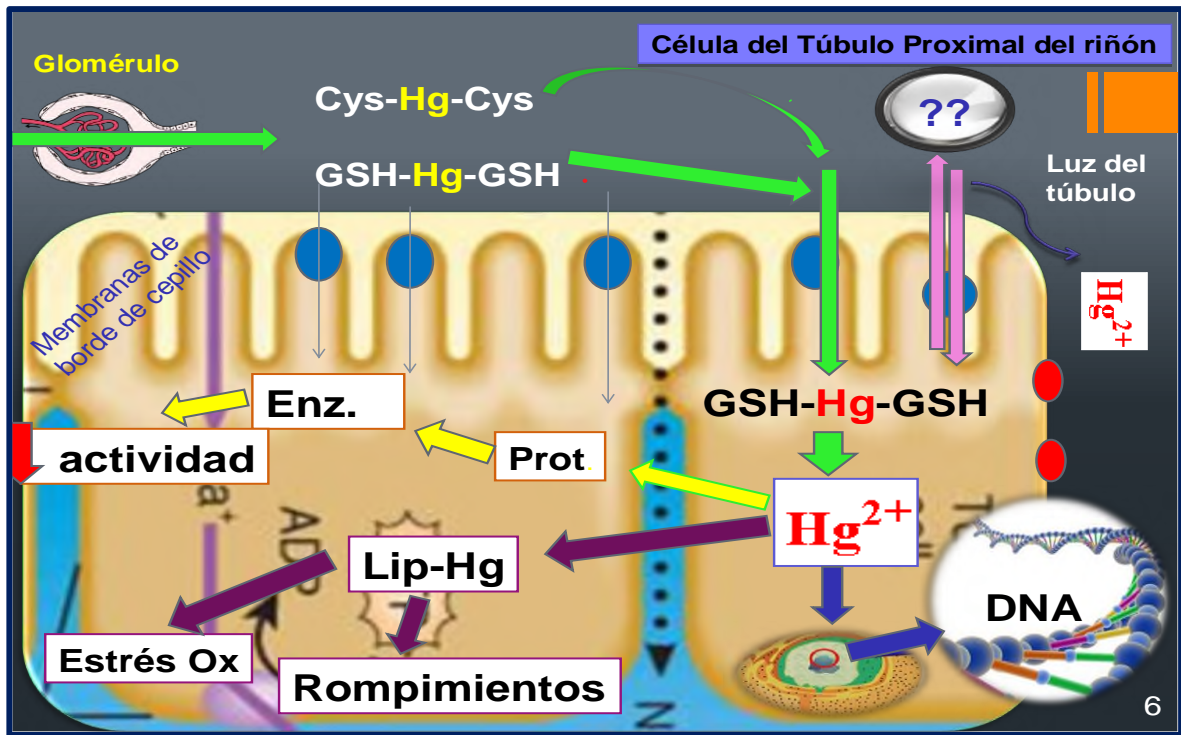


Figura 5. Mecanismo de entrada del Mercurio a células de túbulo proximal de riñón (Modificado de Zalups, 2017).

En esta Figura se puede observar que el Mercurio llega al glomérulo renal formando complejos con Cisteínas o Glutatión. Una vez que se encuentra en el lumen de los túbulos proximales cualquiera de los dos complejos puede ingresar a la célula mediante algunos transportadores de cationes entre los que se encuentra el de Sodio. Una vez en el interior el Mercurio se libera del Glutatión o de las Cisteínas libres que lo ayudaron a entrar a la célula y adquiere su valencia 2+ dando lugar, de esta manera, a la forma tóxica del metal. Una vez dentro de la célula puede ocasionar los efectos que se han mencionado anteriormente dañando, además, al material genético ocasionando mutaciones y desencadenando posibles fenómenos cancerígenos (Zalups, 2017). El segundo mecanismo involucra los transportadores de ácidos dicarboxílicos, la síntesis de alfa-cetoglutarato dentro de la célula y el

transportador de aniones orgánicos. Este transporte involucra especies de Mercurio que forman complejos con Cisteína, Glutati6n y N-acetilcisteína. Se ha propuesto que el Glutati6n sintetizado dentro de la c6lula sale a trav6s de la membrana basolateral y forma complejos con el Glutati6n fuera de la c6lula. De la misma manera el metal forma complejos con cisteína y N-acetil Cisteína. Estos complejos entran a trav6s de la membrana por los transportadores se~alados repletando a la c6lula de alfa-cetoglutarato (Zalups, 2017).

1.7 Estr6s Oxidativo

En las dos 6ltimas d6cadas se ha producido un explosivo inter6s en el papel de los radicales libres de Ox6geno, de manera m6s general conocidos como "Especies Reactivas de Ox6geno," (EROS o ROS por sus siglas en ingl6s) y de las "Especies Reactivas de Nitr6geno" (ERN o RNS por sus siglas en ingl6s) en la actividad experimental b6sica y en la investigaci6n en medicina cl6nica (Cadenas, 1989).

En relaci6n con los efectos fisiol6gicos (ben6ficos) o no fisiol6gicos (t6xicos) de los radicales libres se puede decir que los primeros incluyen papeles metab6licos en las respuestas celulares como la defensa contra agentes infecciosos y en la funci6n de un n6mero de sistemas de se~alizacion celular. Un ejemplo de lo anterior lo constituye la inducci6n de la respuesta mitog6nica. En contraste, a altas concentraciones, las Especies Reactivas tanto de Ox6geno como de Nitr6geno pueden ser mediadores importantes de da~os a las estructuras celulares, incluyendo los l6pidos de membranas, las prote6nas y los 6cidos nucleicos ocasionando un fen6meno denominado estr6s oxidativo (G. Poli et al., 2004).

El efecto de las Especies Reactivas de Ox6geno y de Nitr6geno est6 equilibrado por la acci6n de varias barreras antioxidantes. Estas se encuentran formadas por varias enzimas, p6ptidos, amino6cidos y elementos que constituyen el sistema antioxidante total del organismo. Estas especies resultan extremadamente importantes, ya que contribuyen a la eliminaci6n directa de los radicales libres (prooxidantes), proporcionando as6 una protecci6n m6xima para diferentes sitios biol6gicos. De la misma manera existen antioxidantes no enzim6ticos adem6s de las enzimas antioxidantes (Duques, 2011). A pesar de la presencia de los sistemas de defensa antioxidante de la c6lula para contrarrestar da~o oxidativo por ROS, este se acumula durante el ciclo de vida. Los da~os relacionados con el ADN, las prote6nas y los l6pidos se ha propuesto como precursores clave del desarrollo de enfermedades dependientes de la edad como el c6ncer, la arteriosclerosis, la artritis, neurodegenerativa y otras condiciones (Duques, 2011). Dentro del grupo de trabajo al cual pertenece el presente, al igual que por otros autores (Redman, et al., 2017, Franco, et al., 2007); se ha

establecido que uno de los efectos más importantes de la intoxicación con Mercurio es el aumento de las Especies Reactivas de Oxígeno, las cuales desencadenan el fenómeno de estrés.

Se ha establecido que un buen antioxidante debe presentar alguna o algunas de las siguientes características: 1) eliminar específicamente a los radicales libres; 2) eliminar los metales redox de quelatos; 3) interactuar con otros antioxidantes dentro de la "Red antioxidante" con la finalidad de establecer un proceso de generación-uso-regeneración; 4) tener un efecto positivo sobre los genes de expresión; 5) ser absorbido fácilmente; 6) tener una concentración fisiológica en tejidos y fluidos biológicos y 7) actuar tanto en la fase acuosa como en los dominios de la membrana. Algunos antioxidantes actúan de un ambiente hidrofílico, otros en un ambiente hidrofóbico, y algunos actúan en cualquier entorno celular. Por ejemplo, la vitamina C reacciona con el superóxido en la fase acuosa mientras que la vitamina E lo hace en la fase lipídica. Por su parte, ácido lipoico actúa a su vez tanto en las fases solubles en agua como en las solubles en grasa y por lo tanto puede funcionar tanto en membranas celulares como en el citosol.

1.8 Toxicidad del Mercurio en células eucariontes

Hasta el momento no se han reportado mecanismos encargados de metabolizar al Mercurio dentro de las células de organismos eucariontes superiores como los humanos. Sin embargo, se ha reportado que en ratas y ratones el metilmercurio puede ser oxidado a Mercurio inorgánico antes de entrar a las células del túbulo contorneado proximal de las nefronas. El mecanismo de esta conversión es desconocido (Donn *et al.*, 1980).

El efecto más importante de la entrada de Mercurio a las células es su unión a las Metalotioneínas. Estas moléculas tienen peso molecular bajo (6000 a 7000 Da) y contienen numerosos residuos de cisteína en donde se pueden unir metales como Mercurio, Cadmio y Zinc entre otros. (Piotrowski *et al.*, 1974). Cuando se exponen ratas de laboratorio a Cloruro de Mercurio o a vapores de Mercurio la cantidad de Metalotioneína se eleva, de manera preferencial en riñón. Se ha observado que, en este órgano, el vapor de Mercurio puede ser convertido a Mercurio inorgánico, el cual es el responsable de la inducción de la proteína. Este fenómeno involucra la transcripción de los genes MT-1 y MT-2 vía interacción con factores de transcripción dependientes de Zinc, así como elementos denominados "de respuesta a metal" que se encuentran en la región promotora de los genes de Metalotioneínas (Koropatnick, 2000).

Tanto las formas orgánicas como inorgánicas tienen efectos también en el metabolismo del Glutatión en los riñones. Al administrar concentraciones elevadas de Mercurio, el nivel de Glutatión intracelular disminuye hasta en un 85% en ratas. Se ha observado que a concentraciones no tóxicas de Mercurio el contenido de Glutatión aumenta debido a la inducción de la enzima Gama-glutamilcisteína

sintetasa. De igual manera dosis bajas de metal inducen la actividad de las enzimas Glutatión Disulfuro Reductasa y Glutatión Peroxidasa (Lash, 1992).

La exposición a compuestos de Mercurio también ocasiona estrés oxidativo. Lo anterior puede deberse a la unión del Mercurio al Glutatión, disminuyendo el contenido del mismo y disminuyendo la actividad de enzimas como Superóxido Dismutasa, Catalasa, Glutatión Peroxidasa y Glutatión Disulfuro Reductasa en células renales (Gstraunthaler, 1983).

El Mercurio inorgánico interfiere con la respiración mitocondrial ocasionando el aumento del Peróxido de Hidrógeno y con ello el fenómeno de estrés oxidativo. De la misma manera se ha demostrado que el Mercurio ocasiona salida de Calcio de la mitocondria, oxidación de nucleótidos de piridina y colapso del potencial de membrana (Chavez, 1988., Chavez et al., 1991).

Finalmente, se ha demostrado que el Mercurio puede ocasionar alteraciones en la ATPasa de Sodio y Potasio de la membrana basolateral de las células de túbulo proximal; inhibir las proteínas acuaporinas 1 a 6 presentes a lo largo de toda la nefrona (Verkman, 1992); alterar el metabolismo del grupo hemo ocasionando porfirinuria (Woods et al., 1990); afectar la composición del citoesqueleto de células de túbulo proximal (Miura, 1984); e inducir proteínas de estrés de 70 y 90 kDa de peso molecular. Estas proteínas podrían usarse como marcadores renales de intoxicación con el Mercurio. También, se han reportado proteínas de choque térmico de 65 y 70 kDa, en células de túbulo proximal, después de la administración de Mercurio (Georing et al., 1992).

El Mercurio, resulta ser muy agresivo cuando se encuentra dentro de las células aún a concentraciones muy bajas y en periodos muy cortos de tiempo. Por ello el diagnóstico y el establecimiento de terapias de tratamiento resulta muy difícil. Se conocen algunos síntomas de la presencia de este metal en el humano. En la fase inicial (de absorción) se presenta pérdida de apetito, adelgazamiento, cansancio fácil, cefalea, mareos, insomnio, artralgias y peristalgias. Cuando la intoxicación corre su curso, los síntomas se pueden clasificar en dos. El primero se relaciona con la digestión y se encuentra caracterizado por sabor metálico, mal aliento, náuseas, vómitos y diarrea. El segundo se clasifica como neurológico, en donde la primera fase se caracteriza por tristeza, irritabilidad, ansiedad, insomnio, sueño agitado, temor, debilidad muscular, excesiva timidez, susceptibilidad emocional, hiper-excitabilidad y encefalitis (en casos muy graves). A todo lo anterior se le conoce como eretismo mercurial. También se ha reportado la existencia de temblores no intencionales, los que guardan una estrecha relación con la gravedad de la intoxicación y con la concentración de Mercurio en los tejidos, adicionalmente se presenta el síndrome renal, el síndrome oftalmológico y daños en piel, rinitis y conjuntivitis, parestesia, ataxia, dificultad auditiva, daños en sangre, hipersensibilidad y efectos teratogénicos (Ramírez, 2008).

1.9 Tratamientos contra la intoxicación con Mercurio

1.9.1 Terapia de quelación

La terapia de quelación se basa en el uso de agentes con propiedades de unión a metales pesados como Plomo, Cadmio y Mercurio. En cualquiera de los casos se ha establecido que la terapia de quelación es utilizada para el tratamiento de intoxicaciones humanas y que se fundamenta en las propiedades de unión de los agentes quelantes formando complejos estables con las especies metálicas tóxicas evitando que éstas ataquen a sus blancos biológicos. El primer compuesto de esta naturaleza propuesto contra la intoxicación con Mercurio fue el $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (Citrato de Sodio), usado por Kety en el año de 1941. A partir de entonces se han sintetizado otros compuestos, mismos que muestra en la Tabla 5 (Guan y Dai, 2009).

Tabla 5. Grupos de los compuestos quelantes.

Ácidos sintéticos mercaptanos	Compuestos con grupos tioles
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	2,3-dimercaprol (Anti Lewisita) (BAL)
Ácido etilenglicol tetra acético (EGTA)	Ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA)
Ácido amino fenoxietano tetra acético (BAPTA)	Ácido meso monoisoamil 2,3- dimercaptosuccínico (M; ADMSA)
	Ácido meso monometil 2,3- dimercaptosuccínico (MmADMSA)
	Ácido meso monociclohexil 2,3-dimercaptosuccínico (Mch ADMSA)
	Ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS).

Se ha reportado que la administración de DMPS o DMSA luego de una intoxicación con Mercurio reduce la retención y acumulación de este en varios órganos y baja la excreción urinaria del mismo. Se ha reportado que el DMPS resulta el mejor quelante para compuestos inorgánicos de Mercurio y que el DMSA para compuestos orgánicos (Ramírez, 2008).

1.10 Ácido dimercaptosuccínico (DMSA)

La naturaleza hidrofílica del DMSA es responsable de su considerable absorción gastrointestinal cuando este quelante es administrado por vía oral. Estudios en animales de laboratorio y humanos han demostrado que en el torrente sanguíneo el DMSA se une en un 90% a la albúmina. Se ha

establecido que esta unión se lleva a cabo por uno de los dos grupos SH libres del quelante y que el otro grupo SH es utilizado para quelar diferentes metales tóxicos.

Este quelante tiene una gran aplicación clínica debido a que es el menos tóxico de los compuestos utilizados para remoción de metales tóxicos, sin afectar los niveles de metales esenciales como Zinc, Hierro, Calcio y Magnesio, aunque se ha reportado que puede alterar el metabolismo del Cobre (Flora, 2010).

Cuando llega a los riñones, el DMSA puede pasar a través de la membrana basolateral de las células del túbulo contorneado proximal a través del transportador de iones Sodio; el transportador de ácidos dicarboxílicos o el transportador de aniones orgánicos. Una vez dentro puede formar conjugados estables con Mercurio. Estos conjugados pueden ser, entonces, sustratos para transportadores endógenos como la proteína asociada a multirresistencia 2 localizada en la membrana apical de las células de túbulo proximal por donde son excretados hacia la luz tubular, formando parte de los desechos renales, eliminados por medio de la orina (Bridges, 2008).

Adicionalmente se ha observado que el DMSA se puede eliminar también, en pequeñas proporciones, como compuesto puro sin transformaciones y en forma de compuestos metabolizados por reducción electrofílica en forma de compuestos disulfuro con cisteína u otros compuestos con grupos sulfhidrilo (Aposhian, 1989). La Figura 6 muestra los mecanismos de absorción, acción y eliminación del DMSA.

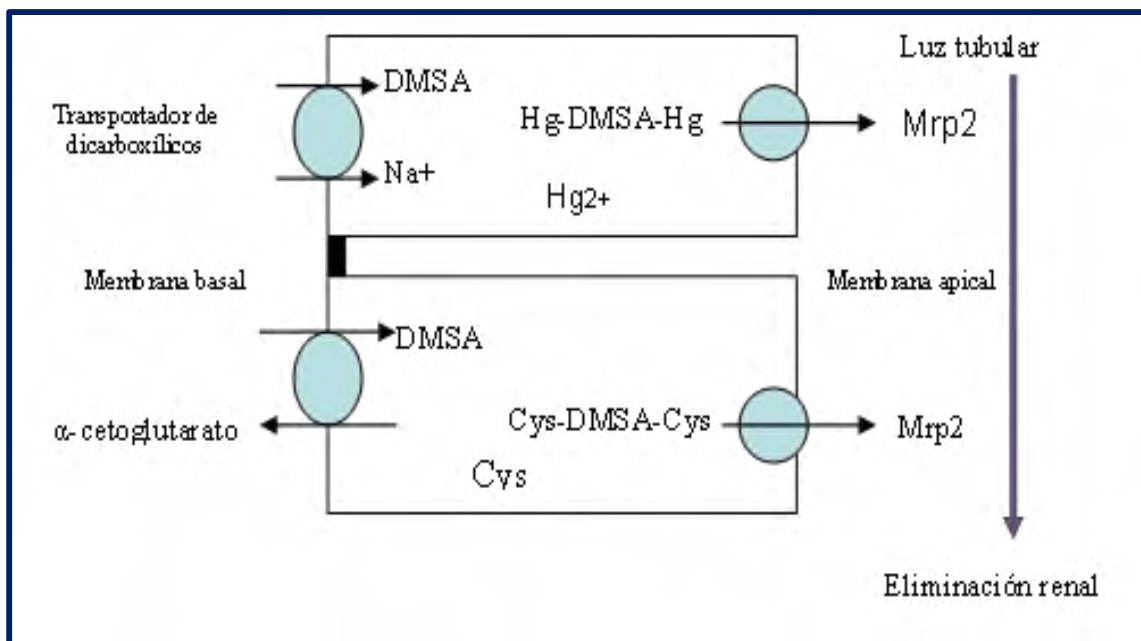


Figura 6. Metabolismo de DMSA en células de túbulo proximal de riñón (Modificada de Bridges, 2008).

1.10.1 Uso de micronutrientes

Algunos micronutrientes que se han empleado como antagonistas de metales pesados son Manganeseo, Cobre, Zinc y Selenio. La importancia de estos elementos radica en que participan como agentes activos formando parte de la estructura de moléculas como Metaloenzimas o Metaloproteínas. Entre las primeras se pueden mencionar a las enzimas que participan dentro del metabolismo antioxidante. El Zinc, el Manganeseo y el Cobre sirven como cofactores para la enzima Superóxido Dismutasa y el Selenio de las enzimas Glutatión Peroxidasa, Glutatión Reductasa y Tio redoxina Reductasa (Rakhi & Jai Raj, 2007).

Se ha establecido que el Selenio y el Mercurio actúan en el organismo disminuyendo cada uno la actividad del otro. En el riñón, se ha reportado que la presencia de Selenio puede reducir la cantidad de Mercurio. Sin embargo, la cantidad del metal pesado aumenta en el resto del organismo de manera preferencial en el hígado. Esta relación presenta ciertas desventajas como el hecho de que el selenio puede presentar propiedades prooxidantes ocasionando la oxidación de los grupos tiol y generando superóxidos. De la misma manera el selenio puede afectar la vía urinaria de eliminación de Mercurio. Se ha observado que Selenio puede ocasionar modificaciones en la distribución del Mercurio dentro del riñón. Se sabe también que ambos elementos forman asociaciones 1:1 pero no se tiene bien estudiada la implicación de esta asociación (Rakhi & Jai Raj, 2007; Lourdes, 1991; Li *et al.*, 2008); Choi, 1978).

1.10.2 Metabolismo del Selenio

El papel clave del Selenio en las funciones de las selenoproteínas determina que sea esencial en varios organismos incluido el ser humano. Como constituyente de las Selenoproteínas, el Selenio juega un papel estructural y enzimático. Además de su papel como antioxidante, el Selenio también actúa como catalizador para la producción de la hormona activa tiroidea y es necesario para el funcionamiento del sistema inmune (Navarro & López, 2000). Las formas biodisponibles de Selenio en la dieta son la Selenometionina y la Selenocisteína. La primera no puede ser sintetizada en el organismo, solo es adquirida mediante la dieta y se utiliza como un reservorio de Selenio. La segunda constituye el compuesto más importante que se incorpora a las Selenoproteínas. La Selenocisteína es codificada por el codón UGA del ARN mensajero, por lo que se considera como el aminoácido número 21. Este codón es leído como un codón de finalización, por lo que la descodificación de la Selenocisteína requiere una reprogramación de la transcripción (Haweck, 1985; Driscoll, 2003).

El Selenio se absorbe bien por el tracto gastrointestinal. El 90% de la Selenometionina se absorbe por el mismo mecanismo que la Metalotioneína. Sin embargo, de la Selenocisteína se conoce poco su mecanismo de absorción. Tras la absorción, el Selenio circula en el plasma unido principalmente

a la Selenocisteína P (que contiene una tercera parte del Selenio plasmático) y la Selenoproteína W (que contiene una sexta parte del Selenio plasmático), hallándose el resto unido a la albúmina plasmática. El metal se distribuye principalmente en hígado, riñones, páncreas y músculos. El Selenio se transfiere al feto por vía placentaria y también aparece en la leche materna. La biodisponibilidad del metal depende de la absorción intestinal y de su conversión en alguna forma biológicamente activa. Las diferentes formas de Selenio siguen rutas metabólicas distintas. La selenometionina puede almacenarse en un almacén proteico. El catabolismo de este almacén genera seleniuro. La Selenocisteína no se almacena, sino que se cataboliza y el Selenio resultante forma una nueva reserva de metal. Las formas inorgánicas del Selenio se almacenan directamente en forma de selenuro, el cual, independientemente de su origen, se utiliza para la formación de selenofosfato, precursor de la selenocisteína que formará parte de las Selenoproteínas. El exceso de Selenio es excretado ya sea vía renal o gastrointestinal, pero la homeostasis del Selenio se consigue mediante su excreción urinaria. En algunos casos puede eliminarse por vía respiratoria (Rayman, 2000).

La función más importante del Selenio es como antioxidante ya que se encuentra en cada uno de los cuatro centros catalíticos de la enzima Glutación Peroxidasa. Esta enzima utiliza al Glutación para reducir los peróxidos, protegiendo a las membranas y otras estructuras celulares de la acción de los peróxidos lipídicos y otros radicales libres. La Selenocisteína es oxidada rápidamente por los hidroperóxidos, lo cual constituye la primera parte de la acción catalítica de la enzima. En su sitio activo contiene un residuo de Selenocisteína en el que el Selenio sufre un ciclo de oxidación-reducción, constituyendo el selenol (E-Se-H), la forma activa que reduce los Peróxidos de Hidrógeno y Nitrógeno. El selenol es oxidado a ácido selénico (E-Se-OH), el cual reacciona con el Glutación Reducido (GSH) formando un compuesto derivado del ácido selénico (E-Se-S-G). Un segundo Glutación regenera la forma activa de la enzima reaccionando con E-Se-S-G y formando el Glutación Oxidado (GSSG). En conjunto dos glutaciones son oxidados para reducir un hidroxiperóxido (Casals *et al.*, 2005). La Figura 7 muestra el mecanismo señalado anteriormente.

Se han identificado cerca de treinta Selenoproteínas, pero no de todas se conoce su función. Algunas Selenoproteínas de función conocida son la Tioredoxina Reductasa (con funciones inmunológicas, se conocen tres isoformas), la Iodotironina desyodidaza (cataliza la disociación de la tiroxina, T₄; se conocen tres isoformas), Selenoproteína P (con gran poder antioxidante, contiene más de doce residuos de Selenoproteína) y la Selenoproteína W (proteína muscular de función no conocida). (Casals *et al.*, 2005).

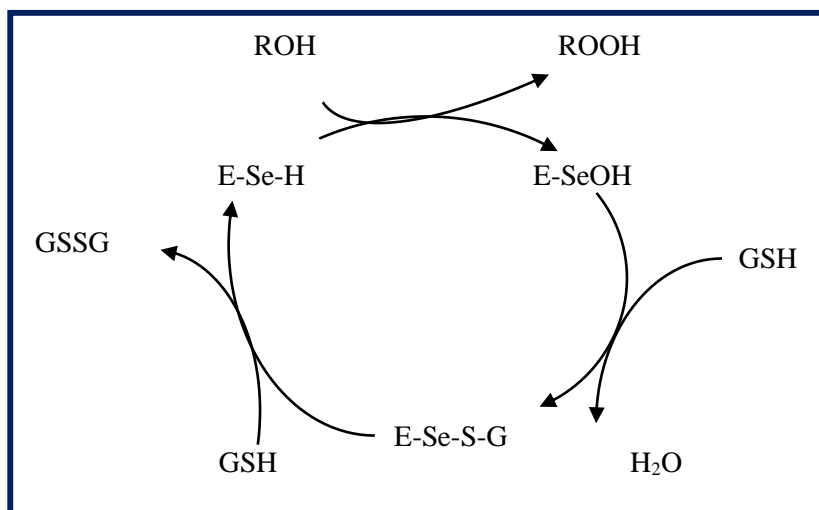


Figura 7. Mecanismo catalítico de la Glutatión Peroxidasa (Modificada de Casals et al., 2005).

1.10.3 Metabolismo del Zinc

El Zinc es un elemento que se encuentra unido a una gran cantidad de enzimas y proteínas (cerca de 300), entre ellas a la enzima Superóxido Dismutasa. Además, se ha estimado que más de 1000 factores de transcripción requieren de este elemento. Muchos estudios han indicado que la falta de este nutriente se relaciona con retardo en crecimiento, disfunción del sistema inmune, daño o retardo cognitivo y otros efectos clínicos. La esencialidad del Zinc en humanos fue establecida en 1963. Desde hace 50 años se ha investigado el metabolismo del Zinc y se ha descubierto que no solo participa como mediador de la respuesta inmune, sino que es un agente antioxidante y antiinflamatorio. Se ha observado que la suplementación de Zinc en la dieta ha ayudado a disminuir la generación de estrés oxidativo, así como la producción de citocinas inflamatorias, relacionadas con enfermedades como la aterosclerosis (Prasad, 2014)^{a,b y c}, (Chasapis et al., 2012). El Zinc no impide directamente la generación de Especies Reactivas de Oxígeno. En lugar de ello, el Zinc actúa de manera directa sobre la estructura de la membrana celular promoviendo y participando en los siguientes eventos: 1) activa a la enzima Superóxido Dismutasa; 2) mantiene las concentraciones tisulares de Metalotioneína; 3) protege a los grupos tiol; 4) evita la interacción entre grupos químicos con Hierro para formar radicales libres y 5) evita daños al DNA. La deficiencia de Zinc puede generar organismos más susceptibles al estrés oxidativo, aumentando los niveles de lipoperoxidación en las membranas mitocondriales y microsomales (Stefanidou, 2006).

Las proteínas que unen Zinc como las Metalotioneínas, constituyen macromoléculas que protegen contra el estrés oxidativo generado por la presencia de metales tóxicos, infecciones y baja concentración de Zinc. Las Metalotioneínas son proteínas constituidas por 61 aminoácidos, de los cuales 29 son cisteínas. Ellas tienen un papel muy importante en la homeostasis celular relacionada con los metales debido a que tienen gran afinidad por los mismos (en particular por Zinc y Cobre). Aunque puede unir varios metales, el Zinc es el metal que se reconoce como principal inductor de estas proteínas. No se sabe si la unión de Zinc a Metalotioneína constituye el resultado de la síntesis o actividad de la misma. Sin embargo, se sabe que cuando la proteína es degradada el Zinc puede ser liberado y participar dentro del metabolismo o inducir la formación de nuevas proteínas. Las Metalotioneínas pueden ayudar a detoxificar a las células ya sea por unión de metales tóxicos o de Especies Reactivas de Oxígeno, como los radicales hidroxilos (300 veces más que el Glutatión). De esta manera se puede establecer que otro de los papeles del Zinc es mantener el nivel de Metalotioneínas para proteger a la célula de los daños ocasionados por el estrés oxidativo derivado de agentes tóxicos que entran a las células. Por la cuál se protege al DNA y a otras estructuras biológicas de los daños ocasionados por los radicales libres. Se ha establecido la posible inducción de los genes MtT-1 y MtT-2 por Zinc.

Lo anterior indica la importancia del Zinc como elemento mediador de dos de las defensas antioxidantes celulares (Superóxido Dismutasa y Metalotioneína) además de tener la función de proteger grupos tioles y prevenir la interacción entre diversos grupos químicos y el Hierro, evitando la formación de Especies Reactivas de Oxígeno intracelulares. Finalmente se sabe que el Zinc puede estabilizar al DNA ya que posee la capacidad de localizarse dentro del núcleo por largo tiempo. El Zinc también puede participar en la apoptosis celular, el sistema inmune, el metabolismo del Cobre, el sistema cardiovascular, el cáncer y enfermedades como Alzheimer, Diabetes mellitus, depresión y enfermedad de Wilson (Stefanidou, 2006; Christos, 2012; Prasad, 2013).

El Zinc funciona como antioxidante por diferentes mecanismos. Las Especies Reactivas de Oxígeno son constantemente producidas in vivo dentro de la célula ya sea mediante la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, las enzimas microsomales del citocromo P450, las flavoproteínas oxidasas y el metabolismo peroxisomal de ácidos grasos. Además, la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPHoxs) cataliza la formación de ion superóxido ($^{\circ}\text{O}_2^-$) desde el Oxígeno utilizando al NADPH como donador de electrones. El Zinc tiene la capacidad de inhibir la actividad de esta enzima, siendo, además, cofactor de la Superóxido Dismutasa, la cual cataliza la dismutación del radical superóxido a Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2). Por otro lado, el Zinc puede competir con los iones Hierro (II) y Cobre (II) por sitios de unión tanto en las membranas biológicas como en algunas proteínas, de manera que los iones catalizadores de Especies Reactivas de

Oxígeno no cumplan su función. El metal también tiene la propiedad de activar a las enzimas dependientes de Glutación, reducir la actividad de enzimas oxidantes como el óxido nítrico sintetasa (iNOS) y la NADPH oxidasa, así como inhibir los productos de la lipoperoxidación. A nivel genético se sabe que el Zinc puede tener un papel regulador sobre el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), un miembro de la familia CNC-b ZIP, que constituye un factor de transcripción crítico que regulan la expresión genética de proteínas antioxidantes como Superóxido Dismutasa, Glutación S-Transferasa (GSTA-1), Hemoxigenasa (HO-1) y GSH por unión con un elemento responsable antioxidante (ARE) en la región promotora del gen blanco (Prasad, 2014).

1.11 Distribución y transporte de Zinc

Una vez que el catión se transfiere desde los eritrocitos al plasma, se fija a diferentes sistemas transportadores. La albúmina es el transportador mayoritario en el plasma. Sin embargo, existen otros transportadores de Zinc tales como la transferrina o la alfa-2-microglobulina. El porcentaje en el que este elemento es acarreado por los transportadores mencionados se encuentra entre el 57 y el 40%, para la albúmina y la alfa-2-microglobulina respectivamente, y en muy poca proporción por la transferrina. También se encuentra unido a aminoácidos (3%), formando complejos sobre todo como Zn-cisteína o Zn-histidina. Es a partir de estos sistemas de transportadores sanguíneos como los tejidos toman mayores o menores cantidades de catión, en función de sus necesidades. La Figura 8 muestra el transporte de Zinc en células epiteliales.

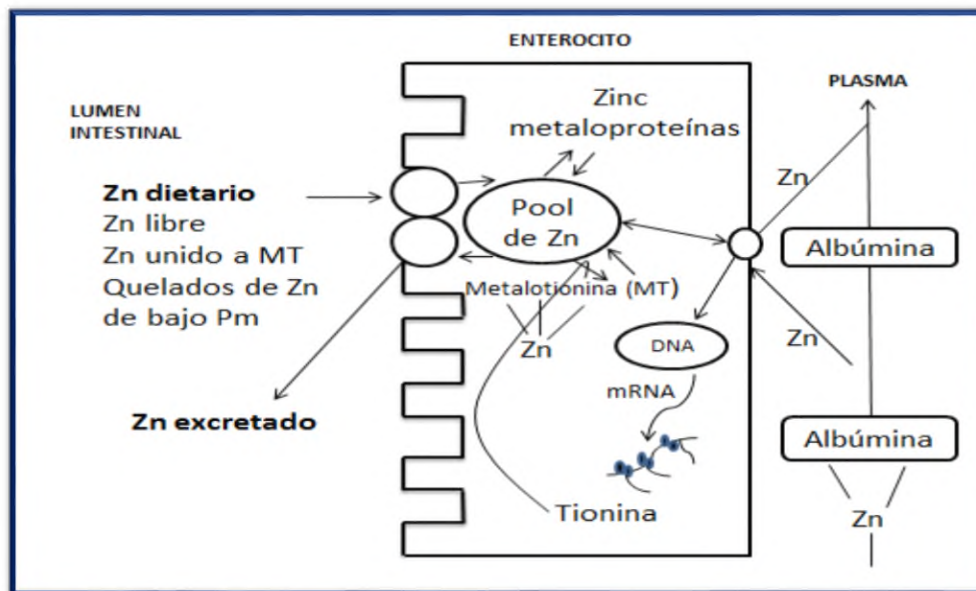


Figura 8. Distribución y Transporte de Zinc en células epiteliales (Tomado de Terrés, 1999).

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

Uno de los principales efectos del Mercurio es la producción de radicales libres, al ocasionar la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes. Los radicales libres ocasionan daños a macromoléculas como el ácido desoxirribonucleico (DNA), las proteínas y los lípidos. Lo anterior no indica que solo las macromoléculas mencionadas sean susceptibles de daño, pero si hace referencia a que son las que resultan más dañadas.

2.1. Daño por estrés oxidativo

La presencia de electrones desapareados generalmente confiere un alto grado de reactividad a los radicales libres. Los radicales derivados de Oxígeno representan la clase más importante de especies generadas en los sistemas vivos; siendo más importantes que los radicales libres de Nitrógeno. En la actualidad, día a día, se va incrementando el porcentaje de personas que padecen enfermedades como daño renal, cáncer, Parkinson y Alzheimer. Existen avances en el conocimiento del origen y la evolución de algunas de estas enfermedades, por lo que se han podido estudiar los efectos de algunas de las enfermedades mencionadas. Se ha observado que el estrés oxidativo juega, muchas veces, un papel importante en el desarrollo de estas y otras patologías. El fenómeno del estrés oxidativo puede generarse a partir de sustancias endógenas o exógenas. Dentro de las primeras se pueden incluir la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias, el metabolismo del Citocromo P450, la actividad de los peroxisomas, y la activación de células inflamatorias. Las mitocondrias pueden generar cantidades significativas de glutatión y mantener el estado redox involucrado en procesos como la reparación y expresión del DNA. En la Figura 9 se observa la entrada de Especies Reactivas de Oxígeno en las células y el proceso seguido hasta originar posibles mutaciones.

Cuando se presenta un entorno oxidativo se produce la modificación de los grupos sulfhidrilo de algunas proteínas (proteína-SH), ya que estos pueden sufrir el proceso de oxidación. Los productos parcialmente oxidados tienen la capacidad de reaccionar con Glutatión Reducido y con proteínas unidas al péptido (proteína-SSG), que se reducen por medio del ciclo del Glutatión a través de las enzimas Glutatión Reductasa, Glutaredoxina y Tiorredoxina, cuya finalidad es la restauración de los sulfhidrilos de las proteínas (proteína-SH). Sin embargo, si el proceso de oxidación de los grupos sulfhidrilo de las proteínas no es frenado por GSH, la oxidación adicional conduce a la formación de forma irreversible de formas oxidadas, tales como proteína-grupo ácido sulfínico (proteína-SO₂H) y proteína-grupo ácido sulfónico (proteína-SO₃H). Generalmente, la capacidad antioxidante de los compuestos tiol se debe a que el átomo de Azufre puede fácilmente perder un solo electrón. Durante el tiempo que dura la existencia de las especies radicales de Azufre se genera un radical tiilo (GS•),

significativamente importante al igual que muchos otros radicales generados durante el estrés. La reacción de Glutathión Reducido (GSH) con un radical $R\cdot$ es la siguiente: $GSH + R\cdot \rightarrow GS\cdot + RH$. Los radicales tiilo generados pueden dimerizarse formando el Glutathión Oxidado (GSSG): $GS\cdot + GS\cdot \rightarrow GSSG$. Este producto se puede acumular en el interior de las células y entonces adquiere un valor esencial la relación de GSH / GSSG como medida del estrés oxidativo de un organismo. Una concentración demasiado alta de Glutathión Oxidado puede dañar la actividad de varias enzimas. De manera adicional, el GSSG puede reaccionar con los grupos sulfhidrilo de proteínas para producir la proteína mixta disulfuro más Glutathión: $GSSG + \text{proteína-SH} \leftrightarrow \text{proteína-S-SG} + GSH$. Los disulfuros mixtos (proteína-S-SG) tienen una vida media más larga de GSSG, muy probablemente debido al plegamiento de las proteínas. Todo lo anterior se puede observar en la Figura 10.

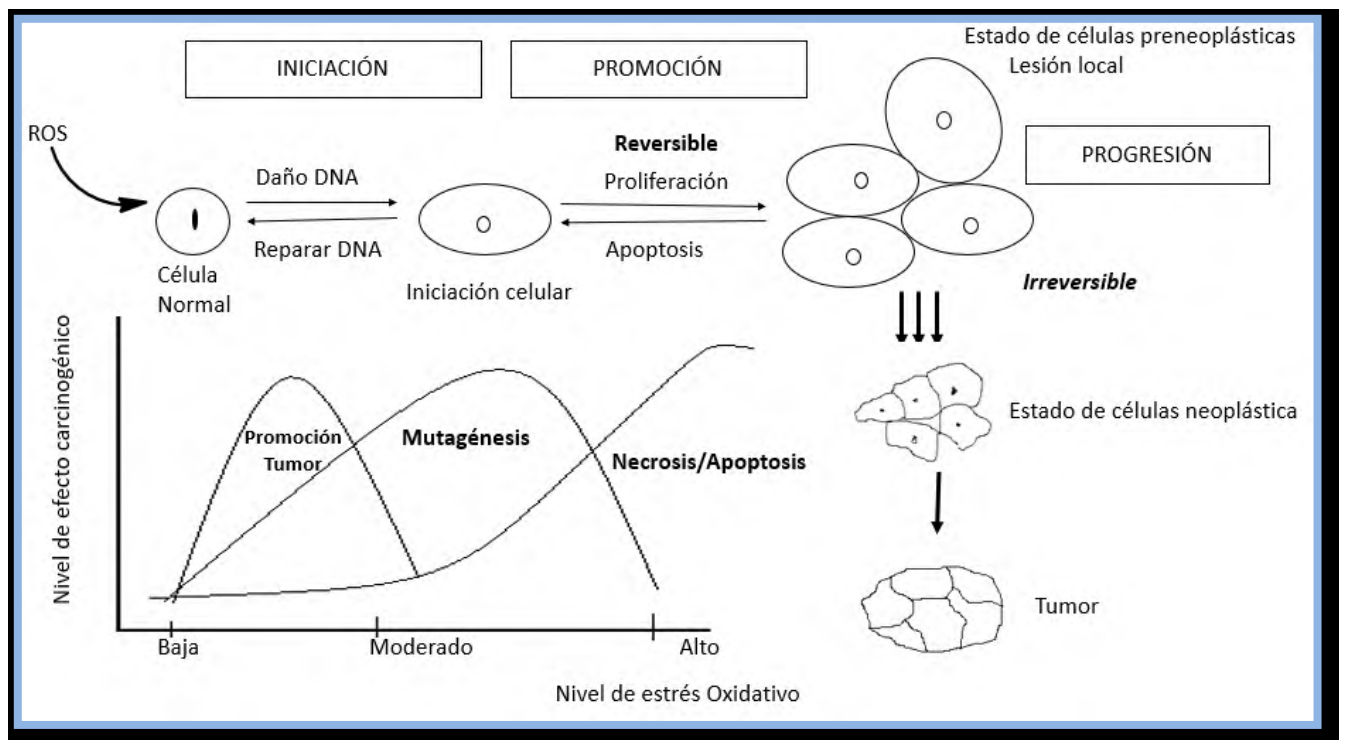


Figura 9. Etapas que conforman el proceso carcinogénico en presencia de radicales libres (Modificado de Valko, 2006).

Las principales funciones de protección del Glutathión contra el estrés oxidativo involucran los siguientes aspectos: 1) el Glutathión es un cofactor de varias enzimas desintoxicantes contra el estrés oxidativo, por ejemplo: Glutathión Peroxidasa (GPx) y Glutathión Transferasa; 2) el Glutathión participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática y 3) este péptido puede neutralizar radicales hidroxilos, Oxígeno singlete, Peróxido de Hidrógeno y peróxidos de lípidos.

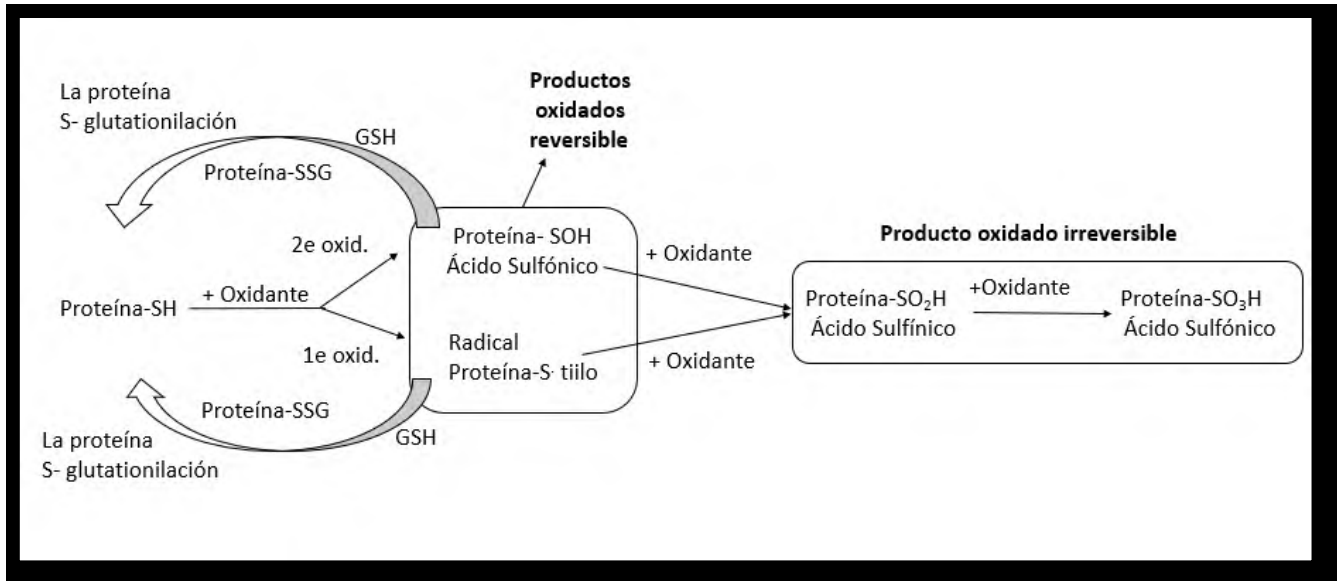


Figura 10. Papeles de GSH en la de los grupos sulfhidrilo de proteínas (Modificado de Valko, 2006).

El efecto de las Especies Reactivas de Oxígeno y las de Nitrógeno está equilibrado por la acción de agentes antioxidantes no enzimáticos y de enzimas antioxidantes. Tales defensas antioxidantes son muy importantes, ya que representan la eliminación directa de los radicales libres (prooxidantes), proporcionando así una protección máxima para algunos sitios biológicos importantes. Un buen antioxidante debe cumplir algunas características, entre las que se encuentran 1) eliminar de manera específica los radicales libres; 2) debe metabolizar los metales redox de quelato; 3) interactuar (regenerar) a los antioxidantes dentro de la "Red antioxidante"; 4) tener un efecto positivo sobre el gen de expresión; 5) ser absorbido fácilmente; 6) estar presente en los tejidos y fluidos a una concentración fisiológica; 7) llevar a cabo su acción tanto en la fase acuosa como en los dominios de la membrana.

Los antioxidantes enzimáticos más eficientes comprenden una batería de enzimas que incluye a la Superóxido Dismutasa, la Catalasa y la Glutión Peroxidasas. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen a la vitamina C, la vitamina E, los carotenoides, los antioxidantes tiol (Glutión, Tiorredoxina y el ácido lipoico), los flavonoides naturales, un producto hormonal de la glándula pineal, la melatonina y otros compuestos. Algunos antioxidantes actúan en un ambiente hidrofílico, otros en un entorno hidrofóbico, y algunos actúan en ambos ambientes dentro de la célula. Los mecanismos de acción dependerán del tipo de antioxidante del que se trate. Por ejemplo, la vitamina C reacciona con el superóxido en la fase acuosa mientras que la vitamina E lo hace en la fase lipofílica. En contraste, el ácido lipoico es soluble tanto el agua como en los lípidos y por ello puede funcionar

tanto en membranas celulares como en el citosol. Todo lo mencionado anteriormente sustenta la importancia de los agentes antioxidantes porque pueden equilibrar la producción de radicales libres, así como inhibir la producción de estas especies dañinas.

Existen microelementos esenciales que también cuentan con acción antioxidante, entre ellos están el Selenio y el Zinc. La creciente importancia del Selenio en la fisiopatología humana radica no sólo en la mayor consideración clínica que cada día tienen los elementos traza sino en su papel en la protección de la célula contra el estrés oxidativo. El hombre ingiere el Selenio en forma de Selenometionina y Selenocisteína, siendo esta última la forma en que el Selenio se encuentra en las proteínas y la de mayor biodisponibilidad. El Selenio forma parte de la Glutatió Peroxidasa (GSH-Px), una enzima fundamental en el sistema de defensa antioxidante celular, ya que descompone los hidroperóxidos lipídicos y el peróxido de hidrógeno en presencia de Glutatió Reducido. La Figura 11 muestra la importancia del Selenio dentro del sistema antioxidante.

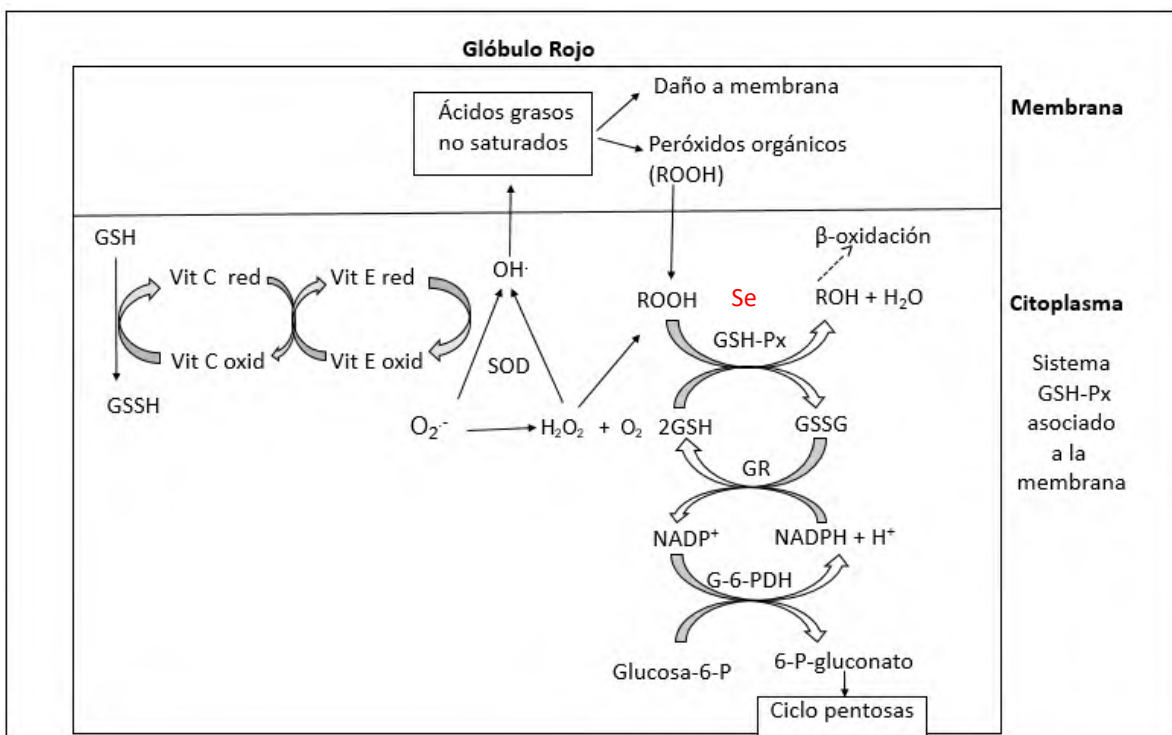


Figura 11. Acción antioxidante del Selenio cómo cofactor de enzimas antioxidantes (Modificado de Navarro, 2004).

Los mecanismos precisos de la acción y acumulación del Mercurio y su retención dentro de los órganos blancos aún no están claros. En general, la asociación de Mercurio con Selenio se utiliza para explicar estos fenómenos y una correlación positiva entre los dos elementos ha sido notificada con frecuencia (Watanabe 2002). Las interacciones de Mercurio y Selenio involucran procesos

toxicológicos y bioquímicos complicados. Por ejemplo, la interacción entre Mercurio inorgánico y Selenito de Sodio muestran características diferentes a la interacción entre metilmercurio (MeHg) y Selenio.

El Mercurio suele ser acumulado y/o retenido y el Selenio (Se) puede proteger a las células de efectos nocivos de metal pesado. Por “retenido” se entiende lo que se acumuló y que no se eliminó. En humanos la acumulación de Mercurio fue observada en grupos expuestos a vapor de Mercurio de forma laboral (mineros y personal dental) o a través de un entorno contaminado (alimentos contaminados) o por implantes odontológicos como las amalgamas. Se ha reportado que la acumulación y retención más alta de ambos elementos (Mercurio y Selenio) presenta una relación casi equimolar, determinándose en la glándulas tiroides y pituitaria seguido de la corteza renal y algunas partes del cerebro de mineros jubilados y personal dental (Kosta, 1975; Nylander 1991; Falnoga, 2000). En estas personas se pudo detectar una concentración muy elevada de Mercurio en los órganos y un daño celular muy bajo, lo cual puede sugerir la formación de asociaciones o complejos 1:1 entre ambos metales. A nivel celular, después de la homogeneización y centrifugación de los tejidos, así como de los estudios de microscopía electrónica y de rayos X realizados, se encontró que tanto la acumulación como la retención de Mercurio y Selenio se localizaron en lisosomas y núcleos en forma de agregados (Friberg, 1989, citado en Drasch 1996).

El proceso de desintoxicación no puede ser atribuido solamente a la formación de conjugados Mercurio-Selenio. Dentro de las células de diferentes órganos se ha detectado un tripéptido de suma importancia metabólica, el Glutati6n en estado reducido (GSH) y una prote6na citos6lica de uni6n a metal rica en ciste6na denominada Metalotione6na (MT). Esta prote6na es conocida por formar complejos estables con metales, incluido el Mercurio en 6rganos como ri6n (Cuello, 2016; Zalups, 2000; Chen, 2004 *a b*), h6gado (Chen, 2004 *a, b*), la gl6ndula tiroides (Falnoga, 1994) y el cerebro (Falnoga, 1993). Lo anterior se ha determinado en experimentos con animales expuestos a vapor de Mercurio o sales de Mercurio inorg6nico.

Al revisar la literatura, se encontraron trabajos reportando que el Glutati6n podr6a jugar un papel importante durante la toxicidad aguda con Mercurio. Tambi6n hay datos e hip6tesis relacionados con la posibilidad de la participaci6n del Selenio dentro de las funciones de la Metalotione6na (Takatera, 1994). Los productos finales de la degradaci6n de la uni6n prote6na-Selenio (en forma de enzimas o en Selenoprote6nas) podr6an contribuir a la formaci6n de complejos insolubles de Mercurio como el selenuro de Mercurio o complejos con sulfuro, mismos que se encuentran en los lisosomas de diferentes tejidos (Aoi, 1985; Li, 2002; citada en Huang, 2004).

Por otro lado, como se especula por algunos autores (Drasch, 1996, 2000; Gailer 2002; Cañari, 2011), la uni6n del Selenio al Mercurio podr6a originar una deficiencia relativa de concentraciones

biológicamente disponibles del micronutriente en diferentes formas (Selenuro de Hidrógeno u otros metabolitos reactivos de Selenio) necesarias para la síntesis de enzimas dependientes de Selenio. Lo anterior podría conducir a la disminución de las funciones de desintoxicación de radicales libres, el metabolismo de la tiroides y la producción de moléculas del sistema inmune (Tapiero, 2003; Schweizer, 2004). Por ello, se ha comenzado a estudiar la cantidad de Selenio no asociado a Mercurio en los tejidos (Drasch, 2000). Derivado de la suposición de que el Mercurio es cuantitativamente depositado en los tejidos unido a Selenio en una relación 1:1, la cantidad de Selenio no unido a Mercurio puede ser calculado por la diferencia entre el contenido molar de los dos elementos (moles de Selenio-moles de Mercurio).

2.2. Zinc y estrés oxidativo

Otro oligoelemento esencial dentro de la dieta alimenticia es el Zinc (Zn), uno de los más importantes metales traza en el cuerpo y es indispensable para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, plantas y animales. Se encuentra en todos los tejidos corporales y secreciones en concentraciones relativamente altas (85% en músculos y los huesos, 11% en la piel y el hígado) y muy elevadas en otros (próstata y partes del ojo).

En todos los sistemas vivos, las células requieren niveles adecuados de defensas antioxidantes con el fin de contrarrestar el efecto perjudicial de una producción excesiva ROS y para evitar daños a las células inmunes. La existencia de estas defensas celulares se debe a que existen procesos normales de producción excesiva de Especies Reactivas de Oxígeno. Por ejemplo, los procesos inflamatorios, la activación de fagocitos y/o la acción de productos bacterianos con receptores específicos son capaces de promover en conjunto la enzima NADPH oxidasa, quien cataliza la producción de altas cantidades del anión superóxido (O_2^-). Bajo ciertas circunstancias los macrófagos pueden producir radicales libres del tipo superóxido y Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) que son esenciales en procesos de fagocitosis de microbios invasores (Puertollano, 2011).

El Zinc protege a la célula de daños de oxidación por radicales libres. Esto puede ocurrir por varios factores, entre los que se encuentran la estabilización de la estructura de la membrana celular; el mantenimiento de un nivel adecuado de Metalotioneínas (que son captadores de radicales libres); ser un componente esencial de la Superóxido Dismutasa (SOD); actuar como agente protector para tioroles; prevenir la interacción entre los grupos químicos con hierro para formar radicales libres; así como actuar como inhibidor de la NADPH oxidasa (atrapa los radicales) (Davis et al., 1998; Tapiero y Tew 2003; Rahman 2007).

El sistema inmune es especialmente sensible a la oxidación. Las células que constituyen el sistema inmune dependen de la comunicación célula-célula a través de receptores unidos a la membrana para llevar a cabo una adecuada transmisión de las señales. Las membranas celulares son ricas en

fosfolípidos que, si se oxidan, pueden conducir a una pérdida de integridad de la membrana alterando la fluidez de la misma (Reyes, 2009) dando como resultado que tanto las funciones celulares como la señalización intracelular se vean afectados intensamente. Algunos investigadores han demostrado que la exposición a agentes potencialmente pro-oxidantes puede implicar una reducción en la expresión de algunos receptores de la membrana celular en aquellas células que no están adecuadamente protegidas por antioxidantes. Por estas razones, resulta obvio que se requieren cantidades elevadas de agentes neutralizantes (antioxidantes) no sólo para proteger las células contra el estrés oxidativo, sino también para prevenir y/o reducir el daño de las células inmunes. Por el contrario, la ingesta insuficiente de antioxidantes, en la dieta, puede conducir a una profunda supresión inmune de funciones, aumentar el riesgo de sepsis y predisponer a las infecciones (Gruner, 1986).

2.3. Protección del Selenio y el Zinc contra la toxicidad inducida por metales pesados

Los metales no esenciales tienen una serie de efectos nocivos en el cuerpo de humanos y animales. Metales como Plomo (Pb), Arsénico (As) y Cadmio (Cd) son altamente tóxicos incluso a muy bajas concentraciones (Martínez, 2013). Entre los metales no esenciales, el Arsénico (As), el Plomo (Pb), el Mercurio (Hg) y el Cadmio (Cd) causan grave preocupación por su bioacumulación inadvertida lo cual genera una alta toxicidad, principalmente por la interrupción de la condición homeostática celular.

Cada uno de esos metales expone una toxicología única, sin embargo, los mecanismos comunes de toxicidad incluyen mimetismo, daño oxidativo y formación de aductos con ADN o proteínas. La toxicidad afecta a casi todos los sistemas y órganos en el cuerpo, incluido el cerebro. Algunos efectos incluyen la generación de ROS, la alteración de los procesos de reparación del ADN; la metilación de material genético; genotoxicidad y activación de la ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos.

La exposición al mercurio puede dañar los pulmones, alterar la membrana mucosa y causar vómitos, náuseas, erupciones en la piel, aumento de la presión arterial, disfunción renal y neurológica grave. Este metal induce efectos genotóxicos a través del estrés oxidativo; rompe la homeostasis del Calcio, y altera sistemas neurotransmisores e interacciones citoesqueléticas.

El Zinc es uno de los metales esenciales que puede mimetizar los efectos de metales pesados como el Plomo, el Cadmio, el Mercurio y el Arsénico, ayudando a mantener la funcionalidad de muchos procesos fisiológicos como el crecimiento celular, la maduración inmune y la reproducción. Este micronutriente tiene un papel biológico protector contra el daño de los radicales libres manteniendo un nivel adecuado de MT, siendo un componente esencial de Cu, Zn-Superóxido Dismutasa (Cu,

Zn-SOD), o como agente protector de los tioles y otros grupos químicos. También sirve como cofactor en muchas reacciones enzimáticas importantes incluyendo la actividad de Carboxil peptidasa, Alcohol deshidrogenasa y Anhidrasa carbónica.

El Selenio juega un papel crucial en la mejora de la toxicidad ejercida por los cuatro metales tóxicos mencionados anteriormente. Muchos estudios demuestran que el Se funciona a través de la formación de Selenoproteínas, que contribuyen a la defensa antioxidante; la producción de hormona tiroidea y las respuestas inmunes en diversos procesos biológicos (Spiller, 2017).

2.4. Selenio en la intoxicación con Mercurio

La toxicidad e interacción del Selenio con el Mercurio, depende de la naturaleza de este agente tóxico (por ejemplo, Hg^0 , Hg^+ y Hg^{+2}). El mecanismo de la toxicidad del Mercurio se basa en su capacidad para unirse y en ciertos casos inhibir el resto de las macromoléculas que contienen Azufre y Selenio. El Mercurio tiene una menor afinidad por los grupos tiol y mayor afinidad para los grupos que contienen Selenio, lo que permite un modo de acción multifactorial. La relativa facilidad con la que el mercurio puede pasar de un grupo tiol a otro permite el movimiento de un grupo vinculante a otro alterando el transporte a través de las membranas y afectando a múltiples proteínas. La unión del Mercurio al Selenio se realiza en Selenoproteínas y Selenoenzimas. El Mercurio presenta una afinidad muy alta (varios órdenes de magnitud) con los grupos tiol. Cuando el Mercurio se une a estas estructuras origina la disminución de las reservas de Selenio y da lugar a daños suprarrenales y posteriormente al daño oxidativo. Por otro lado, el metal (ya sea en forma de $MeHg^+$ o Hg^{2+}) unido a los grupos tioles de las Cisteínas, puede actuar como un sustrato para el transportador de iones orgánicos en las células tubulares renales, lo que permite la absorción en los riñones y la alta carga renal de Mercurio. Este hecho se ha propuesto como mecanismo de toxicidad del Mercurio tanto en los riñones como en el cerebro. Múltiples estudios han demostrado, además, la reducción del Glutatión en células renales, hepáticas y neurales. Esto ocurre ya que el Glutatión se moviliza en respuesta al estrés oxidativo ocasionado por la presencia de Mercurio (Mostafizur, 2019).

2.5. Zinc y la desintoxicación del Mercurio

Se ha reportado que el mecanismo de protección del Zinc contra la intoxicación con Mercurio (II) se realiza principalmente a través de la formación de Metalotioneína y las manifestaciones antioxidantes (Jadán-Piedra *et al.*, 2019). Aunque la afinidad del Mercurio a las Metalotioneínas es mayor que la del Zinc, se ha propuesto que la unión del Mercurio a la Metalotioneína (Hg-MT) pudiera actuar como un mecanismo potencial de protección. Fukino *et al.* (1984), informaron que la restauración de las enzimas antioxidantes como GPx y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, el

aumento de la vitamina C y E, así como contenido de GSH podrían servir como un mecanismo protector originado por el Zinc (Fukino *et al.*, 1984).

CAPÍTULO 3

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día se sabe que los efectos tóxicos de los metales pesados en los seres vivos van aumentando debido, principalmente, a la fabricación de muchos compuestos químicos derivados de los mismos, los cuales se utilizan sin la más mínima conciencia del mal uso que de ellos se ha hecho. Los metales pesados son muy tóxicos cuando se encuentran en forma de iones y con cargas positivas (+1 o +2) ya que constituyen las formas tóxicas cuando se encuentran dentro de las células de todos los seres vivos.

Dentro de las células, los iones metálicos pueden interactuar con macromoléculas esenciales dañando sus funciones y desencadenando el desequilibrio del metabolismo. Lo anterior es responsable de muchas de las enfermedades o efectos tóxicos por los que cursan los seres vivos expuestos a los metales pesados de manera aguda o tóxica, así como de forma ocupacional o no ocupacional.

El Mercurio es un elemento que provoca diferentes efectos de acuerdo a sus características físicas y químicas. Por esta razón sus múltiples compuestos (ya sean orgánicos o inorgánicos) ejercen sus efectos de manera particular. Al final cualquiera que sea el compuesto generará la liberación del mercurio iónico, el cual ejercerá sus efectos principalmente uniéndose e inactivando macromoléculas ricas en grupos sulfhidrilo. El Mercurio tiene efectos adversos prácticamente en todos los órganos del cuerpo de los animales y los humanos, y puede llegar a ocasionar la muerte de muchos miembros de comunidades cercanas a lugares contaminados con el metal.

Ante este escenario es necesario establecer ayuda de tipo metabólico mediante el cual se puedan contrarrestar los efectos de la intoxicación con Mercurio en los mamíferos y de esta manera generar posibles tratamientos con la finalidad de eliminar el Mercurio del organismo o disminuir los efectos de su presencia en las células. Los micronutrientes y los quelantes específicos constituyen dos posibles candidatos bioquímicos para el estudio de sus efectos sobre la intoxicación con el metal.

Por lo anterior se puede establecer que el problema de investigación de este trabajo se enfoca al estudio de los efectos tóxicos del Mercurio y, en base a ello, el establecimiento de posibles terapias para ayudar a prevenir, combatir o reparar los efectos tóxicos del Mercurio en mamíferos, entre ellos el humano.

CAPÍTULO 4

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

4.1. Justificación

El Mercurio se une a los grupos sulfhidrilo libres o pertenecientes a proteínas y péptidos de importancia biológica. Por ello uno de sus efectos más dañinos de este elemento es la inhibición de las enzimas antioxidantes, lo que trae como consecuencia el aumento de las Especies Reactivas de Oxígeno al alterar el balance entre estas y los sistemas antioxidantes endógenos, lo que a su vez genera estrés oxidativo, responsable de enfermedades que día con día van en aumento. Además, se ha relacionado la exposición a Mercurio con diversos problemas renales, mismos que han ido en aumento en los países (incluido México) que desarrollan la industria del Mercurio. La Ciudad de Tuxtepec, Oaxaca cuenta con diferentes tipos de industrias que pueden contaminar el medio ambiente con metales (incluido este metal) y por ello desencadenar enfermedades renales. En esta localidad, datos proporcionados por el ISSSTE (INEGI, 2018), han indicado que los casos de enfermedad renal de origen desconocido han ido incrementando con el paso del tiempo. La edad se relaciona con el sexo afectando a las mujeres de 45 a 64 años de edad con fecha de registro de 01 de enero al 31 de diciembre del 2017. La enfermedad renal se ha dividido en dos etapas, de ellas se sabe que, el 33.33% cursa la etapa 2 y 66.66% la etapa 1. Si el daño se mide en relación con el sexo, en el caso de personas de 65 años en adelante la enfermedad renal afecta 25% a mujeres y 75% a hombres y de ello el 25% se encuentra en etapa 2 y 75% de etapa 1, (datos proporcionados por el ISSSTE, año del registro 2017-2021 en Tuxtepec, Oaxaca).









De acuerdo con cifras oficiales, las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) representan 70% de todas las muertes. En gran medida el problema es consecuencia de falta de acción, desarticulación institucional y procesos mal encaminados. Hoy en día se gasta el 50% de los recursos destinados a salud en ECNT, entre ellas la Enfermedad Renal Crónica (ERC). Si el número de casos que llegan a etapas tardías no disminuye de manera significativa, el impacto económico de la ERC en el sector salud pondría generar graves problemas financieros. La ERC es un problema de grandes dimensiones en México, cuyas proporciones e impacto apenas se ha comenzado a entender. El problema en su mayor parte es consecuencia de ECNT mal atendidas, que son el azote de las instituciones del sector, entre las que se pueden mencionar el sobrepeso, la obesidad, la diabetes, la hipertensión arterial sistémica, las dislipidemias, por mencionar las más importantes. Desafortunadamente a la fecha no se cuenta con información precisa, pues no existe en México un registro nacional centralizado de casos de padecimientos renales, de gran valor para su caracterización, determinación de incidencias y prevalencias, análisis de costos, planeación de acciones y recursos, ya que muchas de las verdaderas causas de muerte que serían atribuibles a la enfermedad, en su progresión desde las etapas tempranas, quedan ocultas dentro de un genérico que casi siempre se reporta como muertes por enfermedades cardiovasculares.

A pesar del subregistro, fuentes oficiales citan la ERC dentro de las primeras diez causas de la mortalidad general en el último decenio (Tamayo et. al., 2016). La Tabla 6 muestra las 10 principales causas de muerte en México.

Tabla 6. Las diez principales causas de mortalidad a nivel nacional y regional (Tomada de INEGI, 2020-2021)

Principales causas de muertes por sexo.

Rango	Total	Hombre	Mujer
1	Enfermedades del corazón 218 885 En 2019 fueron 156 041	COVID-19 129 329	Enfermedades del corazón 97 233 En 2019 fueron 72 788
2	COVID-19 201 163	Enfermedades del corazón 121 637 En 2019 fueron 83 258	Diabetes mellitus 72 173 En 2019 fueron 52 643
3	Diabetes mellitus 151 214 En 2019 fueron 104 354	Diabetes mellitus 79 038 En 2019 fueron 51 711	COVID-19 71 829
4	Tumores malignos 90 645 En 2019 fueron 88 680	Tumores malignos 44 498 En 2019 fueron 43 296	Tumores malignos 46 145 En 2019 fueron 45 384
5	Influenza y neumonía 56 830 En 2019 fueron 31 081	Influenza y neumonía 34 897 En 2019 fueron 17 034	Influenza y neumonía 21 928 En 2019 fueron 14 046
6	Enfermedades del hígado 41 520 En 2019 fueron 40 578	Agresiones (homicidios) 32 147 En 2019 fueron 32 530	Enfermedades cerebrovasculares 18 091 En 2019 fueron 17 659
7	Enfermedades cerebrovasculares 37 054 En 2019 fueron 35 303	Enfermedades del hígado 30 319 En 2019 fueron 29 692	Enfermedades del hígado 11 198 En 2019 fueron 10 879
8	Agresiones (homicidios) 36 579 En 2019 fueron 36 661	Accidentes 25 371 En 2019 fueron 25 758	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 10 062 En 2019 fueron 11 269
9	Accidentes 32 334 En 2019 fueron 33 524	Enfermedades cerebrovasculares 18 961 En 2019 fueron 17 644	Accidentes 6 942 En 2019 fueron 7 730
10	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 21 972 En 2019 fueron 23 768	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 11 910 En 2019 fueron 12 499	Insuficiencia renal 6 632 En 2019 fueron 8 359

 Enfermedades del	 Diabetes mellitus	 Tumor maligno	 Otras enfermedades no transmisibles	 Accidentes	 Agresiones (homicidios)	 Enfermedades transmisibles
 COVID-19						

Se ha informado que de no tomarse medidas adecuadas de enseñanza en las escuelas e instituciones o por la falta de difusión de conocimientos en insuficiencia renal, la ERC se convertirá un problema de salud pública en muy poco tiempo. No obstante, el problema ha crecido

exponencialmente, en términos de pacientes y en términos de procedimientos de diálisis en el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. Por su parte el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), prevé que los pacientes con insuficiencia renal aumentarán del 1.1% en 2011 al 14.3% en 2050, y que el gasto aumentará del 4.0% al 28% (Hernández, 2019).

En las 8 regiones del Estado de Oaxaca, las principales causas de mortalidad son Diabetes Mellitus, Infarto Agudo, Tumores Malignos, Enfermedades del hígado e Hipertensión Arterial.

Dentro de las diez principales causas de mortalidad por región aparecen otras enfermedades del hígado cuya tasa estatal es de 22.69%. La región de Valles Centrales tiene la más alta tasa con 28.68 % seguida de Papaloapan con 23.33% y Cañada con 24.04%. Sin embargo, solamente la región del Papaloapan aparece con 14.28% de casos de insuficiencia renal (NOTA: Tasa por 100 mil habitantes. Fuente: Cubos de SEED, 2010 al 2016. Proyecciones CONAPO 2010-20).

Por lo anterior, el estudio de los posibles tratamientos con agentes quelantes y microelementos constituye un esfuerzo por contrarrestar los daños ocasionados por la exposición a Mercurio en riñones de roedores intoxicados con el metal.

Los estudios realizados en esta investigación tuvieron como finalidad generar información relacionada con el uso de diversos esquemas de protección del riñón utilizando agentes quelantes y micronutrientes contra la intoxicación renal con Mercurio. Estos estudios podrían proporcionar información importante con el fin de, posteriormente, poder iniciar el escalamiento en humanos y con ello investigar si estos esquemas de protección podrían ser útiles en las personas que sufren daño renal debido a la intoxicación con Mercurio.

4.2. Hipótesis

El Selenio, el Zinc y el Ácido Dimercaptosuccínico (DMSA) solos o en combinación, disminuirán los efectos adversos del Mercurio en ratas Wistar macho que pertenecen a la especie *Rattus norvegicus*, expuestas de forma oral a Cloruro de Mercurio (HgCl₂).

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1. General

Estudiar el efecto de los elementos esenciales Selenio y Zinc, así como el agente quelante Ácido Dimercaptosuccínico (DMSA), y su papel preventivo sobre la intoxicación renal con Mercurio en roedores.

5.2. Particulares

- 1.- Estudiar el efecto de la exposición a Mercurio en riñones de roedores expuestos vía oral por un periodo de 15 días.
- 2.- Analizar el efecto del tratamiento con Selenio en riñón de roedores expuestos a Mercurio.
- 3.- Estudiar el efecto del tratamiento con Zinc en riñón de roedores expuestos a Mercurio.
- 4.- Evaluar el efecto del tratamiento con Selenio y Zinc en riñón de roedores expuestos a Mercurio.
- 6.- Estudiar el efecto del tratamiento con DMSA en riñón de roedores expuestos a Mercurio.
- 7.- Evaluar el efecto del tratamiento con Selenio, Zinc y DMSA en riñón de roedores expuestos a Mercurio.

CAPÍTULO 6

METODOLOGÍA

Todos los animales (rata macho de la cepa Wistar) fueron alimentados con comida procesada con el contenido de nutrientes necesarios para su buen crecimiento. Se formaron grupos de 6 ratas cada uno y se colocaron en cajas en donde se les dio agua o el tratamiento correspondiente, manteniéndolos en un ambiente con temperatura templada y ciclos de luz-oscuridad. Los grupos fueron clasificados y tratados como se indica a continuación. Cada grupo contó con su control correspondiente y a continuación se detalla cada uno.

1.- Grupo control o de crecimiento normal: Fue mantenido con agua y comida normales por un periodo de 15 días. Este grupo indicó el desarrollo normal de los animales durante el tiempo de intoxicación y tratamiento.

2.- Grupo expuesto a Mercurio: Los animales fueron intoxicados, vía oral, por un periodo de 15 días con una solución de Cloruro de Mercurio (HgCl_2) que contenía 2.5 mg/kg de peso [92.07mM]. Este grupo nos indicó los daños renales ocasionados por la exposición renal a Mercurio.

Para el tratamiento con micronutrientes proporcionado a los animales al mismo tiempo que se llevó a cabo la intoxicación con el metal se establecieron los siguientes grupos junto con sus respectivos controles.

3.- Grupo expuesto a Mercurio y tratado con Selenio: Los animales se trataron diariamente, vía intraperitoneal, con 25 mg/kg de una solución de Sulfuro de Selenio (SeS_2) al mismo tiempo de ser expuestos por vía oral a 2.5 mg/kg de la sal de Mercurio por un periodo de 15 días.

4.- Grupo expuesto a Mercurio y tratado con Zinc: Los animales se inyectaron, vía intraperitoneal, con 25 mg/kg de una solución de Cloruro de Zinc (ZnCl_2) al mismo tiempo que fueron expuestos por vía oral a 2.5 mg/kg de Cloruro de Mercurio por un periodo de 15 días.

5.- Grupo expuesto a Mercurio y tratado con Selenio y Zinc: Los animales fueron inyectados, vía intraperitoneal, con 25 mg/kg de la sal de Selenio y 25 mg/kg de una solución de Cloruro de Zinc al mismo tiempo que se expusieron por vía oral a 2.5 mg/kg de Cloruro de Mercurio por un periodo de 15 días.

6.- Grupos preexpuestos a Selenio o a Zinc: Los animales fueron tratados por 15 días con Sulfuro de Selenio, o con Cloruro de Zinc a la misma concentración que en los grupos anteriores. Después de esos 15 días se procedió a realizar la intoxicación con Cloruro de Mercurio a la dosis de 2.5 mg/kg. Estos grupos se establecieron para evaluar el posible papel preventivo de los micronutrientes.

7.- Grupos tratados con Selenio o con Zinc: Los animales fueron inyectados, vía intraperitoneal, con 25 mg/kg de una solución de Sulfuro de Selenio o con una solución 25 mg/kg de Cloruro de Zinc por un periodo de 15 días. Estos grupos constituyeron los controles de los grupos experimentales

anteriores y sirvieron para observar el efecto que las sales de los metales esenciales podrían tener en el riñón de los animales de experimentación.

Para el tratamiento con el agente quelante se establecieron los siguientes grupos.

8.- Grupo expuesto Mercurio y tratado con DMSA: Los animales se sometieron a un tratamiento con 20 mg/kg del agente quelante durante dos semanas al mismo tiempo que se intoxicaron por vía oral con 2.5 mg/kg de la sal de Mercurio.

9.- Grupo tratado con DMSA más Selenio: Los animales se trataron con 20 mg/kg de DMSA y a la vez con 25 mg/kg de una solución de la sal de Selenio por un periodo de 15 días.

10.- Grupo tratado con DMSA más el Zinc: Los animales se trataron con 20 mg de DMSA y al mismo tiempo se les inyectó, vía intraperitoneal, 25 mg/kg de una solución de Cloruro de Zinc por un periodo de 15 días.

11.- Grupo expuesto a Mercurio y tratado con Selenio, Zinc y DMSA: Los animales fueron tratados con los micronutrientes y con DMSA (vía intraperitoneal) a las concentraciones indicadas anteriormente a la par de ser intoxicados con 2.5 mg/kg, vía oral, con Mercurio.

Para este bloque un control se estableció un grupo tratado solo por 15 días con el agente quelante. Antes y después de los tratamientos los animales se colocaron en una caja metabólica para realizar la recolección de las muestras de orina correspondientes.

Posteriormente se anestesiaron utilizando pentobarbital sódico a una relación de 1mg/ 2.5 Kg de peso. A continuación, se extrajeron los órganos riñón, cerebro e hígado. Se obtuvo una muestra de sangre la cual fue recolectada en un tubo con EDTA como anticoagulante.

Los dos riñones fueron extirpados y colocados a -20°C hasta el momento de realizar los ensayos bioquímicos.

Para llevar a cabo los ensayos bioquímicos los riñones se lavaron con solución salina isotónica y se cortaron por la mitad mediante una disección longitudinal de tal manera que la médula fuera retirada. El tejido se homogeneizó en un homogenizador ultra turrax IKAT18 basic en una solución 1 M de fosfatos a pH 7.2.

6.1. Medición de proteínas en suero, orina y homogenizado de riñón por método de Lowry

El método de Lowry (1951) constituye un procedimiento colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas totales de una muestra. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las moléculas proteicas, siendo la intensidad del color azul proporcional a la concentración de proteínas, según la Ley de Lambert-Beer $A = \epsilon \cdot l \cdot c$. Este método consta de dos etapas. En la primera los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos

con los átomos de Nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato. En la segunda etapa se lleva a cabo la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el Cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso (Lowry, 1951).

La metodología que se empleó fue la siguiente:

Se colocaron en un tubo de ensaye 790 μL (microlitros) de agua destilada a la cual se le adicionaron 10 μL de la muestra, 100 μL de desoxicolato de Sodio ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}$) y 2 mL (mililitros) de una solución compuesta por Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 0.5%, dos gramos de Hidróxido de Sodio (NaOH) y 0.134 gramos de tartrato de Sodio Potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Finalmente se añadieron 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$, usando una dilución 1:3). Cada tubo fue agitado vigorosamente y se dejó reposando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de este tiempo se midió a la absorbancia a 750 nm (nanómetros) en el espectro de uv/visible (Perkin Elmer Lambda 25). Se utilizó una curva patrón con albúmina sérica bovina.

6.2. Medición de la actividad de la GST en muestras de riñón, suero y orina

La Glutación S-Transferasa (GST), pertenece a una familia de enzimas conocidas anteriormente como ligandinas, mismas que pertenecen a la fase II del metabolismo de xenobióticos. Se ha observado que existen isoformas tanto en eucariontes como en procariontes estas proteínas poseen la capacidad de catalizar la conjugación del Glutación Reducido (GSH) a diversos sustratos electrofílicos con el propósito de llevar a cabo la detoxificación. La técnica de medición se basa en analizar la actividad enzimática en muestras biológicas. La reacción se inicia al colocar, en un amortiguador apropiado, el Agente Ligante (GSH), el Sustrato (en este caso el 2,4-Dinitroclorobenceno, DNCB) y la muestra biológica (en donde se encuentra la enzima). La actividad se manifiesta como el aumento de absorbancia a 350 nm (Atkinson, 2009; Douglas, 1987; Danyelle, 2003; Harrison, 1989). La metodología que se utilizó se explica a continuación.

Se usó un homogeneizado de riñón realizado en un amortiguador de fosfato 0.1 M y pH 7.4. Se centrifugó a 15000 rpm en una microcentrífuga marca Eppendorf (Eppendorf Centrifuge 5424) durante 15 minutos y se recolectó el sobrenadante. A este le fue determinada la concentración de

proteína por el método de Lowry. Posteriormente se procedió a realizar los ensayos en una celda de vidrio a la cual se le agregó el volumen correspondiente de un amortiguador de fosfatos 0.1 M y pH 6.5; el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno a una concentración final de 1 mM y el ligante Glutación Reducido a una concentración final de 1 mM. Esta mezcla se homogenizó por inversión y finalmente se adicionó el volumen correspondiente a 1 mg/mL de proteína total. Se midió el aumento de absorbancia a 350 nm por un tiempo de cinco minutos con intervalos de 20 segundos en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer. Para llevar a cabo los cálculos de la actividad enzimática se utilizó el coeficiente de extinción de $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{mmol}^{-1}$.

6.3. Medición de Especies Reactivas de Oxígeno en muestras de corteza renal

El Oxígeno es esencial para la vida, pero posee una paradoja en los organismos aerobios. Este elemento desempeña una función importante como aceptor terminal de electrones durante la respiración celular, y constituye lo que se conoce como el "soporte de la vida". Pero también constituye el punto de partida para un tipo de daño celular conocido como "estrés oxidativo". El desbalance en la producción de EROS y la defensa antioxidante provoca el "estrés oxidativo" que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el deterioro y muerte celular.

El "estrés oxidativo" puede provenir de una deficiencia del sistema de defensa antioxidante o de un incremento de la formación de EROS, cuya alta reactividad puede provocar peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, rotura del ADN y degradación proteica. El aumento de varios de estos agentes oxidantes a la vez, puede provocar cambios biológicos de manera progresiva en el organismo siguiendo más o menos un patrón común. La acumulación progresiva de esos cambios ocasiona la enfermedad.

La medición de las Especies Reactivas de Oxígeno se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído (MDA), producto del desdoblamiento de los hidroperóxidos, formándose así un color susceptible de ser medido directamente. Su análisis es usado por su buena practicabilidad y sencillez (Fulbert, 1992; Pérez, 2000). La técnica que fue utilizada se detalla a continuación.

Se tomó una muestra de 0.2 mL del homogeneizado de corteza renal en un tubo eppendorf de 1500 μL y se completó el volumen a 1 mL con una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH 7.4 (PBS). Para llevar a cabo la reacción se adicionaron 0.025 mL de butirilhidroxitolueno (BHT) (88 mg de BHT en 10 mL de etanol absoluto) y 300 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 30%. Posteriormente se agitaron los tubos vigorosamente y se colocaron en hielo durante 2 horas. Transcurrido el tiempo se centrifugaron a 2000 rpm por un tiempo de 15 minutos. Al terminar el tiempo se separó el sobrenadante y se adicionó en un tubo de ensayo limpio y etiquetado 1 mL del sobrenadante, 0.075

μL de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0.1M y 0.25 μL de una solución 1% ácido tiobarbitúrico (TBA), se agitaron los tubos y se colocaron a ebullición en un baño maría por un tiempo de 15 minutos. Terminado el tiempo, se dejaron enfriar los tubos y posteriormente se determinó la absorbancia a 532 y 600 nm en el espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer.

6.4. Medición de la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT).

El Oxígeno que es imprescindible para la vida, puede ser también fuente de enfermedad a través de una producción incontrolada de radicales libres de oxígeno que dañan las macromoléculas y alteran los procesos celulares. El sistema de defensa antioxidante de las células, constituye un mecanismo adaptativo de gran relevancia, destacándose las actividades enzimáticas de la Superóxido Dismutasa (SOD) y la Catalasa (CAT). Las enzimas antioxidantes son esenciales para las células aeróbicas, puesto que mantienen en niveles aceptables las concentraciones de especies químicas conocidas como radicales libres (González, 2013).

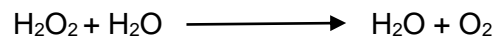
6.4.1. Medición de la actividad de la enzima SOD

Para llevar a cabo esta medición se utilizó un homogeneizado de corteza renal realizado en una solución amortiguadora constituida por fosfato 50 mM y pH 7.8; 13 mM de metionina; 75 μM nitro azul de tetrazolio; 100 μM de EDTA y 2 mM de Riboflavina. Para llevar a cabo la reacción se adicionaron 100 μL de riboflavina al amortiguador salino. Para la medición de las absorbancias se agregó el amortiguador a una celda de vidrio de 3 mL más el volumen correspondiente a 1 mg/mL de proteína del homogeneizado del riñón. Inicialmente se midió la absorbancia a 560 nm (tiempo cero). Una vez realizado lo anterior se procedió a exponer la muestra a la luz un tiempo de 10 minutos (ya que en ese tiempo el azul de nitro-tetrazolio reacciona con la proteína debido que este actúa como aceptor de electrones y al reducirse da lugar a un color rojo ladrillo). Terminado el tiempo de iluminación, se volvió a medir la absorbancia a 560 nm en el espectrofotómetro UV/VIS (tiempo final).

6.4.2. Medición de la actividad de CAT

Se utilizó un homogeneizado de riñón en amortiguador de fosfato 0.1 M y pH 7.4. Se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos y se recolectó el sobrenadante, al cual se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry. Se preparó un amortiguador salino 10 mM de fosfato pH 7 y una solución 50 mM de Peróxido de Hidrógeno. Esta solución fue colocada en el amortiguador de tal manera que la concentración final fuera 10 mM en un volumen final de 3 mL en una celda de vidrio. A la celda se le agregó 1 mg/mL de proteína total y se midió la absorbancia a 240 nm por un tiempo de 1 min debido a que en este tiempo se lleva a cabo la descomposición del

Peróxido de Hidrógeno de acuerdo con la siguiente ecuación. Se utilizó el coeficiente de extinción de 40 M/cm y la Ley de Beer para el cálculo de la actividad enzimática.



6.5. Examen General de Orina

Los términos “uroanálisis”, “urianálisis” “análisis de la orina” “citoquímico de orina”, “parcial de orina” describen un perfil o grupo de pruebas tamiz con capacidad para detectar enfermedad renal, del tracto urinario o sistémica. Desde el punto de vista de los procedimientos médicos, la orina se ha descrito como una biopsia líquida, obtenida de forma indolora, y para muchos, la mejor herramienta de diagnóstico no invasiva. En general, los valores de los analitos que se determinan en esta técnica deben ser negativos, con excepción del pH y la densidad. A continuación, se describe el fundamento de la determinación de cada una de las pruebas determinadas en las tiras de uroanálisis.

pH. La prueba se basa en la combinación de tres indicadores: el rojo de metilo, el azul de bromotimol y la fenolftaleína, que reaccionan con los iones de Hidrógeno, presentes en la muestra de orina.

Densidad. La prueba, mediante reacción con un formador de complejos y detección de los protones liberados, mide las concentraciones iónicas en orina. Como resultado de las reacciones se producen cambios cromáticos.

Proteínas. El principio de la prueba se basa en el denominado error de proteína de los indicadores de pH. En la zona de reacción de la tirilla hay un amortiguador y un indicador que cambia de color amarillo a verde en presencia de proteínas en la orina, aunque el pH se mantenga constante. La reacción es particularmente sensible a la albúmina, siendo positiva a partir de concentraciones mayores a 6 mg/dL

Glucosa. La prueba para la detección de glucosa se basa en una reacción específica de la glucosa oxidasa/ peroxidasa (método GOD/POD), en la cual la D-glucosa se oxida enzimáticamente por el oxígeno del aire y se convierte en D-gluconolactona. El Peróxido de Hidrógeno resultante, oxida, bajo la catálisis de la peroxidasa, al indicador (TMB: tetra-metil-bencidina) para dar una coloración azul-verdosa sobre el papel amarillo reactivo de la tirilla. La reacción es específica para glucosa y no depende del pH ni de la gravedad específica de la orina, ni se ve afectado significativamente por la presencia de cuerpos cetónicos.

Cetona. La prueba se basa en el principio de la prueba de Legal. El ácido acetoacético y la acetona reaccionan con nitroprusiato sódico y glicina en un medio alcalino para formar un complejo color violeta. La reacción es específica para el ácido acetoacético y la acetona. No es interferida por el ácido beta-hidroxibutírico ni por la presencia de glucosa, proteínas y ácido ascórbico en la muestra.

Urobilinógeno. Una sal de diazonio estable, p-metoxibencendiazoniofluoroborato presente en la tira reactiva, reacciona casi inmediatamente con el urobilinógeno, dando lugar a la formación de un colorante azoico rojo.

Bilirrubina. La prueba se basa en la unión de la bilirrubina con una sal de diazonio estable (2,6-diclorobenceno-diazoniofluoroborato) en un medio ácido del papel reactivo.

Nitritos. La prueba se basa en el principio del ensayo de Griess y es específica para el nitrito. La reacción revela la presencia de nitrito y, por lo tanto, indirectamente, la existencia de bacterias formadoras del mismo en la orina, coloreando el tampón de la prueba de color rosa rojizo.

Sangre. La prueba detecta sangre completa (eritrocitos), sangre lisada (hemoglobina) y mioglobina. Para lograr el objetivo, la prueba se basa en la acción peroxidativa de la hemoglobina o la mioglobina que cataliza la oxidación del indicador cromático (TMB: tetrametil-bencidina) mediante un hidroperóxido orgánico, el 2,5-dimetilhexano-2,5-dihidroperóxido, para producir un color azul verdoso sobre el papel amarillo de la tirilla. En las zonas de reacción, de acuerdo al patrón de coloración es posible distinguir eritrocitos intactos de hemolizados. Los eritrocitos intactos se hemolizan sobre el papel reactivo y la hemoglobina liberada inicia la reacción de color, formando puntos verdes visibles.

Hemoglobina. Como se ha expresado, además de los eritrocitos la prueba detecta hemoglobina libre (hemoglobinuria) y mioglobina (mioglobinuria) en la orina. Cuando hay hemoglobinuria la tirilla es reactiva, usualmente con una coloración verde uniforme, y en el sedimento no se observan eritrocitos. Las tirillas reactivas detectan la presencia de hemoglobina libre en la orina a partir de 100 mg/dL y de mioglobina a partir de 15 a 20 mg/dL. La hemoglobinuria o mioglobinuria se presentan en anemia hemolítica severa, intoxicaciones graves, enfermedades infecciosas graves, quemaduras extensas, ejercicio físico intenso, lesiones musculares y enfermedades musculares progresivas. También se puede presentar mioglobinuria en pacientes con rabdomiolisis por medicamentos como las estatinas, aún con daño renal.

Leucocitos. La orina normalmente tiene algunos leucocitos (valores de referencia: 0 a 4 por campo de alto poder). La mayoría de los leucocitos observados en la orina son polimorfonucleares neutrófilos que en la práctica no se diferencian. Cuando se requiere hacer un recuento diferencial de leucocitos (polimorfonucleares neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos) es necesario hacer un estudio citológico con coloraciones especiales, incluida la coloración de Wright utilizada de rutina en la coloración de placas de hematología. La presencia anormal de leucocitos en orina (leucocituria) debe hacer pensar al médico en la posibilidad de una infección urinaria pero no debe olvidarse que en el caso de las mujeres puede haber contaminación con flujo vaginal, en cuyo caso también se observan células epiteliales. Las leucociturias son importantes en enfermedades inflamatorias de las vías urinarias, como en la uretritis, la cistitis y la pielonefritis, particularmente en las formas agudas. También pueden verse en pacientes con procesos febriles, tumores de las vías urinarias y trastornos inflamatorios crónicos o agudos. En caso de que se observe leucocitosis sin bacteriuria debe pensarse en tuberculosis o en uretritis por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycoplasma ssp*, (Campuzano, 2007).

Análisis estadístico. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se compararon mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores que se esperan para que dos o más grupos sean diferentes es $p < 0.05$ y se considera estadísticamente significativo. El programa Minitab, versión 2016, se utilizó para los análisis estadísticos.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

Para describir los resultados obtenidos se ordenaron en cuatro grupos. El primer grupo fue expuesto a Mercurio; el segundo se trató con micronutrientes; el tercer grupo fue tratado con el agente quelante y el cuarto grupo se expuso a Mercurio y tratado en conjunto con micronutrientes y el Ácido Dimercaptosuccínico (DMSA).

7.1. Grupo Control y expuesto a Mercurio

Pesos corporales. La Tabla 7 muestra los pesos obtenidos al inicio y al final del periodo de intoxicación. Los resultados indicaron un aumento significativo ($p < 0.05$) de 20 gramos de peso en el grupo expuesto a Mercurio, lo cual podría reflejar ya sea un proceso inflamatorio o edema originado por la exposición a este metal. Las letras A y B muestran la diferencia entre los grupos.

Tabla 7. Peso Corporal de los roedores al inicio y al final del tiempo de experimentación ($n=6$).

Grupo	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Δ de Pesos
Control	190.70 \pm 7.95	192.83 \pm 19.28	2.13
Mercurio	174.88 \pm 9.77 ^A	196.16 \pm 12.36 ^B	21.28

Peso de los riñones. Debido a que se evaluó el efecto de la exposición a Mercurio sobre la función renal, se determinaron los pesos de los riñones al final del periodo de experimentación. La Tabla 8 muestra un aumento significativo ($p < 0.05$ y las letras A y B muestran la diferencia entre los grupos) de 1.3 gramos del grupo expuesto al metal en relación con el control. La relación peso corporal/peso también demostró un cambio en el grupo expuesto a Mercurio con respecto al control el grupo expuesto a Mercurio aumentó de peso corporal, así como los riñones de estos animales, en comparación con el grupo control, en un lapso de 15 días. Lo que demuestra una alteración fisiológica ocasionada por el metal.

Tabla 8. Peso de riñones y relación peso corporal pesos de riñones ($n=6$).

GRUPO	Peso (g)	Relación peso corporal/peso de riñón
Control	1.91 \pm 0.14 ^A	100.95
Mercurio	2.68 \pm 0.20 ^B	73.19

Examen general de orina. Al inicio de este trabajo se estableció un esquema basado en inyecciones intraperitoneales pero se observó un 100% de mortandad de los animales un día después de haber administrado la primera dosis de 5 mg de HgCl₂/Kg de peso. Debido a ello, la concentración se redujo a la mitad (2.5 mg de HgCl₂) durante el mismo periodo de tiempo y los resultados del examen general de orina revelaban un daño renal severo. Al cambiar el esquema de intoxicación a uno oral, los daños disminuyeron y las ratas lograron vivir más tiempo. Al recuperar las muestras y medir el volumen de orina se observó un aumento significativo ($p < 0.05$ y las letras A y B muestran la diferencia entre los grupos) de 5 mL en el grupo expuesto a Mercurio (29.2 ± 3.6 mL) en relación con el grupo control (24.0 ± 2.0 mL). Se detectó un cambio en el pH, la concentración de cetonas, los leucitos y los nitritos a comparación con el grupo control. El Mercurio no ocasionó presencia de sangre o glucosa en orina y solo ligera presencia de proteínas. La Tabla 9 indica los resultados de los animales y, en algunos casos, el porcentaje de la población para cada valor. En donde no se muestra porcentaje significa el 100% de la población.

Tabla 9. Examen general de orina de animales no expuestos y expuestos a Mercurio (n=6).

Analito	Control	Mercurio
Leucocitos (Leu/μL)	Negativo	Negativo (20%) Positivo (80%)
Nitritos	Negativo	Negativo (60%) Positivo (40%)
Urobilinógeno (μmol/L)	Normal	Negativo (40%) Normal (60%)
Proteínas (mg/dL)	Negativo (33%); 1.0 (33%); 0.3 (33%)	Negativo (80%) 0.3 (20%)
pH	7.17 ± 1.89	6.5 ± 0.61
Sangre (Erit/μL)	Negativo	Negativo
Gravedad específica	1.005	1.000 (40%) 1.01 (60%)
Cetonas (mmol/L)	1.5	0.5 (60%) 16 (40%)
Bilirrubina (μmol/L)	Negativo (33%); Positivo (67%)	Negativo (20%) Positivo (80%)
Glucosa (mg/dL)	Negativo	Negativo
Volumen (mL)	24 ± 1.2^A	29.2 ± 3.6^B

Especies Reactivas de Oxígeno. Los metales pesados pueden ocasionar la generación de Especies Reactivas de Oxígeno, estas especies se han relacionado frecuentemente con el daño de estos elementos en los seres vivos (Crespo-López, *et al.*, 2005). En este trabajo se observó una mayor producción de estas especies en los riñones de los animales expuestos al metal (50.66 ± 6.21 pmol/mg) al compararlos con el grupo control (44.73 ± 6.18 pmol/mg). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Los resultados encontrados se muestran en la Figura 12.

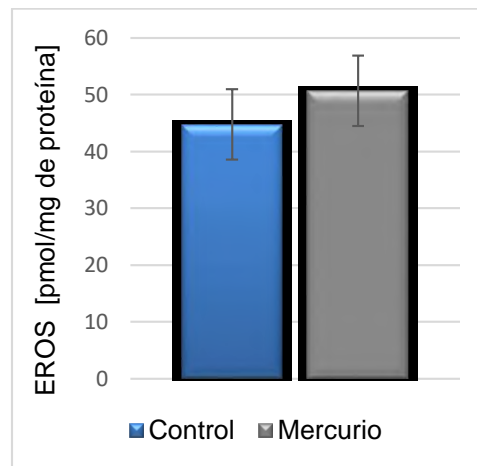


Figura 12. En muestras de corteza renal contenido de Especies Reactivas de Oxígeno en grupo control y expuestos a 2.5 mg de Mercurio por kg de peso ($n=6$).

Actividad de las enzimas GST, SOD y CAT en homogenados de corteza renal.

Los metales pesados, como el Mercurio, pueden ocasionar aumento o disminución de enzimas antioxidantes o enzimas del metabolismo de los xenobióticos (Zalups, 2017). La Figura 13 muestra la actividad de las enzimas GST, SOD y CAT de riñón de ratas no expuestas y expuestas a Mercurio. En el caso de la actividad de las enzimas Glutación S-Transferasa y Catalasa, la actividad entre los dos grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). La actividad de la enzima Superóxido Dismutasa no fue estadísticamente significativa. En estos casos las letras indican la diferencia entre los grupos.

La exposición a Mercurio ocasionó un aumento de 9 unidades en la actividad de GST (16.78 ± 2.76 $\mu\text{mol/mg/min}$) en relación con el grupo control (7.75 ± 0.01 $\mu\text{mol/mg/min}$). En el caso de la actividad de la enzima CAT esta disminuyó 0.06 unidades en presencia del metal con relación al grupo control (0.0435 ± 0.01 vs 0.1015 ± 0.03 $\mu\text{M/mg/min}$). Al medir la actividad de la SOD se constató que la actividad de la enzima en ratas del grupo control y expuestas a Mercurio no cambió, aun cuando se observó una tendencia a disminuir (0.1043 ± 0.005 vs 0.1154 ± 0.0081 respectivamente).

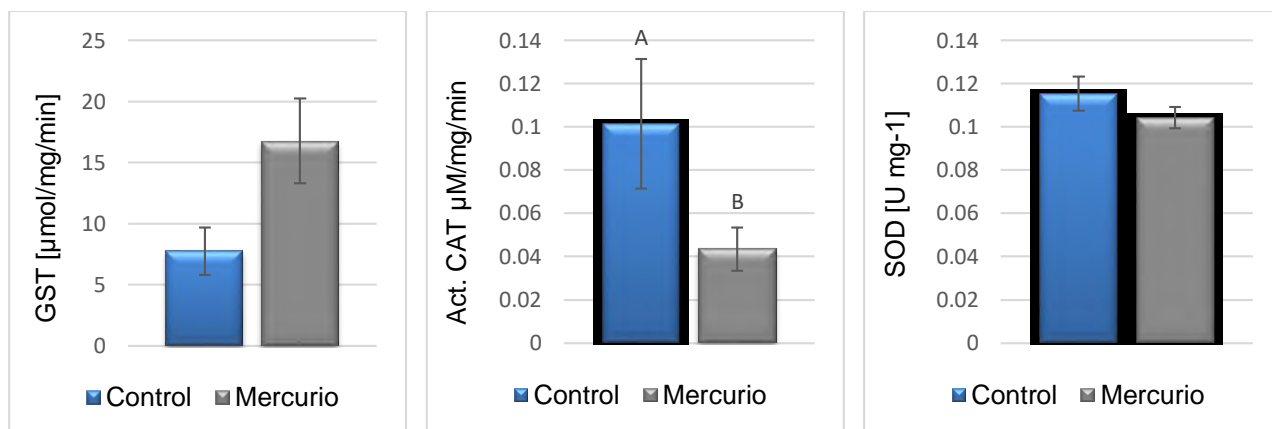


Figura 13. Actividad de a) Glutatión S-Transferasa, b) Catalasa y c) Superóxido Dismutasa en homogenados de riñones de control y expuestos a 2.5 mg de Mercurio por kg de peso (n=6).

Determinación de la actividad de GST en muestras de suero y orina.

Se ha comprobado la existencia de una correlación entre la actividad de GST en riñón y la determinada en orina y suero cuando los animales son intoxicados con Plomo (A. Daniel, 1998). En forma normal, cuando existe la presencia de Plomo o Mercurio, la actividad de GST aumenta en riñón. Cuando los animales son intoxicados por vía intraperitoneal con Mercurio, la actividad de la enzima tiende a aumentar tanto en orina como en suero. (Navarro, 2004, Hernández, 2013, 2015). Debido a lo anterior se determinó la actividad de la enzima en estos fluidos y los resultados se presentan en las gráficas de la Figura 14. Sin embargo, en el caso del Mercurio, la Figura muestra que no existe un efecto estadísticamente significativo en la actividad comparada entre los grupos control y expuestos al metal. Aun así, en suero se observó una tendencia a disminuir y en orina a aumentar la actividad de la enzima.

Aun cuando la estadística indica que el aumento de Especies Reactivas de Oxígeno como respuesta a la exposición a Mercurio no es significativa, fisiológicamente sí lo es ya que se observó un efecto directo en dos enzimas, la Catalasa y la GST. Al disminuir la actividad de la CAT se infiere un aumento en la concentración de Peróxido de Hidrógeno, especie precursora de las Especies Reactivas de Oxígeno. La GST aumenta su actividad debido al desvalence del estado oxidativo. Este desvalence en riñón y, muy posiblemente, en el resto de los órganos blanco del metal se reflejó en la variación de los pesos y el estado alterado de la función renal.

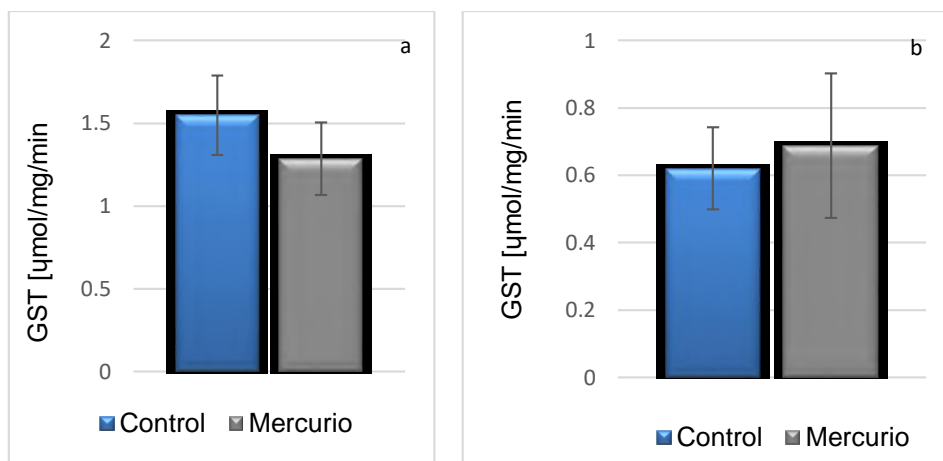


Figura 14. Actividad de la GST en a) Suero y b) Orina en roedores de control y expuestos a 2.5 mg de Mercurio por kg de peso (n=6).

7.2. Grupos tratados con micronutrientes

Una de las estrategias para tratar de contrarrestar los efectos de la intoxicación con Mercurio fue el tratamiento con micronutrientes los cuales, como se explicó en la introducción, juegan un papel esencial dentro del metabolismo, entre otras cosas, como activadores de enzimas, transportadores de electrones o participando dentro de los mecanismos de catálisis enzimática. Para evaluar el efecto de los micronutrientes Selenio y Zinc, se establecieron y analizaron los grupos control; el tratado con Selenio; el tratado con Zinc y el tratado con Selenio más Zinc.

Pesos corporales. La Tabla 10 muestra los pesos corporales obtenidos al inicio y al final del periodo de tratamiento. Al realizar el análisis estadístico se vio que en el grupo control no hubo diferencia significativa, mientras que para los tres grupos restantes se obtuvo una $p < 0.05$; esta diferencia se indicó usando las letras A y B.

Los animales control aumentaron alrededor de dos gramos. Sin embargo, al tratarlos con Selenio y Zinc se pudo observar la disminución de los pesos. El Selenio ocasionó la pérdida de 34 gramos y el Zinc de 42 gramos. También se observó que al tratar a los roedores con ambos metales la disminución de peso no fue tan drástica como la que ocasionaron los micronutrientes por separado, ya que solo perdieron 15 gramos.

Tabla 10. Pesos corporales de los roedores al inicio y al final de la experimentación (n=6).

GRUPOS	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Diferencia de pesos (g)
Control	190.70 ± 7.95	192.83 ± 19.28	2.13
Selenio	246.6 ± 8.68 ^A	212.12 ± 21.55 ^B	-34.48
Zinc	245.3 ± 21.22 ^A	202.4 ± 49.33 ^B	-42.9
Selenio + Zinc	204.3 ± 6.10 ^A	189.2 ± 10.89 ^B	-15.1

Pesos de riñones y relación con el peso corporal. La Tabla 11 muestra los resultados obtenidos al medir los pesos de los riñones de los grupos control y expuesto a los micronutrientes Selenio y Zinc, así como a los dos elementos juntos. Para todos los datos, no existió diferencia significativa al ser comparados con el grupo control. La misma Tabla indica la relación entre el peso corporal y el peso de los riñones y de la misma manera se observó que esta no presenta diferencias.

Tabla 11. Peso de riñones y relación peso corporal/peso de riñones (n=6).

GRUPOS	Peso (g)	Relación peso corporal/peso de riñón
Control	1.9147 ± 0.14	100.7
Se	2.1045 ± 0.22	100.7
Zn	1.8566 ± 0.19	109.0
Se + Zn	1.8523 ± 0.14	102.14

Examen General de Orina. Se observó que en el grupo control los valores fueron por lo general negativos para los diferentes analitos determinados. No existió glucosuria en ningún grupo, pero si ligera proteinuria en los cuatro grupos, así como la presencia de sangre solo en el 20% del grupo expuesto a Zinc. En los grupos tratados con micronutrientes se observó la presencia de nitritos, urobilinógeno, basificación del pH, siendo mayor en el grupo expuesto a los dos micronutrientes, así como cambios en la presencia de cetonas. El volumen de orina solo disminuyó de forma significativa ($p < 0.05$; A y B indican que los grupos presentan diferencias) en el grupo expuesto a los dos micronutrientes en relación con el grupo control.

Tabla 12. Examen general de orina de grupos control y tratados con Selenio, Zinc y la mezcla de Selenio más Zinc (n=6).

	Control	Selenio	Zinc	Se + Zn
Leucocitos (Leu/μL)	Negativo	Negativo (40%); Positivo (20%); Trazas (40%)	Negativo	Negativo
Nitritos	Negativo	Negativo (60%); Positivo (40%)	Negativo (80%); Positivo (20%)	Negativo (40%); Positivo (60%)
Urobilinógeno (μmol/L)	Normal	Negativo (20%); Normal (80%)	Negativo (20%); Positivo (20%); Normal (60%)	Normal
Proteína (mg/dL)	Negativo (33%); 1.0 (33%); 0.3 (33%)	Negativo (60%); 0.3 (40%)	Negativo (80%); 3 (20%)	Negativo (80%); 1.0 (20%)
pH	7.17 \pm 1.89	7.8 \pm 0.84	7.4 \pm 1.29	7.59 \pm 0.55
Sangre (Erit/μL)	Negativo	Negativo	Negativo (80%); Positivo (20%)	Negativo
Gravedad específica	1.005	1.000 (80%); 1.005 (20%)	1.020 (20%); 1.00 (40%); 1.005 (20%)	1 (40%); 1.005 (20%); 1.01 (40%)
Cetonas (mmol/L)	1.5	Negativo	Negativo (80%); Positivo (20%)	Negativo
Bilirrubina (μmol/L)	Negativo (33%); Positivo (67%)	Negativo	Negativo (80%); Positivo (20%)	Negativo
Glucosa (mg/dL)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Volumen (mL)	24 \pm 1.2 ^A	22.8 \pm 2.5	24.2 \pm 3.2	14.8 \pm 2.9 ^B

Especies Reactivas de Oxígeno. La Figura 15 muestra que la actividad de EROS del grupo expuesto a Selenio (27.39 ± 4.27 pmol/mg) disminuyó de forma significativa ($p < 0.05$, A y B muestran la diferencia) 17 unidades en relación con el grupo control (44.73 ± 6.18 pmol/mg). Cuando los animales son puestos en contacto con Zinc y con la mezcla de los dos micronutrientes no se observó una diferencia en relación con el grupo control.

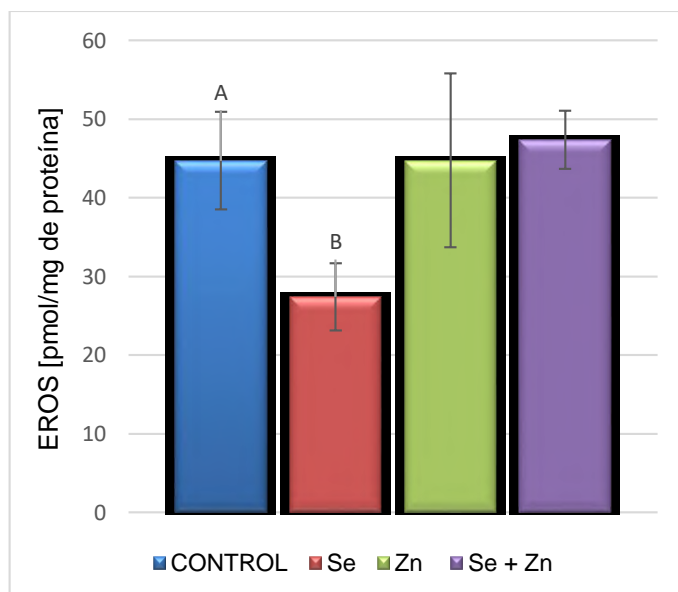


Figura 15. Especies Reactivas de Oxígeno en riñones de ratas control y expuestas a micronutrientes (n=6).

Actividad de las enzimas GST, SOD y CAT en homogeneizados de corteza renal

La Figura 16 muestra las actividades de las enzimas GST, CAT y SOD en homogeneizados de riñón. Al realizar el análisis estadístico se encontró que los datos obtenidos para las tres enzimas obtuvieron una $p < 0.05$ para los grupos que fueron diferentes. Las diferencias entre los grupos se denotan con las letras correspondientes.

La actividad de la GST de las ratas tratadas con Se ($4.69 \pm 0.74 \mu\text{mol/mg/min}$) o Zn ($4.86 \pm 1.85 \mu\text{mol/mg/min}$) disminuyeron aproximadamente tres unidades con respecto a la actividad del grupo control ($7.75 \pm 1.91 \mu\text{mol/mg/min}$). Cuando los micronutrientes se administraron de manera conjunta, la actividad de la GST no mostró diferencia ($7.89 \pm 2.16 \mu\text{mol/mg/min}$) en relación con el control. En relación con la actividad de la catalasa se pudo observar que el grupo control mostró una actividad de $0.11 \pm 0.04 \mu\text{M/mg/min}$. Al administrar los micronutrientes por separado la actividad aumentó 106 y 93 unidades en presencia de Selenio ($106.46 \pm 9.19 \mu\text{M/mg/min}$) y Zinc ($93.65 \pm 6.25 \mu\text{M/mg/min}$) respectivamente. Sin embargo, cuando los dos elementos se suministraron de forma conjunta la actividad cambia ($0.18 \pm 0.07 \mu\text{M/mg/min}$). Para Superóxido Dismutasa, la actividad medida al administrar Selenio aumentó 0.5 unidades ($0.66 \pm 0.12 \text{ U/mg}$) respecto al control ($0.16 \pm 0.01 \text{ U/mg}$) y 0.57 en el caso del Zinc ($0.73 \pm 0.35 \text{ U/mg}$). Cuando los metales se administraron a la par la actividad aumentó menos que al administrarlos de forma separada, el aumento fue de 0.21 unidades ($0.37 \pm 0.06 \text{ U/mg}$) en relación con el grupo

control. Las actividades determinadas para Selenio y Zinc por separado no fueron estadísticamente diferentes.

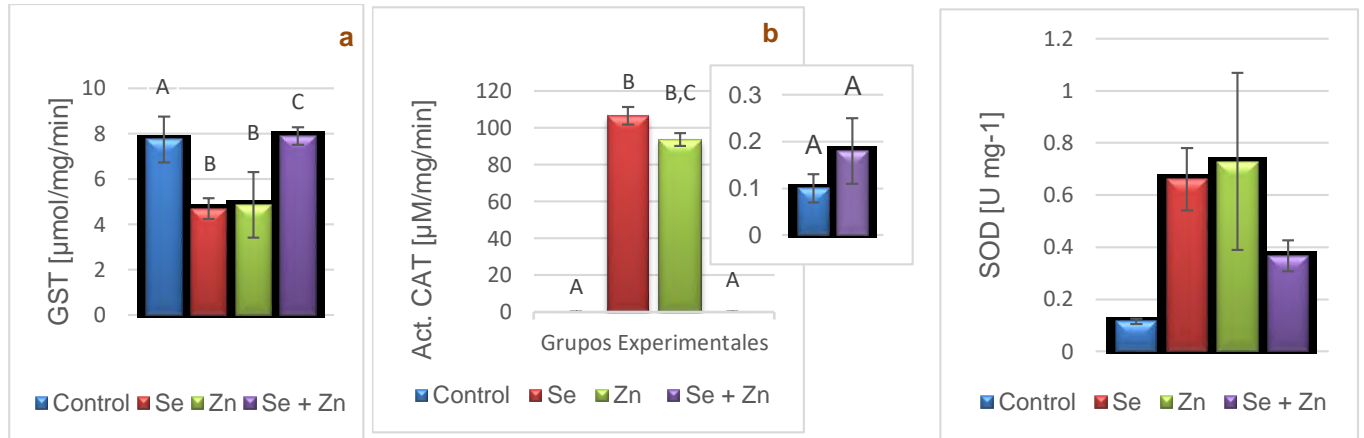


Figura 16. Actividad de a) GST, b) CAT y c) SOD en homogenados de riñones de los grupos control y expuestos a micronutrientes (n=6).

Actividad de la enzima GST en suero y orina. Al realizar el análisis de los datos obtenidos se pudo observar que en ambas muestras cuando los resultados fueron comparados contra el grupo control, las diferencias proporcionaron un valor de $p < 0.05$ y estas fueron indicadas con las letras A, B y C.

La determinación de la actividad de la enzima en las muestras demostró que fue menor en orina que en suero. En la primera muestra, la actividad del grupo control ($0.62 \pm 0.12 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$) disminuyó 0.52 unidades cuando los animales fueron tratados con Selenio ($0.10 \pm 0.04 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$) y 0.47 cuando se les administró Zinc ($0.15 \pm 0.08 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$). El efecto observado entre los grupos anteriores (Selenio y Zinc por separado) no fue diferente. Sin embargo, cuando ambos metales se administraron al mismo tiempo la actividad aumentó al doble ($1.21 \pm 0.07 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$) con relación al grupo control. En el caso del suero se observó una tendencia a aumentar la actividad de la enzima cuando los animales fueron tratados con los micronutrientes. El grupo control presentó una actividad de $1.55 \pm 0.24 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$. Cuando los animales se expusieron a Selenio y a Selenio más Zinc, el aumento fue aproximadamente de 0.95 unidades en ambos casos (2.48 ± 0.23 y $2.50 \pm 0.22 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ respectivamente); así como de 2.93 para el Zinc ($4.84 \pm 0.35 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$). La actividad determinada entre los grupos tratados con Selenio y Selenio más Zinc fue igual. Sin embargo, la actividad obtenida con el Zinc fue la más alta de los cuatro grupos, aumentando

aproximadamente tres unidades en relación con el grupo control. La Figura 17 muestra los resultados obtenidos en los diferentes grupos.

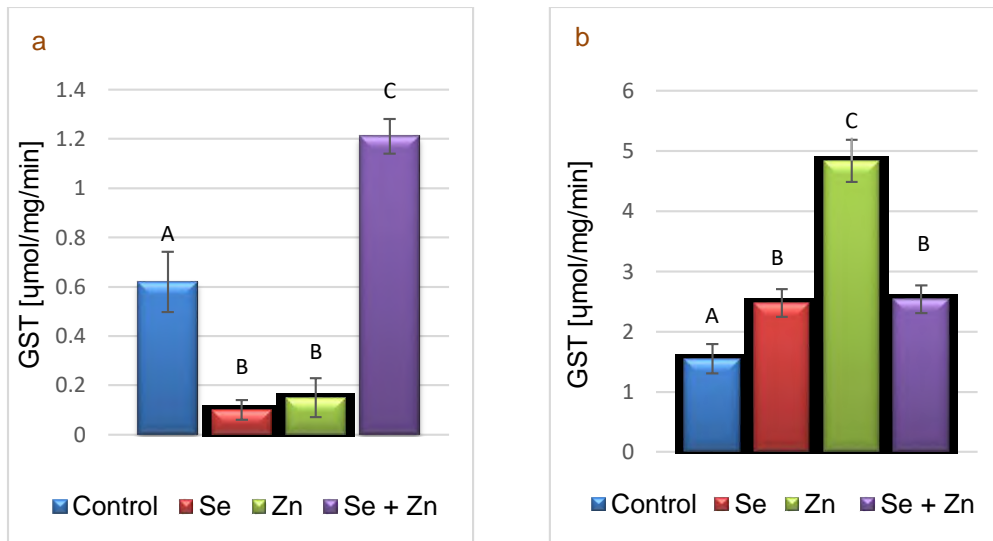


Figura 17. Actividad de GST de (a) orina y (b) suero de los grupos de micronutrientes y el grupo control por kg de pesos.

7.3. Grupo intoxicado con Mercurio y tratado con micronutrientes

Como siguiente paso se procedió a evaluar el efecto de los metales esenciales sobre la toxicidad del Mercurio en riñones de ratas expuestas por vía oral. Para ello se usaron los esquemas de tratamiento utilizados en la sección anterior, es decir se trataron los animales expuestos al tóxico con los micronutrientes por separado y alternativamente con la combinación de los mismos. Dentro de este grupo se incluyeron dos esquemas de tratamiento que consistieron en un pre-tratamiento de 15 días con Selenio o con Zinc con posterior exposición a Mercurio. Lo anterior con el fin de intentar proteger a los roedores del daño ocasionado por la exposición a Mercurio.

Pesos corporales. En la Tabla 13 se observa que el grupo expuesto a Mercurio tiene un aumento de 21 gramos durante el periodo de intoxicación. La Tabla indica los dos esquemas de tratamiento, el primero consiste en la administración de los micronutrientes individuales o en conjunto al mismo tiempo que se intoxica al roedor con Mercurio; mientras que la segunda trata de un pretratamiento con Selenio o con Zinc por un periodo de 15 días previos a la intoxicación con Mercurio (15 días de Se + 15 días de Hg y 15 días de Zn + 15 días de Hg, respectivamente).

En el primer caso se puede observar que los dos metales de forma individual ocasionaron una pérdida significativa de peso ($p < 0.05$; A y B muestran las diferencias entre los pesos inicial y final) de peso de aproximadamente 58 y 109 gramos para el Selenio y el Zinc respectivamente. En el caso del tratamiento con los dos micronutrientes a la par, solo se observó la pérdida de un gramo de peso. En los esquemas de pretratamiento se vio que el Selenio originó un aumento significativo de peso ($p < 0.05$; A y B muestran las diferencias entre los pesos inicial y final) de 47 gramos y el Zinc una disminución de 29 gramos.

Tabla 13. *Peso corporal al inicio y al final de los animales expuestos a Mercurio y tratados con diferentes esquemas basados en el uso de Selenio y Zinc (n=6).*

Grupos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Diferencia de Pesos
Mercurio	174.88 ± 9.77	196.16 ± 12.36	21.28
Hg + Se	243.7 ± 19.93 ^A	185.76 ± 14.50 ^B	-57.94
Hg + Zn	279.3 ± 27.38 ^A	169.76 ± 25.90 ^B	-109.54
Hg + Se + Zn	220.37 ± 24.22	219.37 ± 22.86	-1.00
15 Se +15 Hg	169.25 ± 8.67 ^A	216.67 ± 27.94 ^B	47.42
15 Zn + 15 Hg	276.25 ± 24.57	246.67 ± 38.61	-29.58

Pesos de los riñones y relación entre el peso corporal y el de los riñones. El peso de los riñones al final del periodo de intoxicación y tratamiento se muestra en la Tabla 14. En ella se puede observar que en relación con el grupo expuesto a Mercurio todos los grupos tratados a excepción del tratado con Zinc sufrieron una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$, A y B muestran los grupos diferentes en relación con el expuesto a Mercurio), lo cual se vio reflejado en la relación de pesos. Únicamente el grupo tratado con Zinc conservó una relación cercana a la encontrada con el grupo expuesto a Mercurio. El tratamiento que originó una mayor disminución de peso del riñón fue el pre expuesto a Zinc por 15 días, en contraste el grupo que originó una menor disminución fue el tratado con Zinc a la par de la intoxicación con Mercurio.

Tabla 14. Peso del riñón y relación peso corporal y peso del riñón de los grupos intoxicados con Mercurio y tratados con diferentes esquemas basados en los elementos Selenio y Zinc (n=6).

GRUPOS	Peso riñón (g)	Relación peso corporal/peso de riñón (g)
Mercurio	2.68 ± 0.20 ^A	73.19
Hg + Se	2.02 ± 0.14 ^B	91.96
Hg + Zn	2.19 ± 0.67	77.51
Hg + Se + Zn	1.88 ± 0.22 ^B	116.68
15 días Se/15 días Hg	2.20 ± 0.25 ^B	98.48
15 días Zn/15 días Hg	1.70 ± 0.10 ^B	145.1

Examen general de orina. En la Tabla 15 se muestra que, en relación a los leucocitos los primeros cinco grupos, incluyendo al expuesto a Mercurio presentaron niveles de traza a positivo mayores al 40 % de la población. Únicamente el grupo preexpuesto a Zinc por 15 días presentó el 60% de los animales con resultado negativo.

Sin embargo 20% de la población de animales expuestos a Mercurio más Selenio presentaron niveles positivos de nitritos; de la misma forma 40% de los animales pertenecientes a los grupos expuestos a Mercurio y a Mercurio más Zinc presentaron niveles positivos de nitritos. El grupo preexpuesto a Zinc por 15 días mostró el 66% de su población sin nitritos.

En relación con el nivel de urobilinógeno el 80% de la población del grupo expuesto a Mercurio y tratado con Zinc presentó un nivel alto (3.2 µmol/L).

La proteinuria se observó a diferentes porcentajes en los grupos. El expuesto a Mercurio presentó un nivel de 0.3 mg/dL en el 20%, de su población; el expuesto al metal y tratado con Selenio mostró niveles de 1 a 20 mg/dL en el 60% de su población; el grupo expuesto a Mercurio y tratado con Zinc presentó niveles desde traza a 100 en el 80% de sus integrantes. El grupo expuesto a Mercurio y tratado con los dos micronutrientes presentó 30 mg/dL en el 40% de su población. En los grupos preexpuestos a Selenio y Zinc se observó que únicamente el 17% de sus integrantes mostraron niveles bajos de proteína en orina mientras que el segundo grupo se constató que el 100% de los animales presentaron niveles de proteínas en orina de 30 mg/dL. El pH aumentó dos unidades en el grupo expuesto a Mercurio y tratado con Selenio en relación con el grupo expuesto solo al metal

tóxico ($p < 0.05$, A y B muestran las diferencias). Los valores encontrados en los grupos restantes no presentaron cambios significativos. La presencia de sangre en orina se observó únicamente en el 40% de los animales del grupo expuesto a metal y tratado con Selenio y en el 20% de los animales expuestos a Mercurio y tratados con Zinc. La gravedad específica se mantuvo entre los niveles de 1.005 a 1.02 en todos los grupos.

El valor de las cetonas varió en función del grupo de estudio y únicamente fue negativo en los grupos Mercurio más los dos micronutrientes y el grupo preexpuesto a Zinc por 15 días. Se observaron porcentajes de bilirrubina negativos del 83 al 100% de la población en los grupos Mercurio más Selenio; Mercurio más Selenio más Zinc; 15 días preexpuesto a Selenio y 15 días preexpuesto a Zinc.

El nivel de glucosa en sangre solo fue positivo en el 20% de la población del grupo expuesto a Mercurio y tratado con Zinc.

Finalmente, el volumen de orina fue diferente significativamente entre los grupos tratados con Selenio y el preexpuesto a Zinc en relación con el grupo expuesto a Mercurio.

Tabla 15. Examen general de orina de los grupos intoxicados con Mercurio y tratados con diferentes esquemas basados en los elementos Selenio y Zinc ($n=6$).

	Mercurio	Hg + Se	Hg + Zn	Hg + Se + Zn	15 días Se - 15 días Hg	15 días Zn - 15 días Hg
Leucocitos (Leu/μL)	Negativo (20%); Trazas (80%)	Negativo(60%); Trazas (40%)	Positivo y trazas (80%); Moderado (20%)	Negativo (33%); Positivo (67%)	Positivo	Negativo (67%) Positivo (33%)
Nitritos	Negativo (60%); Positivo (40%)	Negativo (80%); Positivo (20%)	Negativo (60%); Positivo (40%)	Positivo	Negativo (50%); Positivo (50%)	Negativo (67%); Positivo (33%)
Urobilinógeno (μmol/L)	Negativo a normal.	Negativo a normal	Negativo (20%); 3.2 (80%)	Normal	Normal (83%); Positivo (16%)	Negativo
Proteína (mg/dL)	Negativo (80%); 0.3 (20%)	Negativo (40%); 1.0 (20%); 1.005 (20%); 20 (20%)	Negativo (20%); Trazas (20%); 3.2 (40%); 30 a 100 (20%)	Negativo (60%); 30 (40%)	Negativo (83%); Positivo bajo (17%)	30 (100%)
pH	6.5 \pm 0.61 ^A	8.5 \pm 0.0 ^B	7.5 \pm 1.46	7.33 \pm 0.82	7 \pm 0.0	7.33 \pm 0.82

Sangre (Erit/μL)	Negativo	Negativo (60%); Trazas (40%)	Negativo (80%); Trazas (20%)	Negativo	Negativo	Negativo
Gravedad específica	1.000 (40%); 1.01 (60%)	Negativo (40%); 1.0 (60%)	1.0 (60%); 1.01 (20%); 1.005 (20%)	1.005 (33%); 1.015 (16%); 1.01 (51%)	1.005	1.005 (52%); 1.01 (16%); 1.02 (16%); 1.0 (16%)
Cetonas (mmol/L)	0.5 (60%); 16 (40%)	Negativo (40%); 0.5 (20%); 3.2 (20%); 8.0 (20%)	1.5 (20%); 4.0 (40%); 15.0 a 40 (20%); 40 a 80 (20%).	Negativo	Negativo	Negativo (49%); 10.0 (51%)
Bilirrubina (μmol/L)	Negativo (20%); 1.0 (80%)	Negativo	1.0 (40%); 4.0 (60%)	Negativo (83%); 4.0 (17%)	Negativo (83%); 4.0 (17%)	Negativo
Glucosa (mg/dL)	Negativo	Negativo	Negativo (80%); 100 (20%)	Negativo	Negativo	Negativo
Volumen (mL)	29.2 ± 3.63	14.6 ± 6.11	35.4 ± 21.33	43 ± 27.91	21.3 ± 2.42	16 ± 8.0

Especies Reactivas de Oxígeno. Al mostrar los resultados del primer grupo experimental se reportó que el grupo expuesto a mercurio presentó un aumento de 6 unidades de EROS en comparación con el grupo control. Cuando los animales fueron intoxicados con Mercurio y tratados con los diferentes esquemas de micronutrientes se observó que en todos los casos disminuyó la producción de estas especies de manera significativa ($p < 0.05$, A, B, C y D muestran la diferencia entre el grupo expuesto a Mercurio y los grupos tratados con micronutrientes, así como la diferencia entre los grupos pretratados con los microelementos). Los animales administrados con Selenio y Zinc de forma individual, así como el grupo pre tratado por 15 días con Selenio mostraron una disminución de 15 y 12 pmol/mg (Hg + Se: 35.45 ± 4.35 ; Hg + Zn: 38.12 ± 4.39 y 15 Se + 15 Hg: 38.19 ± 3.79 pmol/mg) respectivamente con respecto al grupo expuesto a Mercurio (50.66 ± 6.21 pmol/mg). El tratamiento con Selenio y Zinc en animales expuestos a Mercurio disminuyó cerca de 10 veces la cantidad de EROS (5.76 ± 2.28 pmol/mg de proteína) en relación con el grupo expuesto a Mercurio. Esta cantidad de EROS resultó menor también a la cantidad observada en el grupo Control (44.73 ± 6.18). La Figura 18 muestra los resultados obtenidos.

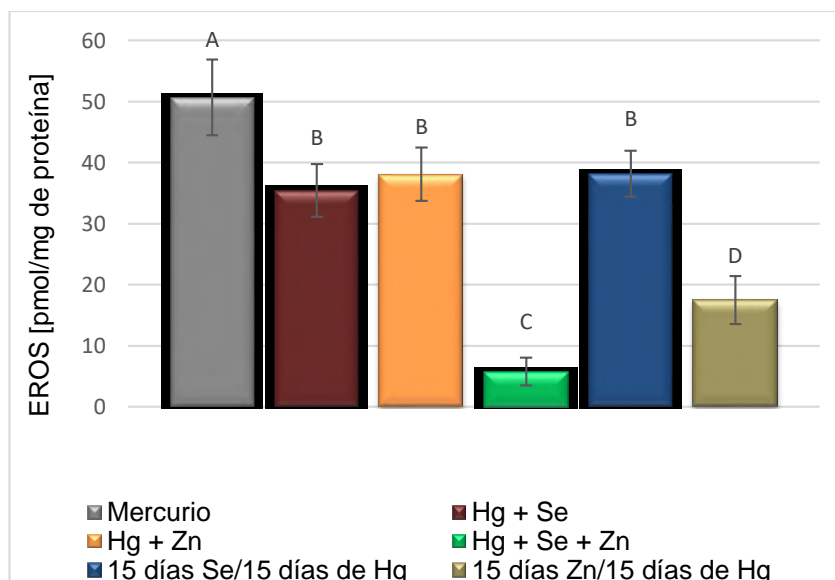


Figura 18. Especies Reactivas de Oxígeno en riñones de ratas expuestas a Mercurio y tratadas con diversos esquemas de micronutrientes (n=6).

Actividad de las enzimas GST, CAT y SOD en homogeneizados de corteza renal. Los análisis estadísticos demostraron que para los grupos las actividades de GST, CAT y SOD son estadísticamente diferentes con valores $p < 0.05$. Las letras indican las diferencias entre los grupos tratados con micronutrientes y los expuestos a Mercurio, así como las diferencias que existieron entre los grupos con diferente tratamiento. La Figura 19 muestra los resultados obtenidos.

La actividad de GST en las ratas expuestas a Mercurio fue de $16.78 \pm 2.76 \mu\text{mol/mg/min}$, lo que representó un aumento de 9 unidades en relación con el grupo no expuesto ($7.75 \pm 0.01 \mu\text{mol/mg/min}$), como se vio en la descripción del grupo inicial de este trabajo. Cuando los animales se trataron con Selenio ($12.30 \pm 6.61 \mu\text{mol/mg/min}$) o con el pre tratamiento con este por 15 días ($14.68 \pm 0.70 \mu\text{mol/mg/min}$) no se observó ningún cambio significativo en relación con el grupo intoxicado con Mercurio. Cuando se utilizó el tratamiento con Zinc, en cualquiera de los esquemas empleados, se pudo ver que estos disminuyen la actividad de la enzima de forma tal que alcanzan los valores de la actividad de la GST en condiciones control. El Zinc disminuyó 9 veces la actividad, la combinación de Zinc y Selenio causó una baja de 10 unidades y el pre tratamiento ocasionó una disminución de 3 unidades (7.34 ± 1.35 ; 6.08 ± 1.22 y $13.69 \pm 1.71 \mu\text{mol/mg/min}$ respectivamente).

Para la Catalasa, los tratamientos con Selenio y Zinc por separado ocasionaron una elevación de 2.285 y 2.393 veces la actividad enzimática (100.57 ± 6.7 y $105.31 \pm 8.22 \mu\text{M/mg/min}$

respectivamente) en relación con el grupo expuesto a Mercurio ($0.044 \pm 0.01 \mu\text{M}/\text{mg}/\text{min}$). Los tratamientos restantes provocaron un aumento de la actividad menor al ocasionado bajo las condiciones anteriores. Cuando se aplicaron los metales Selenio y Zinc de forma conjunta se observó un aumento de 4.5 unidades ($0.1095 \pm 0.0806 \mu\text{M}/\text{mg}/\text{min}$) y cuando se usaron, los pretratamientos con Selenio y Zinc se generó un incremento de 3.4 y 3.19 unidades (0.1500 ± 0.1005 y $0.1404 \pm 0.0925 \mu\text{M}/\text{mg}/\text{min}$) respectivamente y no son estadísticamente significativo ya que hay variabilidad de la población.

Cuando se determinó la actividad Superóxido Dismutasa se pudo constatar que el tratamiento con Selenio ($0.1014 \pm 0.012 \text{ U}/\text{mg}$) y con Zinc ($0.1009 \pm 0.019 \text{ U}/\text{mg}$) no produjeron cambios en la actividad con relación al grupo expuesto a Mercurio ($0.1043 \pm 0.005 \text{ U}/\text{mg}$). Los grupos restantes sí mostraron un efecto sobre la actividad de la enzima. El grupo intoxicado con Mercurio y tratado con los dos metales al mismo tiempo presentó un aumento de dos veces la actividad ($0.2306 \pm 0.0224 \text{ U}/\text{mg}$); el tratado 15 días previos con Selenio, la aumentó tres veces ($0.3324 \pm 0.0418 \text{ U}/\text{mg}$) en relación con el grupo expuesto a Mercurio. Finalmente, el pre expuesto por 15 días a Zinc también ocasionó un aumento de tres veces ($0.3481 \pm 0.0274 \text{ U}/\text{mg}$) la actividad al compararlo con el grupo expuesto a Mercurio.

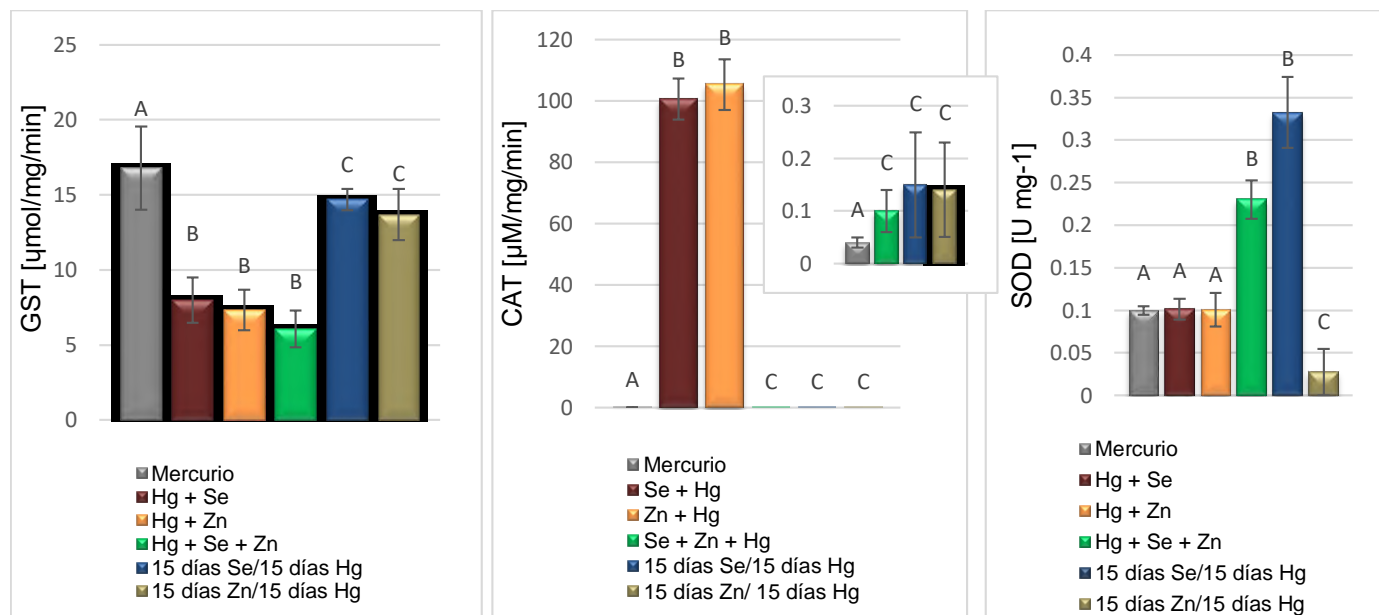


Figura 19. Actividad de a) GST, b) CAT y c) SOD en homogenados de riñones de los grupos intoxicados con Mercurio y tratadas con micronutrientes en kg de peso ($n=6$).

Actividad de Glutación S-Transferasa en muestras de suero y orina. En la Tabla 16 se presentan los resultados de la actividad de GST medida en suero. Al analizar los datos obtenidos en las muestras de suero se observó que, con respecto al control, todas las determinaciones en los grupos son diferentes a este de forma significativa ($p < 0.05$, A y B muestran las diferencias). El Selenio y el Zinc, administrados de forma separada disminuyeron, aproximadamente, 0.56 unidades la actividad de la enzima mientras que la combinación de los dos metales la aumentó 0.9. Cuando los micronutrientes fueron administrados 15 días antes, se observó un aumento de 0.53 unidades en el caso del Selenio y 2.26 para el Zinc. En el caso de la orina solamente se observó una diferencia cuando los grupos expuestos a Mercurio fueron tratados con Selenio y pretratados con Zinc y Selenio por 15 días. En el caso del tratamiento con Zinc y la mezcla de los dos micronutrientes no se observó diferencia. El Selenio disminuyó la actividad 0.45 unidades, mientras que el pretratamiento con Selenio y Zinc aumentó 0.2 y 0.31 unidades la actividad de la enzima.

Tabla 16. Determinación de la actividad de la enzima GST en muestras de suero y orina de ratas expuestas a Mercurio y tratadas con Selenio y Zinc en los diferentes esquemas ($n=6$).

Grupos	GST (Suero) ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	GST (Orina) ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)
Mercurio	1.28 ± 0.22^A	0.68 ± 0.21^A
Hg + Se	0.72 ± 0.32^B	0.23 ± 0.10^B
Hg + Zn	0.73 ± 0.30^B	0.65 ± 0.07
Hg + Se + Zn	2.17 ± 0.11^B	0.71 ± 0.10
15 días de Se/15 días de Hg	1.81 ± 0.13^B	0.88 ± 0.13^B
15 días de Zn/15 días de Hg	3.54 ± 1.07^B	0.99 ± 0.21^B

7.4 Grupos tratados con DMSA y micronutrientes.

Como última estrategia para tratar de revertir los efectos adversos que provocó la exposición a Mercurio en las ratas Wistar se procedió a usar los micronutrientes más el quelante DMSA. Antes de proceder a usarlos en presencia de Mercurio se llevaron a cabo los experimentos enfocados a estudiar el efecto que las combinaciones podrían ocasionar a los animales de experimentación. A continuación, se muestran los resultados.

Pesos Corporales. La Tabla 17 muestra que el grupo tratado con DMSA aumentó de forma significativa 19 gramos el peso corporal ($p < 0.05$; A y B muestran que los resultados son diferentes), durante el tiempo de exposición, mientras que la combinación de los micronutrientes y el agente quelante no mostraron una diferencia de peso, aun cuando la mezcla de Selenio más DMSA disminuyó 5 gramos el peso de los animales.

Tabla 17. Pesos corporales del grupo control, DMSA y tratadas con micronutrientes (n=6).

GRUPO	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Diferencia de pesos
Control	190.70 ± 7.95	192.83 ± 19.28	2.13
DMSA	184.17 ± 17.49 ^A	203.55 ± 16.27 ^B	19.38
Zn + DMSA	169.83 ± 11.91	175.58 ± 17.40	5.75
Se + DMSA	196.83 ± 10.18	191.78 ± 16.91	-5.05

Pesos de los riñones. Los animales expuestos al DMSA y a la combinación de este compuesto más Selenio ocasionaron una disminución estadísticamente significativa (A y B, muestran que son diferentes, $p < 0.05$) de 0.23 y 0.28 gramos de peso entre los grupos tratados y el control. La administración de DMSA más Zinc no ocasionó una diferencia significativa. Este comportamiento se reflejó cuando se realizó la relación entre el peso corporal y el peso del riñón. La Tabla 18 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 18. Pesos de riñones de los roedores expuestos a los diferentes esquemas de tratamientos (n=6).

GRUPOS	Pesos Final (g)	Relación peso corporal/peso de riñón (g)
Control	1.91 ± 0.14 ^A	100.71
DMSA	1.69 ± 0.13 ^B	120.62
DMSA + Zn	1.84 ± 0.21	95.54
DMSA + Se	1.64 ± 0.11 ^B	116.82

Examen general de orina. La Tabla 19 muestra los resultados obtenidos al determinar los diferentes analitos en los grupos experimentales. En relación con el grupo control, la exposición a DMSA no ocasionó cambios significativos en relación con el grupo control excepto en el caso de los leucocitos y los nitritos en donde el 17% de la población presentó trazas de ambos analitos. Aproximadamente, el 50% de la población de los animales tratados con DMSA más Selenio y DMSA más Zinc presentaron nitritos. En relación con el urobilinógeno, ninguno de los grupos presentó resultados positivos. La presencia de proteína en orina fue positiva para el 66% de los animales del grupo control y en el 48 % de los animales tratados con el quelante y el Selenio dando valores entre trazas y 1.0 µmol/L. Los dos grupos restantes dieron resultados negativos. El valor de pH urinario no varió en ninguno de los grupos de estudio. En el caso de la presencia de sangre, tampoco se registraron valores positivos. La gravedad específica fue de 1.005 para el grupo control y de 1.0 para el tratado con DMSA. Para los grupos tratados con quelante y cada uno de los micronutrientes los valores variaron entre 1.00 y 1.03. Para las cetonas solo el grupo control presentó un valor de 1.5 mmol/L para el 100% de su población. El 67% del grupo control presentó trazas de bilirrubina en sangre y los tres grupos restantes dieron resultados negativos. Para los cuatro grupos de estudio no se presentó glucosuria. Finalmente, cuando se midió el volumen de orina de 24 horas, se observó que este no presentó diferencias significativas, manteniéndose entre 19 y 28 mL.

Tabla 19. Examen general de orina de los grupos experimentales (n=6).

	Control	DMSA	DMSA + Se	DMSA + Zn
Leucocitos (Leu/dL)	Negativo	Negativo (83%) Traza (17%)	Negativo	Negativo
Nitritos	Negativo	Negativo (83%) Positivo (17%)	Negativo (49%) Positivo (51%)	Negativo (50%) Positivo (50%)
Urobilinógeno (µmol/L)	Normal (0.2)	Normal (0.2)	Normal (0.2)	Negativo a Normal (0.2)
Proteína (µmol/L)	Negativo (33%) 0.3 (33%) 1.0 (33%)	Negativo	Negativo (49%) Trazas (16%) 0.3 (16%) 1.0 (16%)	Negativo
pH	7.17 ± 1.89	7.92 ± 0.20	8.08 ± 0.86	7.33 ± 0.52
Sangre (Erit/µL)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Gravedad específica (mg/gL)	1.005	1.00	1.0 (66%) 1.01 (16%) 1.03 (16%)	1.0 (16%) 1.005 (66%) 1.01 (16%)
Cetonas (mmol/L)	1.5	Negativo	Negativo	Negativo
Bilirrubina (µmol/L)	Negativo (33%) Trazas (67%)	Negativo	Negativo	Negativo
Glucosa (mg/dL)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Volume (mL)	24.00 ± 2.00	19.33 ± 6.08	28.08 ± 12.63	28.5 ± 9.57

Especies Reactivas de Oxígeno. En la Figura 20 se puede observar que la administración de DMSA no ocasionó una variación en el contenido de Especies Reactivas de Oxígeno en relación con el grupo control. Pero cuando se administraron los microelementos junto con el quelante se observó una disminución significativa ($p < 0.05$, a y b muestran que los grupos son diferentes) de 37 unidades para el caso de DMSA más Zinc y de 41 para DMSA más Selenio en relación con el grupo control. Entre los dos tratamientos anteriores se observó que el Zinc y el DMSA disminuyeron aún más las especies reactivas que el Selenio combinado con el agente quelante con una diferencia de 3.18 unidades.

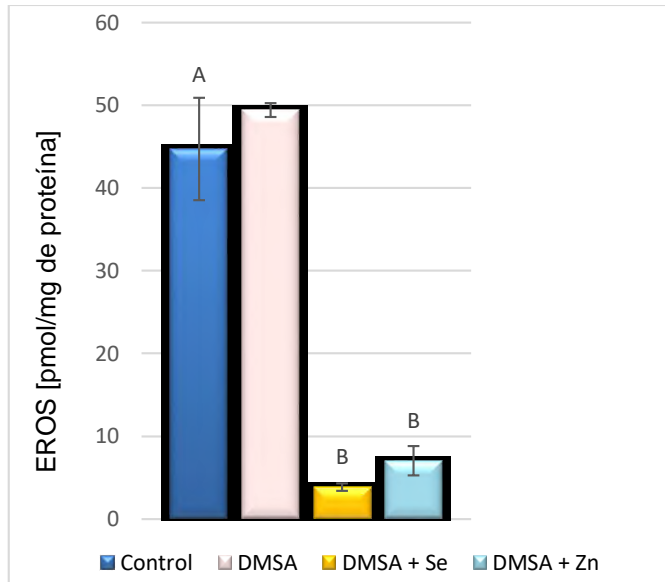


Figura 20. Especies Reactivas de Oxígeno de los grupos control y los grupos tratados con DMSA; más Selenio y DMSA más Zinc.

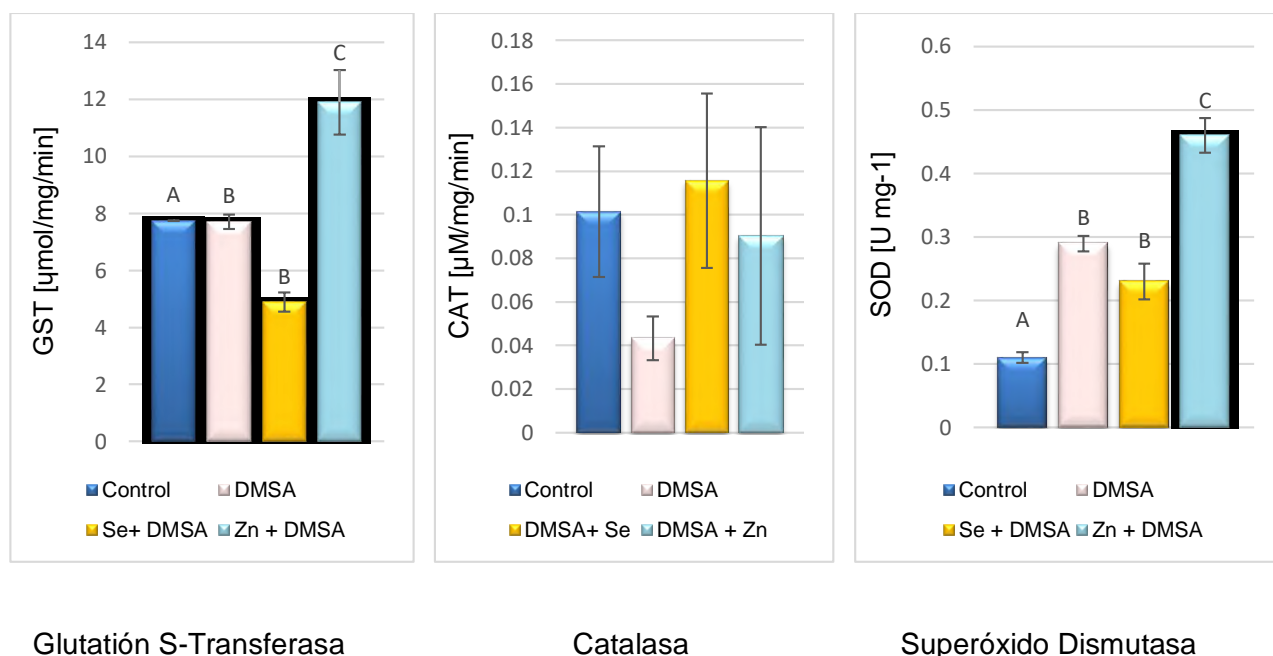
Determinación de las actividades de las enzimas GTS, SOD y CAT en riñón. Los resultados de las determinaciones de la actividad de las tres enzimas se muestran en la Figura 21. Al realizar el análisis estadístico se obtuvieron valores de $p < 0.05$ para las enzimas GST y SOD. Para la enzima CAT las diferencias no fueron significativas.

En el caso de la enzima GST, se observó que la actividad del grupo expuesto a DMSA no cambió en relación con el grupo control (7.75 ± 0.01 vs 7.71 ± 0.25 $\mu\text{g}/\text{mg}/\text{min}$ respectivamente). Cuando los animales fueron expuestos de forma conjunta con el quelante y los micronutrientes se encontró que en ambos casos existió un cambio significativo en la actividad. Se detectó un aumento de 4 unidades para el grupo tratado con DMSA y Selenio (11.90 ± 1.13 $\mu\text{g}/\text{mg}/\text{min}$) y una disminución de 2.9 al usarse DMSA y Zinc (4.89 ± 0.33 $\mu\text{g}/\text{mg}/\text{min}$) en relación con el grupo control.

Al determinar la actividad de la enzima Catalasa no se observaron diferencias significativas ya que los resultados fueron muy diferentes en los integrantes de este grupo experimental

En el caso de la enzima Superóxido Dismutasa se observó que los tres grupos tratados con DMSA y micronutrientes más DMSA presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control. El grupo expuesto a DMSA presentó un aumento de 0.17 unidades (0.16 ± 0.008 U/mg); el expuesto a DMSA más Zinc aumento 0.35 unidades (0.46 ± 0.03 U/mg) y el tratado con DMSA más Selenio

presentó un incremento de 0.12 (0.23 ± 0.03 U/mg) en relación con el grupo no tratado (0.11 ± 0.008 U/mg)



Glutación S-Transferasa

Catalasa

Superóxido Dismutasa

Figura 21. Actividad de Glutación S-Transferasa, Catalasa y Superóxido Dismutasa en homogenados de riñón de los diferentes grupos de estudio (n=6).

Medición de la actividad de GST en suero y orina.

La Figura 22 muestra los resultados obtenidos. En el caso del suero al tratar a los animales con DMSA solo y con DMSA más Selenio se observaron aumentos significativos ($p < 0.05$; A y B muestran las diferencias entre los grupos) en la actividad de la enzima. En el primer caso el aumento fue de 0.30 (1.85 ± 1.14 $\mu\text{mol/mg/min}$) y en el segundo de 0.43 (1.98 ± 0.16 $\mu\text{mol/mg/min}$) unidades con respecto al control (1.55 ± 0.24 $\mu\text{mol/mg/min}$). En el caso del grupo tratado con DMSA y Zinc no se observó diferencia significativa. Al observar los resultados en las muestras de orina se pudo constatar que los diferentes tratamientos mostraron diferencias significativas ($p < 0.005$, a y b muestran las diferencias entre los grupos tratados y el control) en relación con el grupo no tratado. Igual que en el caso de las muestras de suero, los grupos tratados con DMSA solo y DMSA más Selenio la actividad de la enzima aumentó 0.69 (1.31 ± 0.10 $\mu\text{mol/mg/min}$) y 0.41 unidades (1.03 ± 0.04 $\mu\text{mol/mg/min}$) respectivamente en relación con el grupo control (0.62 ± 0.12 $\mu\text{mol/mg/min}$). Un aumento de 0.21 unidades se detectó cuando los animales fueron expuestos a DMSA más Zinc (0.83 ± 0.15 $\mu\text{mol/mg/min}$).

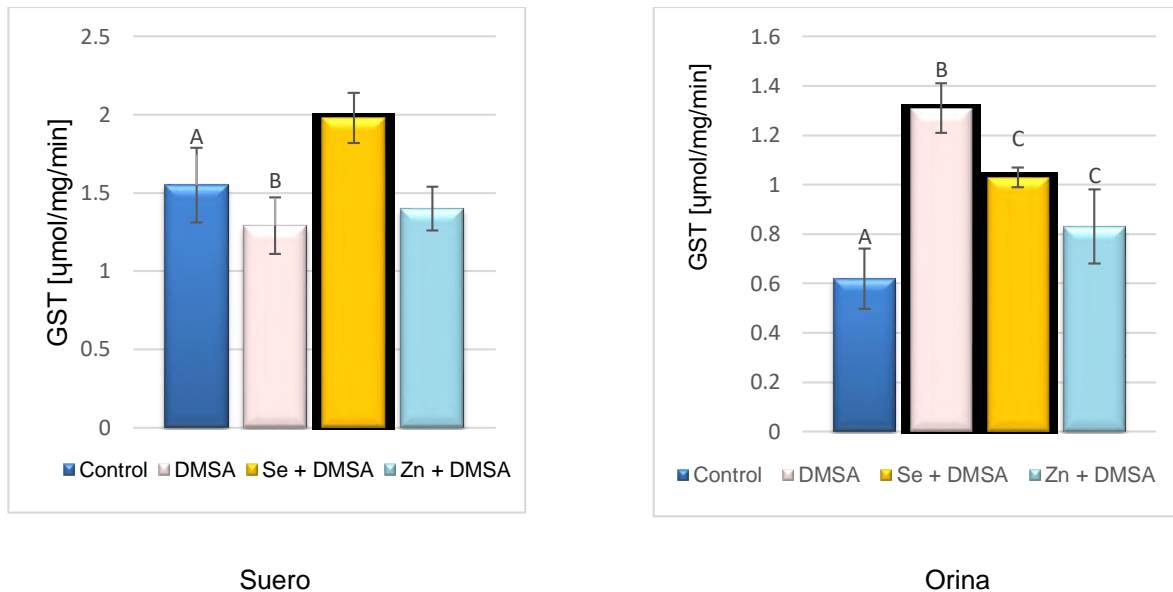


Figura 22. Actividad de la enzima GST en muestras de suero y orina de los grupos de estudios.

7.5 Grupos intoxicados con Mercurio y tratados con DMSA y micronutrientes Selenio y Zinc

Como grupos finales se establecieron los intoxicados con Mercurio y los tratados con el agente quelante; el quelante y cada uno de los micronutrientes y la mezcla de DMSA y los dos elementos. La finalidad de los mismos fue estudiar cuál de estas combinaciones ayudaba a disminuir los daños ocasionados por el Mercurio.

Pesos corporales. En el caso de los animales intoxicados con Mercurio se observó un aumento significativo ($p < 0.05$; A y B muestran la diferencia entre los grupos) de peso corporal de 21 gramos. Este comportamiento se encontró también en los grupos expuesto al metal y tratados con DMSA más Selenio, así como el tratado con el quelante y la mezcla de los micronutrientes. Los animales intoxicados y tratados con DMSA, así como los tratados con DMSA más Zinc mostraron una disminución de 25 y 30 gramos. La Tabla 20 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 20. Pesos Corporales de los Roedores de los diferentes grupos de estudio (n=6).

GRUPOS	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Diferencia
Mercurio	174.88 ± 9.77 ^A	196.16 ± 12.36 ^B	21.28
Hg + DMSA	227.42 ± 21.76	201.72 ± 11.61	-25.7
Hg + Se + DMSA	169.83 ± 36.95	193.83 ± 6.99	24
Hg + Zn + DMSA	207.50 ± 11.48	176.75 ± 37.14	-30.75
Hg + Se + Zn + DMSA	217.00 ± 23.36	235.88 ± 23.03	18.88

Pesos de los riñones y relación entre el peso corporal y el de los riñones. La Tabla 21 muestra los resultados obtenidos. Todos los animales mostraron disminución significativa ($p < 0.05$; A y B muestran que los resultados son diferentes) en el peso de los riñones al ser comparados con el grupo expuesto a Mercurio. El grupo tratado con DMSA disminuyó 0.41 gramos; el tratado con Selenio más DMSA disminuyó 0.92 gramos; el tratado con Zinc y el quelante disminuyó 0.97 gramos y el tratado con los dos micronutrientes y el DMSA mostró una disminución de 0.61 gramos.

Tabla 21. Peso corporal del riñon en los diferentes grupos de estudio (n=6).

Grupos	Peso Final (g)	Relación peso corporal/peso de riñon (g)
Mercurio	2.68 ± 0.20 ^A	73.01
Hg + DMSA	2.28 ± 0.28 ^B	88.53
Hg + Se + DMSA	1.77 ± 0.12 ^B	109.52
Hg + Zn + DMSA	1.72 ± 0.09 ^B	102.93
Hg + Se + Zn + DMSA	2.08 ± 0.18 ^B	113.61

Examen general de orina. La Tabla 22 muestra los resultados obtenidos al determinar el examen general de orina. El nivel de leucocitos y nitritos resultó con valores desde traza hasta positivos en todos los grupos con excepción del grupo expuesto a Mercurio y tratado con Zinc y DMSA. La presencia de urobilinógeno en los grupos no presentó una diferencia entre ellos ya que varió desde negativo hasta trazas, lo cual no implica un cambio grave. La concentración de proteína en sangre a baja concentración (0.3 mg/dL) solo se observó en los grupos expuestos a Mercurio y expuestos a Mercurio y tratados con los dos micronutrientes y el agente quelante. Al observar las alteraciones

en el valor de pH se observó que solo los grupos expuestos a Mercurio y tratados con Selenio más DMSA y los tratados con Selenio más Zinc más DMSA mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$; A y B muestran que los grupos son diferentes) de 1.25 y 1.17 unidades de pH en relación con el grupo expuesto solamente al metal. Únicamente el 34% de la población perteneciente al grupo expuesto a Mercurio y tratado con DMSA presentó un nivel de sangre en orina de 50 eritrocitos/mL. Los cambios en los niveles de gravedad específica y sangre no variaron entre los diferentes grupos. Un nivel positivo de cetonas exclusivamente positivo para los dos primeros grupos. En relación con la bilirrubina solo fue positivo en el grupo expuesto a Mercurio. Finalmente, el volumen de orina aumentó 11 mL de forma significativa ($p < 0.05$; A y B muestran la diferencia) en el grupo expuesto a Mercurio y tratado con Selenio y DMSA.

Tabla 22. Examen general de orina de los diferentes grupos de estudio ($n=6$).

	Mercurio	Hg + DMSA	Hg + Se + DMSA	Hg + Zn + DMSA	Hg + Se + Zn + DMSA
Leucocitos (Leu/mL)	Negativo (20%) Trazas (80%)	Negativo (33%) Trazas (66%)	Negativo (33%) Trazas (66%)	Negativo	Negativo (16%) Positivo (84%)
Nitritos	Negativo (60%) Positivo (40%)	Negativo (60%) Positivo (40%)	Negativo (33%) Positivo (66%)	Negativo	Negativo (50%) Positivo (50%)
Urobilinógeno ($\mu\text{mol/L}$)	Negativo (40%) Normal (60%)	Normal	Normal	Negativo (66%) Normal (33%)	Normal
Proteína (mg/dL)	Negativo (80%) 0.3 (20%)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo (84%) 0.3 (16%)
pH	6.5 ± 0.61^A	7.3 ± 1.25	7.75 ± 0.52^B	7.0 ± 0.63	7.67 ± 0.52^B
Sangre (Erit/mL)	Negativo	Negativo (66%) 50 (34%)	Negativo	Negativo	Negativo
Gravedad específica	1.00 (40%) 1.01 (60%)	1 (50%) 1.01 (25%) 1.005 (25%)	1	1.005 (66%) 1.01 (33%)	1.00 (50%) 1.01 (17%) 1.005 (33%)
Cetonas (mmol/L)	0.5 (60%) 16 (40%)	Negativo (66%) 1.5 (33%)	Negativo	Negativo	Negativo
Bilirrubina ($\mu\text{mol/L}$)	Negativo (20%) Positivo (80%)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Glucosa (mg/dL)	Negativo	Negativo	Negativo	Normal	Normal
Volumen urinario (mL)	29.2 ± 3.63^a	27.2 ± 7.98	40.33 ± 14.94^b	25.00 ± 1.41	33.67 ± 13.59

Especies Reactivas de Oxígeno. Al realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos se observó que en relación con el grupo expuesto a Mercurio los datos de los demás grupos fueron estadísticamente significativos y diferentes entre ellos ($p < 0.05$; las letras A a E muestran la diferencia entre los grupos con tratamiento y entre ellos y el grupo expuesto a Mercurio). El grupo tratado con DMSA mostró un aumento de 28 unidades; el tratado con Selenio y DMSA disminuyó 46.8 unidades; el grupo con Selenio y quelante disminuyó 38.77 unidades y finalmente el grupo en el cual se usaron los dos micronutrientes y el DMSA solo disminuyó 9 pmol/mg (Figura 23).

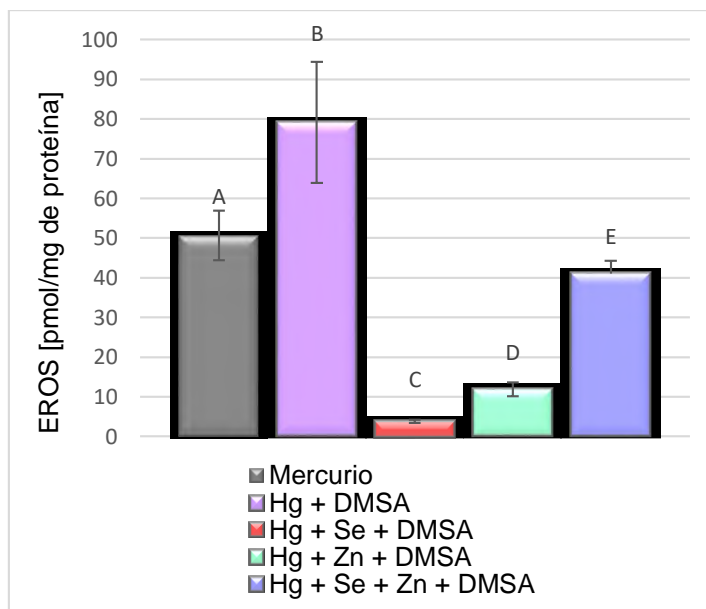


Figura 23. Especies Reactivas de Oxígeno en los grupos experimentales ($n=6$).

Actividad de las enzimas GST, SOD y CAT en riñón Los resultados de las determinaciones de la actividad de las tres enzimas se muestran en la Figura 24. Al analizar los resultados de las actividades medidas en las tres enzimas se pudo observar que en los tres casos las diferencias de los grupos expuestos a Mercurio y tratados con los diferentes esquemas basados en micronutrientes y DMSA mostraron diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0.05$ en el caso de la GST; $p < 0.05$ para CAT y una $p < 0.05$ para SOD. Las letras A a C muestran las diferencias entre los grupos tratados con los micronutrientes y el quelante y entre estos y el grupo expuesto a Mercurio. Únicamente el grupo tratado con Mercurio más DMSA no mostró una diferencia significativa.

En el caso de la GST el grupo tratado con Selenio y DMSA ($6.40 \pm 4.94 \mu\text{mol/mg/min}$); el tratado con Zinc más DMSA ($10.65 \pm 0.49 \mu\text{mol/mg/min}$) y el tratado con Selenio más Zinc más DMSA

($17.13 \pm 1.20 \mu\text{mol/mg/min}$) disminuyeron 10.38, 6.13 y 3.61 unidades su actividad respectivamente en relación con la actividad del grupo expuesto al metal ($16.78 \pm 2.76 \mu\text{mol/mg/min}$).

Para la Catalasa, al contrario de la GST las actividades aumentaron en todos los grupos tratados con micronutrientes y el agente quelante. El grupo tratado con DMSA ($0.224 \pm 0.09 \mu\text{mol/mg/min}$); al que se le administró Selenio y DMSA ($0.095 \pm 0.06 \mu\text{mol/mg/min}$); el grupo con Zinc más DMSA ($0.104 \pm 0.06 \mu\text{mol/mg/min}$) y el tratado con Selenio más Zinc más DMSA ($140 \pm 0.06 \mu\text{mol/mg/min}$) aumentaron la actividad 0.18, 0.051, 0.06 y 0.096 unidades respectivamente en relación con la actividad del grupo expuesto al metal ($0.044 \pm 0.01 \mu\text{mol/mg/min}$).

De la misma forma la SOD mostró un incremento en todos los grupos tratados bajos los diferentes esquemas de micronutrientes y DMSA. El grupo tratado con DMSA ($0.454 \pm 0.04 \mu\text{mol/mg/min}$); al que se le administró Selenio y DMSA ($0.282 \pm 0.03 \mu\text{mol/mg/min}$); el grupo con Zinc más DMSA ($0.238 \pm 0.03 \mu\text{mol/mg/min}$) y el tratado con Selenio más Zinc más DMSA ($0.328 \pm 0.03 \mu\text{mol/mg/min}$) aumentaron la actividad 0.53, 0.178, 0.134 y 0.224 unidades respectivamente en relación con la actividad del grupo expuesto al metal ($0.104 \pm 0.02 \mu\text{mol/mg/min}$).

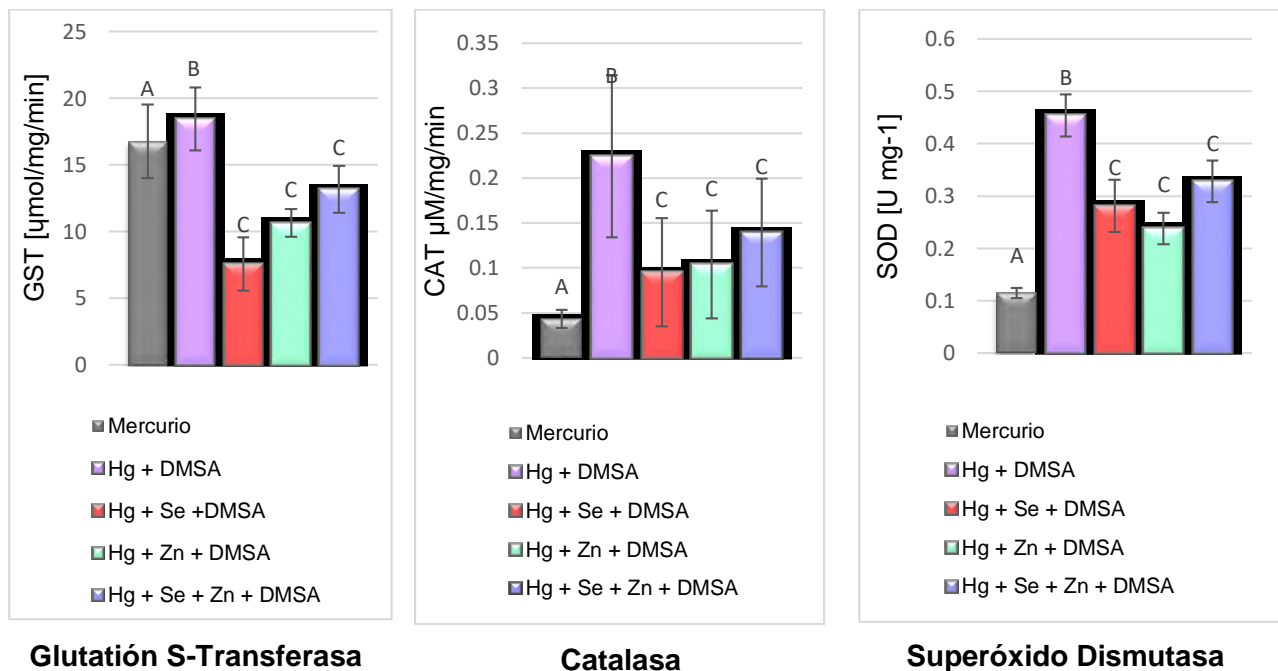


Figura 24. Actividad de Glutación S-Transferasa, Catalasa y Superóxido Dismutasa en homogeneizados de riñón de los diferentes grupos de estudio (n=6).

Actividad de las enzimas GST en muestras de orina y suero. La Figura 25 muestra los resultados obtenidos. En los dos casos las diferencias de los grupos expuestos a Mercurio y tratados con los diferentes esquemas basados en micronutrientes y DMSA mostraron diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0.05$ en el caso de la GST en suero y un valor de $p < 0.05$ para GST en orina. Las gráficas muestran la diferencia de los grupos tratados con micronutrientes y DMSA entre ellos y en comparación con el grupo expuesto solo a Mercurio y de la misma manera las diferencias existentes.

En suero la actividad de la enzima, de los diferentes grupos tratados con micronutrientes y el agente quelante fue aumentando en comparación con el grupo expuesto a Mercurio. El grupo tratado con DMSA mostró una diferencia de 0.7 unidades ($1.99 \pm 0.13 \mu\text{mol/mg/min}$); el tratado con Selenio más DMSA tuvo un aumento de 0.57 ($2.04 \pm 0.11 \mu\text{mol/mg/min}$); el tratado con Zinc más DMSA aumentó 1.3 ($2.59 \pm 0.13 \mu\text{mol/mg/min}$) unidades y finalmente el tratado con los dos micronutrientes y el agente quelante aumentó 1.69 unidades ($2.93 \pm 0.44 \mu\text{mol/mg/min}$) con respecto al grupo expuesto a Mercurio ($1.29 \pm 0.22 \mu\text{mol/mg/min}$).

En el caso de las determinaciones llevadas a cabo en orina se pudo ver que la actividad también aumentó en los grupos tratados con micronutrientes y DMSA. El aumento de la actividad con respecto al grupo expuesto a Mercurio ($0.69 \pm 0.21 \mu\text{mol/mg/min}$) fue de 0.74 unidades para el grupo tratado con DMSA ($1.43 \pm 0.08 \mu\text{mol/mg/min}$); de 0.33 para el tratado con Selenio más DMSA ($1.02 \pm 0.16 \mu\text{mol/mg/min}$); de 1.63 en el caso del grupo tratado con Zinc más DMSA ($2.32 \pm 0.14 \mu\text{mol/mg/min}$) y de 0.35 unidades ($1.04 \pm 0.12 \mu\text{mol/mg/min}$) para el grupo tratado con la mezcla de micronutrientes y el agente quelante.

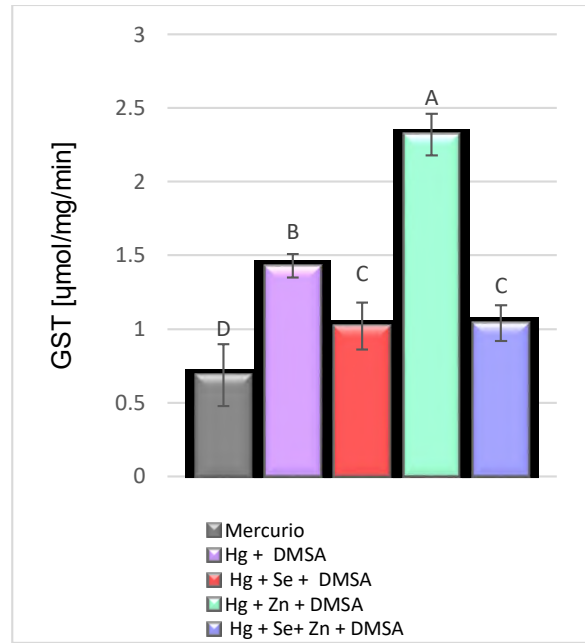
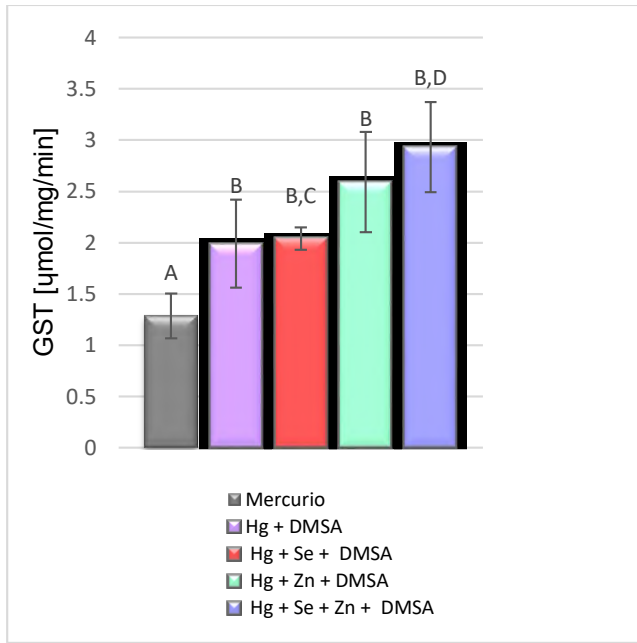


Figura 25. Actividad de GST en suero y orina de los grupos de experimentación (n=6).

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El problema de la intoxicación con Mercurio es global y, al igual que con otros metales pesados, constituye un problema de salud pública. A nivel fisiológico, puede producir náuseas, temblores, diarrea, anorexia, fatiga, falla renal y muerte, por mencionar algunos efectos adversos. A nivel bioquímico, puede afectar desde macromoléculas hasta sistemas orgánicos animales o vegetales. Sus mecanismos de toxicidad se relacionan con sus características químicas y su poca biotransformación. Puede ocasionar alteración en diversas actividades enzimáticas, rompimiento de macromoléculas o fenómenos de estrés oxidativo (Crespo-López, 2005., Ramírez, 2008., (Zalups R. K., 2012).

Cuando se decidió trabajar estudiando los efectos que el Mercurio tiene en el riñón de los animales seleccionados como modelo, se inició con un esquema de intoxicación correspondiente a la administración vía intraperitoneal del metal a una concentración de 2.5 mg/Kg de pesos. Se dictaminó disminuir la dosis 10 veces constatando, de forma tal que los animales pudieron soportar la intoxicación vía oral con la sal de Mercurio. Esto se debió, posiblemente, a que en la vía oral la redistribución del metal ocasiona que este llegue en menor concentración y por ello los efectos sean menores, como consecuencia de la toxicodinámica reportada para el metal (Poma, 2008).

En este estudio se observó que el metal ocasionó aumento de peso en los animales, así como aumento en el peso del riñón. Cuando analizó la relación peso corporal/peso del riñón, esta indicó que posiblemente el riñón no se desarrolló de acuerdo con el desarrollo a nivel organismo que tal vez sufrió un aumento de peso debido a un fenómeno inflamatorio, un desequilibrio hídrico o al aumento del tejido graso a consecuencia de la presencia del Mercurio, eso se observa al hacer la manipulación del órgano blanco el riñón. Rafati-Rahimzadeh y colaboradores 2014, han reportado que la intoxicación con Mercurio varía en función de la naturaleza de los compuestos del metal. En el caso de los compuestos inorgánicos como Cloruro de Mercurio (HgCl_2), el cual fue estudiado y utilizado en este trabajo, puede ocasionar daño agudo y crónico afectando el tracto gastrointestinal, el sistema renal y el sistema nervioso central, presentándose un gran número de síntomas entre los que se encuentran anorexia, pérdida de fluidos, necrosis tubular y pérdida de peso (Rafati-Rahimzadeh, et al, 2013, 2014). Lo anterior puede estar relacionado con la alteración enzimática y la naturaleza de los roedores.

Al realizar el examen general de orina la exposición a Mercurio originó alteraciones en el nivel de leucocitos, nitritos, urobilinógeno, gravedad específica, nivel de cetonas, bilirrubina y volumen de orina, lo que reflejó alteraciones a nivel hepático, renal, estrés o tensión en los animales, descompensación metabólica, deshidratación e infecciones posiblemente bacterianas (Henry, 2001). Aun así, los animales no desarrollaron el Síndrome de Fanconi el cual ha sido observado en

animales intoxicados con Plomo (Ramírez, 2005., Poma, 2008). El cual se caracteriza por la presencia de glucosa, sangre y proteínas en orina. La exposición a Mercurio no ocasionó aumento en el nivel de Especies Reactivas de Oxígeno. Este resultado se reflejó en la nula actividad de la SOD y la disminución de la actividad de la CAT. Shimmojo y colaboradores en el año 2002 publicaron un trabajo en el cual indicaron que la actividad de la Mn-SOD es inhibida, posiblemente de forma directa por el HgCl_2 en un modelo de ratones de la cepa ICR a la cual administraron vía subcutánea dosis de 0.25 a 3 mg de la sal de Mercurio por Kg de peso del animal. Ellos argumentaron que la disminución de la actividad de la enzima fue dependiente de forma directamente proporcional a la dosis empleada en riñón, pero en el hígado la presencia de Mercurio no alteró la actividad de la enzima. Ellos determinaron que la acumulación de Mercurio en el riñón fue 34 a 47 veces mayor en este órgano en relación con el hígado, lo que podría explicar las diferencias encontradas en los dos órganos (Shimmojo, et. al., 2002).

Se ha logrado establecer una relación entre la generación de EROS y el aumento de la actividad de la enzima GST (Hernández, et al., 2015 y Hernández, 2013), por esta razón se determinó la actividad de la enzima, como indicador de daño, en los diferentes grupos de estudio. En el caso de la exposición al metal se observó que la actividad de GST aumentó en el homogeneizado renal, pero no así en orina ni en suero, como se ha encontrado en el caso de la intoxicación con Plomo (Hernández, et al., 2015 y Hernández, 2013). McMahon y Tonomura en 2010 comunicaron que se han establecido algunos biomarcadores para el daño renal, incluyendo la actividad de algunas enzimas de importancia clínica, pero que por su baja concentración en el riñón pueden no cumplir cabalmente esta función. En relación con la GST, McMahon indicó que las isoformas α y π son liberadas exclusivamente durante el daño renal (ocasionado por Cadmio, cisplatino, ciclosporina, antibióticos, trasplantes o en episodios de daño cardíaco en humanos); la primera representando las alteraciones en el túbulo proximal y la segunda las del túbulo distal. De la misma forma la α -GST se ha relacionado con el daño hepático cuando es detectada en muestras de suero. Tonomura indicó que la Food and Drug Administration (FDA) y la European Medicines Agency (EMA) publicaron, en 2008, el nombre de siete nuevos marcadores de daño renal entre los que mencionaron a la proteína total y a la albúmina en particular. El mismo año el International Life Sciences Institute Health and Environmental Sciences Institute (ILSI-HESI) incluyó otros cuatro biomarcadores, entre ellos α -GST y μ -GST en humanos, mencionando que en animales de laboratorio no se han realizado muchos estudios al respecto (Mc-Mahon et al., 2010., Tonomura. et al., 2010). Lo anterior podría ayudarnos a postular que, bajo este esquema de intoxicación, el cloruro de Mercurio, posiblemente dañó de forma sistémica a los roedores y por ello la actividad de la enzima en riñón aumentó, lo que indica posiblemente daño tubular. En relación con lo mencionado, se ha reportado que entre los daños ocasionados por la

exposición a Mercurio se encuentran la interrupción de la formación de microtúbulos; el cambio en el balance de Calcio intracelular; el cambio en el potencial de las membranas, así como la alteración de su integridad; la inhibición de la actividad de un gran número de enzimas; la generación de estrés oxidativo; la inhibición de la síntesis de proteínas y DNA y disturbios en las funciones inmunes. Para tratar de comprender los fenómenos ocasionados por este metal, el equipo de trabajo dirigido por la Dra. Leticia Navarro, ha postulado varios mecanismos de daño basados en las características químicas de este elemento. El Mercurio puede unirse a los grupos fosfato, carboxilo y amino de muchas moléculas intra y extra celulares. De la misma forma tanto los compuestos orgánicos como los inorgánicos de Mercurio pueden unirse a moléculas ricas en grupos sulfhidrilo como la Cisteína, el Glutatión y la albúmina, lo cual influye en la distribución del Mercurio en el organismo ya que las uniones con compuestos que los puedan unir facilitarán su distribución dentro del mismo (Rafati-Rahimzadeh, et al, 2013, 2014).

Los metales pesados como el Mercurio ocasionan daños muy variados, los cuales dependen de la naturaleza química de los compuestos que forma, las vías de entrada, la dosis, el órgano blanco, la edad y el sexo de los individuos, la raza, etc. Esto ha originado que muchos investigadores se dediquen a estudiar posibles tratamientos para prevenir, competir o revertir los daños. Entre ellos se han propuesto compuestos de naturaleza antioxidante, agentes quelantes y micronutrientes. En este trabajo se eligió la terapia con los microelementos esenciales Selenio y Zinc, así como el agente quelante DMSA, el cual se diseñó de forma especial para el Plomo pero que ahora se utiliza para otros metales o agentes contaminantes (Guan y Dai, 2009., Roels, et. al, 1991 Kosnett, 2013., Rafati-Rahimzadeh. et. al, 2014., Bridges, et. al, 2008.a y b).

Las Figuras 26 y 27 muestran esquemas que indican los efectos que la exposición a Mercurio ocasiona en las células renales de ratas Wistar macho expuestas a Cloruro de Mercurio 2.5 mg/Kg. Este esquema surgió del análisis de todas las determinaciones que se realizaron y de las observaciones del comportamiento de los animales durante el periodo de intoxicación con Mercurio comparándolos siempre con el grupo control. El Mercurio ocasiona un desajuste metabólico que involucra alteraciones metabólicas como lo es el metabolismo de los carbohidratos, la alteración de una enzima antioxidante resultando en un posible aumento de H_2O_2 , que es el precursor de las Especies Reactivas de Oxígeno, también generó daños a nivel hepático, renal y posiblemente cerebral al observarse irritabilidad en los animales, pérdida de pelo y alteración de su comportamiento. De la misma forma se generó un estado de infección posiblemente por la afectación del sistema inmune. Finalmente se observó aumento de peso excesivo en los animales expuestos a Mercurio con aumento de grasa corporal y agua.

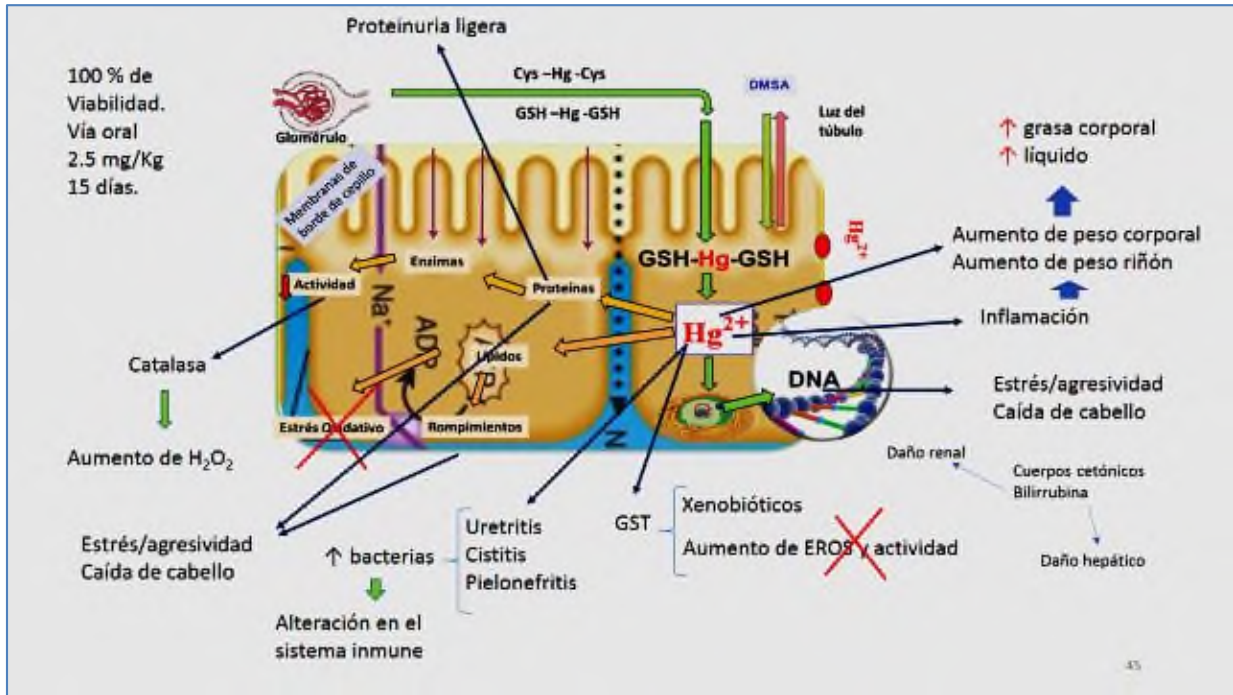


Figura 26. Efectos de la exposición por vía oral a 2.5 mg/kg de Cloruro de Mercurio en ratas Wistar macho por un periodo de 15 días. (Fuente: elaboración propia).

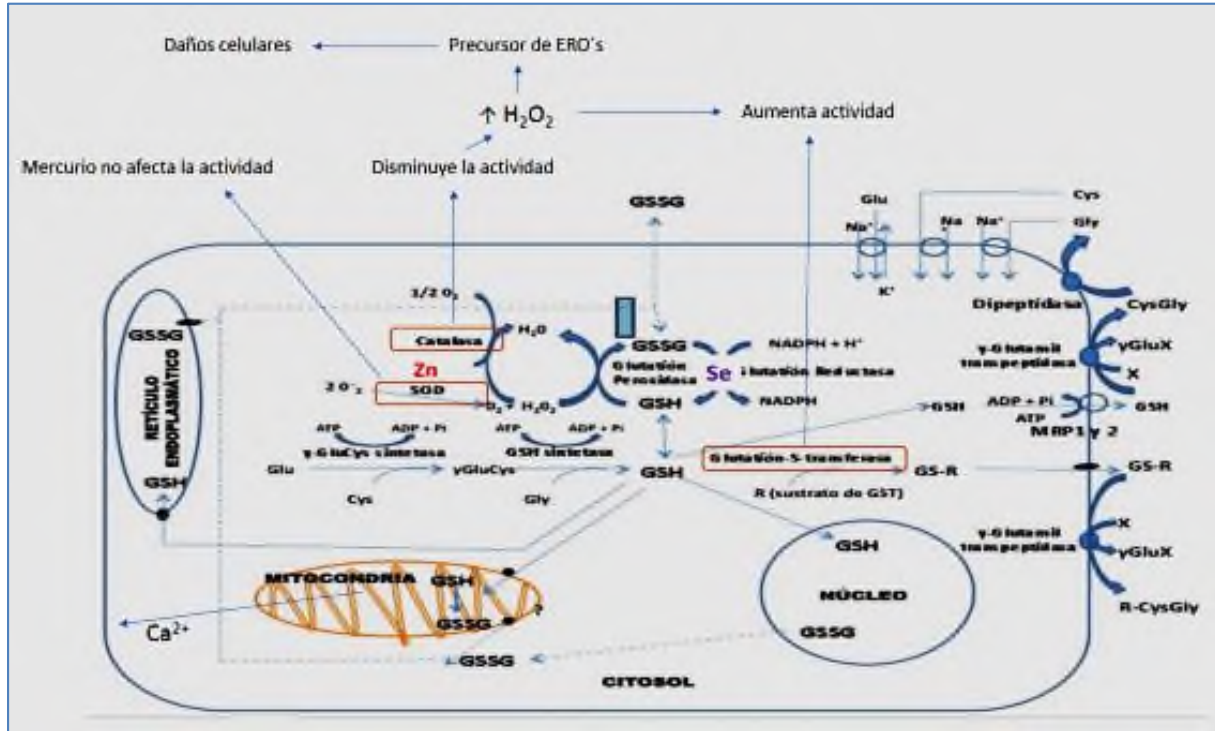


Figura 27. Efectos de la exposición por vía oral a 2.5 mg/kg de Cloruro de Mercurio en la actividad de las enzimas CAT, SOD y GST de riñón de ratas Wistar macho. (Fuente: modificado de Zalups, 2017).

En el desarrollo de esta investigación, se establecieron tres grupos, uno tratado con Selenio, otro con Zinc y el tercero con la mezcla de los dos elementos. El efecto de estos metales, por separado, sobre el peso de los animales fue una disminución significativa de peso sin llegar a causar la muerte de los animales. Se sabe que el Zinc, el Magnesio y el Cobre sirven de cofactores para la enzima Superóxido Dismutasa y que el Selenio es cofactor de las enzimas Glutación Peroxidasa, Glutación Reductasa y Tiorredoxina Reductasa (Agarwal, 2006). Si bien en este trabajo presentó un pequeño aumento de peso ocasionado por algún desequilibrio hídrico como consecuencia de un problema osmótico. A pesar de que, cuando se usó la mezcla de los dos elementos, la disminución de peso fue menor. No se tiene una explicación certera para este hecho. Sin embargo, este último grupo fue el que ocasionó un daño menor en el peso de los animales. No existió un efecto en el peso de los riñones, sin embargo, cuando se llevó a cabo la relación entre el peso del órgano y del riñón se observó solo un aumento en el grupo tratado con Zinc. Entre estos dos micronutrientes Se y Zn, el Selenio es más efectivo, y se sabe que el Selenio, bajo ciertas condiciones, tiene capacidades prooxidantes por lo que puede llegar a oxidar grupos tiol y generar superóxidos. Hay investigaciones que indican que el Selenio, en forma de Selenito de Sodio, disminuye la cantidad de Mercurio en el riñón, pero con incremento en órganos como el hígado y otros tejidos en la cuales no sé hizo el estudio porque el órgano del interés es el riñón que retiene mayor concentración de Hg. Posiblemente estos efectos tengan que ver con las interacciones Hg-Se. De igual forma algunos autores han indicado que el Selenio no puede proteger a los órganos contra la intoxicación con Mercurio cuando es administrado de 1 a 2 horas antes que el metal (Cuvín-Aralar, 1991., Yoneda, 1997., Sasakura, 1998., Agarwal, 2007). En el presente trabajo de Tesis se utilizó el SeS_2 y se observó que el grupo sometido a la preexposición a Selenio por un periodo de 15 días antes de la intoxicación con Mercurio fue el que mostró mejores resultados al normalizar algunas de las alteraciones ocasionadas por el metal.

Cuando los animales se expusieron a los dos metales por separado presentaron alteraciones en los niveles de leucocitos, nitritos y urobilinógeno. Cuando se trataron con Zinc las alteraciones se visualizaron en nitritos, urobilinógeno, proteína, sangre, gravedad específica, cetonas y bilirrubina y un nivel muy bajo de proteína indicando que en este caso se generó un mayor daño renal y hepático y por lo tanto no es tan factible con el Zinc. Cuando los dos micronutrientes fueron administrados al mismo tiempo, los analitos que mostraron un comportamiento anormal fueron los nitritos, en este caso también se detectó ligera proteinuria, interpretando que existe una menor infección en vías urinarias y daño renal. De nueva cuenta la exposición a los dos metales tuvo menores efectos en los animales. Posiblemente los dos elementos presentaron sinergia y por ello los efectos fueron menores. El Selenio disminuyó la generación de Especies Reactivas de Oxígeno en relación con el

grupo control. Esto posiblemente se debió a que el metal activó a las enzimas Glutación Reductasa y Glutación Peroxidasa. Cuando se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes, el Selenio y el Zinc causaron el aumento de la actividad de CAT y SOD lo cual podrían indicar que estos elementos activaron el sistema antioxidante en general por lo cual la capacidad antioxidante celular aumentó, reflejando la interacción entre todas las enzimas, como se ha mencionado en la literatura (Escorza, 2009).

Cuando se evaluó la actividad de GST, los resultados indicaron que estos dos metales, por separado disminuyeron la actividad enzimática, pero al ser administrados juntos la actividad no varió. Posiblemente esto puede deberse a que los metales por separado podrían desencadenar algún proceso celular, diferente al estrés oxidativo, que pueda inhibir la actividad enzimática o a que, como el sistema antioxidante se encuentra activo, ya no es posible inducir la enzima aún más o porque no resulta tan “necesario” activar a la enzima GST. Se debe recordar que una de las actividades de esta proteína es la de participar en la fase II del metabolismo de los xenobióticos (Sherratt, 2001., Nebert, 2004., Josephy, 2010). Sin embargo, los resultados demuestran que en estos grupos el sistema de inducción de la enzima no está siendo influido por dichos xenobióticos ni como generadores de estrés lo cual podría explicar que su actividad haya disminuido.

En el caso de la administración de los dos microelementos, la actividad no se vio afectada. Este dato concuerda con los resultados obtenidos en las pruebas anteriores del EGO. Los resultados obtenidos en riñón al determinar la actividad de GST, se reprodujeron cuando la actividad de la enzima fue medida en orina, reflejando lo que sucedió en el órgano. Cuando la actividad de GST se determinó en suero se observó que en los tres grupos la actividad aumentó lo cual puede reflejar, posiblemente, daño hepático debido a lo mencionado en el apartado correspondiente al grupo intoxicado con Mercurio.

Una vez terminados los grupos anteriores, se establecieron los intoxicados con Mercurio y tratados con micronutrientes. En este caso, se incluyeron dos grupos en los cuales se realizó un pretratamiento por 15 días con Selenio y con Zinc por separado, después del cual los animales fueron expuestos a Mercurio. En la literatura se ha establecido que el Selenio y el Mercurio actúan en el organismo antagonizando cada uno la actividad del otro. En el riñón, se ha reportado que la presencia de Selenio puede reducir la cantidad de Mercurio o modificar la distribución del mismo dentro del órgano. Sin embargo, la cantidad del metal pesado aumenta en el resto del organismo y de manera preferencial en el hígado. Esta relación presenta algunas desventajas como el hecho de que el selenio puede presentar propiedades prooxidantes, lo que podría ocasionar la oxidación de los grupos tiol y generar superóxidos. De la misma manera el Selenio puede afectar la vía urinaria

de eliminación de Mercurio dependiendo de la concentración que se refleja en su función metabólica. Se sabe también que ambos elementos forman asociaciones 1:1 pero no se tiene bien estudiada la implicación de esta asociación (Curvin-Aralar, 1991., Agarwal, 2007., Li, 2008).

De forma similar a los resultados obtenidos en el bloque anterior del EGO de los animales expuestos a Mercurio y tratados con los micronutrientes Selenio y Zinc por separado provocaron un mayor efecto en el peso de los animales, disminuciones de 50 y 100 gramos, lo que para los animales representa un gran desbalance en su desarrollo, tomando en cuenta que el aumento de peso normal de los animales expuestos a Mercurio fue de 21 gramos. La combinación del Selenio más el Zinc mantuvo a los animales sin variación en su peso, lo cual implica que posiblemente, estos elementos actuaron de forma sinérgica contra las acciones del Mercurio y de forma antagónica entre ellos. Este hecho no se reflejó en el peso de los órganos.

En todos los esquemas se detectó disminución de peso de los órganos. Ello denota un desarrollo no normal en relación con el peso de los animales. Los grupos presentaron proteinuria moderada cuando se intoxicaron con Mercurio y se trataron con Selenio y Zinc. Cuando los dos microelementos se usaron juntos para tratar el daño por Mercurio se observó aumento de volumen urinario.

Los diferentes esquemas de tratamiento con los micronutrientes disminuyeron la formación de las Especies Reactivas de Oxígeno y en el caso del tratamiento con los dos micronutrientes los niveles bajaron más de cuatro veces y en el caso de la preexposición a Zinc el descenso fue de 38 veces. Posiblemente el efecto observado sea debido a los efectos de los micronutrientes sobre los sistemas antioxidantes. Se ha reportado que en ocasiones la captación celular de Mercurio se ve realizada por la presencia de Selenio, lo cual podría originar un daño celular mayor (Sanin, et. al, 2006).

En relación con las actividades enzimáticas, se tiene el conocimiento de que el Zinc puede mantener la integridad de los grupos SH y puede evitar la interacción entre los metales Hierro y Cobre de las membranas, lo que evita la formación de Especies Reactivas de Oxígeno. También puede inhibir enzimas oxidantes como la NADPH oxidasa y la Óxido Nítrico Sintetasa. Además, puede inhibir la lipoperoxidación (Haweke, 1985; Driscoll, 2003). Se observó que, en presencia de Mercurio, la enzima GST aumentó y que los micronutrientes administrados solos y los dos juntos ocasionaron disminución de la misma, posiblemente por la disminución de los EROS. Sin embargo, cuando se realizan los pretratamientos la disminución de la actividad es menor, quizá porque la exposición a los micronutrientes disminuyó la generación de estas especies. Se observó un aumento de la actividad de Catalasa en los grupos intoxicados con Mercurio y tratados con Selenio y Zinc por separado, lo cual indica que hay aumento de Peróxido de Hidrógeno posiblemente.

Finalmente, en el caso del tratamiento con Selenio y Zinc y la preexposición a Selenio se observó aumento en la actividad de SOD, lo que denota posiblemente la activación o inducción de la enzima

o la presencia de radicales superóxidos. Se sabe que la administración de los micronutrientes Selenio y Zinc disminuye los daños ocasionados por la intoxicación con Mercurio posiblemente porque por un lado el Zinc podría estar activando la producción de GSH y con ello activar a las enzimas Glutación Peroxidasa (GSHPer), Glutación Reductasa (GSHRed) y GST, así como a las MT mismas que pertenecen al sistema antioxidante celular. Por otro lado, el Selenio estaría activando a la enzima Superóxido Dismutasa que junto con las enzimas anteriores disminuiría la cantidad de Especies Reactivas de Oxígeno generadas por intoxicación con Mercurio. De esta manera la célula se protegería del daño oxidativo a las macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos como el DNA nuclear. Esta propuesta se muestra en la Figura 18. Sin embargo, aún queda un amplio campo por estudiar debido a que el comportamiento de los micronutrientes por separado administrados a roedores intoxicados con mercurio abrió una serie de preguntas relacionadas con los efectos que se observaron que deberán ser estudiadas con más detalle más adelante.

Las figuras 28 a 31 muestran los efectos de los diversos esquemas de tratamiento basados en el uso de micronutrientes por separado, juntos o en forma de pretratamiento por 15 días.

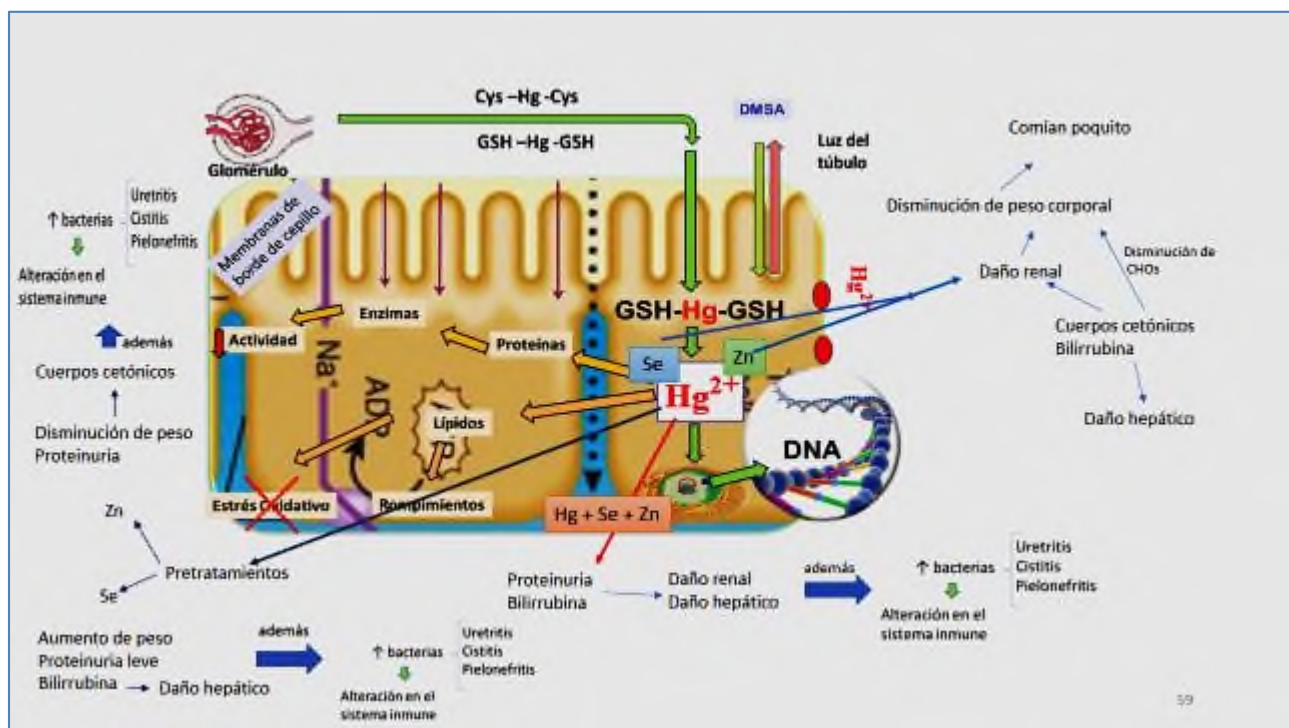


Figura 28. Efectos del tratamiento con micronutrientes Selenio y Zinc sobre la exposición por vía oral a 2.5 mg/kg de Cloruro de Mercurio en ratas Wistar macho por un periodo de 15 días. (Fuente: elaboración propia).

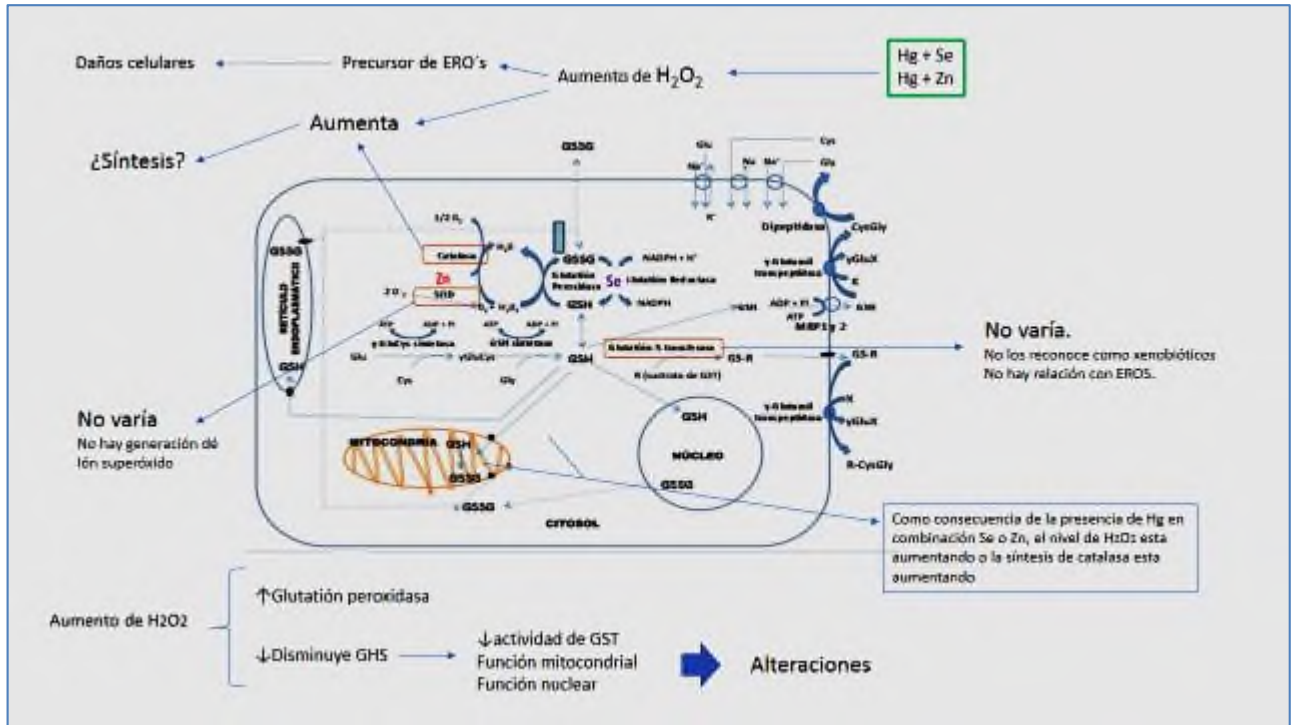


Figura 29. Efecto del tratamiento con Se y Zn en la actividad de las enzimas CAT, SOD y GST en células renales expuestas a Mercurio (Fuente: modificado de Zalups, 2017).

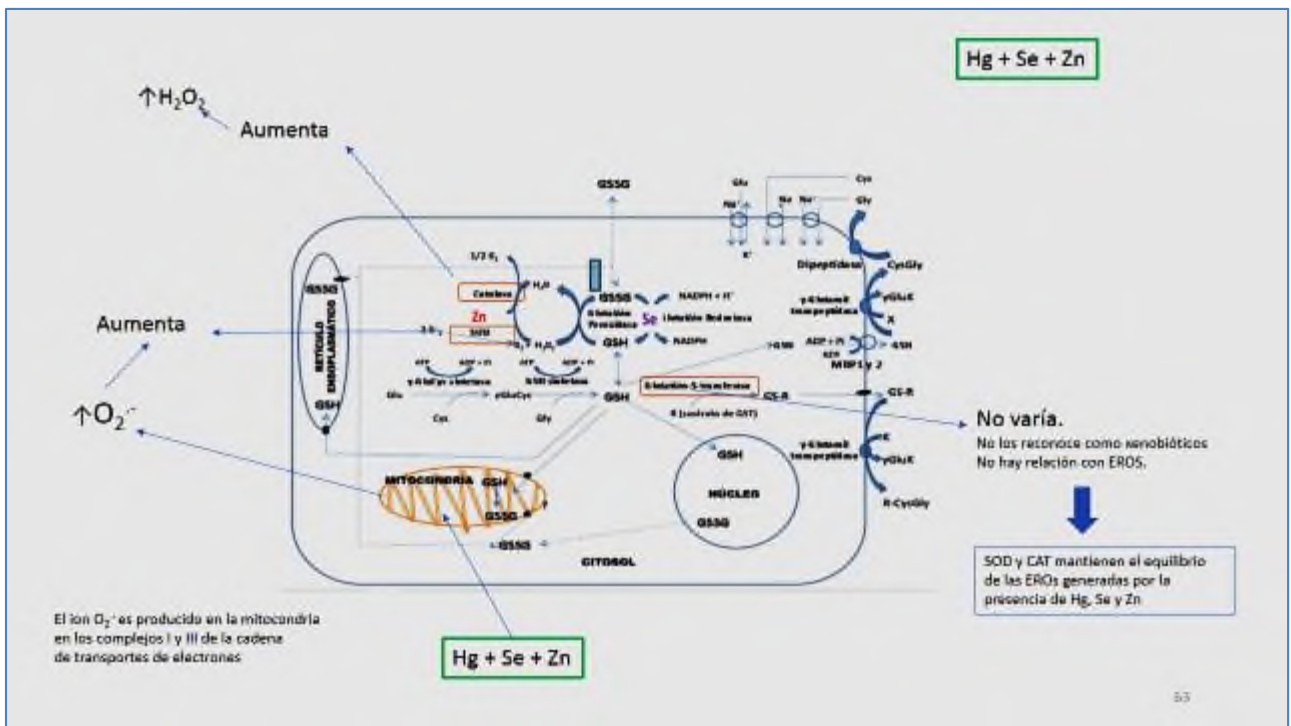


Figura 30. Efecto del tratamiento con Se más Zn en las enzimas CAT, SOD y GST en células renales expuestas a Mercurio (Fuente: modificado de Zalups, 2017).

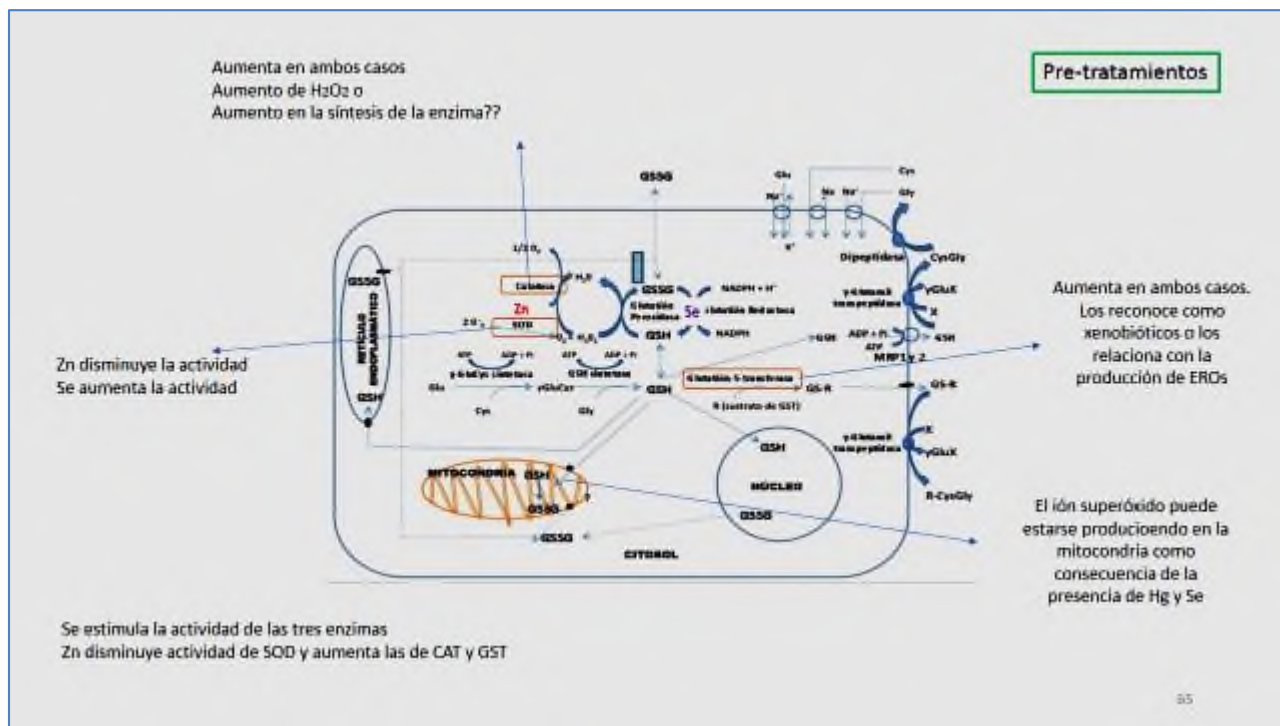


Figura 31. Efecto del pre-tratamiento con Se más Zn en las enzimas CAT, SOD y GST en células renales expuestas a Mercurio (Fuente: modificado de Zalups, 2017).

El DMSA es un agente quelante que se ha diseñado para contaminantes como los metales pesados. En relación con el Mercurio, este quelante es más efectivo sobre las formas orgánicas que las inorgánicas, para las cuales el ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS) es el más utilizado (Guan y Han, 2009).

En el siguiente grupo experimental se usó el DMSA y se analizó su efecto por sí solo y en combinación con Selenio y Zinc por separado. Se observó que en el grupo tratado con DMSA hubo un aumento del peso corporal y el de los riñones, posiblemente por aumento de líquido intersticial, lo cual se pudo observar al realizar la extracción de los órganos de estudio. No se detectaron cambios importantes en el examen general de orina para ninguno de los grupos experimentales, lo cual implica que no existieron alteraciones en riñón, hígado, metabolismo de hemoglobina y lípidos. De la misma forma no se detectaron cambios en el volumen urinario. El DMSA solo no ocasionó cambios en el nivel de EROS en relación con el grupo expuesto a Mercurio. Sin embargo, cuando se administró conjuntamente con Selenio o con Zinc, los niveles de las especies disminuyeron de forma drástica, posiblemente por la acción antioxidante de los micronutrientes y la acción quelante del DMSA. El quelante no ocasionó cambios en la actividad de la GST, pero sí disminuyó la actividad

de CAT y aumentó la de SOD. La combinación de DMSA + Selenio disminuyó la actividad de las enzimas GST y SOD, pero no cambió la actividad de CAT. Finalmente, en el caso de agente quelante + Zinc solo aumentaron las actividades de GST y SOD. Esto indica que la enzima más activa en estas tres condiciones es la SOD, posiblemente debido a la activación de algún proceso oxidativo en donde el ión superóxido se generó. En orina la actividad de GST aumentó en todos los grupos, mayormente en el caso del DMSA solo y en suero no hubo cambios.

Finalmente, el grupo expuesto a Mercurio y los grupos intoxicados con Mercurio y tratados con DMSA, DMSA + Se, DMSA + Zn, DMSA + Se + Zn fueron también evaluados. Las ratas expuestas a Mercurio y tratadas con DMSA y las tratadas con Zn + DMSA, disminuyeron su peso en relación con el grupo intoxicado con Mercurio; los animales tratados con DMSA + Se y DMSA + Se + Zn aumentaron de peso. En cuanto al riñón y a comparación con el grupo intoxicado con Mercurio, el peso de los órganos incrementó en todos los grupos; sin embargo, en relación con el crecimiento de los animales se pudo ver que el aumento de peso del riñón no fue proporcional ya que disminuyó su tamaño. Lo cuál se ha reportado que, en ratones en donde se realizaron pre y post- tratamientos con 20 μmol de Mercurio por kg de peso por vía intraperitoneal se detectó aumento en la lipoperoxidación y el contenido de GSH; disminución de la actividad de SOD en hígado y riñón, así como disminución de la enzima GPx en hígado. El tratamiento con la misma concentración de Selenio reestableció los efectos observados. Además, la actividad de la CAT aumentó en hígado y cerebro (Agarwal, 2007).

Se ha reportado que existe un patrón diferente de toxicidad en función de la especie de Mercurio y de la especie intoxicada. Se sabe que los órganos blancos principales son: riñón, hígado, sistema gastrointestinal, intestinos y sistema nervioso central. De la misma manera se ha dado a conocer que el Mercurio se une a MT, Cisteína y GSH, cuando se encuentra en forma iónica induce lipoperoxidación en riñón y cerebro. En riñón, el Mercurio puede inducir la producción de radicales superóxido e hidroxilo además de disminuir el GSH en riñón, por lo cual ocasiona alteraciones renales (Agarwal, 2007). Cuando se obtuvieron los datos generados por el examen general de orina se observó que, en los grupos tratados con los diferentes esquemas de intoxicación, no se observaron alteraciones relevantes como sangre, proteínas o glucosa en orina, los niveles de cetonas, bilirrubina, y urobilinógeno fueron normales. Solo se vieron alterados los valores de gravedad específica, el volumen urinario del grupo Hg + Se + DMSA. Todos los grupos presentaron niveles variables de leucocitos y nitritos; mientras que el pH solo fue basicado en los grupos Hg + Se + DMSA y Hg + Se + Zn + DMSA. A este respecto se ha reportado que los compuestos inorgánicos de Mercurio, como el HgCl_2 son, por lo general, pobremente absorbidos por el intestino y son

depositados en el riñón en donde pueden ocasionar graves daños. Para tratar de revertirlos se ha empleado la terapia de quelación, la cual consiste en el tratamiento de las intoxicaciones relacionadas con metales pesados, con compuestos con la capacidad de formar complejos estables con el metal, con lo cual se impide el ataque a blancos biológicos. Se ha reportado que la administración oral de DMSA después de la intoxicación con Mercurio puede disminuir el depósito y la retención del metal en varios órganos e incrementar la excreción urinaria del mismo (Planas-Bohne, 1981., Aaseth, 1983., Buchet, 1989., Guan, 2009). El aumento del volumen de orina en el grupo Hg + Se + DMSA posiblemente se encuentra relacionado con un reporte que indica que en animales de experimentación el DMSA y el DMPS tienden a eliminar el Mercurio por vía urinaria posiblemente conjugado con estos agentes. Dentro de este proceso se ha implicado a la Proteína 2 Multiresistente a Drogas (Mrp2), como la que puede mediar la secreción de los complejos quelante-Hg en el túbulo contorneado proximal del riñón. Esto fue probado en ratas a las cuales se les administró por vía intravenosa 0.5 $\mu\text{mol/kg}$ de HgCl_2 y después de transcurridas 24 horas se les inyectó DMSA o DMPS. En el caso del DMSA se observó que el contenido de Mercurio en riñón, así como el peso del órgano disminuyeron y que aumentó la cantidad de metal en orina y suero (Bridges, 2008 a y b). Por otro lado, se ha reportado que, en el caso de personas, la exposición a vapores de Mercurio indujo aumento en la excreción del metal en orina (Roels, 1991).

Se ha reportado que el HgCl_2 puede actuar como agente prooxidante y que ello puede afectar la actividad de las enzimas SOD, GPx y CAT. Estudios experimentales demostraron que cuando se administró Selenito de Sodio a ratones intoxicados con Mercurio, no se generó estrés oxidativo y que las enzimas tuvieron diferentes comportamientos en función del órgano. En hígado disminuyó la actividad de SOD y aumentó la de CAT. En riñón disminuyó la SOD y en cerebro aumentó la actividad de CAT. El Mercurio puede generar radicales libres como superóxido y Peróxido de Hidrógeno en riñón. Se observó, en estos experimentos que cuando se administró Selenio antes del Mercurio la cantidad de H_2O_2 es mayor que la de superóxido en hígado y menor en riñón y cerebro. Cuando se administró el Selenio después del Mercurio, el comportamiento fue el mismo (Chung, 1982., Agawal, 2007). En este trabajo de Tesis se observó que los roedores intoxicados con Mercurio y tratados con DMSA presentaron un nivel mayor de EROS y, de la misma forma, incremento en las actividades de las enzimas GST, CAT y SOD, lo cual demuestra que entre el metal y el quelante ocasionaron generación de H_2O_2 y del ion superóxido. En los grupos Hg + Se + DMSA y Hg + Zn + DMSA se observó una concentración menor de EROS con disminución de la enzima GSTy un, aumento de CAT y de SOD, lo que indica que posiblemente, el radical hidroxilo juega un papel dentro de este fenómeno de activación/inducción de las enzimas. El grupo Hg + Se + Zn + DMSA mantuvo las concentraciones de EROS a nivel de los grupos no expuesto y expuesto a Mercurio, así como

aumento de la capacidad catalítica de CAT y SOD sin variación de la actividad de GST. Todo lo anterior sugiere que los animales a los cuales se les administró el quelante junto con los micronutrientes generaron procesos en los que la participación de Especies Reactivas de Oxígeno estuvo implicada y que como consecuencia de ello las actividades de las enzimas antioxidantes y de la GST en riñón variaron dependiendo de cada esquema de tratamiento.

Los tratamientos con mayor eficacia de todos los grupos experimental de este trabajo, para la intoxicación con Mercurio y el estudio para el daño renal. Resultó que el tratamiento con DMSA tiene una mayor probabilidad de mejorar el daño renal y administrando juntos los micronutrientes que es Selenio y Zinc, también hay una mejor efectividad para contrarrestar la intoxicación con Mercurio. Las figuras 32 y 33 muestran los resultados del tratamiento con los micronutrientes y el DMSA sobre la intoxicación con Mercurio.

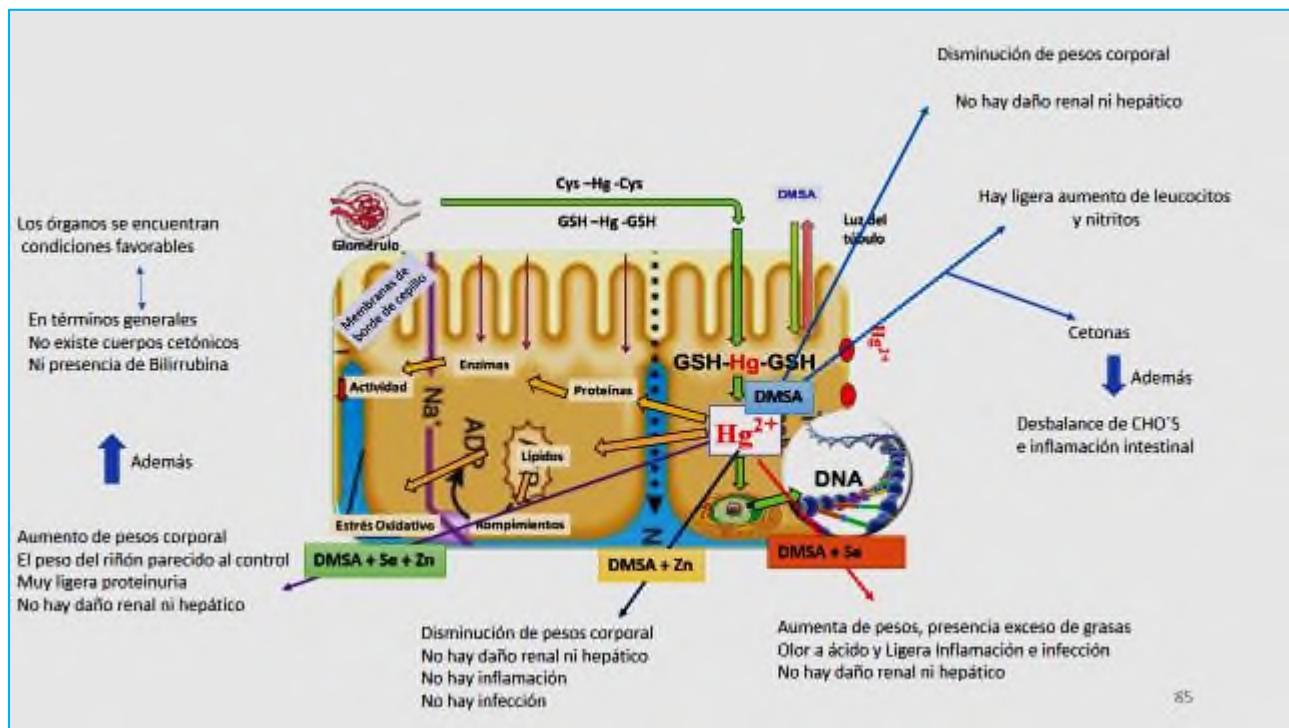


Figura 32. Efectos del tratamiento con el quelante DMSA y los micronutrientes Selenio y Zinc sobre la exposición por vía oral a 2.5 mg/kg de Cloruro de Mercurio en ratas Wistar macho por un periodo de 15 días. (Fuente: elaboración propia).

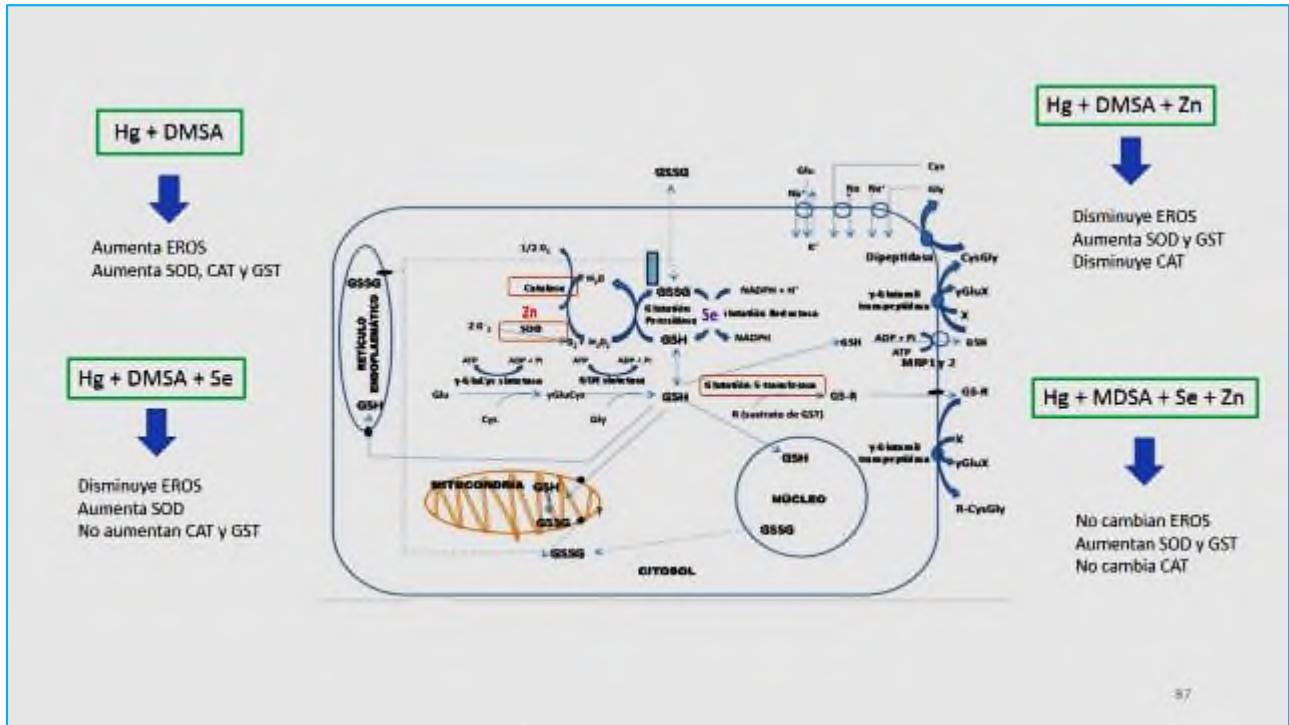


Figura 33. Efecto del tratamiento con DMSA y los micronutrientes Se y Zn en las enzimas CAT, SOD Y GST en células renales expuestas a Mercurio (Fuente: modificado de Zalups, 2017).

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

En este trabajo se usaron ratas Wistar macho, intoxicadas vía oral demuestra tener un efecto dañino en el riñón, el cual implica un componente oxidativo a comparación con el caso de la intoxicación vía intraperitoneal, la cual origina, a la dosis empleada, una mortalidad del 100%.

Los tratamientos con Selenio y Zinc funcionan mejor administrando juntos, que por separado, logrando disminuir la cantidad de producción de EROS y contrarrestar el daño renal.

Los tratamientos con micronutrientes son efectivos debido a que estimulan la actividad de enzimas antioxidantes y disminuyen el estrés oxidativo. Sin embargo, el Selenio fue el que más efectos benéficos tuvo a comparación con el Zinc, el cual originó algunos problemas renales debido posiblemente a la dosis empleada, la cual pudo ejercer un papel como agente prooxidante.

El pretratamiento con Selenio por 15 días previos a la intoxicación con Mercurio ocasiona mejor protección contra la intoxicación con Mercurio que el pretratamiento con Zinc.

El tratamiento con el agente quelante DMSA es más efectivo cuando se administra de forma individual que junto con los micronutrientes al no aumentar el nivel de estrés celular.

PERSPECTIVAS

Se recomienda para futuros proyectos de investigación tener presente lo siguiente:

Al no tener una estabilidad del problema del daño renal y las respuestas eficientes con el DMSA, considerar otros agentes quelantes y diferentes concentraciones.

En nuestra región hay muchas vegetales que son fuentes ricas de elementos esenciales, porque no trabajar con un grupo de experimental para contrarrestar los daños ocasionados por metales pesados.

Así también sería de mucho apoyo estudiar los efectos que puede causar los metales pesados de diferentes dosis, edades y órganos. Teniendo en cuenta que los micronutrientes ayuda al riñón evitando el daño renal, esto podría ser el principio para escalar hacia humanos y disminuir el problema de salud del daño renal.

APÉNDICE

TRABAJOS DERIVADOS DE ESTA TESIS PRESENTADOS EN CONGRESOS.

“Glutation S-Transferase and mercury toxicity” (Cartel).

David Cruz Victoriano, Aurelio Ramírez Hernández, Leticia Guadalupe Navarro Moreno.

4th INTERNATIONAL WORKSHOP FRONTIERS IN PROTEIN FOLDING, EVOLUTION AND FUNCTION.

5° CONGRESO DE LA RAMA DE FISICOQUÍMICA, ESTRUCTURA Y DISEÑO DE PROTEÍNAS DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA. Oaxaca, Oaxaca, México, 3 -7 de Noviembre de 2015.

“Actividad de la enzima glutatión S-Transferasa expuesta a mercurio y micronutrientes” (Cartel).

David Cruz Victoriano y Leticia Guadalupe Navarro Moreno.

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. Nuevas tecnologías y tendencias en la Ingeniería Química.

XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ. Puerto, Vallarta, Jalisco, México, 3 al 7 de mayo de 2016.

“La Actividad de SOD, CATy con sus respectivos activadores Zn, Se para disminuir el efecto de Estrés Oxidativo provocado por el Mercurio” (Cartel).

David Cruz Victoriano y Leticia Guadalupe Navarro Moreno.

4° Reunión de Materiales, Nanotecnología y Ciencias Aplicadas. Universidad del Papaloapan “Campus Tuxtepec”, Tuxtepec, Oaxaca, 30 de Junio y 01 de Julio de 2016.



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
 INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CELAYA
 DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



AMIDIQ

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

Nuevas tecnologías y tendencias en la Ingeniería Química

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

DAVID CRUZ VICTORIANO Y LETICIA GUADALUPE NAVARRO MORENO

Por la presentación del trabajo:

ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EXPUESTA A MERCURIO Y MICRONUTRIENTES

Título: Reconocimiento
 Diseño: Araceli Aguilar Rojas Rosales, Primer
 Ejecución: Raúl Ceja Medina, Esculler
 Colaboradores: Marcelino López, Beatriz Adriana Rodríguez Andrade, Cecilia Rangel Mexicano, Dalila María Elizabeth Cuernera Delafra, Alejandro Lenas Ortiz
 Fecha: 24 de Agosto de 2016.
 Modal: ubicado en la Unidad de Convivencia Estudiantil del Campus II del Instituto Tecnológico de Celaya

XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ

Puerto Vallarta, Jalisco, México, del 3 al 6 de mayo de 2016


Dr. Mauricio Sales Cruz
 PRESIDENTE DE AMIDIQ


Dr. Pedro Alberto Quintana Hernandez
 PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR


Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia
 PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO



La red-PRODEP-SEP "Aprovechamiento Sostenible de Recursos Naturales y Generación de Productos de Alto Valor Agregado"

EXTIENDEN LA PRESENTE

Constancia a:

David Cruz Victoriano, Leticia Guadalupe Navarro Moreno

Por su valiosa participación en la presentación del cartel titulado:

"La actividad del SOD, CAT y con sus respectivos activadores Zn, Se para disminuir el efecto de Estrés Oxidativo provocado por el Mercurio"

Realizada los días 30 de Junio al 01 de Julio de 2016, con motivo de la **4ª Reunión de Materiales, Nanotecnología y Ciencias Aplicadas.**

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca a de 01 de Julio del 2016.



M C Héctor López Arjona
Vice-Rector Académico

Dr. Erick Juárez Arellano
Responsable del CA RENIT-UNPA

Dra. Leticia G. Navarro Moreno
Responsable del CAQBM-UNPA

Dr. Eduardo Ramírez Vargas
Responsable del Grupo de Investigación PTP-CIQA

CAPÍTULO 10

REFERENCIAS

Aaseth J. (1983). Recent advance in the therapy of metal poisonings with chelating agents. *Human. Toxicol*, 2: 257-272.

Agarwal Pradeep K. Agarwal Parinita, Reddy MK. And Sudhir Sopory K. (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant cell reports*, 25(12), 1263–1274.

Agarwal, R., & Behari, J. R. (2007). Role of selenium in mercury intoxication in mice. *Industrial Health*, 45(3), 388–395.

Aoi T., Higuchi T., Kikodoro R., Fukumura R., Yagi A., Oghuchi S., Sasa A., Hayashi H., Sakamoto N., Hanaichi T. (1985). An association of mercury with selenium in inorganic mercury intoxication. *Human Toxicol* 4, 637-642.

Aposhian Vasken H., M. Maiorino R., C. Dart R., F. Perry D., Tucson Ariz. (1989). Urinary excretion of meso 2, 3- dimercaptosuccinic acid in human subjets. *Clin. Pharm. Ther*, 45, 520-526.

Atkison J. H. and Babbitt C. P. (2009). Glutathione transferases are structural and funtional outliers in the thioredoxin fold. *Biochem*. 48(46), 11108-11116.

ATSDR. (2003). Resumen de Salud Pública. Selenio CAS # 7782-49-2.

Boyer, T. (1989). The glutathione S-transferases: an update. *Hepatology*, 9 3, 486-96.

Bridges, C. C., Joshee, L., & Zalups, R. K. (2008). Multidrug resistance proteins and the renal elimination of inorganic mercury mediated by 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 324(1), 383–390. (a)

Bridges C. Christy., Lucy J., Zalups R.K. (2009). Effect of DMPS and DMSA on the placental and fetal Disposition of Metthylmercury. *Placenta*. NIH Public Access., 30(9), 800-805.

Bridges C. Christy., Zalups R. K., Joshee L. (2015). Toxicological significance of renal Bcrp: Another potential transporter in the elimination of mercuric ions from proximal tubular cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 285: 110-117.

Bridges C.C., Joshee L., Zalups R.K. (2008). Multidrug Resistance Proteins and the Renal Elimination of Inorganic Mercury Mediated 6 y 2,3-Dimercapto promamo-1-sulfonia Acid and Meso-2,3-dimercaptosuccinic Acid. *J. Pharm. Exp. Ther*. 324 (1): 383-390. (b)

Bridges C.C., Joshee L., Zalups., R.K. (2008). MRP2 and DMPS and DMSA Mediated. Elimination of Mercury in TR and control Rats Exposed to Thiol S-Conjudates of Inorganic Mercury. *Toxicological Sciences*. 105 (1): 211-220.

Buchet JP, Louwerys RR, (1989). Influence of 2,3-dimercaptopropane-1-sulforate and dimercaptosuccinic acido n the mobilization of mercury from tissues of rats pretreated with mercuric chloride, phenylmercury vapors. *Toxicology* 54: 323-33.

Cabañero Ortíz, A. I. (2005). Acumulación- interacción de especies de mercurio y selenio en tejidos animales: desarrollo de nuevas metodologías de análisis.

- Cadenas Enrique (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem*, 58, 79-110.
- Campuzano, M. G., Albeláez G. M. (2007). El uroanálisis: el gran aliado del médico. *Urología colombiana.*, 67-92.
- Cañari chumpitaz Cristhian L. (2011). El selenio, un elemento poco conocido con un rol biológico importante. *Revista de Química PUCP*. Vol. 25, N° 1-2.
- Casals Mercadal G., Torra Santamaria M., Deulofeu Piquet R., & M. Ballesta Gimeno A. (2005). Importancia del selenio en la práctica clínica. *Química Clínica.*, 24, 141-148.
- Castro D. J. (2013). Evaluación de los suministros de mercurio primario y secundario en México. Comisión para la cooperación ambiental. *Cec. org*.
- Cervantes C., Moreno S. R. (1995). Contaminación ambiental por metales pesados. (AGT., Ed.) *Impacto en los seres vivos*, 157.
- Chasapis T., Christos., Loutsidou C., Ariadni., Spiliopoulou A. Chara., and Stefanidou E. María (2012). Zinc and human health: an update. *Arch. Toxicol.*, 86, 521-531.
- Chávez E. and A. H. José. (1988). Mitochondrial calcium release induced by Hg²⁺. *J. Biol. Chem*, 283, 3582-3587.
- Chávez E., Zazuela C., Osornio A., Holguín JA., Miranda ME. (1991). Protective behavior of captopril on Hg⁺⁺ Induced toxicity on kidney mitochondria: In vivo and in vitro experiments. *J. of Pharm. and Exp. T.* 256, 385-390.
- Chen C., Zhao J., Deng G., Zhang P., Qu L., Chai Z., (2004). Cellular distribution of mercury, selenium and their binding proteins in porcine kidney and liver from mercury exposed areas studied by biochemical separation and hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Sci Tot Environ* (submitted). (a)
- Chen YW., Huang CF., Tsai KS., Yang RS., Yen CC., Yang CY. (2006). Methylmercury induces pancreatic beta-cell apoptosis and dysfunction. *Chem Res Toxicol.* 19(8): 1080-1085. (b)
- Choi BH., Lapham LW., Amin-Zaki L., Saleem T. (1978). Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse White matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *J. Neuropathol Exp Neurol.* 37 (6): 719-733.
- Christos T. Chasapis., Ariadni C. Loutsidou., Chara A. Spiliopoulou., Maria E. Stefanidou (2012). Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol.* 86: 521-534.
- Chung AS., Maines MD., Reynolds WA. (1982). Inhibition of the enzymes of glutathione metabolism by mercuric chloride in the rat Kidney: reversal by selenium. *Bio. Pharm.* 31: 3093-100.
- Covarrubias S. A., Peña C. J. J. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: problemática y estrategias de fitorremediación. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 33, 7-21.

Crespo López., Herculano A.M., Corvelo T.C., Nascimento Do. (2005). Mercurio y neurotoxicidad. *Rev. Neuro.*, 40, 441-7.

Cuello Núñez Susana (2016). Biocumulación, toxicidad e interacción de metilmercurio y especies de selenio. Tesis Doctoral.

Cuvin Aralar ML., Furness RW. (1991). Mercury and Selenium Interaction. A Review. *E. and E. S.* 21, 348-364.

Danyelle M. Townsend., D. Tew Kenneth (2003). The role of glutathione S-transferase in anticancer drug resistance. *Ocogenes*, 22, 7369-7375.

Davis R. Steven., J. McMahon and J. Cousins Robert (1998). Metallothionein knockout and transgenic mice exhibit altered intestinal processing of zinc with uniform zinc-dependent zinc transporter-1 expression. *J. Nutr.*, 128, 825-831.

Donn., TW. Clarkson (1980). Does mercury exhalation signal demethylation of methyl mercury? *Health Phys.*, 38, 411- 414.

Douglas T. Kenneth (1987). Mechanism of action of glutathione- dependent enzymes. *Adv. Enzymol, Relat. Areas Mol. Biol.*, 59, 103-167.

Duques M. A. L. (2011). Estudio de las propiedades antioxidantes de flavonoides alimentarios y su efecto sobre la biosíntesis de eicosanoides mediada por lipoxigenasa hepática. Tesis.

Drasch G., Mailänder S., Schlosser C., Roeder G. (2000) Content of non-mercury-associated selenium in human tissues. *Biol. Trace Elem. Res.* 77, 219-230.

Drasch G., Wanghofer E., Roeder G., Strobach S. (1996) Correlation of mercury and selenium in the human kidney. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 10(4), 251-254.

Driscoll M. Donna, Copeland R. Paul (2003). Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis. *Annu Rev. Nutr.*, 23, 17-40.

Duntas LH., Benvenga S (2014). Selenium: an element for life. *Endocrine*: 1-20.

Escorza Q., A. M., Calderón Salinas, J. V. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y Aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica.*, 28(3), 89-101.

Español Cano, S. (2001). Toxicología del mercurio. Actuaciones preventivas en sanidad laboral y ambiental. Jornada Internacional sobre el impacto ambiental del mercurio utilizado por la minería aurífera artesanal en Iberoamérica.

Falnoga I., Kregar I., Skreblin M., Tusek-Znidaric., Stegnar P. (1993). Interaction of mercury in rat brain. *Biol Trace Elem. Res.* 37, 71-83.

Falnoga I., Mrhar A., Karba R., Stegnar P., Skreblin M., TusekZnidaric M. (1994). Toxicokinetics in Wistar rats exposed to elemental mercury vapour: modelling and computer simulation. *Arch. Toxicol* 68, 406-415.

Falnoga I., Tusek-Znidaric M., Horvat M., Stegnar P. (2000). Mercury, Selenium and Cadmium in human autopsy samples from Idrija Residents and mercury mine workers. *Environ Res* 84, 211-218.

Falnoga Ingrid., Kregar Igo., Skrebin M., Tusek-Znidaric M. and Stegnar Peter. *Interactions of Mercury in Rat Brain* (1993). The Human Press, Inc.

Falnoga Ingrid., Tusek Znidaric Madga., Stegnar Peter (2006). The influence of long-term mercury exposure on selenium availability in tissues: an evaluation of date. *BioMels*. 19: 283-294.

Falnoga I., Tusek Znidaric M., Stegnar P. (2006). The influence of lung-term mercury exposure an Availability in tissues; an evaluation of data. *BroMetals* 19: 283-294.

Farina M., Avila, Silva A. D., Batista Teixeira Da Roncha J., & Aschner M. (2013). Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International*, 64, 575-594.

Ferrer Dufol, A. (2003). Intoxicación por metales. *ANALES Sis San Navarra*, 26 (supl.) 1, 141-153.

Flora JS. Waran and Pachauri Vidhu (2010). Chelation in Metal Intoxication. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 7, 2745-2788.

Franco Jeferson L., Braga Hugo de Campos, Nunes K.C. Adriana, Ribas Camila M., Stringari James, Silva Aline P., C. Solange, Pomblum García, Maro Maro M. Angela, Bohrer Denise, Santos R.S. Adair, Dafre Alcir L., Farina Marcelo (2007). Lactational exposure to inorganic mercury: Evidence of neurotoxic effects. *Neu. and Ter.* 29:360-367.

Friberg L., Mottet BK. (1989). Accumulation of methylmercury and inorganic mercury i the brain. *Biol Trace E. Res.* 21: 201-206.

Fukino H., Hirai M., Hsueh YM., Yamane Y (1984). Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney. *Tox. A. Pharm.* 73, 395-401.

Fulbert JC. and MJ. Cals (1992). Free radicals in clinical biology. Origin, pathogenic effect and defense mechanisms. *Pathol. Biol.*, 40, 66-77.

García-Hernández J., Cadena-Cárdenas L., Betancourt- Lozano M., García de la Parra L.M., García-Rico L. y Márquez-Farías F. (2007). Total mercury content found in edible tissues of top predator fish from the Gulf of California, Mexico. *Toxicol. Environ. Chem.* 89, 507- 522.

G. Poli., G. Leonarduzzi., F. Biasi and E. Chiapotto (2004). Oxidative stress and cell signalling. *Curr. Med. Chem.*, 11, 1163-1182.

Gailer J. (2000). Reactive selenium metabolites as targets of toxic metal/metalloids in mammals: a moleclar toxicological perspective. *Appl Organometal Chem* 16, 701-707.

Gailer Jürgen., Graham N. George., J. Pickering Ingrid., C. Price., Husam S. Yonis and JJ. Winzerling. (2002). *Chem. Res. Toxicol.* 15, 11, 1466-1471.

Goering P. L., Fisher Benjamin. R., Chaudhars P., Dick C. A. (1992). Relationship between stress protein induction in rat kidney by mercuric chloride and nephrotoxicity. *Tox. Appl Pharm.*, 113, 184-191.

González-Dávila O., Gómez-Bernal J.M. y Ruíz-Huerta E.A. (2012). Plants and soil contamination with heavy metals in agricultural areas of Guadalupe, Zacatecas, Mexico. En: *Env. Contam.* 37-50.

González G. A., González M. Y., Heredia R. D., Fernández C. D., Ballesteros H. M. (2013). Enzimas antioxidantes en la hiperglicemia e hiperlipidemia inducida por sacarosa en ratas Wistar. *Rev. Méd. Electrónica.*, 35(2).

Gruner Stefan., Volk Hans-Dieter., Falck Peter., Von Baehr Rudiger (1986). The influence of phagocytic Stimul: on the expresion of HLA-DR antigens; role of reactive oxygen intermediates. *Eur. J. Immunol.*, 16, 212-215.

Gstraunthaler G., Pfaller W., and Kotanko P. (1983). Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate-induced acute renal failure. *Biochem Pharm.* 32, 2969-2972.

Guan, Rong and Di Han (2009). Chelation Therapy for Mercury Poisoning. *Biochem. Insights*, Libertas Académica.

Harrison H. D J., R. Kharbanda., D. Scott Cunningham., L I McLellan., J D Hayes., (1989). Distribution of glutathione S-transferase isoenzymes in human kidney: basis for possible markers of renal injury. *J. Clin. Pathol.*, 42, 624-628.

Haweks WC., Wilhelmsen EC., Tappel AL. (1985). Abundance and tissue distribution of selenocysteine-containing proteins in the rat. *J. Inorg. Biochem.*, 23, 77-92.

Henry Jon Bernard (2001). *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Philadelphia. Saunders.

Hernández Amador J., Navarro Moreno L. G., Velázquez Manzanares M., De La Garza Rodríguez I. M., Colunga Urbina E. M. and Hernández Sánchez M. (2015). Chemometrics as a Tool in the Study of Lead Toxicity in Rats. *J. Mex. Chem. Soc.* 59 (1), 5-11.

Hernández Llamas Guillermo (2019). Situación actual de la enfermedad renal crónica en México. UNEME de Enfermedades Crónicas, Servicios de Salud en Sinaloa.

Hernández Sánchez M. (2013). Estudio de los Efectos del Plomo en Roedores desde una Perspectiva Quimiométrica. Tesis.

Huang Z-Y., Shen J-C., Zhuang Z-X., Wang X-R., Lee FC. (2004). Metallothionein as a biomarker for mercury in tissues of rat fed orally with cinnabar. *Appl Org. Chem* 18, 255-261.

Jadán-Piedra C., Crespo A., Monedero V., Vélez D., Devesa V., Zúniga M. (2019). Effect of lactic acid bacteria on mercury toxicokinetics. *Food and Chem. Tox.* 128, 147-153.

Josephy P. D. (2010). Genetic Variations in Human Glutathione Transferase Enzymes: Significance for Pharm. and Tox. Hum Gen. Prot. 1-14.

Kazantzis G. by (1970). Mercury and the Kidney. Trans. Soc. Occup. Med., 20, 54-59.

Kenneth Rubinson y Judith Rubinson, "Análisis Instrumental", Ed. Prentice Hall (2001).

Koropatnick JD and Zalups RK. (2000). Effect of toxic and essential metals on cellular responsiveness to cell signals, in Molecular Biology and Toxicology of Metals (Zalups RK and Koropatnick DJ eds) Taylor and Francis, Londo, in press.

Kosnett MJ. (2013). The Role of Chelation in the Treatment of Arsenic and Mercury Poisoning. J. Med. Tox. 9: 347-354.

Kosta L., Byrne R. A., Zelenko V. (1975). Correlation between selenium and mercury in man following exposure to inorganic mercury. Nat. 254, 238-239.

Lash H. Lawrence and K. Zalups Rudolfs (1992). Mercuric chloride- induced cytotoxicity and compensatory hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells. L. Phar. Exp. Ther. 261, 819-829.

Li SQ, Zhao JH. China J. Chin. Occup. Med. 2002; 2: 47.

Li Su., Wang Ming., Ting Shu Yin., Wang Hui Li., Chen Liang., Chen Liang., Li Su Guang., Ruan Di-Yu (2008). The interaction of Selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. Ecotoxicology and Environmental Zanetti., 70, 483-489.

Lourdes Ma. A., Cuvín Aralar and W. Furness Robert (1991). Mercury and Selenium Interaction: A Review. Ecotoxicol. and Env. Safety. 21, 348-364.

Lowry H. Oliver., J. Rosebrough Nira., Lewis Far A. J. Randall Rose (1951). Protein measurement with the Follin phenol reagent. J. Biol. Chem, 193, 265-275.

M. Maiorino Richard., C. Bruce David., Vasken Aposhian H. (1989). Determination and metabolism of dithiol chelating agents. VI. Isolation and identification of the mixed disulfides of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid with L-cysteine in human urine. Toxicol. Appl. Phar., 97, 338-349.

Martínez Flores Karina., Souza Arroyo Verónica., Bucio Ortiz Leticia., Gómez Quiroz Luis Enrique., Gutiérrez Ruiz María Concepción (2013). Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. Acta Toxicol. Argent. 21 (1): 33-49.

Matés M. J., Pérez-Gómez C. and Núñez de castro I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. Clin. Biochem., 32, 595-603.

McCall R. M. & Fri Balz (1999). ¿Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? Free Rad. Biol. Med., 11, 1034-1053.

- McMahon A. Blaitthin., Koyner L. Jay and Murray T. Patrick (2010). Urinary glutathione S-transferase in the pathogenesis and diagnostic evaluation of acute kidney injury following cardiac surgery: a critical review. *Curr. Opin. Crit. Care.*, 16(6), 550-555.
- Rafati-Rahimzadeh M., Rafati-Rahimzadeh M., Kazemi S. and Moghadamnia A. (2014). Current Approaches of the management of mercury poisoning: need of the hour. *DARVU*. 22 (1); 46.
- Mela M., Neto F. F., Grötzner S.R., Rabitto I. S., Ventura D. F. & Oliveira Ribeiro C.A. (2012). Localization of inorganic and organic mercury in the liver and kidney *Cyprinus carpio* by autometallography. *J. Braz. Soc. E.*, 7(2), 73-78.
- Miura Kyoko., Inokawa Masae., Imura Nobumasa (1984). Effects of methylmercury and some metal ions on microtubule networks in mouse glioma and in vitro tubulin polymerization. *Tox. Appl Pharm.*, 73, 218-231.
- Navarro Moreno L. G. (2004). Proteínas de los Cuerpos de Inclusión y la Susceptibilidad Renal Hacia La Intoxicación Con Plomo. CINVESTAV. Tesis Doctoral.
- Navarro-Alarcón M. & López-Martínez M.C. (2000). Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci. Total Environ.*, 249, 347-371.
- Nebert, W., D., Vasiliou, & Vasilis. (2004). Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Human Genomics*, 1(6), 460-464.
- Nylander M, Weiner J. (1991). Mercury and Selenium concentrations and their interrelations in organs from dental staff and the general population. *Br. J. Ind. Med.* 48(11), 729-734.
- Joseph P. D. (2010). Genetic Variations in Human Glutathione Transferase Enzymes: Sig. for Pharm. and Tox. *Human Genomics and Proteomics*. 1-14.
- Pérez Gastell P. L. & Pérez de Alejo J. L. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev. Cubana Med. Millit.*, 29(3), 192-198.
- Piotrowski J. K., Trojanowska B., Wisniewska-Knypil J.M., Bolanowska W. (1974). Mercury binding in the kidney and liver of rats repeatedly exposed to mercuric chloride. *Tox. Appl Pharm.*, 27, 11-19.
- Planas-Bohne F. (1981). The influence of chelating agents on the distribution and biotransformation of methylmercuric chloride in rats. *J. Pharm. Exp Ther.* 217 (2) 500-504.
- Poma A. Pedro (2008). Intoxicación por plomo en humanos. *An. Fac. Med.*, 69(2), 120-126.
- Prasad S. A. (2012). Discovery of human zinc deficiency: 50 years later. *J. Trace Elem. in Med. and Biol.*, 26(2-3), 66-69.
- Prasad S. A. (2013). Discovery of Human Zinc Deficiency: Its Impact on Human Health and Disease. *Adv. Nutr.* 4(2), 176-190. (b)

Prasad S. A. (2014). Zinc: An antioxidant and anti-inflammatory agent: Role of zinc in degenerative disorders of aging. *J. Trace Elem. in Med. and Biol.*, 28, 354-371. (c)

Puertollano A. M., Puertollano E., Álvarez de Cienfuegos G. and Pablo M. A. (2011). Dietary antioxidants: immunity and host defense. *Curr. Top Med. Chem.*, 11(14), 1752-1766.

Rafati-Rahimzadeh M., Rafati Rahimzadeh M., Moghadamnia A.A (2013). Arsenic compounds toxicity. *J. of B. Univ. of Med. Sc. (JBUMS)*. 15; 2, 51-68.

Rahman Khalid (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging* 2(2) 219-236.

Rahman Mostafizur Md., Binte Hossain Kaniz Fatima., Banik Subrata., Sikder Tajuddin Md., Akter Mahmuda., Corpus Bondad Serene Ezra., Rahaman Md. Rahaman., Hosokawa Toshiyuki., Saito Takeshi., Kurasaki Masaaki. (2019). Selenium and zinc protections against metal-(loids) induce toxicity and disease manifestations: A review *Ecotoxicol. Environ. Safety* 168: 149-163.

Ramírez Álvarez J. A., Castro Díaz J., Alatorre E. W. R. (2000). Diagnóstico del Mercurio en México.

Ramírez Augusto (2008). Intoxicación ocupacional por mercurio. *An. Fac. Med.*, 69(1), 46-51.

Ramírez V. A. (2005). El cuadro clínico de la intoxicación ocupacional por plomo. *An. Fca. Med.*, 66(1), 57-70.

Rayman M. P. (2000). The importance of selenium to human health. *Lancet.*, 356(9225), 233-241.

Rehman Kanwal, Fátima Fiza, Waheed Iqra, Sajid Hamid Akash Muhammad (2017). Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J. F. Cel. Biochem.*

Reyes Echeverría María Cruz (2009). Estudio de la toxicidad aguda del POLI-1 sobre hígado, riñón y sistema inmune". Tesis de Maestría.

Rice M. K., M. Walker Jr E., Wu M., Gillette C. and R. Bloug E. (2014). Environmental Mercury and Its Toxic Effects. *J. Prev. Med. Public. Health*, 47, 74-83.

Roels HA., Boeckx M., Ceulemans E., Lauwerys RR. (1991). Urinary excretion of mercury after occupational exposure to mercury vapour and influence of the chelating agent meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA). *B. J. of Ind. Med.* 48, 247-253.

Sanin Luz Helena., Guevara Rosa María. (2006). El cuidado de la salud, sin daño: EL CASO DEL MERCURIO. Synthesis.

Santos-Santos E., Yarto-Ramírez M., Gavilán-García I., Castro-Díaz J., Gavilán-García A., Rosiles R., Suárez S. y López-Villegas T. (2006). Analysis of arsenic, lead and mercury in farming areas with mining contaminated soils at Zacatecas, Mexico. *J. Mex. Chem. Soc.* 50, 57-63.

Sasakura, C, Suzuki, T (1998). Biological interactions between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein. P.J. Inorg. Biochem. 71: 159-162.

Schweizer Ulrich., Bräver Anja U., Köhrle., Nitsch Robert., Savaskan E. Nicolai. (2004). Selenium and brain function: a poorly recognized liaison Brain Research Reviews. 45 (3), 164-178.

Sherratt J. P. and Hayes J. D. (2001). Glutathione S-transferase in Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics. Ed. By. Costas I. 319-352.

Shimojo N., Kumagai Y., Nagatsuma J., (2002). Difference between kidney and liver in decreased manganese superoxide dismutase activity caused by exposure of mice to mercuric chloride. Arch. Toxicol. 76: 383-387.

Skoog. West. Holler. Crouch. (2004). Fundamentos de Química Analítica (octava edición ed.). Brooks Cole.

Spiller A. Henry. (2017). Rethinking mercury: the role of selenium in the pathophysiology of mercury toxicity. Clin. Tox.

Stefanidou M., Maravelias C., Dona A., Spiliopoulou (2006). Zinc: a multipurpose trace element. Arch. Tox., 80, 1-9.

Takatera Kikuo., Osaki Nobukazu., Yamaguchi Hiroyoshi and Watanabe Tadashi (1994). HPLC /ICP Mass Spectrometric Study of the Selenium Incorporation into Cynobacterial Metallothionein Induced under Heavy-Metal Stress. Anal. Sc. August, Vol. 10.

Tamayo Juan A., Orozco y Lastiri Quirós Santiago H. (2016). La enfermedad renal crónica en México, hacia una política nacional para enfrentarla. Academia Nacional de Medicina de México (ANMM).

Tapiero H., Townsend D.M., Tew K. D. (2003). The antioxidant role of selenium and seleno- compounds. Biom. & Pharm.. 57, 134-144.

Tchounwou Paul B., Yedjou G. Clement., Patlolla K. Anita and Sutton J, Dwayne (2012). Heavy Metal Toxicity and the Environment. A. Luch (ed.). Mol. Clin. and Env. Tox.

Terrés Martos Carmen (1999). Determinación de los niveles de zinc en alimentos, suelos y bebidas del área de motril. Evaluación de su ingesta en la dieta. Tesis Doctoral.

Tonomura Yutaka., Tsuchiya Noriko., Torii Miki., Uehara Takeki (2010). Evaluation of the usefulness of urinary biomarkers for nephrotoxicity in rats. Tox., 273, 53-59.

Toxicología Fundamental. (1988). Científico Médica, 6, 180.

Toxicological profile for mercury (update). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1999). (ATSDR).

Trejo-Acevedo A., Díaz-Barriga F., Carrizales L., Domínguez G., Costilla R., Ize-Lema I., Yarto-Ramírez M., Gavilán-García A., Mejía-Saavedra J.J. y Pérez-Maldonado I.N. (2009). Exposure assessment of persistent organic pollutants and metals in Mexican Children. Chem. 74, 974-980.

Valderas J. J., Mejías P. Ma. Emilia., Riquelme R. J., Aedo S. K., Aros A. Sofía., Barrera Q. Fco. (2013). Intoxicación familiar por mercurio elemental. Caso Clínico. *Revista chilena de pediatría*, 84(1), 72-79.

Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1-40.

Velasco-González O.H., Echavarría-Almeida S., Pérez- López M.E. y Villanueva-Fierro I. (2001). Contenido de mercurio y arsénico en atún y sardinas enlatadas mexicanas. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 17, 31-35.

Verkman A. S. (1992). Water channels in cell membranes. *Annu Rev. Physiol*, 54, 97-108.

Watanabe Chiho (2002). Modification of mercury toxicity by selenium: Practical Importance? (Review). *Tohoku. J. Exp. Med.*, 196, 71-77.

Woods JS., Calas CA., Aicher LD., Robinson BH y Mailer C (1990). Stimulation of porphyrinogen oxidation by mercuric ion. I. Evidence of free radical formation in the presence of thiols and hydrogen peroxide. *Mol. Pharm.*, 38, 253-260.

Yoneda S., Suzuki KT (1997). Detoxification of mercury by selenium by binding equimolar Hg-Se complex to a specific plasma protein. *Toxicol. Appl. Pharm.* 143-80.

Zahir Farhana., J. Rizwi Shamin., K. Haq Soghra., H. Khan Rizwan (2005). Low dose mercury toxicity and human health. 20, 351-360.

Zalups, Rudolfs K., & Bridges, C. C. (2012). Relationships between the renal handling of DMPS and DMSA and the renal handling of mercury. *Chem. R. in Tox.* 25, 1825-1838.

Zalups R. K. (2017). Molecular Interactions with Mercury in the Kidney. *Pharm. Rev.*, 52(1) 113-143.

Zetina-Rodríguez M.C. (2012). La historia de un tesoro que se convirtió en un desastre ambiental, la Zacatecana, ejido de Guadalupe. *RCSL*. 4, 160-194.

Zhang Yuexuan., Yu Zhiling., Fu Xinrong and Liang Chun (2002). NOC3P, a bHLH Protein, play an Integral Role in the Initiation of DNA Replication in Budding Yeast. *Cell*, 109(7), 849-860.

