



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

Efecto de la exposición a Mercurio y Cadmio en la actividad de la enzima Glutación S-Transferasa de las especies *Hafnia Alvei*, *Candida Parapsilosis*, *Penicillium sp* & *Rattus Norvegicus* (Wistar).

TESIS

**Maestría en Ciencias
Químicas**

P R E S E N T A:

BRANDON ALBERTO PULIDO HERNÁNDEZ

Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno

Director de Tesis

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA, 2022



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

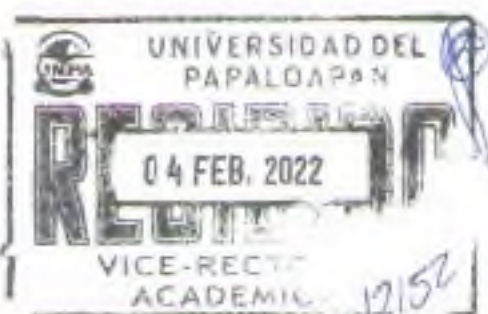
OFICIO	DEP-MCQ/2022/12
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 04 de febrero de 2022

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
VICE-RECTOR ACADÉMICO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas del **C. Brandon Alberto Pulido Hernández**, con número de **Matrícula 18130008**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **"Efecto de la exposición a Mercurio y Cadmio en la actividad de la enzima Glutación S-Transferasa de las especies Hafnia Alvei, Candida Parapsilosis, Penicillium sp y Rattus Norvegicus (Wistar)**, para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes



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

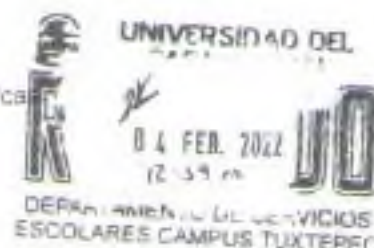
Dr. José Abad Zavaleta
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Brandon Alberto Pulido Hernández – Estudiante
C.c.p. Dra. Leticia Guadalupe Martínez Navarro – Director de Tesis
C.c.p. Dr. Erick Adrian Juárez Arellano – Coordinador de la maestría en Ciencias Químicas
C.c.p. M.E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares
C.c.p. Archivo

Recibi 04/02/2022

10/03/2022



CAMPUS TUXTEPEC
C. Circunvalar No. 200, Col. Parque Industrial
C.P. 68301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(257)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Torreyerri S/N, Ciudad universitaria
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(257)8779330



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2021/254
ASUNTO	Jurado de examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 14 de diciembre de 2021

C. BRANDON ALBERTO PULIDO HERNÁNDEZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas estará integrado por los siguientes investigadores.

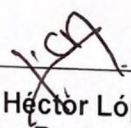
Dr. Enrique Villalobos Amador	Universidad del Papaloapan
Dr. Oscar A. Ramírez Marroquín	Universidad del Papaloapan
Dra. Leticia G. Navarro Moreno	Universidad del Papaloapan
Dr. Edgar García López	Universidad del Papaloapan
Dra. Martha E. Poisot Vázquez	Universidad del Papaloapan

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

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


Dr. José Abad Zavaleta
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado




M. en C. Héctor López Arenal
Vice-Rector Académico
Vo. Bo.



C.c.p. Dra. Leticia G. Navarro Moreno – director de tesis
C.c.p. Dr. Aurelio Hernandez Ramirez – Coordinador de Maestría en Ciencias Químicas
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo


CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Ed. Parque Industrial,
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240
DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES CAMPUS TUXTEPEC

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

Cuando se observa el registro fósil, se ve claramente que algunos organismos presentan notables similitudes anatómicas, mientras que otros tienen marcadas diferencias. Hay una especie de árbol taxonómico de la evolución que se ha ido elaborando minuciosamente desde hace más de un siglo. Pero en la época actual, es posible buscar fósiles químicos, estudiar la bioquímica de organismos vivos, e incluso se empieza a saber algo de la bioquímica de organismos extinguidos, porque parte de esa materia orgánica puede ser recuperada pese a todo. Y aquí hay una correlación notable entre lo que dicen los anatomistas y los biólogos moleculares. A saber, que la estructura de los huesos de los chimpancés y los humanos es asombrosamente similar y, del mismo modo, sus moléculas de hemoglobina son asombrosamente similares. Sólo un aminoácido entre varios centenares diferencia la hemoglobina de chimpancés y humanos.

De hecho, cuando observamos la vida en la Tierra de un modo más genérico, encontramos que todo es el mismo tipo de vida. No hay muchas clases diferentes; solo hay una, que utiliza unos cincuenta bloques de construcción biológica fundamentales.

Así pues, con significantes excepciones, todos los organismos de la Tierra recurren a un tipo de molécula particular, llamada proteína, como catalizador o enzima para controlar el grado de funcionamiento y la dirección de la química de la vida. Todos los organismos de la Tierra emplean un tipo de molécula llamada ácido nucleico para codificar la información hereditaria y reproducirla en la siguiente generación. Todos los organismos de la Tierra poseen un libro de códigos idéntico para traducir el lenguaje del ácido nucleico al lenguaje de la proteína y, aunque hay algunas diferencias evidentes entre, digamos, el moño y yo, en lo esencial, estamos muy emparentados. La lección es: no hay que juzgar por la apariencia. Desde el punto de vista molecular, todos somos prácticamente iguales.

Eso plantea interesantes preguntas sobre si tenemos idea de las variedades posibles de la vida y de lo que podría haber en otra parte. Estamos atrapados en un único modelo y no tenemos imaginación suficiente para intuir siquiera otras maneras en que pudiera darse la vida, cuando podrían existir miles o millones de formas.....

Carl Sagan

La diversidad de la Ciencia

Una visión personal de la búsqueda de Dios.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer, antes que nada, a la **Universidad del Papaloapan**, por acogerme en su seno y permitirme desarrollar en él.

A **CONACYT**. Por el apoyo sustancial durante el periodo de estudio de la Maestría.

A la **Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno**, “La maestra más mala del mundo” y “La mamá de los pollitos” por darme la oportunidad de trabajar bajo su tutela, por brindarme sus consejos y conocimientos, su comprensión, su dureza, y por remar juntos contra corriente. Entramos a este proyecto buscando algo y desarrollamos otra cosa: un trabajo sorprendente en su propia naturaleza. Le prometo que el sueño de desarrollarme en la difusión de la ciencia no muere aquí. Gracias Dra.

A mis sinodales: Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín, Dr. Octavio Silva. Por seguir de cerca el desarrollo del proyecto. A los doctores Enrique Villalobos Amador, Edgar García López, Martha E. Poisot Vázquez, por sus acertadas observaciones, sugerencias, y por ayudar a que mi trabajo mejorase sustancialmente.

A mis compañeros y amigos de la maestría: Jared, Omegui, y en especial a Sam, Marquinhos, Cheyta y Abi. El sendero ha sido duro y escarpado, pero si de algo he de tener fe, es en que todos cumpliremos nuestras metas y sueños.

A mi grupo de laboratorio de bioquímica: mis amigos, “el squad de ratas y microorganismos” A Josephcito, Deivis, Mirthchi, Joaco’s, Jéc, Sari y Lipe. Podría escribir un libro completo contando todas nuestras aventuras. He de remitirme a decir que los quiero mucho. Espero ni la distancia ni el tiempo rompa nuestra amistad.

A Darukita, Kokorito. Mujercita Volcánica: porque en poco tiempo te volviste pilar de mi vida e impulsora de mis sueños. Por creer en mí y apoyarme, por brindarme tu cariño, tu poder, por dejarme conocerte y por desnudarme de mí.

A mi familia: Mi Joven Trueno, con sus destellos de plata y ojos de sol. Por tener la paciencia que brinda tu cariño a este proyecto de vida mío. Sé que te he hecho esperar, te prometo que no será en vano. A mi Ma, si acaso alguien siempre ha estado orgullosa de mí, y me ha apoyado, esa eres tú, porque tu Amor es más intenso que las estrellas y más cálido que la flor. A mi “Jefa del Departamento de Crédito Cañero”. Porque siempre serás mi manita chiquita, y siempre serás “la mayor” No puedo ni expresar lo orgulloso que me siento cuando hablo de ti, espero poder hacerte sentir orgullosa yo también. Los Amo tanto. Gracias a Todos.

DEDICATORIA

*A la **FUERZA UNA**.
Directora del flujo energético del universo.*

*A mi tío Pablo Pulido
"Que tu Luz refleje L.V.X. en el espejo del universo"
Te Quiero tío*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
DEDICATORIA	6
LISTA DE TABLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
ABREVIACIONES	15
RESUMEN	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN	18
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO's)	19
2.2 SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	21
2.3 GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST)	23
2.3.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES, CLASIFICACIÓN Y PRESENCIA DE GST EN DISTINTOS ORGANISMOS.	23
2.3.2 VERSATILIDAD METABÓLICA DE LA ENZIMA GST	26
2.3.2.1 FASE II DEL METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS	27
2.3.2.2 RELACION GST - INTOXICACIÓN CON METALES PESADOS.	29
2.3.2.3 GST Y SU PAPEL EN EL CÁNCER.....	30
3. ANTECEDENTES.....	32
3.1 METALES PESADOS	32
3.1.1 METALES PESADOS Y MEDIO AMBIENTE	32
3.1.1.1 PRESENCIA DE METALES PESADOS EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS DE LA REGIÓN DEL PAPALOAPAN.	34
3.1.2 METALES PESADOS Y SU EFECTO EN EL METABOLISMO	35
3.1.3 METALES PESADOS Y ERO's.....	36
3.1.4 MERCURIO	37
3.1.5 CADMIO	38
3.1.5.1 CADMIO Y ESTUDIOS CON ERO'S	38
3.2 ANTECEDENTES DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA	40
3.2.1 GST Y SU PAPEL EN EL ESTRÉS OXIDATIVO	41
3.2.1.1 ANTECEDENTES DIRECTOS POR EL GRUPO DE BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN	42
3.2.2 PAPEL DE LA GST EN DIFERENTES ESPECIES.	43
3.2.2.1 <i>Candida Parapsilosis</i>	44
3.2.2.2 <i>Penicillium sp</i>	45
3.2.2.3 <i>Rattus Norvegicus</i> (Wistar)	45
3.2.2.4 <i>Hafnia Alvei</i>	47
4. JUSTIFICACIÓN.....	48
5. HIPÓTESIS	48
6. OBJETIVOS	49
6.1 GENERAL:	49
6.2 ESPECÍFICOS:	49

7. METODOLOGÍA.....	50
7.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES TOLERANTES E INHIBITORIAS DE Hg Y Cd EN LAS ESPECIES DE ESTUDIO.	50
7.1.1 <i>Hafnia Alvei</i> & <i>Candida Parapsilosis</i>	51
7.1.2 <i>Penicillium sp.</i>	52
7.1.3 <i>Rattus Norvegicus</i> de la cepa Wistar	52
7.2 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.	52
7.3 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL POR EL MÉTODO DE LOWRY (MODIFICADO POR NAVARRO-MORENO, 1999)	53
7.4 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA.	54
7.5 CUANTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.	55
7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56
7.7 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	56
8. RESULTADOS Y DISCUSION	57
8.1 <i>HAFNIA ALVEI</i>	57
8.1.1 CRECIMIENTO RADIAL DE <i>Hafnia Alvei</i> EXPUESTA A $HgCl_2$ & $CdCl_2$	57
8.1.1.1 SELECCIÓN DE CONCENTRACIONES TOLERANTES E INHIBITORIAS DE MP EN <i>Hafnia Alvei</i>	61
8.1.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Hafnia Alvei</i>	62
8.1.3 <i>Hafnia Alvei</i> – ANÁLISIS BIOQUÍMICOS: ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's.....	63
8.1.3.1 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's Cd-T0, T10 & T120 (HORAS)	64
8.1.3.2 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN DE ERO's-Cd EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN.....	66
8.1.3.3 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN DE ERO's-Cd EN FUNCIÓN DEL TIEMPO	67
8.1.3.4 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's Hg-T0, T10 y T120	70
8.1.3.5 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST & PRODUCCIÓN ERO's-Hg EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN	71
8.1.3.6 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST PRODUCCIÓN ERO's-Hg EN FUNCIÓN DEL TIEMPO	72
8.1.3.7 ANÁLISIS <i>Hafnia Alvei</i> -MP- PRODUCCIÓN ERO's-ACTIVIDAD GST	74
8.2 <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i>	75
8.2.1 CRECIMIENTO RADIAL DE <i>Candida Parapsilosis</i> EXPUESTA A $HgCl_2$ & $CdCl_2$	75
8.2.1.1 SELECCIÓN DE CONCENTRACIONES TOLERANTES E INHIBITORIAS DE MP EN <i>Candida Parapsilosis</i>	78
8.2.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Candida Parapsilosis</i>	78
8.2.3 <i>Candida Parapsilosis</i> – ANÁLISIS BIOQUÍMICOS: ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's	79
8.2.3.1 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's Cd-T0, T10 y T56 (HORAS)	79
8.2.3.2 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST & PRODUCCIÓN ERO's-Cd EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN	81
8.2.3.3 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST & PRODUCCIÓN ERO's-Cd EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.....	82
8.2.3.4 ACTIVIDAD GST Y CUANTIFICACIÓN ERO's Hg-T0, T10 & T56 (HORAS).....	84
8.2.3.5 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST, PRODUCCIÓN ERO's-Hg EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN.....	86
8.2.3.6 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST, PRODUCCIÓN ERO's-Cd EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.....	88
8.2.3.7 ANÁLISIS MP- <i>Candida Parapsilosis</i> - ERO's-GST	89
8.3 <i>PENICILLIUM SP</i>	90
8.3.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Penicillium sp</i> & DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES TOLERANTES E INHIBITORIAS DE $HgCl_2$ & $CdCl_2$	90
8.3.2 <i>Penicillium sp</i> – ANÁLISIS BIOQUÍMICOS: ACTIVIDAD GST Y CUANTIFICACIÓN ERO's	93
8.3.2.1 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's Cd-T18 (DÍAS)	94
8.3.2.2 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's Hg-T18 (DÍAS).....	94
8.4 <i>RATTUS NORVEGICUS (WISTAR)</i>	96
8.4.1 TRATAMIENTO & ANÁLISIS DE <i>Rattus Norvegicus (Wistar)</i> A $HgCl_2$ & $CdCl_2$	96

8.4.2 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS DE <i>Rattus Norvegicus</i> (Wistar) TRATADAS CON CdCl_2	97
8.4.2.1 PESO DE ROEDORES CdCl_2	97
8.4.2.2 EXAMEN GENERAL DE ORINA (EGO) EN RATAS Wistar- CdCl_2	98
8.4.2.3 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's -Cd-CEREBRO	100
8.4.2.4 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's -Cd-HÍGADO	101
8.4.2.5 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's -Cd-RIÑÓN	103
8.4.3 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS DE <i>Rattus Norvegicus</i> (Wistar) TRATADAS CON HgCl_2	105
8.4.3.1 PESO DE ROEDORES HgCl_2	105
8.4.3.2 EXAMEN GENERAL DE ORINA (EGO) EN RATAS Wistar- HgCl_2	106
8.4.3.3 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's -Hg-CEREBRO	107
8.4.3.4 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's -Hg-HÍGADO	109
8.4.3.5 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's -Riñón - Hg	111
9. CONCLUSIONES	115
10. PERSPECTIVAS	116
11. BIBLIOGRAFÍA	117
12. ANEXO	135
12.1 TABLAS ESTADÍSTICAS	135
12.1.1 <i>Hafnia Alvei</i> – CdCl_2	135
12.1.2 <i>Hafnia Alvei</i> – HgCl_2	137
12.1.3 <i>Candida Parapsilosis</i> – CdCl_2	140
12.1.4 <i>Candida Parapsilosis</i> – HgCl_2	142
12.1.5 <i>Penicillium sp</i> – CdCl_2	145
12.1.5 <i>Penicillium sp</i> – HgCl_2	146
12.1.5 <i>Rattus Norvegicus</i> – CdCl_2	146
12.1.6 <i>Rattus Norvegicus</i> – HgCl_2	150
12.2 TRABAJOS DERIVADOS DEL PROYECTO DE TESIS	154
12.2.1 Participación en el XXVII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica (Ponente y Memorias)	154
12.2.2 Participación en el V Encuentro Regional de Investigación Multidisciplinaria (Ponente y Memorias)	155
12.2.3 Participación en el Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Hidalgo 2020 (Ponente, Memorias & Capítulo de Libro)	156

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clases de GST en cuatro especies de organismos (Fuente: Mannervik, 2005; Sherrat, 2002.) ^{28,29}	24
Tabla 2. Límites máximos permisibles de concentración de metales pesados (Hg, As, Cd y Pb) en agua, suelo y alimentos de consumo humano. Fuente: Codex, 1995; UE, 2016. ⁶²	34
Tabla 3. Determinación de MP en fuentes hídricas de la región de San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca.	35
Tabla 4. Especies a utilizar para la realización del estudio bioquímico.	50
Tabla 5. Diámetros de inhibición de <i>Hafnia Alvei</i> generados por las concentraciones de HgCl ₂ y CdCl ₂	58
Tabla 6. Halos de inhibición generados por HgCl ₂ en <i>Hafnia alvei</i>	59
Tabla 7. Halos de inhibición generados por CdCl ₂ en <i>Hafnia alvei</i>	59
Tabla 8. Límites máximos permisibles de concentración de metales pesados en agua y suelo. Fuente: Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. ¹¹⁸	60
Tabla 9. Concentraciones seleccionadas para el análisis de la actividad de la GST y la cuantificación de ERO's en <i>Hafnia alvei</i>	61
Tabla 10. Diámetros de inhibición de <i>Candida Parapsilosis</i> generados por las concentraciones de HgCl ₂ y CdCl ₂	76
Tabla 11. Halos de inhibición generados por HgCl ₂ en <i>Candida Parapsilosis</i>	77
Tabla 12. Halos de inhibición generados por CdCl ₂ en <i>Candida Parapsilosis</i>	77
Tabla 13. Concentraciones seleccionadas para el análisis de la actividad de la GST y la cuantificación de ERO's en <i>C. Parapsilosis</i>	78
Tabla 14. Tratamientos por MP a Ratas de la cepa Wistar	96
Tabla 15. Análisis realizados por tratamientos	97
Tabla 16. Peso corporal de las ratas Wistar. Comparación entre semanas. Primer bloque correspondiente al grupo control. Segundo bloque correspondiente al tratamiento con CdCl ₂ (n=6).	97
Tabla 17. Análisis EGO para muestras de orina-Tratamientos CdCl ₂ (n=6).	99
Tabla 18. Peso corporal de las ratas Wistar. Comparación entre semanas. Primer bloque correspondiente al grupo control. Segundo bloque correspondiente al tratamiento con HgCl ₂ (n=6).	106
Tabla 19. Análisis EGO para muestras de orina-Tratamientos HgCl ₂ (n=6).	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Respuesta celular ante la formación de ERO's causada por estímulos fisiológicos y factores estresantes...	21
Figura 2. Estructura química del GSH, formado por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. Los enlaces en rojo representan los enlaces peptídicos.....	22
Figura 3. Posible patrón de divergencia en la superfamilia GST.	25
Figura 4. (a) Clase Alfa humana, (b) clase Pi humana, (c) clase Mu de rata, (d) clase theta humana. Las subunidades se distinguen por el color (verde y azul). Los residuos de tirosina o serina catalíticamente esenciales se representan en el modo de relleno del espacio y se resaltan en amarillo, mientras que el ligando con el que la enzima se co-cristalizó se muestra en rojo, lo que identifica la ubicación del sitio activo. Las características específicas de las estructuras Alfa y Mu se muestran en negro.	25
Figura 5. Estructuras tridimensionales de subunidades GST individuales. (a) clase Sigma de calamar, (b) clase Omega humana, (c) clase Beta bacteriana (<i>Proteus mirabilis</i>) y (d) <i>Fasciola hepática</i> clase Mu. El dominio N-terminal 1 es de color azul, mientras que el dominio C-terminal 2 es rojo. Los residuos catalíticamente esenciales (tirosina en a y d; cisteína en b y c) son de color amarillo y se presentan en modo de relleno de espacio, mientras que los ligandos con los que la proteína se co-cristalizó se muestran en verde. Las hebras de enlace que conectan los dos dominios se muestran en violeta.	26
Figura 6. Estructuras representativas de moléculas electrófilas que pueden servir como sustratos: a) Haluro de arilo, b) epóxido, c) cetona α , β -insaturada, d) haluro de alquilo, e) alqueno, f) y g) compuestos con grupos nitro. ..	27
Figura 7. Reacción bioquímica catalizada por la enzima Glutatión S-transferasa, usando como sustrato al 1-cloro-2,4-dinitroclorobenceno (DNCB)..	28
Figura 8. Diagrama de reacción para la adición nucleofílica de GS ⁻ a 1-cloro-2,4-dinitroclorobenceno.....	29
Figura 9. Fuentes de contaminación por metales pesados en aire, suelo, agua y plantas.....	33
Figura 10. Esquema que ilustra las vías de la toxicidad neuronal causada por la exposición al cadmio.....	39
Figura 11. Estructuras de los Benzopirenos y Nitros aminas metiladas. Moléculas potencialmente carcinogénicas. .	41
Figura 12. Árbol filogenético que comprende las distintas especies establecidas en los tres dominios, Bacteria, Arquea y Eucaria. Los organismos de estudio comprenden el dominio Bacteria (<i>Hafnia alvei</i>) y Eucaria (<i>Candida Parapsilosis</i> , <i>Penicillium sp</i> y ratas Wistar).	50
Figura 13. Representación de las técnicas de sembrado por estría y por expansión.....	51
Figura 14. Mecanismo general del proceso de la reacción del método de Lowry.	53
Figura 15. Esquema general de la reacción del Malondialdehído y el ácido tiobarbitúrico..	55
Figura 16. Diámetros de inhibición de <i>Hafnia alvei</i> generados por las concentraciones de HgCl ₂ (izquierda) y CdCl ₂ (derecha).....	58
Figura 17. Halos de inhibición generados por CdCl ₂ en <i>Hafnia alvei</i> (experimento 2). Asignación: 1=14mM, 2=12mM, 3=10mM, 4=8mM y 5=7mM.	60
Figura 18. Cinética de Crecimiento en CN de <i>Hafnia alvei</i> : Izquierda - Espectrofotometría UV-Vis- a 560nm/Derecha – Conteo de microorganismos en Cámara Neubauer.....	62
Figura 19. Cinética de Crecimiento en M-H de <i>Hafnia alvei</i> : Izquierda - Espectrofotometría UV-Vis- a 560nm/Derecha – Conteo de microorganismos en Cámara Neubauer.....	63
Figura 20. Actividad GST y producción ERO's en <i>Hafnia Alvei</i> – T0 sometida a tratamientos de CdCl ₂ : T0CCd= Control, T0[-]Cd= 7mM, T0[+]Cd= 8mM (n=9).....	64
Figura 21. Actividad GST y producción ERO's en <i>Hafnia Alvei</i> – T10 sometida a tratamientos de CdCl ₂ : T10CCd= Control, T10[-]Cd= 7mM, T10[+]Cd= 8mM (n=9)	65
Figura 22. Actividad GST y producción ERO's en <i>Hafnia Alvei</i> – T120 sometida a tratamientos de CdCl ₂ : T120CCd= Control, T120[-]Cd= 7mM, T120[+]Cd= 8mM (n=9)	65

- Figura 23. Actividad GST en *Hafnia Alvei* – Comparativo en Función de la Concentración de CdCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T120). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo las distintas concentraciones de CdCl_2 utilizadas.....66
- Figura 24. Cuantificación ERO's en *Hafnia Alvei* – Comparativo en Función de la Concentración de CdCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T120). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo las distintas concentraciones de CdCl_2 utilizadas.....67
- Figura 25. Actividad GST en *Hafnia alvei* – Comparativo en Función del tiempo (CdCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo los distintos tiempos utilizados.68
- Figura 26. Cuantificación ERO's en *Hafnia alvei* – Comparativo en Función del tiempo (CdCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo los distintos tiempos utilizados. 68
- Figura 27. Reacción catalizada por GST utilizando GSH para inactivar HNE, producto tóxico de la peroxidación de lípidos. Modificado de Valko, M. *et al.*²²⁹69
- Figura 28. Actividad GST y producción ERO's en *Hafnia Alvei* – T0 sometida a tratamientos de HgCl_2 : T0CCd= Control, T0[-]Cd= 0.24mM, T0[+]Cd= 1.95mM (n=9)70
- Figura 29. Actividad GST y producción ERO's en *Hafnia Alvei* – T10 sometida a tratamientos de HgCl_2 : T10CCd= Control, T10[-]Cd= 0.24mM, T10[+]Cd= 1.95mM (n=9)70
- Figura 30. Actividad GST y producción ERO's en *Hafnia Alvei* – T120 sometida a tratamientos de HgCl_2 : T120CCd= Control, T120[-]Cd= 0.24mM, T120[+]Cd= 1.95mM (n=9)71
- Figura 31. Actividad GST en *Hafnia Alvei* – Comparativo en Función de la Concentración de HgCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T120). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo las distintas concentraciones de HgCl_2 utilizadas.....71
- Figura 32. Cuantificación ERO's en *Hafnia Alvei* – Comparativo en Función de la Concentración de HgCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T120). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo las distintas concentraciones de HgCl_2 utilizadas.....72
- Figura 33. Actividad GST en *Hafnia Alvei* – Comparativo en Función del tiempo (HgCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo los distintos tiempos utilizados.72
- Figura 34. Cuantificación ERO's en *Hafnia Alvei* – Comparativo en Función del tiempo (HgCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo los distintos tiempos utilizados. 73
- Figura 35. Diámetros de inhibición de *Candida Parapsilosis* generados por las concentraciones de HgCl_2 (izquierda) y CdCl_2 (derecha).....76
- Figura 36. Cinética de Crecimiento en Sabouraud de *Candida Parapsilosis*: Izquierda - Espectrofotometría UV-Vis/Derecha – Conteo de microorganismos en Cámara Neubauer.78
- Figura 37. Actividad GST y producción ERO's en *Candida Parapsilosis* – T0 sometida a tratamientos de CdCl_2 : T0CCd= Control, T0[-]Cd= 0.33mM, T0[+]Cd= 0.67mM (n=9)80
- Figura 38. Actividad GST y producción ERO's en *Candida Parapsilosis* – T10 sometida a tratamientos de CdCl_2 : T10CCd= Control, T10[-]Cd= 0.33mM, T10[+]Cd= 0.67mM (n=9)80
- Figura 39. Actividad GST y producción ERO's en *Candida Parapsilosis* – T56 sometida a tratamientos de CdCl_2 : T56CCd= Control, T56[-]Cd= 0.33mM, T56[+]Cd= 0.67mM (n=9)80

- Figura 40. Actividad GST en *Candida Parapsilosis* – Comparativo en Función de la Concentración de CdCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T56). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo las distintas concentraciones de CdCl_2 utilizadas.....81
- Figura 41. Cuantificación ERO's en *Candida Parapsilosis* – Comparativo en Función de la Concentración de CdCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T56). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo las distintas concentraciones de CdCl_2 utilizadas.....82
- Figura 42. Actividad GST en *Candida Parapsilosis* – Comparativo en Función del tiempo (CdCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo los distintos tiempos utilizados.....83
- Figura 43. Cuantificación ERO's en *Candida Parapsilosis* – Comparativo en Función del tiempo (CdCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo los distintos tiempos utilizados. 83
- Figura 44. Actividad GST y producción ERO's en *Candida Parapsilosis* – T0 sometida a tratamientos de HgCl_2 : T0CCd= Control, T0[-]Cd= 0.05mM, T0[+]Cd= 0.67mM (n=9)85
- Figura 45. Actividad GST y producción ERO's en *Candida Parapsilosis* – T10 sometida a tratamientos de HgCl_2 : T10CCd= Control, T10[-]Cd= 0.05mM, T10[+]Cd= 0.67mM (n=9)85
- Figura 46. Actividad GST y producción ERO's en *Candida Parapsilosis* – T56 sometida a tratamientos de HgCl_2 : T56CCd= Control, T56[-]Cd= 0.05mM, T56[+]Cd= 0.67mM (n=9)86
- Figura 47. Actividad GST en *Candida Parapsilosis* – Comparativo en Función de la Concentración de HgCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T56). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo las distintas concentraciones de HgCl_2 utilizadas.....87
- Figura 48. Cuantificación ERO's en *Candida Parapsilosis* – Comparativo en Función de la Concentración de HgCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T56). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo las distintas concentraciones de HgCl_2 utilizadas.....87
- Figura 49. Actividad GST en *Candida Parapsilosis* – Comparativo en Función del tiempo (HgCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo los distintos tiempos utilizados.....88
- Figura 50. Cuantificación ERO's en *Candida Parapsilosis* – Comparativo en Función del tiempo (HgCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo los distintos tiempos utilizados. 89
- Figura 51. Cinética de crecimiento de *Penicillium sp*-Hg91
- Figura 52. Crecimiento colonial de *Penicillium sp*. Izquierda: Control-18 días, Derecha: 0.75 mM HgCl_2 -18 días91
- Figura 53. Cinética de crecimiento de *Penicillium sp*-Cd.....92
- Figura 54. Crecimiento colonial de *Penicillium sp*. Izquierda: Control-18 días, Derecha: 0.75 mM CdCl_2 -18 días.....92
- Figura 55. Actividad GST y producción ERO's en *Penicillium sp* – T18 (días) sometido a tratamientos de CdCl_2 : T18CCd= Control, T18[-]Cd= 0.75mM, T18[+]Cd= 1.95mM (n=9)94
- Figura 56. Actividad GST y producción ERO's en *Penicillium sp* – T18 (días) sometido a tratamientos de HgCl_2 : T18CCd= Control, T18[-]Cd= 0.75mM, T18[+]Cd= 1.95mM (n=9)95
- Figura 57. Actividad GST y producción ERO's en cerebro de ratas Wistar sometidas a tratamientos de CdCl_2 (n=6) 101
- Figura 58. Actividad GST y producción ERO's en hígado de ratas Wistar sometidas a tratamientos de CdCl_2 (n=6) .103

Figura 59. Actividad GST y producción ERO's en riñón de ratas Wistar sometidas a tratamientos de CdCl_2 (n=6)....	104
Figura 60. Actividad GST en orina de ratas Wistar sometidas a tratamientos de CdCl_2 (n=6).....	104
Figura 61. Actividad GST y producción ERO's en cerebro de ratas Wistar sometidas a tratamientos de HgCl_2 (n=6)	109
Figura 62. Actividad GST y producción ERO's en Hígado de ratas Wistar sometidas a tratamientos de HgCl_2 (n=6).	110
Figura 63. Actividad de GST de los subgrupos del tratamiento HgCl_2 -1Sem en Hígado de ratas Wistar.....	111
Figura 64. Morfología de órganos. Imagen Izquierda: Hígado en estado normal. Imagen derecha: Hígado expuesto a Hg -3Sem. En ella se observa una pérdida de brillo, consistencia, y un aumento en la porosidad del tejido. Cambios asociados a la intoxicación por el metal.	111
Figura 65. Actividad GST y producción ERO's en Riñón de ratas Wistar sometidas a tratamientos de HgCl_2 (n=6)...	112
Figura 66. Producción de ERO's de los subgrupos del tratamiento HgCl_2 -1Sem en Riñón de ratas Wistar. 1S SubG1: Rata 1-4, 1S SubG2: Rata 5-6.....	112
Figura 67. Morfología de órganos. Imagen Izquierda: Riñón en estado normal. Imagen derecha: Riñón expuesto a Hg -3Sem. Se Observan protuberancias anormales asociadas a la intoxicación por el metal.	113
Figura 68. Imagen Izquierda: Actividad GST en orina de ratas Wistar sometidas a tratamientos de HgCl_2 (n=6). Imagen derecha: Actividad de GST de los subgrupos del tratamiento HgCl_2 -1Sem en orina de ratas Wistar. 1S SubG1: Rata 1-4, 1S SubG2: Rata 5-6	113

ABREVIACIONES

Glutación S-Transferasa (GST)
Metales Pesados (MP)
Estrés Oxidativo (EO)
Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's)
Cadmio (Cd)
Mercurio (Hg)
Cloruro de cadmio (CdCl_2 equivalente a Cd^{+2})
Cloruro de mercurio II (HgCl_2 equivalente a Hg^{+2})
Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC)
Agencia de Protección Ambiental de los EUA (USEPA)
Reacciones de óxido-reducción (Redox)
Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)
Enfermedad de Alzheimer (EA)
Enfermedad de las Neuronas Motoras (MND)
Superóxido dismutasa (SOD)
Cloruro de Mercurio (HgCl_2)
Ácido Tiobarbitúrico (TBA)
Malondialdehído (MDA)
Catalasa (CAT)
Glutación peroxidasa (GPX)
Glutación reducido (GSH)
Glutación peroxidasa (GPx)
Dinitroclorobenceno (DNCB)
4-Hidroxi-2-nonenal (HNE)
Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

RESUMEN

Los metales pesados son un grupo de elementos que resultan altamente contaminantes en los ambientes en los que se encuentren. Los organismos expuestos a metales pesados pueden presentar diversas patologías, desde daños mutagénicos y celulares hasta el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y cáncer. Resulta, por tanto, importante, el desarrollo de proyectos de investigación destinados a encontrar una manera de contrarrestar la toxicidad ejercida por estas especies químicas. La comprensión de los mecanismos destinados a combatir su toxicidad se hace fundamental para esta empresa. En particular, los mecanismos antioxidantes desempeñan un papel muy importante en contra de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, la forma más importante que tienen los metales pesados para ejercer daño celular. La enzima GST, presente en un gran número de especies, ha sido postulada como enzima de respuesta ante el estrés oxidativo inducido por metales pesados. Es por ello que en este proyecto de investigación se estudió la relación entre la exposición a metales pesados (Cd^{+2} y Hg^{+2}) en distintos organismos (*Hafnia alvei*, *Candida Parapsilosis*, *Penicillium sp* y ratas de la cepa Wistar), la producción de especies reactivas de oxígeno que estos elementos provocaron y la actividad de la enzima GST como respuesta a este nivel de intoxicación. Se determinaron las concentraciones tolerantes e inhibitorias para los microorganismos de estudio, y se realizaron cinéticas de crecimiento para evaluar los tiempos óptimos de exposición y medición de los análisis bioquímicos. En el caso de las ratas de la cepa Wistar se utilizó un sistema de exposición vía oral por un periodo de 4 semanas. Para todos estos organismos, se cuantificaron las ERO's a través del método de malondialdehído y se midió la actividad total de la enzima. En organismos como *H. Alvei* y *C. Parapsilosis*, expuestas a CdCl_2 y HgCl_2 , se encontraron relaciones ($\text{Cd(T120h)-H. Alvei}$ y $\text{Hg(T56h)-C. Parapsilosis}$) que indican la posible presencia del 4-hidroxi-2-nonenal (producto competidor del malondialdehído en la peroxidación de lípidos) y que explicaría la relación: aumento de actividad GST/decremento de ERO's, observada en los resultados. En *P. sp.* y en los sistemas MP-Hígado de ratas Wistar-ERO's-GST, se observó un aumento en la actividad enzimática que estableció la posibilidad de que la capacidad de respuesta de la enzima intervenga en mecanismos que actúen más allá de la respuesta a la producción de ERO's. En ratas de la cepa Wistar, además, se encontró que el daño ocasionado por los MP utilizados puede variar en función del órgano objetivo, siendo el cerebro el órgano menos afectado bajo este esquema de intoxicación, debido, posiblemente, a la barrera hematoencefálica como estructura de protección al paso de MP. Los resultados se mostraron enriquecedores respecto al papel de la GST en la defensa contra metales pesados, que nutren la visión de la enzima como mecanismo de respuesta ante la exposición a estas especies químicas. Sea por su capacidad antioxidante o por mecanismos subyacente en los cuales interviene para la protección de las distintas especies estudiadas. Las perspectivas que pueden plantearse derivadas de este proyecto resultan interesantes en aras de continuar ampliando el conocimiento sobre este fenómeno.

ABSTRACT

Heavy metals are a group of elements that are highly polluting in the environments in which they are found. Organisms exposed to heavy metals can present various pathologies, from mutagenic and cellular damage to the development of neurodegenerative diseases and cancer. It is therefore important to develop research projects aimed at finding a way to counteract the toxicity exerted by these chemical species. Understanding the mechanisms designed to combat its toxicity is essential for this undertaking. In particular, antioxidant mechanisms play a very important role against the overproduction of reactive oxygen species, the most important form of heavy metals to cause cell damage. The GST enzyme, present in a large number of species, has been postulated as a response enzyme to oxidative stress induced by heavy metals. For this reason, this research project studied the relationship between exposure to heavy metals (Cd^{+2} and Hg^{+2}) in different organisms (*Hafnia alvei*, *Candida Parapsilosis*, *Penicillium sp.*, and Wistar rats), the production of reactive oxygen species that these elements provoked, and the activity of the GST enzyme in response to this level of intoxication. Tolerant and inhibitory concentrations for the study microorganisms were determined, and growth kinetics were performed to evaluate the optimal times of exposure and measurement of biochemical analyses. In the case of Wistar strain rats, an oral exposure system was used for a period of 4 weeks. For all these organisms, the ROS was quantified through the malondialdehyde method, and the total activity of the enzyme was measured. In organisms such as *H. Alvei* and *C. Parapsilosis*, exposed to CdCl_2 and HgCl_2 , relationships ($\text{Cd}(\text{T120h})$ -*H. Alvei* and $\text{Hg}(\text{T56h})$ -*C. Parapsilosis*) were found that indicate the possible presence of 4-hydroxy-2-nonenal (competitive product of malondialdehyde in lipid peroxidation) and that would explain the relationship: increase in GST activity/decrease in ROS, observed in the results. In *P. sp.* and the MP-Liver Wistar-ERO's-GST systems, an increase in enzymatic activity was observed, which established the possibility that the response capacity of the enzyme intervenes in mechanisms that act beyond the response to the ERO production. In rats of the Wistar strain, it was also found that the damage caused by the MPs used can vary depending on the target organ, with the brain being the least affected organ under this intoxication scheme, possibly due to the blood-brain barrier as a structure of protection to the passage of PM. The results were enriching regarding the role of GST in the defense against heavy metals, which nourish the vision of the enzyme as a response mechanism when exposed to these chemical species. Either because of its antioxidant capacity or because of the underlying mechanisms in which it intervenes for the protection of the different species studied. The perspectives that can arise from this project are interesting to continue expanding knowledge about this phenomenon.

1. INTRODUCCIÓN

El aumento a la exposición de metales pesados (MP) debido a actividades antropogénicas como la minería del carbón, la fundición y los efluentes industriales, ha llegado a constituir una amenaza para la salud de los seres humanos y la estabilidad del medio ambiente y de los sistemas ecológicos. Lo anterior debido a su elevada toxicidad, nula biodegradabilidad, y acumulación en los diferentes sistemas biológicos. En el metabolismo, elementos como el mercurio (Hg), cadmio (Cd) y plomo (Pb) son capaces de generar un fenómeno denominado estrés oxidativo (EO), el cual constituye un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO's), las cuales, en altas concentraciones, son causa de deterioro de órganos y daño celular.¹⁻⁴

Las Glutación S-Transferasas (GST's) constituyen una familia de enzimas presentes en diversos organismos, distribuidos a lo largo del árbol filogenético.⁵⁻⁷ Éstas presentan una variedad de actividades metabólicas, entre las cuales destacan su participación como parte del mecanismo de desintoxicación de la fase II del metabolismo de los xenobióticos y como un posible agente antioxidante.^{6,7} Además, también han sido relacionadas en mamíferos y en otras especies como bioindicadores de daño en órganos como hígado, riñón y cerebro,^{8,9} y del estrés oxidativo, respectivamente.^{10,11}

Existen especies de organismos que han logrado adaptarse a ambientes contaminados con agentes tóxicos de naturaleza orgánica e inorgánica, desarrollando mecanismos de respuesta ante el estrés generado por la contaminación. Teniendo como base la idea anterior, en el presente estudio se busca establecer una relación entre la exposición a los MP mercurio y cadmio (Hg^{+2} y Cd^{+2}) con la producción de ERO's y la actividad total de la enzima Glutación S-transferasa (GST) en organismos procariontes y eucariontes pertenecientes a diferentes niveles tróficos aislados de ambientes acuáticos contaminados de la región de Tuxtepec, Oaxaca (*H. Alvei*, *C. Parapsilosis*, y *P. sp*) así como en *Rattus Norvegicus* de la cepa Wistar. Organismos modelo utilizados como objeto de estudio.

Lo anterior contribuirá a entender mejor el posible papel que esta enzima desempeña en el mecanismo de defensa de diferentes especies ante la exposición a MP. De esta manera el conocimiento generado dentro del grupo de investigación de la Universidad del Papaloapan dedicado al estudio del papel de esta enzima como un mecanismo de defensa contra la intoxicación con metales tóxicos en diferentes especies tróficas será favorablemente enriquecido.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO's)

Hace alrededor de unos 3.500 millones de años, las cianobacterias fotosintéticas comenzaron a inundar la atmósfera de la tierra con oxígeno molecular (O_2).¹² Hecho que facilitó la evolución de la vida en el planeta. Sin embargo, derivadas de esta molécula, surgieron también las especies reactivas de oxígeno, moléculas que alteran la homeostasis redox de las células y provocan el denominado estrés oxidativo. Este tipo de moléculas pueden formarse a partir de procesos fisiológicos normales, tales como la cadena de transporte de electrones (CTe^-) en la respiración celular, o también debido a procesos patológicos y factores de presión externos. Desempeñan un papel importante en el proceso de muerte celular programada (apoptosis) y en mecanismos de defensa celular contra agentes patógenos. El término especies reactivas hace referencia a dos tipos de moléculas: los radicales libres y los no radicales.¹³ Los radicales libres y los no radicales comprenden las ERO's, las especies reactivas de nitrógeno (ERN's), así como también especies reactivas procedentes de otros elementos como cloro (ERCl's) y Bromo (ERBr's).^{14,15} No obstante, las ERO's constituyen el grupo de moléculas más importante implicado en el metabolismo oxidativo.

Radicales Libres: Los radicales libres son moléculas cuya última orbita contiene uno o más electrones desapareados, los cuales las tornan altamente reactivos y muy inestables, teniendo la capacidad para reaccionar con distintos tipos de moléculas inespecíficamente. Entre éstas se encuentran las integrantes de la estructura celular como proteínas, ADN y lípidos.¹⁶ Esta capacidad de reacción es inversamente proporcional a la vida media presentada por este tipo de moléculas, la cual llega a ser muy corta.¹⁷ La interacción por la cual los radicales libres reaccionan con diferentes tipos de moléculas es a través de reacciones oxido-reducción, es decir, reacciones en las que hay transferencia de electrones donde una de las especies participantes se reduce (gana electrones) y la otra se oxida (pierde electrones). La generación y propagación de las reacciones llevadas a cabo por los radicales libres suelen ser una serie de reacciones en cadena, las cuales se pueden clasificar de la siguiente forma: 1) reacciones de iniciación (formación de un radical libre a partir de no radicales), 2) reacciones de propagación (formación de un radical libre cuando reacciona una molécula estable con un radical libre) y 3) reacciones de terminación (reacción química entre dos radicales libres, en donde sus electrones desapareados son cancelados y se genera un producto estable). Ejemplos de radicales libres (RL) basados en oxígeno son el superóxido $O_2^\bullet$ (radical más abundante y común a nivel celular. Se forma principalmente en la cadena de transporte de electrones y en la fagocitosis, para ser usado como defensa bactericida), y el radical hidroxilo $OH^\bullet$ (generado por la descomposición de peróxido de hidrógeno y poseedor de una alta reactividad).¹⁸

No radicales: Básicamente las moléculas no radicales pertenecientes a ERO's son aquellas que no poseen electrones desapareados en su última capa electrónica pero que son capaces de producir radicales libres. Entre las moléculas no radicales de mayor importancia se encuentra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual se puede llegar a descomponer en el radical hidroxilo $OH^\bullet$ debido a la débil unión O-O en su estructura.¹⁸

Por lo tanto, las ERO's comprenden todos aquellos derivados de oxígeno, tanto radicales libres como no radicales, que participan activamente en reacciones de óxido-reducción de distintos procesos celulares. La producción de estas moléculas puede deberse a fuentes endógenas y exógenas. Dentro de las fuentes endógenas se pueden mencionar las siguientes:¹⁸

1. Mitocondria: En ella se lleva a cabo la respiración celular y el proceso de producción de ATP. Es considerada la mayor fuente de producción de radicales libres en el organismo generados en la CTe⁻.
2. Peroxisomas: Organelo que presenta una gran cantidad de enzimas reductoras de O_2 (como la D-aminoácido oxidasa, y la ácido úrico oxidasa). También posee una elevada concentración de CAT, enzima que ayuda a transformar al H_2O_2 en H_2O y O_2 . Sin embargo, el H_2O_2 no transformado por el sistema peroxisomal puede llegar a producir daño celular.
3. Citocromo P-450: Encontrado en el retículo endoplasmático, participa activamente en la fase I del metabolismo de los xenobióticos y es capaz de generar RL a partir de la catálisis de reacciones que generan $O_2^\bullet$, mediante mecanismos dependientes de NADPH (que utilizan las enzimas NADPH oxidasas).
4. Fagocitosis: Durante la fagocitosis se produce una gran cantidad de ERO's (H_2O_2 , $O_2^\bullet$, $OH^\bullet$) en un proceso denominado "explosión oxidativa" (producido por la NADPH-oxidasa), destinado a ser la primera línea de defensa contra agentes patógenos.

Las fuentes exógenas por otro lado pueden deberse a diversos factores de estrés, como la exposición a rayos X o radiación de alta energía, al ozono, al tabaco, a contaminantes del aire y productos químicos industriales.^{19,20}

Estos factores, en especial los exógenos, pueden inducir una sobreproducción de ERO's, provocando EO. Este es un fenómeno generado cuando existe una producción excesiva de ERO's, aunado a un mal desempeño del sistema antioxidante. Cuando esto sucede, las ERO's pueden llegar a causar diferentes daños a nivel celular, como la oxidación de lípidos (peroxidación lipídica), de grupos sulfhídricos de las proteínas, de bases púricas y pirimidínicas.²¹

En el esquema de la Figura 1 se muestra la respuesta celular frente a la formación de ERO'S a través de distintos estímulos. Cuando es debido a factores fisiológicos, existe una respuesta regulada. En el caso de factores externos, un mal desempeño del sistema antioxidante puede derivar en EO y daño celular.²²

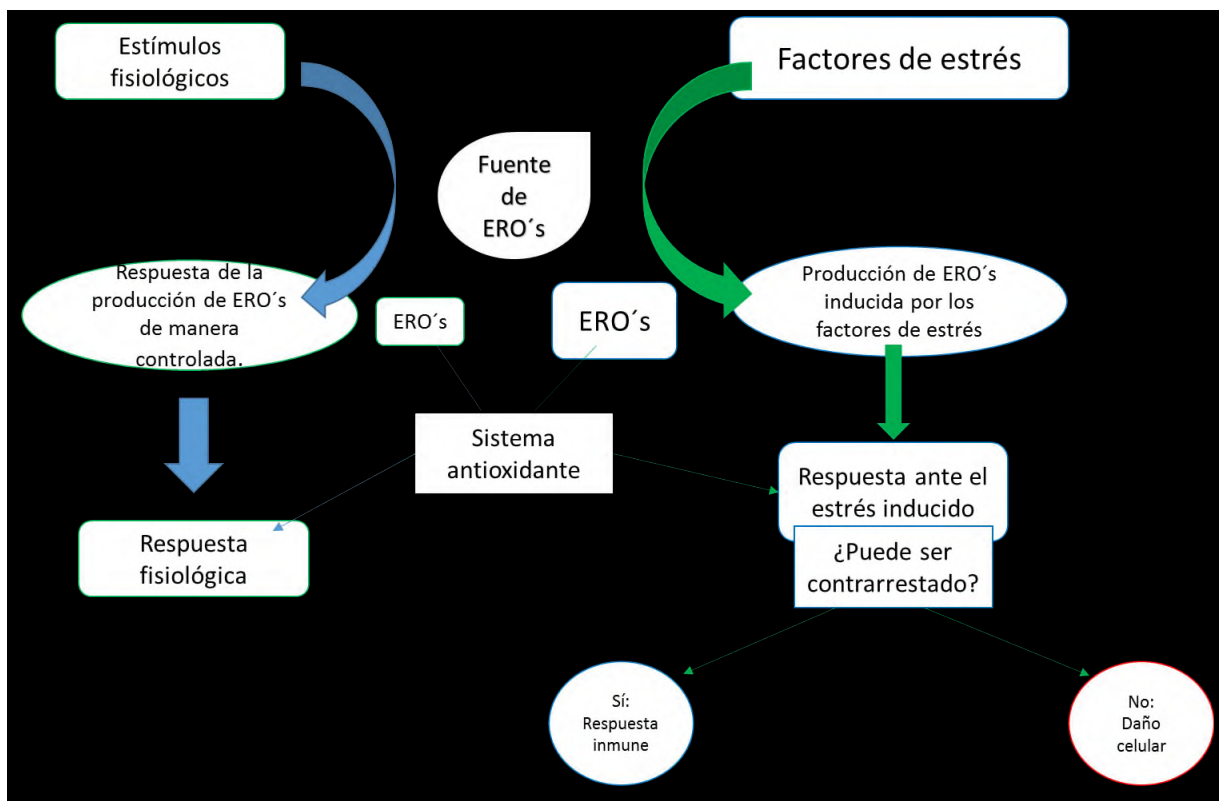


Figura 1. Respuesta celular ante la formación de ERO's causada por estímulos fisiológicos y factores estresantes. Modificado de: Pourouva, J., et al.²²

2.2 SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Para combatir el EO generado por las ERO's los organismos han desarrollado mecanismos de defensa especializados en funciones antioxidantes. Un antioxidante es toda aquella especie química capaz de retardar o prevenir la oxidación de un sustrato (lípidos, proteínas, ADN u otro tipo de moléculas). Estos mecanismos, o sistemas de defensa antioxidante, se encuentran formados tanto por especies enzimáticas como por no enzimáticas. Los antioxidantes no enzimáticos tienen como función capturar RL y generar moléculas menos nocivas para la célula mediante la adición de un electrón al RL, con el objetivo de estabilizarlo.¹⁸ Dentro de este grupo se pueden encontrar los mencionados a continuación.

- ✚ Vitamina C: Encontrada a nivel intra y extracelular en la forma de ascorbato, actúa directamente sobre los radicales $O_2^\bullet$, $OH^\bullet$ y algunos hidroperóxidos lipídicos. Sin embargo, el ascorbato puede llegar a ser un potente prooxidante cuando se encuentran presentes excesivas concentraciones de iones hierro y cobre.¹⁹

- ✚ Glutatión: Abreviado como GSH, es un tripéptido constituido por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina (γ -glutamil-cisteinil-glicina) (Figura 2). Actúa sobre H_2O_2 , $\text{O}_2^\bullet$, $\text{OH}^\bullet$, usualmente en conjunción con enzimas en donde el GSH es utilizado como ligante.

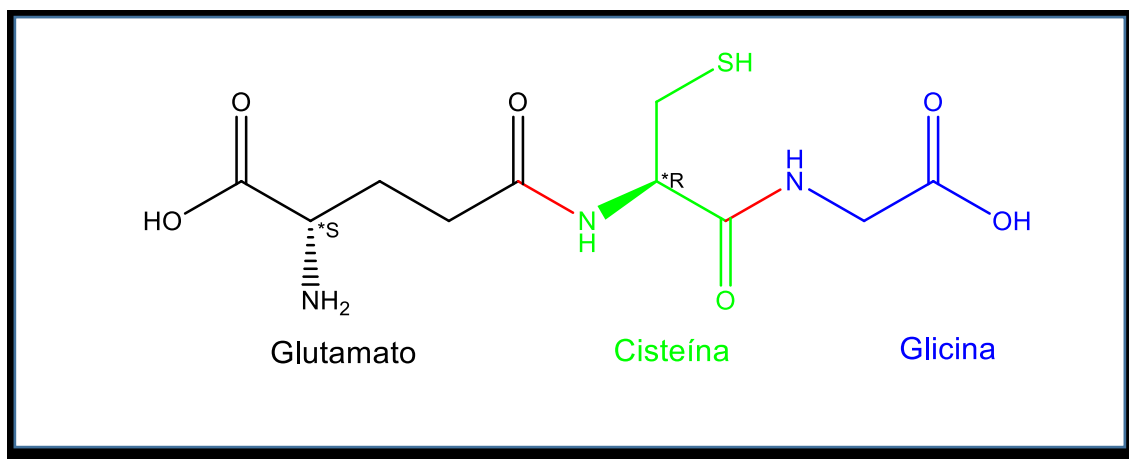


Figura 2. Estructura química del GSH, formado por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. Los enlaces en rojo representan los enlaces peptídicos. *Propia autoría.*

Los antioxidantes enzimáticos, por otra parte, comprenden la primera línea de defensa ante las ERO's. Se encargan de catalizar reacciones en las que se efectúa una transferencia de electrones de un sustrato hacia los RL.¹⁸

Dentro de los sistemas antioxidantes enzimáticos se pueden mencionar los siguientes:

- ✚ Superóxido Dismutasa (SOD): Esta enzima tiene como función catalizar la dismutación del $\text{O}_2^\bullet$ a H_2O_2 , el cual es menos reactivo y puede llegar a ser degradado por otras enzimas como la CAT o la GPx.^{23,24}
- ✚ Catalasa (CAT): Es una hemoproteína que se concentra principalmente en los peroxisomas y en las mitocondrias, se encarga de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.²⁵
- ✚ Glutatión peroxidasa (GPx): Es una selenoproteína que, en presencia de GSH como agente reductor, cataliza la reducción del H_2O_2 y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente.²⁶
- ✚ Glutatión S-Transferasa (GST): Conocida por su participación en la segunda fase del metabolismo de los xenobióticos. Utiliza el GSH para catalizar reacciones con compuestos exógenos y endógenos. No forma parte del canon de enzimas antioxidantes, sin embargo, desde hace más de 20 años se identificó su participación en el metabolismo antioxidante.⁵

Se puede afirmar, de acuerdo a lo anterior que los distintos sistemas de defensa antioxidante, sean enzimáticos o no, son constituyentes fundamentales en la supervivencia celular contra el EO.

2.3 GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST)

2.3.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES, CLASIFICACIÓN Y PRESENCIA DE GST EN DISTINTOS ORGANISMOS.

Las GST's comprenden una superfamilia de enzimas multifuncionales. Suelen clasificarse en tres grupos principales, de acuerdo a su presencia en los distintos componentes celulares: mitocondriales, citosólicas y microsomales. Las GST's más estudiadas han sido las citosólicas. La estructura terciaria de la mayoría de estas es un dímero globular. El peso molecular de las subunidades de estas estructuras varía de 23 kD a 29 kD y cada una de ellas consta de dos dominios distintos: el dominio N-terminal, que es capaz de unirse al GSH, y el dominio C-terminal, el cual parece combinarse con diferentes compuestos electrofílicos, presentes en diferentes sustratos.²⁷

Dentro de la clasificación general de estas enzimas suelen haber subclasificaciones, denominando a los distintos subgrupos de enzimas en clases, la cuales son designadas por los nombres de las letras griegas: Alfa, Mu, Pi, etcétera. Se han identificado alrededor de quince clases de GST: Alfa (α), Mu (μ), Pi (π), Sigma (σ), Teta (θ), Zeta (ζ), Omega (ω), y Kappa (κ) encontradas en los mamíferos (clase perteneciente al reino animalia y al dominio Eucaria); Beta (β), Teta (θ), Zeta (ζ), Nu (ν), Rho (ρ) encontradas en bacterias; Delta (δ), Epsilon (ϵ), Omega (ω), Sigma (σ), Theta (θ) y Zeta (ζ) en insectos (clase perteneciente al reino animalia y al dominio Eucaria); Phi (Φ), Zeta (ζ), Tau (τ), y Teta (θ) encontradas en plantas (reino perteneciente al dominio Eucaria).^{7,28,29} En la Tabla 1 se ilustra la presencia de las diferentes clases en estos grupos de organismos.

El que una enzima pertenezca o no a una u otra clase se encuentra en función de distintos criterios, entre los cuales destacan: La secuencia de aminoácidos, la especificidad por el sustrato, las propiedades cinéticas y la estructura, entre otros.^{7,30,31,27} La secuencia de aminoácidos suele ser el criterio principal a considerar para la clasificación de las distintas clases, sin embargo no existen criterios claramente establecidos con respecto a la extensión de la similitud de la secuencia requerida para colocar una GST en una clase particular. En general se acepta que las GST que comparten más del 60% de identidad pueden establecerse dentro de una misma clase y aquellas con menos del 30% de identidad se asignan a clases separadas. Se suele poner mucho énfasis en la estructura primaria del extremo N terminal porque, dentro de las clases, esta región tiende a conservarse mejor que otras, ya que incluye una parte importante del sitio activo (esta región contiene un residuo de tirosina, serina o cisteína catalíticamente esencial que interactúa con el grupo tiol de GSH).⁷

Tabla 1. Clases de GST en cuatro especies de organismos (Fuente: Mannervik, 2005; Sherrat, 2002.)^{28,29}

Clase de GST	Grupos de organismos				Órgano/organelo predominante
	Mamíferos	Bacterias	Insectos	Plantas	
Alfa	X				Cerebro, hígado
Beta		X			Citoplasma
Delta			X		No determinado
Épsilon			X		No determinado
Zeta	X	X	X	X	Citosólica (plétora, raíz, tallo)
Teta	X	X	X	X	Pulmón
Kappa	X				Peroxisomas
Mu	X				Testículos, hígado
Un		X			Citoplasma
Pi	X				Riñón, testículos
Rho		X			Citoplasma
Sigma	X		X		Placenta
Tau				X	Citosólica (plétora, raíz, tallo)
Phi				X	Citosólica (plétora, raíz, tallo)
Omega	X		X		Esófago

(X significa la especie en la cual la clase de GST es predominante)

Algunos trabajos han utilizado las secuencias de distintos tipos de GST's comparándolas y construyendo árboles filogenéticos tratando de identificar los patrones de divergencia. En la Figura 3 se muestra un árbol filogenético basado en las distintas secuencias de GST's reportadas.³² En el extremo izquierdo se muestran las biomoléculas precedentes a las primeras GST's. Conforme se avanza hacia el extremo derecho se observa el surgimiento en el tiempo de las diferentes clases de esta enzima.

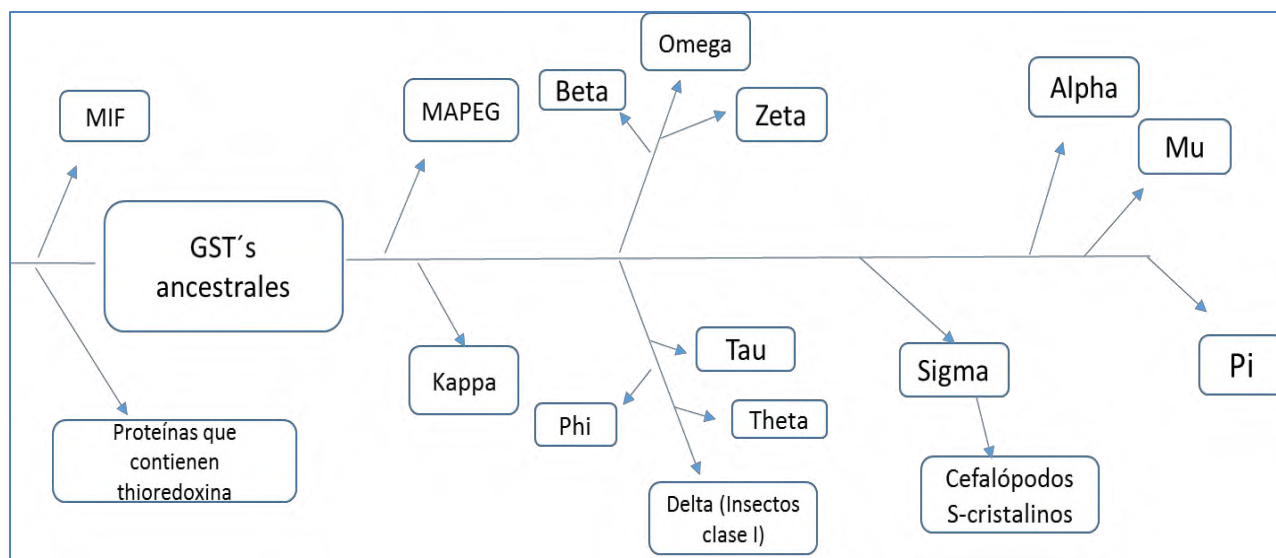


Figura 3. Posible patrón de divergencia en la superfamilia GST. Basados en los alineamientos secuenciales descritos por Board, P.G. *et al.*, Kanoaka, Y. *et al.* Y Snyder, M. J. *et al.*³²

En la Figura 4 se muestra la comparación de algunas estructuras cristalinas para las clases Alfa (humano), Pi (humano), Mu (rata) y Theta (humano). A pesar del bajo nivel general de identidad de secuencia en todas las clases, todas las estructuras siguen un pliegue canónico similar, y cada subunidad consta de dos dominios distintos. En las GST, el dominio 1 (N-terminal) está altamente conservado y proporciona la mayor parte del sitio de enlace de GSH. Este dominio está conectado al dominio 2 (C-terminal) por una secuencia corta que sirve como enlazante (Figura 5).⁷

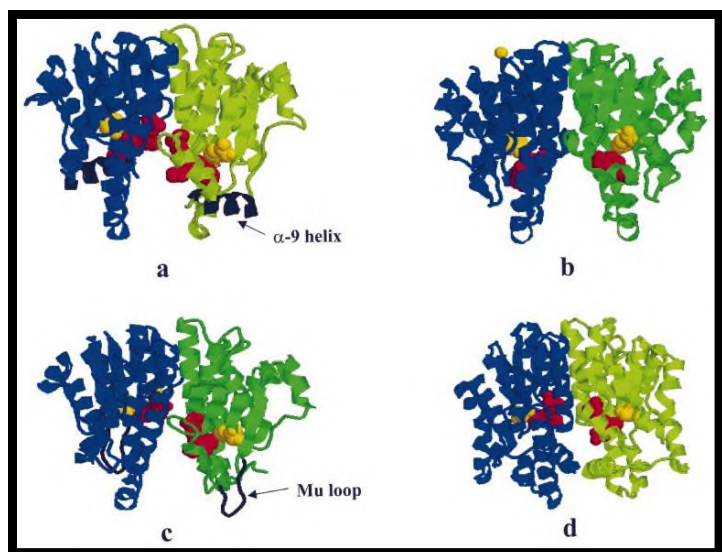


Figura 4. (a) Clase Alfa humana, (b) clase Pi humana, (c) clase Mu de rata, (d) clase theta humana. Las subunidades se distinguen por el color (verde y azul). Los residuos de tirosina o serina catalíticamente esenciales se representan en el modo de relleno del espacio y se resaltan en amarillo, mientras que el ligando con el que la enzima se co-cristalizó se muestra en rojo, lo que identifica la ubicación del sitio activo. Las características específicas de las estructuras Alfa y Mu se muestran en negro. Fuente: Sheehan *et al.*⁷

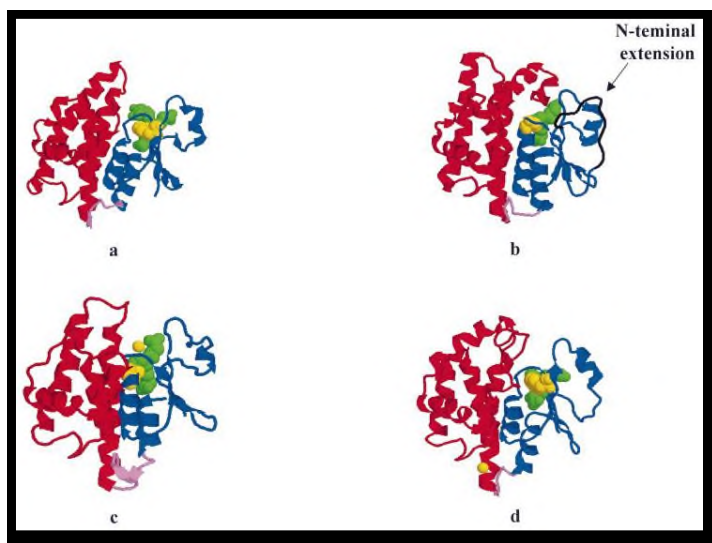


Figura 5. Estructuras tridimensionales de subunidades GST individuales. (a) clase Sigma de calamar, (b) clase Omega humana, (c) clase Beta bacteriana (*Proteus mirabilis*) y (d) *Fasciola hepática* clase Mu. El dominio N-terminal 1 es de color azul, mientras que el dominio C-terminal 2 es rojo. Los residuos catalíticamente esenciales (tirosina en a y d; cisteína en b y c) son de color amarillo y se presentan en modo de relleno de espacio, mientras que los ligandos con los que la proteína se co-cristalizó se muestran en verde. Las hebras de enlace que conectan los dos dominios se muestran en violeta. Fuente: Sheehan et al.⁷

Las secuencias y las estructuras tridimensionales conocidas de estas enzimas sugieren que estas proteínas comparten una ascendencia común, aunque los detalles precisos de su evolución aún no se encuentran esclarecidos en su totalidad.

2.3.2 VERSATILIDAD METABÓLICA DE LA ENZIMA GST

La GST es una proteína que presenta una amplia gama de actividades metabólicas, pues participa en varios procesos de desintoxicación y prevención. Como se mencionó anteriormente, la principal actividad de la GST se localiza dentro de la fase II del metabolismo de los xenobióticos. Además, participa dentro del metabolismo de leucotrienos y prostaglandinas; dentro de diversos mecanismos de prevención del proceso de carcinogénesis; juega un papel dentro de la vía de transducción de señales y actualmente se ha postulado como bioindicador de daño en órganos como hígado y riñón.^{5,33-37} Es así que esta enzima ejerce un papel muy relevante en distintos procesos metabólicos debido, a su carácter multifuncional.

En este trabajo estudiaremos su papel dentro de los fenómenos de intoxicación con dos MP (Cd y Hg) y la relación entre la generación de ERO's y la actividad de la enzima. Los resultados derivados de este estudio nos ayudarán a seguir analizando su posible papel como bioindicador de estrés ocasionado por la intoxicación por MP en organismos de diferentes niveles taxonómicos y abrirá las puertas para futuros estudios de carácter: estrés MP-organismos adaptados.

2.3.2.1 FASE II DEL METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS

Posiblemente la función más reconocida de la Glutatión S-Transferasa es su participación en el metabolismo de los xenobióticos. La enzima GST forma parte de la fase II de esta vía metabólica, en donde cataliza la reacción de unión del GSH, utilizado como ligante, con una amplia gama de sustratos electrófilos principalmente hidrofóbicos.³⁸

Las reacciones de desintoxicación comprenden los primeros cuatro pasos de síntesis del ácido mercaptúrico, con la conjugación a GSH que sirve para hacer los sustratos más solubles y permitir que sean eliminados de la célula. Después de la exportación, los productos de conjugación se convierten en ácidos mercaptúricos y se excretan a través de la orina o la bilis. Algunos de estos compuestos pueden ser epóxidos, aldehídos y cetonas α , β -insaturadas, haluros de alquilo, de arilo, compuestos con grupos nitro, entre otros, los cuales establecen un enlace tioéter entre el átomo de azufre del GSH y su carbono electrofílico. En este sentido, la enzima contribuye a la supervivencia de la célula por desintoxicación de componentes externos.²⁹ La Figura 6 muestra algunos sustratos que puede unir la enzima con el glutatión para posteriormente ser expulsados de las células.

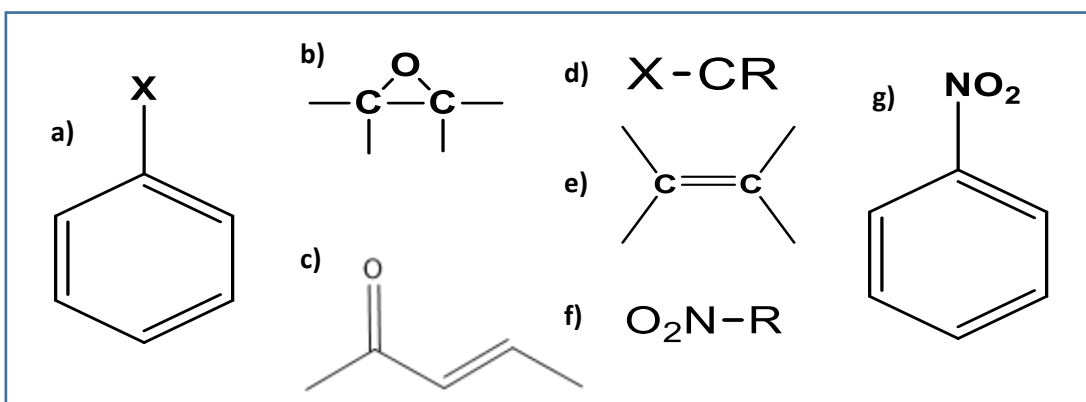


Figura 6. Estructuras representativas de moléculas electrófilas que pueden servir como sustratos: a) Haluro de arilo, b) epóxido, c) cetona α , β -insaturada, d) haluro de alquilo, e) alqueno, f) y g) compuestos con grupos nitro. *Propia autoría.*

Muchos compuestos pueden inducir tanto la síntesis como la actividad de la GST, incluidos pesticidas, bifenilos policlorados (BPC), metales e hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA). Estos pueden ser sustratos directos de esta enzima, o alternatively, se pueden metabolizar a través de la monooxigenación del citocromo P-450 a compuestos que pueden servir como sustratos de GST.³⁹

Se ha indicado en párrafos superiores que existen muchas isoformas de GST, posiblemente por su gran variedad de actividades metabólicas, las cuales han podido ayudar a un gran número de especies en los procesos de desintoxicación por sustancias exógenas. Es por ello que uno de los problemas a los que se han enfrentado quienes han estudiado el o los papeles de este grupo de enzimas es cómo medir su actividad. Este problema se ha resuelto al medir la actividad total de la enzima GST, la cual engloba todas las isoformas reportadas. Para llevar a cabo lo anterior se descubrió que el 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB), es un sustrato reconocido por todas las formas de la enzima, por lo cual su uso se ha empleado para cuantificar la actividad. El DNCB cuando se conjuga con GSH genera S-(2,4-dinitrofenil) glutatión, un compuesto que permite realizar un ensayo espectrofotométrico a 350 nm. La Figura 7 muestra la reacción general de la enzima usando DNCB como sustrato y a GSH como ligante.⁴⁰⁻⁴⁴

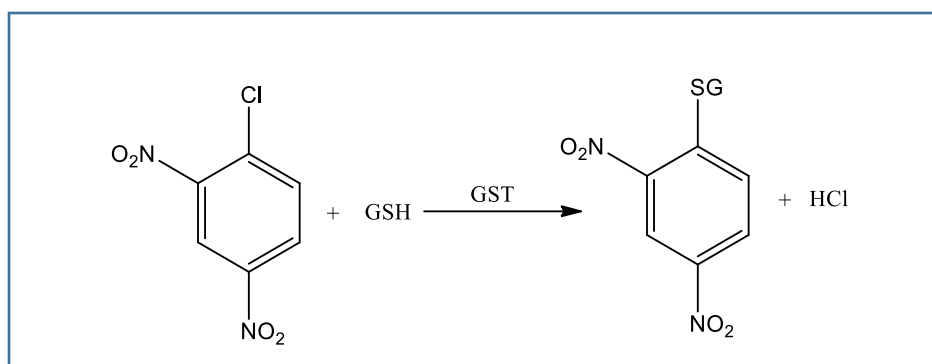


Figura 7. Reacción bioquímica catalizada por la enzima Glutatión S-transferasa, usando como sustrato al 1-cloro-2,4-dinitroclorobenceno (DNCB). Propia autoría.

Las GST's citosólicas representan la familia enzimática de mayor importancia. Esta familia comprende las clases alfa, beta, delta, épsilon, zeta, theta, mu, nu, pi, sigma, tau, phi y omega.⁴⁵ Muchas de ellas (theta, mu, omega, sigma, delta, pi y alfa) han sido estudiadas a través de la medición de su actividad en distintos organismos utilizando como sustrato el DNCB.^{10,11,40-44}

La clase Theta utiliza el grupo hidroxilo del residuo serina localizado cerca del dominio N-terminal para activar el átomo de azufre del GSH. En tanto, las clases Alpha, Mu, Pi y Sigma realizan esta función con el grupo hidroxilo de tirosina. El aminoácido hidroxilado dona hidrógenos para el azufre, lo cual baja el pKa del tiol en el complejo Enzima-GSH. Esto genera la ionización del complejo a un pH fisiológico.⁴⁶

El mecanismo de reacción por el cual se lleva a cabo la unión del GSH al DNCB está establecido por una sustitución nucleofílica aromática. Esta es un tipo de reacción en la que el nucleófilo desplaza a un buen grupo saliente, como un haluro, en un anillo aromático. Esto ocurre fácilmente cuando en las posiciones orto y para hay grupos tractores de densidad electrónica fuertes, tales como grupos nitro. Específicamente para la reacción entre GSH y DNCB la enzima GST cataliza la unión

del GSH desprotonado (GS^-) con el sustrato, estabilizando el estado de transición de la formación del complejo intermedio, donde el nucleófilo (GS^-) se adiciona a la posición del grupo saliente (Cl^-), el cual a continuación es eliminado, recuperándose así la aromaticidad.³³ El mecanismo se ilustra en la Figura 8.

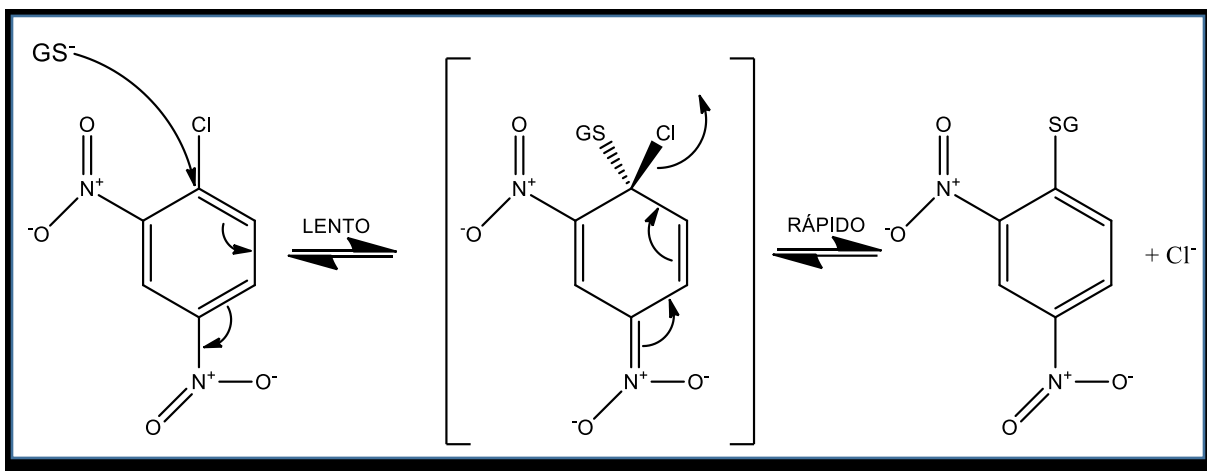


Figura 8. Diagrama de reacción para la adición nucleofílica de GS^- a 1-cloro-2,4-dinitrobeneno. Modificada de: Armstrong, R.N.³³

2.3.2.2 RELACION GST - INTOXICACIÓN CON METALES PESADOS.

Dentro del proceso de desintoxicación que emplea la GST en distintas especies químicas se puede vislumbrar la relación que guarda contra la intoxicación por MP. Como se ha mencionado con anterioridad, uno de los mecanismos de acción por el cual los MP son capaces de generar alteraciones en el organismo es a través del aumento en la producción de ERO's, por medio de la inhibición de enzimas antioxidantes como la SOD o la unión a grupo sulfhídricos de péptidos y/o proteínas, unión que eventualmente causa alteraciones metabólicas.^{1,2,47,48}

Así pues, se ha demostrado que la GST tiene una capacidad de respuesta ante el EO generado por la exposición a MP. El mecanismo de acción de la GST en este proceso aún no está del todo establecido. Sin embargo, es posible que esta enzima catalice la actividad que tiene el GSH sobre especies reactivas como el H_2O_2 , $\text{O}_2^\bullet$, $\text{OH}^\bullet$. Un mecanismo similar al utilizado por la GPx. Empero, en tanto que la GPx comprende una enzima de carácter antioxidante, la GST ha demostrado una relación dosis agente estresante-respuesta EO mayor que la primera.⁴⁹⁻⁵² Esto debido posiblemente a que la GST ha evolucionado para constituir un mecanismo de respuesta y de defensa contra el EO.

2.3.2.3 GST Y SU PAPEL EN EL CÁNCER

La GST desempeña un papel dual en el metabolismo que involucra los procesos carcinogénicos. Por un lado, debido a su participación en la fase II del metabolismo de los xenobióticos, contribuye activamente en la desintoxicación de moléculas carcinógenas. Estas moléculas son transformadas en la primera fase de esta ruta metabólica, generalmente por el citocromo P-450, en compuestos electrofílicos, los cuales pueden llegar a reaccionar con macromoléculas como el ADN. En pos de impedir esta reacción el GSH puede actuar como sitio nucleófilo alternativo (competitivo) a los sitios nucleófilos del ADN, evitando así la pérdida de estructura y función de este. Esto ocurre en la fase II del metabolismo de xenobióticos en donde la reacción entre el GSH y los compuestos electrofílicos derivados de metabolitos carcinógenos es catalizada por la GST. Los tejidos con bajo nivel de GSH o GST pueden tener una capacidad reducida para desintoxicar las moléculas potencialmente carcinógenas, lo que resulta en un mayor daño citogenético, y en el aumento del riesgo de cáncer.^{53,54}

Por otra parte, la GSTP, más específicamente la GSTP1, se ha detectado a niveles elevados en una variedad de cánceres humanos y líneas celulares y tumores resistentes a los medicamentos. Además de ello varios estudios que emplean enfoques genéticos demuestran una asociación de GSTP1 con el desarrollo del cáncer.⁵⁴

Esto implica una dualidad por parte de la GST en el metabolismo del cáncer, pues, por una parte, la mayoría de las familias y clases de la GST contribuyen en la desintoxicación de compuestos carcinogénicos, colaborando en la prevención del cáncer, mientras que, por otra, formas como la GSTP1, se ha relacionado con la promoción de la enfermedad.

2.3.2.4 PARTICIPACIÓN DE LA GST EN EL METABOLISMO DE LEUCOTRIENOS Y PROSTAGLANDINAS.

Los leucotrienos son compuestos biológicamente activos que funcionan como mediadores de diversos procesos inflamatorios, como la quimiotaxis (habilidad de las células para determinar la dirección de su locomoción a lo largo de un gradiente de concentración de sustancias atractantes o repelentes) de los leucocitos, el aumento de la permeabilidad vascular, la constricción del músculo liso y el aumento de la secreción de moco. La proteína más importante que participa en la biosíntesis de estos compuestos es la leucotrieno C4 (TLC4) sintetasa, la cual cataliza la producción de LTC4 a partir de LTA4 y GSH. Sin embargo, se han encontrado clases de GST, como la GST II microsomal, que también pueden catalizar esta reacción, con menos especificidad, pues puede reaccionar con otros sustratos distintos de LTA4, como el DNCB, pero que puede funcionar como una proteína de apoyo o respuesta a la síntesis de leucotrienos.³⁴

Las prostaglandinas (PG) son un conjunto de sustancias de carácter lipídico derivadas del ácido araquidónico, algunas como las prostaglandinas D2, E2 y F2 (PGD2, PGE2 y PGF2 respectivamente) actúan como hormonas locales y se unen a varios receptores de superficie celular acoplados a

proteínas G vinculados a sistemas de segundo mensajero. La estimulación de estos receptores regula diversas actividades, como la contracción o la relajación de los músculos vasculares, la estimulación o la inhibición de la secreción de hormonas y neurotransmisores, y produce efectos variables en la reabsorción de agua tubular renal. La PG F2 también estimula la proteína cinasa activada por mitógenos (MEK por sus siglas en inglés), presumiblemente a través de un receptor de la superficie celular.⁵⁵ Se ha descrito la participación de GST's citosólicas o membranales implicadas en la biosíntesis de PG. Varias clases alfa catalizan la reducción de la prostaglandina H2 (PGH2) a la PGF2. Además de ello, la clase sigma de GST puede catalizar la isomerización de PGH2 a PGD2 o PGE2.³⁶

2.3.2.5 ACTIVIDADES NO CATALÍTICAS DE GST

La enzima GST es también capaz de expresarse de manera no catalítica. Participando en rutas metabólicas diversas y asistiendo para el correcto desarrollo de estas, cuando las enzimas canónicas de estas rutas no pueden ejercer su labor. Esta expresión está dada por su unión con un amplio número de ligandos sin la intervención de un sustrato. Puede participar por ejemplo en las vías de transducción de señales mediante la interacción con proteínas cinasas que actúan en esta vía. También es capaz de unirse a distintos ligandos receptores de hormonas que incluyen a la hormona tiroidea y hormonas esteroidales, en donde las clases alfa y mu presentan una mayor actividad, y unirse a ácidos biliares de naturaleza lipofílica que no son un sustrato para la reacción de conjugación.^{36, 54}

Es así que la enzima GST constituye una proteína con una versatilidad metabólica importante, que incluye actividades catalíticas que comprenden una capacidad de respuesta ante agentes externos y condiciones de estrés y también actividades no catalíticas importantes en la biosíntesis de moléculas importantes en distintas rutas bioquímicas.

3. ANTECEDENTES

3.1 METALES PESADOS

El término metales pesados (MP) no tiene una definición específica acuñada por instituciones como la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) o la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de los EUA). En la literatura, sin embargo, suele considerarse MP a aquellas sustancias que presentan determinadas características de densidad, masa atómica y/o efectos bioquímicos. Así pues, los MP pueden ser considerados como un grupo de elementos (metales, semimetales (As), incluso no metales (Se)) y compuestos (metilmercurio), con alta densidad ($> 4 \text{ g/cm}^3$), y peso atómico por encima de 20, a los que además se atribuyen diferentes efectos de contaminación, toxicidad y/o ecotoxicidad. Algunos de estos elementos son: aluminio (Al), bario (Ba), berilio (Be), cobalto (Co), cobre (Cu), estaño (Sn), hierro (Fe), manganeso (Mn), cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb), arsénico (As), cromo (Cr), molibdeno (Mo), níquel (Ni), plata (Ag), selenio (Se), talio (Tl), vanadio (Va), oro (Au) y zinc (Zn).⁵⁶ Pueden encontrarse naturalmente en la corteza terrestre, pero las actividades antropogénicas han causado cambios drásticos en sus ciclos geoquímicos. Algunos, como el Zn, Cu, Fe, Mn y Co, son requeridos en el cuerpo humano,⁵⁷ sin embargo, pueden llegar a ser tóxicos en ingestas elevadas. En tanto, otros como el Hg o Pb, no parecen presentar ningún beneficio en el metabolismo celular del ser humano, siendo capaces, por otro lado, de provocar deterioros en él mediante una bioacumulación, por períodos prolongados de tiempo.⁵⁸

La exposición a estos elementos puede darse debido a procesos industriales, agrícolas, artesanales y naturales, ante la presencia de productos que los contienen, como pigmentos, aleaciones e incluso alimentos contaminados. Sin embargo, la fuente predominante de exposición para la especie humana es el consumo de agua potable contaminada. De ello pueden derivarse patologías como trastornos cardiovasculares, daño neuronal, lesiones renales, y riesgo de cáncer y diabetes.⁴

3.1.1 METALES PESADOS Y MEDIO AMBIENTE

La contaminación ambiental es un problema que debe resultar trascendental para toda la sociedad y población global del siglo XXI. Específicamente se deben atender los casos de contaminación por MP en el ámbito alimenticio, en la movilización de estos por aire y suelo y, sobre todo, en la exposición por medio de agua contaminada (ya sea por vía antrópica o natural) debido a que estas formas afectan severamente la salud pública.

Ciertos estudios han reportado la presencia de MP (Hg, As, Pb, Cd, Zn, Ni y Cr), como consecuencia del uso de aguas contaminadas en siembras de hortalizas de lechuga, repollo, calabaza, brócoli y papa. Además, también se han encontrado metales en diferentes concentraciones en peces, carnes y leche, como resultado de la bioacumulación y movilidad desde el ambiente a las fuentes hídricas.^{59,60}

Los efectos de toxicidad, la movilidad, distribución o disponibilidad biológica dependen, en gran medida, de la especie química de la cual se esté tratando, así, se ha encontrado que Cd, Hg, Pb y As son cuatro de los elementos que por su impacto en la salud deben ser cuidadosamente evaluados y monitoreados. En la Figura 9 se ilustran las fuentes de contaminación y la exposición a distintos tipos de metales pesados.⁶¹

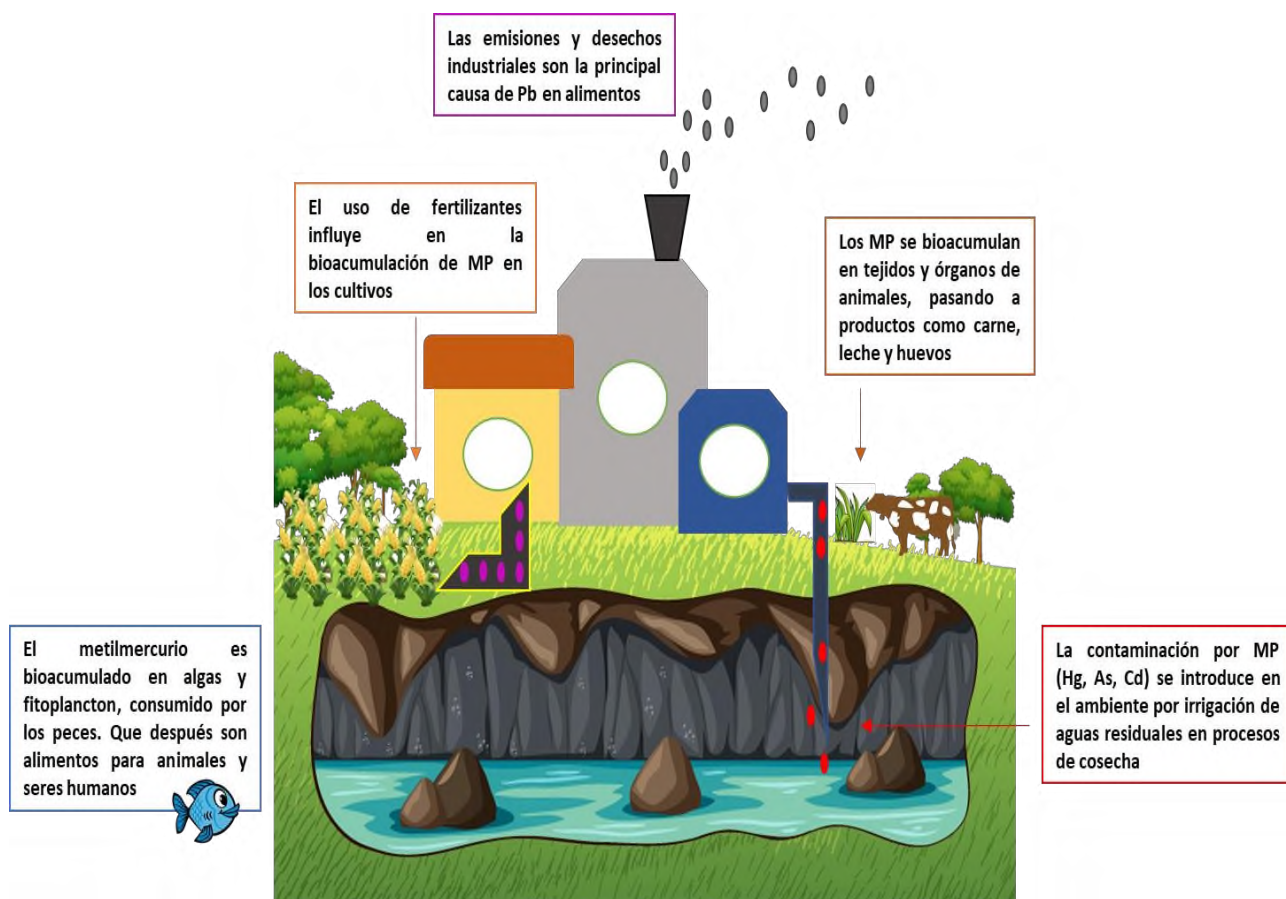


Figura 9. Fuentes de contaminación por metales pesados en aire, suelo, agua y plantas. Modificado de: Reyes, Y. *et al.* 2016.⁶¹

En la Tabla 2 se muestran los límites permisibles, de acuerdo al tipo de metal, para distintas fuentes de exposición de MP en humanos.⁶² Se puede observar que el Hg es uno de los elementos más tóxicos. Debido a su toxicidad inherente a bajas concentraciones.

Tabla 2. Límites máximos permisibles de concentración de metales pesados (Hg, As, Cd y Pb) en agua, suelo y alimentos de consumo humano. Fuente: Codex, 1995; UE, 2016.⁶²

Fuente	Hg	As	Cd	Pb
Agua para consumo humano	0.001 mg/L	0.05 mg/L	0.01 mg/L	0.05 mg/L
Agua Marina y de estuarios	0.0001 mg/L	0.05 mg/L	0.05 mg/L	0.01 mg/L
Agua para uso Agrícola	0.001 mg/L	0.1 mg/L	0.01 mg/L	0.05 mg/L
Agua para uso Pecuario	0.01 mg/L	0.2 mg/L	0.05 mg/L	0.05 mg/L
Hortalizas de fruto (cucurbitáceas)	---	---	0.05 mg/Kg	0.1 mg/Kg
Hortalizas de Hoja	---	---	0.1 mg/Kg	0.3 mg/Kg
Legumbres	---	---	---	0.2 mg/Kg
Raíces y Tubérculos	---	---	0.1 mg/Kg	0.1 mg/Kg
Carne de vacuno, porcino y ovino	---	---	0.05 mg/Kg	0.1 mg/Kg
Carne de aves	---	---	---	0.1 mg/Kg
Leche	---	---	---	0.02 mg/Kg
Cereales en grano (excepto trigo)	---	1	---	0.2 mg/Kg
Peces	0.5 mg/Kg	2 mg/Kg	---	---
Peces Depredadores	1 mg/Kg	---	---	---

3.1.1.1 PRESENCIA DE METALES PESADOS EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS DE LA REGIÓN DEL PAPALOAPAN.

Particularmente en la región del Papaloapan, específicamente en el municipio de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, en un estudio realizado previamente en la Universidad del Papaloapan, se encontró la presencia de concentraciones elevadas de MP como Pb, Cr, Cd y Hg en distintas fuentes hídricas (mostradas en la Tabla 3). De igual forma, en dicho estudio se aislaron organismos que fueron capaces de crecer y desarrollarse en estos ambientes contaminados, tales como *H. Alvei*, *C. Parapsilosis* y *P. sp.*,⁶³ microorganismos que por esta razón se convirtieron en objetos de estudio de esta investigación.

Tabla 3. Determinación de MP en fuentes hídricas de la región de San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca.

Fuente Hídrica	Concentración (ppm) de MP en muestras de agua
<i>Río Papaloapan</i>	Pb: 1.2 Cr: 2.3 Cd: 0.75
<i>Río Sumatra</i>	Hg: 0.0072 Pb: Trazas Cd: Trazas
<i>Plan de Águila</i>	Pb: Trazas Hg: Trazas
<i>San Isidro, Naranjal</i>	Pb: 0.85

3.1.2 METALES PESADOS Y SU EFECTO EN EL METABOLISMO

Una vez que los MP tóxicos ingresan dentro de los sistemas biológicos, son capaces de bloquear las actividades vitales de los organismos. Sea por la ingesta en alimentos o aguas contaminadas, los MP son capaces de bioacumularse en diversos órganos del cuerpo, siendo el hígado, riñón, corazón y cerebro los más susceptibles.

A nivel global, se han reportado casos, como el ocurrido en Japón en la década de los cincuenta, en donde poblaciones como la ubicada en las riberas del río Jintsu, se vio afectada por el consumo de arroz proveniente de cultivos contaminados con Cd procedente de los vertimientos de las minas. Esta ingesta produjo una enfermedad conocida como Itai-Itai, u osteoartritis, cuyo principal efecto es la afectación del tejido óseo.⁶⁴ Otro caso relevante se dio en la población infantil de Torreón, Coahuila, en el Norte centro de México, donde se reportaron casos por envenenamiento de Pb proveniente de actividades industriales que incorporan este metal a la cadena alimenticia y al agua.⁶⁵

Los MP son considerados especies químicas persistentes, en el sentido de que no pueden ser degradados mediante procesos biológicos o antropogénicos. Una vez que estos han entrado en los ecosistemas acuáticos pueden ser transformados y distribuidos entre varias especies con distintas características. Así pues, los MP pueden encontrarse en animales (terrestres y/o acuáticos), plantas, hongos y bacterias; reinos entre los cuales existen especies adaptadas y resistentes a estos factores.^{66,67}

En mamíferos, sin embargo, la presencia de MP ha sido relacionada con procesos mutagénicos y de carcinogénesis, estos, a su vez, han sido relacionados con la participación de ERO's (especies químicas altamente reactivas capaces de causar daño en órganos y células). Los MP participan en reacciones de óxido-reducción (redox), en las cuales se producen las ERO's. Estas especies pueden participar en la activación de factores de transcripción que son sensibles a reacciones redox, o

bien estar implicadas en el proceso de señalización mitogénica⁶⁸ (proceso en el cual intervienen factores que actúan estimulando la división celular).

Otras patologías que pueden ser ocasionadas con la exposición crónica a MP son:¹

- + Arsénico: enfermedades de la piel (hiperqueratosis, hiperpigmentación, cáncer de la piel), hipertensión, trastornos gastrointestinales, diabetes mellitus, trastornos neurológicos.
- + Plomo: Inhibición de la biosíntesis del grupo hemo (grupo presente en distintas proteínas, entre las que destaca la hemoglobina), alteración de vías dependientes del calcio en donde el plomo “imita el comportamiento” de este inhibiendo su participación.
- + Mercurio: Asociado con varios trastornos como necrosis tubular renal, asma, dermatitis, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Alzheimer (EA) y enfermedad de Parkinson.
- + Cadmio: Edema pulmonar, capacidad de cruzar la barrera placentaria y alcanzar el tejido fetal ejerciendo efectos dañinos, neurotoxicidad, polineuropatía periférica (PNP) y efectos en la enfermedad de las neuronas motoras (MND).⁴

3.1.3 METALES PESADOS Y ERO's

El EO, es decir, el aumento en la producción de ERO's a causa de condiciones ambientales, agentes de presión externos, y un desbalance en la relación sistema antioxidante/agentes oxidantes, es considerado uno de los mecanismos subyacentes de toxicidad inducida por MP.^{1,2,47} Los MP son capaces de alterar la actividad de algunas enzimas, como la Paraoxonasa sérica 1 (PON1), una enzima antioxidante sintetizada en el hígado y que fluye a través del plasma sanguíneo. La PON1 se transporta en asociación con partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) ejerciendo un efecto protector contra la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y, en consecuencia, previniendo enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis.⁶⁹ Los MP también son capaces de disminuir la actividad de enzimas como la Superóxido dismutasa (SOD), lo que provoca la disminución en la eficiencia de la respuesta antioxidante del organismo,¹ y unirse a los grupos sulfhídrico, lo que eventualmente conduce a la perturbación de las vías enzimáticas y del metabolismo.⁴⁸ Así pues, gran parte del mecanismo del aumento en las ERO's puede explicarse en virtud de que este se genera en respuesta a un sistema antioxidante que no es capaz de metabolizar dichas ERO's debido a la interacción que tienen los MP con algunas enzimas de carácter antioxidante.

3.1.4 MERCURIO

El Hg es un metal líquido a temperatura ambiente, el cual puede formar tanto compuestos orgánicos como inorgánicos. Elementalmente, puede emitir vapores tóxicos y su inhalación puede causar intoxicaciones agudas y crónicas. Sin embargo, suele encontrarse también en forma molecular, como sulfuro o metilmercurio, este último es una de las formas más tóxicas y más fácilmente bioacumulables del metal. Entre sus consecuencias se encuentran el daño al sistema nervioso y al cerebro en estado fetal.⁶¹

3.1.4.1 MERCURIO Y ESTUDIOS CON ERO's

Estudios realizados con Hg respecto a su papel en el EO han mostrado que este presenta una alta incidencia en la generación de ERO's, debido a su capacidad de inhibición en ciertas enzimas.

Un estudio realizado en ratas de dos meses de edad en donde se evaluó la inducción de ERO's utilizando cloruro de mercurio (HgCl_2) como un agente inductor de EO, develaron un incremento de ERO's del grupo de ratas expuestas a HgCl_2 con respecto al grupo control (grupo de ratas no expuestas a agentes tóxicos), además de la disminución en la actividad de enzimas como la SOD. En este trabajo uno de los métodos de medición de la generación de ERO's fue el de la evaluación de la peroxidación lipídica a través de la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA por sus siglas en inglés) con el Malondialdehído (MDA).¹

Otros trabajos han buscado establecer la capacidad de ciertas enzimas, como la PON 1, para combatir la producción de ERO's generada a través de la contaminación por MP como el Hg y Cd.² En dicho trabajo se empleó el proceso de peroxidación lipídica (TBA-MDA) para delimitar el grado de producción de ERO's. Este constituye uno de los métodos más utilizados en la medición de la relación metal-producción de ERO's.^{70,71}

No sólo en mamíferos se ha establecido un nivel de producción de ERO's. En especies marinas, como el pez cebra, se evaluó la toxicidad del HgCl_2 (una de las formas inorgánicas que presenta el Hg, las cuales representan el mayor porcentaje de presencia del metal transmitido en el agua) y su papel en el EO y en la alteración de enzimas como la Catalasa (CAT), la Glutación peroxidasa (GPX) y la Glutación S-transferasa (GST) (Esta última medida utilizando como sustrato DNCB). Se observó que a mayor concentración de HgCl_2 (16 $\mu\text{g/L}$) aumentaba la concentración de ERO's, medida a través del método TBA-MDA, a la par de que disminuía la actividad de GPX. Sin embargo, también se observó que aumentaban la actividad de las enzimas CAT y GST. Estableciendo una respuesta al EO generado.⁴⁹

En organismos como el *Perinereis aibuhitensis*, un poliqueto marino denominado comúnmente lombriz coreana, muy apreciado en la pesca de recreo, y que puede servir como bioindicador de la exposición y contaminación por MP, se midió la actividad de enzimas como SOD y GPX a diferentes

concentraciones de HgCl_2 . Para ambas enzimas se encontró que al aumentar la concentración del agente tóxico su actividad disminuyó.⁷² En *Cyprinus carpio*, una carpa producida en países como México, Japón, China e India y consumida en muchos otros, se evaluó la relación entre el EO inducido por Hg^{+2} (HgCl_2) y la toxicidad presentada por esta especie. Se estudiaron muestras de sangre, cerebro, hígado y branquias, en donde se encontró que el efecto del tóxico sobre la actividad enzimática de SOD, CAT y GPX dependía del órgano de estudio. El daño por EO se midió a través de la evaluación del proceso de peroxidación lipídica (TBA-MDA).⁷³

Así pues, se puede observar que el Hg constituye, dentro del grupo de MP, uno de los principales precursores de la generación de ERO's. Y que es un potente agente contaminante para diferentes especies de mamíferos, así como también para la mayoría de las especies que habitan ecosistemas acuáticos.

3.1.5 CADMIO

A la par con el Hg, el Cd es otro metal reconocido como una especie altamente tóxica, que puede dañar órganos como cerebro, hígado, riñón, pulmones y testículos. Los efectos nocivos generados por el Cd en estos órganos suelen estar implicados con las ERO's, pues hay evidencia de la producción de radicales libres en animales después de una sobrecarga aguda de Cd, el cual suele provocar procesos de intoxicación generando nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, aparición de tumores, entre otros.³

3.1.5.1 CADMIO Y ESTUDIOS CON ERO'S

Es bien aceptado que el EO juega un papel importante en la intoxicación aguda por Cd. Este es capaz de generar aniones superóxido ($\text{O}_2^\bullet$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$), mismos que han sido detectados por espectros de resonancia de espín electrónico.³

En ratas, un estudio reveló que el Cd es altamente acumulable en el plexo coroideo (estructura vascular del encéfalo encargada de formar el líquido cefalorraquídeo). Dicha acumulación ha sido explicada en función de la expresión de metalotioneínas (MT). Estas son proteínas que son inducidas por MP esenciales como el Cu y el Zn (ya que participan dentro del metabolismo de estos elementos), poseen un alto grado de afinidad a metales tóxicos como el Cd, debido al grupo tiol de las cisteínas que presentan en su estructura.⁷⁴ De forma similar, también se ha observado un aumento en la peroxidación lipídica en varias áreas del cerebro como el cerebelo y la corteza después de la exposición al Cd, presumiblemente, debido al EO y a la producción de ERO's.⁷⁵ En el caso del riñón, se ha observado que las MT son las vías con las cuales el Cd entra al órgano a través del complejo cadmio-metalotioneína (Cd-MT).⁷⁶ Estudios realizados por otros grupos de

investigación han demostrado que la exposición a Cd en algunos animales y en plantas puede inducir la expresión de las MT, lo cual indica que estas proteínas podrían jugar un papel dentro de los mecanismos de defensa celulares para abatir los efectos de la exposición a este agente contaminante.

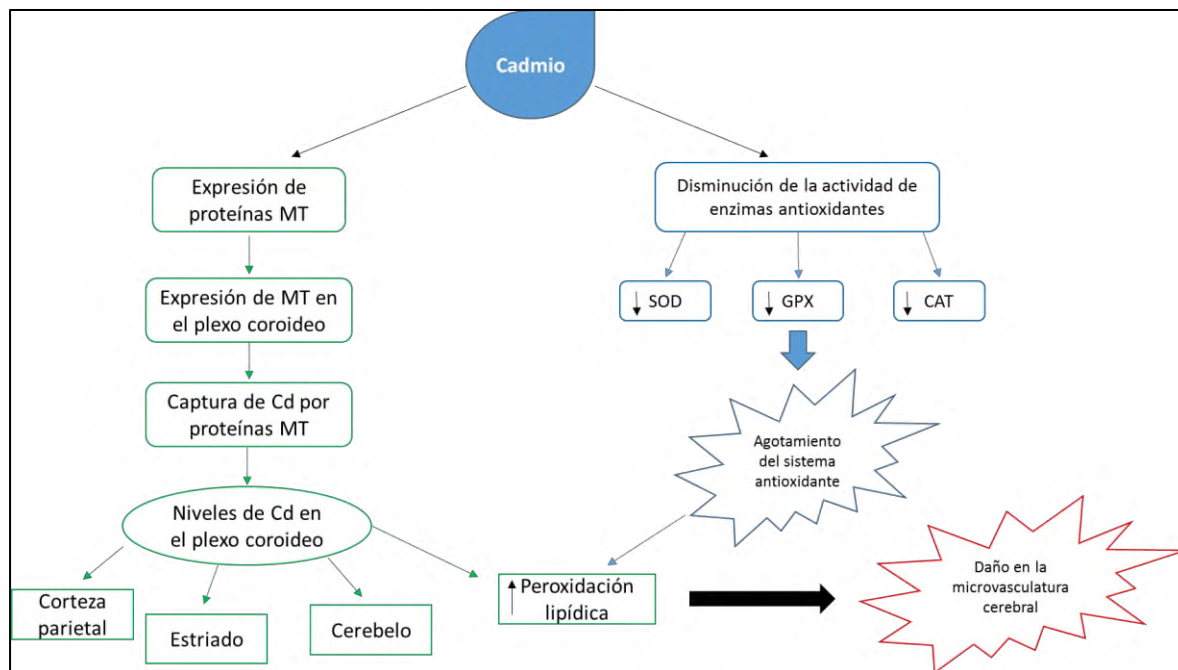


Figura 10. Esquema que ilustra las vías de la toxicidad neuronal causada por la exposición al cadmio. Modificado de: Akash, M.S.H *et. al.*⁴

En la Figura 10 se puede observar un esquema del mecanismo de toxicidad neuronal causada por Cd. Como se mencionó, un aumento en la exposición de Cd incrementa la generación de peroxidación lipídica, con el consecuente daño cerebral microvascular. De la misma manera puede inducir la síntesis de la proteína y usarla como un quelante de liberación prolongada del metal tóxico. Esto la convierte en un factor que, en el caso del cadmio, podría tener efectos positivos, pero también negativos en lo relacionado con el proceso de intoxicación por el metal mencionado.

En el caso de los organismos vegetales, estos suelen estar expuestos a la producción y acción continua de partículas dañinas y condiciones de EO. Durante este se observa un aumento de la producción de ERO's, lo que provoca daños en los tejidos e incluso la muerte. En plantas, la toxicidad del Cd ha sido ampliamente estudiada y se ha establecido que el EO constituye el principal mecanismo de fitotoxicidad descrito hasta el momento.⁷⁷

Para *Conocarpus erectus* L., una especie importante en la conservación del suelo y control de la erosión, se estudió el efecto de la salinidad con respecto a la acumulación de Cd y sus efectos tóxicos. En el estudio se encontró que tanto el Cd por sí solo, así como un aumento en la salinidad, provocaba una disminución en la biomasa de los brotes y las raíces, el contenido de agua en las hojas y el contenido de pigmentos, acentuándose el efecto en la combinación Cd + salinidad. También se encontró que para ambos casos existió un aumento en la producción de ERO's y de la peroxidación de lípidos.⁷⁸

Los organismos acuáticos también se encuentran expuestos a la contaminación por Cd. En el caso de *Procambarus clarkii* (cangrejos de agua dulce que pueden servir de indicadores del impacto de los MP en el ambiente), se realizó un estudio exponiendo a estos organismos a distintas concentraciones de Cd con distintos tiempos de exposición, evaluando el daño causado por la peroxidación lipídica (medida a través del método TBA-MDA) en el hepatopáncreas y la respuesta de su sistema antioxidante a través de la medición de la actividad de enzimas como SOD, CAT y GST (utilizando como método de medición para esta última la reacción entre el GSH y el DNCB). Para las enzimas SOD y CAT sólo se observó un aumento significativo de la actividad con respecto a la relación dosis-tiempo de exposición a raíz de que este alcanzó las 48 horas (SOD) y las 72 horas (CAT). En tanto para la GST, se observó un aumento concordante con la relación dosis-tiempo de exposición a partir de las 24h, alcanzando un incremento en la actividad de hasta un 60% con respecto a la actividad de GST medida del organismo control.⁵⁰

En base a lo comentado anteriormente, se torna evidente que tanto el Cd como el Hg pueden inducir EO por el aumento de las ERO's en distintos tipos de especies. Aliciente a esto es el hecho de que sean además una fuente de contaminación cuya presencia en distintos medios ambientes hacen de ellos un objeto de estudio necesario.

3.2 ANTECEDENTES DE LA GLUTATION S-TRANSFERASA

Dentro de la naturaleza existen enzimas que se encuentran formando familias de proteínas que se distribuyen en los diferentes organelos celulares de distintas especies. Ello es debido a su gran importancia biológica dentro de procesos tan impresionantes como la evolución. La enzima Glutación S-transferasa (GST) constituye un ejemplo de este tipo de enzimas y es por ello que se ha convertido en un objetivo de investigación del grupo de Bioquímica de la Universidad del Papaloapan. Esta familia enzimática cuenta con una variedad sustancial de estructuras y funciones metabólicas. Dos de sus funciones más importantes son su participación dentro del proceso celular de desintoxicación y su posible papel dentro del metabolismo antioxidante.^{5,7} Este tipo de proteínas pueden encontrarse en sistemas eucariontes y procariontes, ya sea en el citoplasma, en los microsomas o en las mitocondrias.³⁰

Desde la década de 1960, se han aislado y caracterizado múltiples clases de GST. En relación con su actividad, esta fue reportada por primera vez en 1961 al determinarla en el citosol de células hepáticas. Las isoformas de GST tienen actividades que podrían determinarse dependiendo del compartimiento en el que se encuentren. Por ejemplo, las localizadas en el citoplasma son más importantes en el metabolismo de los fármacos y las sustancias xenobióticas, en tanto que las GST's microsomales son importantes en metabolismo endógeno de leucotrienos y prostaglandinas.^{38,79} Diez años después del descubrimiento de la enzima en mamíferos, esta fue descubierta en plantas, en donde se observó su relación con el proceso de desintoxicación de sustancias exógenas como los herbicidas.⁸⁰ En bacterias Gram negativas e incluso en algunos organismos del dominio arquea, como la familia de *Halobacteriaceae*, también se ha encontrado y estudiado. Es en bacterias también, que, además de las familias de enzimas GST citosólicas, microsomales y mitocondriales, se ha identificado una cuarta familia (FosA, Fos B y FosX), exclusiva para estos organismos, y que comprende proteínas de resistencia a la fosfomicina (un antibiótico bactericida).^{31,81}

3.2.1 GST Y SU PAPEL EN EL ESTRÉS OXIDATIVO

La enzima GST ha sido vinculada con una gran variedad de actividades metabólicas, entre las cuales se encuentran la participación de esta en la fase II del metabolismo de los xenobióticos, así como en el metabolismo de leucotrienos y prostaglandinas. Ha sido establecida como un posible mecanismo de prevención del proceso de carcinogénesis a partir de la inactivación de moléculas como benzopirenos o nitrosaminas metiladas (Figura 11). De la misma manera se ha determinado su participación en la vía de transducción de señales. Aunado a esto también se ha postulado como bioindicador de daño en órganos como hígado y riñón.³³⁻³⁷

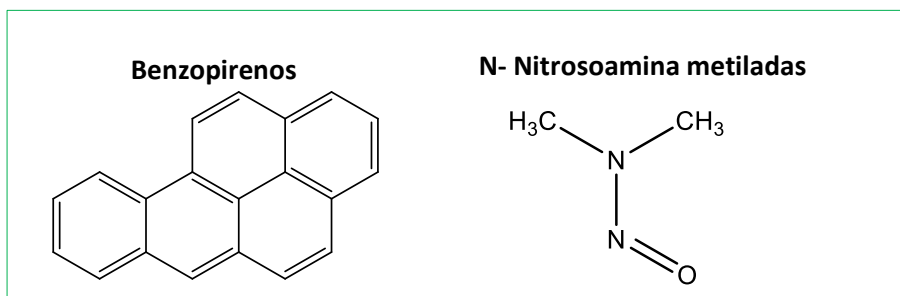


Figura 11. Estructuras de los Benzopirenos y Nitros aminas metiladas. Moléculas potencialmente carcinogénicas. Propia autoría.

Recientemente, se le ha conferido otra función metabólica importante dentro del metabolismo oxidativo como una enzima de respuesta ante el estrés. Por ejemplo, en mamíferos y plantas se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), molécula precursora de radicales libres, es capaz de inducir la síntesis de la enzima. Dicha inducción parece representar una respuesta

adaptativa de parte de los organismos, teniendo en cuenta que estas enzimas participan en la desintoxicación de los metabolitos tóxicos que contienen grupos carbonilos, peróxidos y epóxidos, producidos dentro de la célula a causa del EO.⁵

En ostras de *Crassostrea gigas* se midió la respuesta de la GST ante la exposición a diésel y distintas concentraciones de salinidad (puesto que las respuestas bioquímicas en moluscos bivalvos se emplean comúnmente en estudios ambientales como biomarcadores de contaminación acuática). Las ostras expuestas únicamente a distintas concentraciones de salinidad no generaron un aumento significativo ni en la actividad de la GST ni en los niveles de MDA, sin embargo, el efecto provocado por el diésel cuando se administraba junto con este indujo un incremento tanto en los niveles de MDA como en la actividad de la enzima formando parte de un mecanismo dosis-respuesta. En algunos casos (salinidad 25 ppt y diésel 1 mL/L) la actividad de la GST se mantuvo elevada incluso una semana después de depuración en agua limpia.⁵¹

En el bagre amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*) se evaluó el efecto del triclosán (un agente antibacteriano de amplio espectro, detectado universalmente en ecosistemas acuáticos en los últimos años) en el sistema de desintoxicación de este organismo, tanto para la fase I como para la fase II. Para la fase II se midió, entre otros aspectos, la actividad de la enzima GST y los niveles de MDA, en donde se detectó un aumento en la actividad de la GST poco relacionada con el aumento de MDA.⁵²

3.2.1.1 ANTECEDENTES DIRECTOS POR EL GRUPO DE BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

El grupo de investigación de Bioquímica de la Universidad del Papaloapan ha estudiado la enzima GST y su relación con MP. Navarro en 1999, realizó un estudio *in vivo* en ratas de la cepa Wistar expuestas a 500 ppm de plomo durante siete meses vía oral. Los resultados mostraron una relación directamente proporcional entre la actividad de la Glutación S-transferasa y la exposición a plomo en riñón, orina y suero. Debido a ello se propuso que el incremento de la actividad enzimática podría implicar una relación directa con la formación de las ERO's.⁸² Hernández en 2013, estableció un modelo experimental *in vivo* fundamentado quimiométricamente, en donde se reforzó la propuesta por Navarro de la relación entre la actividad enzimática de la Glutación S-transferasa con el aumento de ERO's, como consecuencia de la intoxicación con plomo en ratas Wistar macho.⁸³ Méndez en 2016, estudió la actividad de la GST *in vivo* en ausencia y presencia de plomo en el riñón y un posible tratamiento con diferentes antioxidantes. Observó que el daño renal por la intoxicación con plomo aumentó la concentración de ERO's y también aumentó la actividad de la GST. El tratamiento con extractos naturales, ricos en antioxidantes externos (Aloe vera y Blue Berry) ayudaron a disminuir el aumento de ERO's ocasionado por exposición al metal, así como a reestablecer la actividad de la GST y finalmente a disminuir los daños renales.⁸⁴ Cruz en 2016, realizó estudios de la actividad de la GST *in vivo* en presencia y ausencia de Hg en el riñón y

los efectos de un tratamiento con micronutrientes (Selenio y zinc) y el agente quelante ácido dimercapto succínico (DMSA). Observó que la actividad de la GST incrementó en presencia de Hg, (no así las ERO's) y una disminución de la actividad de algunas enzimas del sistema antioxidante celular como la CAT, y la SOD. El tratamiento con los micronutrientes selenio y zinc activó las defensas antioxidantes enzimáticas celulares y la remoción del Hg con el agente quelante DMSA, redujo los daños renales y la actividad de la GST se reestableció.⁸⁵ Raymundo, también en 2016, estudió la dinámica molecular de la interacción de la GST con el ligante glutatión reducido (GSH) y el sustrato DNCB, observando los residuos involucrados en la catálisis enzimática, el efecto estructural ocasionado por el Pb y el establecimiento de un posible modelo teórico-experimental de la actividad de la GST y la inhibición por Pb en experimentos *in vitro*.⁸⁶ Zilli, 2020, realizó estudios en ratas hembras expuestas a Pb y tratadas con hormonas. Se encontró que la exposición al metal por sí sólo, no generaba un aumento, ni de la actividad GST ni de las ERO's. En cambio, el tratamiento Pb + hormonas, desencadenaba un aumento de la actividad enzimática en órganos como el cerebro y riñón, y un incremento de ERO's en cerebro.²³⁰ De la misma manera, se realizaron estudios de susceptibilidad a Pb en roedores pre-expuestos a este metal por cuatro meses. Se encontró que en los organismos expuestos vía a oral a Pb o Hg después de la pre-exposición al primero, las ERO's y la actividad de la GST aumentaban en órganos como el riñón y cerebro, principalmente.²³¹ Finalmente se ha comenzado a ampliar el estudio de la enzima en microorganismos como bacterias, algas, hongos y levaduras en presencia de los metales Pb, Cr, Cd y Hg debido a que son cuatro de los metales que se encuentran involucrados en la contaminación ambiental y el daño a los seres vivos.

La importancia que representa la GST en el metabolismo oxidativo es tal, que existen estudios enfocados en optimizar aún más sus propiedades, tales como el sitio de unión con el GSH, la estabilidad térmica y la estabilidad oxidativa. Todo ello a través de la evolución dirigida.⁸⁷

3.2.2 PAPEL DE LA GST EN DIFERENTES ESPECIES.

La enzima Glutatión S-Transferasa es una proteína presente en una numerosa variedad de seres vivos. Su presencia ha sido determinada en organismos de clases como mamíferos e insectos, ha sido encontrada también en peces, aves, plantas, bacterias e incluso ha sido determinada su presencia en organismos del dominio arquea.^{31,88} Lo anterior le proporciona un valor taxonómico y evolutivo importante debido a que, posiblemente, pudo ayudar a la sobrevivencia de muchas especies a lo largo del tiempo.

Dentro de la inmensa gama de organismos existentes, se encuentran aquellos que se han podido adaptar a diversas condiciones de estrés como el oxidativo. La presencia y capacidad de respuesta de la GST ha sido estrechamente relacionada con la capacidad de algunos organismos de desarrollarse en medios contaminados y bajo condiciones de EO.

En este trabajo se proponen cuatro organismos en los cuales la relación anterior no ha sido examinada o determinada. No obstante, se han reportado trabajos en los cuales algunas de estas especies, o algunos otros microorganismos emparentados, se han relacionado con algunos MP, con el EO o con la presencia y/o actividad de la enzima.

3.2.2.1 *Candida Parapsilosis*

Candida Parapsilosis es una levadura perteneciente al género Cándida, al reino Fungi y al dominio Eukarya. Fue aislado por primera vez en 1928 a partir de muestras de piel y uñas de las manos de enfermeras y otros profesionales del área de salud, por lo que se ha establecido que esta levadura forma parte de la flora comensal humana normal.⁸⁹ Pertenecientes también al mismo género se encuentran *Candida Oleophila*, *Candida Glabrata* y *Candida Albicans*.

C. Glabrata es un patógeno fúngico común en el tracto gastrointestinal que ha desarrollado una alta resistencia a las ERO's. Uno de los mecanismos claves en la defensa contra microorganismos es la destrucción de estos al someterlos a una exposición de especies reactivas de oxígeno producidas, por ejemplo, por el complejo NADPH oxidasa en células fagocíticas (tipo de célula inmunitaria que puede rodear y destruir microorganismos, ingerir material extraño y eliminar células muertas). Este complejo tiene la capacidad de catalizar la producción de aniones superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) y por consiguiente la formación de radicales libres. Los microorganismos como *C. Glabrata* deben contar, por tanto, con un sistema antioxidante capaz de contrarrestar la explosión oxidativa destinada a eliminarlas. Este sistema está constituido por enzimas de carácter antioxidante como la SOD, la CAT, y enzimas que utilizan el glutatión para catalizar distintas reacciones (Glutatión Peroxidasa (GPx) y Glutatión Reductasa (GR)).⁹⁰

C. Glabrata y *C. Albicans*, por ejemplo, han demostrado ser resistentes al H_2O_2 , llegando a resistir dosis de este veinte veces mayor que la dosis letal para *Saccaromyces Cerevisiae* (*S. Cerevisiae* es un organismo que ha sido fundamental para la comprensión de la respuesta del EO eucariótico de múltiples facetas). La resistencia mostrada por *C. Glabrata* y *C. Albicans* ha sido relacionada con la capacidad de inducción de estos organismos para la enzima CAT.⁹¹

Trabajos realizados con *C. Oleophila* la han propuesto como agente de control biológico contra las enfermedades postcosecha de frutas como la manzana. En ellos se ha encontrado que la resistencia al calor, al EO y al estrés ácido y su eficacia como biocontrol pueden aumentar después de la exposición a 1M de NaCl y a 5 mM H_2O_2 .^{92,93}

Se ha evaluado la inducción de ERO's generada por fluconazol en cepas de *C. Glabrata* susceptibles y resistentes a éste en la fase de crecimiento estacionario y se ha medido la activación de enzimas antioxidantes como Glutatión peroxidasa (GPx), SOD y GST. La medición de la actividad de la enzima GST fue llevada a cabo a través de la formación del S-(2,4-dinitrofenil)-

glutación, es decir, a través de la reacción del GSH y el DNCB, y se encontró que las cepas susceptibles mostraron una mayor actividad de GST con respecto a las resistentes. Sin embargo, la actividad al momento de la exposición a fluconazol disminuyó para las cepas susceptibles, en tanto que para las resistentes se vio aumentada. Además de ello, el daño oxidativo provocado por el fluconazol fue medido a través de la cuantificación de MDA (lípidos), carbonilo (proteínas) y 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) (DNA), junto con la medición indirecta de óxido nítrico.⁹⁴

3.2.2.2 *Penicillium sp*

P. sp es un organismo perteneciente al dominio Eukarya, al reino Fungi y al género *Penicillium*. Forman parte del mismo género también *Penicillium Citrinum*, *Penicillium Chrysogenum* y *Penicillium Digitatum*. En estos organismos ha sido estudiado el EO desde distintas perspectivas. *P. Citrinum* ha sido propuesto como un organismo con alto potencial antioxidante.⁹⁵ Para *P. Chrysogenum* (una cepa importante que se utiliza para la producción industrial de antibióticos β -lactámicos-penicilina), fue clonado un nuevo gen de GST conocido como PcgstB. Los estudios sobre GST en hongos son relativamente raros y para este género aún más. Las enzimas GST fúngicas más caracterizadas son diferentes de las clases comúnmente encontradas en mamíferos, plantas, insectos o bacterias,⁹⁶ sin embargo, la actividad para las GST de *P. Chrysogenum* se midió a través del método de la reacción del ligante GSH con el sustrato DNCB.²⁷

En otro trabajo se evaluó el efecto de *P. Digitatum* (inducido por limoneno) en la generación de moho verde en cítricos mediante la regulación de la homeostasis de ERO's. En dicho trabajo se encontró que el crecimiento de esporas de *Penicillium* aumentaba la aparición del moho. También se determinó que la exposición de *P. Digitatum* a limoneno (0.25 μ M) después de 5 horas reducía las ERO's presentes en las esporas con respecto a los grupos control. Además de ello, el contenido de ERO's, tanto para el grupo control como para el expuesto a limoneno, disminuía de 0 a 5 horas, pero aumentaba nuevamente transcurridas 7 horas. Aunado a esto, la medición de la actividad de la enzima GST (una de las enzimas antioxidante medidas además de la CAT y la SOD) mostró una relación inversa con el contenido de ERO's aumentando su actividad transcurridas 5 horas, pero disminuyendo esta después de 7 horas. Encontrando que a mayor actividad de GST, menor contenido de ERO's en las esporas y viceversa.⁹⁷

3.2.2.3 *Rattus Norvegicus* (Wistar)

En mamíferos, el estudio del EO, capacidad antioxidante y/o contaminación por MP suele llevarse a cabo en modelos de ratas. La especie *R. Norvegicus*, en particular las ratas de la cepa Wistar, desarrolladas en el Instituto Wistar en 1906 para su uso en la investigación biológica y médica, son una cepa de ratas que sirven como organismo modelo para el estudio y entendimiento de diversos procesos bioquímicos llevados a cabo en mamíferos. Una amplia variedad de investigaciones sobre

el efecto de sustancias exógenas y dañinas al organismo, como aquellas generadoras de EO se han llevado a cabo con estas cepas. Se han evaluado en ratas Wistar, por ejemplo, el daño renal inducido por arsénico e intensificado a través de la aplicación de imidacloprid (un insecticida usado en el manejo de insectos y plagas en la agricultura y el control de pulgas en perros y gatos). El daño celular fue determinado a través de la medición de los niveles de MDA por el método MDA-TBA y por el producto de la oxidación avanzada en proteínas (AOPP) en el tejido renal. Además de ello se midió también la actividad de distintas enzimas antioxidantes como la CAT, SOD, GPx, GR y GST. Esta última determinada a través de la formación del complejo GSH-DNCB. Se encontró pues que el imidacloprid potencia el daño renal inducido por arsénico, provocando un aumento en la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas.⁹⁸

Otro compuesto evaluado a través de ratas Wistar, en este caso hembras, fue el diepóxido de 4-vinilciclohexeno (un químico ocupacional reportado que agota los folículos ováricos en roedores). Para este compuesto se evaluaron biomarcadores de inflamación, alteración endocrina, apoptosis y daño oxidativo. El 4-vinilciclohexeno indujo un desequilibrio hormonal en las ratas, además de aumentar el nivel de MDA ovárico y uterino, y las actividades de CAT, GPx y GST.⁹⁹

Otro estudio hecho en ratas Wistar embarazadas mostró la primera evidencia de que la exposición materna al tricloroetileno (TCE), compuesto asociado con la disminución del peso al nacer y al parto prematuro, aumenta los marcadores de EO en la placenta, como el de la actividad de la GST-Pi (clase predominante en la placenta, medida a través de la reacción de GSH con DNCB). Estableciendo un posible mecanismo de acción del TCE en la restricción de crecimiento fetal.¹⁰⁰

En cuanto a MP, existen trabajos dedicados a evaluar la toxicidad de estos en diversos órganos. Se ha trabajado con ratas Wistar sometidas a CdCl_2 vía intragástrica por 30 días, evaluando su toxicidad en tejidos cardíacos y eritrocitos. Proporcionando evidencias de que el desequilibrio inducido por Cd en el sistema oxidante-antioxidante es contribuyente de diversas enfermedades cardíacas. Entre los factores que se analizaron en este trabajo se encuentran análisis morfológicos de eritrocitos y tejido cardíaco, evaluación del daño al ADN, daño en tejidos cardíacos y plasma por la peroxidación lipídica, carbonilación de proteínas y análisis de antioxidantes en sangre y tejido (GSH, CAT, SOD y GST). Se encontraron morfologías anormales para eritrocitos y daños histológicos en el tejido, promoción de apoptosis en cardiomiocitos (células del músculo cardíaco capaces de contraerse de forma espontánea e individual), y disminución del sistema antioxidante de las ratas expuestas a Cadmio.¹⁰¹

Aunado a este y otros trabajos se pueden citar también los estudios hechos con MP como el Pb realizados por el grupo de investigación de bioquímica de la Universidad del Papaloapan, utilizando también como cepas de estudio a ratas Wistar.⁸²⁻⁸⁶

Así pues, se puede concluir que las ratas Wistar constituyen en mamíferos un modelo de estudio óptimo para el análisis de diversos procesos bioquímicos (entre ellos el EO provocado por intoxicación con MP).

3.2.2.4 *Hafnia Alvei*

A diferencia de las tres especies citadas anteriormente, *H. Alvei* no pertenece al dominio Eukarya sino al de Bacteria. Se trata de una bacteria gram negativa, no esporulada, aeróbica facultativa y móvil gracias a flagelos peritricos. Perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y al género *Hafnia*. Originalmente fue asignada al género *Enterobacter* debido a las similitudes en sus perfiles bioquímicos, sin embargo, gracias a un estudio de hibridación de ADN que reveló que tenía una proporción de unión de sólo 20% con *Ent. Cloacae* fue, posteriormente, reasignada a su propio género, constituyendo la única especie de este.¹⁰² Se ha encontrado a *H. Alvei* en diferentes nichos ecológicos, a nivel ambiental se ha aislado de ambientes acuáticos, suelos y alimentos. Además, forma parte de la microbiota normal de mamíferos, aves, reptiles y peces. En el ser humano en específico, *H. Alvei* ha sido identificada como especie entérica y ocasionalmente ha sido implicada tanto en infecciones intestinales como extraintestinales.¹⁰³

En cuanto a las condiciones ambientales de crecimiento, esta especie es capaz de proliferar en distintos tipos de entornos. *H. Alvei* es capaz de hacer uso de diferentes fuentes de carbono para su desarrollo y subsistir en intervalos de temperatura que comprenden los 4–20 °C (temperaturas encontradas en las cadenas de alimentos de conservación y los ambientes acuáticos de los peces) y los 37–42 °C (temperatura corporal de los humanos y las aves).¹⁰⁴

Hafnia ha sido estudiada como un microorganismo resistente a MP en suelos y efluentes.^{105,106} En el primero se determinó la presencia de esta junto con otras especies de bacterias en muestras de suelo contaminadas por MP a causa de una fábrica industrial química. Lo que sugiere una elevada capacidad de resistencia de *Hafnia* a estas especies químicas.¹⁰⁵ En tanto que en el segundo estudio se evaluó la resistencia y capacidad de asimilación de metales como Pb, Cd y Cr por una cepa aislada de efluentes de curtiembre, la cual mostró una mayor sensibilidad hacia Cr.¹⁰⁶

La capacidad de crecimiento de *H. Alvei* en ambientes contaminados por MP y la facultad que posee en la captación de estos la convierten en un organismo atractivo para el estudio del efecto de estas especies químicas y su relación con el EO y la actividad de la enzima GST, hasta ahora no explorada.

4. JUSTIFICACIÓN

Los MP como el Hg o el Cd constituyen una frecuente fuente de contaminación en la mayoría de los ecosistemas. En un amplio espectro de concentraciones pueden causar numerosos desórdenes metabólicos, por lo que su monitorización representa un factor importante en la prevención de patologías derivadas de las bajas o altas exposiciones a estas especies químicas por períodos de tiempo variables.

Cuando se habla de los efectos de la exposición a MP no esenciales se pueden mencionar una gran variedad de fenómenos, entre los cuales se encuentra el daño a macromoléculas esenciales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos mediante un proceso subsecuente a la aparición de ERO's. Ante dicho problema, se han tratado de establecer bioindicadores de esta condición, siendo las enzimas las macromoléculas más estudiadas.

La enzima GST es una enzima que puede ser abordada en el estudio de exposición o daño por MP no esenciales, debido a que se le ha relacionado con los procesos dependientes de ERO's generados por una amplia gama de agentes tóxicos. Una de las formas para estudiar este posible papel es la determinación de la actividad de la enzima en organismos de distintas especies.

En este trabajo se estudió el efecto de la exposición a CdCl_2 y HgCl_2 (por separado y en relación) en organismos aislados de ambientes contaminados de la región de Tuxtepec en la actividad total de la enzima GST, con la finalidad de establecer una relación entre la dosis del metal, la generación de ERO's y la actividad de la enzima Glutación S-transferasa para poder establecer su posible papel como proteína indicadora de daño oxidativo generado por la intoxicación con MP.

5. HIPÓTESIS

La exposición a los MP HgCl_2 y CdCl_2 aumentará la generación de ERO's, mismas que desencadenarán un incremento en la actividad de la enzima Glutación S-transferasa en las especies *H. Alvei*, *C. Parapsilosis*, *P. sp* y *R. Norvegicus* de la cepa Wistar.

6. OBJETIVOS

6.1 GENERAL:

Determinar la relación que guarda la actividad de GST con la generación de ERO's como consecuencia de la exposición a los MP Hg y Cd en las especies *H. Alvei*, *C. Parapsilosis*, *P. sp* y *R. Norvegicus* de la cepa Wistar.

6.2 ESPECÍFICOS:

- 1.- Llevar a cabo un estudio dosis-respuesta, evaluando el efecto de diferentes concentraciones de Hg y Cd sobre el crecimiento de las especies *R. Norvegicus* de la cepa Wistar, y, de manera microbiológica, *H. Alvei*, *C. Parapsilosis* y *P. sp*,
- 2.- Determinar las concentraciones en donde se observe inhibición y tolerancia a los metales Hg y Cd en las especies *H. Alvei*, *C. Parapsilosis*, *P. sp* y *Rattus Norvegicus* de la cepa Wistar.
- 3.- Determinar la actividad *in vivo* de la GST en condiciones normales de crecimiento y desarrollo para las especies: *H. Alvei*, *C. Parapsilosis*, *P. sp* y *Rattus Norvegicus* de la cepa Wistar.
- 4.- Determinar la actividad *in vivo* de la GST en presencia de las concentraciones en las cuales Hg y Cd causen tolerancia e inhibición para las especies: *H. Alvei*, *C. Parapsilosis*, *P. sp* y *Rattus Norvegicus* de la cepa Wistar.
- 5.- Cuantificar las ERO's para las especies: *H. Alvei*, *C. Parapsilosis*, *P. sp* y *Rattus Norvegicus* de la cepa Wistar en condiciones normales de crecimiento.
- 6.- Cuantificar las ERO's para las especies: *H. Alvei*, *C. Parapsilosis*, *P. sp* y *Rattus Norvegicus* de la cepa Wistar en presencia de las concentraciones en las cuales Hg y Cd causen tolerancia e inhibición.

7. METODOLOGÍA

A continuación, se describe la metodología seguida para el estudio propuesto en este proyecto. La Tabla 4 muestra las especies que fueron objeto de estudio en este trabajo. Tres de ellas distribuidas en el dominio Eucaria y una en el dominio Bacteria como se muestra en la Figura 12.

Tabla 4. Especies a utilizar para la realización del estudio bioquímico.

Bacteria	Levadura	Hongo	Mamífero
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Candida Parapsilosis</i>	<i>Penicillium sp</i>	Ratas Wistar

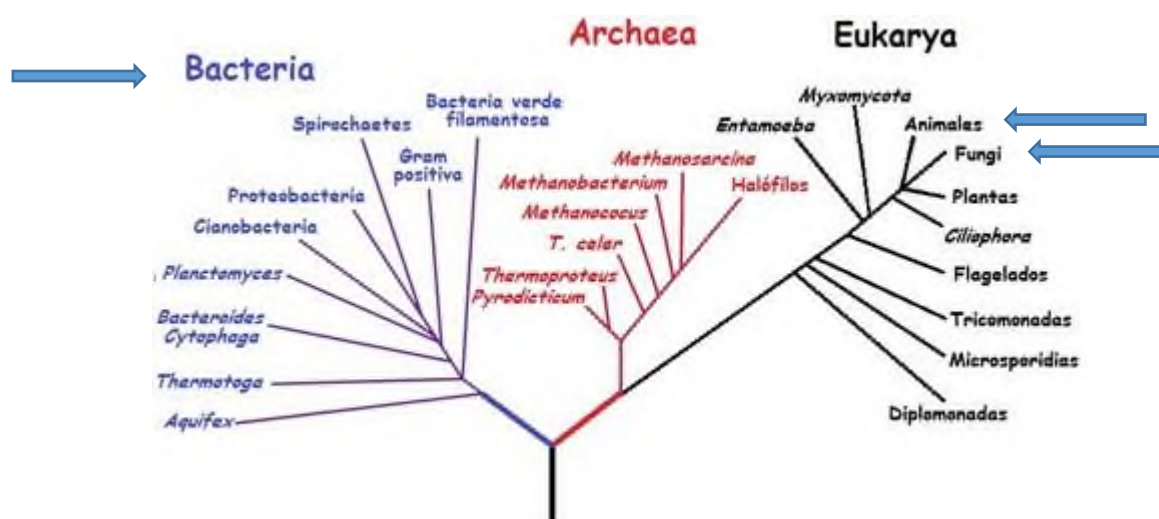


Figura 12. Árbol filogenético que comprende las distintas especies establecidas en los tres dominios, Bacteria, Arquea y Eucaria. Los organismos de estudio comprenden el dominio Bacteria (*Hafnia alvei*) y Eucaria (*Candida Parapsilosis*, *Penicillium sp* y ratas Wistar).

7.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES TOLERANTES E INHIBITORIAS DE Hg Y Cd EN LAS ESPECIES DE ESTUDIO.

La determinación de las concentraciones de Hg y Cd para la realización de los ensayos de inhibición y tolerancia en el crecimiento de las distintas especies de estudio se llevó a cabo con la finalidad de establecer las concentraciones de metales posteriormente empleadas en la cuantificación de la actividad de la GST y de las ERO's. Las concentraciones base utilizadas de HgCl_2 y CdCl_2 comprendieron un intervalo de $0.05\mu\text{M}$ a 6.59mM . Estas se tomaron como base de inicio debido a las observaciones llevadas a cabo en un estudio previo, realizadas dentro del grupo de investigación de Bioquímica de la Universidad del Papaloapan.¹⁰⁷

7.1.1 *Hafnia Alvei* & *Candida Parapsilosis*

Tanto para la bacteria *H. alvei* como para la levadura *C. Parapsilosis* se llevó a cabo el mismo proceso de determinación de las concentraciones de Hg y Cd. Ambos se sembraron por los métodos de estría y expansión (Figura 13). El primero con la finalidad de observar tanto la morfología colonial como microscópica de los microorganismos. El segundo método empleado para evaluar la inhibición del crecimiento radial de ambos organismos. Se utilizó un asa de Digralski para llevar a cabo el sembrado, a partir de un volumen conocido (100µL) del organismo sembrado en medios de cultivo específicos. Para la evaluación de la inhibición del crecimiento radial se utilizaron discos de papel filtro estériles embebidos en concentraciones crecientes de HgCl_2 y CdCl_2 , los discos se depositaron en el sembrado del microorganismo. Después de 24h se midió el diámetro del halo de inhibición de crecimiento y en base a los resultados se determinaron las concentraciones a utilizar para realizar los experimentos de medición de actividad de GST y cuantificación de ERO's. El procedimiento se efectuó por triplicado y los medios de cultivo utilizados para *H. alvei* y *C. Parapsilosis* fueron Mueller-Hinton (M-H) y Sabouraud, respectivamente. El primero es un medio utilizado internacionalmente para procedimientos de evaluación de resistencia y crecimiento bacteriano.^{108,109} El segundo, por otro lado, es un medio cuyas características permite el crecimiento y enriquecimientos de las características del organismo a evaluar.

El procedimiento descrito anteriormente se basó en el método de difusión de discos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, descrito por el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST por sus siglas en inglés).¹¹⁰ Una vez realizado este y elegidas las concentraciones de MP a utilizar, se hizo una estandarización por medio de los métodos de cinética de crecimiento y unidades formadoras de colonias (UFC) con el fin de determinar los tiempos de crecimiento óptimos para la evaluación de la actividad de la enzima GST y la cuantificación de ERO's.⁴⁶

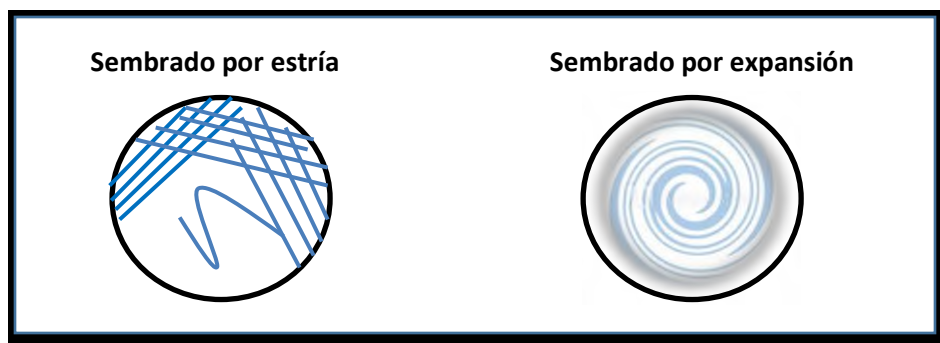


Figura 13. Representación de las técnicas de sembrado por estría y por expansión. *Propia autoría.*

7.1.2 *Penicillium sp.*

Para *P. sp* el sembrado se generó por el método de picadura, utilizado para observar el efecto de las diferentes concentraciones en el crecimiento del hongo en el medio de cultivo Sabouraud, al cual se le añadieron las concentraciones de MP a evaluar. Una vez seleccionadas las concentraciones de inhibición y tolerancia se llevó a cabo una estandarización por medio del conteo de UFC,⁴⁶ para después evaluar los efectos microbiológicos, la determinación de ERO's y la actividad de la GST. Preparando para lo anterior, medios de cultivo con distintas concentraciones de los respectivos metales.

7.1.3 *Rattus Norvegicus de la cepa Wistar*

En el caso de los animales empleados, se contó con trabajos precedentes que sirvieron de base para determinar la dosis de MP utilizados. Se realizaron los controles usando animales que no fueron expuestos a MP.

Se utilizaron ratas con un peso corporal promedio de 270 y 300 gramos para CdCl_2 y HgCl_2 , respectivamente. Los roedores fueron alimentados de forma normal y se agruparon en cajas de crecimiento en un ambiente con control de la temperatura. En el caso de la exposición a Hg, esta se realizó administrando una solución de HgCl_2 con una concentración de 25mg/Kg de peso en agua de bebida por un periodo de 1, 2, 3 y 4 semanas. Para llevar a cabo la intoxicación con cadmio, la exposición vía oral fue llevada a cabo bajo el mismo esquema, a una concentración de 50mg/Kg de peso de CdCl_2 bajo el mismo intervalo de tiempo que con HgCl_2 .¹¹¹ Una vez terminado el periodo de intoxicación los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico a una relación de 1 mL por Kg de peso. Posteriormente se extrajeron los órganos riñón, hígado y cerebro y se embebieron en un amortiguador 0.1 mM de fosfatos a pH de 7.4 hasta ser procesadas para la realización de las mediciones bioquímicas.

7.2 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

El tratamiento de las muestras se llevó a cabo homogenizando estas en un amortiguador de fosfatos 0.1M y pH de 7.4 con la finalidad de mantener integra la enzima GST evitando su desnaturalización por un cambio brusco de pH. Para el caso particular de las muestras obtenidas en ratas, se prepararon los homogenados correspondientes teniendo en cuenta las siguientes consideraciones: el cerebro se utilizó completo, en el hígado se usaron los lóbulos principales y en el caso del riñón se usó la corteza.^{28,29}

Una vez tratadas las muestras, se efectuaron los análisis bioquímicos correspondientes.

7.3 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL POR EL MÉTODO DE LOWRY (MODIFICADO POR NAVARRO-MORENO, 1999)

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. Este se encuentra dividido en dos etapas. En la primera se lleva a cabo una reacción de complejación entre el Cu^{2+} y los nitrógenos de los enlaces peptídicos de las proteínas, formando un complejo de color azul claro en un medio básico, la complejación provoca el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiendo los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución básica en forma de su complejo con tartrato, mientras que se lleva a cabo la segunda etapa a través de una reacción de reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, cuyo principal constituyente es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon lc$). En esta etapa el cobre actúa como catalizador de la reacción.¹¹² En la Figura 14 se muestra el mecanismo de reacción de la reacción del método de Lowry.

El procedimiento de medición se llevó a cabo de la siguiente forma:

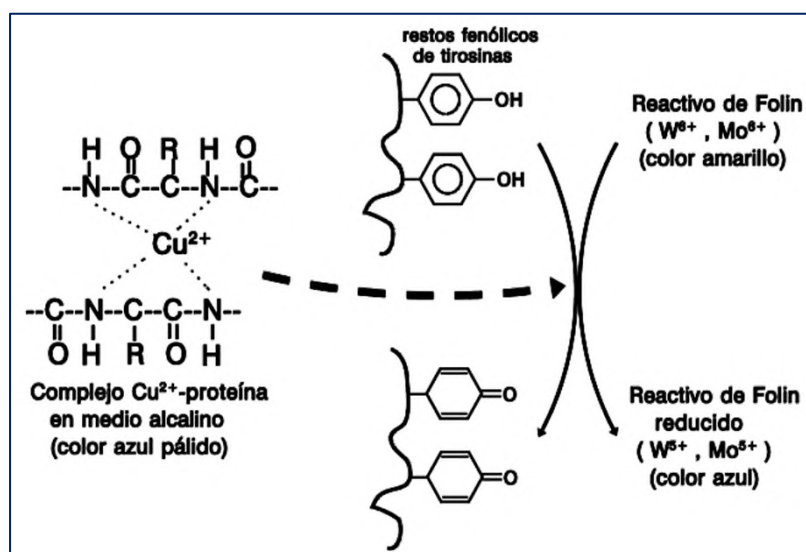


Figura 14. Mecanismo general del proceso de la reacción del método de Lowry.
Fuente: Maugeri, D. *et al.*¹¹³

Se colocaron en un tubo de ensaye 790 μL de agua destilada, 10 μL de la muestra, 100 μL de desoxicolato de sodio ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}$), 2 ml de una solución compuesta por sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 0.5%, solución A (equivalente a 2 gramos de hidróxido de sodio (NaOH) y 0.134 gramos de tartrato de sodio potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)), y 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu

(C₆H₆O, usando una dilución 1:3). Se agitó y dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos para después proceder a leerse a una longitud de onda de 750 nm en el equipo de UV/Visible Pekín Elmer Lambda 25. Se realizó una curva de calibración utilizando como estándar seroalbúmina bovina.

La determinación de la cantidad total de proteínas sirvió para ajustar la concentración de proteína a utilizar (1mg/mL) en la medición de la actividad de la GST.

7.4 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA.

La actividad de la GST viene dada por su capacidad de desactivar los xenobióticos, catalizando el ataque nucleofílico por GSH sobre átomos electrofílicos de carbono, azufre o nitrógeno de dichos xenobióticos. La función de las GST en este rol es doble: unir el sustrato en el sitio hidrofóbico de la enzima y el GSH en el sitio hidrófilo adyacente, que juntos forman el sitio activo, y posteriormente activar el grupo tiol de GSH, permitiendo el ataque nucleofílico sobre el sustrato. De esta manera la GST evita así la interacción de estos xenobióticos con proteínas cruciales en el funcionamiento celular. La mayoría de las isoenzimas de mamíferos tienen afinidad por el sustrato DNCB, y los ensayos espectrofotométricos que utilizan este sustrato se usan comúnmente para medir la actividad de GST.¹¹⁴

Procedimiento:

En una celda de vidrio se agregó el volumen correspondiente de un amortiguador de fosfatos 0.1 M y pH 6.5, el sustrato DNCB y el ligante glutatión reducido a una concentración final de 1 mM.¹¹⁵ Esta mezcla se homogenizó por inversión y finalmente se adicionó el volumen correspondiente a 1 mg/mL de proteína total. Se midió la absorbancia a 350 nm por un tiempo de cinco minutos con intervalos de 20 segundos en un espectrofotómetro UV/Vis (Perkin Elmer Lambda 25).

La actividad de la GST se determinó empleando la ecuación de Lambert-Beer de la siguiente manera.

$$A = \epsilon cl$$

Dónde:

A = Absorbancia

ϵ = Coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 9.6 \text{ mg/mL min}$)

c = Concentración de la enzima GST

l = Diámetro de la celda.

7.5 CUANTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

Como consecuencia del metabolismo celular normal, se producen radicales libres, los cuales pueden interaccionar con los lípidos séricos y tisulares provocando su peroxidación. Algunos productos de su degradación metabólica están constituidos fundamentalmente por aldehídos de alta capacidad reactiva, siendo el más significativo el MDA. Entre la variedad de métodos analíticos desarrollados para determinar el daño oxidativo el más comúnmente utilizado se basa en la reacción del malondialdehído con el ácido-2-tiobarbitúrico (TBA) para formar aductos cromógenos MDA-TBA muy estables que se pueden cuantificar por espectrofotometría de absorción visible o por fluorimetría.¹¹⁶

Un mol de MDA reacciona con dos moles de TBA en medio ácido y a alta temperatura. La velocidad de esta reacción depende de la concentración de TBA, la temperatura y el pH. El compuesto generado posee un pico máximo de absorbancia a 532-600 nm y otro secundario a 245-305 nm.¹¹⁷ En la Figura 15 se muestra la reacción general del MDA y TBA.

Procedimiento:

Se obtuvieron 0.2 mL del homogenado de las muestras en una solución buffer fosfato salino (PBS) 0.1M a pH 7.4, el volumen se completó a 1 ml con la misma solución. Se adicionaron 0.025 mL de butirilhidroxitolueno (BHT) y 0.03 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 30%. Posteriormente se agitó y colocó en hielo durante 2 horas. Transcurrido el tiempo se centrifugó en una microcentrifuga (Eppendorf Centrifuge 5424) 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, al cual se le agregó 1 mL del sobrenadante, 0.075 mL de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0.1M y 0.25 mL de una solución al 1% de TBA, se agitó y colocó a ebullición en un baño maría por un tiempo de 15 minutos. Terminado el tiempo, se dejó enfriar y se midió la absorbancia a longitudes de onda de 532 y 600 nm en el espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda 25.

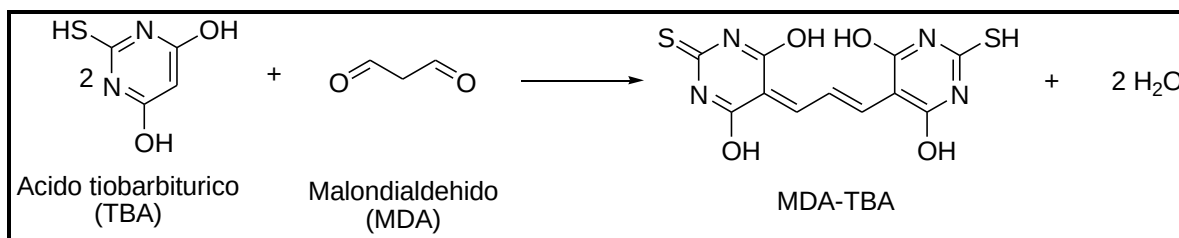


Figura 15. Esquema general de la reacción del Malondialdehído y el ácido tiobarbitúrico. Fuente: <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2739/Anexo.pdf%3Fsequence%3D12>.¹¹⁷

7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar. Las diferencias generales entre los grupos de tratamiento se compararon mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Minitab, Versión 2016, se utilizó para todos los análisis estadísticos.

7.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado en este proyecto de investigación, para cada especie de estudio, fue un diseño completamente aleatorizado (DCA): Un factor o variable independiente (CdCl_2 o HgCl_2) con más de un nivel (distintas concentraciones).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en este proyecto de tesis, analizados en virtud de la evidencia experimental y la bibliografía científica.

8.1 *Hafnia Alvei*

La forma en la que se presentan los resultados y el análisis de estos para el organismo *H. alvei* lleva la siguiente estructura:

- ❖ Determinación de concentraciones tolerantes e inhibitorias por medio de la evaluación del crecimiento radial
- ❖ Determinación de los tiempos de medición de los análisis bioquímicos en función de la cinética de crecimiento del organismo
- ❖ Análisis bioquímicos (Actividad de GST y Cuantificación de ERO's)

8.1.1 CRECIMIENTO RADIAL DE *Hafnia Alvei* EXPUESTA A HgCl_2 & CdCl_2

El desarrollo experimental se llevó a cabo como se describe en la metodología de los apartados 7.1 y 7.1.1. Se utilizó un intervalo de concentración $0.01\mu\text{M}$ ($1 \times 10^{-5}\text{mM}$)- 6.59mM para HgCl_2 y $0.05\mu\text{M}$ ($5 \times 10^{-5}\text{mM}$)- 6.59mM para CdCl_2 , de acuerdo a trabajos establecidos con anterioridad.¹⁰⁷

Los resultados mostraron la alta tolerancia que presenta este organismo.

En la Tabla 5 se presentan los valores del diámetro de inhibición obtenidos para cada concentración, esta se estructuró en una columna principal, correspondiente al microorganismo estudiado, seguido de cuatro columnas, dos de ellas pertenecientes a las concentraciones y las otras dos a los diámetros de inhibición resultantes. En las columnas pertenecientes a las concentraciones se estableció la asignación seguida de la concentración establecida (número: concentración). La etiqueta fue establecida en orden decreciente, asignando el número 1 a la concentración de HgCl_2 y CdCl_2 más alta (6.59mM), y la número 14 y 15 para las concentraciones más bajas ($5 \times 10^{-5}\text{mM}$ y $1 \times 10^{-5}\text{mM}$, respectivamente). En la Figura 16 se construyó un gráfico ilustrativo de lo anterior, donde se observa la aparición de halos de inhibición en concentraciones superiores al 0.1mM (HgCl_2) y la ausencia de estos en CdCl_2 . En las tablas subsecuentes se relacionaron las concentraciones de MP utilizados con respecto al diámetro de inhibición resultante de la exposición.

Tabla 5. Diámetros de inhibición de *H. Alvei* generados por las concentraciones de HgCl_2 y CdCl_2

<i>H. Alvei</i>			
$[\text{HgCl}_2]$	Halo inhibición	$[\text{CdCl}_2]$	Halo inhibición
1: 6.59mM	1.96 cm	1: 6.59mM	---
2: 5.66mM	1.96 cm	2: 5.66mM	---
3: 1.95mM	1.30 cm	3: 1.95mM	---
4: 0.75mM	1.06 cm	4: 0.75mM	---
5: 0.67mM	0.96cm	5: 0.67mM	---
6: 0.33mM	0.80 cm	6: 0.60mM	---
7: 0.24mM	0.65 cm	7: 0.33mM	---
8: 0.12mM	0.60cm	8: 0.24mM	---
9: 0.10mM	---	9: 0.12mM	---
10: 0.05mM	---	10: 0.05mM	---
11: 3×10^{-3} mM	---	11: 0.01mM	---
12: 5×10^{-4} mM	---	12: 5×10^{-3} mM	---
13: 1×10^{-4} mM	---	13: 1×10^{-4} mM	---
14: 5×10^{-5} mM	---	14: 5×10^{-5} mM	---
15: 1×10^{-5} mM	---		

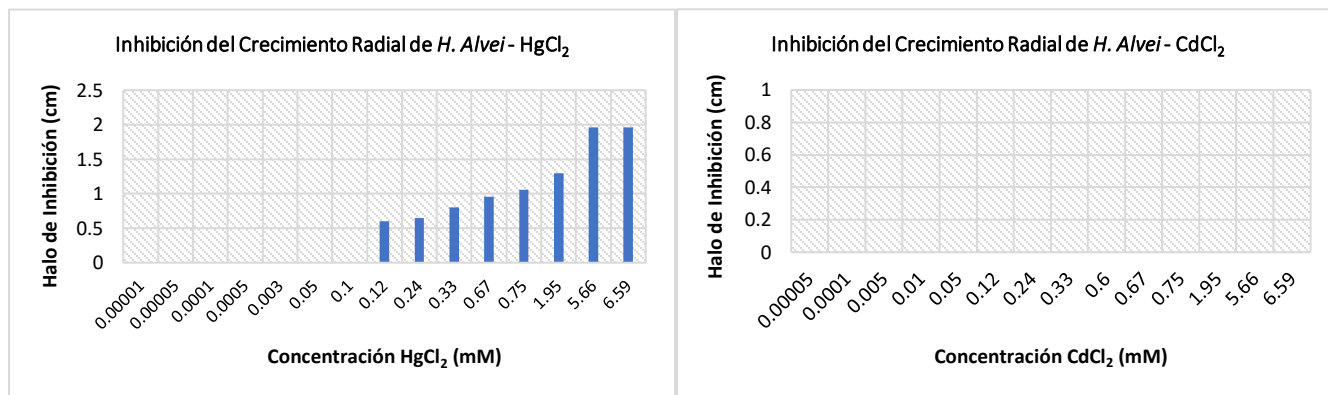
Figura 16. Diámetros de inhibición de *H. Alvei* generados por las concentraciones de HgCl_2 (izquierda) y CdCl_2 (derecha).

Tabla 6. Halos de inhibición generados por HgCl_2 en *H. Alvei*.

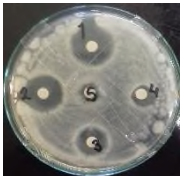
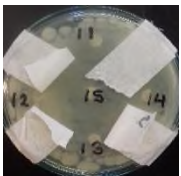
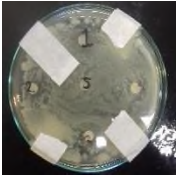
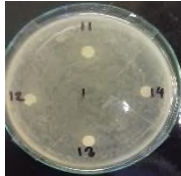
<i>H. alvei</i> / HgCl_2	Concentraciones 1-5					Concentraciones 6-10					Concentraciones 11-15				
Asignación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Diámetro de inhibición (cm)	1.9 6	1.9 6	1.3 0	1.0 6	0.9 6	0.8 0	0.6 5	0.6 0	---	---	---	---	---	---	---
Halo de inhibición															

Tabla 7. Halos de inhibición generados por CdCl_2 en *H. Alvei*.

<i>H. alvei</i> / CdCl_2	Concentraciones 1-5					Concentraciones 6-10					Concentraciones 11-15				
Asignación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Diámetro de inhibición (cm)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Halo de inhibición															

H. Alvei mostró una amplia tolerancia. En HgCl_2 se vio inhibida a los 0.12mM (32.6ppm de HgCl_2 y 24ppm de Hg^{+2}), en tanto que para CdCl_2 , incluso la más alta concentración de este metal (6.59mM=740ppm de Cd^{+2}) no provocó ninguna alteración en el crecimiento del organismo. Fue necesario pues, la ejecución de otro experimento en el cual se probaron concentraciones superiores a las establecidas en primera instancia. Se partió de 7mM (1283 ppm CdCl_2) y se continuó con concentraciones ascendentes de la especie de cadmio (8, 10, 12 y 14mM) asignadas bajo la misma dinámica usada en el intervalo anterior, el número 1 para la concentración más elevada y el 5 para la más baja. El experimento derivó en resultados en donde se generaron halos tenues de inhibición (de 1.06, 1.4, 1.43, 1.5 y 1.6 cm respectivas a las concentraciones ascendentes del metal). Lo que significa que aún a esas concentraciones el CdCl_2 no fue capaz de inhibir por completo el crecimiento del microorganismo, debido, presumiblemente, a una adaptación surgida de la exposición prolongada a esta especie química (Figura 17).



Figura 17. Halos de inhibición generados por CdCl_2 en *H. Alvei* (experimento 2). Asignación: 1=14mM, 2=12mM, 3=10mM, 4=8mM y 5=7mM.

Estos datos revelan la alta tolerancia de este microorganismo con respecto a la exposición de distintas concentraciones de Hg y Cd. Dichas concentraciones, expresadas en ppm, superan ampliamente los límites permisibles para MP establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, en fuentes acuáticas y de suelo, mostrados en la Tabla 8,¹¹⁸ y los establecidos por la CODEX internacional respecto a productos alimenticios de consumo humano (Tabla 2).⁶² En ambas se muestran que las concentraciones nocivas para seres humanos, independientemente de la fuente, están por debajo de la unidad de ppm, en tanto, *H. alvei* mostró tolerar concentraciones mucho mayores.

Tabla 8. Límites máximos permisibles de concentración de metales pesados en agua y suelo. Fuente: Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996.¹¹⁸

Metales	Ríos (uso en riego agrícola/urbano/protección de vida acuática) en ppm	Embalses naturales y artificiales (Uso en riego agrícola/uso público urbano) en ppm	Aguas costeras (explotación pesquera y navegación/recreación/estuarios) en ppm	Suelo (uso en riego agrícola) en ppm
Cadmio	0.2/ 0.1 /0.1	0.2/0.1	0.1/ 0.2 /0.1	0.05
Cromo	1.0/ 0.5 /0.5	1.0/0.5	0.5/ 1.0 /0.5	0.5
Mercurio	0.01/ 0.005 /0.005	0.01/0.005	0.01/ 0.01 /0.01	0.005
Plomo	0.5/ 0.2 /0.2	0.5/ 0.2	0.2/ 0.5 /0.2	5

En bacterias existen distintos mecanismos de resistencia al Cd, tales como la rápida expulsión del metal generada por la ATPasa del tipo P, cuyos dominios transmembranales funcionan como un poro para la expulsión del Cd (grampositivas).^{63,119} Para las bacterias gramnegativas existen mecanismos basados en sistemas de transporte especializados en las cuales intervienen un transportador de la membrana interna, un transportador de la membrana externa, y un polipéptido que atraviesa a ambas membranas y que funciona como un puente que asegura que los cationes sean expulsados al exterior de la célula y no sólo al espacio periplásmico. Se ha establecido también que este proceso ocurre por un sistema antiportador Cd/protones.¹²⁰⁻¹²² Otro mecanismo de resistencia al Cd se basa en la síntesis de proteínas ricas en cisteínas, similares a las MT, capaces de capturar los iones del metal.¹²³ En el caso del Hg se conoce un mecanismo basado en la reducción enzimática del Hg inorgánico (Hg^{+2}) a su forma metálica, menos tóxica y volátil (Hg^0), catalizada por la reductasa mercúrica. El proceso se lleva a cabo a través de la captura y transferencia del Hg^{+2} por parte de las cisteínas de proteínas encargadas de llevar el metal a la reductasa. El primer paso es la captura del metal en el exterior por las cisteínas de la proteína periplásmica (MerP), la cual transfiere el Hg^{+2} a otro par de cisteínas de la proteína membranal (MerT), quienes a su vez lo transfieren a las cisteínas presentes en la reductasa y las cuales son las encargadas de conducir el Hg^{+2} al sitio activo de la enzima. Así, en este proceso se asegura que el Hg^{+2} nunca se encuentre libre, protegiendo el citoplasma de la toxicidad del metal.¹²⁴

Relativo a nuestro objeto de estudio, la enzima GST presenta una capacidad de respuesta contra agentes xenobióticos y el EO, el cual constituye un mecanismo subyacente de toxicidad de los MP. Aunado a ello es el hecho de que esta enzima presenta en su estructura un alto contenido de cisteínas, las cuales, como ya se mencionó, ejercen un papel importante en los mecanismos de desintoxicación de MP. Y que utiliza al glutatión como ligante de las reacciones de desintoxicación, el cual puede llegar a cumplir un papel como quelante, o como agente antioxidante en la reconstitución del equilibrio redox desplazado por la presencia intracelular de MP.¹²⁵

8.1.1.1 SELECCIÓN DE CONCENTRACIONES TOLERANTES E INHIBITORIAS DE MP EN *Hafnia Alvei*

De acuerdo a los resultados mostrados anteriormente, se seleccionaron las concentraciones de Hg y Cd que generaron inhibición, un control, así como una concentración intermedia (mostradas en la Tabla 9).

Tabla 9. Concentraciones seleccionadas para el análisis de la actividad de la GST y la cuantificación de ERO's en *H. Alvei*.

Organismo	Control	[-] HgCl_2	[+] HgCl_2	[-] CdCl_2	[+] CdCl_2
<i>Hafnia alvei</i>	---	0.24mM	1.95mM	7mM	8mM

8.1.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Hafnia Alvei*

Los experimentos subsecuentes a la determinación de las concentraciones tolerantes e inhibitorias de HgCl_2 y CdCl_2 se enfocaron en delimitar el tiempo óptimo de medición para la actividad de GST y la producción de ERO's. Por ello se buscó establecer los tiempos en los cuales *H. alvei* presentara un metabolismo más activo. Se evaluaron dos medios de cultivo (Caldo Nutritivo (CN) y Mueller Hinton (M-H)), cuyos resultados respecto al crecimiento del microorganismo también fueron considerados. La cinética de crecimiento se realizó por el método por conteo en cámara Neubauer descrito en el apartado 7.1.1, además de ser analizada también por medio de espectrofotometría UV-Vis a 560nm.^{126,127} En las Figuras 18 y 19 se muestran las gráficas pertenecientes al análisis espectrofotométrico y al del conteo bacteriano en cámara de Neubauer para la cinética realizada en CN y M-H, respectivamente. En ambas, se compararon los tiempos en el cual el metabolismo del organismo se encontró más activo.

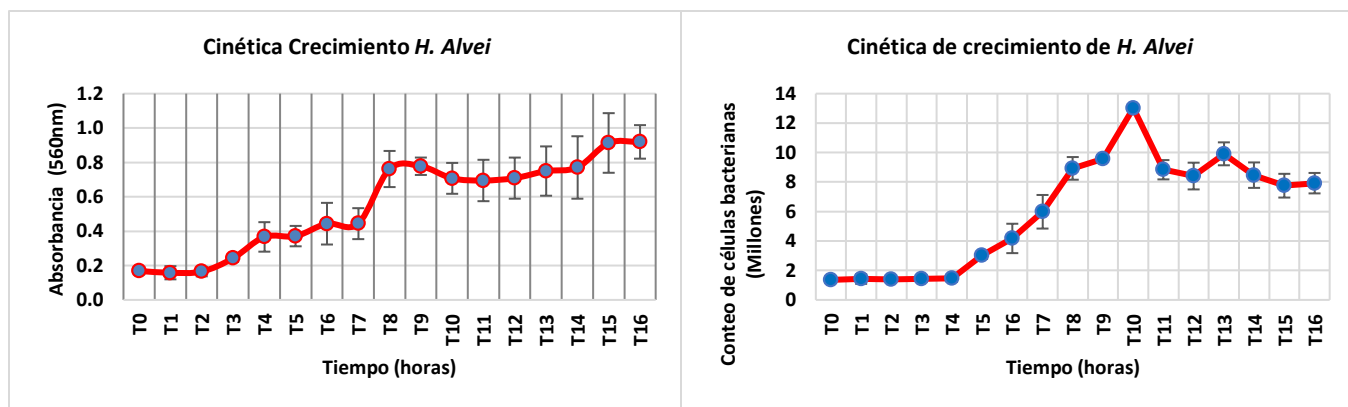


Figura 18. Cinética de Crecimiento en CN de *H. Alvei*: Izquierda - Espectrofotometría UV-Vis- a 560nm/Derecha - Conteo de microorganismos en Cámara Neubauer.

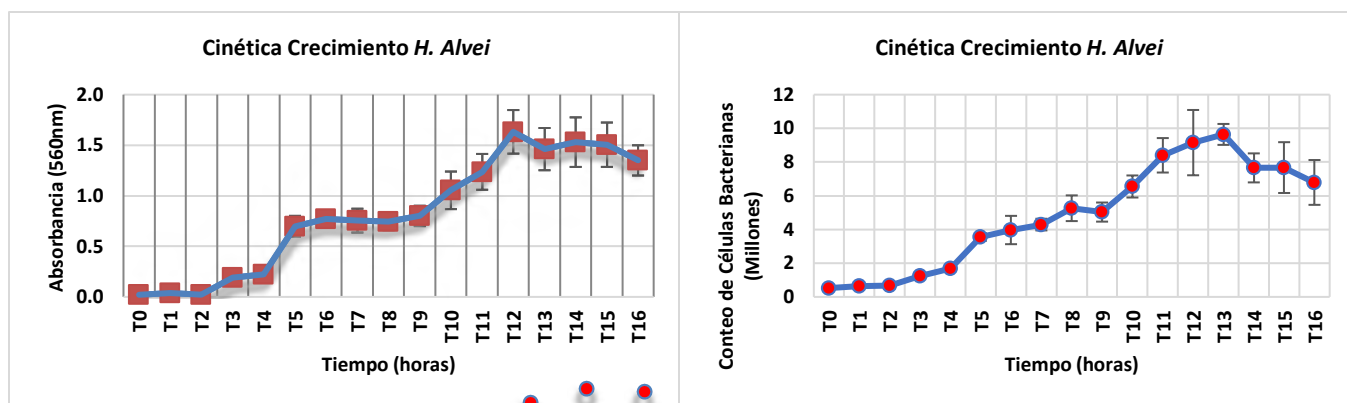


Figura 19. Cinética de Crecimiento en M-H de *H. Alvei*: Izquierda - Espectrofotometría UV-Vis- a 560nm/Derecha – Conteo de microorganismos en Cámara Neubauer.

Tanto la Figura 18 como la 19, muestran la forma de crecimiento de *H. alvei* en ambos medios de cultivo. En CN se observa un mejor desarrollo de la bacteria entre los tiempos T7 y T8, en tanto, para M-H, el metabolismo se encontró más activo en el intervalo T9-T12. Si bien el CN es un medio capaz de propiciar el crecimiento de *H. alvei*, dado que este microorganismo puede desarrollarse con escasos requerimientos nutricionales^{126,128-129}, no es específico para este propósito. M-H, por otro lado, constituye un medio propicio para una gran variedad de microorganismos que no necesariamente tienen bajos requerimientos nutricionales. Además, es el medio más utilizado internacionalmente bajo los estándares para procedimientos de evaluación de resistencia y crecimiento bacteriano.^{108,109} Lo anterior, aunado a un periodo más prolongado en cuanto al pico de desarrollo y reproducción bacteriana, llevó a la decisión de escoger este medio para las pruebas de análisis posteriores de la actividad enzimática y la producción de ERO's en presencia y ausencia de MP. Eligiendo tres intervalos de tiempo diferentes: Uno en el cual el metabolismo de nuestro microorganismo estuviese más activo, esto es, de acuerdo a los resultados observados, en el T10, un tiempo inicial (T0), y, para dar seguimiento al curso metabólico del microorganismo, un tiempo fuera del rango estándar de medición de acuerdo a la cinética bacteriana (T120).

8.1.3 *Hafnia Alvei* – ANÁLISIS BIOQUÍMICOS: ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's

A partir de los resultados previos, se destinaron las concentraciones y los tiempos de medición para la cuantificación y la medición de la actividad de las ERO's y GST, respectivamente. Los resultados y el análisis efectuado a partir de ellos, para cada MP (CdCl_2 y HgCl_2) se muestran a continuación. El análisis estadístico de las mediciones bioquímicas se realizó mediante un ANOVA de una sola vía, utilizando como prueba conclusiva la prueba de comparación por Tukey. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

Nota: A partir de este punto, siempre que se describan los aumentos o decrementos, tanto de la actividad de GST como de la cuantificación de ERO's, en términos de unidades, se estará haciendo referencia al valor que se eleva o desciende, bajo las respectivas unidades de cada prueba.

A saber: **uM/mg/min** para la actividad de GST y **pM/mg** para la cuantificación de ERO's.

8.1.3.1 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's Cd-T0, T10 & T120 (HORAS)

En el tiempo inicial (T0), se observó una significativa disminución de ambas respuestas bioquímicas (actividad enzimática (de 1.2 y 1.9 unidades de la concentración de 7 y 8 mM, respectivamente, en comparación al grupo control) y presencia de ERO's (de 35 unidades)) ante la exposición a Cd^{+2} con respecto al grupo control. Es posible inferir que se debe a la rápida acción de los mecanismos de respuesta de la bacteria ante la presencia del metal una vez que este ingresa en la célula (Figura 20). Empero, esta respuesta parece variar de acuerdo a periodos de transición. En el T10, se observó, por ejemplo, el mismo comportamiento en la actividad enzimática, pero una tendencia inversa en la presencia de ERO's, incrementando ésta hasta en 233 unidades en función del aumento de la concentración de Cd^{+2} , lo que implica un decremento en la respuesta de los mecanismos canónicos contra la presencia de MP (Figura 21). Sin embargo, a las 120 horas de haber expuesto a la bacteria a la presencia de Cd^{+2} la significancia en la variación (incremento o disminución), tanto de la actividad de GST como la presencia de ERO's se ve poco alterada (Figura 22). Lo que sugiere un periodo de adaptación surgido posteriormente al periodo de mayor intoxicación que supuso la exposición a las 10 horas.

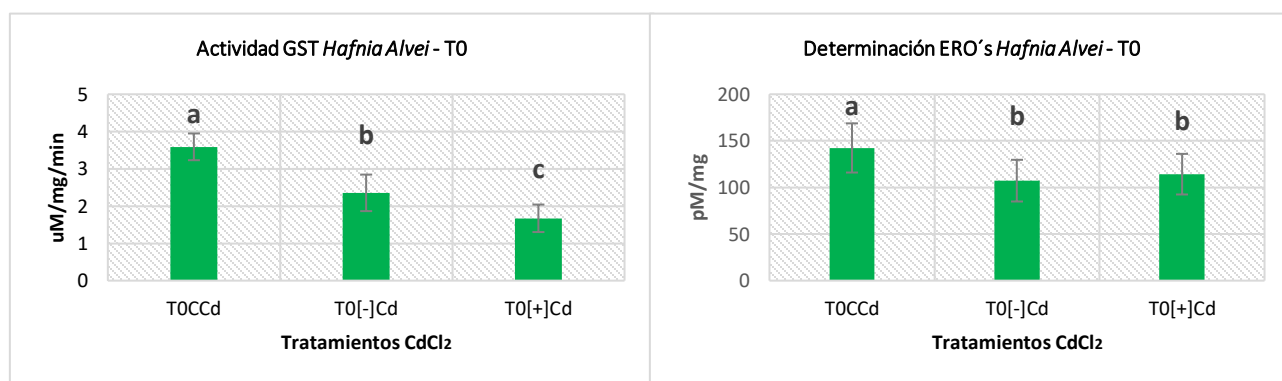


Figura 20. Actividad GST y producción ERO's en *H. Alvei* – T0 sometida a tratamientos de CdCl_2 : TOCCd= Control, T0[-]Cd= 7mM, T0[+]Cd= 8mM (n=9)

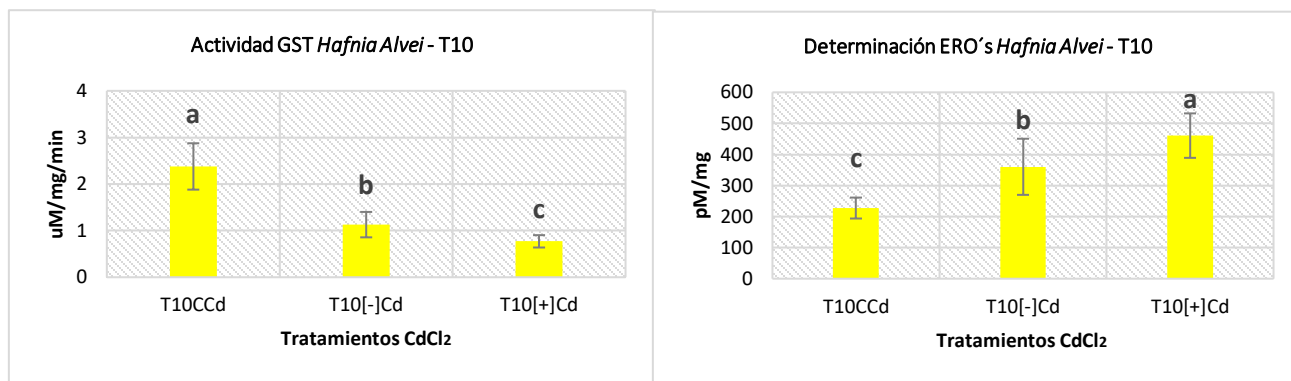


Figura 21. Actividad GST y producción ERO's en *H. Alvei* – T10 sometida a tratamientos de CdCl_2 : T10CCd= Control, T10[-]Cd= 7mM, T10[+]Cd= 8mM (n=9)

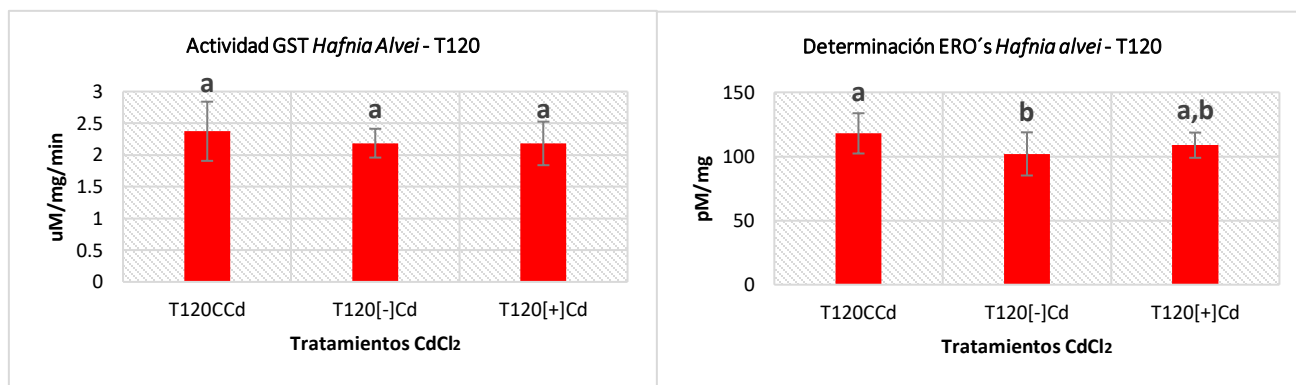


Figura 22. Actividad GST y producción ERO's en *H. Alvei* – T120 sometida a tratamientos de CdCl_2 : T120CCd= Control, T120[-]Cd= 7mM, T120[+]Cd= 8mM (n=9)

En virtud de esclarecer mejor el texto anterior, y en dotar de nuevas perspectivas la descripción y el análisis de los resultados obtenidos, se hizo un comparativo en función de la concentración y del tiempo, que se ven plasmadas en los gráficos siguientes.

8.1.3.2 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN DE ERO's-Cd EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

Tal como se ilustró en la descripción de los resultados donde se evalúan los tiempos por separado, En los gráficos de las Figuras 23 y 24 se muestran las tendencias descritas anteriormente. A saber: Una relación proporcional a disminuir la actividad enzimática y la presencia de ERO's en el tiempo inicial. Una relación inversa respecto a la disminución de la actividad de GST y el aumento de ERO's después de 10 horas. Y la poca variación en la actividad y la presencia de especies reactivas entre las diferentes concentraciones evaluadas para después de 120 horas.

Ahora bien, estos gráficos también nos permiten observar un panorama más completo en la propensión del comportamiento de *H. alvei* ante la exposición a las concentraciones de CdCl_2 . La característica más significativa se atiende al evaluar los rangos de actividad y presencia de ERO's entre los tiempos 10 y 120. Al observar, por ejemplo, la actividad de la enzima en el tiempo 120, se llegó a la conclusión de que no hay diferencias significativas entre las distintas concentraciones. Sin embargo, si se contrasta con el comportamiento enzimático del tiempo 10 se observa que la tendencia en decremento en este, no se cumple para las 120 horas. Así, es posible que, en esta última etapa de medición, la enzima haya comenzado a tener un papel más relevante en el combate contra el daño provocado por el metal en la bacteria. Inverso es el caso de la presencia de ERO's, donde se observa una mayor expresión de estas especies, acorde a la concentración de metal suministrada únicamente para el T10.

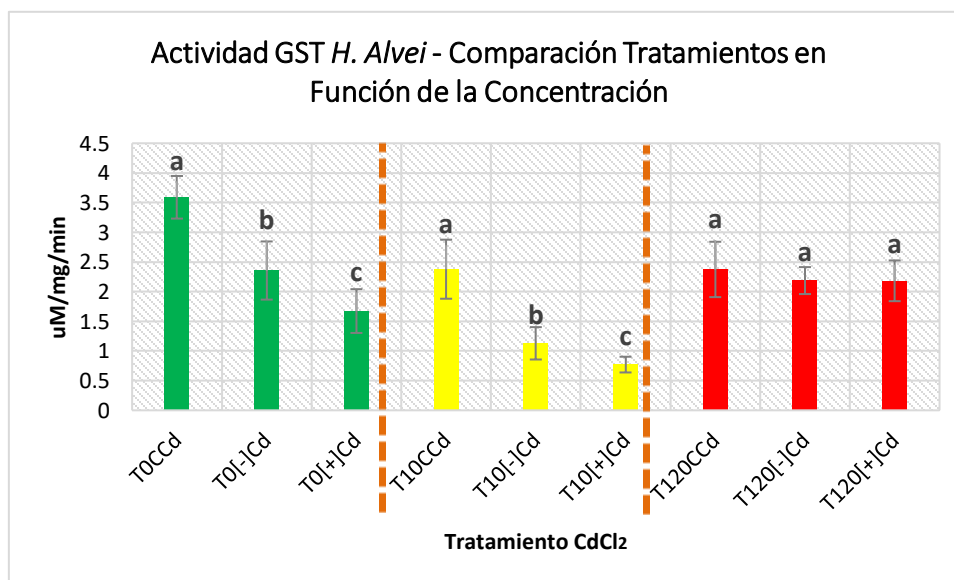


Figura 23. Actividad GST en *H. Alvei* – Comparativo en Función de la Concentración de CdCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T120). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo las distintas concentraciones de CdCl_2 utilizadas.

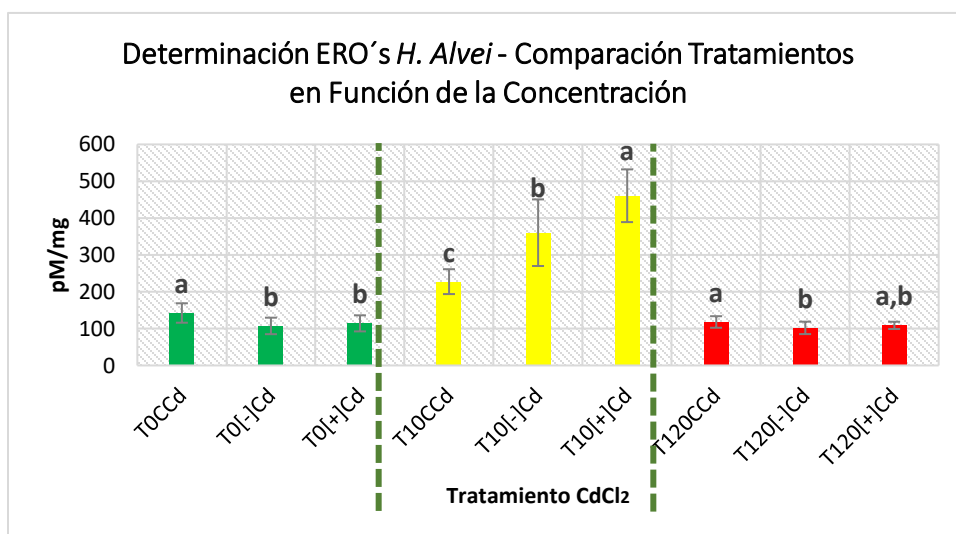


Figura 24. Cuantificación ERO's en *H. Alvei* – Comparativo en Función de la Concentración de CdCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T120). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo las distintas concentraciones de CdCl_2 utilizadas.

8.1.3.3 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN DE ERO's-Cd EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

Otra posición desde donde puede tomar lugar un nuevo criterio, es a través de la comparación de los tratamientos en función del tiempo.

La actividad de GST (Figura 25) para los tratamientos con presencia de CdCl_2 se observa como incrementa en el T120, respecto al T10, independiente de la concentración de metal utilizada (1 unidad para 7mM y 1.4 unidades para 8mM). Similar es la independencia de las concentraciones de ERO's cuando se evalúa en función del tiempo. En este caso, el comportamiento es inverso, pues, las especies reactivas disminuyen en el T120 con respecto al T10 (258 unidades para 7mM y 352 para 8mM), independiente de la exposición a las distintas concentraciones (Figura 26). Este fenómeno puede bien explicarse a partir del proceso oxidativo de lípidos que desencadena el metal. Cuando ocurre la peroxidación lipídica, el MDA, molécula mutagénica para células bacterianas,^{228,229} y clave en la detección de ERO's por espectrofotometría UV-Vis, es el generado en mayor cantidad. Sin embargo, de este proceso también puede derivarse el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), el mayor producto competidor del MDA. Cuando ocurre que el HNE se produce en mayor cantidad, los niveles de MDA se ven reducidos, lo que explica la disminución de los resultados de ERO's en el T120. La presencia del 4-hidroxi-2-nonenal, por otro lado, desencadena una reacción en la que interviene la enzima GST, utilizando el GSH para transformar el HNE en un aducto de glutatión inocuo (Figura 27).²²⁹ Reacción que también explica el aumento en la actividad de la enzima en el T120. Todo a la vez que ambos comportamientos pueden ser comprendidos por el mismo fenómeno, derivado de la peroxidación de lípidos provocada por el CdCl_2 .

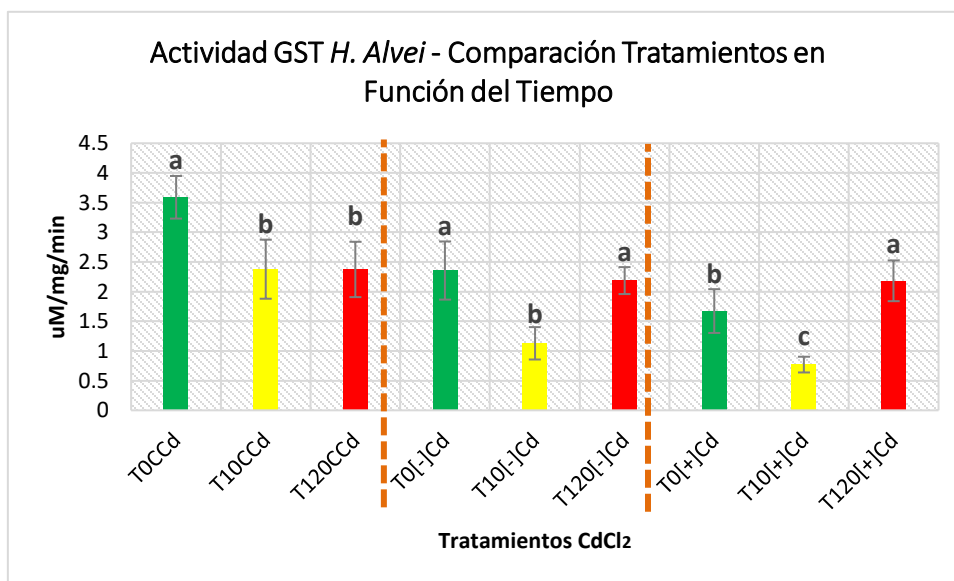


Figura 25. Actividad GST en *H. alvei* – Comparativo en Función del tiempo (CdCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo los distintos tiempos utilizados.

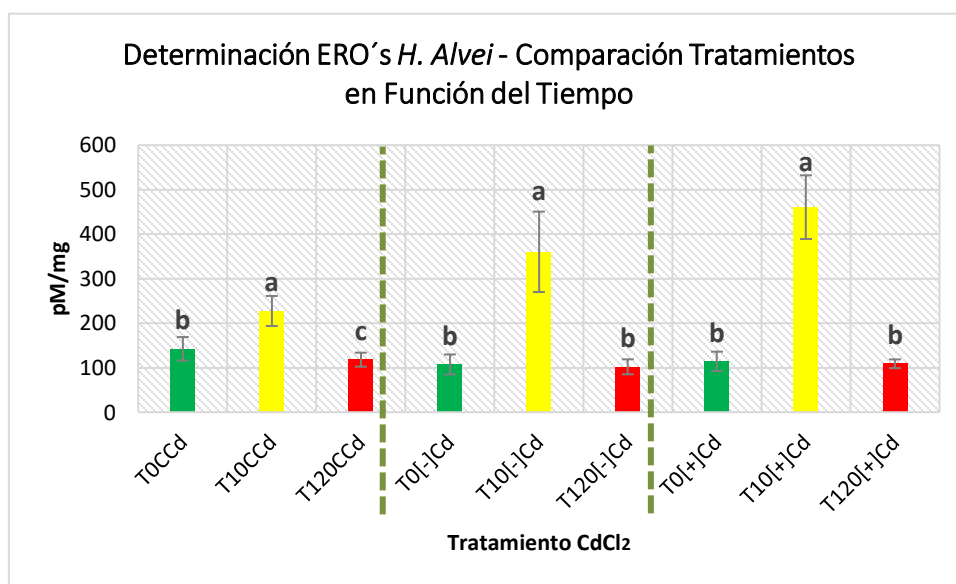


Figura 26. Cuantificación ERO's en *H. alvei* – Comparativo en Función del tiempo (CdCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo los distintos tiempos utilizados.

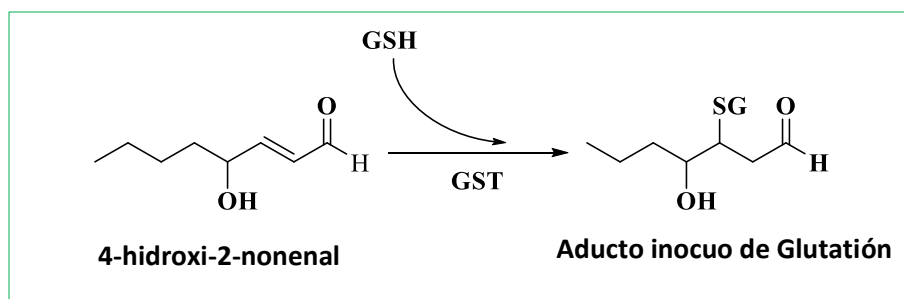


Figura 27. Reacción catalizada por GST utilizando GSH para inactivar HNE, producto tóxico de la peroxidación de lípidos. Modificado de Valko, M. *et al.*²²⁹

De lo anterior se pueden extraer observaciones generales muy interesantes. A saber:

- ❖ A las 10 horas de exposición (T10) se observó una mayor producción de ERO's para los tratamientos ejercidos, acorde a la concentración de Cd utilizada (a mayor concentración, mayor presencia de ERO's).
- ❖ Un comportamiento inverso se encontró en la actividad de la enzima en el mismo periodo (a mayor concentración Cd, menor actividad enzimática).
- ❖ La relación anterior no se cumplió una vez transcurridas 120 horas (T120). En este tiempo la presencia de ERO's y la actividad GST tuvieron poca variación significativa.
- ❖ Analizados en función del tiempo, la actividad enzimática se vio reestablecida, e incluso incrementada en el T120, con respecto al T10, independiente de la concentración de Cd utilizada.
- ❖ Bajo el mismo análisis, las ERO's se vieron reducidas en el T120, con respecto al T10, con independencia de la concentración utilizada.

De las cuales se pueden postular las siguientes conclusiones:

- ✚ El tiempo desempeñó un papel importante en la relación entre la "Exposición CdCl₂/Respuesta del organismo" para la bacteria *H. Alvei*.
- ✚ La mayor producción de ERO's, bajo los parámetros de los experimentos establecidos, se generó transcurridas 10 horas de exposición.
- ✚ A las 120 horas de exposición, el comportamiento de la enzima GST y la presencia de ERO's se hicieron independientes de la concentración de CdCl₂.
- ✚ El incremento en la actividad de GST, después de 120 horas, sugiere la acción de la enzima como mecanismo de respuesta ante la producción de 4-hidroxi-2-nonenal, molécula generada en la peroxidación lipídica y competidora del MDA. La menor producción de MDA en este periodo explica por qué en este las ERO's se vieron disminuidas.²²⁹

8.1.3.4 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's Hg-T0, T10 y T120

El comportamiento entre GST y las ERO's en los tratamientos con Hg para el T0 y T120 se observó poco relacionados entre sí. En ambos casos la actividad enzimática tuvo poca variación significativa, escasamente relacionada con el aumento de ERO's para la concentración alta de HgCl_2 (Figura 28 y 30). Para el T10, sin embargo, se observó un comportamiento inverso entre la actividad de la enzima y la presencia de ERO's. Por un lado, estas últimas no tuvieron un aumento significativo sino hasta la exposición a la mayor concentración de HgCl_2 (aumento de 130 unidades), mientras que la actividad de la GST no se vio disminuida sino hasta llegado esa misma concentración (concentración de 1.95mM, menos 1 unidad de actividad enzimática) (Figura 29).

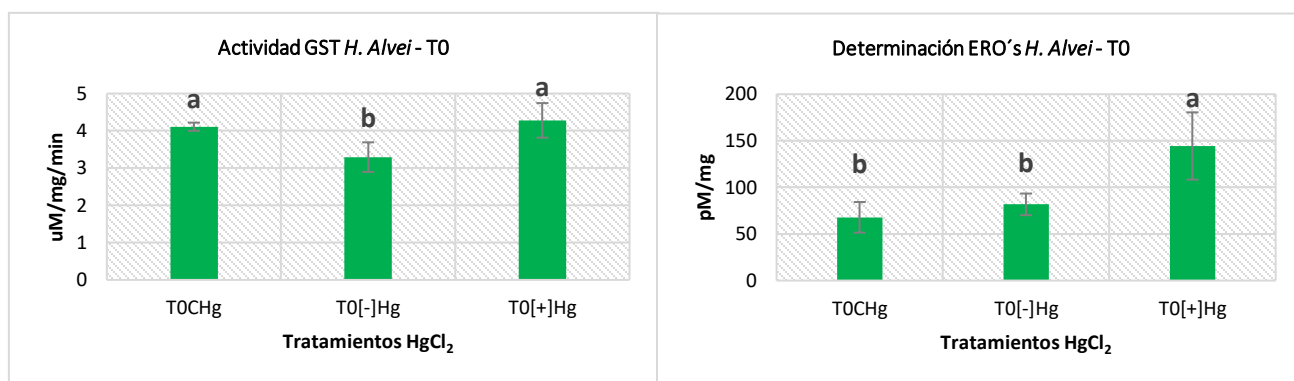


Figura 28. Actividad GST y producción ERO's en *H. Alvei* – T0 sometida a tratamientos de HgCl_2 : T0CCd= Control, T0[-]Cd= 0.24mM, T0[+]Cd= 1.95mM (n=9)

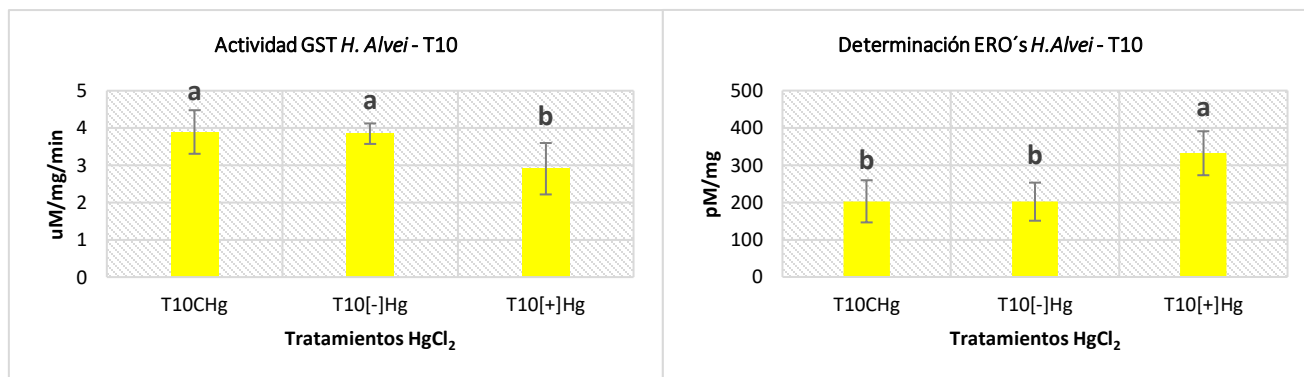


Figura 29. Actividad GST y producción ERO's en *H. Alvei* – T10 sometida a tratamientos de HgCl_2 : T10CCd= Control, T10[-]Cd= 0.24mM, T10[+]Cd= 1.95mM (n=9)

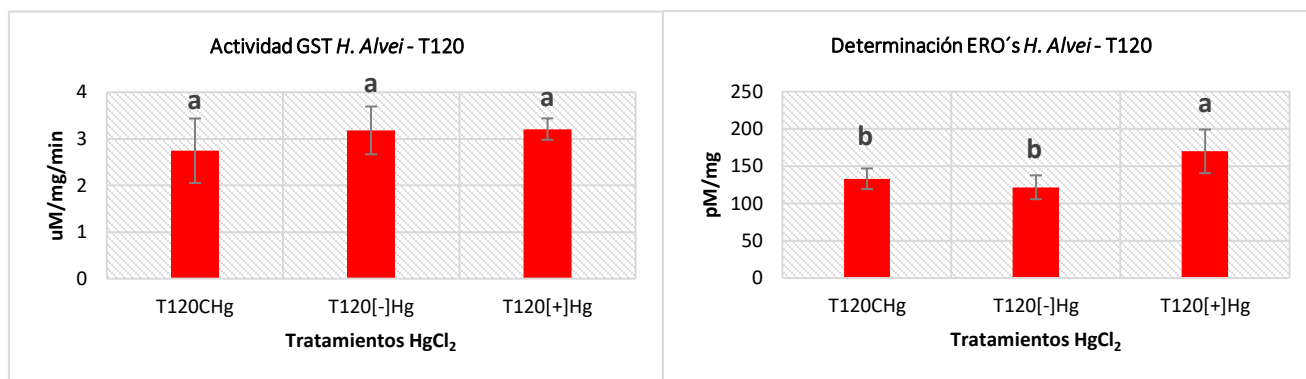


Figura 30. Actividad GST y producción ERO's en *H. Alvei* – T120 sometida a tratamientos de $HgCl_2$: T120CCd= Control, T120[-]Cd= 0.24mM, T120[+]Cd= 1.95mM (n=9)

8.1.3.5 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST & PRODUCCIÓN ERO's-Hg EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

Extendiendo el análisis, se puede observar un patrón que se cumple para la determinación de ERO's en todos los tiempos dados. A saber: la conservación de los niveles de ERO's en las muestras control y la concentración baja del metal, y el aumento, con independencia del tiempo, de los niveles de peroxidación lipídica en la concentración alta de Hg. Hecho que refleja una injerencia directa de la concentración de Hg en los niveles de ERO's medido a través de la producción de MDA.

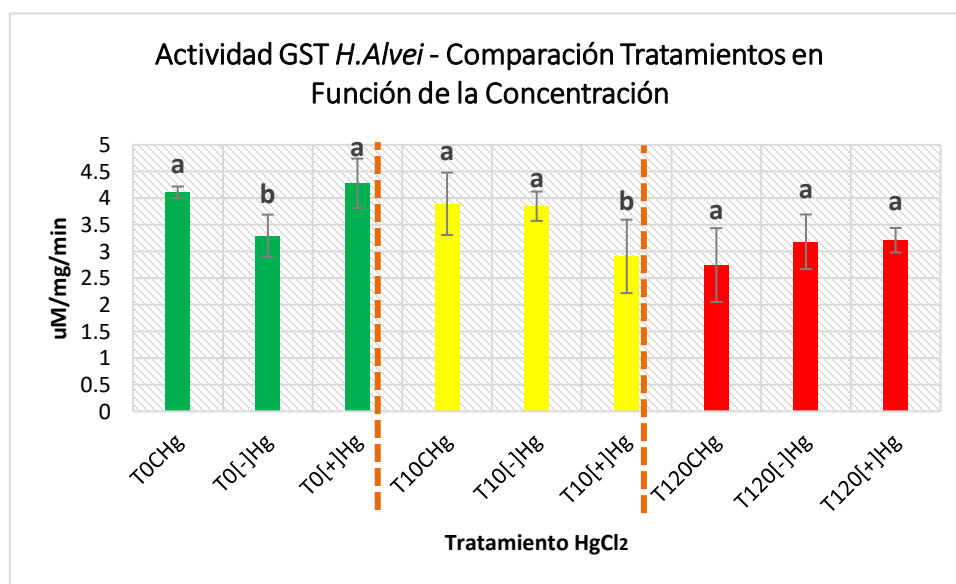


Figura 31. Actividad GST en *H. Alvei* – Comparativo en Función de la Concentración de $HgCl_2$. Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T120). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo las distintas concentraciones de $HgCl_2$ utilizadas.

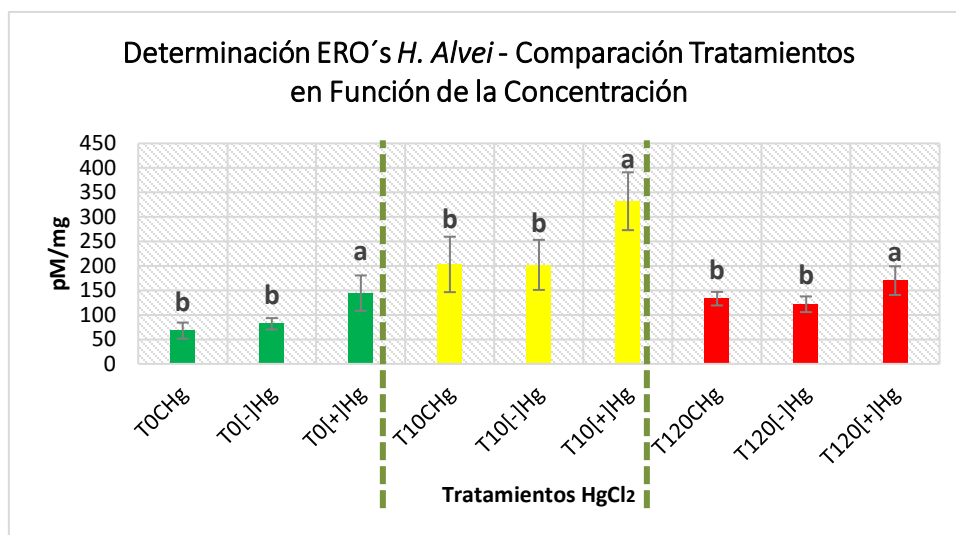


Figura 32. Cuantificación ERO's en *H. Alvei* – Comparativo en Función de la Concentración de HgCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T120). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo las distintas concentraciones de HgCl_2 utilizadas.

8.1.3.6 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST PRODUCCIÓN ERO's-Hg EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

Otra propensión observada, ahora desde la arista del tiempo, es la mayor producción de ERO's que se genera, al igual que en el tratamiento con Cd, transcurridas 10 horas, para cualquiera de las concentraciones evaluadas (Figura 34).

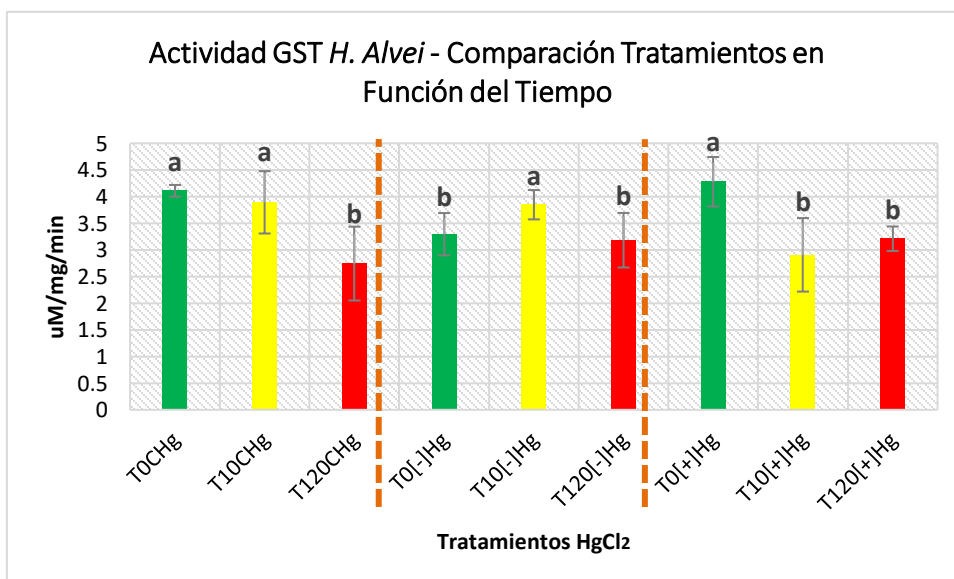


Figura 33. Actividad GST en *H. Alvei* – Comparativo en Función del tiempo (HgCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo los distintos tiempos utilizados.

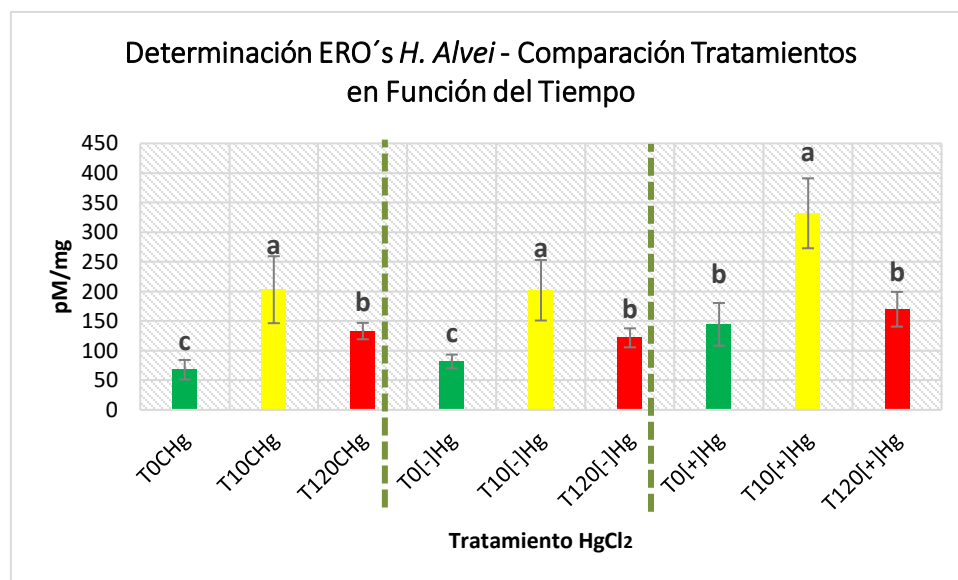


Figura 34. Cuantificación ERO's en *H. Alvei* – Comparativo en Función del tiempo ($HgCl_2$). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo los distintos tiempos utilizados.

De las anteriores observaciones se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- + La actividad de la enzima GST en los T0 y T120 estuvo poco relacionada al comportamiento de las ERO's.
- + En el T10 existió una relación inversa entre la disminución de la actividad enzimática y el aumento en las ERO's.
- + Es en el T10 cuando se observó la mayor producción de ERO's para los experimentos establecidos.
- + En todos los tiempos medidos, la mayor concentración de $HgCl_2$ es la que generó mayor producción de especies reactivas.
- + De acuerdo a las dos últimas premisas, el pico máximo de ERO's alcanzado en los experimentos, se observó durante el T10, en la concentración alta de $HgCl_2$ (1.95mM)

8.1.3.7 ANÁLISIS *Hafnia Alvei*-MP- PRODUCCIÓN ERO's-ACTIVIDAD GST

Son pocos el número de estudios dedicados a las GST's bacterianas, comparados con las de otros tipos de organismos como mamíferos, plantas o insectos. Esto implica que exista un menor conocimiento sobre cómo operan estas enzimas, su funcionamiento fisiológico, estructura, y las moléculas que intervienen en sus mecanismos de acción. Aún con ello, se ha identificado, por ejemplo, un gran número de GST's bacterianas, similares a las diclorometano deshalogenasas (DCMD's) bacterianas, que no poseen afinidad por el sustrato que se utilizó en los experimentos del presente estudio (DNCB). Sin embargo, esto no supone necesariamente una contradicción respecto de la metodología experimental utilizada, debido, específicamente, a dos razones principales. La primera de ellas es que este tipo de GST's (GST/DCMD's) tienen como función catalizar reacciones que producen compuestos que pueden utilizarse para el crecimiento bacteriano.^{130,131} Y no tienen relación con la defensa contra agentes xenobióticos. La segunda razón es que existe también un amplio número de estudios en los que se identificó la presencia de GST's utilizando como sustrato el DNCB. En organismos como: *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* B, K12 cepa JM86, cepa JM105, *Burkholderia sp.* cepa LB400, o *Cycloclasticus oligotrophus*.^{130, 132-138} La función fisiológica de estas GST's frente al DNCB no está clara, aunque han sido asociadas a la resistencia a antibióticos y al EO.^{130,139} En *Proteus mirabilis*, por ejemplo, se han descrito tres GST's. La isoforma PmGST B1-1, en particular, se ha relacionado con la defensa contra el EO y agentes antimicrobianos, pues la expresión del gen que la codifica se ve aumentada ante el estrés generado por DNCB, H₂O₂, fosfomicina o tetraciclina.¹⁴⁰

En específico para *H. Alvei*, no existen trabajos que ahonden en la relación agentes xenobióticos-GST, mucho menos MP-GST. Al ser el único organismo perteneciente al género *Hafnia*, es difícil encontrar un paralelismo con organismos similares. Sin embargo, en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, al cual pertenece este agente, se ha descrito la acción de una GST, que cataliza la adición de GSH a la molécula de fosfomicina (antibiótico) convirtiéndolo en un compuesto inactivo. Esta enzima es una metaloproteína dependiente de Mn⁺² que requiere K⁺ para su óptima actividad catalítica.¹⁴¹⁻¹⁴³ Existe la posibilidad, por tanto, de que un mecanismo similar sea llevado a cabo en *Hafnia* contra MP. También se ha encontrado que la enzima GST puede transformar el 4-hidroxi-2-nonenal (producto de la peroxidación lipídica capaz de causar daños mutagénicos en células bacterianas) en una molécula inocua. Lo cual explica el aumento de la actividad enzimática ante la exposición a CdCl₂ en el T120 y la disminución de la producción de ERO's (basadas en la medición de MDA, producto competidor con el HNE, y que, al verse disminuido, disminuirá la detección de ERO's). El fenómeno inverso (incremento de ERO's y disminución de la actividad GST), observado en el T10 para HgCl₂, también puede discutirse en función de la relación de la enzima con el HNE. El hecho de que las ERO's aumentaron, significa un mayor contenido de MDA, y un menor contenido de HNE. Esto último representa una menor actividad enzimática para contrarrestar este producto tóxico.

Si bien los resultados obtenidos resultan interesantes y promisorios, es sólo el primer paso respecto de conocer con mayor amplitud las características particulares del metabolismo MP-GST en *H. Alvei*. Un campo de investigación que se perfila amplio y prometedor.

8.2 *Candida Parapsilosis*

Siguiendo una estructura similar en cuanto a la presentación de resultados que en *Hafnia*, en *C. Parapsilosis* se muestra:

- ❖ Determinación de concentraciones tolerantes e inhibitorias por medio de la evaluación del crecimiento radial.
- ❖ Determinación de los tiempos de medición de los análisis bioquímicos en función de la cinética de crecimiento.
- ❖ Análisis bioquímicos (Actividad de GST y Cuantificación de ERO's).

8.2.1 CRECIMIENTO RADIAL DE *Candida Parapsilosis* EXPUESTA A HgCl_2 & CdCl_2

Para *C. Parapsilosis*/Hg (Tabla 10, 11 y Figura 35-izquierda) se observaron sutiles halos de inhibición de aproximadamente 0.65cm de diámetro (HgCl_2 : 0.05mM), los cuales incrementaron con respecto al aumento de la concentración de HgCl_2 . Para *C. Parapsilosis*/Cd (Tabla 10, 12 y Figura 35-derecha) el crecimiento se encontró más propicio, dado que la inhibición se presentó a concentraciones por encima de los 0.24mM. El crecimiento de *C. Parapsilosis* sólo se vio afectado para HgCl_2 a los 0.05mM, es decir, a una concentración de 13.5ppm de la sal y 10ppm de este metal. Mientras que para Cd esta inhibición sólo se alcanzó a los 0.33mM (55ppm de la sal y 33.7ppm del metal). Las designaciones mostradas en las tablas 10, 11 y 12 corresponden al mismo intervalo usado para *H. alvei* (Tabla 5).

Tabla 10. Diámetros de inhibición de *C. Parapsilosis* generados por las concentraciones de HgCl_2 y CdCl_2

<i>C. Parapsilosis</i>			
[HgCl_2]	Halo inhibición	[CdCl_2]	Halo inhibición
1: 6.59mM	2.26 cm	1: 6.59mM	3 cm
2: 5.66mM	2.06 cm	2: 5.66mM	2.76 cm
3: 1.95mM	1.56 cm	3: 1.95mM	2.23 cm
4: 0.75mM	1.23 cm	4: 0.75mM	1.33 cm
5: 0.67mM	1.13 cm	5: 0.67mM	1.33 cm
6: 0.33mM	0.93 cm	6: 0.60mM	1.53 cm
7: 0.24mM	0.93 cm	7: 0.33mM	1.05 cm
8: 0.12mM	1 cm	8: 0.24mM	---
9: 0.10mM	1 cm	9: 0.12mM	---
10: 0.05mM	0.65 cm	10: 0.05mM	---
11: 3×10^{-3} mM	---	11: 0.01mM	---
12: 5×10^{-4} mM	---	12: 5×10^{-3} mM	---
13: 1×10^{-4} mM	---	13: 1×10^{-4} mM	---
14: 5×10^{-5} mM	---	14: 5×10^{-5} mM	---
15: 1×10^{-5} mM	---		

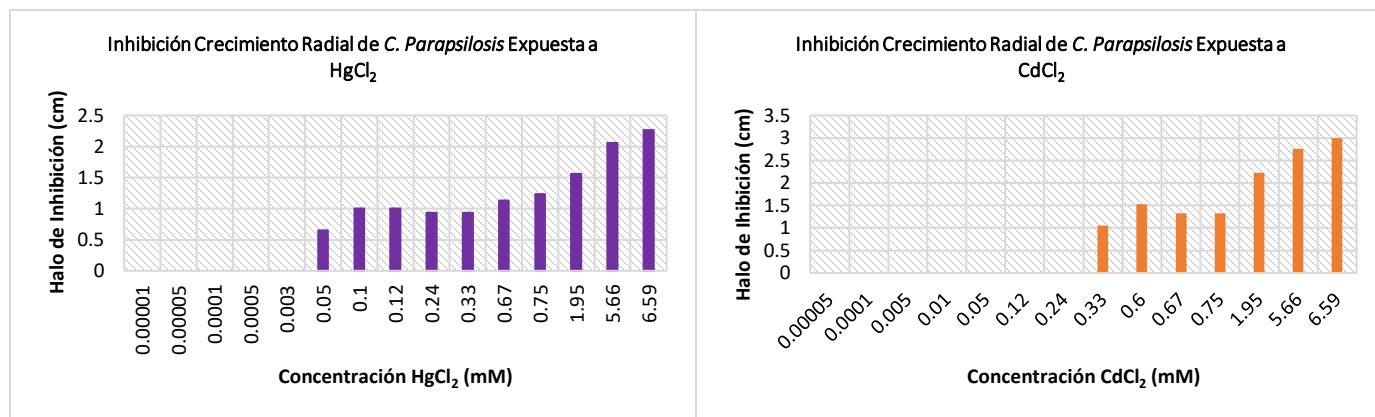
Figura 35. Diámetros de inhibición de *C. Parapsilosis* generados por las concentraciones de HgCl_2 (izquierda) y CdCl_2 (derecha).

Tabla 11. Halos de inhibición generados por HgCl_2 en *C. Parapsilosis*.

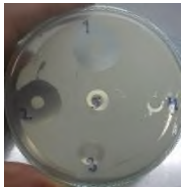
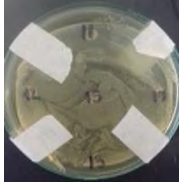
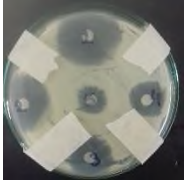
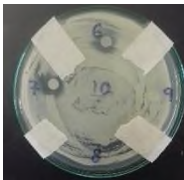
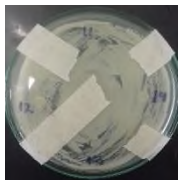
<i>C. Parapsilosis</i> / HgCl_2	Concentraciones 1-5					Concentraciones 6-10					Concentraciones 11-15				
Asignación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Díámetro de inhibición (cm)	2.2 6	2.0 6	1.5 6	1.2 3	1.1 3	0.9 3	0.9 3	1	1	0.6 5	---	---	---	---	---
Halo de inhibición															

Tabla 12. Halos de inhibición generados por CdCl_2 en *C. Parapsilosis*.

<i>C. Parapsilosis</i> / CdCl_2	Concentraciones 1-5					Concentraciones 6-10					Concentraciones 11-15				
Asignación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Díámetro de inhibición (cm)	3	2.7 6	2.2 3	1.3 3	1.3 3	1.5 3	1.0 5	---	---	---	---	---	---	---	---
Halo de inhibición															

Los resultados anteriores mostraron una tolerancia más acentuada para CdCl_2 , y menor para ambos metales en relación a *Hafnia*, sin embargo, *C. Parapsilosis* sigue mostrando un alto nivel de tolerancia para ambas especies de MP. Para levaduras, algunos de los mecanismos biológicos implicados en la supervivencia de estos organismos a la exposición a MP son la precipitación extracelular, la transformación de especies metálicas (reacciones oxido-reducción), la biosorción a paredes celulares, o la impermeabilidad.¹⁴⁴ Otro de los mecanismos participantes es la formación de complejos entre el metal y distintos tipos de moléculas. Algunas de estas son las fitoquelatinas (FQ) o cadistinas, inducidas por la presencia de MP.¹⁴⁵ Las metalotioneínas (MT) en particular, son proteínas ricas en cisteínas que pueden formar complejos MT-MP para captar distintos metales. Levaduras como *S. cerevisiae*, *C. glabrata* y *S. pombe*, por ejemplo, presentan un mecanismo predominante de captación de Cd basado en la formación del complejo MT-Cd.¹⁴⁶

8.2.1.1 SELECCIÓN DE CONCENTRACIONES TOLERANTES E INHIBITORIAS DE MP EN *Candida Parapsilosis*

El siguiente paso con respecto al estudio de esta especie consistió en la elección de las concentraciones a utilizar para realizar el posterior análisis de la actividad de la enzima GST y la cuantificación de ERO's. Para ello se seleccionaron las concentraciones de Hg y Cd que generaron inhibición, un control, así como una concentración intermedia (mostradas en la Tabla 13).

Tabla 13. Concentraciones seleccionadas para el análisis de la actividad de la GST y la cuantificación de ERO's en *C. Parapsilosis*.

Organismo	Control	[-] HgCl ₂	[+] HgCl ₂	[-] CdCl ₂	[+] CdCl ₂
<i>C. Parapsilosis</i>	---	0.05mM	0.67mM	0.33mM	0.67mM

8.2.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Candida Parapsilosis*

Determinadas las concentraciones para las pruebas bioquímicas, se procedió a elegir los tiempos de análisis. Para ello se desarrolló una cinética de crecimiento basada en métodos espectrofotométricos y conteos de microorganismos (Figura 36).

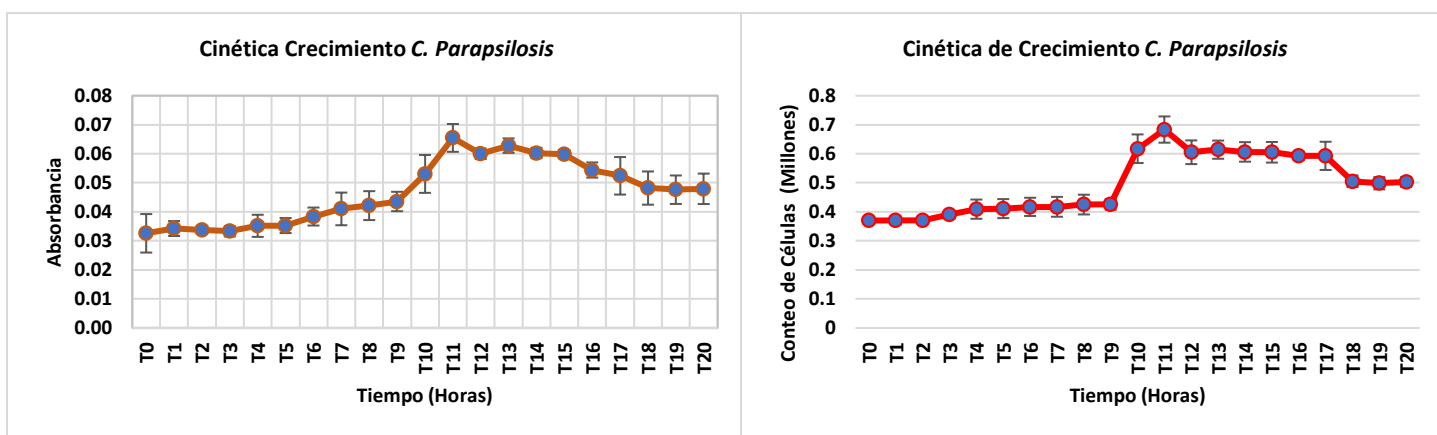


Figura 36. Cinética de Crecimiento en Sabouraud de *C. Parapsilosis*: Izquierda - Espectrofotometría UV-Vis/Derecha – Conteo de microorganismos en Cámara Neubauer.

Ambos métodos se mostraron concordantes respecto al tiempo exponencial en el cual el metabolismo del organismo se encontrase más activo (T9-T11) siendo el T10 el adecuado para realizar los análisis bioquímicos correspondientes.

8.2.3 *Candida Parapsilosis* – ANÁLISIS BIOQUÍMICOS: ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's

Los resultados mostrados con anterioridad se utilizaron para establecer las concentraciones y los tiempos de medición (T0, T10 y T56 (este último se designó con la intención de seguir el patrón de comportamiento del organismo en un tiempo fuera del periodo establecido)) para la cuantificación y la actividad de las ERO's y GST, respectivamente. Los resultados y el análisis efectuado a partir de ellos, para cada MP (CdCl_2 y HgCl_2) se muestran a continuación. El análisis estadístico de las mediciones bioquímicas se realizó mediante un ANOVA de una sola vía, utilizando como prueba conclusiva la prueba de comparación por Tukey. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

8.2.3.1 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's Cd-T0, T10 y T56 (HORAS)

La comparación entre la actividad de GST y la presencia de ERO's mostró, al T0 (Figura 37), una nula relación entre ambas, donde la actividad enzimática decrece con el aumento de CdCl_2 mientras la concentración de ERO's no muestra cambio significativo. En tanto, para el T10 (Figura 38), se observa un decremento de la enzima para la concentración baja, pero un aumento, incluso con respecto al organismo control, en la concentración alta. Esto sugiere que en el periodo en el cual el metabolismo de la levadura se encontró más activo para la cinética medida, el factor dosis-respuesta (Cd^{+2} -GST) es relevante en el comportamiento de la enzima. Lo mismo podría decirse para el T56 (Figura 39), pero en un sentido distinto, pues, en este periodo, la actividad de la GST se ve aumentada como respuesta a la dosis baja del metal, en tanto que se reestablece (respecto al control) o decrece (respecto a la baja concentración de CdCl_2), para la concentración más alta. Los diferentes comportamientos de la enzima en estos últimos dos periodos, podrían bien responder también la actividad metabólica propia del organismo, promovido y regulado por su ambiente (nutrientes disponibles) y su tasa de crecimiento y desarrollo.

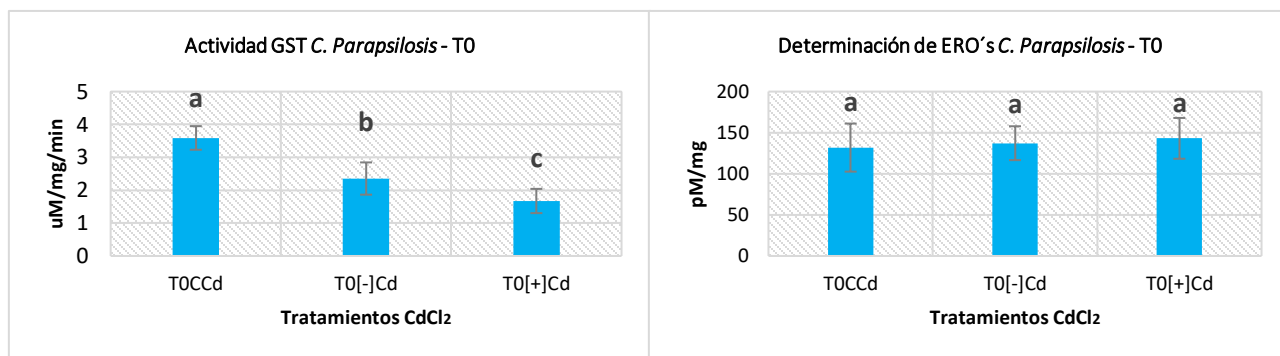


Figura 37. Actividad GST y producción ERO's en *C. Parapsilosis* – T0 sometida a tratamientos de CdCl_2 : T0CCd= Control, T0[-]Cd= 0.33mM, T0[+]Cd= 0.67mM (n=9)

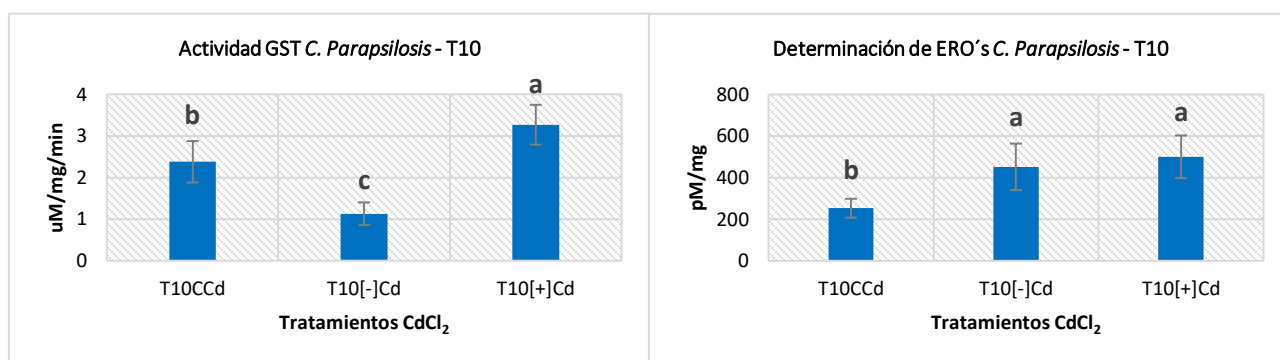


Figura 38. Actividad GST y producción ERO's en *C. Parapsilosis* – T10 sometida a tratamientos de CdCl_2 : T10CCd= Control, T10[-]Cd= 0.33mM, T10[+]Cd= 0.67mM (n=9)

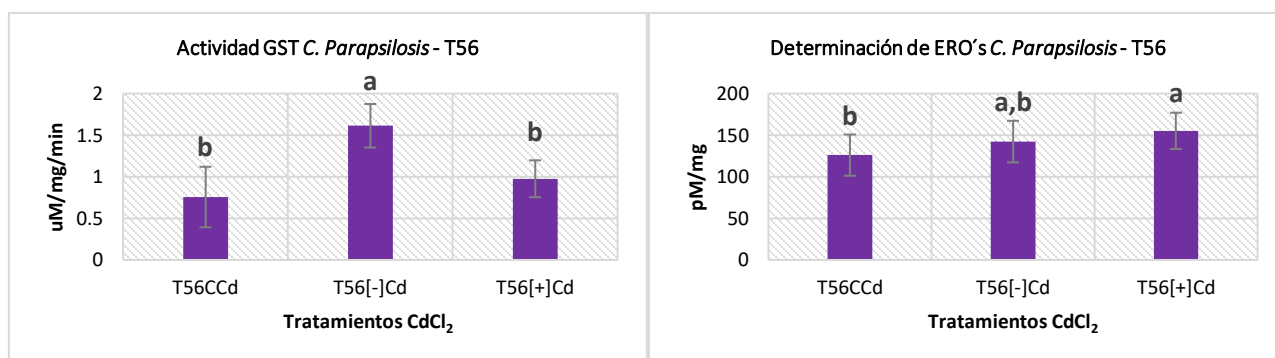


Figura 39. Actividad GST y producción ERO's en *C. Parapsilosis* – T56 sometida a tratamientos de CdCl_2 : T56CCd= Control, T56[-]Cd= 0.33mM, T56[+]Cd= 0.67mM (n=9)

8.2.3.2 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST & PRODUCCIÓN ERO's-Cd EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

La descripción realizada en el apartado anterior sobre la actividad enzimática en los tiempos 10 y 56, se visualizan con más claridad en la Figura 40. En el T10 se observó un aumento de hasta 2 unidades en la concentración alta (0.67mM) con respecto a la concentración baja del metal (0.33mM), y de 0.89 unidades comparando la primera con el control. En tanto, para las 56 horas de exposición, el incremento de la actividad se generó en la concentración baja (de 0.63 unidades con respecto a la alta concentración y 0.85 respecto al control).

En relación al comportamiento de ERO's en el microorganismo, el crecimiento de estas con la presencia del metal se produjo en los tiempos T10 y T56 (de hasta 247 unidades en el T10 con respecto al grupo control, y de 29 unidades para el T56 usando la misma comparación). Estos datos muestran la participación directa del CdCl_2 en la producción de ERO's en *C. Parapsilosis*, en particular, en el T10, donde se genera un mayor incremento, lo cual denota la importancia del periodo de exposición en la interacción MP-*C. Parapsilosis* (Figura 38).

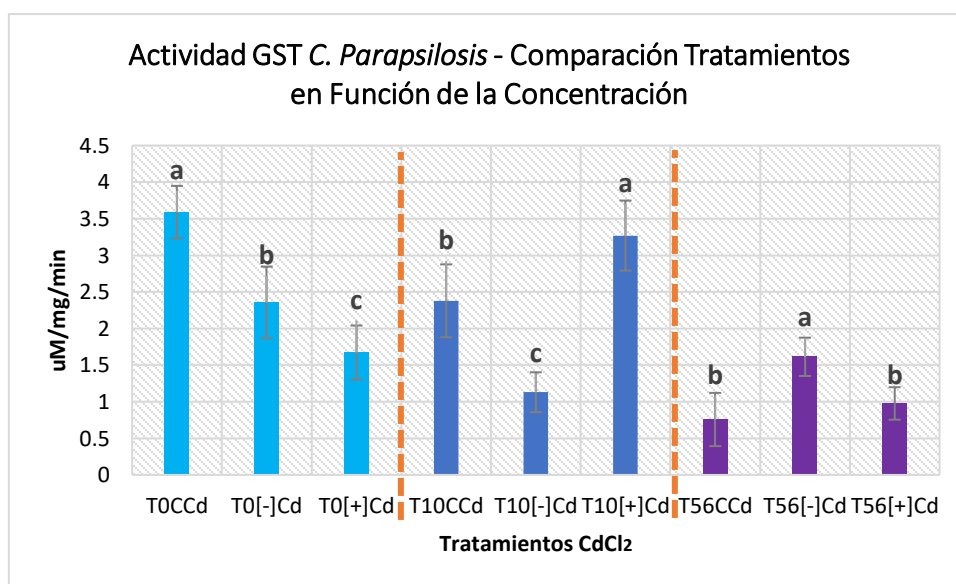


Figura 40. Actividad GST en *C. Parapsilosis* – Comparativo en Función de la Concentración de CdCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T56). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo las distintas concentraciones de CdCl_2 utilizadas.

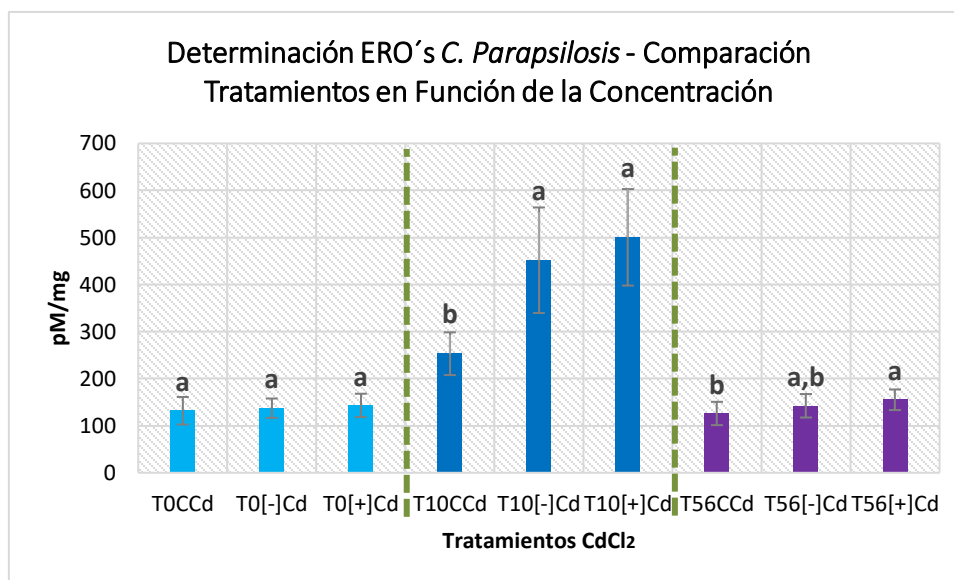


Figura 41. Cuantificación ERO's en *C. Parapsilosis* – Comparativo en Función de la Concentración de CdCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T56). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo las distintas concentraciones de CdCl_2 utilizadas.

8.2.3.3 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST & PRODUCCIÓN ERO's-Cd EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

Evaluando la actividad de la enzima en función del tiempo, se encontró que en el grupo control, la enzima se vio disminuida con el avance de las horas. Para la concentración baja (0.33mM), esta también decreció con el paso del tiempo, sin embargo, transcurridas 10 horas es cuando se observó la menor actividad, y después de 56 horas, esta volvió a aumentar. Es en la concentración alta de la sal metálica (0.67mM) cuando se encontró un aumento significativo de la actividad de la enzima con respecto al grupo control (de 1.6 unidades), dado 10 horas de exposición. Posteriormente, a las 56 horas, esta volvió a decrecer (Figura 42).

El comportamiento de las ERO's, visualizado en función del tiempo, presentó un patrón de comportamiento en las tres secciones del gráfico. Tanto para el control, como para las concentraciones de CdCl_2 , se observó que en el T10 fue donde se presentó una mayor cantidad de especies reactivas, acentuándose este comportamiento en presencia del agente tóxico. Lo que sugiere una importancia subyacente del periodo de exposición del CdCl_2 , con respecto al daño oxidativo generado en el organismo (Figura 43). Por otro lado, cuando se evaluaron en conjunto las comparaciones de la enzima y las ERO's en función del tiempo, específicamente para las exposiciones al MP, en el T10, se extrajeron dos comportamientos diferentes. 1) Que, para la concentración baja (0.33mM), cuando las ERO's aumentan, por causa del CdCl_2 , la actividad enzimática se presenta en su rango más bajo. Y 2) en la alta concentración de Cd^{+2} , cuando se propicia el máximo incremento de ERO's, la actividad enzimática también se ve expresada en su

punto más alto. Lo anterior refleja que el comportamiento de la enzima responde a la toxicidad de CdCl_2 bajo una estrecha relación dosis-tiempo de exposición, relacionada al metabolismo celular del organismo. Pues es importante recordar que a las 10 horas es cuando se genera el pico máximo de crecimiento y desarrollo celular de *C. Parapsilosis*.

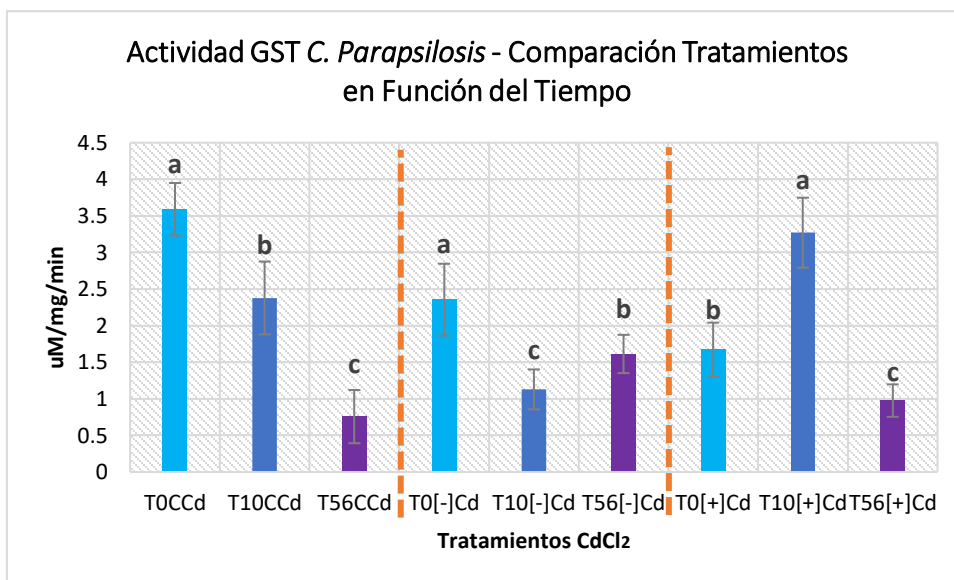


Figura 42. Actividad GST en *C. Parapsilosis* – Comparativo en Función del tiempo (CdCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo los distintos tiempos utilizados.

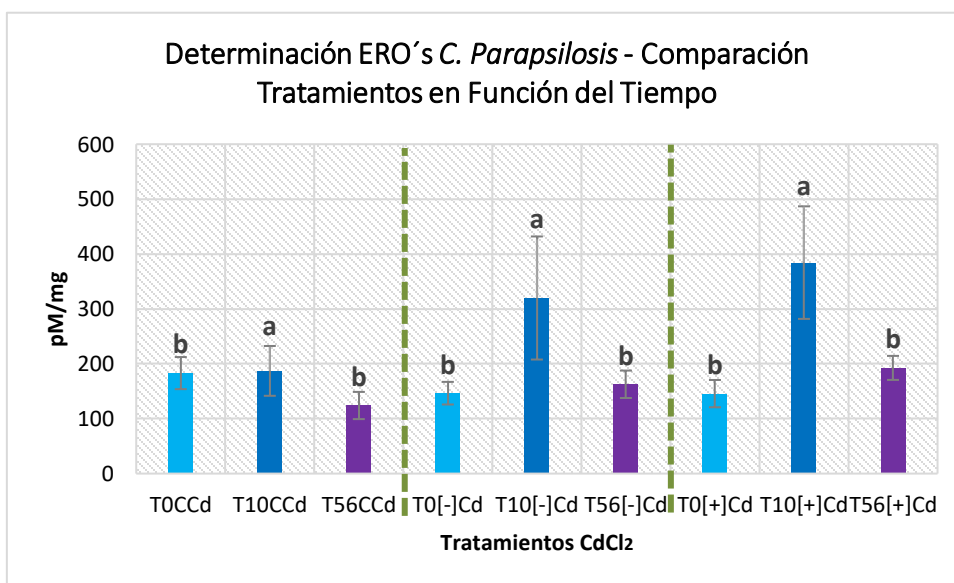


Figura 43. Cuantificación ERO's en *C. Parapsilosis* – Comparativo en Función del tiempo (CdCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo los distintos tiempos utilizados.

Bajo las observaciones generadas se substrajeron las siguientes conclusiones:

- ✚ El MP Cd^{+2} (CdCl_2) es capaz de propiciar la producción de ERO's en *C. Parapsilosis*. Dicha inducción está ligada al periodo de exposición del metal, viéndose acentuado éste al transcurrir 10 horas, bajo un intervalo medido de T0-T56 (horas), con independencia de la dosis suministrada.
- ✚ El comportamiento de la enzima GST en *C. Parapsilosis*, responde a la toxicidad de CdCl_2 bajo una determinada relación dosis-tiempo de exposición. Viéndose disminuida a sus estándares más bajos en el T10, para la mínima concentración del metal (0.33mM), pero aumentada a su nivel más alto, en el mismo periodo, para la concentración más alta (0.67mM). Lo cual sugiere una capacidad de respuesta del organismo utilizando la enzima para combatir la producción de ERO's generada por la intoxicación por CdCl_2 suministrado en altas concentraciones.
- ✚ La conclusión anterior se ve reforzada al observar el comportamiento enzimático en la comparación en función del tiempo (Figura 42), para el T56, alta concentración, y compararla con la presencia de ERO's en la Figura 43, para el mismo tiempo y la misma concentración. Allí se observa una disminución, tanto de ERO's como de la actividad de la enzima, transcurridas 56 horas, lo que denota que la enzima responde a la peroxidación de lípidos generado por el Cd^{+2} . Así pues, una vez reestablecidas las ERO's en el T56, la actividad enzimática se ve disminuida, respondiendo a los bajos niveles de especies reactivas.
- ✚ El metabolismo celular del organismo desempeña un papel clave en la respuesta bioquímica a la exposición al CdCl_2 . En el T10 es cuando se genera el pico máximo de crecimiento y desarrollo celular, y es en este periodo cuando se observa una mayor producción de ERO's, y una respuesta enzimática relacionada a la concentración del metal (baja para la menor concentración, y alta para la concentración más elevada).

8.2.3.4 ACTIVIDAD GST Y CUANTIFICACIÓN ERO's Hg-T0, T10 & T56 (HORAS)

Al igual que sucedió con el CdCl_2 , para HgCl_2 , en el T0, no se percibió una relación existente entre el comportamiento de GST y el de las ERO's, debido, posiblemente, a la homeostasis metabólica del microorganismo, sin un agente tóxico que la perturbe (Figura 44). Por otro lado, en el T10, se observó, en la concentración alta del metal, la disminución de la enzima (en 0.89 unidades con respecto al control), al tiempo que aumentaron las ERO's hasta en 70 unidades (Figura 45). Un fenómeno contrario es visualizado transcurridas 56 horas (Figura 46). En este tiempo, se vio un aumento en la actividad de la enzima ante la presencia a Hg^{+2} (en 0.5 unidades). En el mismo periodo y para las mismas concentraciones del metal, las ERO's disminuyeron en 40 unidades. En este caso, es necesario saber las condiciones metabólicas de la levadura, si se encuentra

envejecida o su capacidad de adaptación, sin embargo, al igual que sucedió con *H. alvei* en un periodo prolongado de exposición, el aumento de la actividad de la enzima, al tiempo que se generó un decremento en las ERO's, puede deberse a la capacidad de la GST para detoxificar el HNE, producto competidor del MDA en la lipoperoxidación.²²⁹

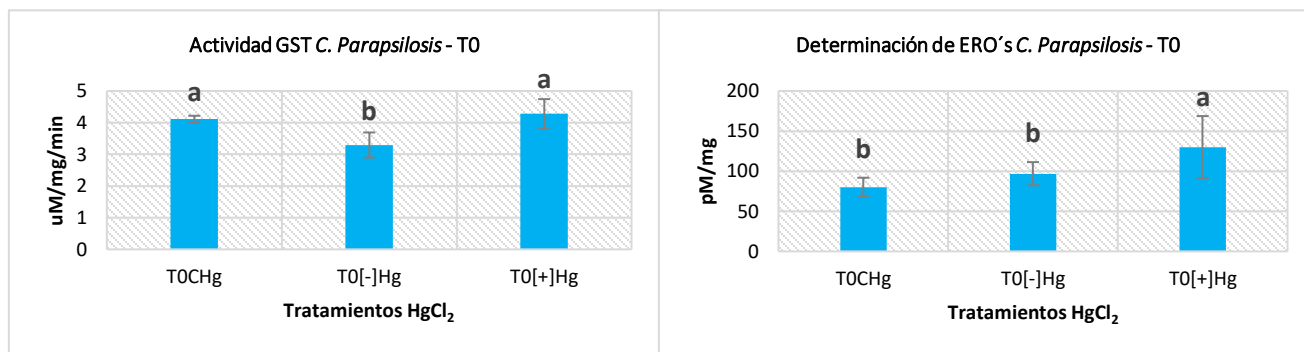


Figura 44. Actividad GST y producción ERO's en *C. Parapsilosis* – T0 sometida a tratamientos de $HgCl_2$: T0CCd= Control, T0[-]Cd= 0.05mM, T0[+]Cd= 0.67mM (n=9)

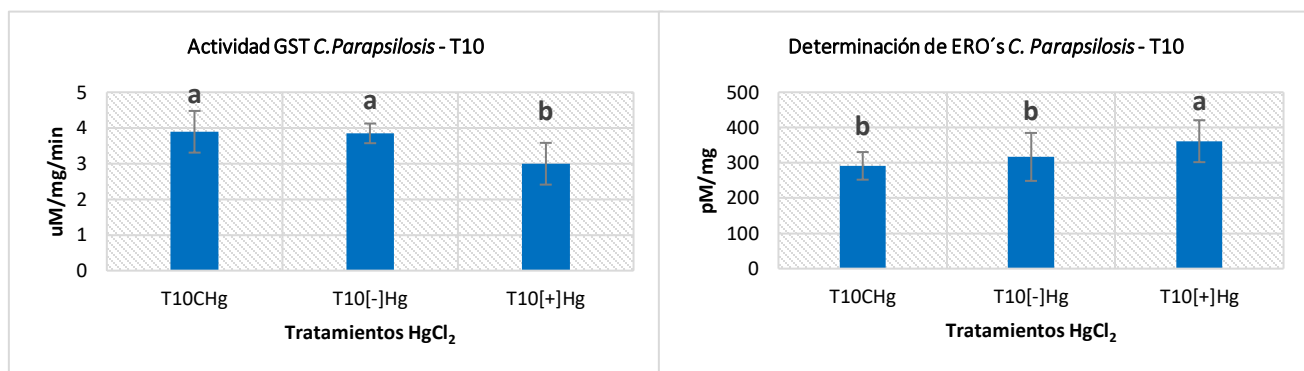


Figura 45. Actividad GST y producción ERO's en *C. Parapsilosis* – T10 sometida a tratamientos de $HgCl_2$: T10CCd= Control, T10[-]Cd= 0.05mM, T10[+]Cd= 0.67mM (n=9)

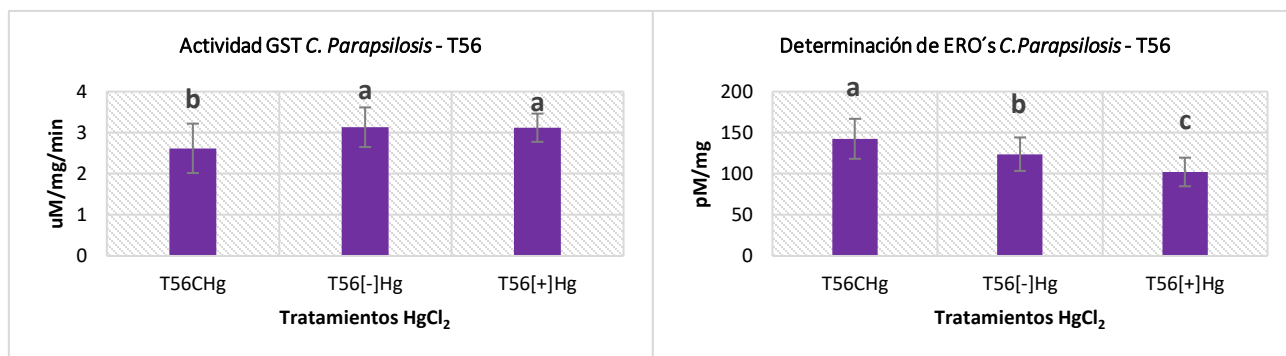


Figura 46. Actividad GST y producción ERO's en *C. Parapsilosis* – T56 sometida a tratamientos de HgCl_2 : T56CCd= Control, T56[-]Cd= 0.05mM, T56[+]Cd= 0.67mM (n=9)

Los tres diferentes comportamientos evidencian la importancia del tiempo en la reacción enzimática de parte de la GST (la enzima parece reaccionar a la intoxicación por MP, aumentando su actividad, transcurridas 56 horas de exposición, como posible mecanismo de reacción ante la toxicidad generada por Hg^{+2}), y como este comportamiento evoluciona dependiendo de las horas transcurridas, aumentando su estatus como enzima reactiva dependiente del tiempo para agentes xenobióticos, en este particular caso, para MP (HgCl_2).

8.2.3.5 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST, PRODUCCIÓN ERO's-Hg EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

En el gráfico de ERO's comparativo de las concentraciones de HgCl_2 se observó un aumento de estas en los T10 para la superior concentración de Hg^{+2} (Figura 48). En el mismo periodo, para la misma concentración de Hg^{+2} , La actividad de GST disminuyó (Figura 47). En cambio, al T56, se vio una disminución de ERO's con respecto al control para ambas concentraciones del agente xenobiótico (Figura 48), comportamiento descrito con anterioridad, junto al aumento de la acción enzimática para el mismo periodo (Figura 47).

Ambos conjuntos de resultados sostienen la hipótesis descrita con anterioridad, respecto al papel que desempeña el producto competidor (HNE) del MDA en la lipoperoxidación y como pudo afectar la producción de ERO's y la actividad GST (a mayor HNE, menor producción de ERO's medida a través del método de MDA, y mayor actividad enzimática, y viceversa).²²⁹ Ahora bien, en el caso de *C. Parapsilosis*-Hg, la producción mayoritaria de uno u otro producto parece ser dependiente del tiempo. Cuando el metabolismo de *C. Parapsilosis* se encuentra más activo (T10), hay una mayor producción de MDA, y una menor actividad enzimática. Por el contrario, al T56, se

favorece la generación de HNE, con el consecuente aumento de la actividad de GST para inactivarlo.

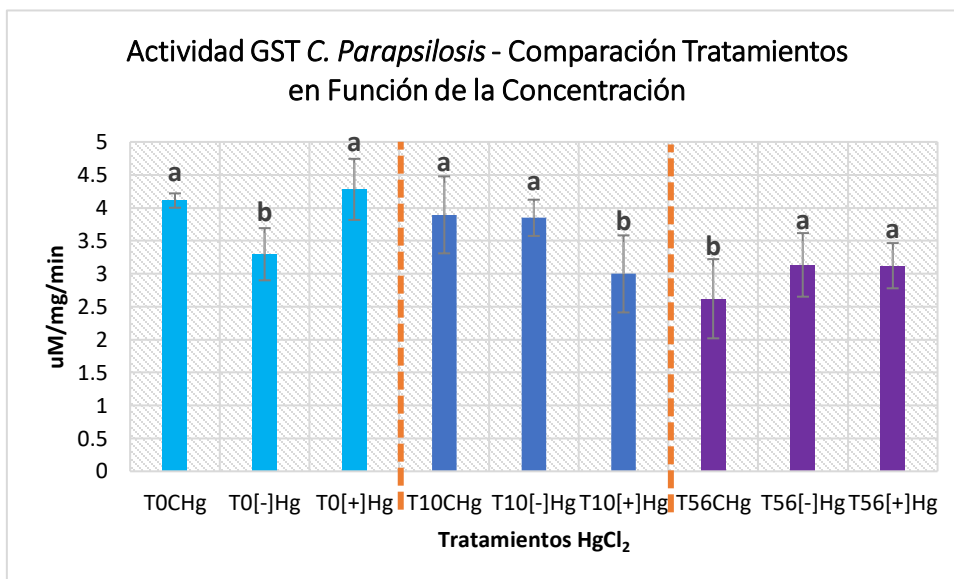


Figura 47. Actividad GST en *C. Parapsilosis* – Comparativo en Función de la Concentración de HgCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T56). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo las distintas concentraciones de HgCl_2 utilizadas.

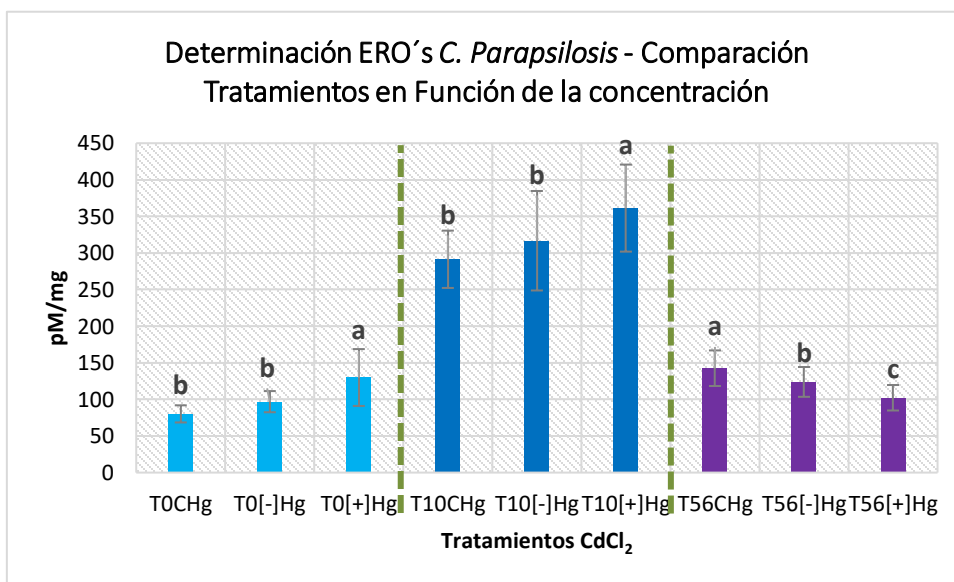


Figura 48. Cuantificación ERO's en *C. Parapsilosis* – Comparativo en Función de la Concentración de HgCl_2 . Los análisis estadísticos se dividieron en función de los tiempos (T0, T10 y T56). En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo las distintas concentraciones de HgCl_2 utilizadas.

8.2.3.6 COMPARACIÓN ACTIVIDAD GST, PRODUCCIÓN ERO's-Cd EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

La comparativa en función del tiempo del comportamiento de las ERO's de acuerdo a la presencia de HgCl_2 muestra un aumento claro de estas para el T10, donde los niveles se disparan (Figura 50). Si, además, este comportamiento se compara con el gráfico de la actividad de GST en función del tiempo (Figura 49), se encuentra un punto (T10[-]Hg) donde también la actividad aumenta, incluso, por sobre los niveles del control, denotando el punto de convergencia del más alto comportamiento de la actividad enzimática y la concentración de ERO's.

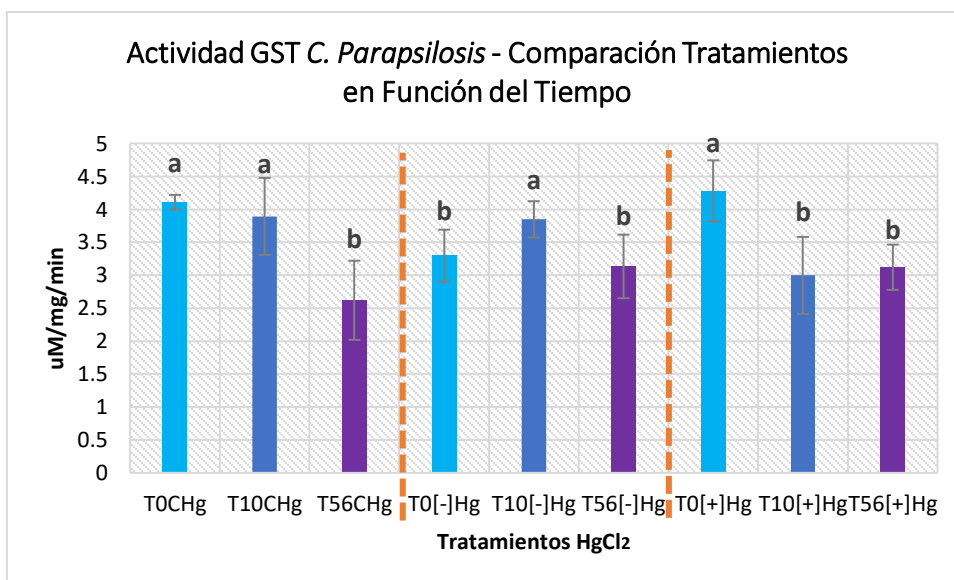


Figura 49. Actividad GST en *C. Parapsilosis* – Comparativo en Función del tiempo (HgCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de la enzima de acuerdo los distintos tiempos utilizados.

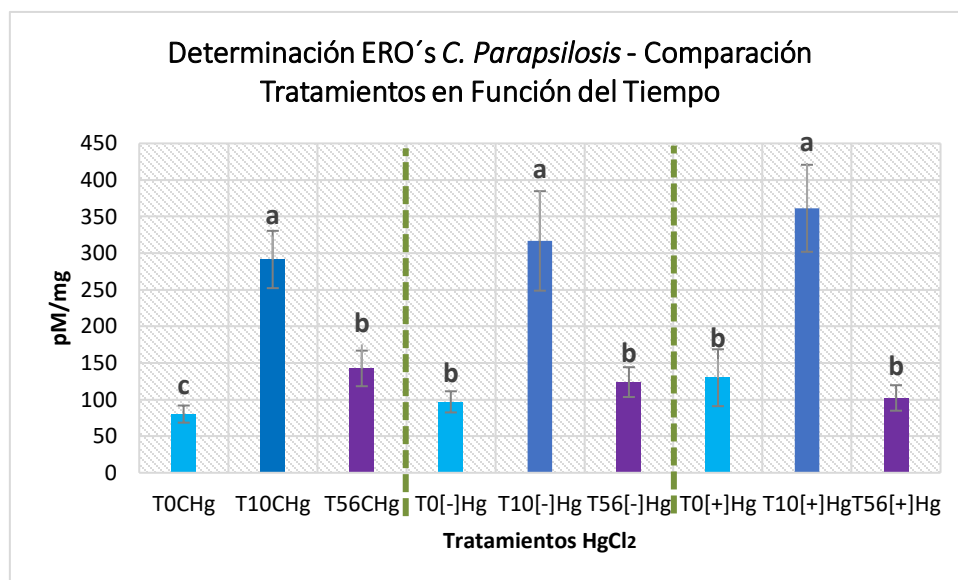


Figura 50. Cuantificación ERO's en *C. Parapsilosis* – Comparativo en Función del tiempo (HgCl_2). Los análisis estadísticos se dividieron en función de las concentraciones. En el gráfico se señala cada división con líneas punteadas. Se analizó en cada uno el comportamiento de ERO's de acuerdo los distintos tiempos utilizados.

8.2.3.7 ANÁLISIS MP-*Candida Parapsilosis*- ERO's-GST

Algunos estudios dedicados a las GST's en levaduras han mostrado la inducción de la enzima por DNCB o por moléculas parecidas estructuralmente a este, como el o-dinitrobenzenceno (o-DNB) en *Issatchenkia orientalis*.¹⁴⁷

En levaduras pertenecientes al género *Candida*, como *C. albicans* y *C. glabrata*, se ha estudiado la actividad de la enzima en condiciones de EO por agentes no metálicos, como el fluconazol, donde se observó una respuesta dependiente de la naturaleza de estos agentes.^{148,149} En particular, para *C. Parapsilosis*, no existen estudios sobre el comportamiento de la enzima, y aún menos de esta bajo condiciones de EO y/o exposición a MP. Sí existen, empero, estudios en células de levaduras como *S. cerevisiae* (un organismo modelo muy estudiado en investigación), que indican que las GST puede proteger contra la toxicidad por cadmio en las células de levadura al mediar en el secuestro de complejos de cadmio-glutación en los compartimentos vacuolares.^{150,151} El estudio de Cd-GST para *C. Parapsilosis* indicó que el comportamiento de la enzima GST en este organismo responde a la toxicidad de CdCl_2 bajo una determinada relación dosis-tiempo de exposición (transcurridas 10 horas de exposición a 0.67mM de la especie química), posiblemente utilizando un mecanismo similar al descrito en *S. cerevisiae*.

Respecto a Hg, *Schizosaccharomyces pombe* ha mostrado respuesta al EO inducido por sustancias como menadiona y HgCl_2 , la enzima GST en estos estudios vio incrementada su actividad ante la presencia a estos agentes, lo que sugiere su participación en la defensa contra el EO.^{152,153}

Los resultados observados en este trabajo, mostraron que la respuesta bioquímica de *C. Parapsilosis* al estrés provocado por HgCl_2 se tornan dependientes del tiempo. Al no existir bibliografía específica para esta relación, se vuelve pues, importante, el diseño de nuevos proyectos de investigación, complementarios a este, destinados a seguir elucidando la función de defensa de la enzima GST contra MP como Cd y Hg en organismos como *C. Parapsilosis*.

8.3 *Penicillium sp*

Continuando la estructura de presentación de resultados precedente, en *P. sp* se muestra:

- ❖ Determinación de concentraciones tolerantes e inhibitorias y determinación de los tiempos de medición de los análisis bioquímicos en función de la cinética de crecimiento.
- ❖ Análisis bioquímicos (Actividad de GST y Cuantificación de ERO's).

8.3.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Penicillium sp* & DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES TOLERANTES E INHIBITORIAS DE HgCl_2 & CdCl_2

La estrategia experimental desarrollada para *P. sp* permitió evaluar la cinética de crecimiento colonial del organismo por el método de picadura en medio Sabouraud y su capacidad de tolerancia bajo concentraciones de HgCl_2 y CdCl_2 establecidas en un intervalo de 0.75mM-6.59mM. Los resultados, presentados en las Figuras 51-54, mostraron una respuesta a la toxicidad de HgCl_2 más acentuada que en CdCl_2 . La cinética de *P.sp*- HgCl_2 por ejemplo, ilustrada en la figura 51, denotó que las concentraciones de 5.66 y 6.59 mM inhibieron por completo el crecimiento del microorganismo. Sin embargo, a menores concentraciones, tales como 1.95 y 0.75 mM, si bien se observó un retardo en el comienzo del crecimiento, este se vio favorecido con el transcurso del tiempo, llegando casi a igualar (en el caso del microorganismo expuesto a 0.75mM de HgCl_2) el diámetro de crecimiento del sembrado de partida de la muestra control.

Lo anterior, no obstante, no significa que a ese tiempo el crecimiento de *P. sp*-0.75mM de HgCl_2 se haya igualado con el de la muestra control, dado que para esos momentos dicha muestra contaba ya con más de 40 colonias distribuidas por todo el medio de cultivo (Figura 52). Significa, empero, que el metabolismo del hongo, aunque ralentizado por la presencia de MP, sigue activo a concentraciones de 0.75 y 1.95mM.

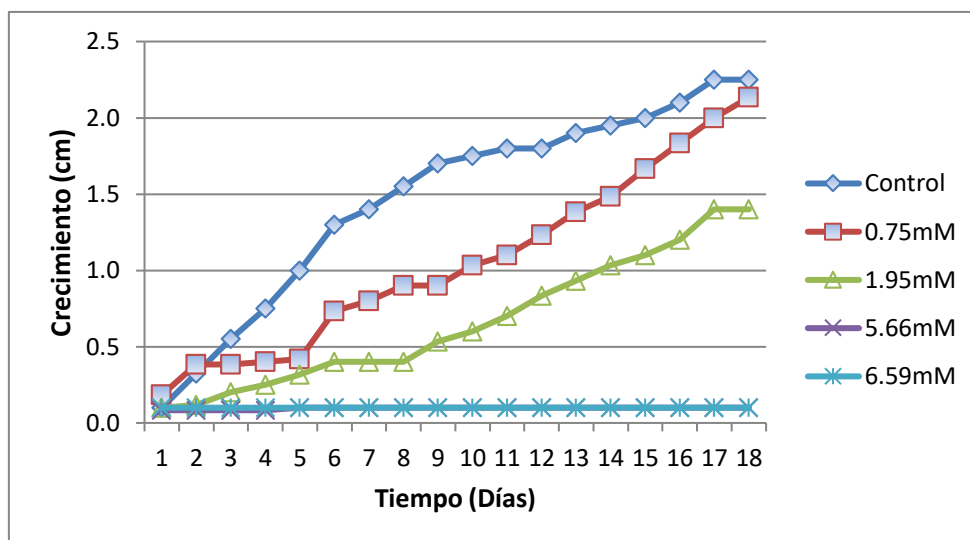


Figura 51. Cinética de crecimiento de *P. sp-Hg*

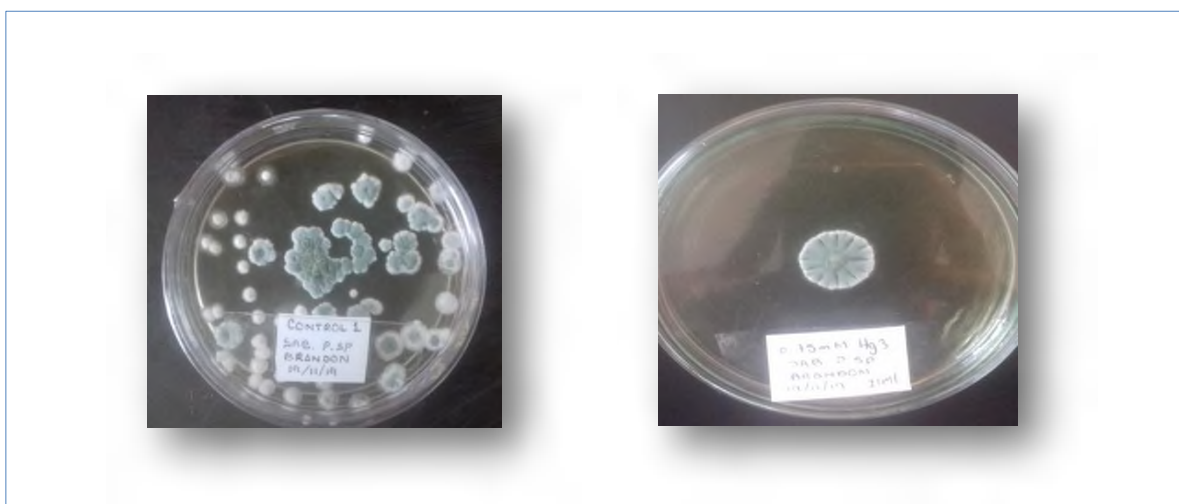


Figura 52. Crecimiento colonial de *P. sp.* Izquierda: Control-18 días, Derecha: 0.75 mM HgCl_2 -18 días

En el caso de *P.sp- CdCl₂* se vislumbró un fenómeno similar al descrito con anterioridad en *P.sp-HgCl₂*, con una respuesta contra la toxicidad por cadmio menos acentuada que en la de mercurio. Al igual que en el sistema anterior, las concentraciones de 5.66 y 6.59 mM de CdCl_2 inhibieron por completo el crecimiento y desarrollo del organismo, en tanto que en concentraciones inferiores, como 0.75mM y 1.95mM, sólo se observó un crecimiento notable a partir del duodécimo y décimo cuarto día, respectivamente (Figura 53).

En ambos casos, tanto para la Figura 51 como para la Figura 53, se hace una comparación del crecimiento colonial de *P. sp*-control con *P. sp*- 0.75mM metal (para la Figura 53 la comparación se muestra en la Figura 54), dado que, de todo el espectro de concentraciones utilizado, en ésta en particular fue donde el crecimiento del organismo fue más propicio.

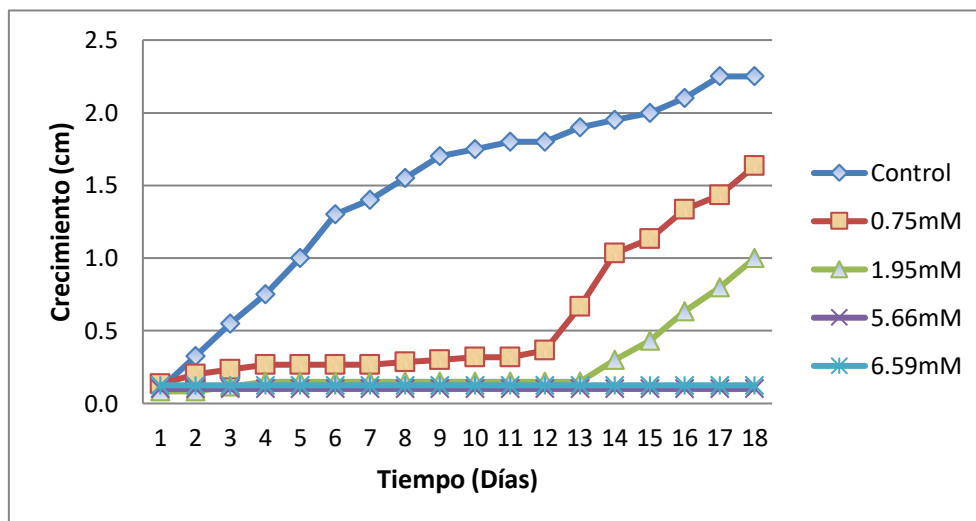


Figura 53. Cinética de crecimiento de *P. sp*-Cd

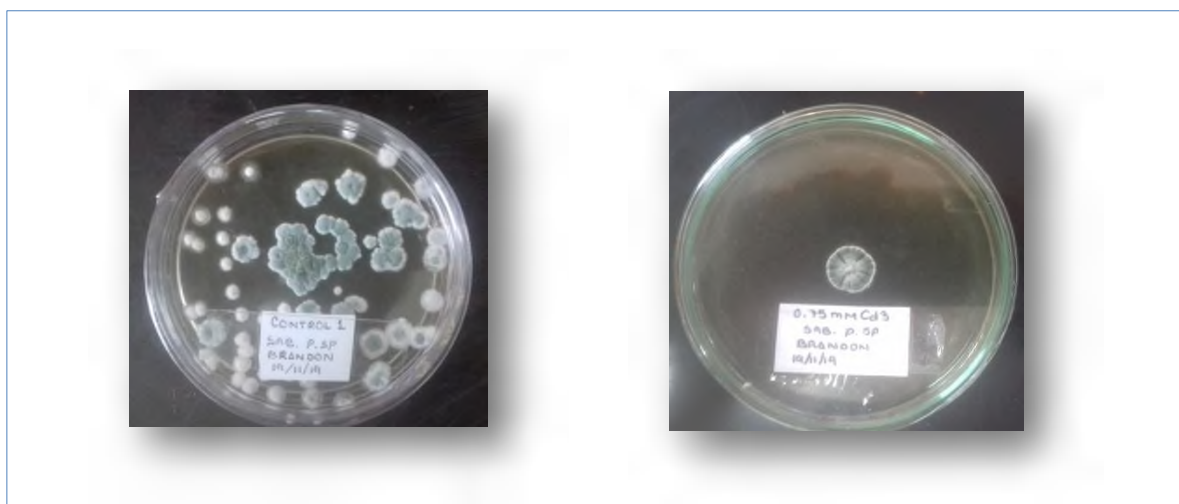


Figura 54. Crecimiento colonial de *P. sp*. Izquierda: Control-18 días, Derecha: 0.75 mM CdCl_2 -18 días

El hecho de que el metabolismo de *P. sp*, aún ralentizado, haya permitido el crecimiento del organismo a concentraciones de 0.75 y 1.95mM, sugiere la acción de mecanismos de supervivencia respondiendo ante la toxicidad generada por los MP. En hongos, algunos de los mecanismos operantes consisten en reacciones oxido-reducción cuya finalidad es la transformación de estos cationes metálicos a especies menos nocivas para el organismo, que incluso puedan ser excretadas por este. Otros tipos de mecanismos consisten en la

impermeabilidad selectiva contra los MP o la quelación de estos a través de la formación de complejos con moléculas inducidas por los hongos.^{154, 155}

En relación a la mejor capacidad de respuesta de *P. sp* en Hg con respecto a Cd, esto entra en concordancia con el comportamiento de otros organismos del mismo género *Penicillium*, tales como *P. valunskyi* y *P. digitatum*, donde la capacidad de tolerancia de estos organismos a Cd^{+2} se ha encontrado nula con respecto a otros MP como Pb^{+2} o Cr^{+6} .¹⁵⁶ Así, el comportamiento inverso de *P. sp* contrastado con la tolerancia de *H. alvei* y *C. Parapsilosis* para Hg y Cd promueve un panorama de opciones más amplio en cuanto al estudio de las especies seleccionadas para la investigación y su relación con los MP y los mecanismos que utilizan para detoxificar estas especies químicas.

8.3.2 *Penicillium sp* – ANÁLISIS BIOQUÍMICOS: ACTIVIDAD GST Y CUANTIFICACIÓN ERO's

Los parámetros utilizados para los análisis bioquímicos se basaron en los resultados obtenidos en los experimentos precedentes. Para ambas especies químicas (CdCl_2 y HgCl_2) se estableció un tiempo de análisis utilizando como criterio el máximo crecimiento del organismo, tomando en cuenta que en este periodo el metabolismo de *P. sp* se encontraba altamente activo. Así pues, se establecieron también las concentraciones de exposición (0.75mM y 1.95mM) para ambos MP. En las cuales el microorganismo fue capaz de desarrollarse.

Las mediciones en la actividad de la enzima y la cuantificación de ERO's se muestran a continuación.

8.3.2.1 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's Cd-T18 (DÍAS)

Los análisis bioquímicos para *P. sp*-Cd mostraron una invariancia en los niveles activos de la enzima, independiente de la dosis del metal. En el caso de la producción de ERO's, las concentraciones de Cd^{+2} no generaron un aumento significativo en el organismo. Conociendo, por tanto, la premisa respecto a la naturaleza de la GST (enzima de respuesta ante el estrés y agentes xenobióticos), el comportamiento enzimático mostrado en la Figura 55 es concordante con la función establecida, pues, dado que no existe un aumento en las ERO's al cual responder, no existe la necesidad, por tanto, de un aumento en la inducción de la actividad de la GST. Por otro lado, la falta de ERO's se puede deber a la acción de otros mecanismos antioxidantes y/o especializados en el tratamiento contra MP.

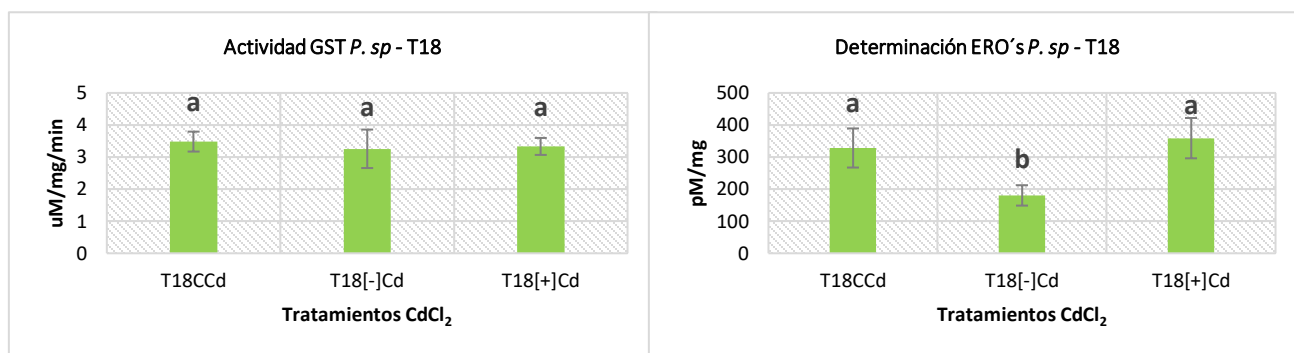


Figura 55. Actividad GST y producción ERO's en *P. sp* – T18 (días) sometido a tratamientos de CdCl_2 : T18CCd= Control, T18[-]Cd= 0.75mM, T18[+]Cd= 1.95mM (n=6)

8.3.2.2 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's Hg-T18 (DÍAS)

Referente a los análisis con HgCl_2 , se pudo observar un aumento de 0.4 unidades (respecto al control) en la actividad de la enzima ante la exposición a la concentración baja del metal (0.75mM), aumento que decreció, pero se mantuvo significativo, para la concentración alta. En términos de especies reactivadas generadas, se originó un incremento (en 188 unidades respecto al grupo control) bajo la exposición a la concentración elevada de la especie química (1.95mM). El incremento temprano de la actividad de la enzima sugiere una pronta respuesta ante la presencia de HgCl_2 , lo cual podría explicar por qué el crecimiento del organismo se vio favorecido con respecto al tratamiento con CdCl_2 (Figuras 51-54). A decir: La pronta reacción de la enzima GST contra el HgCl_2 y el posterior incremento de ERO's por este, promoviendo una respuesta nulificadora de los efectos adversos en el crecimiento y desarrollo metabólico de *P. sp*.

El hecho de que la enzima se haya activado, incluso antes del aumento de las ERO's sugiere la acción de mecanismos previos a la activación de la maquinaria antioxidante. En organismos fúngicos, reacciones de oxido-reducción, impermeabilidad selectiva o la quelación contra MP son algunos de los procesos por los cuales se pueden detoxificar estas especies químicas.^{154,155} Es pues, factible pensar, que la enzima GST de hongos como *P. sp*, del mismo modo que sucede con algunas levaduras, sea capaz de mediar en el secuestro de complejos de MP-GSH.^{150,151}

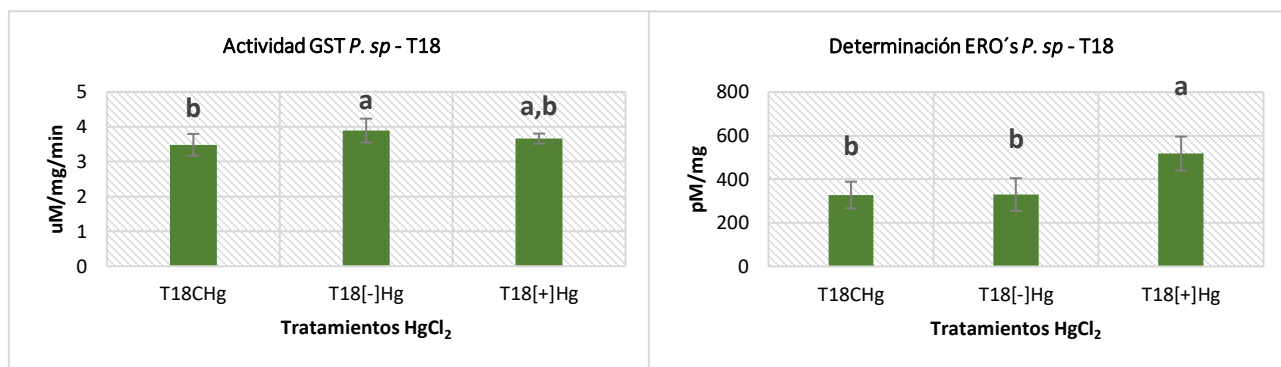


Figura 56. Actividad GST y producción ERO's en *P. sp* – T18 (días) sometido a tratamientos de HgCl_2 : T18CCd= Control, T18[-]Cd= 0.75mM, T0[+]Cd= 1.95mM (n=6)

De ambos análisis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- ✚ La actividad de la enzima GST no se vio afectada por los tratamientos con CdCl_2 , al mismo tiempo, no se observó generación de especies reactivas por ningún tratamiento con este metal. Lo cual puede significar que, para CdCl_2 , los mecanismos del organismo, como la acción de MT, tienen una importante participación en la detoxificación de la especie química. Así mismo, los resultados implican que la respuesta de la enzima se encuentra ligada a la generación de ERO's.
- ✚ En el tratamiento con HgCl_2 , la enzima vio aumentada su actividad en concentraciones del metal por debajo del cual este generó un aumento en las ERO's. Este hecho parece denotar que la función de la GST en ciertos organismos, en este caso, en *P. sp*, para moléculas como el HgCl_2 , trasciende la función de respuesta antioxidante, e interviene en mecanismos más directos en la inactivación del metal.
- ✚ El mejor crecimiento de parte de *P. sp* para Hg^{+2} , con respecto a Cd^{+2} puede explicarse en virtud de la conclusión anterior. A decir: Dado que es posible que la enzima GST intervenga en mecanismos que actúan directamente sobre el Hg^{+2} y no únicamente sobre la generación de ERO's, entonces es factible que esta promueva una respuesta que neutralice, en cierta medida, los efectos adversos en el crecimiento y desarrollo metabólico de *P. sp*.

La potencialidad de la enzima GST en los mecanismos de reacción contra MP, y la resistencia de *P. sp.* contra estos mismos, abre la posibilidad de nuevas investigaciones con estrategias destinadas a encontrar una aplicación en la biorremediación de ecosistemas contaminados. Existen ya trabajos que utilizan microorganismos con ese fin. Se han utilizado diferentes cepas microbianas para la remediación de MP como Cd, Cr, Hg, Cu o Zn, entre muchos otros, en los cuales se han evaluado desde bacterias, hasta levaduras como *C. Blankii* y hongos como *Penicillium brevicompactum*, perteneciente al mismo género de *P. sp.*¹⁵⁷⁻¹⁶⁰

8.4 *Rattus Norvegicus* (Wistar)

8.4.1 TRATAMIENTO & ANÁLISIS DE *Rattus Norvegicus* (Wistar) A HgCl₂ & CdCl₂.

Los resultados del último organismo abordado en este proyecto de investigación partieron desde la realización de tratamientos efectuados a ratas de la cepa Wistar expuestas vía oral a HgCl₂ y CdCl₂ por periodos de 1, 2, 3 y 4 semanas.¹¹¹ Se utilizaron grupos de 6 ratas por cada tratamiento. En la Tabla 14 se muestran todos los grupos de tratamientos realizados. Se recolectaron muestras de orina, hígado, riñón y cerebro.

Tabla 14. Tratamientos por MP a Ratas de la cepa Wistar

TRATAMIENTOS							
CdCl ₂ (50mg/Kg de peso)				HgCl ₂ (25mg/Kg de peso)			
1 Semana	2 Semanas	3 Semanas	4 Semanas	1 Semana	2 Semanas	3 Semanas	4 Semanas
Cerebro	Cerebro	Cerebro	Cerebro	Cerebro	Cerebro	Cerebro	Cerebro
Riñón	Riñón	Riñón	Riñón	Riñón	Riñón	Riñón	Riñón
Hígado	Hígado	Hígado	Hígado	Hígado	Hígado	Hígado	Hígado
Orina	Orina	Orina	Orina	Orina	Orina	Orina	Orina

Una vez llevado a cabo los tratamientos y el sacrificio de las ratas se extrajeron los órganos de cerebro, hígado y riñón, además de la recolección de muestras de orina. Para estas últimas se realizó un examen general de orina (EGO) junto a la cuantificación de proteína por el método de Lowry y la actividad de GST. En el caso de los órganos, estos se pesaron y se procesaron adecuadamente para su posterior homogenizado. La cuantificación por el método de Lowry, la medición de la actividad de la GST y la cuantificación de ERO's fueron realizadas a todos los órganos por las metodologías descritas en los apartados 7.3, 7.4 y 7.5, respectivamente (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis realizados por tratamientos

TRATAMIENTOS																			
CdCl ₂ (50mg/Kg de Peso)										HgCl ₂ (25mg/Kg de peso)									
1 Semana	2 Semanas	3 Semanas	4 Semanas	1 Semana	2 Semanas	3 Semanas	4 Semanas	1 Semana	2 Semanas	3 Semanas	4 Semanas	1 Semana	2 Semanas	3 Semanas	4 Semanas	1 Semana	2 Semanas	3 Semanas	4 Semanas
C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O
C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O
C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O
C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O	C H R O

Análisis
EGO
Lowry
GST
ERO's

Nota: Cada letra corresponde a una muestra específica (C= Cerebro, H= Hígado, R= Riñón y O= Orina). Las letras marcadas en verde se refieren a que estas no fueron analizadas por el método respectivo atribuido en la tabla.

8.4.2 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS DE *Rattus Norvegicus* (Wistar) TRATADAS CON CdCl₂

8.4.2.1 PESO DE ROEDORES CdCl₂.

Junto a los análisis bioquímicos, se realizaron una serie de evaluaciones morfológicas y un seguimiento de parámetros destinados a comparar el estado de los organismos y órganos utilizados entre los distintos tratamientos. Uno de los parámetros evaluados fue el peso de los roedores en el estado inicial y final de los procedimientos. La dinámica de comparación se efectuó midiendo, tanto para el grupo control como para el tratado con CdCl₂, el estado inicial vs el peso 1 semana, peso 1 semana vs peso 2 semanas, peso 2 semanas vs peso 3 semanas y peso 3 semanas vs peso 4 semanas. Las diferencias significativas (con valor $p < 0.05$) de pérdida o ganancia de peso, se observan en la Tabla 16.

Tabla 16. Peso corporal de las ratas Wistar. Comparación entre semanas. Primer bloque correspondiente al grupo control. Segundo bloque correspondiente al tratamiento con CdCl₂ (n=6).

Comparación - Control	Peso Inicial	Peso Final	Diferencia
Inicial vs 1 semana	266.4±8.2 ^b	282.8±10.9 ^a	+16.4 (Significativa)
1 semana vs 2 semanas	282.8±10.9 ^b	300.9±11.2 ^a	+18.65 (Significativa)
2 semanas vs 3 semanas	300.9±11.2 ^b	322.4±10.3 ^a	+21.5 (Significativa)
3 semanas vs 4 semanas	322.4±10.3 ^a	325.3±16.4 ^a	+2.9g (No significativa)
Comparación – CdCl ₂	Peso Inicial	Peso Final	Diferencia
Inicial vs 1 semana	273.5 ±4.6 ^b	301.9±5.9 ^a	+28.4(Significativa)
1 semana vs 2 semanas	301.9±5.9 ^a	284.6±13.2 ^b	-17.3(Significativa)
2 semanas vs 3 semanas	284.6±13.2 ^b	302.4±8.9 ^a	+17.8(Significativa)
3 semanas vs 4 semanas	302.4±8.9 ^a	299±13.2 ^a	-3.27(No significativa)

Los análisis mostraron cambios significativos en el peso en las comparaciones: inicio vs 1 semana, 1 semana vs 2 semanas y 2 semanas vs 3 semanas, para ambos grupos. Sin embargo, mientras que para el grupo control la tendencia fue en todas las comparaciones un aumento de peso, para el grupo con CdCl_2 se observó una pérdida significativa de peso de 17g en la comparación 1 semana vs 2 semanas. E incluso, aunque no significativa estadísticamente, en la comparación 3 semanas vs 4 semanas, se observó también una pérdida de 3g para este grupo. Lo cual sugiere un desbalance metabólico en el grupo expuesto a CdCl_2 , desbalance originado por esta especie química.

8.4.2.2 EXAMEN GENERAL DE ORINA (EGO) EN RATAS Wistar- CdCl_2 .

El examen general de orina (EGO) o uroanálisis, se realizó con una tira reactiva 10 LG parameter Urine Reagent Strip 100 Strips URI-10P, y se muestra en la Tabla 17. Este describe un grupo de pruebas tamiz con capacidad para detectar enfermedad renal o sistémica.¹⁹⁸

Los resultados mostraron la presencia de leucocitos (Cd-1Sem, Cd-3Sem y Cd-4Sem), nitritos (50% de la población de Cd-3Sem), proteína (con valores de entre 17 y 15 mg/dL), cetonas en 50% de la población de los tratamientos de Cd-2, 3 y 4 semanas. Urobilinógeno y bilirrubina. Es importante señalar que resultados positivos no significan necesariamente la presencia de patologías renales severas. Por ejemplo, en el caso de la presencia de proteínas, esta no constituye una prueba indudable de nefropatía. Los valores negativos resultan en un rango menor a los 10mg/dL, sin embargo, se considera proteinuria cuando la excreción urinaria de proteínas es superior a los 150mg/día.¹⁹⁸ En el caso del tratamiento Cd-1Sem, 1 de las 6 ratas expuestas a este presentó valores elevados de proteína (300mg/dL), lo que indica proteinuria renal provocada por una susceptibilidad individual mayor, presumiblemente a la exposición al metal, de esta con respecto a los demás sujetos de estudio de este grupo.

Los valores negativos a la presencia de cetonas se encuentran por debajo de los 5mg/dL. Por lo cual, los resultados positivos del 50% de la población de los tratamientos de Cd-2, 3 y 4 semanas están en el límite. La cetonuria (no diabética), usualmente está relacionada con una dieta baja en carbohidratos, o bien por un consumo elevado de proteínas. En el caso del urobilinógeno y la bilirrubina, la presencia de estos (como es el caso de varias ratas expuestas a CdCl_2) puede servir como indicador de daño hepatocelular, incluso antes de que se presenten manifestaciones clínicas.¹⁹⁹ La posibilidad de un daño hepático tomada en cuenta del uroanálisis puede relacionarse con el aumento en la actividad de la GST en el hígado (Figura 58), esto como respuesta a la toxicidad derivada del Cd^{+2} .¹⁸⁷⁻¹⁸⁹

Los resultados positivos de nitritos en 3 ratas de Cd-3Sem y de leucocitos en los grupos Cd-1, 3 y 4 semanas, indican la presencia de bacterias y de posibles infecciones urinarias. Pues estas dos

pruebas son utilizadas en conjunto para detectar bacteriuria (la mayoría a causa de bacterias gram negativas) e infecciones con un recuento mayor a 10^5 UFC/mL.¹⁹⁸⁻²⁰⁰

Las pruebas restantes: gravedad específica, pH, glucosa y sangre. Presentaron valores encontrados dentro de los estándares de referencia. Lo cual descarta patologías como insuficiencia suprarrenal, glucosuria, insuficiencia renal, acidosis tubular y hematuria por daño glomerular o renal, entre otras.¹⁹⁸

Tabla 17. Análisis EGO para muestras de orina-Tratamientos CdCl₂ (n=6).

Análisis	Control	Cd-1Sem	Cd-2Sem	Cd-3Sem	Cd-4Sem
Volumen (mL)	43.5±9.58	35±5.32	61.66±38.01	40.5±9.83	44.6±8
Gravedad específica	1.00±2.5x10 ⁻³	1.01±0.01	1.00±5x10 ⁻³	1.00±5x10 ⁻³	1.00±2x10 ⁻³
pH	7.75±0.28	6.66±0.57	6.66±0.25	6.75±0.41	7.66±0.25
Leu (Leu/μL)	--- (50%) /15(33.3%) /70(16.6%)	15(66.6%) /125(33.3%)	---	--- (50%) /15(33.3%) /70(16.6%)	--- (66.66%) /15(33.3%)
Nitritos	---	---	---	--- (50%) / +(50%)	---
Proteína (mg/dL)	15	15(83.33%) / 300 (16.6%)	17.5±6.12	15±9.48	15
Glucosa	---	---	---	---	---
Cetonas (mg/dL)	--- (50%) / 5(50%)	---	--- (50%) / 5(50%)	--- (50%) / 5(50%)	--- (50%) /5(50%)
Urobilinógeno (mg/dL)	---	0.2 (66.6%) / --- (33.3%)	0.2±3.04x10 ⁻¹⁷	0.2±3.04x10 ⁻¹⁷	---
Bilirrubina	---	---	---(66.6%) /1(33.3%)	---(50%) / 1(50%)	---(83.3%) /1(16.6%)
Sangre	---	---	---	---	---

Las Figuras 57, 58 y 59 muestran los resultados de las pruebas de actividad enzimática y producción de ERO's para los órganos cerebro, hígado y riñón, respectivamente. Para cada prueba se realizó un análisis estadístico ANOVA de una sola vía, utilizando como prueba conclusiva la prueba de comparación por Tukey. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

8.4.2.3 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's -Cd-CEREBRO

En el análisis del cerebro se observó una disminución, si bien no directamente proporcional, tanto de la actividad de GST como de la producción de ERO's (Figura 54). La hipótesis del proyecto plantea una tendencia opuesta, sin embargo, este resultado puede ser explicado en función de otro factor.

Como se ha mencionado con anterioridad, la enzima GST funge como un factor de respuesta cuando el sistema antioxidante falla y no es capaz de contrarrestar el EO ocasionado por MP. Sin embargo, no es el único mecanismo de defensa contra este tipo estrés. Estudios previos han investigado la capacidad de otra proteína de responder ante la intoxicación por cadmio. Las MT son un grupo de proteínas de bajo peso molecular, estables al calor y con un alto contenido de cisteínas (30% peso/peso aproximadamente),⁷⁴ cuyas características permiten establecer un mecanismo de captura a través de enlaces metal-proteína.^{161,162} Se ha encontrado, además, que la presencia de cadmio en el cerebro, el cual puede absorberse en áreas como el plexo coroideo y las meninges, y cuya accesibilidad es dependiente de la edad del animal (la permeabilidad del cerebro al Cd disminuye con el aumento de la edad, presumiblemente debido al desarrollo de la barrera hematoencefálica y la inducción de MT)¹⁶³⁻¹⁶⁶ es capaz de inducir la síntesis de MT en regiones diferentes del órgano en ratas Wistar adulto (de aproximadamente 8 semanas de edad), siendo esta concentración significativamente superior en el tratamiento con cadmio que previo a la exposición a este.⁷⁴ Sin embargo, este comportamiento parece ser dependiente de la dosis y el mecanismo de exposición al metal. Dado que en ciertos sistemas de exposición esta relación no se cumple.^{167,168} De acuerdo con Nishimura *et al.*⁷⁴ es posible que para dosis elevadas y tiempos de exposición prolongados (100 mg/kg de peso de Cd por 22 semanas), donde el cadmio es capaz de generar trastornos neurodegenerativos, la inducción de MT se vea disminuida o inhibida.¹⁶⁹

Ahora bien, el sistema de intoxicación utilizado en este proyecto (50mg/kg de peso de CdCl₂, vía oral, por un periodo de exposición menor a las 5 semanas, en ratas adultas de aproximadamente 8 semanas), sugiere la plausibilidad de que la disminución de ERO's se deba, en primer lugar, a una relativa menor concentración del metal en el cerebro, asociada a la edad de los animales de estudio,¹⁶³⁻¹⁶⁶ hecho que favoreció la reducción del efecto tóxico de este, y, en segundo lugar, a la posible inducción de MT y su consiguiente efecto en la captación del Cd. No hay que excluir, empero, la posible participación del sistema antioxidante canónico (enzimático y no enzimático) contra la generación de ERO's. Sin embargo, los estudios relacionados con la exposición a Cd en cerebro, sugieren que este sistema se ve afectado, de forma negativa en la mayoría de los casos, por el efecto tóxico del metal. Donde factores como el GSH, SOD, CAT, GPx y GR ven su contenido y actividad decrecer después del tratamiento con CdCl₂.^{170,171} Es importante aclarar que en estos estudios el tratamiento fue vía intraperitoneal, por lo que no necesariamente debe cumplirse el

mismo comportamiento con respecto al presente proyecto de investigación, el cual se desarrolló a través de una exposición oral.

En todo caso, se sabe que la enzima GST puede funcionar como mecanismo de respuesta ante la producción de ERO's, elevando o disminuyendo su actividad en función del aumento o disminución de estas. Pero en vista de que las ERO's se vieron reducidas (debido posiblemente a componentes como las MT, o al sistema antioxidante per sé), es concordante que la actividad enzimática de nuestra proteína de estudio disminuya junto a las ERO's.

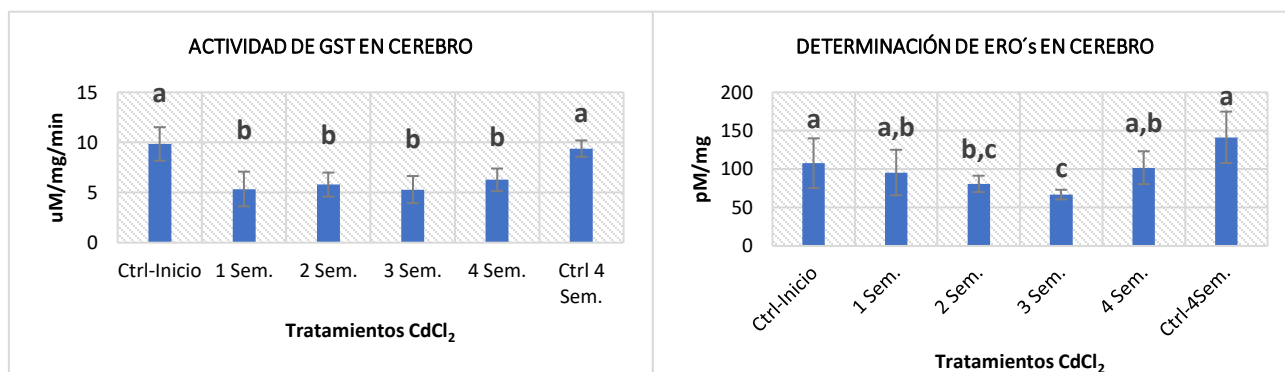


Figura 57. Actividad GST y producción ERO's en cerebro de ratas Wistar sometidas a tratamientos de CdCl₂ (n=6)

8.4.2.4 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's -Cd-HÍGADO

Si bien el cadmio es capaz de inducir la generación de MT en el cerebro, el contenido de estas proteínas ante la exposición al metal se ha encontrado predominante en órganos como el hígado y riñones.¹⁷²⁻¹⁷⁴ Se ha evaluado, por ejemplo, la producción de MT ante la exposición de Pb y Cd en ratas, encontrando que el primero se distribuye mayormente en la sangre, mientras que el segundo es acumulable en hígado y riñones. De igual forma se observó una relación entre el incremento de la dosis de los metales, la disminución de factores antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos como el GSH y la SOD, CAT y GPx, respectivamente, y el aumento en el contenido de MT en ambos órganos.¹⁷⁵ Este mecanismo (la inducción de MT quelantes del Cd), bien podría servir para explicar por qué el contenido de ERO's disminuye en el hígado en los grupos tratados con cadmio con respecto al grupo control, el cual no presentó diferencia significativa en el transcurso del tiempo (presumiblemente debido a una homeostasis metabólica, mantenida por la ausencia de agentes tóxicos que la perturben). Sin embargo, no ayuda a interpretar el comportamiento inversamente proporcional entre la disminución de ERO's y el aumento en la actividad de GST, en específico en la semana 3 y 4 (Figura 58). Para ello es necesario acudir a estudios específicos de Cd-Hígado-GST. En el hígado, la mayor actividad de la enzima está asociada al citoplasma.^{176,177} En sistemas de exposición aguda de CdCl₂ en ratas, Casalino *et al.* encontraron

que el incremento en la actividad, y en la expresión de la GST en este órgano, particularmente de la GST alfa, está relacionada con el aumento en la exposición al metal, pero poco relacionada con el aumento en las ERO's. En el mismo estudio se realizaron algunos tratamientos en los cuales se suministró vitamina E a los organismos expuestos a cadmio, lo que redujo los niveles de peroxidación lipídica, pero no así la actividad ni la expresión de la enzima.¹⁷⁸ Esto sugiere la posible intervención de otros mecanismos de acción en la promoción de la síntesis de la enzima como respuesta del organismo ante la exposición a los MP. Si bien la hipótesis sobre la participación las ERO's en este proceso es extendida.^{49,73,179} Se han abordados mecanismos alternativos, particularmente en el caso que se refiere, para explicar esta divergencia. En las investigaciones realizadas se identificó un elemento promotor (en términos generales, un promotor es una secuencia de ADN capaz de activar o desactivar un gen. Es el sitio donde se inicia el proceso de transcripción), conocido como el "elemento de respuesta antioxidante" (ARE, por sus siglas en inglés) que regula la expresión de genes que codifican la glutatión S-transferasa y otras enzimas en respuesta a oxidantes o xenobióticos, y que puede ser activado por un conjunto de compuestos oxidantes y electrofílicos diversos, entre los que destacan los MP.^{180-182,185,186} Se encontró, además, que el factor de transcripción Nrf2 se une a ARE, regulando positivamente la expresión génica mediada por este, y por consiguiente, la inducción de enzimas.¹⁸³⁻¹⁸⁵ La actividad de este factor Nrf2 se encuentra constitutivamente inhibida por su unión con una proteína citoplásmica llamada Keap1 (el mecanismo celular debe mantener un determinado balance redox para estar en homeostasis, por lo que Nrf2, que promueve la síntesis de enzimas antioxidantes y de detoxificación, no puede mantenerse activo todo el tiempo). Sin embargo, ante la exposición a agentes xenobióticos, esta inhibición parece desactivarse. En particular, para MP, además del EO generado por estos, también pueden interaccionar con los grupos tiol de Keap1, alterando su actividad como inhibidor asociado a Nrf2, permitiendo así la expresión génica mediada por ARE.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ Todo lo anterior bien puede explicar por qué la actividad enzimática de la GST se mantuvo y aumentó con respecto al tiempo de exposición a MP a pesar de la disminución de EO en el mismo periodo. Aunado a esto, no debemos descartar la posibilidad de que la enzima GST esté actuando junto con los componentes antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos, activados por la presencia de Cd. Los cuales, juntos a las MT, estén generando una respuesta antioxidante global para mitigar los daños celulares generados por CdCl₂ (como la oxidación de lípidos, por ejemplo).

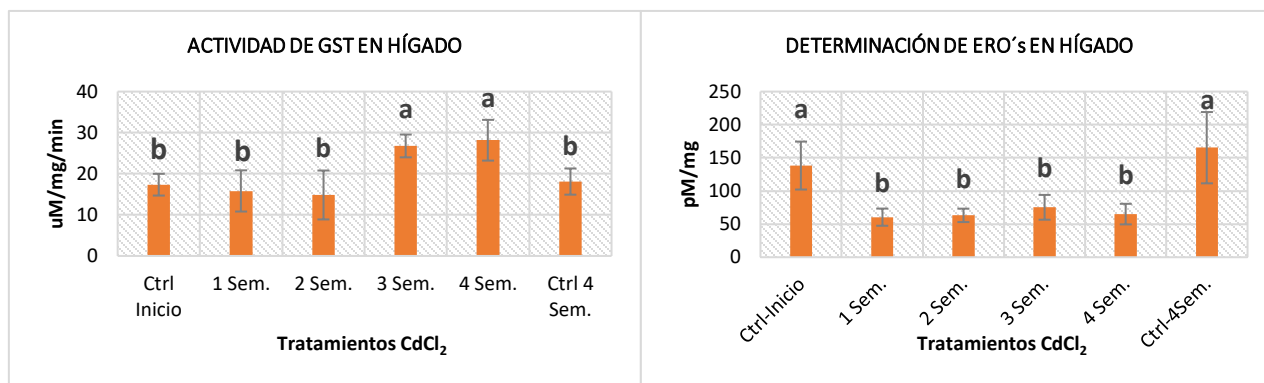


Figura 58. Actividad GST y producción ERO's en hígado de ratas Wistar sometidas a tratamientos de CdCl₂ (n=6)

8.4.2.5 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's -Cd-RIÑÓN

Como bien se ha mencionado anteriormente, el riñón, al igual que el hígado, es un órgano donde las MT se expresan en altas concentraciones posterior a la exposición a Cd.¹⁷²⁻¹⁷⁴ Los procesos fisiopatológicos que explican como intervienen estas proteínas en el metabolismo del riñón ante la exposición al metal comienzan desde el hígado. En él, el Cd se une a estas proteínas, el complejo Cd-MT resultante es secretado en la bilis y reabsorbido y devuelto a la sangre a través de la circulación enterohepática (proceso cíclico en el que sustancias como los ácidos biliares, producidos por el hígado, son excretados por la vesícula biliar en dirección hacia el intestino. Después de cumplir su rol en éste, son reabsorbidos y devueltos al hígado, donde se conjugan y almacenan nuevamente en la vesícula). Allí se filtra a través del glomérulo y se reabsorbe por la sección S1 del tubo contorneado proximal (TCP), en un proceso mediado por las proteínas megalina y cubilina.^{190,191} En el medio intracelular del TCP el complejo Cd-MT es almacenado y degradado en los lisosomas. Como resultado, el Cd⁺² es transportado al citoplasma, y, una vez libre, puede llegar a acumularse en la mitocondria, donde interfiere con el complejo III de la cadena de transporte de electrones (CTe⁻), generando ERO's, o bien con la actividad de la enzima Na/K ATP-asa; con resultados contraproducentes en la función mitocondrial, desde el mal funcionamiento del organelo, hasta la incapacidad para producir ATP y su falla sistémica total.¹⁹²⁻

194

La oscilación del aumento y decremento en la producción de ERO's, observada en los tratamientos (Figura 59), puede deberse a una oscilación en las concentraciones de Cd absorbido y/o desechado por el órgano en los diferentes periodos de tiempo. El Cd absorbido terminaría por alojarse en las mitocondrias de las células renales, interfiriendo en la CTe⁻. En este caso, pudo haberse activado el sistema antioxidante (SOD, GSH, CAT, etcétera) para combatir la generación de ERO's provocada por el metal; redirigiendo así la producción de las especies reactivas en función de las

concentraciones almacenadas del metal. Este comportamiento pudo suponer un desbalance en el metabolismo del mamífero. Se sabe que las ERO's tienen funciones fisiológicas y una subproducción de ellas también puede llegar a ocasionar daño fisiológico. En este caso, un daño renal.

En relación al comportamiento de la enzima, la GST en el riñón se encuentra expresada en dos clases principales (alfa y pi), la primera asociada al TCP, mientras que la segunda al túbulo contorneado distal (TCD), asa de Henle y la capsula de Bowsman, que recubre el glomérulo.¹⁹⁵ Para ambas se ha encontrado que efectos adversos que dañan las regiones asociadas derivan en un aumento de la GST en la orina.^{196,197} Este hecho es importante, debido a que la invariancia de la actividad enzimática del riñón a través del tiempo (Figura 59), posee el mismo comportamiento que la actividad enzimática medida en la orina (Figura 60), lo que sugiere que el daño provocado por el Cd en el riñón a lo largo de las cuatro semanas de exposición se encuentra poco relacionado con la actividad de la enzima, ilustrado en la falta de aumento de su actividad en ambas muestras, fisiológicamente relacionadas.

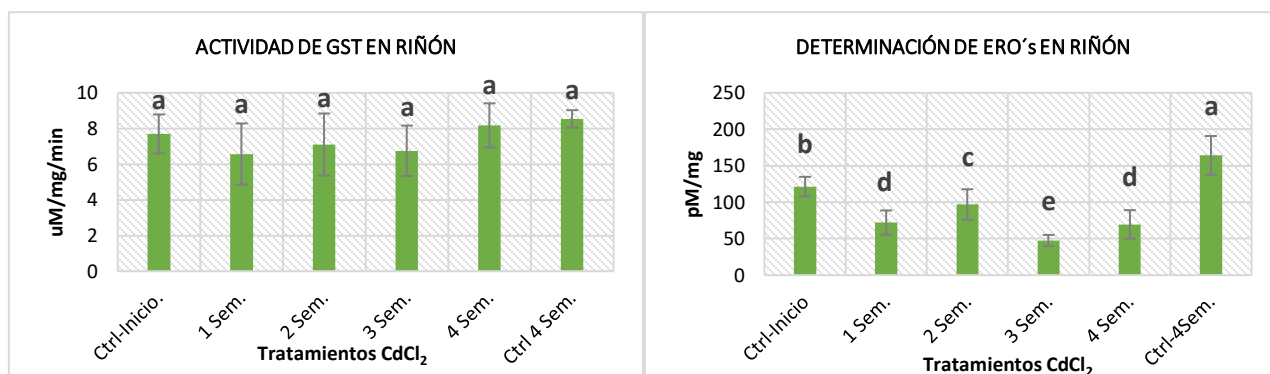


Figura 59. Actividad GST y producción ERO's en riñón de ratas Wistar sometidas a tratamientos de CdCl₂ (n=6)

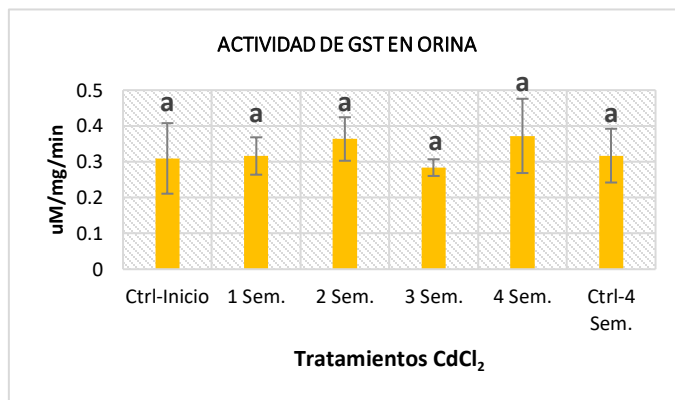


Figura 60. Actividad GST en orina de ratas Wistar sometidas a tratamientos de CdCl₂ (n=6)

En síntesis, los resultados de los tratamientos con CdCl_2 en Ratas de la cepa Wistar pueden derivarse en las siguientes conclusiones:

- ✚ El sistema de intoxicación con CdCl_2 utilizado en este proyecto no generó un incremento de ERO's en el cerebro, debido, presumiblemente, a la poca adsorción del metal, incapaz de cruzar la barrera hematoencefálica con eficacia en ratas desarrolladas.
- ✚ La actividad enzimática de la GST en el cerebro mostró un patrón de comportamiento acorde al comportamiento de las ERO's (viéndose estas disminuidas, también se vio disminuida la actividad). Lo que reafirma su condición como enzima de respuesta ante la presencia o ausencia de especies reactivas.
- ✚ El incremento de actividad de la GST en el hígado denota que, en este órgano, la enzima pudo ser activada por mecanismos de expresión antioxidantes, gatillados por la presencia del Cd. En este caso la actividad se mantuvo incluso aunque las ERO's disminuyeron (este fenómeno diverge del comportamiento en el cerebro, pero es concordante con otros estudios de la misma naturaleza). Lo que demuestra que la capacidad antioxidante de la enzima puede tener una importancia más profunda respecto a la intoxicación por MP.
- ✚ La invariante actividad enzimática en el riñón y la orina, fisiológicamente relacionadas, junto a los resultados de los exámenes general de orina, mostraron que, en el caso de este órgano, el CdCl_2 provocó daños renales poco asociados a la actividad de la enzima GST.

8.4.3 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS DE *Rattus Norvegicus* (Wistar) TRATADAS CON HgCl_2

8.4.3.1 PESO DE ROEDORES HgCl_2 .

De la misma forma que en los tratamientos con CdCl_2 , en los tratamientos con HgCl_2 se realizó un seguimiento del peso de los organismos, para una mejor comprensión de su estado. En la Tabla 18 se muestra la relación establecida.

En este caso no se presentó diferencia significativa en el peso de las ratas entre las primeras 3 semanas de los tratamientos (control y expuestas). Sí se obtuvo, en la semana 4, un aumento significativo del peso con respecto a los tiempos anteriores, tanto para el control como para la exposición a Hg^{+2} . Sin embargo, en los organismos tratados con Hg^{+2} se observó un aumento de tejido adiposo y grasa abdominal presentes al realizar la disección de estos y asociada a la exposición al metal. Lo que puede indicar la pérdida de consistencia de ciertas estructuras, posiblemente tejidos musculares y óseos, sistemas usualmente afectados por MP.^{1,4,61,64} Cuyo peso neto pudo haber sido reemplazado por un incremento de grasa corporal.

Tabla 18. Peso corporal de las ratas Wistar. Comparación entre semanas. Primer bloque correspondiente al grupo control. Segundo bloque correspondiente al tratamiento con HgCl_2 (n=6).

Comparación - Control	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Diferencia (g)
Inicial vs 1 semana	300.3±3.83	313.6±4.86 ^b	+13.3 (No significativa)
1 semana vs 2 semanas	313.6±4.86 ^b	327.51±7.42 ^b	+13.9 (No significativa)
2 semanas vs 3 semanas	327.51±7.42 ^b	338.89±10.1 ^b	+11.38 (No significativa)
3 semanas vs 4 semanas	338.89±10.1 ^b	365.42±9.2 ^a	+26.53 (Significativa)
Comparación – HgCl_2	Peso Inicial	Peso Final	Diferencia
Inicial vs 1 semana	304.6 ±14.5 ^a	312.9±15.28 ^a	+8.3 (No significativa)
1 semana vs 2 semanas	312.9±15.28 ^a	323±17.9 ^a	+10.1 (No significativa)
2 semanas vs 3 semanas	323±17.9 ^a	338±18.9 ^a	+15 (No significativa)
3 semanas vs 4 semanas	338.4±18.9 ^b	377.4±16.9 ^a	+39 (Significativa)

8.4.3.2 EXAMEN GENERAL DE ORINA (EGO) EN RATAS Wistar- HgCl_2 .

El análisis general de orina mostró indicios de proteinuria, e incluso hematuria en un gran número de ratas tratadas con HgCl_2 (Tabla 19), evidencia de un posible daño glomerular y tubular.¹⁹⁸ que se concatena con la morfología mostrada en el riñón en la Figura 67. Donde se vislumbran protuberancias surgidas a partir de la exposición a Hg por 3 semanas que no se observan en los riñones de las muestras control.

El EGO, indicado en la Tabla 19, también mostró casos de infecciones a partir de las dos semanas, debido, posiblemente, a que el metal inhibió el sistema inmune, ocasionando la disminución de las defensas. La presencia de cetonas puede deberse a un daño en el metabolismo de carbohidratos, y la de bilirrubina y urobilinógeno a un daño hepático surgido por la presencia del metal.¹⁹⁸ Lo cual también concuerda con la pérdida de estructura del hígado en el tratamiento por Hg (Figura 64).

Tabla 19. Análisis EGO para muestras de orina-Tratamientos HgCl_2 (n=6).

Análisis	Control	Hg-1Sem	Hg-2Sem	Hg-3Sem	Hg-4Sem
Volumen (mL)	43.5±9.58	24.16±14.67	85±38.10	25±6.33	46.16±3.48
Gravedad específica	1.00±2.5×10 ⁻³	1.01±3×10 ⁻³	1.001±0.01	1.01±6×10 ⁻³	1.00±2×10 ⁻²
pH	7.75±0.28	6.75±0.68	6.75±1.17	7.04±0.67	7.33±0.25
Leu (Leu/μL)	--- (50%) /15(33.3%) /70(16.6%)	--- (50%) / 15(16.6%) /70(33.3%)	--- (50%) / 15(50%)	--- (66.6%) /15(16.3%)/70(16.6%)	--- (66.6%)/70(33.3%)
Nitritos	---	---	--- (50%) / +(50%)	--- (83.3%)/ +++ (16.6%)	--- (66.6%)/+++ (33.3%)
Proteína (mg/dL)	15	15(33.33%) / 30 (66.6%)	15,100, 300(16.6%) / 30 (50%)	100(66.6%) / 300 (33.3%)	15

Glucosa	---	---	---	---	---
Cetonas (mg/dL)	--- (50%) /5(50%)	--- (66.6%) /5 (33.3%)	--- (50%) /5(50%)	--- (33.3%) /15(50%)/40(16.6%)	--- (33.3%) /15(66.6%)
Urobilinógeno (mg/dL)	---	0.2±3.04x10 ⁻¹⁷	0.16±0.081	--- (50%) /0.2 (50%)	---
Bilirrubina	---	--- (16.6%) / 1(83.3%)	---(16.6%) /1(83.3%)	1(50%) /4+(33.3%) /4++++(16.6%)	---(50%) /1(50%)
Sangre	---	--- (83.3%) /++(16.6%)	---	--- (83.3%) /++(16.6%)	--- (66.6%) /++(33.3%)

Las Figuras 61, 62 y 65 muestran los resultados de los análisis bioquímicos de ERO's y GST realizados a los órganos de cerebro, hígado y riñón, respectivamente, de ratas Wistar tratadas con Hg en periodos comprendidos de 1, 2, 3 y 4 semanas. En algunos casos, como en la actividad de GST en hígado y orina, así como en la producción de ERO's en riñón, se observó la presencia de subgrupos en el grupo tratado con Hg por 1 semana. En los tres análisis referidos las ratas 5 y 6 mostraron niveles en los factores de respuesta muy diferentes de las demás. Es por ello que en esos casos se estableció una distinción específica para un mejor discernimiento de estas. Al igual que en los tratamientos con Cd, en las pruebas con Hg se realizó un análisis estadístico ANOVA de una sola vía, utilizando como prueba conclusiva la prueba de comparación por Tukey. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

8.4.3.3 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's -Hg-CEREBRO

El mercurio puede encontrarse en el ambiente en diferentes estados: en forma de mercurio elemental (Hg^0) o vapor de mercurio, en forma orgánica, de la cual el metilmercurio es la especie más tóxica, y en forma inorgánica, donde el HgCl_2 es el compuesto más representativo y el utilizado en este estudio. Esclarecer esto es importante, debido a que la toxicidad del Hg en el organismo está asociada a la especie química de la cual se refiera.²⁰¹⁻²⁰³ Así, mientras el metilmercurio puede absorberse en varios tejidos y es una de las especies más tóxicas del metal, el efecto tóxico principal del mercurio elemental está asociado con el cerebro, pues es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica con mayor eficiencia. En el caso del HgCl_2 éste suele ser relativamente estable y absorbido en menor medida si es comparado con las otras especies químicas. Los órganos objetivos de esta sal son principalmente el intestino y el riñón.²⁰⁴

La intoxicación específica HgCl_2 -cerebro es relativamente pobre comparada con otros órganos. Inicialmente sólo el 2% del HgCl_2 es absorbido, y, normalmente, éste no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica con eficacia.^{203, 205-207} Este pobre nivel de absorción, junto con la acción de mecanismos antioxidantes, puede explicar el por qué las ERO's se vieron disminuidas en los

tratamientos con el metal (Figura 60), y como la GST, cual enzima de respuesta, no vio modificada su actividad ante la ausencia de este.

Es probable que el sistema de intoxicación utilizado en este trabajo no haya podido inhibir por completo la acción de los factores antioxidantes canónicos como el de las enzimas SOD, CAT o GPx. Sin embargo, para el caso particular de la intoxicación por Hg, el GSH y biomoléculas con grupos sulfhídricos (-SH) como las MT y la cisteína, juegan un papel fundamental en la defensa contra el daño ejercido por este MP. Debido a las altas constantes de estabilidad Hg-SH (asociadas a la energía necesaria para romper y formar enlaces), éste se unirá a cualquier grupo sulfhidrilo libre disponible, y el que se encuentre en mayor concentración será ligado con más frecuencia al metal. Esto facilita la distribución del Hg a través del organismo (que tiene como objetivo secretarlo por la orina), y además protege a otras proteínas de perder su estructura y funcionalidad al limitar la interacción de éstas con el tóxico.^{202,208-210} En concreto es el GSH el que parece ejercer un papel mucho más activo en el metabolismo antioxidante contra el Hg. Este tripéptido es el compuesto de bajo peso molecular con grupos -SH que se encuentra en mayor proporción en las células de mamíferos (en cantidades milimolares en muchas de ellas).²¹¹ Además de unirse al metal, también interviene en la reacción promovida por la enzima GPx para transformar el H_2O_2 (uno de los compuestos generados por el $HgCl_2$, que después da paso a la formación del radical $OH\bullet$).^{212,213} En cuanto al cerebro, células de la barrera hematoencefálica liberan el Hg a través de complejos Hg-GSH. Un bajo contenido de GSH inhibe la capacidad de estas células de expulsar al metal. Si éste cruza la barrera, los astrocitos (células del tejido cerebral, las cuales son las primeras en encontrar los metales que cruzan la barrera y poseen un alto contenido de MT y GSH) pueden servir como depósito de Hg en el cerebro.

En enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, o en lesiones por perfusión por isquemia cerebral se han encontrado bajos niveles de GSH. Evidencia que apunta a que la falta de éste está asociada con daño neuronal.²¹⁴⁻²¹⁶

Todo lo anterior se puede ligar no sólo a los resultados de las ERO's (asociados a la baja toxicidad ejercida por el sistema de intoxicación, la poca capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica de la especie química usada y por la capacidad del sistema antioxidante, en especial del GSH, para disminuir la lipoperoxidación en el cerebro), sino también a los resultados de la actividad de la enzima GST (Figura 61). En ellos se observa como dicha actividad no presentó diferencia significativa ni entre el grupo control y los tratamientos, ni entre los tratamientos mismos. Este comportamiento puede estar relacionado con el contenido de GSH, que presumiblemente está relacionado con la presencia de Hg en el cerebro. La inducción en la síntesis de GSH destinado a combatir la cantidad de metal que haya logrado cruzar la barrera hematoencefálica bien pudo mantener la actividad de la enzima. Pues la síntesis de ésta también está relacionada al contenido de GSH celular. Es por ello que en este caso la actividad enzimática no se vio disminuida con la

disminución de ERO's, como sucedió con el cerebro expuesto a Cd, donde es más plausible la acción de las MT.

Así, aunque posiblemente la enzima haya tenido un papel secundario en la detoxificación de Hg, se mantuvo activa por su relación con el GSH en los procesos de detoxificación celular.

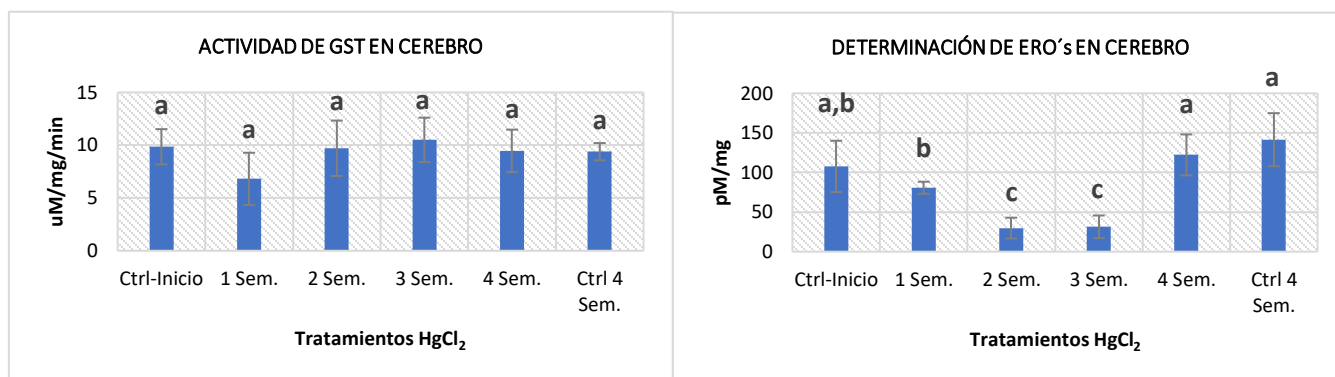


Figura 61. Actividad GST y producción ERO's en cerebro de ratas Wistar sometidas a tratamientos de HgCl₂ (n=6)

8.4.3.4 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's -Hg-HÍGADO

Como se mencionó en el apartado anterior, el órgano objetivo del HgCl₂ suele ser el riñón, sin embargo, este también es capaz de alojarse en el hígado. En el cual es capaz de generar EO, despolarización y desacoplamiento que conduce al agotamiento de ATP en las mitocondrias, y, en última instancia, a muerte celular.²¹⁷⁻²¹⁹ A pesar de que el EO es una forma por la cual éste puede provocar toxicidad (estudios diversos han informado daños histopatológicos y lesiones ultraestructurales del hígado por la degeneración de ácidos grasos y necrosis celular a causa de HgCl₂ y EO).²²⁰⁻²²² Otros mecanismos como la alteración en la integridad de la membrana celular, cambios en el equilibrio del Ca⁺² intracelular y el potencial de membrana e inhibición de enzimas, proteínas y alteración del ADN, también son medios por los cuales se genera daño celular.²²³ Es posible que alguno de estos mecanismos hayan generado daños histopatológicos en el hígado, relacionados a los cambios estructurales del órgano en algunas ratas del tratamiento de HgCl₂ de 3 semanas, no asociado al EO por sí mismos (daños como pérdida de consistencia en el tejido y aumento de porosidad (Figura 64)). Es justo mencionar que los estudios referidos sobre EO a causa de Hg tuvieron como forma de exposición una intoxicación aguda vía intraperitoneal, de las ratas al metal (la utilizada en este trabajo fue vía oral).²²⁰⁻²²² En la intoxicación por Hg, el grado de daño se encuentra en función, no sólo de la especie química, sino también de la dosis, el tiempo y la vía de exposición.^{203,204}

Lo anterior puede explicar el decremento de la peroxidación lipídica en el hígado, al mismo tiempo que el aumento en la actividad de la enzima y los cambios morfológicos del órgano en algunos casos (Figuras 62, 63 y 64). Como bien se mencionó, la intoxicación por Hg en el sistema de intoxicación propuesto en este trabajo puede deberse a mecanismos como la interacción del tóxico con los grupos -SH de algunas proteínas. En este caso factores antioxidantes como el GSH pudieron ejercer un papel relevante en aras de nulificar esta intoxicación. Un aumento del GSH celular, en conjunto con una probable interacción del Hg con proteínas como la Keap1, que, como se mencionó en el apartado GST-Cd-Hígado, promueve el acoplamiento entre el factor Nrf2 y el ARE,¹⁸⁰⁻¹⁸⁹ inducirían la síntesis y actividad de la enzima GST como un posible mecanismo de respuesta ante la intoxicación por HgCl₂ vía oral. Otras hipótesis plausibles son la posibilidad de una sobreinducción del sistema antioxidante general (incluida la GST), que hubiese generado un decremento en la producción de las ERO's a niveles sub-metabólicos de los normales. O bien, la generación de HNE (producto competidor del MDA en la peroxidación lipídica y el cual tiene efectos sobre las vías de transducción de señales, que a su vez tienen un efecto importante sobre las características fenotípicas de las células),²³² que haya reducido los niveles de ERO's cuantificados por el método MDA, pero indujera la actividad de la GST, al ser una molécula objetivo de la enzima.²²⁹

En las Figuras 62 y 63 pudo observarse la presencia de subgrupos (organismos dentro del grupo establecido que presentaron una respuesta diferente al tratamiento determinado) en la exposición a Hg-1Sem, lo que indica que el aumento en la actividad de la enzima se presentó incluso en algunas ratas a partir de la primera semana.

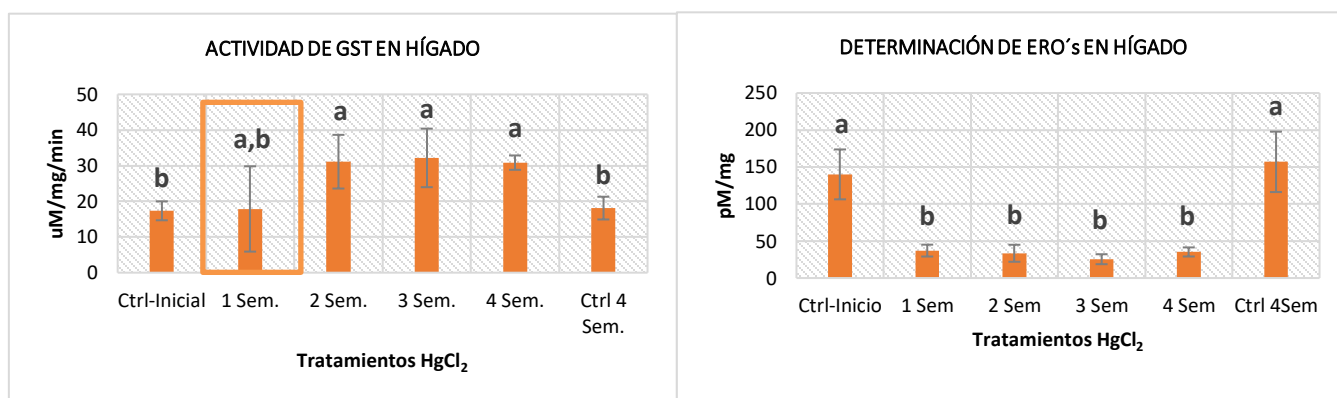


Figura 62. Actividad GST y producción ERO's en Hígado de ratas Wistar sometidas a tratamientos de HgCl₂ (n=6)

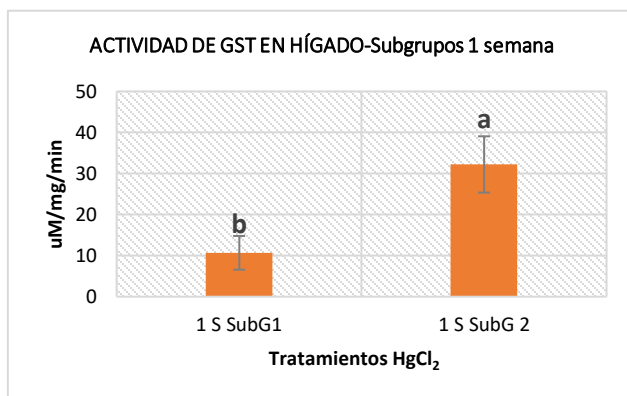


Figura 63. Actividad de GST de los subgrupos del tratamiento HgCl_2 -1Sem en Hígado de ratas Wistar.



Figura 64. Morfología de órganos. Imagen Izquierda: Hígado en estado normal. Imagen derecha: Hígado expuesto a Hg -3Sem. En ella se observa una pérdida de brillo, consistencia, y un aumento en la porosidad del tejido. Cambios asociados a la intoxicación por el metal (Acervo Personal).

8.4.3.5 ACTIVIDAD GST & CUANTIFICACIÓN ERO's -Riñón - Hg

Tanto la actividad de la enzima en el riñón, como la determinación de ERO's, exhibieron, si bien no un comportamiento igual, sí una tendencia similar a sus análogos del hígado. Las ERO's decrecieron con el paso de los tratamientos, mientras que la actividad de la enzima aumentó en la semana 3 de la exposición a Hg^{+2} (Figura 65). El riñón es el órgano donde el Hg^{+2} puede acumularse en mayores cantidades.²⁰⁴ Mucha de la carga de HgCl_2 en el cuerpo reside en el TCP. En esta región en específico el Hg^{+2} suele unirse a MT.²²⁴⁻²²⁶ Una exposición crónica a HgCl_2 es capaz de dañar la corteza renal y causar la falla del órgano. La cual pudo detectarse en la orina (donde el Hg se excreta) a través de la presencia de proteinuria, hematuria, oliguria o poliuria.^{204,224,227} Esto se observó en la Tabla 19. El análisis general de orina mostró indicios de proteinuria, e incluso hematuria en un gran número de ratas tratadas con HgCl_2 ,¹⁹⁸ evidencia de un posible daño renal. En la Figura 67 este daño se mostró a través de presencia de

protuberancias surgidas a partir de la exposición a Hg^{+2} por 3 semanas que no se observaron en los riñones de las muestras control.

La actividad de la enzima en el contenido de orina mostró un aumento con respecto al tiempo de exposición al metal (Figura 68, izquierda), que podría estar relacionado con la presencia de éste en la orina, con el contenido de GSH, así como con el contenido de proteínas presentes en la muestra. En el tratamiento por una semana se observó la presencia de dos subgrupos (Figura 68, derecha), que, al igual que sucedió con la actividad del hígado y con las ERO's asociadas al riñón (Figura 66), mostraron respuestas muy diferentes entre sí. En específico, las ratas 5 y 6 en contraste con las demás.

La tendencia al alza de la actividad enzimática de la orina y el riñón, cuyos procesos se encuentran relacionados, el análisis EGO, además del surgimiento de alteraciones morfológicas en su estructura, sugieren un daño renal provocado por el HgCl_2 . El comportamiento inverso de la peroxidación lipídica, por otro lado, podría implicar la posible participación de mecanismos antioxidantes, tales como GSH, y enzimas como las MT. El mayor aumento en la actividad de la GST en las semanas 3 y 4 podría significar que, en ese punto, el sistema canónico antioxidante no fue suficiente para neutralizar la intoxicación por HgCl_2 y que el metabolismo del organismo activó mecanismos alternos, como la enzima GST, en busca de neutralizar esta intoxicación.

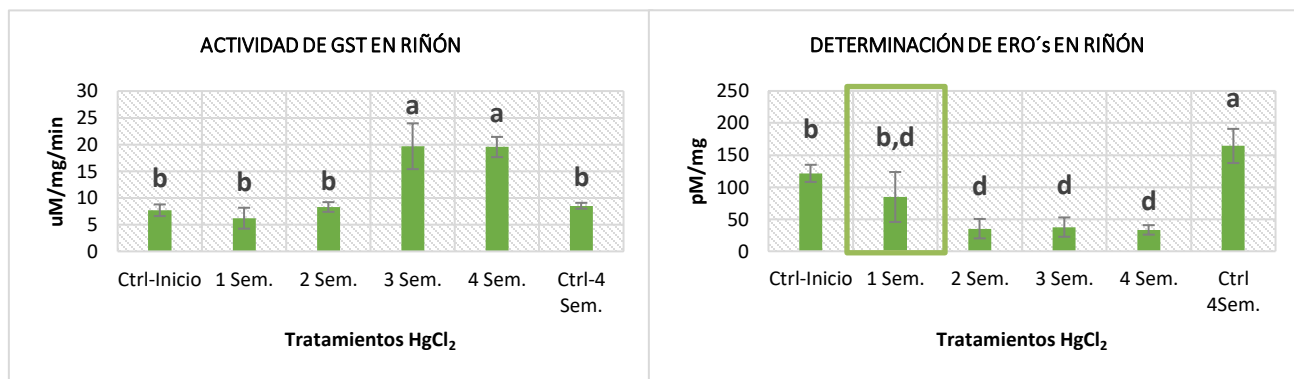


Figura 65. Actividad GST y producción ERO's en Riñón de ratas Wistar sometidas a tratamientos de HgCl_2 (n=6)

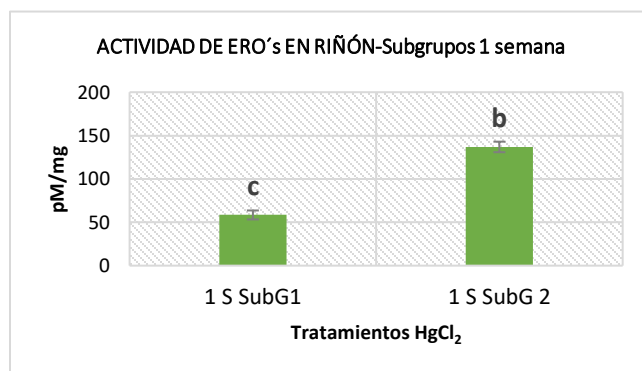


Figura 66. Producción de ERO's de los subgrupos del tratamiento HgCl_2 -1Sem en Riñón de ratas Wistar. 1S SubG1: Rata 1-4, 1S SubG2: Rata 5-6.

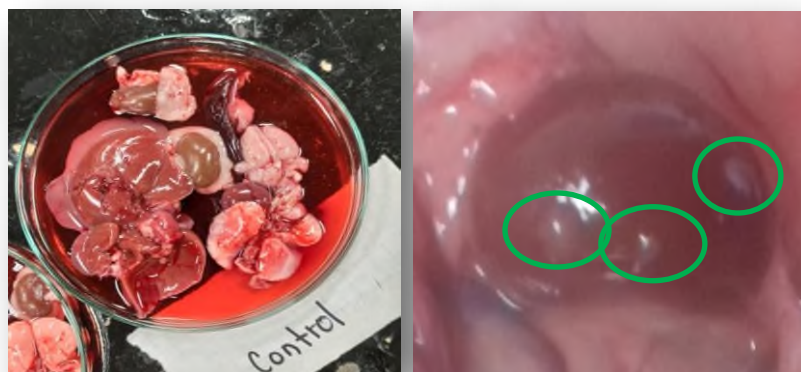


Figura 67. Morfología de órganos. Imagen Izquierda: Riñón en estado normal. Imagen derecha: Riñón expuesto a Hg-3Sem. Se observan protuberancias anormales asociadas a la intoxicación por el metal (Acervo Personal).

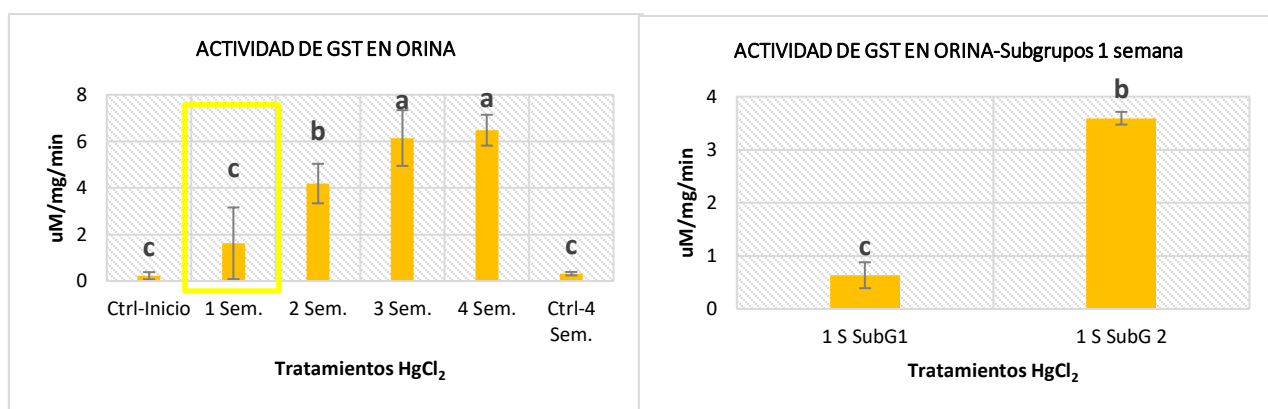


Figura 68. Imagen Izquierda: Actividad GST en orina de ratas Wistar sometidas a tratamientos de HgCl₂ (n=6). Imagen derecha: Actividad de GST de los subgrupos del tratamiento HgCl₂-1Sem en orina de ratas Wistar. 1S SubG1: Rata 1-4, 1S SubG2: Rata 5-6

Del análisis previo, las conclusiones extraídas son:

- ✚ La disminución en las ERO's en el cerebro, podría explicarse bajo dos factores principales. El primero: la incapacidad del HgCl₂ de cruzar la barrera hematoencefálica del cerebro con eficacia y, en segunda instancia, el alto contenido de GSH, factor de carácter antioxidante que utilizan las células de este órgano para inactivar el Hg.
- ✚ Un alto contenido de GSH en el cerebro pudo haber mantenido los niveles activos de la GST, pues la actividad de esta se encuentra íntimamente relacionada con el contenido del primero (a mayores niveles de GSH, mayor actividad enzimática).
- ✚ En el hígado, el daño histopatológico observado en este órgano pudo haber respondido a mecanismos alternos al proceso oxidativo (alteración en la integridad de la membrana celular, cambios en el equilibrio del Ca⁺² intracelular o inhibición de enzimas, proteínas y

alteración del ADN). O bien, a la producción de HNE como producto competidor del MDA, lo cual explicaría el incremento de la actividad GST y el decremento de las ERO's.

- + Análogo al hígado, los riñones tratados con HgCl_2 , mostraron daños histopatológicos, los cuales concuerdan con el análisis de EGO (el cual mostró señales de proteinuria y hematuria provocados por la intoxicación con el MP) y el aumento en la actividad enzimática en el riñón y la orina (cuyo incremento está asociado a daños renales).
- + Ciertos organismos exhibieron una susceptibilidad mayor a la intoxicación con HgCl_2 , creando subgrupos en los análisis de hígado, riñón y orina en el tratamiento por una semana.
- + Las actividades de la GST en muestras de hígado, riñón y orina denotan que la enzima puede participar en procesos de detoxificación contra MP que podrían no restringirse únicamente a la respuesta contra el EO.

9. CONCLUSIONES

La enzima Glutación S-Transferasa demostró, en varios esquemas de intoxicación, una capacidad de reacción en el metabolismo que involucra MP, la cual exhibe su importancia en la estructura evolutiva de organismos que han desarrollado mecanismos para contrarrestar la toxicidad de estos agentes xenobióticos. En organismos como *H. alvei* y *C. Parapsilosis*, expuestas a CdCl_2 y HgCl_2 , la enzima ejerció una acción de respuesta ante la producción de ERO's, bajo una estrecha relación dosis-tiempo de exposición al metal. En particular, se encontraron ciertas relaciones ($\text{Cd(T120h)-H. alvei}$ y $\text{Hg(T56h)-C. Parapsilosis}$) que indican la posible presencia de HNE (producto competidor del MDA en la peroxidación de lípidos) y que explicaría el aumento de la actividad de la GST a pesar del decremento de las ERO's.

En *P. sp.* se encontró un aumento en la actividad enzimática ante la exposición a MP (HgCl_2 particularmente), que, aunque poco relacionada con el incremento de las ERO's, estableció la posibilidad de que la capacidad de respuesta de la enzima trascienda los mecanismos antioxidantes establecidos en nuestra hipótesis, y, por lo tanto, intervenga en mecanismos más directos, relacionados a la inactivación del MP.

Un fenómeno similar ocurrió en el esquema Cd^{+2} -Hígado-ERO's-GST y Hg^{+2} -Hígado-ERO's-GST de ratas Wistar, donde los MP no generaron un incremento en las ERO's, más sí un daño hepático y renal, evidenciado en el análisis EGO y en la morfología del órgano tratado con MP. El aumento en la actividad de la GST sugiere su participación ante la intoxicación contra MP bajo la posible acción de mecanismos de transcripción que pueden promover su inducción ante la presencia de estos agentes xenobióticos.

En el caso del riñón, se encontró que la toxicidad ejercida por los MP pudo provocar la reacción del sistema antioxidante global, lo cual pudo derivar en una subproducción de ERO's, observadas en la cuantificación de estas especies.

Se encontró, además, que, en mamíferos, el daño ocasionado por los MP CdCl_2 y HgCl_2 puede variar en función del órgano objetivo. Y que, bajo el esquema utilizado en este trabajo, el órgano menos afectado por estas especies químicas, fue el cerebro. Debido, presumiblemente, a la barrera hematoencefálica como estructura de protección al paso de MP.

El incremento de la actividad de la enzima GST, relacionada a la toxicidad por MP, con independencia de los mecanismos involucrados, sugiere la posibilidad de que la enzima pueda ser utilizada como bioindicador por intoxicación por MP en diferentes especies de organismos.

10. PERSPECTIVAS

Los mecanismos de respuesta antioxidante en los que participa la enzima Glutathión S-Transferasa y su trascendencia en los procesos de detoxificación de MP, genera una amplia gama de opciones sobre la cual puede diversificarse aún más esta línea de investigación. El estudio en los diferentes organismos abordados en este proyecto, puede complementarse bajo la implementación de diferentes esquemas de intoxicación, que ayuden a construir un panorama más completo del comportamiento de la enzima en diferentes condiciones de estrés. Igual de interesante es la opción de implementar un esquema de investigación similar al utilizado en este proyecto, evaluando el impacto de otros MP como el Cr, Pb, Co, entre otros y la respuesta de la GST antes estas especies químicas.

Otra línea de investigación que es posible derivar de este proyecto es el análisis individual de los organismos de estudio, y los mecanismos de acción enzimática involucrados en el combate contra los MP. Sean aquellos que presentaron una respuesta enzimática poco relacionada al incremento de ERO's (Hg^{+2} -P sp. o MP-Ratas Wistar-Hígado-GST). O bien aquellos donde existe la posibilidad de que el sistema antioxidante global (incluida la GST) se haya inducido en función de contrarrestar los efectos adversos de los MP.

Una perspectiva que resulta particularmente interesante de abordar es la relación entre el tiempo de exposición a MP y los productos generados mayoritariamente en la peroxidación de lípidos (MDA y/o HNE), y la relación de estos con el aumento o decremento en la actividad de la GST.

Además de ello, el aumento de la actividad de la enzima (con independencia de los mecanismos involucrados) ante la presencia de MP en las diferentes especies de estudio, sugieren la posibilidad del uso de esta biomolécula como potencial bioindicador de amplio espectro para la intoxicación por MP.

Sea pues importante determinar que este proyecto, que ejerce de base para la estructura de una investigación global que permita ampliar el entendimiento de la enzima y su importancia en los mecanismos de respuesta ante el estrés provocado por MP, cumple su papel como pilar sobre el cual pueden divergir investigaciones destinadas a la comprensión de la GST como proteína de carácter evolutivo y a la posibilidad de aplicaciones ulteriores enfocadas en combatir la toxicidad generada por los MP.

11. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Agrawal, S., Flora, G., Bhatnagar, P., Flora, S.J., 2014. Comparative oxidative stress, metallothionein induction and organ toxicity following chronic exposure to arsenic, lead and mercury in rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 60, 13-21.
- 2.- Almeida Lopes, A.C.B., Urbano, M.R., Souza-Nogueira, A., Oliveira-Paula, G.H., Michelin, A.P., Carvalho, M.F.H., Camargo, A.E.I., Peixe, T.S., Cabrera, M.A.S., Paoliello, M.M.B., 2017. Association of lead, cadmium and mercury with paraoxonase 1 activity and malondialdehyde in a general population in Southern Brazil. *Environ. Res.* 156, 674-682.
- 3.- Patra, R.C., Rautray, A.K., Swarup, D., 2011. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet. Med. Int* 2011, 457327.
- 4.- Rehman, K., Fatima, F., Waheed, I., Akash, M.S.H., 2018. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J. Cell. Biochem* 119, 157-184.
- 5.- Wark, P.A., Grubben, M.J., Peters, W.H., Nagengast, F.M., Kampman, E., Kok, F.J., et al., 2004. Habitual consumption of fruits and vegetables: associations with human rectal glutathione S-transferase. *Carcinogenesis*. 25, 11, 2135-2142.
- 6.- Wahab, P.J., Peters, W.H., Roelofs, H.M., Jansen, J.B., 2001. Glutathione S-transferases in small intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *Cancer Sci.* 92, 3, 279-284.
- 7.- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1-16.
- 8.- Zhang, W., Gao, J., Lu, L. Bold, T., Li, X., Wang, S., Chang Z., et al. 2021. Intracellular GSH/GST antioxidants system change as an earlier biomarker for toxicity evaluation of iron oxide nanoparticles. *NanoImpact.* 23, 100338
- 9.- Wrensch, M., Kelsey, K. T., 2004. Glutathione S-Transferase Variants and Adult Glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13, 3, 461-467.
- 10.- Yamamoto, K., Zhang, P., Miake, F., Kashige, N., Aso, Y., Banno, Y., Fujii, H., 2005. Cloning, expression and characterization of theta-class glutathione S-transferase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 141, 340-346.
- 11.- Hearne, J.L., Colman, R.F., 2006. Contribution of the mu loop to the structure and function of rat glutathione transferase M1-1. *Protein Sci.* 15, 1277-1289.
- 12.- Schopf, J.W., 1993. Microfossils of the early archean apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* 260, 640-646.

- 13.- Lozada, S., García, L., 2009. Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio. *Rev Asociación Colombiana de Dermatología* 17, 172-179.
- 14.- Nogueira, E., 2008. Estudio de la respuesta celular a SOK1 y mecanismos de regulación. [Tesis doctoral]. Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Fisiología.
- 15.- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141, 312 -22.
- 16.- Halliwell, B., 1994. Free radical, antioxidants and human disease, curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721-724.
- 17.- Cheeseman, K., Slater, T., 1993. An introduction to free radical biochemistry. In: Cheeseman K, Slater T, editors. Free radicals in medicine. London (UK): Churchill Livingstone, 481-493.
- 18.- Corrales, L. C., Muñoz, M.M., 2012. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas* 1794-2470, 10, 135-250.
- 19.- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., et al., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 4(8).
- 20.- Ugartondo, V., 2009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Universitat de Barcelona. Facultad de farmacia.
- 21.- Punchard, N., Kelly, F., 1996. Free radicals: a practical approach. Oxford University Press.
- 22.- Pourova, J., Kottova, M., Voprsalova, M., 2010. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta physiol.* 198, 15-35.
- 23.- Bandyopadhyay, U., Das, D., Banerjee, R., 1999. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci.* 77, 658-666.
- 24.- Borella, M., Varela, Q., 2004. Antioxidantes enzimáticos. En: Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Editora da ULBRA. Canoas- RS (Brasil). 35 - 49.
- 25.- Yu, P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews.* 74, 139 – 162.
- 26.- Power, S., Lennon, S., 1995. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.* 58, 1025-1033.
- 27.- Yuan, Z., Fu-Qiang, W., Gui-Zhen, Z., Meng, D., Jing, L., Ying, Z., Zhi-Hong, R., Qian, J., Bao-Hua, Z., 2007. Cloning and Characterization of a Novel Glutathione Transferase Gene from *Penicillium chrysogenum*. *Chin J Biotech.* 23, 618–622.

- 28.- Mannervik, B., Board, P., Hayes, J., Listowsky, I., Pearson, W., 2005. Nomenclature for Mammalian Soluble Glutathione Transferases. *Methods in Enzymology* 401 (5), 1-8.
- 29.- Sherratt, P. J., Hayes, J. D., 2002. Glutathione S-transferases. Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics. *John Wiley & Sons Ltd*, 319-352.
- 30.- Landi, S., 2000. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutation Research* 463, 247-283.
- 31.- Allocatia, N., Federicia, L., Masullia, M., Di Illoa, C., 2012. Distribution of glutathione transferases in Gram-positive bacteria and Archaea. *Biochimie* 94, 588-596.
- 32.- Sheehan, D., Meade, G., M. Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1-16.
- 33.- Armstrong, R. N., 1991. Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chemical Research in Toxicology* 4, 2, 131-140.
- 34.- Jakobsson, P. J. (1996). "Identification and characterization of a novel human microsomal glutathione S-transferase with leukotriene C4 synthase activity and significant sequence identity to 5-lipoxygenase-activating protein and leukotriene C4 synthase." *J Biol Chem* 271(36): 22203-22210.
- 35.- Tsuchida, S., Sato, K., 1992. Glutathione Transferases and Cancer. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 27, 4-5, 337-384.
- 36.- Hayes, J. D., Strange, R. C., 2000. Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences. *Pharmacology* 61, 3, 154-166.
- 37.- Kilty, C., Doyle, S., Hassett, B., Manning, F., 1998. Glutathione S-transferases as biomarkers of organ damage: applications of rodent and canine GST enzyme immunoassays. *Chemico-Biological Interactions* 111-112, 123-135.
- 38.- Mannervik, B., 2012. Five Decades with Glutathione and the GSTome. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 9, 6072-6083
- 39.- Sheweita, S.A., 2000. Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Current Drug Metabolism* 1, 107-132.
- 40.- Gonçalves-Soares, D., Zanette, J., Yunes, J.S., Yepiz-Plascencia, G.M., Bainy, A.C.D., 2012. Expression and activity of glutathione S-transferases and catalase in the shrimp *Litopenaeus vannamei* inoculated with a toxic *Microcystis aeruginosa* strain. *Marine Environmental Research* 75, 54-61.
- 41.- Won, E-J., Kim, R-O., Rhee, J-S., Park, G. S., Lee, J., Shin, K-H., Lee, Y-M., Lee, J-S., 2011. Response of glutathione S-transferase (GST) genes to cadmium exposure in the marine pollution indicator worm, *Perinereis nuntia*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 154, 82-92.

- 42.- Pal, R., Sanil, N., Clark, A., 2012. Developmental studies on the Sigma and Delta-1 glutathione transferases of *Lucilia cuprina*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 7, 28–34.
- 43.- Lee, S-K., Lee, D-R., Choi, B-K., Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Suh, J-W., 2015. Glutathione S-transferase pi (GST-pi) inhibition and anti-inflammation activity of the ethyl acetate extract of *Streptomyces* sp. strain MJM 8637. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22, 744–751.
- 44.- Casalino, E., Calzaretto, G., Landriscina, M., Sblano, C., Fabiano, A., Landriscina, C., 2007. The Nrf2 transcription factor contributes to the induction of alpha-class GST isoenzymes in liver of acute cadmium or manganese intoxicated rats: Comparison with the toxic effect on NAD(P)H: quinone reductase. *Toxicology* 237, 24–34.
- 45.- Richardson, K.L., Gold-Bouchot, G., Schlenk, D., 2009. The characterization of cytosolic glutathione transferase from four species of sea turtles: Loggerhead (*Caretta caretta*), green (*Chelonia mydas*), olive ridley (*Lepidochelys olivacea*), and hawksbill (*Eretmochelys imbricata*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 150, 279–284.
- 46.- Armstrong, R. N. 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10: 2-18
- 47.- Matovic, V., Buha, A., Ethukic-Cosic, D., Bulat, Z., 2015. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem. Toxicol.* 78, 130–140.
- 48.- Clarkson, T. W., Magos, L., 2006. The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. *Critical Reviews in Toxicology* 36, 609–662.
- 49.- Zhang, Q.-F., Li, Y.-W., Liu, Z.-H., Chen, Q.-L., 2016. Exposure to mercuric chloride induces developmental damage, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish embryos-larvae. *Aquatic Toxicology* 181, 76–85.
- 50.- Zhang, Y., Li, Z., Kholodkevich, S., Sharov, A., Feng, Y., Ren, N., Sun, K., 2019. Cadmium-induced oxidative stress, histopathology, and transcriptome changes in the hepatopancreas of freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*). *Science of the Total Environment* 666, 944–955.
- 51.- Zanette, J., Alves de Almeida, E., Zaccaron, A., Guzenski, J., Ferreira, J. F., Di Mascio, P., Freire, M. R., Dias, A. C., 2011. Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil. *Science of the Total Environment* 409, 1976–1983.
- 52.- Ku, P., Wu, X., Nie, X., Ou, R., Wang, L., Sua, T., Li, Y., 2014. Effects of triclosan on the detoxification system in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Expressions of CYP and GST genes and corresponding enzyme activity in phase I, II and antioxidant system. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 166, 105–114.
- 53.- Coles, B., Ketterer, B., 1990. The role of glutathione and glutathione S-transferases in chemical carcinogenesis. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, 47–70.

- 54.- Chatterjee, A., Gupta, S., 2018. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cáncer. *Cancer Letters* 433, 33–42.
- 55.- Reginato, M.J., Krakow, S.L., Bailey, S.T., Lazar, M.A., 1998. Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J Biol Chem* 273, 1855–1858.
- 56.- Londoño-Franco, L.F., Londoño-Muñoz, P.T., Muñoz-García, F.G., 2016. Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 14, 2, 145-153.
- 57.- Lane, T.W., Morel, F.M., 2000. A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci.* 97,4627–4631.
- 58.- Chronopoulos, J., Haidouti, C., Chronopoulou-Sereli, A., Massas, I., 1997. Variations in plant and soil lead and cadmium content in urban parks in Athens, Greece. *Sci Total Environ.* 196, 91–98.
- 59.- Singh, A., Sharma, R. K., Agrawal, M., Marshall, F. M., 2010. Risk assessment of heavy metal toxicity through contaminated vegetables from waste water irrigated area of Varanasi, India. *Tropical Ecology*, 51(2 SUPPL.), 375–387.
- 60.- Li, N., Kang, Y., Pan, W., Zeng, L., Zhang, Q., Luo, X., 2015. Concentration and transportation of heavy metals in vegetables and risk assessment of human exposure to bioaccessible heavy metals in soil near a waste-incinerator site, South China. *Science of the Total Environment* 521-522, 144–151.
- 61.- Reyes, Y.C., Vergara, I., Torres, O.E., Díaz, M., González, E.E., 2016. Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo* 16, 2, 66-77.
- 62.- CODEX STAN 193-1995. Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. 2016.
- 63.- Silver, S., Nucifora, G., Chul, L., Misra, T.K., 1989. Bacterial Resistance ATPases: Primary pumps for exporting toxic cations and anions. *Trends Biochem. Sci.* 14, 76-80.
- 64.- Sánchez, C.I., Ramírez Calderón, J. E., Cartagena Torres, E., Díaz Álvarez, J. C., 2010. Perfil sociodemográfico y epidemiológico de la población expuesta a la contaminación por mercurio, plomo y cadmio, ubicada en la vereda Manuel Sur del municipio de Ricaurte y los barrios Brisas del Bogotá y La Victoria del municipio de Girardot. *Investig. Enferm.* 12, 2, 93–116.
- 65.- Valdés, F., 1999. La contaminación por metales pesados en Torreón, Coahuila, México. *Texas Center for Policy Studies*, 1, 1-50. Available at: <http://www.texascenter.org/publications/torreon.pdf>.
- 66.- Bothe, H., Słomka, A., 2017. Divergent biology of facultative heavy metal plants. *Journal of Plant Physiology* 219, 45–61.

- 67.- Liu, S.-H., Zeng, G.-M., Niu, Q.-Y., Liu, Y., Zhou, L., Jiang, L.H., Tan, X.-F., Xu, P., Zhang, C., Cheng, M., 2017. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. *Bioresource Technology* 224, 25–33.
- 68.- Genestra M., 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal.* 19, 1807–1819.
- 69.- Li, H.L., Liu, D.P., Liang, C.C., 2003. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J. Mol. Med. (Berl.)*. 81, 766–779.
- 70.- Ahamed, M., Siddiqui, M.K., 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin. Chim. Acta* 383, 57–64.
- 71.- Almeida Lopes, A.C.B., Peixe, T.S., Mesas, A.E., Paoliello, M.M., 2015. Lead exposure and oxidative stress: a systematic review. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 236, 193–238.
- 72.- Zhang, L.J., Li, Y., Chen, P., Li, X. M., Chen, Y. G., Hang, Y.Y., Gong, W.J., 2017. A study of genotoxicity and oxidative stress induced by mercuric chloride in the marine polychaete *Perinereis aibuhitensis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 56, 361–365
- 73.- García-Medina, S., Galar-Martínez, M., Gómez-Oliván, L. M., Ruiz-Lara, K., Islas-Flores, H., Gasca-Pérez, E., 2017. Relationship between genotoxicity and oxidative stress induced by mercury on common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Aquatic Toxicology* 192, 207–215
- 74.- Nishimura, N., Nishimura, H., Ghaffar, A., Tohyama, C., 1992. Localization of metallothionein in the brain of rat and mouse. *J Histochem Cytochem.* 40, 309–315.
- 75.- Méndez-Armenta, M., Villeda-Hernández, J., Barroso-Moguel, R., Nava-Rui, C., Jiménez-Capdeville, M. E., Rí, C., 2003. Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone. *Toxicol Lett.* 144, 151–157.
- 76.- Svartengren, M., Elinder, C. G., Friberg, L., Lind, B., 1986. Distribution and concentration of cadmium in human kidney. *Environ Res.* 39, 1–7.
- 77.- Grobelak, A., Świątek, J., Murtas, A., Jaskulak, M., Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants. CHAPTER 9. Copyright © 2019 Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00009-7>
- 78.- Rehman, S., Abbas, G., Shahid, M., Saqib, M., Farooq, A. B. U., Hussain, M., Murtaza, B., Amjad, M., Naeem, M.A., Farooq, A., 2019. Effect of salinity on cadmium tolerance, ionic homeostasis and oxidative stress responses in *Conocarpus* exposed to cadmium stress: Implications for phytoremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 171, 146–153.
- 79.- Brunton, Laurence L., 2012. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica (12a. ed.), 135-142.

- 80.- Cummins, I., Dixon, D. P., Freitag-Pohl, S., Skipsey, M., Edwards, R., 2011. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), 266–280.
- 81.- Allocatia, N., Federicia, L., Masullia, M., Di Ilioa, C., 2009. Glutathione transferases in bacteria. *FEBS Journal* 276, 58–75.
- 82.- Navarro-Moreno, L. G., 1999. Efecto del plomo sobre algunos aspectos fisiológicos de túbulo proximales de riñón de rata. CINVESTAV-IPN-México, DF.
- 83.- Hernández, M., 2013. Estudio de los efectos del plomo en roedores desde una perspectiva quimiométrica. Tesis de licenciatura en ciencias químicas.
- 84.- Méndez, S., 2016. Antioxidantes como tratamiento alternativo contra la intoxicación renal con plomo. Tesis de licenciatura en ciencias químicas.
- 85.- Cruz, D., 2016. Actividad de la enzima Glutathión S-Transferasa expuesta a mercurio y micronutrientes. Congreso AMIDIQ.
- 86.- Raymundo, M., 2016. Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutathión S-transferasa p1. Universidad del Papaloapan-Tuxtepec Oaxaca México. Tesis de maestría en biotecnología.
- 87.- Axarli, I., Muleta, A. W., Chronopoulou, E. G., Papageorgiou, A. C., Labrou, N. E., 2016. Directed evolution of glutathione transferases towards a selective glutathione-binding site and improved oxidative stability. *Biochim. Biophys. Acta* 28600, 13, 4C, 5-11.
- 88.- Hayes, J. D., Pulford, D.J., 1995. The glutathione s-transferase supergene family: regulation o GST and the contribution of the isoenzymes to cáncer chemoprotection and drugs resistance. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 30, 445-600.
- 89.- Treviño-Rangel, R. J., González-González, J. G., Garza- González, E., González, G. M., 2012. Candida parapsilosis, una amenaza desafiante. *Medicina Universitaria* 14, 56, 157-165.
- 90.- Roetzer, A., Klopff, E., Gratz, N., Marcet-Houben, M., Hiller, E., Rupp, S., Gabaldón, T., Kovarik, P., Schüller, C., 2011. Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS Letters* 585, 319–327.
- 91.- Jamieson, D. J., Stephen, D- W. S., Terrière, E. C., 1996. Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters* 138, 83-88.
- 92.- Wang, Y., Luo, Y., Sui, Y., Xie, Z., Liu, Y., Jiang, M., Liu, J., 2018. Exposure of *Candida oleophila* to sublethal salt stress induces an antioxidant response and improves biocontrol efficacy. *Biological Control* 127, 109–115.

- 93.- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Hershkovitz, V., Tian, S., Farrell, R., 2012. Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80, 578–590.
- 94.- Mahl, C.D., Behling, C.S., Hackenhaar, F.S., de Carvalho e Silva, M.N., Putti, J., Salomon, T.B., Alves, S.H., Fuentefria, A., Benfato, M.S., 2015. Induction of ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 82, 203–208.
- 95.- Chandra, P., Arora, D. S., 2011. Antioxidant Potential of *Penicillium citrinum* and its Optimization through Different Statistical Approaches. *Free Rad. Antiox.* 1, 4, 48-55.
- 96.- McGoldrick, S., O'Sullivan, S.M., Sheehan, D., 2005. Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. *FEMS Microbiol Lett* 242(1), 1–12.
- 97.- Taa, N., Chena, Y., Wua, Y., Wang, X., Lia, L., Zhuh, A., 2019. The terpene limonene induced the green mold of citrus fruit through regulation of reactive oxygen species (ROS) homeostasis in *Penicillium digitatum* spores. *Food Chemistry* 277, 414–422.
- 98.- Mahajan, L., Verma, P. K., Raina, R., Pankaj, N. K., Sood, S., Maninder Singh, M., 2018. Alteration in thiols homeostasis, protein and lipid peroxidation in renal tissue following subacute oral exposure of imidacloprid and arsenic in Wistar rats. *Toxicology Reports* 5, 1114–1119.
- 99.- Abolajilsaac, A.O., Adedara, I.A., Abajing, A. O., Fatunmibi, O. J., Ladipo, E. O., Farombi, E. O., 2016. Evidence of oxidative damage and reproductive dysfunction accompanying 4-vinylcyclohexene diepoxide exposure in female Wistar rats. *Reproductive Toxicology* 66, 10-19.
- 100.- Loch-Caruso, R., Hassan, I., Harris, S. M., Kumar, A., Bjork, F., Lash, L. H., 2019. Trichloroethylene exposure in mid-pregnancy decreased fetal weight and increased placental markers of oxidative stress in rats. *Reproductive Toxicology* 83, 38–45.
- 101.- Ghosh, K., Indra, N., 2018. Cadmium treatment induces echinocytosis, DNA damage, inflammation, and apoptosis in cardiac tissue of albino Wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*.
- 102.- Okada, S., Gordon, D.M., 2003. Genetic and Ecological Structure of *Hafnia alvei* in Australia. *System. Appl. Microbiol.* 26, 585–594.
- 103.- Janda, J. M., Abbott, S. L., 2006. The Genus *Hafnia*: from Soup to Nuts. *Clinical Microbiology Reviews* 19(1), 12–28
- 104.- Vivas, J., Padilla, D., Real, F., Bravo, J., Grasso, V., Acosta, F., 2007. Influence of environmental conditions on biofilm formation by *Hafnia alvei* strains. *Veterinary Microbiology* 129, 150–155.

- 105.- Chihching, C., Yumei, K., Changchieh, C., Chunwei, H., Chihwei, Y., Weijen, Y., 2008. Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Sciences* 20, 359–363.
- 106.- Marzan, L. W., Hossain, M., Akter Mina, S., Akter, Y., Masudul Azad Chowdhury, A.M., 2017. Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 43, 65–74
- 107.- Galicia, A. J. A., 2013. Efecto de la exposición a plomo en bacterias aisladas de efluentes contaminados. Tesis de grado. Licenciatura en Ciencias Químicas, Universidad del Papaloapan, Oaxaca, México.
- 108.- EUCAST: Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. 2000. Versión 3.1
- 109.- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* Vol.3, 163-175.
- 110.- EUCAST: método de difusión con discos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. 2012. Versión 2.1
- 111.- Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Poujeol, P., Cougnon, M., 2004. Acute study of interaction among cadmium, calcium, and zinc transport along the rat nephron in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, 1067–1075.
- 112.- U.S. Pharmacopeia, National Formulary (USP 37, NF 32). 1057 Biotechnology-derived article: total protein assay.
- 113.- Maugeri, D., Iribarren, P. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS. 1-9.
- 114.- Habig, W. H., Pabst, M. J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I. M., Jakoby, W. B., 1974. The Identity of Glutathione S-Transferase B with Ligandin, a Major Binding Protein of Liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71(10), 3879–82.
- 115.- Jacoby, W., 1985. Glutathione Transferases: An Overview. *METHODS IN ENZYMOLOGY*. 61, 495-496.
- 116.- Estepa, V., Ródenas, S., Martín, M.C., 2001. Optimización de un método para la determinación de peroxidación lipídica en suero humano. *Anal. Real Acad. Farm.* 67(3), 1-17.
- 117.- <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2739/Anexo.pdf%3Fsequence%3D12>
- 118.- Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996-Límites Máximos Permisibles de Contaminantes en la Descarga de Aguas Residuales en Agua y Bienes Nacionales. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 23 de Abril del 2003.
- 119.- Silver, S., Walderhaugh, M., 1992. Regulation of chromosomal and plasmid cation and anion transport systems. *Microbiol. Rev.* 56, 1-33.

- 120.- Diels, L., Dong, Q., van der Lelie, D., Baeyens, W., Mergeay, M., 1995. The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to removal of heavy metal. *J. Indust. Microbiol.* 14, 142-153.
- 121.- Nies, D.H., 1995. The cobalt, zinc and cadmium efflux system from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 2707-2712.
- 122.- Nies, D.H., Silver, S., 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Indust. Microbiol.* 14, 186-199.
- 123.- Higman, D.P., Sadler, P.J., Scawen, M.D., 1984. Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science* 225, 1043-1046.
- 124.- Moreno-Sanchez, R., Cervantes, C., 1999. Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos. AGT EDITOR, S. A.
- 125.- Tapia, L.M., 2002. Función de las metalotioneínas en el metabolismo celular del cobre. Universidad de Chile. Tesis de doctoral.
- 126.- Mac Faddin, 1985. Media for isolation-cultivation- identification, maintenance of medical bacteria. Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimos, Md.
- 127.- Protocolos de Prácticas de Microbiología Experimental. 2014. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE QUÍMICA Departamento de Biología, 82-93.
- 128.- Downes and Ito, ed. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- 129.- Padilla, D.F., 2003. Factores de virulencia y patogenicidad de *Hafnia alvei* en la acuicultura con especial aplicación a la dorada (*Sparus aurata*, L.) UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, FACULTAD DE VETERINARIA. Tesis doctoral.
- 130.- Vuilleumier, S. 1997. Bacterial Glutathione S-Transferases: What Are They Good for? *Journal of Bacteriology* vol. 179, 1431-1441
- 131.- Leisinger, T., Bader, R., Hermann, R., Schmid-Appert, M., Vuilleumier, S. 1994. Microbes, enzymes and genes involved in dichloromethane utilization. *Biodegradation* 5:237-248.
- 132.- Di Ilio, C., Aceto, A., Piccolomini, R., Allocati, N., Faraone, A., Cellini, L., Ravagnan, G., Federici, G. 1988. Purification and characterisation of three forms of glutathione transferase from *Proteus mirabilis*. *Biochem. J.* 255:971-975
- 133.- Piccolomini, R., Di Ilio, C., Aceto, A., Allocati, N., Faraone, A., Cellini, L., Ravagnan, G., Federici, G. 1989. Glutathione transferase in bacteria: subunit composition and antigenic characterization. *J. Gen. Microbiol.* 135: 3119-3125.
- 134.- Arca, P., Garcia, P., Hardisson, C., Suarez, J. E. 1990. Purification and study of a bacterial glutathione S-transferase. *FEBS Lett.* 263:77-79.

- 135.- Iizuka, M., Inoue, Y., Murata, K., Kimura, A. 1989. Purification and some properties of glutathione S-transferase from *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol.* 171:6039–6042.
- 136.- Nishida, M., Kong, K.-H., Inoue, H., Takahashi, K. 1994. Molecular cloning and site-directed mutagenesis of glutathione S-transferase from *Escherichia coli*. The conserved tyrosyl residue near the N terminus is not essential for catalysis. *J. Biol. Chem.* 269:32536–32541.
- 137.- Hofer, B., Bachhaus, S., Timmis, K. N. 1994. The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (bph) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes. *Gene* 144:9–16.
- 138.- Wang, Y., Lau, P. C. K., Button, D. K. 1996. A marine oligobacterium harboring genes known to be part of aromatic hydrocarbon degradation pathways of soil pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2169–2173.
- 139.- Marsh, M., Shoemark, D. K., Jacob, A., Robinson, C., Cahill, B., Zhou, N.-Y., Williams, P. A., Hadfield, A. T. 2008. Structure of Bacterial Glutathione-S-Transferase Maleyl Pyruvate Isomerase and Implications for Mechanism of Isomerisation. *J. Mol. Biol.* (2008) 384, 165–177
- 140.- Allocati, N., Favaloro, B., Masulli, M., Alexeyev, M. F., Di Ilio, C. 2003. *Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stresses. *Biochem J* 373: 305-311
- 141.- Arca, P., Garcia, P., Hardisson, C. y Suarez, J. E. 1990. Purification and study of a bacterial glutathione S-transferase. *FEBS Lett* 263: 77-79
- 142.- Arca, P., Hardisson, C. y Suarez, J. E. 1990. Purification of a glutathione S-transferase that mediates fosfomycin resistance in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 844-848
- 143.- Arca, P., Rico, M., Brana, A. F., Villar, C. J., Hardisson, C. y Suarez, J. E. 1988. Formation of an adduct between fosfomycin and glutathione: a new mechanism of antibiotic resistance in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1552-1556
- 144.- Moreno-Sanchez, R., Cervantes, C., 1999. Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos. AGT EDITOR, S. A.
- 145.- Grill, E., Loeffler, S., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1989. Phytochelatins, the heavy metal binding complexing peptides of plants, are synthesized from glutathioneins by a specific γ -glutamyl-cysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6838-6842.
- 146.- Yu, W., Santhanagopalan, V., Sewell, A.K., Jensen, L.T., Winge, D.R., 1994. Dominance of Metallothionein in metal ion buffering in yeast capable of synthesis of (EC)_nG isopeptides. *J. Biol. Chem.* 269, 21010-21015.
- 147.- Tamaki, H., Yamamoto, K. y Kumagai, H. 1999. Expression of two glutathione S-transferase genes in the yeast *Issatchenkia orientalis* is induced by o-dinitrobenzene during cell growth arrest. *J Bacteriol* 181, 2958-2962.

- 148.- Garcerá, A., Casas, C., Herrero, E. 2010. Expression of *Candida albicans* glutathione transferases is induced inside phagocytes and upon diverse environmental stresses. *FEMS Yeast Res* 10, 422–431.
- 149.- Benfato, M.S., Mahl, C.D., Behling, C.S., et al. 2015. Induction of ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* xxx, xxx–xxx.
- 150.- Adamis P.D., Gomes D.S., Pinto M.L., Panek A.D., Eleutherio E.C. 2004. The role of glutathione transferases in cadmium stress. *Toxicol Lett* 154: 81–88.
- 151.- Li, Z., Lu, Y., Zhen, R., Szcypka, M., Thiele, D. Rea, P.A. 1997 A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathione) cadmium. *P Natl Acad Sci USA*, 94: 42–47.
- 152.- Veal, E. A., Toone, W. M., Jones, N., Morgan, B. A. 2002. Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*. 277, 35523-35531
- 153.- Cho, Y.-W., Park, E.-H., Fuchs, J.A., Lim, C.-J. 2002. A second stress-inducible glutathione S-transferase gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim. Biophys. Acta* 1574, 399–402.
- 154.-Moreno-Sanchez, R., Cervantes, C., 1999. Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos. AGT EDITOR, S. A.
- 155.- Grill, E., Loeffler, S., Winnacker, EL., Zenk, M.H., 1989. Phytochelatins, the heavy metal binding complexing peptides of plants, are synthesized from glutathioneins by a specific γ -glutamyl-cysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6838-6842.
- 156.- Muñoz-Silva, L., Olivera-Gonzales, P., Miguelina Santillán-Torres, M., Tamariz-Angeles, C., 2019. Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú). *Revista peruana de biología*, 26(1), 109 – 118.
- 157.- Tsekova, K., Kaimaktchiev, A., Tzekova, A. 2014. Bioaccumulation of heavy metals by microorganisms. *Biotechnol Biotechnol Equip* 12, 2, 94–96.
- 158.- Banerjee, S., Gothwal, R., Sahu, P.K., Sao, S. 2015. Microbial observation in bioaccumulation of heavy metals from the Ash dyke of thermal power plants of Chhattisgarh, India. *Adv Biosci Biotechnol* 06, 02, 131–138.
- 159.- Özdemir, S., Kılınç, E., Poli, A., Nicolaus, B. 2013. Biosorption of heavy metals (Cd^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , and Mn^{+2}) by thermophilic bacteria, *Geobacillus thermantarcticus* and *Anoxybacillus amylolyticus*: equilibrium and kinetic studies. *Biorem J* 17, 2, 86–96.
- 160.- Swati, S., Sakshi, T., Abshar H., Varun S., Lalit, P. 2018. Recent advances in conventional and contemporary methods for remediation of heavy metal-contaminated soils. *3 Biotech*, 8, 216.

- 161.- Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S. 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267–294.
- 162.- Nordberg, G.F. 2004. Cadmium and health in the 21st century—historical remarks and trends for the future. *Biometals* 17, 485–489.
- 163.- Arvidson, B., Tjälve, H. 1986. Distribution of ^{109}Cd in the nervous system of rats after intravenous injection. *Acta Neuropathol (Berl)* 69:111.
- 164.- Wong, K.L., Cachia, R., Klaassen, C.D. 1980. Comparison of the toxicity and tissue distribution of cadmium in newborn and adult rats after repeated administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 56, 317–325.
- 165.- Wong, K.L., Klaassen, C.D. 1982. Neurotoxic effects of cadmium in young rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63, 330–337.
- 166.- Choudhuri, S., Liu, W.L., Berman, N.E., Klaassen, C.D. 1996. Cadmium accumulation and metallothionein expression in brain of mice at different stages of development. *Toxicol. Lett.* 84, 127–133.
- 167.- Méndez-Armenta, M., Villeda-Hernández, J., Barroso-Moguel, R., Nava-Ruiz, C., Jiménez-Capdeville, M.E., Ríos, C. 2003. Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone. *Toxicology Letters* 144, 151–157.
- 168.- Bragaa, M. M., Dicka, T., de Oliveiraa, D. L., Scopel-Guerraa, A., Mussulinia, B. H., Souzaa, D. O., da Rocha, J.B.T. 2015. Evaluation of zinc effect on cadmium action in lipid peroxidation and metallothionein levels in the brain. *Toxicology Reports* 2, 858–863.
- 169.- Valois, AA., Webster, WS. 1989. The choroid plexus as a target site for cadmium toxicity following chronic exposure in the adult mouse: an ultrastructural study. *Toxicology* 55:193.
- 170.- Al Olayan, E.M., Aloufi, A. S., AlAmri, O.D., El-Habit, O.H., Abdel Moneimc, A.E. 2020. Protocatechuic acid mitigates cadmium-induced neurotoxicity in rats: Role of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Science of the Total Environment* 723, 137969
- 171.- Khan, M.H., Parvez, S. 2015. Hesperidin ameliorates heavy metal induced toxicity mediated by oxidative stress in brain of Wistar rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 31, 53–60
- 172.- Klaassen, C.D. 1978. Effect of metallothionein on hepatic disposition of metals. *Am. J. Physiol.* 234, E47–E53.
- 173.- Liu, J., Liu, Y., Michalska, A.E., Choo, K.H., Klaassen, C.D. 1996. Distribution and retention of cadmium in metallothionein I and II null mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136, 260–268.
- 174.- Jarup, L., Berglund, M., Elinder, C.G., Nordberg, G., Vahter, M. 1998. Health effects of cadmium exposure—a review of the literature and a risk estimate. *Scand. J. Work Environ. Health* 24 (Suppl 1), 1–51.
- 175.- Shujun, D., Zhongqiong, Y., Guiping, Y., Hongke, L., Renyong, J., Jiao, X., Xu, S., Li, L., Yang, S. Xiaoxia, L., Changliang, H., Cheng, L., Wei, Z. 2013. Quantification of metallothionein on the liver and kidney of rats by

subchronic lead and cadmium in combination. *Environmental toxicology and pharmacology*. 36, 1207–1216.

176.- Turella, P., Pedersen, J.Z., Caccuri, A.M., De Maria, F., Mastroberardino, P., Lo Bello, M., Federici, G., Ricci, G. 2003. Glutathione transferase superfamily behaves like storage proteins for dinitrosyldiglutathionyl-iron complex in heterogeneous systems. *J. Biol. Chem.* 278, 42294–42299.

177.- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretto, G., Landriscina, C. 2004. Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. *Toxicology* 200, 29–38.

178.- Casalino, E., Sblano, C., Calzaretto, G., Landriscina, C. 2006. Acute cadmium intoxication induces alpha-class glutathione S-transferase protein synthesis and enzyme activity in rat liver. *Toxicology* 217, 240–245.

179.- Lenartova, V., Holovska, K., Martinez-Lara, E., Lopez-Barea, J., Rosival, I. 1996. Changes in GST-isoenzyme pattern of some organs of sheep exposed to different levels of pollutants. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 114, 153–158.

180.- He, C.H., Gong, P., Hu, B., Stewart, D., Choi, M.E., Alam, J. 2001. Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J. Biol. Chem.* 276, 20858–20865.

181.- Ikeda, H., Serria, M.S., Kakizaki, I., Hatayama, I., Satoh, K., Tsuchida, S., Muramatsu, M., Nishi, S., Sakai, M. 2002. Activation of mouse pi class glutathione S-transferase gene by Nrf2 (NF-E2-related factor 2) and androgen. *Biochem. J.* 364 (Pt 2), 563–570.

182.- Chanas, S.A., Jiang, Q., McMahon, M., McWalter, G.K., McLellan, L.I., Elcombe, C.R., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Moffat, C.J., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J.D. 2002. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase GSTA1, GSTA2, GSTM1, GSTM21 GSTM31 and GSTM4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem. J.* 365 (Pt 2), 405–416.

183.- Cho, M.K., Kim, Y.J., Lee, M.G., Kim, S.G. 2000. The effect of cysteine on the altered expression of class alpha and mu glutathione S-transferase genes in the rat liver during protein-calorie malnutrition. *Toxicology* 200, 29–38.

184.- Thimmulappa, R.K., Mai, K.H., Srisuma, S., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Biswal, S. 2002. Identification of Nrf2-regulated genes induced by chemopreventive agent sulphorane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* 62, 5196–5203.

185.- Lee, J.M., Johnson, J.A. 2004. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37, 139–143.

186.- Lee, J.S., Surh, Y.J. 2005. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett* 224:171–184.

- 187.- Huang, H.C., Nguyen, T., Pickett, C.B. 2002. Phosphorylation of Nrf2 at ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 277, 42769–42774.
- 188.- Zhang, D.D., Hannink, M. 2003. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemo-preventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8137–8151.
- 189.- Levonen, A.L., Landar, A., Ramachandran, A., Ceaser, E.K., Dickinson, D.A., Zaroni, G., Morrow, J.D., Darley-Usmar, V.M. 2004. Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem. J.* 378 (Pt 2), 373–382.
- 190.- Klassen, R.B., Crenshaw, K., Kozyraki, R., Verroust, P.J., Tio, L., Atrian, S. 2004. Megalin mediates renal uptake of heavy metal methallothionein complexes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287: F393-403.
- 191.- Sabath, E., Robles-Osorio, M. L. 2004. Medio ambiente y riñón: nefrotoxicidad por metales pesados. *Nefrología.* 32(3):279-86.
- 192.- Liu, Y., Liu, J., Klaassen, CD. 2001. Metallothionein-null and wild-type mice show similar cadmium absorption and tissue distribution following oral cadmium administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 175:253-9.
- 193.- Hirano, S., Sun, X., DeGuzman, C., Ransom, R., MacLeish, K., Smoyer, W.E., et al. 2005. p38 MAPK/HSP25 signaling mediates cadmium-induced contraction of mesangial cells and renal glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F1133-43.
- 194.- Gunawardana, C.G., Martínez, R.E., Xiao, W., Templeton, DM. 2006. Cadmium inhibits both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in renal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F1074-82.
- 195.- Beckett, G.J., Hayes, J.D. 1993. Glutathione S-transferases: biomedical applications. *Adv Clin Chem.* 30:281–380.
- 196.- Sundberg, A., Appelkvist, E.L., Dallner, G., Nilsson, R. 1994. Glutathione S-transferases in the urine: sensitive methods for detection of kidney damage induced by nephrotoxic agents in humans. *Environ Health Perspect.* 102:293–6.
- 197.- Sundberg, A., Nilsson, R., Appelkvist, E.L., Dallner, G. 1995. ELISA procedures for the quantification of glutathione S-transferases in the urine. *Kidney Int.* 48:570–5.
- 198.- Campuzano-Maya, G., Arbeláez-Gómez, M. 2007. El uroanálisis: un gran aliado del médico. *Revista Urología Colombiana* 16 (1) 67-92.
- 199.- Jacobs, D.S., Alon, U. 2001. Urinalysis. In: Lexi-Comp I, ed. Laboratory test handbook (ed 5th Edition). Hudson (Cleveland), OH, USA; 869-889.

- 200.- Semeniuk, H., Church, D. 1999. Evaluation of the leukocyte esterase and nitrite urine dipstick screening tests for detection of bacteriuria in women with suspected uncomplicated urinary tract infections. *J Clin Microbiol.* 37:3051-3052.
- 201.- Ibrahim, D., Froberg, B., Wolf, A., Rusyniak, D.E. 2006. Heavy metal poisoning: clinical presentations and pathophysiology. *Clin Lab Med.* 26:67-97.
- 202.- Patrick, L. 2002. Mercury Toxicity and Antioxidants: Part I: Role of Glutathione and alpha-Lipoic Acid in the Treatment of Mercury Toxicity. *Alternative Medicine Review.* 7, 6, 456-471.
- 203.- Bernhoft, R.A. 2011. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. *Journal of Environmental and Public Health.* 1-10.
- 204.- Berlin, M. Zalups, R.K., Fowler, B.A. 2007. "Mercury," in Handbook on the Toxicology of Metals, G. F. Nordberg, B. A. Fowler, M. Nordberg, and L. T. Friberg, Eds., chapter 33, Elsevier, New York, NY, USA, 3rd edition.
- 205.- Norseth, T., Clarkson, T.W. 1971. Intestinal transport of ²⁰³Hg labeled methyl mercury chloride. Role of biotransformation in rats. *Archives of Environmental Health.* 22, 5, 568-577.
- 206.- National Research Council. 2000. Toxicological Effects of Methylmercury. Washington, DC: National Academy Press; 33-35.
- 207.- National Research Council. 2000. Toxicological Effects of Methylmercury. Washington, DC: National Academy Press; 31-70.
- 208.- Clarkson, T.W. 2002. The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect.* 110:11-23.
- 209.- Divine, K.K., Ayala-Fierro, F., Barber, D.S., Carter, D.E. 1999. Glutathione, albumin, cysteine, and cystgly effects on toxicity and accumulation of mercuric chloride in LLC-PK1 cells. *J Toxicol Environ Health A* 57:489-505.
- 210.- Davidson, P.W., Myers, G.J., Weiss, B. 2002. Mercury exposure and child development outcomes. *Pediatrics.* 113, 1023-1029.
- 211.- Sen, C. 1997. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *J Nutr Biochem.* 8, 660-672.
- 212.- Lee, Y.W., Ha, M.S., Kim, Y.K. 2001. Role of reactive oxygen species and glutathione in inorganic mercury-induced injury in human glioma cells. *Neurochem Res.* 26, 1187-1193.
- 213.- Yoshizawa, K., Rimm, E.B., Steven Morris, J., Spate, V.L., Hsieh, C.C., Spiegelman, D., Stampfer, M.J., Willett, W.C. 2002. Mercury and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med.* 347, 1755-1760.
- 214.- Kerper, L.E., Mokrzan, E.M., Clarkson, T.W., Ballatori, N. 1996. Methylmercury efflux from brain capillary endothelial cells is modulated by intracellular glutathione but not ATP. *Toxicol Appl Pharmacol.* 141, 526-531.

- 215.- Packer, L., Kraemer, K., Rimbach, G. 2001. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*. 17, 888-895
- 216.- Cookson, M.R., Pentreath, V.W. 1996. Protective roles of glutathione in the toxicity of mercury and cadmium compounds to C6 glioma cells. *Toxicol In Vitro*. 10:257-264.
- 217.- Nieminen, A.L., Gores, G.J., Dawson, T.L., Herman, B., Lemasters, J.J., 1990. Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem*. 265, 2399–2408.
- 218.- Ghosh, A., Sil, P.C., 2008. A protein from *Cajanus indicus* Spreng protects liver and kidney against mercuric chloride-induced oxidative stress. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1651–1658.
- 219.- Bashandy, S.A., Alhazza, I.M., El-Desoky, G.E., Al-Othman, Z.A., 2011. Hepatoprotective and hypolipidemic effects of *Spirulina platensis* in rats administered mercuric chloride. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 5, 175–182.
- 220.- Zhang, H., Tan, X., Yang, D., Lu, J., Liu, B., Baiyun, R., Zhang, Z., 2017. Dietary luteolin attenuates chronic liver injury induced by mercuric chloride via the Nrf2/NF- κ B/P53 signaling pathway in rats. *Oncotarget* 8, 40982-40993.
- 221.- Gosh, A., Sil, P.C., 2008. A protein from *Cajanus indicus* Spreng protects liver and kidney against mercuric chloride-induced oxidative stress. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1651-1658.
- 222.- Joshi, D., Srivastav, S.K., Belemkar, S., Dixit, V.A., 2017. Zingiber officinale and 6-gingerol alleviate liver and kidney dysfunctions and oxidative stress induced by mercuric chloride in male rats: A protective approach. *Biomed. Pharmacother.* 91, 645-655.
- 223.- Klaassen, C.D. 2007. Casarett & Daull's toxicology the basic science of poisons. New York: McGrawHill.
- 224.- Park, J.D., Zheng, W. 2012. Human exposure and health effects of Inorganic and elemental mercury. *J Prev Med Publ Health*. 45, 344–352.
- 225.- Verma, S., Kumar, R., Khadwal, A., Singhi, S. 2010. Accidental inorganic mercury chloride poisoning in a 2-year old child. *Indian J Pediatr*. 77, 1153–1155.
- 226.- Taugner, R., Winkel, R., Iravani, J. 1966. The localization of mercuric chloride concentration in the rat kidney. *Virchows Archiv*. 340, 4, 369–383.
- 227.- Kojima, S., Shimada, H., Kiyozumi, M. 1989. Comparative effects of chelating agents on distribution, excretion, and renal toxicity of inorganic mercury in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 64, 471-484.
- 228.- Fink, S. P., Reddy, G. R., & Marnett, L. J. 1997. Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 8652–8657.

229.- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84.

230.- Zilli, S., Navarro, L. 2020. Efecto de la intoxicación con plomo en ratas gestantes. Tesis Licenciatura. Universidad del Papaloapan.

231.- Cruz, D. Navarro, L. 2019. Susceptibilidad a la intoxicación con plomo en roedores. Tesis Licenciatura. Universidad del Papaloapan.

232.- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncola, J., Izakovic, M., Mazura, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1–40

12. ANEXO

12.1 TABLAS ESTADÍSTICAS

12.1.1 *Hafnia Alvei* – CdCl_2

Tabla 20. Análisis ANOVA para *H. Alvei* CdCl_2 -T0-GST

ANOVA: T0CCd, T0[-]Cd, T0[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	16.999	8.499	50.5	0.000
ERROR	24	4.039	0.168		
TOTAL	26	21.038			

Tabla 21. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *H. Alvei* CdCl_2 -T0-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T0CCd	9	3.5898	A
T0[-]Cd	9	2.3556	B
T0[+]Cd	9	1.6725	C

Tabla 22. Análisis ANOVA para *H. Alvei* CdCl_2 -T0-ERO's

ANOVA: T0CCd, T0[-]Cd, T0[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	12432	6216	11.16	0.000
ERROR	51	28419	557		
TOTAL	53	40851			

Tabla 23. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *H. Alvei* CdCl_2 -T0-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T0CCd	18	142.41	A
T0[-]Cd	18	107.31	B
T0[+]Cd	18	114.26	B

Tabla 24. Análisis ANOVA para *H. Alvei* CdCl₂-T10-GST

ANOVA: T10CCd, T10[-]Cd, T10[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	12.817	6.409	56.59	0.000
ERROR	24	2.718	0.113		
TOTAL	26	15.535			

Tabla 25. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *H. Alvei* CdCl₂-T10-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T10CCd	9	2.3781	A
T10[-]Cd	9	1.1291	B
T10[+]Cd	9	0.7707	C

Tabla 26. Análisis ANOVA para *H. Alvei* CdCl₂-T10-ERO's

ANOVA: T10CCd, T10[-]Cd, T10[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	372305	186153	22.05	0.000
ERROR	51	430597	8443		
TOTAL	53	802902			

Tabla 27. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *H. Alvei* CdCl₂-T10-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T10CCd	18	429.53	C
T10[-]Cd	18	348.65	B
T10[+]Cd	18	227.47	A

Tabla 28. Análisis ANOVA para *H. Alvei* CdCl₂-T120-GST

ANOVA: T120CCd, T120[-]Cd, T120[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	0.896	0.448	2.23	0.129
ERROR	24	4.823	0.201		
TOTAL	26	5.719			

Tabla 29. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *H. Alvei* CdCl₂-T120-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T120CCd	9	2.5176	A
T120[-]Cd	9	2.1862	A
T120[+]Cd	9	2.0932	A

Tabla 30. Análisis ANOVA para *H. Alvei* CdCl₂-T120-ERO's

ANOVA: T120CCd, T120[-]Cd, T120[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	1977	988	3.31	0.045
ERROR	51	15245	299		
TOTAL	53	17222			

Tabla 31. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *H. Alvei* CdCl₂-T120-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T120CCd	18	113.61	A
T120[-]Cd	18	98.82	B
T120[+]Cd	18	105.42	AB

12.1.2 *Hafnia Alvei* – HgCl₂

Tabla 32. Análisis ANOVA para *H. Alvei* HgCl₂-T0-GST

ANOVA: T0CHg, T0[-]Hg, T0[+]Hg					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	4.988	2.494	19.49	0.000
ERROR	24	3.070	0.128		
TOTAL	26	8.058			

Tabla 33. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *H. Alvei* HgCl₂-T0-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T0CHg	9	4.2799	A
T0[-]Hg	9	3.9251	B
T0[+]Hg	9	4.1101	A

Tabla 34. Análisis ANOVA para *H. Alvei* HgCl₂-T0-ERO's

ANOVA: T0CHg, T0[-]Hg, T0[+]Hg					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	72003	36002	32.30	0.000
ERROR	51	56844	1115		
TOTAL	53	128847			

Tabla 35. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *H. Alvei* HgCl₂-T0-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T0CHg	18	67.86	B
T0[-]Hg	18	81.8	B
T0[+]Hg	18	151.34	A

Tabla 36. Análisis ANOVA para *H. Alvei* HgCl₂-T10-GST

ANOVA: T10CHg, T10[-]Hg, T10[+]Hg					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	5.571	2.785	9.36	0.001
ERROR	24	7.144	0.298		
TOTAL	26	12.715			

Tabla 37. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *H. Alvei* HgCl₂-T10-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T10CHg	9	3.8929	A
T10[-]Hg	9	3.8481	A
T10[+]Hg	9	2.9078	B

Tabla 38. Análisis ANOVA para *H. Alvei* HgCl₂-T10-ERO's

ANOVA: T10CHg, T10[-]Hg, T10[+]Hg					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	126317	63159	12.62	0.000
ERROR	51	255217	5004		
TOTAL	53	381535			

Tabla 39. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *H. Alvei* HgCl₂-T10-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T10CHg	18	202.94	B
T10[-]Hg	18	202	B
T10[+]Hg	18	305.06	A

Tabla 40. Análisis ANOVA para *H. Alvei* HgCl₂-T120-GST

ANOVA: T120CHg, T120[-]Hg, T120[+]Hg					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	1.092	0.546	2.06	0.152
ERROR	21	5.562	0.265		
TOTAL	23	6.654			

Tabla 41. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *H. Alvei* HgCl₂-T120-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T120CHg	18	2.7443	A
T120[-]Hg	18	3.1819	A
T120[+]Hg	18	3.2103	A

Tabla 42. Análisis ANOVA para *H. Alvei* HgCl₂-T120-ERO's

ANOVA: T120CHg, T120[-]Hg, T120[+]Hg					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	22852	11426	26.22	0.000
ERROR	51	22220	436		
TOTAL	53	45072			

Tabla 43. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *H. Alvei* HgCl₂-T120-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T120CHg	18	133.10	B
T120[-]Hg	18	121.68	B
T120[+]Hg	18	169.89	A

12.1.3 *Candida Parapsilosis* – CdCl₂

Tabla 44. Análisis ANOVA para *C. Parapsilosis* CdCl₂-T0-GST

ANOVA: T0CCd, T0[-]Cd, T0[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	16.999	8.499	50.50	0.000
ERROR	24	4.039	0.168		
TOTAL	26	21.038			

Tabla 45. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *C. Parapsilosis* CdCl₂-T0-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T0CCd	9	3.5898	A
T0[-]Cd	9	2.3556	B
T0[+]Cd	9	1.6725	C

Tabla 46. Análisis ANOVA para *C. Parapsilosis* CdCl₂-T0-ERO's

ANOVA: T0CCd, T0[-]Cd, T0[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	1140	570	0.90	0.412
ERROR	51	32226	632		
TOTAL	53	33336			

Tabla 47. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *C. Parapsilosis* CdCl₂-T0-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T0CCd	18	131.87	A
T0[-]Cd	18	137.23	A
T0[+]Cd	18	143.12	A

Tabla 48. Análisis ANOVA para *C. Parapsilosis* CdCl₂-T10-GST

ANOVA: T10CCd, T10[-]Cd, T10[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	20.808	10.404	56.64	0.000
ERROR	24	4.408	0.184		
TOTAL	26	25.216			

Tabla 49. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *C. Parapsilosis* CdCl₂-T10-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T10CCd	9	2.3781	B
T10[-]Cd	9	1.1291	C
T10[+]Cd	9	3.2694	A

Tabla 50. Análisis ANOVA para *C. Parapsilosis* CdCl₂-T10-ERO's

ANOVA: T10CCd, T10[-]Cd, T10[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	618502	309251	36.9	0.000
ERROR	51	427364	8380		
TOTAL	53	1045866			

Tabla 51. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *C. Parapsilosis* CdCl₂-T10-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T10CCd	18	253.00	B
T10[-]Cd	18	451.77	A
T10[+]Cd	18	500.41	A

Tabla 52. Análisis ANOVA para *C. Parapsilosis* CdCl₂-T56-GST

ANOVA: T56CCd, T56[-]Cd, T56[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	3.5603	1.7801	21.36	0.000
ERROR	24	2.0000	0.0833		
TOTAL	26	5.5603			

Tabla 53. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *C. Parapsilosis* CdCl₂-T56-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T56CCd	9	0.7569	B
T56[-]Cd	9	1.6131	A
T56[+]Cd	9	0.9762	B

Tabla 54. Análisis ANOVA para *C. Parapsilosis* CdCl₂-T56-ERO's

ANOVA: T56CCd, T56[-]Cd, T56[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	7687	3844	6.71	0.003
ERROR	51	29194	572		
TOTAL	53	36882			

Tabla 55. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *C. Parapsilosis* CdCl₂-T56-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T56CCd	18	126.02	B
T56[-]Cd	18	142.34	AB
T56[+]Cd	18	155.18	A

12.1.4 Candida Parapsilosis – HgCl₂

Tabla 56. Análisis ANOVA para *C. Parapsilosis* HgCl₂-T0-GST

ANOVA: T0CHg, T0[-]Hg, T0[+]Hg					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	4.988	2.494	19.49	0.000
ERROR	24	3.070	0.128		
TOTAL	26	8.058			

Tabla 57. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *C. Parapsilosis* HgCl₂-T0-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T0CHg	9	4.1101	A
T0[-]Hg	9	3.2951	B
T0[+]Hg	9	4.2799	A

Tabla 58. Análisis ANOVA para *C. Parapsilosis* HgCl₂-T0-ERO's

ANOVA: T0CHg, T0[-]Hg, T0[+]Hg					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	23026	11513	18.63	0.000
ERROR	51	31520	618		
TOTAL	53	54545			

Tabla 59. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *C. Parapsilosis* HgCl₂-T0-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T0CHg	18	80.17	B
T0[-]Hg	18	96.88	B
T0[+]Hg	18	129.87	A

Tabla 60. Análisis ANOVA para *C. Parapsilosis* HgCl₂-T10-GST

ANOVA: T10CHg, T10[-]Hg, T10[+]Hg					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	4.591	2.296	9.07	0.001
ERROR	24	6.077	0.253		
TOTAL	26	10.668			

Tabla 61. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *C. Parapsilosis* HgCl₂-T10-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T10CHg	9	3.8929	A
T10[-]Hg	9	3.8481	A
T10[+]Hg	9	2.9966	B

Tabla 62. Análisis ANOVA para *C. Parapsilosis* HgCl₂-T10-ERO's

ANOVA: T10CHg, T10[-]Hg, T10[+]Hg					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	45124	22562	6.99	0.002
ERROR	51	164688	3229		
TOTAL	53	209811			

Tabla 63. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *C. Parapsilosis* HgCl₂-T10-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T10CHg	18	291.38	B
T10[-]Hg	18	316.76	B
T10[+]Hg	18	361.32	A

Tabla 64. Análisis ANOVA para *C. Parapsilosis* HgCl₂-T56-GST

ANOVA: T56CHg, T56[-]Hg, T56[+]Hg					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	1.546	0.773	3.26	0.046
ERROR	24	5.694	0.237		
TOTAL	26	7.240			

Tabla 65. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *C. Parapsilosis* HgCl₂-T56-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T56CHg	9	2.6197	B
T56[-]Hg	9	3.1333	A
T56[+]Hg	9	3,1211	A

Tabla 66. Análisis ANOVA para *C. Parapsilosis* HgCl₂-T56-ERO's

ANOVA: T56CHg, T56[-]Hg, T56[+]Hg					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	14674	7377	16.81	0.000
ERROR	51	22264	437		
TOTAL	53	36938			

Tabla 67. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *C. Parapsilosis* HgCl₂-T56-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T56CHg	18	142.55	A
T56[-]Hg	18	123.85	B
T56[+]Hg	18	102.21	C

12.1.5 *Penicillium sp* – CdCl_2 Tabla 68. Análisis ANOVA para *P. sp* CdCl_2 -18h-GST

ANOVA: T18CCd, T18[-]Cd, T18[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	0.158	0.079	0.45	0.647
ERROR	15	2.632	0.175		
TOTAL	17	2.790			

Tabla 69. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *P. sp* CdCl_2 -18h-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T18CCd	6	3.4832	A
T18[-]Cd	6	3.2582	A
T18[+]Cd	6	3.3326	A

Tabla 70. Análisis ANOVA para *P. sp* CdCl_2 -18h-ERO's

ANOVA: T18CCd, T18[-]Cd, T18[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	218601	109301	37.81	0.000
ERROR	33	95388	2891		
TOTAL	35	313989			

Tabla 71. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *P. sp* CdCl_2 -18h-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T18CCd	12	328.34	A
T18[-]Cd	12	359.06	B
T18[+]Cd	12	180.55	A

12.1.5 *Penicillium sp* – $HgCl_2$ Tabla 72. Análisis ANOVA para *P. sp* $HgCl_2$ -18h-GST

ANOVA: T18CCd, T18[-]Cd, T18[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	0.5007	0.2503	3.19	0.070
ERROR	15	1.1763	0.0784		
TOTAL	17	1.6770			

Tabla 73. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *P. sp* $HgCl_2$ -18h-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T18CCd	6	3.4832	B
T18[-]Cd	6	3.8905	A
T18[+]Cd	6	3.6594	AB

Tabla 74. Análisis ANOVA para *P. sp* $HgCl_2$ -18h-ERO's

ANOVA: T18CCd, T18[-]Cd, T18[+]Cd					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	2	285525	142763	27.72	0.000
ERROR	33	169957	5150		
TOTAL	35	455482			

Tabla 75. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *P. sp* $HgCl_2$ -18h-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
T18CCd	12	328.34	B
T18[-]Cd	12	329.93	B
T18[+]Cd	12	518.05	A

12.1.5 *Rattus Norvegicus* – $CdCl_2$ Tabla 76. Análisis ANOVA para *R. Norvegicus* $CdCl_2$ -Cerebro-GST

ANOVA: Ctrl-Inic, Cd-1 Sem, Cd-2 Sem, Cd-3 Sem, Cd-4 Sem, Ctrl-4Sem					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	5	125.38	25.08	13.68	0.000
ERROR	29	53.16	1.83		
TOTAL	34	178.55			

Tabla 77. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *R. Norvegicus* CdCl₂-Cerebro-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Ctrl-Inicio	6	9.848	A
Cd-1Sem	6	5.354	B
Cd-2Sem	6	5.799	B
Cd-3Sem	6	5.296	B
Cd-4Sem	6	6.269	B
Ctrl-4Sem	6	9.384	A

Tabla 78. Análisis ANOVA para *R. Norvegicus* CdCl₂-Cerebro-ERO's

ANOVA: Ctrl-Inic, Cd-1 Sem, Cd-2 Sem, Cd-3 Sem, Cd-4 Sem, Ctrl-4Sem					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	5	39165	7833	12.84	0.000
ERROR	66	40264	610		
TOTAL	71	79429			

Tabla 79. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *R. Norvegicus* CdCl₂-Cerebro-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Ctrl-Inicio	12	107.72	A
Cd-1Sem	12	95.82	AB
Cd-2Sem	12	80.82	BC
Cd-3Sem	12	66.85	C
Cd-4Sem	12	101.98	AB
Ctrl-4Sem	12	141.47	A

Tabla 80. Análisis ANOVA para *R. Norvegicus* CdCl₂-Hígado-GST

ANOVA: Ctrl-Inic, Cd-1 Sem, Cd-2 Sem, Cd-3 Sem, Cd-4 Sem, Ctrl-4Sem					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	5	1002.6	200.5	10.94	0.000
ERROR	30	550.1	18.3		
TOTAL	35	1552.6			

Tabla 81. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *R. Norvegicus* CdCl₂-Hígado-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Ctrl-Inicio	6	17.343	B
Cd-1Sem	6	15.822	B
Cd-2Sem	6	14.839	B
Cd-3Sem	6	26.775	A
Cd-4Sem	6	28.163	A
Ctrl-4Sem	6	18.103	B

Tabla 82. Análisis ANOVA para *R. Norvegicus* CdCl₂-Hígado-ERO's

ANOVA: Ctrl-Inic, Cd-1 Sem, Cd-2 Sem, Cd-3 Sem, Cd-4 Sem, Ctrl-4Sem					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	5	123771	24754	29.32	0.000
ERROR	66	55714	844		
TOTAL	71	179485			

Tabla 83. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *R. Norvegicus* CdCl₂-Hígado-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Ctrl-Inicio	12	138.36	A
Cd-1Sem	12	60.47	B
Cd-2Sem	12	63.18	B
Cd-3Sem	12	75.36	B
Cd-4Sem	12	65.09	B
Ctrl-4Sem	12	165.35	A

Tabla 84. Análisis ANOVA para *R. Norvegicus* CdCl₂-Riñón-GST

ANOVA: Ctrl-Inic, Cd-1 Sem, Cd-2 Sem, Cd-3 Sem, Cd-4 Sem, Ctrl-4Sem					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	5	18.89	3.78	2.07	0.096
ERROR	30	54.66	1.82		
TOTAL	35	73.55			

Tabla 85. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *R. Norvegicus* CdCl₂-Riñón-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Ctrl-Inicio	6	7.699	A
Cd-1Sem	6	6.751	A
Cd-2Sem	6	7.104	A
Cd-3Sem	6	6.754	A
Cd-4Sem	6	8.177	A
Ctrl-4Sem	6	8.539	A

Tabla 86. Análisis ANOVA para *R. Norvegicus* CdCl₂-Riñón-ERO's

ANOVA: Ctrl-Inic, Cd-1 Sem, Cd-2 Sem, Cd-3 Sem, Cd-4 Sem, Ctrl-4Sem					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	5	106865	21373	62.85	0.000
ERROR	66	22444	340		
TOTAL	71	129309			

Tabla 87. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *R. Norvegicus* CdCl₂-Riñón-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Ctrl-Inicio	12	121.46	B
Cd-1Sem	12	72.09	D
Cd-2Sem	12	96.88	C
Cd-3Sem	12	47.60	E
Cd-4Sem	12	69.69	D
Ctrl-4Sem	12	164.21	A

Tabla 88. Análisis ANOVA para *R. Norvegicus* CdCl₂-Orina-GST

ANOVA: Ctrl-Inic, Cd-1 Sem, Cd-2 Sem, Cd-3 Sem, Cd-4 Sem, Ctrl-4Sem					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	5	0.03472	0.00694	1.26	0.306
ERROR	30	0.16520	0.00551		
TOTAL	35	0.19992			

Tabla 89. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *R. Norvegicus* CdCl₂-Orina-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Ctrl-Inicio	6	0.30938	A
Cd-1Sem	6	0.31609	A
Cd-2Sem	6	0.36358	A
Cd-3Sem	6	0.28368	A
Cd-4Sem	6	0.3722	A
Ctrl-4Sem	6	0.31713	A

12.1.6 *Rattus Norvegicus* – HgCl₂

Tabla 90. Análisis ANOVA para *R. Norvegicus* HgCl₂-Cerebro-GST

ANOVA: Ctrl-Inic, Hg-1 Sem, Hg-2 Sem, Hg-3 Sem, Hg-4 Sem, Ctrl-4Sem					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	5	48.73	9.75	2.40	0.062
ERROR	29	117.87	4.06		
TOTAL	34	166.60			

Tabla 91. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *R. Norvegicus* HgCl₂-Cerebro-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Ctrl-Inicio	6	9.848	A
Hg-1Sem	6	7.810	A
Hg-2Sem	6	9.708	A
Hg-3Sem	6	10.507	A
Hg-4Sem	6	9.460	A
Ctrl-4Sem	6	9.384	A

Tabla 92. Análisis ANOVA para *R. Norvegicus* HgCl₂-Cerebro-ERO's

ANOVA: Ctrl-Inic, Hg-1 Sem, Hg-2 Sem, Hg-3 Sem, Hg-4 Sem, Ctrl-4Sem					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	5	132291	26458	48.49	0.000
ERROR	66	36010	546		
TOTAL	71	168302			

Tabla 93. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *R. Norvegicus* HgCl₂-Cerebro-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Ctrl-Inicio	12	107.72	AB
Hg-1Sem	12	87.77	B
Hg-2Sem	12	29.83	C
Hg-3Sem	12	31.39	C
Hg-4Sem	12	122.21	A
Ctrl-4Sem	12	141.47	A

Tabla 94. Análisis ANOVA para *R. Norvegicus* HgCl₂-Hígado-GST

ANOVA: Ctrl-Inic, Hg-1 Sem, Hg-2 Sem, Hg-3 Sem, Hg-4 Sem, Ctrl-4Sem					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	5	1675.6	335.1	6.97	0.000
ERROR	30	1442.0	48.1		
TOTAL	35	3117.6			

Tabla 95. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *R. Norvegicus* HgCl₂-Hígado-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Ctrl-Inicio	6	17.343	B
Hg-1Sem	6	17.863	AB*
Hg-2Sem	6	31.121	A
Hg-3Sem	6	32.178	A
Hg-4Sem	6	30.852	A
Ctrl-4Sem	6	18.103	B

*Nota: Debido a la gran desviación estándar, el grupo Hg-1Sem se dividió en 2 subgrupos

Tabla 96. Análisis ANOVA para *R. Norvegicus* HgCl₂-Hígado-ERO's

ANOVA: Ctrl-Inic, Hg-1 Sem, Hg-2 Sem, Hg-3 Sem, Hg-4 Sem, Ctrl-4Sem					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	5	216929	43386	84.44	0.000
ERROR	66	33913	514		
TOTAL	71	250842			

Tabla 97. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *R. Norvegicus* HgCl₂-Hígado-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Ctrl-Inicio	12	140.03	A
Hg-1Sem	12	37.07	B
Hg-2Sem	12	35.25	B
Hg-3Sem	12	33.49	B
Hg-4Sem	12	25.42	B
Ctrl-4Sem	12	157.02	A

Tabla 98. Análisis ANOVA para *R. Norvegicus* HgCl₂-Riñón-GST

ANOVA: Ctrl-Inic, Hg-1 Sem, Hg-2 Sem, Hg-3 Sem, Hg-4 Sem, Ctrl-4Sem					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	5	1128.27	225.65	53.35	0.000
ERROR	29	122.68	4.23		
TOTAL	34	1250.94			

Tabla 99. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *R. Norvegicus* HgCl₂-Riñón-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Ctrl-Inicio	6	7.699	B
Hg-1Sem	6	6.211	B
Hg-2Sem	6	8.305	B
Hg-3Sem	6	19.681	A
Hg-4Sem	6	19.919	A
Ctrl-4Sem	6	8.539	B

Tabla 100. Análisis ANOVA para *R. Norvegicus* HgCl₂-Riñón-ERO'S

ANOVA: Ctrl-Inic, Hg-1 Sem, Hg-2 Sem, Hg-3 Sem, Hg-4 Sem, Ctrl-4Sem					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	5	177463	35493	73.42	0.000
ERROR	66	31907	483		
TOTAL	71	209370			

Tabla 101. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *R. Norvegicus* HgCl₂-Riñón-ERO's

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Ctrl-Inicio	12	121.46	B
Hg-1Sem	12	84.59	BD*
Hg-2Sem	12	35.23	D
Hg-3Sem	12	37.68	D
Hg-4Sem	12	33.32	D
Ctrl-4Sem	12	164.20	A

**Nota: Debido a la gran desviación estándar, el grupo Hg-1Sem se dividió en 2 subgrupos*

Tabla 102. Análisis ANOVA para *R. Norvegicus* HgCl₂-Orina-GST

ANOVA: Ctrl-Inic, Hg-1 Sem, Hg-2 Sem, Hg-3 Sem, Hg-4 Sem, Ctrl-4Sem					
FUENTE	DF	SS	MS	F	P
FACTOR	5	177463	35493	73.42	0.000
ERROR	66	31907	483		
TOTAL	71	209370			

Tabla 103. Prueba de comparación conclusiva por el método de Tukey para *R. Norvegicus* HgCl₂-Orina-GST

AGRUPACIÓN INFORMACIÓN - MÉTODO DE TUKEY: CONFIANZA DE 95%			
	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Ctrl-Inicio	6	0.228	C
Hg-1Sem	6	1.621	C*
Hg-2Sem	6	4.187	B
Hg-3Sem	6	6.141	A
Hg-4Sem	6	6.477	A
Ctrl-4Sem	6	0.317	C

**Nota: Debido a la gran desviación estándar, el grupo Hg-1Sem se dividió en 2 subgrupos*

12.2 TRABAJOS DERIVADOS DEL PROYECTO DE TESIS

12.2.1 Participación en el XXVII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica (Ponente y Memorias)



12.2.2 Participación en el V Encuentro Regional de Investigación Multidisciplinaria (Ponente y Memorias)



Tuxtepec, Oaxaca, 07 de noviembre del 2019

Buen día

Brandon A. Pulido Hernández
Universidad del Papaloapan

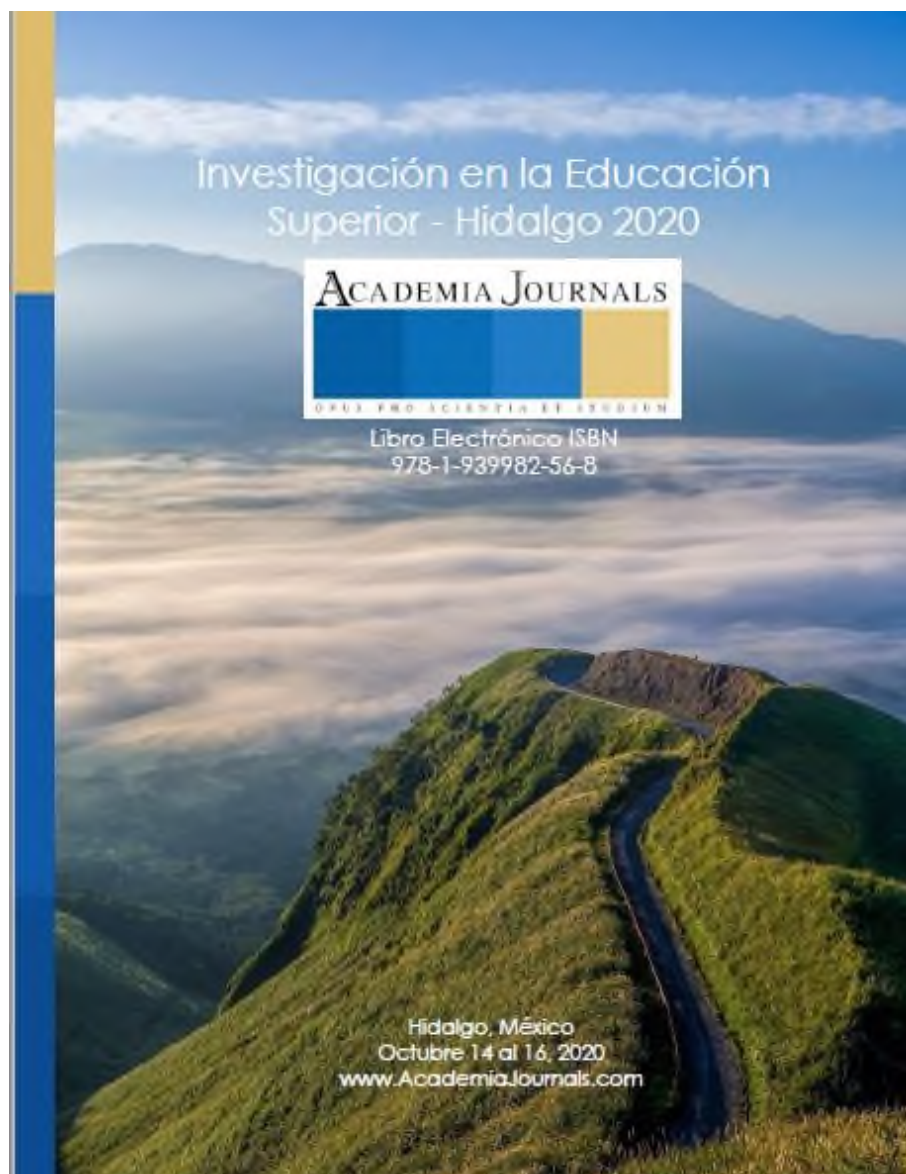
Por este medio reciba un saludo cordial y sirva la presente para informarle que una vez realizado el proceso de arbitraje correspondiente, el comité organizador del 5to Encuentro Regional de Investigación Multidisciplinaria, ha determinado aceptar para el desarrollo de las ponencias su trabajo titulado: Glutación S-Transferasa. Una proteína con implicación evolutiva.

Agradecemos su participación y lo invitamos a revisar las observaciones que el equipo dictaminador realizó, con la intención de poder continuar en el siguiente proceso de selección y edición del libro del encuentro.

Atentamente

ME. Flor Garza Vargas
Representante del CA Estudios Multidisciplinarios

12.2.3 Participación en el Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Hidalgo 2020 (Ponente, Memorias & Capítulo de Libro)



Investigación en la Educación
Superior - Hidalgo 2020

© Academia Journals 2020

Hidalgo, México
14 al 16 de octubre 2020

	Título	Autores	Primer Autor	Página
H140	Glutación S-Transferasa, metales pesados y especies adaptadas en la región del Papaloapan	Lic. Brandon Alberto Pulido Hernández Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno	Pulido Hernández	1620
H377	Caracterización de la mezcla de marketing turístico en los atractivos recreacionales	Héctor Miguel Pumarejo Mindiola Aleydis del Carmen Julio Peterson Leonardo Javier Pumarejo Julio	Pumarejo Mindiola	1626
H309	Simulación en CFD de motor cohete a diferentes rangos de empuje para un lanzador reutilizable	Ing.Fernando Antonio Quintero Zapata Dr.Julio Valle Hernandez Dr.Jose Manuel Gallardo Villarreal Dr.Jorge Guillermo Alonso Alfaro	Quintero Zapata	1639

Memorias del Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Hidalgo 2020



Elibro online con ISSN
1946-5351, Vol. 12, No. 7, 2020

Memorias del Congreso Internacional
de Investigación Academia Journals
Hidalgo 2020

© Academia Journals 2020

Hidalgo, México
14 al 16 de octubre 2020

	Título	Autores	Primer Autor	Página
H140	Glutación S-Transferasa, metales pesados y especies adaptadas en la región del Papaloapan	Lic. Brandon Alberto Pulido Hernández Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno	Pulido Hernández	1620
H377	Caracterización de la mezcla de marketing turístico en los atractivos recreacionales	Héctor Miguel Pumarejo Mindiola Aleydis del Carmen Julio Peterson Leonardo Javier Pumarejo Julio	Pumarejo Mindiola	1626
H309	Simulación en CFD de motor cohete a diferentes rangos de empuje para un lanzador reutilizable	Ing.Fernando Antonio Quintero Zapata Dr.Julio Valle Hernandez Dr.Jose Manuel Gallardo Villarreal Dr.Jorge Guillermo Alonso Alfaro	Quintero Zapata	1639