



Universidad del Papaloapan

campus Tuxtepec

Susceptibilidad a la intoxicación con
plomo en roedores

TESIS

Que para obtener el grado de:
Licenciado en Ciencias Químicas

Presenta

Diego Feliciano Cruz

Director

Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno



Universidad del Papaloapan

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax. a 3 de septiembre de 2019
Asunto: Autorización de impresión de tesis

M. E. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
P R E S E N T E

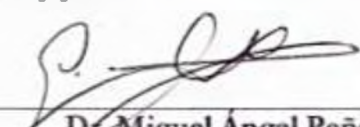
Sirva la presente para informarle que los abajo firmantes, miembros de la comisión revisora de la tesis presentada por el joven Diego Feliciano Cruz (Matrícula 13060075) pasante de la Licenciatura en Ciencias Químicas, manifestamos que después de examinar su trabajo de tesis autorizamos la impresión del manuscrito que lleva por título "Susceptibilidad a la Intoxicación por Plomo en Roedores" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante. El trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno.

Sin otro asunto en particular le agradecemos la atención a la presente.

A t e n t a m e n t e
terra uberrima, mens aperta
• *Bon Lo-tama, chi ji jii*



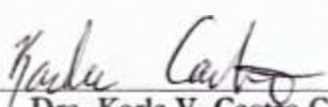
Dr. Enrique Villalobos Amador
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan



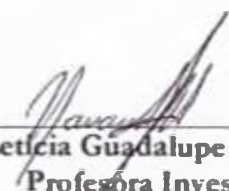
Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan



Dra. Alma Xóchitl Ávila Alejandre
Profesora Investigadora
Universidad del Papaloapan



Dra. Karla V. Castro Cerritos
Profesora-Investigadora
Universidad del Papaloapan



Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno
Profesora Investigadora
Directora de Tesis

C.c.p. M. en C. Héctor López Arjona. Vice-Rector Académico de la UNPA, para su conocimiento.
C.c.p. Dra. Roxana Martínez Pascual, Jefa de Carrera de la Licenciatura en Ciencias Químicas.

“Generalmente se define lo fantástico como una violación de las leyes naturales, como la aparición de lo imposible. En nuestra opinión, no es nada de esto. Lo fantástico es una manifestación de las leyes naturales, un efecto del contacto con la realidad cuando ésta se percibe directamente y no filtrado por el sueño intelectual, por los hábitos, por los prejuicios, por los conformismos.

La ciencia moderna nos enseña que, detrás de lo simple y visible, está lo invisible y complicado. Una mesa, una silla, el cielo estrellado, son en realidad radicalmente diferentes de la idea que nos formamos de ellos: sistemas en rotación, energías en suspenso, etc.

En este sentido decía Valéry que en el conocimiento moderno «lo maravilloso y lo positivo han contraído una asombrosa alianza». Nosotros hemos percibido claramente que este contrato entre lo maravilloso y lo positivo no se ciñe únicamente al dominio de las ciencias físicas y matemáticas. Lo que es verdad para estas ciencias es, sin duda, también verdad para los otros aspectos de la existencia: la antropología, por ejemplo, o la historia contemporánea, o la psicología individual, o la sociología. Lo que juega en las ciencias físicas, juega probablemente igual en las ciencias humanas. Sólo que cuesta mucho percibirlo...”

Louis Pauwels y Jacques Bergier
El Retorno de los Brujos

AGRADECIMIENTOS

Al destino y a los seres del más allá que me dieron las fuerzas necesarias para culminar este trabajo de investigación.

A mi honorable jurado y revisores de tesis, Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos, Dra. Alma Xochil Ávila Alejandro, Dr. Enrique Villalobos Amador y el Dr. Miguel Ángel Peña Rico por darme las observaciones y recomendaciones para culminar el presente trabajo de investigación. De todo corazón muchas gracias. A la Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno, por la oportunidad de trabajar con usted, gracias por los consejos y observaciones dadas durante mi estancia, por la gran ayuda para culminar la redacción de la presente tesis.

A mi jefe de carrera, Dra. Roxana Martínez Pascual, por darme una luz de esperanza y encaminarme a la terminación del siguiente escrito, al Vice-rector académico Héctor López Arjona por brindarme apoyo y consejos en la culminación de este trabajo de investigación. A la coordinadora de la beca Jóvenes Construyendo el Futuro, Maestra Meyver de los Ángeles Andrade López y a mi tutor de beca, el Dr. José Abad Zabaleta, quienes me proporcionaron este apoyo durante mi estancia en la Unpa y lograr finalizar este trabajo.

A la Q. F. B. Leticia Saldaña Medina, a la maestra en C. Químicas Beatriz Castro Hilario, el Ingeniero Juan Hernández Sánchez por recibirme en sus correspondientes áreas de trabajo y hacerme sonreír en mis momentos de estrés. Al Dr. Aurelio Ramírez Hernández, por sus grandes consejos y por siempre darme los ánimos para seguir adelante.

A mi amiga Paula Arabia Gómez por acompañarme en estos 5 años de carrera y darme muy buenos consejos, confiando en los conocimientos previos; a mis amigos y compañeros de clase que compartieron la última etapa de la carrera, las noches extremas de estudio y las convivencias realizadas, muchas gracias Shardey Mextlisol Cruz Valencia y Luis Felipe Collado. A mi amigo David Cruz Velasco con quien compartí momentos alegres durante mi estancia en la UNPA, además agradezco el apoyo que me brindo en el análisis estadístico realizado. A mi novia Aridaith Parra Reyes, por formar parte de mi vida, por ser mi mano derecha, por abrirme los ojos y guiarme durante la culminación de este proyecto, por tus consejos, por demostrarme que la felicidad no se compra, si no se gana, por todas las alegrías que me has dado, gracias por darme la fuerza que necesitaba, por ayudarme a sonreír, por darme una manita. Gracias de todo corazón amor.

A mis hermanitas Kikiry y Tellis (Aracely y Emeteria) quienes me dieron la fortaleza necesaria para seguir adelante y soportar los golpes que da el destino, a mi mamá por darme la oportunidad de vivir y conocer los caminos que rigen a la vida.

DEDICATORIA

Han pasado 6 años desde que salí de casa, ha sido difícil aventurarse sin estar cerca de familia, aún recuerdo ese día, lloraste, me hice el fuerte pero en el camino me dio miedo, que hasta las lágrimas me salieron; dije que me estaba entrenando cuando me iría de casa, veías mis loqueras, comía poco, sabías que afuera era peligroso, aun así te dije que saldría a estudiar, no sabes cómo me ha ayudado mi entrenamiento, perdóname por todas las actividades que realice fuera de casa, principalmente porque salí varias veces de noche. Estoy muy agradecido contigo, aun con todos los eventos tristes que has pasado, momentos malos que has tenido, me regalaste el tesoro más grande que existe, la educación. Sabes, como una vez te dije, vine a este lugar a estudiar y no a pasearme, hoy lo he logrado, gracias por encaminarme en el camino del bien, estoy muy contento porque yo no defraude, a mí me defraudaron, bueno nos defraudaron a los dos, pero ese no es motivo para dejarse vencer, la vida sigue. Estoy muy feliz porque lo he logrado, aun cuando me dejaste solo, ya no podías ayudarme, pero sé que darías todo por mí, pase momentos difíciles porque creí que no lograría terminar este trabajo, pero cuando existe la esperanza y la fuerza de salir adelante, todo es posible mamá. De todo corazón te agradezco por este gran regalo que me diste, el regalo de tener vida y tener salud para luchar día a día, de darme la oportunidad de estudiar. Muchas gracias.

Para ti madre Fausta Cruz Bautista.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA.....	VI
ÍNDICE GENERAL.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	X
ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.I Contaminación con metales pesados.....	2
A) Contaminación con plomo.	2
B) Intoxicación con plomo en México.	3
I.II Efectos del plomo en la salud.	5
A) Sistema nervioso	5
B) Sistema urinario.....	6
C) Sistema hematopoyético	6
I.III La susceptibilidad individual en los procesos de adaptación.	8
I.IV Factores biológicos implicados en la susceptibilidad individual	8
I.V Efecto de la presión selectiva sobre una población	9
I.VI Biomarcadores de susceptibilidad.	11
I.VII Marcadores de daño oxidativo.....	13
I.VIII Papel de la enzima Glutación S-transferasa en la susceptibilidad hacia agentes tóxicos.	13
II. ANTECEDENTES	15
II.I Antecedentes directos del grupo de investigación.	21
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
IV. JUSTIFICACIÓN.....	25
V. HIPÓTESIS.....	27
VI. OBJETIVOS.....	29

VI.I Objetivo general.....	30
VI.II Objetivos particulares	30
VII. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	31
VII.I Grupos experimentales.....	32
VII.II Ensayos bioquímicos.....	33
A) Examen general de orina.....	33
B) Medición de proteínas en suero, orina y homogeneizado de riñón, cerebro e hígado por método de Lowry modificado (Navarro-Moreno, 1999).....	34
C) Cuantificación de las especies reactivas de oxígeno en muestras de homogeneizado de riñón, hígado y cerebro.	35
D) Medición de la actividad de la Glutación S-transferasa (GST) en muestras de homogeneizado de riñón, hígado, cerebro, suero y orina.	36
E) Medición de la actividad de la enzima Catalasa.	37
F) Análisis estadístico.....	38
VIII. RESULTADOS.....	39
A) Grupos expuestos a acetato de plomo por 4 meses y exposición posterior a acetato de plomo por vía intraperitoneal.....	40
B) Grupos expuestos a acetato de plomo por 4 meses y posterior exposición a acetato de plomo (5000 ppm) y cloruro de mercurio (2.5 mg/kg) durante 1 mes por vía oral.....	48
C) Grupo expuesto a acetato de plomo por 4 meses y posterior exposición a cloruro de mercurio por vías oral e intraperitoneal.....	53
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	61
X. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVA.....	73
XI. REFERENCIAS	75
XII. ANEXOS.....	85
Anexo 1. Comparación de los controles experimentales.	86
Anexo 2. Valores e interpretación del examen general de orina.....	88
Anexo 3. Curva de calibración usada para la determinación de proteínas en el ensayo de Lowry.....	88
Anexo 4. Constancias de participación realizadas con el trabajo de investigación: Susceptibilidad hacia la intoxicación con plomo.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitios de inhibición de los iones plomo y mercurio en la biosíntesis del grupo Hemo (Tomado y modificado de Layer et al., 2010; Rose et al., 2008).	7
Figura 2. Diagrama representativo de la variabilidad en función de los niveles de organización biológica (Tomado y modificado de Zeise, 2013).	9
Figura 3. Susceptibilidad y factores que la afectan (Tomado y modificado de Barrett, 1997).	11
Figura 4. Biomarcadores de susceptibilidad empleado en la evaluación de riesgos (Tomado y modificado de Arango, 2012).	12
Figura 5. Reacción entre la proteína y los reactivos (Tomado de www3.uah.es).	35
Figura 6. Esquema de la reacción entre malondialdehído y ácido tiobarbitúrico (Elaboración propia).	35
Figura 7. Especies reactivas de oxígeno en grupo de exposición inicial a acetato de plomo (4m Pb) y grupo tratado con acetato de plomo vía ip (4m Pb + IP Pb) (n=6).	45
Figura 8. Actividad de la enzima GST en órganos cerebro, hígado y riñón (n=6).	46
Figura 9. Especies reactivas de oxígeno en órganos blanco con tratamiento oral (n=6).	51
Figura 10. Actividad de la GST en cerebro, hígado y riñón (n=6).	52
Figura 11. Determinación de ERO's en cerebro, hígado y riñón (n=4 a 6).	57
Figura 12. Actividad de GST en cerebro, hígado y riñón.	58
Figura 13. Curva de calibración obtenido en un espectrofotómetro UV-vis Perkin Elmer.	89
Figura 14. Participación en el 3to Encuentro Regional de Investigación Multidisciplinaria, presentación de cartel, en la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec (2017).	90
Figura 15. Participación en el 4to Encuentro Regional de Investigación Multidisciplinaria, presentación de cartel, en la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec (2018).	91
Figura 16. Participación en la 5ª reunión de materiales, nanotecnología y ciencias aplicadas, en la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec (2017).	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pesos corporales de los animales control y expuestos a acetato de plomo (n= 6).....	41
Tabla 2. Pesos de los órganos de los animales control y expuestos a acetato de plomo (n= 6).....	42
Tabla 3. Examen general de orina de los grupos control y expuestos a acetato de plomo (n= 6).....	43
Tabla 4. Actividad de GST en suero y orina de los grupos control y expuestos a acetato de plomo (n= 6).....	47
Tabla 5. Actividad de la enzima Catalasa en los grupos exposición inicial y tratado posteriormente a acetato de plomo vía ip (n= 6).	47
Tabla 6. Pesos corporales de los grupos expuestos posteriormente a acetato de plomo o cloruro de mercurio vía oral (n= 6).	48
Tabla 7. Pesos de los órganos de los grupos expuestos a acetato de plomo y cloruro de mercurio vía oral (n= 6).....	49
Tabla 8. Examen general de orina de los grupos exposición inicial a acetato de plomo y tratamiento posterior a cloruro de mercurio vía oral (n= 6).....	50
Tabla 9. Actividad de GST en grupo control y expuestos a metales (n= 6).	53
Tabla 10. Actividad de la enzima Catalasa en grupos control y expuestos a metales (n= 6)..	53
Tabla 11. Pesos corporales de los diferentes grupos expuestos a metales (n= 4 a 6).	54
Tabla 12. Pesos órganos de diferentes grupos expuestos a metales (n= 4 a 6).....	55
Tabla 13. Examen general de orina de los grupos expuestos a metales (n= 4 a 6).....	56
Tabla 14. Actividad de GST en suero y orina de los grupos expuestos a metales (n= 4 a 6).....	59
Tabla 15. Actividad de Catalasa de los grupos expuestos a metales (n= 4 a 6).....	60
Tabla 16. Niveles normales de analitos en el examen general de orina y su implicación clínica cuando aumentan o disminuyen.	88
Tabla 17. Absorbancia y concentración utilizados para la obtención de la curva de calibración.	89

ABREVIATURAS

δ-ALA: Ácido delta-aminolevulínico.

ALAD: Ácido delta-aminolevulínico deshidratasa.

ALAS: Ácido aminolevulínico sintetasa.

BHT: Butirilhidroxitolueno.

BLL: Nivel de plomo en sangre.

BSA: Albúmina sérica bovina.

BUN: Nitrógeno ureico en sangre.

CYT: Citocromo P450.

DMSA. Ácido dimercapto succínico.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DNCB: 2,4-dinitroclorobenceno.

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético.

EROS: Especies reactivas de oxígeno.

ERNS: Especies reactivas de nitrógeno.

FSH: Hormona folículo estimulante.

GDNB: Glutati3n-dinitrobenceno.

GPT: Transaminasa glutámico-pirúvica.

GSH: Glutati3n Reducido.

GSSG: Glutati3n oxidado.

GST: Glutati3n S-Transferasa.

GSTM1: Glutati3n S-Transferasa Mu 1.

HMM: Mezcla de metales pesados.

ip: Intraperitoneal.

LH: Hormona luteinizante.

MDA: Malondialdehído.

MDR: Proteína 1 asociada a Resistencia a Múltiples Fármacos.

NAG: N-acetilglutaminasa.

PBS: Buffer fosfato salino.

PON: Paraoxonasa.

SNP's: Polimorfismos de un solo nucleótido.

TBA: Ácido tiobarbitúrico.

TCA: Ácido tricloroacético.

VDR: Receptor de vitamina D.

ZPP: Protoporfirina de zinc.

RESUMEN

La contaminación con metales pesados como el plomo es uno de los problemas de salud pública que hoy en día la población mundial enfrenta. En la actualidad la interacción entre los seres vivos y los contaminantes se ha vuelto constante y casi imperceptible. Como consecuencia de lo anterior se ha observado que algunos organismos pueden desarrollar mecanismos de protección con la finalidad de mantener la supervivencia de su especie. La capacidad de adaptación es una de las principales características de los seres vivos, pero no todos tienen las mismas oportunidades de desarrollarlo, ya que cada organismo responde ante el medio de forma diferente, mientras unos se adaptan, otros sucumben, ya que estos organismos son más susceptibles al medio. En este trabajo se utilizaron ratas de la cepa Wistar, las cuales recibieron un tratamiento especial que consistió en exposición oral (1000 ppm $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) desde el desarrollo embrionario, hasta llegar a una edad de 4 meses. La finalidad de este tratamiento consistió en ayudar a los roedores a adaptarse, para realizar ensayos posteriores de intoxicación con mayor concentración del mismo metal o la utilización de un metal diferente. Las vías de administración fueron oral e intraperitoneal y las sales inorgánicas utilizadas fueron acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) y cloruro de mercurio (HgCl_2). Los resultados demostraron, por un lado, que las ratas preexpuestas a ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) por cuatro meses se comportaron de forma similar a las ratas control y, por otro, que fueron capaces de tolerar concentraciones subsecuentes y mayores tanto de la sal de plomo como la de mercurio. En este último caso, la sobrevivencia de los animales fue del 50%, lo que resulta superior a los resultados que se obtienen cuando los animales son intoxicados con HgCl_2 sin una preexposición previa. Ello indica que la intoxicación llevada a cabo a baja dosis de plomo desde el momento de la concepción, pudo desencadenar eventos bioquímicos que ayudaron a los animales a tolerar concentraciones elevadas de dos metales que constituyen parte de un grave problema de salud no solo en México, sino a nivel mundial.

I. INTRODUCCIÓN

I.I Contaminación con metales pesados.

Los metales pesados son elementos que se definen como aquellos que poseen una densidad mayor a la del agua. En general, estos elementos no son esenciales para las células y pueden ejercer efectos adversos. A cualquier concentración, pueden inhibir diversas funciones bioquímicas y, como consecuencia, fisiológicas en los organismos vivos. Aunque se ha reconocido, a nivel mundial, que los metales pesados pueden ejercer efectos adversos para la salud, ya que pueden permanecer por periodos largos de tiempo en el hospedero, la falta de información de los investigadores y las respectivas autoridades hacia la población en general ha ocasionado que la exposición a éstos continúe y aumente en muchas partes del planeta (Jaishankar et al., 2014).

Los efectos tóxicos de los metales resultan perjudiciales para el cuerpo humano, ya que pueden alterar su funcionamiento al interferir con diferentes procesos metabólicos. La toxicidad del metal depende de la dosis, la vía de exposición y la duración de la misma. Lo anterior puede conducir a diversos trastornos inducidos por la interacción directa del metal con las macromoléculas o por el estrés oxidativo originado por la formación de radicales libres (Mathew et al., 2014).

A) Contaminación con plomo.

El plomo constituye uno de los metales más antiguos descubiertos y utilizado por la raza humana. Propiedades del metal como la alta maleabilidad, la ductilidad, el bajo punto de fusión y la resistencia a la corrosión, han dado lugar a su uso generalizado en diferentes industrias como la automotriz, la de las pinturas, la cerámica, la de los plásticos, etc. Esto a su vez ha conducido a un aumento múltiple en la aparición de plomo libre en los sistemas biológicos y el medio ambiente (Kalia & Flora, 2005).

La exposición humana al plomo se produce a través de diversas fuentes como la gasolina, los procesos industriales como la fundición del metal y la combustión del carbón, las pinturas, las tuberías o la soldadura en sistemas de suministro de agua y al reciclaje de baterías, rejillas y cojinetes. Se sabe que el plomo interfiere con una serie de funciones corporales y afecta principalmente al sistema nervioso central, hematopoyético, hepático y renal, produciendo trastornos graves (Patra et al., 2011).

Se ha reportado que, al menos, existen dos tipos de toxicidad. En primer lugar, se encuentra la toxicidad aguda, la cual se encuentra relacionada con la exposición ocupacional y es bastante frecuente. En segundo lugar, la toxicidad crónica es mucho más común y se produce a niveles de plomo en sangre de aproximadamente 40-60 µg/dL. Este tipo de intoxicación puede ser mucho más

grave si no se trata en el tiempo y se caracteriza por vómitos persistentes, encefalopatía, letargo, delirio, convulsiones y coma (Pearce, 2007). Algunos de los síntomas anteriores son originados por que el metal puede ser absorbido y acumulado en varios tipos celulares como los osteocitos, los hepatocitos, los adipocitos, las células epiteliales del túbulo contorneado proximal de las nefronas y varios tipos de células cerebrales. El plomo acumulado es tóxico en la mayoría de sus formas químicas, ya sea inhalado o ingerido en agua. Sin embargo, debido a su lenta tasa de eliminación, los niveles nocivos de plomo se pueden acumular en las células mencionadas anteriormente y, de esta forma, en los tejidos de los cuales forman parte después de una exposición prolongada a bajas concentraciones de plomo, las cuales se relacionan con niveles de metal en sangre menores a 10 µg/dL (Ercal et al., 2001). La exposición al plomo se considera perjudicial y se asocia con anomalías de la conducta, déficit auditivo, debilidad neuromuscular y deterioro de las funciones cognitivas en humanos y animales de experimentación (Flora et al., 2012).

B) Intoxicación con plomo en México.

México está catalogado como el quinto mayor productor de plomo a nivel mundial con una producción de 220,000 toneladas métricas (2013) y una reserva de más de 5.6 millones de toneladas. Tres compañías mineras procesan mineral de plomo en 13 minas ubicadas en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Guerrero, Hidalgo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora y Zacatecas.

Uno de los principales problemas de contaminación con plomo fue su uso en la gasolina. Lo anterior se debió a que las gasolinas formadas con alcanos lineales y cicloalcanos tienen pobres cualidades como combustibles, explosionando en el motor en lugar de quemarse progresivamente. Contrariamente a éstos, los hidrocarburos ramificados tienen excelentes propiedades como combustibles, quemándose progresivamente y obteniendo una mayor potencia por unidad de masa quemada. La adición de tetrametil y/o tetraetilplomo evita la explosión y hace aumentar el índice de octano. El problema es la elevada toxicidad del plomo atmosférico por lo que fue retirado de varios países (Tomado de globedia.com). En el año 1990, se empezó a eliminar el plomo de la gasolina y empezó la utilización de combustibles libres de plomo. En 1997, se eliminó por completo el plomo de la gasolina, sin embargo, este hecho no ayudó a que disminuyera la interacción de los compuestos a base de plomo con seres humanos (Caravanos et al., 2014).

La exposición con plomo se ha producido también por la alfarería vidriada, actividad que fue introducida a las costumbres de los alfareros mexicanos por los españoles en 1519, pues hasta

entonces tapaban el poro de la cerámica a base de bruñido con piedras. Desde 1994, la FONART (Fondo Nacional para el Fomento de las Artesanías) ha dado especial atención al sector alfarero, mediante el Programa Nacional para la Adopción de Esmalte Libre de Plomo, buscando erradicar los trastornos en la salud de los artesanos. Este organismo midió el nivel de plomo en sangre de una muestra representativa de artesanos alfareros con resultados que confirman que los niveles de plomo en sangre de la población alfarera rebasan los señalados como permisibles en la norma oficial mexicana NOM-199-SSA1-2000 vigente para población no expuesta desde el 2002 (Pérez y Sánchez, 2010).

La comunidad alfarera está expuesta al momento de esmaltar, a la contaminación ambiental cuando el esmalte se esparce en sus talleres y casas; la exposición a plomo se produce también cuando la alfarería vidriada con greta (óxido de plomo), se utiliza para almacenar, cocinar o servir alimentos ácidos o bebidas calientes; es decir, la exposición al plomo depende del uso, frecuencia y tiempo utilitario de estos objetos. En el país, se encontró que más del 50 % de los objetos probados tuvieron niveles superiores a los establecidos por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos para lixiviación de plomo (Noyola, 2017).

En 1991 empezó el interés de las autoridades mexicanas, por la intoxicación con plomo, ya que en ese tiempo una niña de siete años, de origen estadounidense, bebió una limonada almacenada en un vitrolero (olla de barro vidriado) elaborada con greta, cuyo componente mayor es el plomo. El origen de la intoxicación se atribuyó al uso de alfarería vidriada, este hecho, sumando al trabajo de distintos grupos de investigación en México, posicionó al uso del plomo en el barro como un tema prioritario de interés y estudio, sin embargo, no se ha podido erradicar su venta y uso en la alfarería popular mexicana sobre todo en estados como: Hidalgo, Oaxaca, San Luis Potosí, Morelos y Michoacán, afectando tanto a productores como a consumidores (Tolentino, 2016).

Las pinturas son otro ejemplo de contaminantes a base de plomo. Dentro del país opera dos grandes concesionarias, la primera es el Grupo Comex, cuarto mayor productor de pinturas arquitectónicas en Norte y Centro América, y la segunda se encuentra representada por Sherwin Williams, la gran industria de producción de pinturas y recubrimientos. En 2008 un estudio reveló que todas las muestras probadas de pintura de esmalte, contenía concentraciones de plomo de más de 90 ppm (el límite regulatorio en China y Estados Unidos); las pinturas plásticas contenían en promedio 6 ppm (Caravanos et al., 2014).

Varios estudios han documentado el impacto en la salud de adultos y niños en México, debido a la fabricación de alfarería vidriada y han reportado concentraciones superiores a 20 µg/dL de plomo en sangre en familias de alfareros en Tzintzuntzan, Michoacán, y de más de 30 µg/dL en una

comunidad alfarera del estado de Veracruz. El riesgo de intoxicación por Pb^{2+} de los alfareros y sus familias es mayor debido a la exposición ambiental al plomo, a los alimentos cocinados en alfarería vidriada con plomo, la malnutrición, el uso del espacio laboral para la vivienda, las malas prácticas en el manejo del óxido de plomo y al hecho de que el plomo se convierte en una fuente endógena de exposición (Estrada-Sánchez et al., 2016).

La norma oficial mexicana establece como límite máximo permisible una concentración de plomo en sangre de 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$. Sin embargo, algunos estudios han reportado que el nivel de plomo en sangre a concentraciones menores de este valor puede ocasionar daño neuronal en la población infantil (Leal-Escalante et al., 2007). Esta observación indica que los niños son más susceptibles a la intoxicación con plomo que los adultos lo cual, también muestra una relación entre las características de desarrollo y la toxicidad del metal.

I.II Efectos del plomo en la salud.

A) Sistema nervioso

Uno de los órganos blanco de mayor interés en la intoxicación por plomo es el cerebro, ya que los efectos tóxicos del metal pueden provocar daños severos cuando este órgano se encuentra en desarrollo. El plomo puede entrar fácilmente en el tejido neural en desarrollo afectando directamente las neuronas y la sinapsis o, indirectamente, las conexiones neuronales a través de las células gliales. La neurotoxicidad de este elemento puede manifestarse en los niños como una disminución del coeficiente intelectual (IQ), o trastornos del comportamiento, de la memoria o del aprendizaje (Chibowska et al., 2016). Tanto el sistema nervioso central como el sistema nervioso periférico se ven afectados por la exposición al metal. Los efectos sobre el sistema nervioso periférico son más pronunciados en los adultos, mientras que el sistema nervioso central es más prominente en los niños (Brent, 2006; Bellinger, 2004). La encefalopatía es una consecuencia directa de la exposición al plomo y los principales síntomas incluyen molestia, irritabilidad, falta de atención, dolor de cabeza, temblor muscular, pérdida de memoria y alucinaciones. Las manifestaciones más graves ocurren en exposiciones muy altas e incluyen delirio, falta de coordinación, convulsiones, parálisis, coma y ataxia (Flora et al., 2006).

Las afectaciones sufridas por los niños que presentan mayores niveles de plomo pueden verse reflejadas al presentar retraso en el crecimiento; disminución de la inteligencia; de la memoria a corto plazo y la pérdida de la audición. A niveles más altos, el metal puede causar daño cerebral

permanente e incluso la muerte (Cleveland et al., 2008). Dentro de las repercusiones también se ha observado neuropatía periférica, lo cual implica reducción de la actividad motora debido a la pérdida de la vaina de mielina, la que tiene como función el aislamiento de los nervios, afectando seriamente la transducción de los impulsos nerviosos, causando debilidad muscular, fatiga y falta de coordinación muscular (Sanders et al., 2009).

B) Sistema urinario

La exposición tanto a concentraciones altas (> 60 µg/dL) como bajas (10 µg/dL) de plomo pueden ocasionar daño renal (Grant, 2008). Se han reportado dos tipos de anormalidades en el riñón, ocasionadas por exposición al metal: nefropatía aguda y nefropatía crónica. La primera puede clasificarse morfológicamente a través de los cambios degenerativos presentes en el epitelio tubular acompañados por la presencia de cuerpos de inclusión intracelulares, formados por complejos entre proteínas y plomo (Navarro, 2004) y funcionalmente por la alteración de los mecanismos de transporte localizados en las membranas apicales y basales de las células de los túbulos proximales que conforman a las nefronas corticales y medulares. Sin embargo, no es la razón detrás de la aparición de proteínas en la orina, pero podría aumentar una secreción no estándar de aminoácidos, fosfatos y glucosa, conjunto de procesos que se conocen como síndrome de Fanconi, el cual es característico de personas con falla renal asociada a la intoxicación por el metal (Salim, 2015).

Además del estrés oxidativo como mecanismo de toxicidad del plomo en el riñón, estudios experimentales han demostrado que la exposición a plomo induce un aumento de la apoptosis celular no sólo en el hígado, sino también en el riñón (Sujatha et al, 2011). Un estudio demostró que el tratamiento crónico de ratas con acetato de plomo durante un período de 12 semanas aumentó el número de cuerpos apoptóticos en las células tubulares proximales, por lo que se podría pensar que uno de los efectos del metal a nivel celular es su influencia en la expresión génica de las proteínas relacionadas con la apoptosis como las caspasas y algunas cinasas (Finley, 2014; Velaga et al, 2014).

C) Sistema hematopoyético

Se han observado daños en el sistema hematopoyético en animales y en humanos después de la exposición al plomo. Estos daños incluyen la detección de niveles elevados de porfirinas en orina, entre las que se encuentran el ácido deltaaminolevulínico (δ -ALA), coproporfirinas, protoporfirina eritrocitaria y protoporfirina de zinc, como resultado de la inhibición de tres de las enzimas que participan en la biosíntesis del grupo Hemo: ácido δ -aminolevulínico deshidratasa (ALAD),

ferroquelatasa, y δ -ALA sintetasa (ALAS) (ATSDR, 2015). También reduce la vida útil de los eritrocitos circulantes aumentando la fragilidad de las membranas celulares debido al proceso conocido como lipoperoxidación. La combinación de estos dos procesos conduce a la anemia (Cornelis, 2005; Piomelli, 2002).

El efecto del plomo sobre la enzima ALAD es una de las características más estudiadas dentro del fenómeno de la intoxicación con plomo y su inhibición se ha utilizado clínicamente para medir el grado de envenenamiento por el metal. La inhibición de la ALAD da lugar a la acumulación de ácido aminolevulínico, detectable en el plasma y en la orina, incluso a niveles de plomo en sangre inferiores a 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$. Aunque la inhibición de ALAD se observa por primera vez en los niveles de plomo en sangre de 10-20 $\mu\text{g}/\text{dL}$, la biosíntesis de hemo no disminuye hasta que la actividad de ALAD es inhibida en un 80-90%, lo que ocurre a una concentración de plomo en la sangre mucho mayor a 55 $\mu\text{g}/\text{dL}$. (Ahamed et al., 2005). La Figura 1 muestra los pasos secuenciales en la biosíntesis del grupo hemo, la porfirina, los productos intermedios y las enzimas específicas inhibidas por los iones de plomo y mercurio (Layer et al., 2010; Rose et al., 2008).

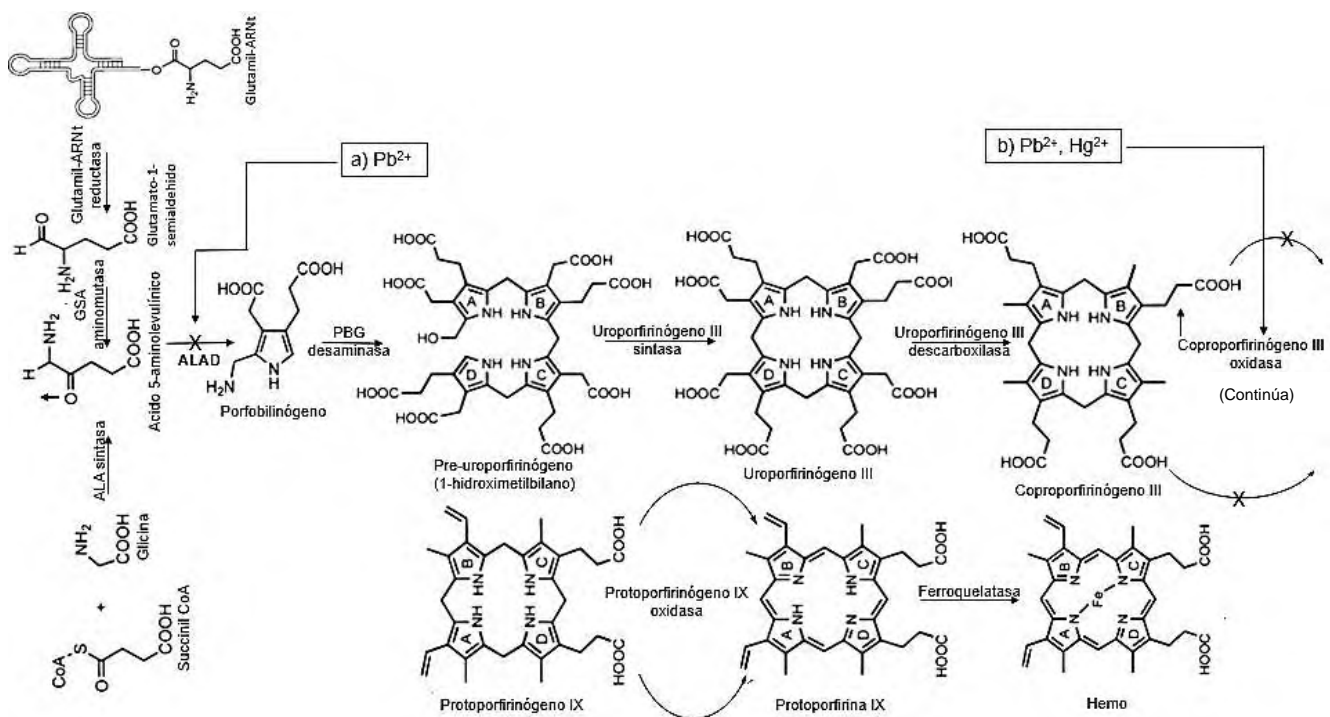


Figura 1. Sitios de inhibición de los iones plomo y mercurio en la biosíntesis del grupo Hemo (Tomado y modificado de Layer et al., 2010; Rose et al., 2008).

La inhibición de la ferroquelatasa da como resultado un aumento de la excreción de coproporfirina en la orina y la acumulación de protoporfirina en los eritrocitos (EP). Además, la inhibición de esta enzima da lugar a la sustitución del hierro por el zinc en el anillo de porfirina con la formación de

protoporfirina de zinc (ZPP). Se incrementa así la concentración de ZPP, que también puede usarse como un indicador para monitorear el nivel de exposición al plomo (Jangid et al, 2012; Patrick, 2006).

I.III La susceptibilidad individual en los procesos de adaptación.

Charles Darwin propuso una serie de teorías en su libro "El origen de las especies", publicado en 1859, en donde explicaba la modificación de órganos en los seres vivos y su transmisión de padres a hijos de forma totalmente distinta. Su teoría, formulada al mismo tiempo, aunque por separado a la de Alfred Russell Wallace, se basa en las siguientes ideas clave.

- Variabilidad: Los individuos no son exactamente iguales, sino que varían y esas variaciones se transmiten de padres a hijos. Esas variaciones se producen al azar, no son debidas al medio, y unas beneficiarán al individuo y otras le perjudicarán.
- Supervivencia: En el medio natural se engendran más individuos de los que pueden sobrevivir.
- Selección natural: Los individuos que mejor partido sacan del medio natural viven más y tienen más descendientes.
- Especiación: La selección natural actúa produciendo distintas razas más favorables a cada entorno, y posteriormente nuevas especies a partir de ellas.

Todos los seres viven en un entorno específico donde hay que buscar comida y cobijo, evitar a los depredadores y tratar de reproducirse. Aquellos individuos que mejor lo hagan estarán más adaptados a las condiciones de vida de ese entorno y lograrán reproducirse más. De esta manera y con el paso de las siguientes generaciones habrá descendientes con mayor capacidad de adaptación a las condiciones cambiantes de su entorno. Como cada entorno es distinto, la variabilidad en los hijos podrá ser distinta, y la selección actuará de forma diferente. Así, lugares y condiciones climáticas distintas propiciarán que los individuos de una misma especie tengan descendientes diferentes, más adaptados a las condiciones locales, indicando que ellos adquirieron diferente susceptibilidad ambiental (Tomado de eScholarium, E-tutoring).

I.IV Factores biológicos implicados en la susceptibilidad individual

La variabilidad individual puede contribuir a explicar por qué algunas personas informan que son muy intolerantes o susceptibles a la presencia de sustancias químicas en su entorno. Existe un rango de susceptibilidad humana a los efectos de exposiciones ambientales que se debe, en parte, a factores endógenos como la genética y la epigenética, la fisiología, la edad, y otras diferencias biológicas (Bijlsma y Cohen, 2016). Comprender la variabilidad individual es fundamental para

entender la susceptibilidad, identificar poblaciones vulnerables, y comprender los mecanismos que ayuden a identificar y desarrollar métodos para intervenir a los más vulnerables. Puede conducir a nuevos tratamientos e intervenciones para los problemas de salud ambiental. Para abordar la susceptibilidad de la población es fundamental abordar la variabilidad individual. Esta puede ser causada por factores externos, como la duración de la exposición a un contaminante o el entorno laboral de una persona.

Los factores biológicos endógenos, como la genética y las enfermedades preexistentes, también son fuentes de variabilidad. En la figura 2 se muestra un diagrama representativo de la variabilidad como función de la organización biológica (Zeise, 2013).



Figura 2. Diagrama representativo de la variabilidad en función de los niveles de organización biológica (Tomado y modificado de Zeise, 2013).

I.V Efecto de la presión selectiva sobre una población

La selección natural es el proceso que limita la tasa reproductora o la eficacia biológica de los seres vivos en relación con características fenotípicas heredables, dando lugar a cambios en las frecuencias de los fenotipos de la población en generaciones futuras. Lo anterior se conoce como evolución. Tiene lugar siempre que existan los factores de variabilidad individual, relación entre variabilidad en eficacia biológica y variabilidad fenotípica, y relación entre esas características fenotípicas y el genotipo del individuo. La selección natural afecta al valor medio y a la varianza del

carácter en la población, dando lugar a los distintos tipos de selección (estabilizadora, direccional y disruptiva). Las presiones selectivas, que se pueden definir como las influencias del ambiente en la eficacia biológica, son las causas de que ocurran procesos de selección natural. La consecuencia inmediata de estas presiones o agentes selectivos sobre los de seres vivos (selección natural) es una mejora en la eficacia biológica media poblacional, a lo largo de generaciones, asociada a la evolución de caracteres que mejoran la adaptación de los organismos al ambiente que los rodea (Otáñez-Durán, 2015).

En el caso de los tóxicos, es bien conocida la capacidad de múltiples organismos de responder adaptativamente o por selección a un daño. Es importante diferenciar entre la respuesta adaptativa y la selección, debido a que el resultado final es el mismo. La respuesta adaptativa se produce cuando se expresa en una población, una característica ya determinada y aparentemente oculta, que les permite a los organismos responder al nuevo estímulo. En el caso de la selección, se trata de una función no aparente hasta ese momento, que les permite sobrevivir a las nuevas condiciones a unos cuantos organismos, los cuales, al reproducirse, la heredan a su descendencia y toman finalmente el lugar de la población anterior. Es bien conocida la presencia de procesos ya sean adaptivos o selectivos en microorganismos y en humanos los cuales ocurren de manera semejante (Wolfson y Swartz, 1985; Calderón et al., 1993). En el humano, mediante un análisis simple, se podrían identificar algunas diferencias que son debidas a las características fenotípicas y genotípicas particulares del organismo y que constituyen la variabilidad individual (Guyatt et al., 1986).

En relación con los procesos de adaptación y la exposición a plomo, se sabe que muchos organismos han estado en contacto con el metal a lo largo del tiempo y han logrado sobrevivir. Este hecho ha planteado una serie de preguntas relacionadas con los mecanismos de toxicidad y de resistencia que podría ocasionar la presencia del plomo en los diferentes sistemas y organismos que coexisten dentro del medio ambiente. Para entender los procesos de sensibilidad o resistencia a este metal en los organismos superiores es necesario observar y evaluar los cambios en los diferentes sistemas que conforman a los sujetos de estudio (George-Cherian y Nordberg, 1983).

La susceptibilidad de un organismo se relaciona con el binomio exposición-efecto que a su vez está relacionado a diferentes fenómenos como exposiciones al medio ambiente, factores genéticos, dieta, edad, raza, que difieren en cada organismo. En la figura 3 se muestran los diferentes factores que tienen influencia en el desarrollo de la susceptibilidad individual, de una población y finalmente de un ecosistema. Estos factores pueden llevar al desarrollo de la variabilidad individual. La figura indica que la exposición a xenobióticos definidos cambiará en función de su paso por los diferentes compartimientos del organismo. De esta manera, cuando se produce un daño estructural, se

desencadenará una enfermedad clínica. De forma paralela muestra el efecto de las exposiciones subsecuentes y como se afecta a la población, desarrollando también organismos resistentes o vulnerables a la intoxicación con los agentes externos (Barret, 1997). La figura también muestra que, el fenómeno de la susceptibilidad individual, a lo largo de todas las fases, se puede observar que pueden detectarse poblaciones tolerantes o sensibles a la exposición a diferentes agentes tóxicos. Y que estas poblaciones podrán ser catalogadas como resistentes o vulnerables.

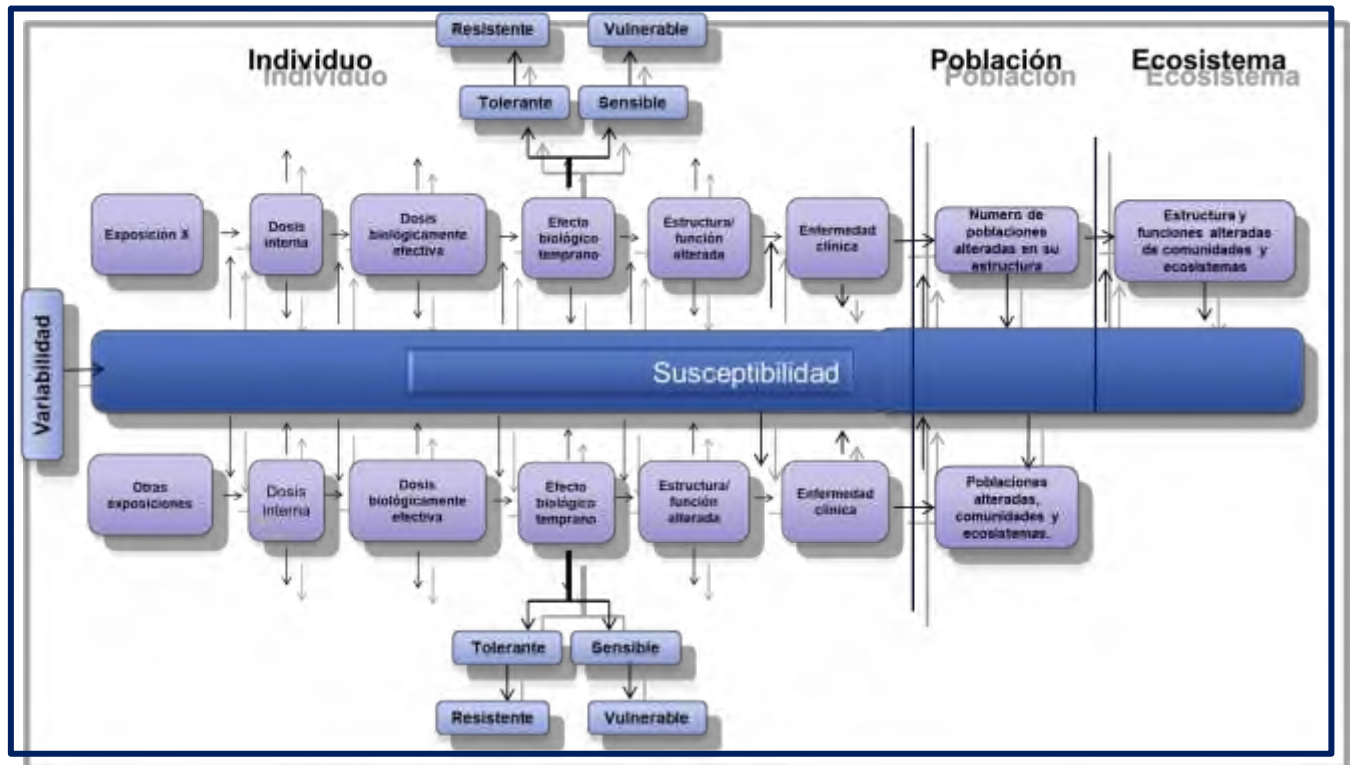


Figura 3. Susceptibilidad y factores que la afectan (Tomado y modificado de Barrett, 1997).

I.VI Biomarcadores de susceptibilidad.

Son indicadores de la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición de algún xenobiótico. En la figura 4 se presenta un diagrama de los diferentes biomarcadores de susceptibilidad empleados en la evaluación de riesgos. Dentro de ellos se encuentran los polimorfismos en general y el de la enzima Glutación S-transferasa en particular. Un polimorfismo es considerado como tal cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1%. Hay varios tipos de polimorfismos (inserciones, deleciones, cambios en el número de secuencias repetidas), pero los más frecuentes son los SNP's (polimorfismos de un solo nucleótido) (Checa, 2007).

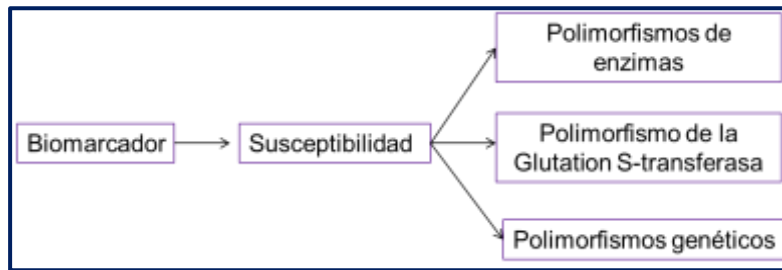


Figura 4. Biomarcadores de susceptibilidad empleado en la evaluación de riesgos (Tomado y modificado de Arango, 2012).

Los biomarcadores sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Se deben generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN y sus fragmentos de restricción (RFLPs), clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas (Repetto, 1997). Se pueden distinguir dos tipos de marcadores: marcadores de polimorfismos de sistemas de activadores y marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores (Cauteren y Van, 1996). Los marcadores de polimorfismos de sistemas activadores permiten la medida de actividad de las enzimas del citocromo P-450 (CYP) implicadas en la toxicidad de numerosos xenobióticos. Las enzimas microsomales del citocromo P450 humano están codificadas por un mínimo de 30 genes diferentes, que se agrupan en distintas familias (en función de la semejanza de secuencias aminoacídicas) de las cuales las más importantes son las familias I, II, III y IV que, a su vez, se agrupan en subfamilias constituidas por genes polimórficos (por ejemplo, el CYP1A1, el CYP1C8 y el CYP1D6) (González y Guerra, 2014). Los marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores se relacionan con actividades enzimáticas tales como las de las enzimas Glutación-S-transferasa, acetiltransferasa, sulfotransferasa, glucuroniltransferasa y paraoxonasa (Gil y Pla, 1998). En relación con lo anterior, se ha observado que la predisposición al cáncer ha sido correlacionada con polimorfismos genéticos de las N-acetiltransferasas, enzimas implicados en la inactivación de aminas aromáticas (Agúndez, 2008). En este sentido, los acetiladores lentos con exposición a aminas aromáticas presentan un mayor riesgo de desarrollo de cáncer de vejiga que la población control que posee una actividad acetiladora lenta. Después de la acetilación hay una excreción urinaria aumentada (Golka et al., 2002).

Otro ejemplo lo constituye la Glutación-S-transferasa μ , enzima implicada en la detoxificación de metabolitos reactivos que se ha relacionado con el cáncer pulmonar de células escamosas (Dong et al., 2018). La mitad de la población no posee alelos funcionales para este enzima o su actividad es baja o incluso inexistente, lo que hace que se incremente el posible riesgo de dicho cáncer (Sanz, 1995).

Finalmente, un último ejemplo lo constituye la Paraoxonasa sérica (PON) en la hidrólisis (inactivación) de varios compuestos organofosforados (Ceron et al., 2014). Esta presenta un importante polimorfismo, habiéndose detectado en humanos 3 genotipos: individuos homocigotos para el alelo de baja actividad, individuos homocigotos para el alelo de alta actividad e individuos heterocigotos, hecho que permite proponer dicha actividad enzimática como biomarcador de susceptibilidad (Geldmacher-von y Diepgen, 1988; Li et al, 1995).

I.VII Marcadores de daño oxidativo.

Los contaminantes (hidrocarburos aromáticos policíclicos y halogenados, metales pesados, herbicidas y disolventes) son capaces de originar daño oxidativo en el organismo. Las macromoléculas que pueden resultar afectadas incluyen a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Hoffman et al., 1989). Como respuesta, el organismo desencadena mecanismos adaptativos a través de sistemas de protección, cuantificados habitualmente en plasma, que incluyen la razón glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) y en la determinación de las actividades de las enzimas del sistema antioxidante (glutatión reductasa, catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa) (Kurutas, 2015).

I.VIII Papel de la enzima Glutatión S-transferasa en la susceptibilidad hacia agentes tóxicos.

Las Glutatión S-transferasas (GST) constituyen un grupo de enzimas diméricas que desempeñan un papel crítico en la defensa contra productos de estrés oxidativo y varios compuestos electrofílicos en la fase II del metabolismo de los xenobióticos, catalizando la conjugación de glutatión reducido con sustancias genotóxicas potenciales (He et al., 1998). Varios estudios han demostrado que las diferencias individuales en la actividad de GST son el resultado del polimorfismo genético de estas enzimas (Cao et al., 2017). Este grupo de enzimas son productos de una superfamilia de genes, algunos de ellos polimórficos debido a los alelos eliminados o mutados (Blackburn et al., 2000).

La familia de las Glutatión S-transferasas están ampliamente distribuidas y se expresan en muchos tejidos de mamíferos en forma específica y en función del tipo de tejido y de célula (Thiagara et al., 2005). Muchos estudios han demostrado evidencia de variaciones individuales en la expresión de GST en diferentes tejidos (Laguna-Ruiz et al., 2005). A este respecto, se ha confirmado una correlación entre el genotipo y el fenotipo de GSTM1, ya que los ensayos de fenotipificación

mostraron una menor actividad de la enzima en leucocitos de sujetos con genes carentes de GSTM1 (Zhong et al., 1991).

Además de los tejidos de mamíferos, la enzima se encuentra en especies de diferentes reinos, lo cual la hace poseedora de un papel muy importante dentro de los diferentes organismos que la poseen. Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, una presión de selección podría desencadenar una serie de fenómenos para que las especies logren sortearlos y puedan vivir bajo las condiciones adversas a las cuales se enfrentan, originando individuos resistentes a las nuevas condiciones. Las enzimas han sido involucradas dentro de fenómenos como este y se ha llegado a hablar de una evolución proteica. En este trabajo no se pretende involucrar a la GST como la responsable de algún fenómeno adaptativo, sino como una macromolécula implicada en el proceso de la intoxicación con plomo con un posible papel defensivo. Lo anterior no indica que la enzima tenga un papel evolutivo, más bien se quiere estudiar cuál es su comportamiento dentro de este problema y con ello, además de varios estudios adicionales, poder estudiar su papel dentro del fenómeno global de la intoxicación por plomo en los mamíferos.

II. ANTECEDENTES

Como se ha expresado en los párrafos anteriores, el fenómeno de la susceptibilidad hacia los efectos de los agentes tóxicos es un evento complicado que depende tanto de las características físicas y químicas de los agentes xenobióticos como de las condiciones biológicas del organismo en cuestión. Para estudiar el fenómeno de susceptibilidad hacia los agentes tóxicos en mamíferos se llevó a cabo una búsqueda en la literatura con la finalidad de obtener un mejor conocimiento de los estudios realizados relacionados con el tema.

Tanto mecanismos toxicocinéticos como los toxicodinámicos pueden afectar al individuo predispuesto a los efectos tóxicos (Grandjean, 1992). Dichos mecanismos se pueden clasificar en los tres mencionados a continuación.

- 1) Factores que aumentan la concentración de la sustancia biológicamente activa en el sitio activo.
- 2) Factores que aumentan la reacción de la sustancia química con moléculas diana en el cuerpo, iniciando así la respuesta.
- 3) Factores que promueven la secuencia de eventos entre la reacción inicial y la manifestación final de un efecto adverso para la salud (Grandjean, 1992).

El conocimiento sobre la susceptibilidad individual puede ser importante para reducir el riesgo de enfermedades en los individuos. El diagnóstico precoz les proporcionaría potencialmente a las personas más susceptibles la oportunidad de planificar su vida para reducir el impacto de su vulnerabilidad. No detectar y advertir a esas personas en situación de riesgo podría ser peligroso (Hattis et al, 1987).

La sensibilidad a los diferentes agentes tóxicos se ha reconocido como un concepto toxicológico ligado al concepto de dosis-respuesta. La sensibilidad también incluye el concepto de hipersensibilidad y con el de sensibilidad química múltiple. Este último término se ha relacionado con individuos que presentan una sensibilidad multi órgano como consecuencia de varias exposiciones a agentes tóxicos. Estos individuos pueden cursar con muchos signos y síntomas que hacen del proceso algo difícil y complicado de estudiar. Se sabe que existen diferentes clasificaciones relacionadas con los individuos que son sensibles a los agentes químicos. Entre ellos se pueden mencionar los trabajadores de industrias, quienes están expuestos de forma ocupacional diariamente y a dosis constantes de químicos; los trabajadores de oficinas cercanas a las fuentes de emisiones de los tóxicos; los individuos que viven formando comunidades cercanas a los sitios de contaminación y finalmente, los individuos que por una u otra razón reciben dosis altas o bajas de algún tóxico. En todos ellos prevalecen relaciones dosis-respuesta que los predispondrán a ser más o menos sensibles. Se ha observado que en estos individuos existen fases diferentes iniciando con

signos y síntomas ocasionados por la exposición a bajos niveles de tóxicos, pasando por una fase de sensibilidad reversible en la cual los signos y síntomas se realzan, pero después bajan al estar sometido el individuo a una dosis constante de tóxico y, al final una fase de sensibilidad química múltiple. Todo lo anterior originará grupos con mayor o menos susceptibilidad hacia la exposición y los efectos de muchos agentes químicos (Winder, 2002; Bolt y Kiesswetter, 2002).

Experimentalmente se ha observado que, durante la administración a largo plazo de productos químicos a los animales, la intensidad de efectos tóxicos a menudo disminuye (UNL, 2012). Esto puede ser causado por una disminución de la concentración de la sustancia química en el sitio del receptor debido a una mayor tasa de transformación a una sustancia inactiva. Otra posible causa de la disminución en el efecto es la susceptibilidad alterada del tejido objetivo al producto químico. La toxicidad de un químico no es una propiedad coligativa de una sustancia; es función de la susceptibilidad del organismo sobre el cual actúa. Las exposiciones químicas durante las ventanas sensibles del desarrollo, principalmente en el útero y en los primeros años de vida, podrían tener un papel en el desarrollo de enfermedades crónicas. Numerosos estudios han proporcionado evidencia de que la exposición prenatal o postnatal a Hg^{2+} y Pb^{2+} , está asociada con disfunciones neurológicas en niños.

Yorifuji y colaboradores (2011) determinaron los efectos de la exposición prenatal al plomo en los déficits cognitivos en presencia de una concentración molar similar al metilmercurio en niños de 7 y 14 años nacidos en las Islas Feroe. Los análisis de la cohorte total y de los miembros de la cohorte sin términos de interacción entre la categoría inferior de exposición a contaminantes mostraron resultados equívocos. Sin embargo, cuando los sujetos se restringieron a una categoría inferior de contaminantes y se ingresaron términos de interacción estadística dentro de la categoría, se observaron efectos adversos de la exposición prenatal al plomo en las funciones cognitivas en la infancia, especialmente en la atención, el aprendizaje y la memoria. Además, estos estudios respaldan la existencia de efectos adversos sobre las funciones cognitivas en exposiciones prenatales a diversos compuestos de plomo.

Chen y colaboradores (2014) estudiaron la exposición materna a múltiples metales (incluidos Cd, Hg, Pb y Se) y la transferencia transplacentaria de estos elementos de la madre al feto en una variedad de medios sanguíneos en los EE. UU. Concluyeron que los glóbulos rojos son mejores que el plasma para reflejar la transferencia transplacentaria de Hg, Pb y Se de la madre al feto. Además, encontraron niveles significativamente más altos de Hg en plasma y glóbulos maternos y eritrocitarios en nacimientos prematuros o con bajo peso al nacer, en comparación con los nacimientos a término o normales. Este estudio piloto sentó las bases para futuras investigaciones.

Hallén y colaboradores (1995) estudiaron los efectos de la exposición placentaria y de lactancia al Pb^{2+} en ratas lactantes después de la exposición a largo plazo de ratas madre al metal en el agua potable. La exposición continua a Pb^{2+} durante la gestación y la lactancia dio como resultado niveles de Pb^{2+} en la leche aproximadamente 2.5 veces más altos que los niveles del ión en sangre. Cuando terminó la exposición a tóxico en el parto, los niveles en la leche eran similares a los encontrados en sangre en el día 15 de la lactancia, y solo el 10% de los niveles de leche encontrados después de la exposición continua al metal. La exposición a través de la placenta y la leche en la descendencia de las ratas expuestas continuamente dio como resultado niveles en sangre y cerebro 6 veces mayores que en la descendencia expuesta solo a través de la placenta. La exposición solo por la vía lactante en las crías de las madres expuestas a plomo hasta el parto originó niveles del tóxico en sangre más altos que en las crías expuestas solo a través de la placenta. Todo lo anterior indica que la transferencia a través de la leche materna es considerablemente mayor que la transferencia placentaria. Además, determinaron que en la descendencia de los grupos expuestos disminuyó la actividad de ALAD en la sangre, lo que indicó una relación entre la actividad de la enzima y los niveles de plomo en sangre, en la cual la actividad es inhibida de forma proporcional a la concentración del tóxico. Sin embargo, no observaron ningún efecto en la calidad de la leche, medida por las concentraciones de lípidos, proteínas y calcio de la leche, ni en la producción de leche (Oskarsson et al., 1992; Hallén y Oskarsson, 1993; Gulson et al., 1998).

Reportes relacionados con el tema de la susceptibilidad fueron hechos por Balazs y colaboradores (1983), quienes experimentaron con ratas Sprague-Dawley jóvenes (150-200 g) y adultas (500 g). Los animales se inyectaron en condiciones idénticas el mismo día con isoproterenol en dosis graduadas de 0.1 a 1000 mg/kg. No se reportaron animales muertos a ninguna dosis en el grupo de las ratas jóvenes, pero se observó una mortalidad relacionada con la dosis en las ratas adultas. Los valores encontrados de dosis letal 50 determinados fueron 1300 mg/kg en las ratas jóvenes y 0.66 mg/kg en las ratas adultas. En grupos adicionales de animales, se registraron los electrocardiogramas después de la administración de varias dosis de isoproterenol. Las contracciones ventriculares prematuras ocurrieron dentro de los 15 a 30 minutos; en algunos casos fueron seguidos por taquicardia ventricular, fibrilación posterior, convulsiones y muerte que ocurrió 1 hora después de la administración. Los resultados de estos experimentos indicaron que la mayor susceptibilidad de la rata pesada a la toxicidad letal de isoproterenol está relacionada con el desarrollo de fibrilación ventricular.

Prescott y Ansari examinaron la secuencia de tiempo de los cambios tubulares renales después de las inyecciones subcutáneas diarias de dicloruro de mercurio ($HgCl_2$) en ratas. Dosis diarias de 0.5 o

2 mg/kg aumentaron los niveles de celuria (aumento de células en la orina) y transaminasa glutámico pirúvica (UGOT) en pocos días. A medida que continuó la dosificación, estos efectos disminuyeron. Después de 3 semanas de interrupción, sin embargo, la administración de una dosis de 0,5 mg/kg reprodujo los efectos iniciales. El examen histológico reveló necrosis tubular renal en ratas dosificadas diariamente con 0.5 mg/kg durante cuatro días, pero sin lesión en aquellos dosificados durante 9 días. Se detectaron lesiones extensas en el grupo de 2 mg/kg el cuarto día, pero solo se observó regeneración con poca necrosis después de nueve días de administración (Prescott y Ansari, 1969).

Fairchild (1974) ha revisado el desarrollo de la resistencia a los productos químicos irritantes para los pulmones. La inhalación de concentraciones apropiadas de ozono, dióxido de nitrógeno o fosgeno (ClOCl_2 , usado para preparar plásticos y pesticidas y a temperatura ambiente es venenoso), o la administración oral de algunos derivados de tiourea $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$, inducen edema seguido por un grado de resistencia en animales de experimentación. La duración de esta resistencia varió de 10 a 100 días en diferentes especies y con diferentes irritantes (Balazs, 1974).

Zhou y colaboradores (2017) utilizaron ratas de la especie Sprague-Dawley para exponerlas a dos dosis de acetato de plomo: una baja (1%) y otra alta (2%) durante el embarazo estableciendo, de esta manera, un modelo animal de exposición embrionaria al plomo y con este poder determinar el efecto en la ingesta de alimentos y el movimiento intestinal en sus descendientes. Entre los resultados observaron que la exposición a ambas dosis ocasionó una reducción significativa en la ingesta diaria de alimentos; un aumento significativo en el contenido de agua de las heces, una reducción significativa en el peso de los sedimentos fecales y un aumento significativo en la propulsión del intestino delgado. El grupo de exposición al plomo en dosis alta presentó una reducción significativa en la capacidad de vaciado gástrico en comparación con el grupo control. Al comparar los grupos expuestos a plomo con el control, se comprobó que los primeros presentaron cambios inflamatorios patológicos significativamente mayores en la mucosa gástrica.

Todos los casos narrados anteriormente son ejemplos de susceptibilidad ya sea individual o colectiva. La razón de estos cambios es la efectividad de la respuesta del organismo ante la agresión que supone la exposición a un tóxico. En el caso del plomo existen múltiples sistemas de respuesta que pueden resultar en la reducción de las manifestaciones de daño. Una de ellas es la disminución de la entrada y el aumento de la salida del metal en las células y el organismo, lo cual puede disminuir las posibilidades de daño. Otro mecanismo es el que se relaciona con la unión del plomo con las macromoléculas, entre ellas las proteínas, lo cual origina, de nueva cuenta la disminución del daño al disminuir la concentración del ion de plomo libre. Un ejemplo de estas

proteínas son las que forman los cuerpos de inclusión dentro del núcleo de algunos tipos celulares y que han sido asociadas de forma directa o indirecta con la susceptibilidad. Se han encontrado evidencias de células que tienen mayor afinidad al metal y que funcionan como reservorios, tal es el caso de las células del hueso y algunas que conforman el sistema nervioso central; la consecuencia es la disminución del daño por reducción de la concentración del elemento en otras células cercanas o alejadas. Se han reportado isoformas de algunas proteínas, las cuales presentan afinidad mayor por el tóxico y que se han usado como marcadores de susceptibilidad, tal es el caso del enzima ácido δ -aminolevulínico deshidratasa. Se ha observado que algunas características celulares pueden influir en la toxicidad del plomo y por ende en la susceptibilidad individual, tal es el caso de variaciones en el pH, en la fuerza iónica, la concentración de fosfatos, el balance energético, la capacidad de reparación celular, la regeneración de tejidos y el desarrollo de funciones alternativas. Ejemplo de los procesos anteriores es la regeneración de células renales y la reeducación de un nervio motor para realizar algún proceso contráctil. Aunado a todo lo anterior se encuentra la capacidad de respuesta celular a los procesos de estrés oxidativo. Finalmente se debe mencionar que factores como el estado físico, el nutricional o el de salud pueden cambiar la susceptibilidad individual hacia la intoxicación con plomo (Calderón y Maldonado, 2008).

Por otro lado, se han realizado investigaciones que asocian la susceptibilidad con los factores genéticos. Uno de los biomarcadores empleados en la investigación de la toxicidad por plomo es la inhibición de enzimas que intervienen en la síntesis del grupo HEMO (La-Llave-León et al., 2017). Biao (2004) estudió la relación entre la toxicidad del metal y la actividad del enzima ácido δ -aminolevulínico deshidratasa, así como los polimorfismos del gen del receptor de la vitamina D. Él observó que el genotipo VDR (receptor de la vitamina D) se encuentra asociado con el nivel de plomo en la sangre. El genotipo ALAD (ácido delta aminolevulínico) se asoció con el nivel de plomo en orina. Los trabajadores con el genotipo ALAD 1-2 y concentraciones de plomo en sangre iguales o superiores a 40 $\mu\text{g}/\text{dL}$ mostraron mayor actividad de la enzima N-acetilglutaminasa (NAG) (4.17 U/mmol) que los trabajadores con genotipo ALAD 1-1 (1.27 U/mmol). Al comparar trabajadores con genotipos VDR bb y VDR B, observaron que los que tenían el primer genotipo presentaron menor presión sistólica a niveles de plomo en sangre iguales o superiores a 40 $\mu\text{g}/\text{dL}$, a comparación con los que tenían el segundo genotipo, en donde las presiones sistólicas fueron mayores a los mismos niveles de plomo en sangre. Como resultado de los experimentos anteriores determinaron que los alelos ALAD-2 y VDR-B podrían modificar la absorción y la toxicidad del plomo.

Scinicariello y colaboradores (2007), informaron uno o más datos por individuos con genotipos ALAD 1-1 y ALAD 1-2 / 2-2: en el nivel de plomo en sangre (BLL), tibia o nivel de plomo trabecular,

protoporfirina de zinc (ZPP), hemoglobina, creatinina sérica, nitrógeno ureico en sangre (BUN), plomo quelatable al ácido dimercaptosuccínico o presión arterial. Encontraron que los portadores del alelo ALAD2 presentaron niveles mayores de BLL que los poseedores del alelo ALAD1 homocigotos y una mayor hemoglobina y ZPP inferior, y el último parece estar inversamente relacionado con BLL.

II.I Antecedentes directos del grupo de investigación.

En estudios anteriores a la presente investigación, se utilizaron ratas de la cepa Wistar, a las cuales se les administró $Pb(C_2H_3O_2)_2$ vía oral por un período de siete meses. Se emplearon dos esquemas, el primero consistió en una intoxicación inicial de un mes con 100 ppm del tóxico seguido de seis meses con 500 ppm de plomo; el segundo consistió en la administración de 500 ppm del tóxico por siete meses vía oral. Los resultados demostraron que el primer grupo resultó más sensible que el primero, reflejándose esta observación de las diferentes pruebas bioquímicas e histológicas realizadas (Navarro-Moreno et al, 2009).

Posteriormente en el grupo de investigación de la Universidad del Papaloapan, se realizaron estudios quimiométricos para obtener datos o correlaciones más precisas y útiles en el análisis de algunos parámetros físicos, biológicos y bioquímicos en roedores, con el fin de estudiar la toxicidad que la exposición a plomo pudo ocasionar en su organismo, encontrando como resultados que la actividad de GST tiene correlación directa con la generación de especies reactivas de oxígeno y la intoxicación con plomo por lo que, dentro de los diferentes estudios realizados por este grupo de investigación, se considera a la enzima GST como un indicador de daño debido a que su actividad en general aumenta por presencia de metales como el plomo (Hernández, 2013).

Por otro lado, se realizó el estudio de la interacción molecular entre el plomo y los sitios activos de la enzima Glutación S-transferasa PI (GST) empleando la dinámica molecular para evaluar este comportamiento encontrando que la presencia del glutatión reducido GSH tiene gran influencia en el comportamiento de la GST PI dado que este favorece la abertura del sitio catalítico de la enzima y con un sustrato hidrofóbico como lo es el DNCB cierra el sitio activo (Townsend et al., 2008). Los aminoácidos encontrados implicados en la catálisis de unión con la GSH encontrados fueron: Trp 38, Lys 44, Leu 52, Ser 65, para el DNCB: Trp 38, Lys 44, Gln 51 y para el complejo GDN: Tir 7, Trp 38, Lys 44, Gln 51. Se encontró, de igual manera, que el Pb^{2+} se une a sitios alejados del sitio activo, constituyendo, posiblemente un inhibidor de tipo no competitivo (Raymundo, 2016).

Cruz (2016), realizó estudios de la actividad de la Glutación S-transferasa *in vivo* en presencia y ausencia de mercurio 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 Glutación S-transferasa incrementó en presencia de mercurio junto con un aumento de las especies reactivas de oxígeno y una disminución de la actividad de algunas enzimas del sistema antioxidante celular como la catalasa, y el superóxido dismutasa (Kurutas, 2015). El tratamiento con los micronutrientes selenio y zinc activó las defensas antioxidantes enzimáticas celulares y la remoción del mercurio con el agente quelante DMSA, redujo los daños renales y la actividad de la Glutación S-transferasa se restableció.

Recientemente tres trabajos se están llevando a cabo relacionados con la intoxicación con plomo y su efecto en ratas de laboratorio; bacterias y hongos aislados de ríos de aguas contaminadas de la región del Papaloapan.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los seres vivos estamos expuestos a distintas sustancias químicas que provocan a nuestro organismo alteraciones que nos pueden llevar hasta la muerte. Uno de los puntos importantes en la interacción con compuestos químicos, es que cada organismo es diferente. Factores como la raza, la edad, el sexo, el peso, la alimentación y las características genéticas son puntos clave para la sensibilidad de un organismo hacia la exposición a sustancias químicas.

La susceptibilidad se ha estudiado de forma preferente en muchos microorganismos debido a que cuentan con la capacidad de resistir concentraciones altas de metales pesados como plomo, cromo y cadmio generando una variedad de mecanismos de resistencia ante estos tóxicos, lo que se traduce en su supervivencia. Sin embargo, en los seres vivos eucariontes complejos como los mamíferos esta capacidad de adaptación, ha sido poco estudiada debido a que en estos organismos el proceso es más lento. Como consecuencia ello, se pone más énfasis en estudiar los procesos de toxicidad que los de resistencia.

En el caso de la intoxicación con plomo, el panorama resulta el mismo. Este hecho tiene como consecuencia que los esfuerzos se enfoquen en tratar la intoxicación como un proceso que ocasiona daños a los organismos y no enfocarlos a los posibles mecanismos celulares que se podrían desencadenar en organismos expuestos de forma crónica al metal y que pudieran, posiblemente, ayudar a los organismos a tolerarlo.

Este trabajo representa un primer intento para abordar un tema que resulta complicado ya que se relaciona con preguntas que han sido estudiadas por muchos científicos a lo largo de la historia y que se relacionan con la cuestión de cómo pueden las especies tolerar los agentes tóxicos y como este hecho podría ayudarlos a soportar otros elementos tóxicos. De manera adicional este estudio podría ayudarnos a entender si se trata de una condición que ayude o perjudique más a las especies en estudio.

IV. JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, no existen muchas investigaciones relacionadas a los organismos complejos y a cómo podrían llegar a adaptarse a situaciones de estrés ocasionadas por la exposición a concentraciones bajas o altas de metales pesados. Lo anterior se debe a que estos procesos se llevan a cabo de forma lenta y son poco perceptibles por el ser humano. Sin embargo, existen muchos ejemplos en la naturaleza, en la cual los cambios se han podido observar de forma física. Este es el caso de las observaciones de grandes científicos como Charles Darwin, quien basó su teoría de la evolución en los cambios que observó en individuos y como modificaban sus características para poder sobrevivir.

Este trabajo se basa en la idea de realizar estudios para comenzar a investigar si, al igual que los microorganismos, los organismos multicelulares como las ratas Wistar puedan generar condiciones o procesos celulares de resistencia ante la intoxicación con plomo y monitorear su susceptibilidad tras la preexposición al metal pesado. Los resultados nos proporcionarán una idea de lo que sucede en los animales que han sido expuestos a concentraciones bajas de un agente tóxico, el cual generará una condición de presión en el individuo y como consecuencia tendrá dos posibilidades, la primera relacionada con la tolerancia y la segunda con la sensibilidad a la presencia del metal.

V. HIPÓTESIS

La exposición a una sal de plomo desde el proceso embrionario en ratas macho de la cepa Wistar constituirá una ventaja adaptativa la cual podrá ayudarlos a resistir dosis mayores del mismo metal y a reducir los daños causados por otros metales pesados que puedan interactuar con el organismo en exposiciones subsecuentes.

VI. OBJETIVOS

VI.I Objetivo general

Estudiar la susceptibilidad hacia la intoxicación con plomo en roedores.

VI.II Objetivos particulares

1. Establecer un esquema de intoxicación adecuado para obtener crías de ratas expuestas con acetato de plomo por vía oral desde el desarrollo embrionario hasta cumplir 4 meses.
2. Determinar los efectos fisiológicos en los animales de los diferentes grupos de experimentación.
3. Realizar los estudios bioquímicos: Determinación de proteínas totales, medición de la actividad de la enzima Catalasa, medición de la actividad de la enzima Glutación S-transferasa, cuantificación de las especies reactivas de oxígeno y examen general de orina.

VII. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

VII.I Grupos experimentales.

Para llevar a cabo los estudios relacionados con el desarrollo de resistencia a la intoxicación con plomo se establecieron los siguientes grupos de experimentación.

Grupo 1. Sin exposición a acetato de plomo desde el desarrollo embrionario hasta cumplir cuatro meses de edad.

Grupo 2. Sin exposición a acetato de plomo desde el desarrollo embrionario hasta cumplir cinco meses de edad.

Grupo 3. Exposición a 1000 ppm con acetato de plomo por vía oral desde el desarrollo embrionario hasta cumplir cuatro meses de edad.

Grupo 4. Exposición a 1000 ppm con acetato de plomo por vía oral desde el desarrollo embrionario hasta cumplir cuatro meses de edad, seguida de siete dosis de una solución 2.5 mg/kg de acetato de plomo por vía intraperitoneal.

Grupo 5. Exposición a 1000 ppm con acetato de plomo por vía oral desde el desarrollo embrionario hasta cumplir cuatro meses de edad, seguida de un mes con tratamiento de una solución 5000 ppm de acetato de plomo por vía oral.

Grupo 6. Exposición a 1000 ppm con acetato de plomo desde el desarrollo embrionario hasta cumplir cuatro meses de edad, seguida de siete dosis de una solución 2.5 mg/kg de cloruro de mercurio por vía intraperitoneal.

Grupo 7. Exposición a 1000 ppm con acetato de plomo por vía oral desde el desarrollo embrionario hasta cumplir cuatro meses de edad, seguida de tratamiento con una solución 2.5 mg/kg de cloruro de mercurio por vía oral.

Cada grupo de ratas estuvo conformado por seis animales, los cuales se distribuyeron en pares en cajas de plástico para así poder sincronizar el tiempo con los tratamientos aplicados. Al inicio y al final de cada experimento los animales se pesaron. Durante el periodo de tratamiento se monitorio el comportamiento y los cambios que los animales presentaron.

Posterior al término de cada tratamiento, los animales se colocaron por pares en cajas metabólicas para recolectar las muestras de orina. Cada par de ratas se anestesió con pentobarbital sódico, se sacrificaron y extirparon los órganos riñón, hígado y cerebro, además de la recolección de la muestra de sangre. Los órganos se pesaron.

VII.II Ensayos bioquímicos.

A) Examen general de orina.

La muestra reaccionó con los reactivos desecados unidos a una fase sólida que se encuentra adherida a un soporte plástico. Se proveen reactivos para la detección de urobilinógeno, glucosa, cetonas, bilirrubina, proteínas, nitrito, pH, sangre, densidad, leucocitos y ácido ascórbico.

Los principios químicos de cada prueba son los siguientes:

- a) **Leucocitos.** Esta prueba reveló la presencia de esterasas granulocitarias. Las esterasas escinden un derivado del éster pirazol aminoácido para liberar un derivado de hidroxipirazol que luego con la sal de diazonio determina un producto violeta.
- b) **Urobilinógeno.** La prueba está basada en la reacción de unión de una sal de diazonio con el urobilinógeno urinario en un medio ácido. El color vira del rosa pálido al rosa intenso.
- c) **Glucosa.** Reacción enzimática secuencial donde la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa dando ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Luego, la peroxidasa cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno con ioduro de potasio, formándose productos coloreados que van desde celeste verdoso, pasando por marrón verdoso intermedio, a marrón.
- d) **Cetonas.** Se basa en la reacción de ácido acetoacético de la orina con nitroprusiato. El color resultante va desde tostado, cuando no hay reacción, a distintos tonos de púrpura para reacciones positivas.
- e) **Bilirrubina.** Se fundamenta en la unión de la bilirrubina con la sal de diazonio del 2,4-diclorofenilo en un medio fuertemente ácido. El color cambia de tostado suave a tostado intenso.
- f) **Proteínas.** Basada en el cambio de color del indicador, azul de tetrabromofenol, en presencia de proteínas. Una reacción positiva está indicada por un cambio de color del amarillo verdoso al verde, y luego al verde intenso.
- g) **Nitrito.** En esta prueba se lleva a cabo la reacción de ácido p-arsanílico y nitrito, derivado del nitrato de la dieta en presencia de bacterias de la orina, para formar un compuesto de diazonio. Este compuesto reacciona con N-(1-naftil) etilendiamina en un medio ácido. El color resultante es rosa. Cualquier tonalidad rosada es considerada positiva.
- h) **pH.** Se utilizan indicadores dobles (rojo de metilo y azul de bromotimol) los cuales dan un amplio espectro de colores cubriendo el rango de pH urinario completo. Los colores varían desde ocre, pasando por verdoso-amarillento, a verde azulado.

- i) **Sangre.** Esta prueba detecta la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina, la cual cataliza la reacción de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina con hidroperóxido orgánico tamponado. El color resultante varía desde verdoso-amarillento, pasando por verde azulado, hasta azul oscuro.
- j) **Densidad.** Se fundamenta en el cambio de pKa, en presencia de los cationes urinarios, se liberan protones de un polielectrolito produciéndose un cambio de color en el indicador azul de bromotimol desde azul a amarillo (Free, A.H. y Free, H.M, 1972).

La muestra de orina se recolectó en un pequeño recipiente y en el resto se le colocó en una tira reactiva de uroanálisis (10 LG parameter Urine Reagent Strip 100 Strips URI-10P) la cual indico por medio de una reacción de color la concentración de glucosa, bilirrubina, cetonas, gravedad específica, sangre, pH, proteínas, nitritos y leucocitos.

B) Medición de proteínas en suero, orina y homogeneizado de riñón, cerebro e hígado por método de Lowry modificado (Navarro-Moreno, 1999).

El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con los grupos amino de las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$). Este método consta de dos etapas (la interacción de los reactivos y las proteínas se señalan en la figura 5). En la primera, los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato. En la segunda etapa se produce la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso (Lowry et al., 1951). Se colocaron en un tubo de ensaye 790 μL de agua destilada, 10 μL de la muestra, 100 μL de desoxicolato de sodio ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}$), 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$, usando una dilución 1:3) y 2 μL de una solución compuesta por sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 0.5%, 2 g de hidróxido de sodio

(NaOH) y 0.134 g de tartrato de sodio potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Las muestras se agitaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después se procedió a leer a una longitud de onda de 750 nm en el equipo de UV/Visible Pekín Elmer Lamda 25. La curva patrón se realizó con albúmina sérica bovina (BSA). Esta se detalla en el Anexo 3 de esta Tesis

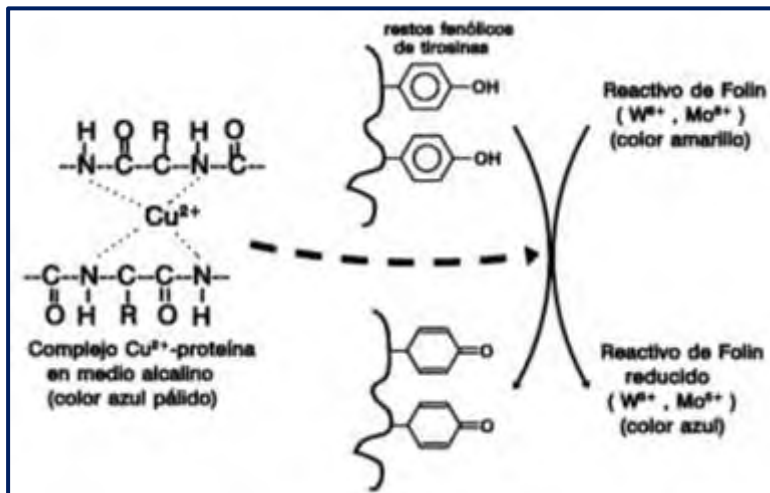


Figura 5. Reacción entre la proteína y los reactivos (Tomado de www3.uah.es).

C) Cuantificación de las especies reactivas de oxígeno en muestras de homogeneizado de riñón, hígado y cerebro.

El método espectrofotométrico del ácido tiobarbitúrico (TBA) es el más comúnmente utilizado para la cuantificación de malondialdehído (MDA). La determinación de los niveles de MDA en materiales biológicos es un método conveniente, sensible y ampliamente utilizado para estimar cuantitativamente la extensión de la peroxidación lipídica. En la figura 6 se muestra la reacción que ocurre por ataque del MDA sobre el grupo metileno activo del TBA. 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 pigmento generado posee un pico máximo de absorbancia a 532-535 nm y otro secundario a 245-305 nm (sedici.unlp.edu.ar).

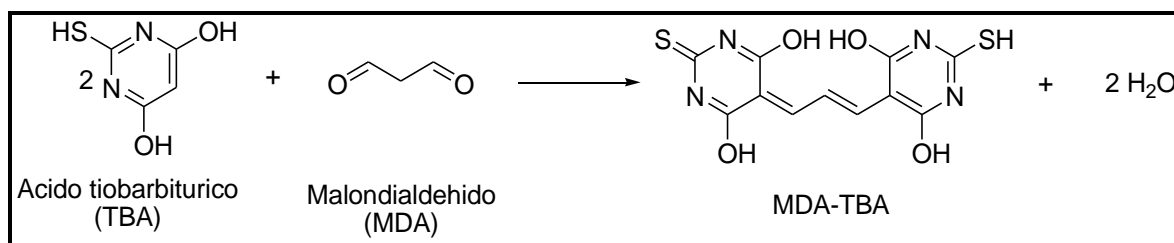


Figura 6. Esquema de la reacción entre malondialdehído y ácido tiobarbitúrico (Elaboración propia).

Se utilizaron 0.2 mL del homogenado de corteza renal, de hígado y de cerebros realizados cada uno por separado en una solución buffer fosfato salino (PBS) 0.1M a pH 7.4, el volumen se completa a 1 mL con la misma solución. Para llevar a cabo la reacción se adicionaron 0.025 mL de butirilhidroxitolueno (BHT) y 300 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 30% en un tubo de ensayo. Posteriormente éste se agitó vigorosamente y se 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 μ L del sobrenadante, 0.075 μ L de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0.1M y 0.25 μ L de una solución al 1% de ácido tiobarbitúrico (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 Lamda 25.

La actividad de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico se determinó por la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon cl$$

Dónde:

A es la diferencia de absorbancia en un intervalo de longitud de onda (532-600 nm).

ϵ es el coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 1.5 \text{ mg/mLmin}$).

c es la concentración de las especies reactivas de TBA.

l es la longitud de la celda.

D) Medición de la actividad de la Glutación S-transferasa (GST) en muestras de homogeneizado de riñón, hígado, cerebro, suero y orina.

La función principal de las GST es desintoxicar los xenobióticos catalizando el ataque nucleofílico por GSH sobre átomos electrofílicos de carbono, azufre o nitrógeno de dichos sustratos xenobióticos no polares, evitando así su interacción con proteínas celulares cruciales y ácidos nucleicos. La función de las GST en este rol es doble: unir el sustrato en el sitio H hidrofóbico de la enzima y el GSH en el sitio G hidrófilo adyacente, que juntos forman el sitio activo de la enzima y posteriormente activar el grupo tiol de GSH, permitiendo el ataque nucleofílico sobre el sustrato. Los compuestos dirigidos de esta manera por las GST abarcan una amplia gama de toxinas ambientales o de otro modo exógenas, que incluyen agentes quimioterapéuticos y otras drogas, pesticidas,

herbicidas, carcinógenos y epóxidos derivados de forma variable. Las reacciones de desintoxicación comprenden los primeros cuatro pasos de síntesis de ácido mercaptúrico, con la conjugación a GSH que sirve para hacer los sustratos más solubles y permitir que sean eliminados de la célula por transportadores como la proteína 1 asociada a resistencia a múltiples fármacos (MRP1) (Oakley, 2011). Después de la exportación, los productos de conjugación se convierten en ácidos mercaptúricos y se excretan a través de la orina o la bilis. La mayoría de las isoenzimas de mamíferos tienen afinidad por el sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno, y los ensayos espectrofotométricos que utilizan este sustrato se usan comúnmente para informar la actividad de GST (Habig et al, 1974).

Se utilizó un homogeneizado de riñón, de hígado y de cerebro realizado cada uno y por separado en un amortiguador de fosfato 0.1 M y pH 7.4. Se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos y se recolectó el sobrenadante, al cual se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry, de la misma manera que a las muestras de orina y sangre. Se procedió a realizar los ensayos en una celda de vidrio, se le agregó el volumen correspondiente de un amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 6.5, el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno a una concentración final de 1 mM y el ligante glutatión reducido a una concentración final de 1 mM. Esta mezcla se homogenizó por inversión y finalmente se adicionó el volumen correspondiente a 1 mg/mL de proteína total. Se midió el aumento de absorbancia a 350 nm por un tiempo de cinco minutos con intervalos de 20 segundos en un espectrofotómetro UV/Vis-Perkin Elmer Lambda 25. La actividad de la GST se determinará por la ecuación de Lambert-Beer de la siguiente manera: $A = \epsilon cl$

Dónde:

A es la absorbancia.

ϵ es el coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 9.6 \text{ mg/mLmin}$).

c es la concentración de la enzima GST.

l es la longitud de la celda.

E) Medición de la actividad de la enzima Catalasa.

La catalasa es una enzima presente en los peroxisomas de las células de todos los tejidos animales y vegetales. Actúa sobre el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) descomponiéndolo en agua y oxígeno y liberando energía en forma de calor. El agua oxigenada es un producto resultante de las reacciones metabólicas y si no se destruye puede ser tóxica para la célula (Tomado de www.uaq.mx). La reacción catalizada por la enzima se muestra en la siguiente reacción.



Para medir la actividad enzimática se utilizó un homogeneizado de riñón realizado en un amortiguador de fosfato 0.1 M y pH 7.4. Se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos y se recolectó el sobrenadante, al cual se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry. Se preparó un amortiguador salino 10 mM de fosfato pH 7 y una solución 50 mM de peróxido de hidrógeno. Esta solución se colocó en el amortiguador de tal manera que la concentración final fuera 10 mM en un volumen final de 3 mL en una celda de vidrio. A la celda se le agregó 1 mg/mL de proteína total y se midió la absorbancia a 240 nm por un tiempo de 1 min debido a que en este tiempo se lleva a cabo la descomposición del peróxido de hidrógeno. La actividad de la catalasa se determinará por la ecuación de Lambert-Beer de la siguiente manera: **$A = \epsilon c l$**

Dónde:

A es la absorbancia.

ϵ es el coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 39.58 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

c es la concentración de la enzima Catalasa.

l es la longitud de la celda.

F) 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.

VIII. RESULTADOS

Se establecieron siete grupos, mismos que fueron divididos en controles de cuatro y cinco meses (dependiendo del esquema de intoxicación) de edad sin exponer. Los resultados indicaron que las diferencias fueron mínimas entre los dos controles y que solo algunas de sus características fueron diferentes. Los resultados obtenidos se muestran en el Anexo 1. Adicionalmente se estableció un grupo expuesto a acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) por cuatro meses a partir de la gestación, grupos de animales expuestos a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (4 meses) y posteriormente tratados con dosis mayores de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ o con otro agente toxico como HgCl_2 , por vías oral e intraperitoneal.

Posteriormente se formó un grupo expuesto a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ por seis meses debido a que el grupo exposición inicial de 4 meses de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ más dosis con HgCl_2 , no soportó la administración intraperitoneal (1 sobreviviente de 6). De esta manera fueron analizados y se obtuvieron los resultados que se describen a continuación.

A) Grupos expuestos a acetato de plomo por 4 meses y exposición posterior a acetato de plomo por vía intraperitoneal.

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en los animales control, los que fueron expuestos por cuatro meses a 1000 ppm de acetato de plomo y el grupo con exposición inicial (4 meses con acetato de plomo 1000 ppm) y expuesto posteriormente a siete administraciones de 2.5 mg/kg de peso de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$. En el caso de las ratas inyectadas con HgCl_2 el 83% de los animales perdió la vida y por ello se decidió prolongar el tiempo de preexposición a 1000 ppm dos meses más. Los resultados obtenidos se analizarán en el apartado C.

Pesos corporales. Un efecto sistémico ocasionado por la exposición a algunos tóxicos puede manifestarse de forma clínica en alguna alteración del peso corporal. Se sabe que algunos metales podrían ocasionar aumento en el peso corporal, posiblemente por aumento del tejido graso o el aumento del líquido intersticial, tal cual se ha explicado en la parte introductoria de este trabajo.

Los pesos registrados para estos grupos de experimentación se muestran en la Tabla 1. Analizando los datos se puede observar que el grupo de exposición inicial a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ no presenta una diferencia significativa en relación con el grupo control; sin embargo, el grupo expuesto a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ por vía ip sufrió una disminución de 96 gramos en relación con el grupo control y de 55 gramos en relación con el grupo tratado inicialmente con $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$. El grupo expuesto a 1000 ppm de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ desde el desarrollo embrionario compartió características similares a los grupos controles, ya mostraban una actitud tranquila, así como confianza cuando se les proporcionaba el alimento, caso contrario de lo que se observó en las ratas expuestas posteriormente a plomo vía ip.

Los animales tratados vía ip mostraron inseguridad y agresividad. Este comportamiento se ha observado en el grupo de animales expuestos a HgCl₂ aunque en estas observaciones el daño sistemático mayor. Un trabajo anterior al presente demostró que las ratas Wistar macho expuestas vía ip a 2.5 mg/Kg de peso de plomo mostraron características diferentes a las encontradas en los animales preexpuestos a Pb(C₂H₃O₂)₂ por cuatro meses (Méndez, 2016).

Tabla 1. Pesos corporales de los animales control y expuestos a acetato de plomo (n= 6). Los resultados se muestran con media ± desviación estándar. ^ap<0.05 vs control, ^bp<0.05 vs 4 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂. Las muestras se ajustaron a 1mg/mL de proteína.

	Control 1 (g)	4 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ (g)	4 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ más 2.5 mg/kg de Pb(C₂H₃O₂)₂ vía ip (g)
Peso	292.33 ± 21.84	250.98 ± 21.98	196.38 ± 16.21 ^{a,b}

Peso de los órganos. Se ha observado que algunos agentes tóxicos pueden ocasionar efectos a diferentes órganos y que algunos de estos se manifiestan por un aumento de peso el cual podría ser debido a algún edema ocasionado por el exceso de sales presentes dentro de la célula. La Tabla 2 muestra los resultados encontrados al evaluar el peso de los órganos de los tres grupos de experimentación. Los datos indican que no existió diferencia entre los pesos de los órganos de ninguno de los dos grupos expuestos a plomo en relación con el grupo control. Dentro del grupo de experimentación del Laboratorio de Bioquímica se ha observado que cuando los animales son expuestos a plomo sin ser preexpuestos, los órganos sufren una alteración en sus pesos ya sea aumentando o disminuyendo. En este caso no se encontró ninguna alteración en los mismos. Físicamente los órganos del grupo control presentaron las siguientes características: los riñones tenían un aspecto normal en relación con el color y el tamaño, aunque presentaron una ligera cantidad de tejido graso en sus alrededores (debido, posiblemente, a la edad de los animales) y pequeños puntos de color gris; los cerebros eran aparentemente normales mientras que el hígado de la mayoría de los ejemplares se observó con una ligera tonalidad oscura.

Tabla 2. Pesos de los órganos de los animales control y expuestos a acetato de plomo (n= 6). Los resultados se representan con media \pm desviación estándar. Ajustado a 1mg/mL de proteína.

	Control 1 (g)	4 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ (g)	4 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ más 2.5 mg/kg de Pb(C₂H₃O₂)₂ vía ip (g)
Riñón	1.76 \pm 0.16	1.73 \pm 0.23	1.98 \pm 1.10
Hígado	8.45 \pm 1.43	6.91 \pm 0.37	7.51 \pm 0.37
Cerebro	1.78 \pm 0.16	1.76 \pm 0.11	1.79 \pm 0.16

Examen general de orina. Este examen se realiza para evaluar los cambios en algunos de los analitos que se encuentran en orina. Algunos de ellos indican algún efecto debido a que normalmente no deben encontrarse en este fluido. La Tabla 3 muestra los resultados experimentales, en color marrón se muestran las diferencias más notables. Se puede observar que de los 10 analitos determinados solo tres fueron negativos en los grupos (nitritos, cetonas y glucosa). En el caso de los leucocitos se observó que en los tres grupos existen animales con un alto valor, de tal forma que el 83 % de las ratas control presentaron niveles de 15 c/dL; 67 % de los animales con exposición inicial a 4 meses de Pb(C₂H₃O₂)₂ tuvieron niveles de 70 c/dL y el 17% de los animales expuestos posteriormente por vía ip al mismo metal, mostraron un valor de 125 c/dL. El resto de los animales en los primeros dos grupos obtuvieron resultados negativos, pero en el tercer grupo se observaron 67 % de animales con un nivel de leucocitos de 70 c/dL así como 16% con un nivel de 1.0 c/dL. El urobilinógeno fue negativo en el 100% de los animales de los grupos control y expuesto a Pb(C₂H₃O₂)₂ posteriormente por vía ip. En el grupo de exposición inicial por cuatro meses, el 33% de los miembros se detectó un nivel de 0.2 mg/dL. El 100% de las ratas de los dos primeros grupos mostraron un nivel de 15 mg/dL de proteínas en orina, mientras que el tercer grupo presentó además el 50% de sus miembros con 50 mg/dL, denotando proteinuria. El valor de pH no mostró una diferencia significativa entre los grupos. La presencia de sangre fue positiva en el 17 % de los individuos de los primeros dos grupos de experimentación. Los niveles de bilirrubina fueron positivos para el 17% de los animales de los tres grupos. Hubo mayor retención de líquidos en el grupo tratado vía ip con Pb(C₂H₃O₂)₂ con respecto al grupo expuesto durante cuatro meses a Pb(C₂H₃O₂)₂; además se observó una diferencia significativa de volumen entre el grupo de exposición inicial y el grupo expuesto a Pb(C₂H₃O₂)₂ vía ip de 26.5 mL. Estos datos se encuentran relacionados con el flujo urinario, el cual indica algún trastorno a nivel renal como la retención de agua, cosa que ocurrió en el grupo 3, debido, posiblemente, a la gran cantidad de sal de plomo a nivel celular de varios de los tejidos.

Tabla 3. Examen general de orina de los grupos control y expuestos a acetato de plomo (n= 6).

	Control 1	4 meses a 1000 ppm de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	4 meses a 1000 ppm de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ más 2.5 mg/Kg de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ vía ip
Leucocitos (c/dL)	15 (83%) Negativo (17%)	70 (67%) Negativo (33%)	125 (17%); 70 (67%) 1.0 (16%)
Nitritos (mg/dL)	Negativo	Negativo	Negativo
Urobilinógeno (mg/dL)	Negativo	0.2 (33%) Negativo (67%)	Negativo
Proteínas (mg/dL)	15	15	15 (50%); 30 (50%)
Ph	8.58 ± 0.61	7.25 ± 0.63	7.83 ± 0.37
Sangre (Eri/μL)	Negativo (50%) Positivo (17%)	Negativo (50%) Positivo (17%)	Negativo (100%)
Gravedad específica	1.004 ± 0.003	1.006 ± 0.002	1.005 ± 0.003
Cetonas (mg/dL)	Negativo	Negativo	Negativo
Bilirrubina (mg/dL)	Negativo (83%) Positivo (17%)	Negativo (83%) Positivo (17%)	Negativo (83%) Positivo (17%)
Glucosa (mg/dL)	Negativo	Negativo	Negativo
Volumen de orina (mL)	49.5 ± 19.86	66.17 ± 7.70	39.67 ± 13.23

Especies reactivas de oxígeno. Uno de los principales problemas de la exposición a los metales pesados es la generación del estrés oxidativo, el cual ocurre debido al desbalance que existe entre los sistemas antioxidantes y las especies reactivas de oxígeno. Este desbalance puede ser impulsado por la presencia de xenobióticos que alteren la funcionalidad de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos presentes en las células. La Figura 7 muestra los resultados obtenidos en los tres órganos.

Los valores obtenidos en los órganos de los tres grupos son significativamente diferentes. Analizando los valores encontrados se vio que el grupo de exposición inicial a cuatro meses con Pb(C₂H₃O₂)₂ fue el que mostró un mayor aumento de especies reactivas en el hígado de todos los grupos. Los niveles en los dos grupos restantes variaron dependiendo de los órganos y del esquema de intoxicación.

En el caso del cerebro el grupo de exposición inicial a 4 meses con $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ aumentó 163 unidades en relación al grupo control. La exposición posterior vía ip a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ tuvo una disminución de 70 unidades en relación con el grupo control. Entre los grupos de tratamiento inicial por cuatro meses y exposición posterior vía ip a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ la diferencia fue significativa y de 233 unidades menos en este último. Este resultado indica que la preexposición a plomo por cuatro meses tuvo una implicación celular por la cual, al recibir una dosis mayor del tóxico, la producción de especies reactivas de oxígeno ya no aumentó, sino al contrario disminuyó, lo que para este órgano implicó disminución del riesgo de problemas ocasionados por el estrés que implica el aumento de las especies reactivas de oxígeno.

En el hígado el grupo de exposición inicial a 4 meses con $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ la cantidad de ERO's aumentó 144 unidades con relación al grupo control. El grupo con exposición posterior vía ip a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ tuvo un incremento de 116 unidades al compararlo con el grupo control. Entre los grupos de tratamiento inicial a cuatro meses y exposición posterior vía ip a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ la diferencia de 27 unidades menos en este último. Este comportamiento es semejante al observado en el riñón y se podría explicar por la amplia relación que los dos órganos tienen como los responsables de eliminar sustancias tóxicas o por su capacidad de retenerlas.

Finalmente, en el riñón, las diferencias observadas entre los grupos fueron estadísticamente significativas. El grupo expuesto a 4 meses con $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ aumentó 268 unidades con relación al grupo control; esta diferencia fue la más alta entre los grupos de estudio. Ello podría indicar que la prolongada exposición al metal pudo originar un estado constante y elevado de estrés oxidativo en las células renales. Por su parte el grupo expuesto posteriormente vía ip a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ tuvo un aumento de 92 unidades al compararlo con el grupo control. Entre los grupos de exposición inicial a cuatro meses y el de exposición posterior vía ip a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ la diferencia fue de 176 unidades menos en el último grupo. Este resultado puede indicar que las células renales alcanzaron un estado tal que el aumento de plomo no indujo la producción de especies reactivas de oxígeno, quizá debido a que desarrolló mecanismos que le ayudaron a tolerar el aumento de metal.

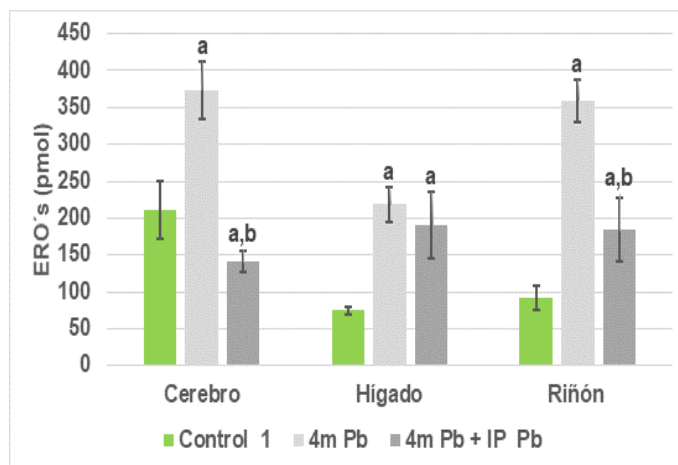


Figura 7. Especies reactivas de oxígeno en grupo de exposición inicial a acetato de plomo (4m Pb) y grupo tratado con acetato de plomo vía ip (4m Pb + IP Pb) (n=6). Los resultados se muestran con media \pm desviación estándar. ^ap<0.05 vs control 1, ^bp<0.05 vs 4m Pb. Ajustado a 1mg/mL de proteína.

Actividad de la enzima Glutación S-transferasa. La Figura 8 muestra los resultados obtenidos en los órganos riñón, hígado y cerebro de los tres grupos de estudio correspondientes a este bloque. Dentro del grupo de investigación de Bioquímica en la Universidad del Papaloapan, se ha establecido que en ratas Wistar macho expuestas a metales pesados existe una relación entre el contenido de especies reactivas de oxígeno y la actividad de la enzima GST (Hernández, 2013; Méndez 2016; Raymundo, 2016). Los resultados fueron comparados con los animales no expuestos, debido a que ellos representan las condiciones normales de desarrollo.

En el cerebro, se observó que en los grupos tratados con $Pb(C_2H_3O_2)_2$ la actividad se redujo significativamente en relación con el grupo control, sin embargo, entre ellos no existió una diferencia significativa. En el grupo de exposición inicial a $Pb(C_2H_3O_2)_2$ por cuatro meses, la actividad de la GST disminuyó 2.6 veces respecto al control. El grupo expuesto a $Pb(C_2H_3O_2)_2$ vía ip disminuyó 2.52 veces respecto al control. Este hecho puede deberse a que existen isoformas de enzimas, las cuales pueden mostrar más o menos sensibilidad a la presencia de los agentes tóxicos. En este caso la o las isoformas de GST pudieron resultar más dañadas al seguir administrando el metal.

En el hígado, el grupo de exposición a cuatro meses mostró un incremento de actividad de 3.54 unidades en relación con el grupo control. En la agrupación con tratamiento posterior vía ip se registró un incremento de 12.9 unidades también en relación con el grupo control. La actividad entre los dos grupos tratados con $Pb(C_2H_3O_2)_2$ fue diferente y mayor por 9 unidades en el grupo de exposición posterior vía ip al metal. De nueva cuenta la presencia de plomo desencadenó procesos celulares, que como consecuencia elevaron la actividad enzimática.

En el caso del riñón, los dos grupos expuestos a plomo al ser comparados con el grupo control, en general mostraron un aumento de la actividad de GST. El grupo de exposición inicial a cuatro meses aumentó 3.77 unidades de actividad enzimática. El grupo con exposición posterior vía ip también mostró un aumento 3.98 unidades. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas. Ello indica que el plomo pudo ocasionar efectos dentro de la célula que tuvieron como consecuencia el aumento de la actividad de la enzima, lo que concuerda con los datos observados en otros sistemas y que ya han sido comprobados mediante métodos quimiométricos (Hernández, 2013). No obstante, entre los dos grupos expuestos a plomo las diferencias no fueron significativas. Este resultado podría indicar que de cierta manera la preexposición a plomo pudo inducir cierta tolerancia a una concentración más elevada de plomo.

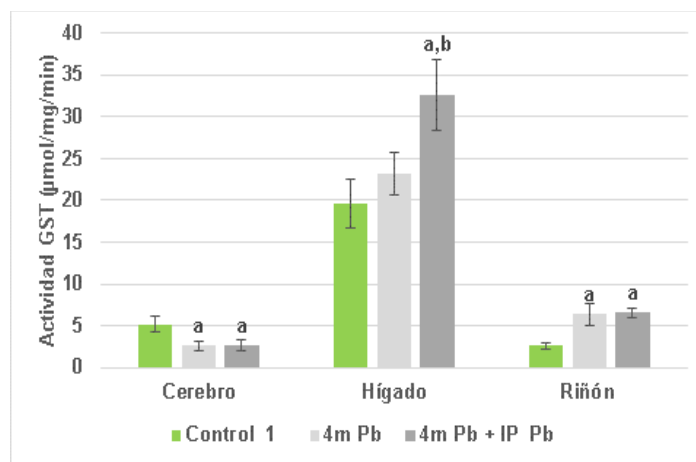


Figura 8. Actividad de la enzima GST en órganos cerebro, hígado y riñón (n=6). Las actividades se representan con media \pm desviación estándar; ^ap<0.05 vs control 1, ^bp<0.05 vs 4m Pb. Ajustado a 1mg/mL de proteína.

Actividad de GST en orina y suero. Como parte de los estudios que se llevan a cabo dentro del Laboratorio de Bioquímica se analiza la actividad de la enzima GST en suero y orina debido a que se ha encontrado una relación entre la actividad de la proteína en estos fluidos con la de riñón (Hernández, 2013; Méndez, 2016; Raymundo, 2016). La Tabla 4 muestra los resultados en suero y orina en los tres grupos analizados. En el caso del suero, la actividad no varió de forma significativa entre los grupos de estudio. En el caso de la actividad determinada en orina, el grupo con exposición posterior a $Pb(C_2H_3O_2)_2$ por vía ip, mostró un aumento significativo de 1.7 y 1.3 al compararlo con los grupos control y expuesto 4 meses a $Pb(C_2H_3O_2)_2$ respectivamente.

	Control 1 ($\mu\text{mol/mg/mL}$)	4 meses a 1000 ppm de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ($\mu\text{mol/mg/mL}$)	4 meses a 1000 ppm de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ más 2.5 mg/mL de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ via ip ($\mu\text{mol/mg/mL}$)
Suero	1.29 \pm 0.17	1.19 \pm 0.07	1.27 \pm 0.57
Orina	0.66 \pm 0.91	0.74 \pm 0.06	1.15 \pm 0.43 ^{a,b}

Tabla 4. Actividad de GST en suero y orina de los grupos control y expuestos a acetato de plomo (n= 6). Los resultados se representan con media \pm desviación estándar. ^ap < 0.05 vs control 1, ^bp<0.05 vs 4 meses a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$. Ajustado a 1mg/mL de proteína.

Actividad de catalasa. Una de las enzimas implicadas en la respuesta antioxidante del organismo es la Catalasa, la cual se encarga de metabolizar al peróxido de hidrógeno para evitar que de origen a dos de las especies reactivas de oxígeno más reactivas que son los radicales superóxido e hidroxilo (Baquero, 2005; Cupul, 2016). La Tabla 5 muestra los valores obtenidos al medir la actividad en los grupos estudiados. En los órganos hígado y cerebro, los valores obtenidos no mostraron significancia estadística en ninguno de los tres órganos. En el riñón se observó en el grupo expuesto posteriormente a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, la actividad de la enzima disminuyó significativamente dos unidades en su actividad al compararla con el grupo control. Estos resultados podrían indicar que las exposiciones a plomo no lograron aumentar la actividad de este enzima antioxidante debido, posiblemente a que, posiblemente, en la edad en la que se encuentran los roedores usados la actividad de la catalasa ha llegado a una fase estacionaria, y por lo tanto la presencia del tóxico no la ha incrementado. Podría ser, por otro lado, que la intoxicación con plomo no induzca la producción de peróxido de hidrógeno, al inhibir la actividad de esta enzima o al incrementar otro tipo de especies reactivas de oxígeno.

Tabla 5. Actividad de la enzima Catalasa en los grupos exposición inicial y tratado posteriormente a acetato de plomo vía ip (n= 6). Los resultados se representan con media \pm desviación estándar. ^ap<0.05 vs control 1, ^bp<0.05 vs 4 meses a 1000 ppm de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$. Ajustado a 1mg/mL.

	Control 1 ($\mu\text{mol/mg/min}$)	4 meses a 1000 ppm de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ($\mu\text{mol/mg/min}$)	4 meses a 1000 ppm de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ más 2.5 mg/kg de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ vía ip ($\mu\text{mol/mg/min}$)
Riñón	107.27 \pm 1.96	106.89 \pm 1.68	105.06 \pm 1.52 ^{a,b}
Hígado	106.01 \pm 1.98	109.37 \pm 5.73	105.49 \pm 3.90
Cerebro	109.93 \pm 2.50	105.92 \pm 4.50	106.72 \pm 2.28

B) Grupos expuestos a acetato de plomo por 4 meses y posterior exposición a acetato de plomo (5000 ppm) y cloruro de mercurio (2.5 mg/kg) durante 1 mes por vía oral.

Peso corporal de los animales de experimentación. La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos. entre los grupos control y expuesto posteriormente con 5000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ vía oral. Se observó que no existió una diferencia significativa de peso. Tampoco se notó un cambio en su comportamiento, en la alimentación y en la ingesta de la solución. Al comparar el grupo con tratamiento posterior a $HgCl_2$ se detectó una disminución significativa de 76 g de peso entre este grupo y el control. Entre el grupo expuesto vía oral a $HgCl_2$ y el tratado con posterior exposición oral a $Pb(C_2H_3O_2)_2$ la diferencia fue de 43 g. Las ratas que fueron expuestas a la sal de mercurio mostraron alteraciones en su comportamiento como la disminución de la ingesta de alimento y de la solución, así como signos de diarrea en algunas ratas. Estos resultados demuestran que la subsecuente exposición a mercurio originó, posiblemente, un estado de estrés muy difícil de soportar por las células, pero aún y con este estado lograron tolerar la presencia del metal al ser administrado por vía oral.

Tabla 6. Pesos corporales de los grupos expuestos posteriormente a acetato de plomo o cloruro de mercurio vía oral (n= 6). Los resultados se muestran con media \pm desviación estándar. ^ap<0.05 vs control 2, ^bp<0.05 vs 4 meses a 1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ más 5000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ vía oral. Ajustado a 1 mg/mL de proteína.

Control 2 (g)	4 meses a 1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ más 5000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ vía oral (g)	4 meses a 1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ más 2.5 mg/kg de $HgCl_2$ vía oral (g)
374.73 \pm 32.07	355.08 \pm 36.73	298.53 \pm 30.24 ^{a,b}

Peso de los órganos. La Tabla 7 muestra los pesos de los órganos de los grupos de estudio. Como primera observación el cerebro no sufrió cambios significativos en su peso en ninguno de los tres grupos de ratas. En el caso del riñón, los grupos tratados con $Pb(C_2H_3O_2)_2$ y $HgCl_2$ vía oral después de la preexposición a plomo disminuyeron de forma significativa en relación con el control, pero no se encontró diferencia significativa entre ellos. En el hígado las diferencias encontradas entre los grupos fueron mayores en relación con el riñón. De la misma forma los grupos tratados con las sales de plomo y mercurio, después de la preexposición a $Pb(C_2H_3O_2)_2$ disminuyeron de forma significativa en relación con el control, pero no se encontró diferencia entre ellos. El primero disminuyó 2.5 y el segundo 2.4 unidades. Al sacrificar a las ratas y observar el estado físico de sus

órganos se encontró que el riñón presentaba exceso de tejido graso; el hígado conservó una coloración café oscura y el cerebro conservó su aspecto normal.

Tabla 7. Pesos de los órganos de los grupos expuestos a acetato de plomo y cloruro de mercurio vía oral (n=6). Los resultados se representan con media \pm desviación estándar. ^ap<0.05 vs control 2. Ajustado a 1mg/mL de proteína.

	Control 2 (g)	4 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ más 5000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ vía oral (g)	4 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ más 2.5 mg/kg HgCl₂ vía oral (g)
Riñón	2.31 \pm 0.08	1.92 \pm 0.17 ^a	2.17 \pm 0.13 ^a
Hígado	11.18 \pm 1.55	8.71 \pm 0.91 ^a	8.77 \pm 0.95 ^a
Cerebro	2.24 \pm 0.16	1.99 \pm 0.13	2.11 \pm 0.15

Examen general de orina. En la Tabla 8 se recopilaron los resultados obtenidos. Al analizarla se puede observar que seis de 10 analitos evaluados no mostraron diferencias, lo que indica que los dos grupos con exposición oral no fueron diferentes al grupo control. En relación con los leucocitos los tres grupos presentaron un nivel de 70 en más del 80% de su población. Los leucocitos fueron elevados en los tres grupos y esto se observó en más del 83 % de la población. En el caso de las proteínas el grupo control presentó un promedio de 15 mg/dL. El 67% de los dos grupos expuestos posteriormente presentaron también 15 mg/dL de proteína en orina, así como niveles de 30 en el 17 % restante de su población. Una pequeña elevación en el nivel de cetonas se presentó en el grupo tratado con HgCl₂. Al medir el volumen de orina se observó que el grupo expuesto posteriormente vía ip aumento 8.33 mL de orina con respecto al grupo preexpuesto (exposición inicial). Este grupo aumentó 9.83 mL de orina con respecto al grupo control. Los animales bebían agua en grandes cantidades.

Tabla 8. Examen general de orina de los grupos exposición inicial a acetato de plomo y tratamiento posterior a cloruro de mercurio vía oral (n= 6).

	Control 2	4 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ más 5000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ vía oral	4 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ más 2.5 mg/kg de HgCl₂ vía oral
Leucocitos (c/dL)	70 (83 %)	70	70 (83%)
Nitritos (mg/mL)	Negativo	Negativo	Negativo
Urobilinógeno (mg/mL)	Negativo	Negativo	Negativo
Proteínas (mg/mL)	15	15 (67%) 30 (33%)	15 (67%) 30 (33%)
Ph	8.83 ± 0.37	8.5 ± 0.50	8.67 ± 0.47
Sangre (Eri/μL)	Negativo	Negativo (67%)	Negativo (67%) Positivo (6.5%)
Gravedad específica	1.004 ± 0.003	1.004 ± 0.002	1.003 ± 0.002
Cetonas (mg/dL)	Negativo	Negativo	Negativo (67%) 5 (33%)
Bilirrubina (mg/dL)	Negativo	Negativo	Negativo
Glucosa (mg/dL)	Negativo	Negativo	Negativo
Volumen (mL)	39.17 ± 18.62	49 ± 20.46	57.33 ± 16.43

Especies reactivas de oxígeno. La Figura 9 muestra los resultados obtenidos al determinar las ERO's de los animales expuestos de forma oral a las sales de plomo y mercurio. En este caso la administración ocasiona un fenómeno toxicocinético en el que todos los órganos se ven involucrados y por ello primero tuvieron contacto con plomo y después a concentraciones mayores del mismo elemento y a la sal de mercurio, lo cual supone una posible suma de efectos.

En relación con el cerebro solo el grupo expuesto a HgCl₂ vía oral presentó un aumento significativo de especies reactivas de oxígeno a comparación con los otros dos grupos estudiados. En relación con el control el aumento fue de 150 unidades y en comparación con el grupo expuesto a Pb(C₂H₃O₂)₂ a 5000 ppm, el aumento fue de 206 unidades. Entre los grupos control y tratado con Pb(C₂H₃O₂)₂ vía oral no hubo diferencia estadística, aunque se ve una tendencia a disminuir. De forma similar a los grupos experimentales del apartado anterior, el cerebro resultó ser más sensible a la posterior presencia de los iones Pb²⁺ y Hg²⁺. El hígado solo mostró aumento significativo de especies reactivas en el grupo con tratamiento posterior a Pb(C₂H₃O₂)₂ en relación con el grupo

control. Este aumento fue de 48 unidades. El grupo con tratamiento a $HgCl_2$ presentó una disminución significativa de 49 unidades en relación con el grupo expuesto posteriormente a plomo, pero no así con el grupo control, con el cual no hubo diferencia. Estos datos indican que, posiblemente, el mercurio ocasionó que las defensas antioxidantes tanto proteicas como no proteicas se activaran y lograran disminuir la cantidad de ERO's producidas, mientras que, en el caso del plomo, este indujo la producción de más especies mediante efectos directos en las enzimas o induciendo la sobreproducción de estas especies por otros mecanismos. En el riñón se observó un aumento significativo de las especies de oxígeno en los grupos de exposición inicial y expuesto posteriormente con $HgCl_2$ en relación con el grupo control, aunque entre ellos la diferencia no fue significativa. El grupo con tratamiento posterior a $Pb(C_2H_3O_2)_2$ aumentó 20 unidades en relación con el grupo control, mientras que el grupo con exposición posterior a $HgCl_2$ presentó una diferencia de 56 unidades. esto indica que la posterior exposición a mercurio ocasionó que incrementaran las especies reactivas de oxígeno, sumándose a las ya existentes por la presencia de plomo.

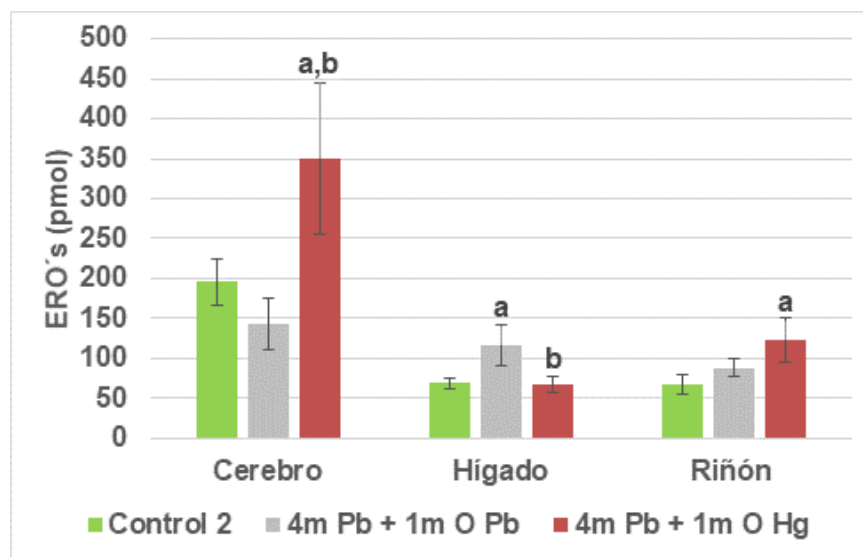


Figura 9. Especies reactivas de oxígeno en órganos blanco con tratamiento oral (n=6). Los resultados se representan con media \pm desviación estándar; ^ap<0.05 vs control 2, ^bp<0.05 vs 4m Pb + 1m O Pb (grupo expuesto posteriormente con $Pb(C_2H_3O_2)_2$ vía oral. Ajustado a 1mg/mL de proteína).

Actividad de la enzima Glutación S-transferasa. En los tres órganos el aumento en la actividad de la GST mantuvo un mismo comportamiento, de tal manera que los grupos con exposición posterior vía oral presentaron un aumento significativo en relación con el control y solo en riñón y cerebro se observó diferente de actividad. La figura 10 muestra los resultados obtenidos.

En el cerebro, se observó el mismo comportamiento que en el hígado, ya que en los grupos expuestos a metales la actividad de la enzima aumentó de forma significativa, pero la diferencia

entre ambos grupos no. El grupo con exposición a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ aumentó 4 unidades la actividad de la enzima en relación con el grupo control. El grupo tratado con HgCl_2 aumentó 3 unidades de actividad en relación con el grupo control. En el hígado, los dos grupos expuestos a tratamiento con metales vía oral mostraron la misma actividad enzimática y en ambos grupos esta aumentó de forma significativa en relación con el grupo control. Ambos grupos aumentaron 6 unidades en relación con el control.

En el riñón, el grupo expuesto a 5000 ppm de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ vía oral aumentó 20 unidades la actividad en relación con el grupo control. El grupo expuesto a HgCl_2 vía oral aumentó 11 veces en relación al grupo control. Entre los grupos tratados vía oral con 5000 ppm con $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ o HgCl_2 hubo una diferencia significativa de casi 8 unidades. En este caso el efecto de la exposición posterior a las sales de plomo y mercurio ocasionó el aumento de la actividad de la enzima GST, lo cual correlaciona con el aumento de las especies reactivas de oxígeno.

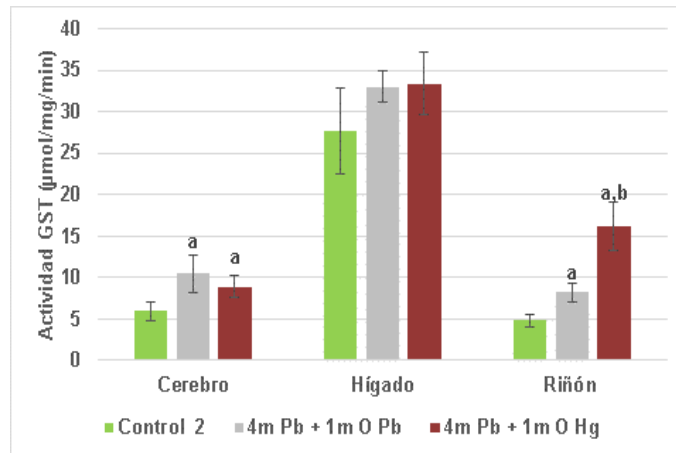


Figura 10. Actividad de la GST en cerebro, hígado y riñón (n=6). Los resultados se muestran con media \pm desviación estándar; ^ap<0.05 vs control 2; ^bp<0.05 vs 4m Pb + 1m O Pb (grupo con tratamiento posterior a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$). Ajustado a 1 mg/mL de proteína.

Actividad de GST en suero y orina. La Tabla 9 muestra que la actividad de la enzima en suero no presentó diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos. En orina se observó una disminución significativa entre el control y el grupo tratado con HgCl_2 de 0.58 unidades de actividad. De la misma manera entre los grupos con exposición a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ y HgCl_2 existió una disminución de 0.32 unidades de forma significativa. En este caso los resultados indicaron que, bajo estas condiciones experimentales, no se cumplió el comportamiento que se había detectado cuando los animales son intoxicados solo con plomo sin ser preexpuestos a ningún otro metal. Por lo que los datos indican que, para este tipo de intoxicaciones no se podría determinar si existe o no daño a

nivel renal al determinar la actividad de GST en los fluidos orina o suero, lo cual haría más difícil el estudio de casos como los que se estudiaron en este apartado.

Tabla 9. Actividad de GST en grupo control y expuestos a metales (n= 6). Los resultados se representan con media \pm desviación estándar. ^ap<0.05 vs control 2, ^bp<0.05 vs 4 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ más 5000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ vía oral.

	Control 2 ($\mu\text{mol/mg/min}$)	4 meses a 1000 ppm de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ más 5000 ppm de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ vía oral ($\mu\text{mol/mg/min}$)	4 meses a 1000 ppm de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ más 2.5 mg/kg de HgCl ₂ vía oral ($\mu\text{mol/mg/min}$)
Suero	1.53 \pm 0.17	1.28 \pm 0.13	1.66 \pm 0.26
Orina	1.60 \pm 0.16	1.34 \pm 0.27	1.02 \pm 0.05 ^{a,b}

Actividad de Catalasa. Los datos que se muestran en la Tabla 10 muestran que la actividad de la enzima catalasa en los tres órganos no presentó diferencias significativas y permaneció muy similar en todos los casos. Estos resultados son iguales a los del apartado anterior y la explicación podría ser la misma que en ese caso, solo habría que tomar en cuenta que la presión ejercida por el mercurio adicional podría estar inhibiendo la actividad de la enzima.

Tabla 10. Actividad de la enzima Catalasa en grupos control y expuestos a metales (n= 6). Los resultados se representan con media \pm desviación estándar.

	Control 2 ($\mu\text{mol/mg/min}$)	4 meses a 1000 ppm de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ más 5000 ppm de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ vía oral ($\mu\text{mol/mg/min}$)	4 meses a 1000 ppm de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ más 2.5 mg/kg de HgCl ₂ vía oral ($\mu\text{mol/mg/min}$)
Riñón	110.92 \pm 3.42	112.25 \pm 4.32	111.76 \pm 2.87
Hígado	110.42 \pm 2.96	110.15 \pm 108.32	108.32 \pm 3.69
Cerebro	109.93 \pm 2.5	108.9 \pm 1.76	111.66 \pm 1.81

C) Grupo expuesto a acetato de plomo por 4 meses y posterior exposición a cloruro de mercurio por vías oral e intraperitoneal.

Como se mencionó en el apartado A de esta sección de resultados, uno de los experimentos que se realizaron fue la exposición a cuatro meses con 1000 ppm de una solución de Pb(C₂H₃O₂)₂, contando desde el periodo de gestación, la lactancia y crecimiento. Se ha observado que los animales expuestos después de este tratamiento a una solución cinco veces mayor vía oral (5000 ppm) de Pb(C₂H₃O₂)₂ o a 2.5 mg/kg de peso de HgCl₂, respectivamente sobrevivieron el 100%. Sin embargo, cuando los animales fueron expuestos a siete dosis de 25 mg/kg de HgCl₂ vía

intraperitoneal, se observó una mortandad del 100%. Este resultado fue similar a los resultados obtenidos en otro proyecto de investigación del Laboratorio de Bioquímica de la UNPA (Cruz, 2016).

Debido a lo anterior se decidió bajar la dosis e inyectarles 10 veces menos (2.5 mg/kg) a las ratas con exposición inicial a 1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ vía oral por cuatro meses. En este caso de seis roedores murieron cinco. Esta razón llevó a aumentar dos meses más la preexposición a 1000 ppm $Pb(C_2H_3O_2)_2$ y aumentar el número de animales a ocho. En este caso la mortandad fue del 50%. Es por ello que en este apartado se comparará el grupo de exposición inicial con $Pb(C_2H_3O_2)_2$ por cuatro meses, el grupo expuesto vía oral a 2.5 mg/kg y el de a seis meses con $Pb(C_2H_3O_2)_2$ y expuesto posteriormente a 2.5 mg/kg con $HgCl_2$ vía intraperitoneal.

Pesos corporales. Analizando la Tabla 11 se encontró que la diferencia entre los dos primeros grupos de la tabla, se observa que en la exposición posterior vía oral a $HgCl_2$ ocasionó un aumento de 48 gramos de peso estadísticamente significativa. Cuando los animales cumplieron los seis meses de exposición fueron pesados y después inyectados con $HgCl_2$, Se observó que los animales tuvieron una disminución significativa de 68 gramos. No obstante, de los ocho roedores, cuatro sobrevivieron presentando consumo excesivo de agua. Al observarlos se pudo constatar que entre los signos que presentaron se pudieron distinguir disentería, caída de pelo, pelos erizados y baja actividad en general.

Tabla 11. Pesos corporales de los diferentes grupos expuestos a metales (n= 4 a 6). Los pesos se muestran con media \pm desviación estándar. ^ap<0.05 vs control 1, ^bp<0.05 vs 4 meses a 1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$, ^cp<0.05 vs 4 meses a 1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ más 2.5 mg/kg de $HgCl_2$ vía oral, ^dp<0.05 vs 6 meses a 1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$. Ajustado a 1mg/mL de proteína.

Control 1	4 meses a 1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$	4 meses a 1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ más 2.5 mg/kg de $HgCl_2$ vía oral	6 meses a 1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$	6 meses a 1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ más 2.5 mg/kg de $HgCl_2$ vía ip
292.33 \pm 21.84	250.98 \pm 21.98	298.53 \pm 30.24 ^{a,b}	374.71 \pm 46.66 ^{a,b,c}	305.55 \pm 43.02 ^{a,b,d}

Pesos de los órganos. El peso fue diferente en cada órgano de cada grupo experimental. La Tabla 12 muestra los resultados obtenidos en los órganos de los diferentes grupos. El riñón el grupo que presentó diferencias significativas fue el grupo expuesto a $HgCl_2$ por vía ip. Este tuvo un aumento de 1.53 g en relación con el grupo preexpuesto a $Pb(C_2H_3O_2)_2$ por 4 meses y de 1.09 en relación con el grupo expuesto vía oral a $HgCl_2$. Respecto al control no presentaron diferencia significativa en el peso del riñón. Esto quiere decir que, posiblemente el mercurio ocasionó un grave problema osmótico debido a la concentración del tóxico en las células renales. En el hígado los grupos que presentaron diferencia significativa fueron el expuesto a $HgCl_2$ vía oral y con exposición inicial a $Pb(C_2H_3O_2)_2$ respecto al control. En relación con el grupo de exposición inicial a $Pb(C_2H_3O_2)_2$ por 4

meses se observó un aumento de 4 gramos contra el grupo expuesto vía ip y al comparar contra el grupo expuesto vía oral a HgCl₂ la diferencia fue de 2.36 gramos. En el cerebro, el grupo control y expuesto vía oral a HgCl₂ si presentaron diferencias estadísticas al compararlos con los otros dos grupos.

Tabla 12. Pesos órganos de diferentes grupos expuestos a metales (n= 4 a 6). Los resultados se muestran con media ± desviación estándar. ^ap<0.05 vs control 2 en hígado; ^bp<0.05 vs 4 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ , ^cp<0.05 vs 4 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ más 2.5 mg/kg de HgCl₂ vía oral.

Grupo	Control 2	4 meses a 1000 ppm de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ (g)	4 meses a 1000 ppm de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ más 2.5 mg/kg de HgCl ₂ vía oral (g)	6 meses a 1000 ppm de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ más 2.5 mg/kg de HgCl ₂ vía ip (g)
Riñón	2.31 ± 0.08	1.73 ± 0.23	2.17 ± 0.13	3.26 ± 0.21 ^{b,c}
Hígado	11.18 ± 1.14	6.91 ± 0.56 ^a	8.77 ± 0.95 ^{a,b}	11.13 ± 0.98 ^{b,c}
Cerebro	2.24 ± 0.16	1.76 ± 0.11 ^a	2.11 ± 0.15 ^b	1.80 ± 0.18 ^{a,c}

Examen general de orina. Los datos del EGO se muestran en la Tabla 13, los datos en color marrón indican los resultados más relevantes en cada uno de los grupos de estudio. Como ya se ha descrito las ratas presentaron alteraciones en su fisiología y su comportamiento. El EGO reveló la presencia de proteinuria (a niveles de 300 y 2000 mg/dL), glucosuria (de 50 a 250 mg/dL), presencia de sangre (en el 25 % de la población), lo que indica problemas renales. También se observaron niveles altos de leucocitos (70 c/dL a 125 c/dL) y nitritos (positivo en el 50% de la población), así como la presencia de cetonas (50% de la población presentó un nivel de 40) y bilirrubina (50 % obtuvo resultados positivos), además de la acidificación del pH. El grupo tratado con 5000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ presentó daños leves como la presencia de valores de proteína de 33 mg/dL en un 30% de la población, 83% de la población presentó leucocitos a un nivel de 70 c/dL, la presencia de sangre solo fue encontrada en el 6.5% de los integrantes y el nivel de cetonas aumentó a 5 mg/dL en el 33% de los animales. Al comparar ambos grupos con el grupo solo preexpuesto a plomo se pudo constatar que los cuatro roedores del grupo expuesto a HgCl₂ vía oral aún con sus severos problemas renales pudieron soportar las dosis de HgCl₂ administradas. El volumen de orina recolectado en cada grupo mostró que el grupo expuesto por vía ip a mercurio presento un volumen menor de orina, reflejando un problema renal severo asociado, muy posiblemente, con el Síndrome de Fanconi.

Tabla 13. Examen general de orina de los grupos expuestos a metales (n= 4 a 6).

	4 meses a 1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ (g)	4 meses a 1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ más 2.5 mg/kg de $HgCl_2$ vía oral (g)	6 meses a 1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ más 2.5 mg/kg de $HgCl_2$ vía ip (g)
Leucocitos (c/dL)	15 (83%) Negativo (17%)	70 (83%)	125 (50%) 70 (50%)
Nitritos	Negativo	Negativo	Positivo (50%) Negativo (50%)
Urobilinógeno (mg/dL)	Negativo	Negativo	Negativo
Proteínas (mg/dL)	15	15 (67%) 30 (33%)	15 (25%), 300 (50%), 2000 (25%)
Ph	8.58 ± 0.61	8.67 ± 0.47	7.25 ± 1.15
Sangre (Ery/dL)	Negativo (50%) Positivo (17%)	Negativo (67%) Positivo (6.5%)	Negativo (75%) Positivo (25%)
Gravedad específica	1.004 ± 0.003	1.003 ± 0.002	1.014 ± 0.012
Cetonas (mg/dL)	Negativo	Negativo (67%), 5 (33%)	Negativo (50%), 40 (50%)
Bilirrubina (mg/dL)	Negativo (83%) Positivo (17%)	Negativo	Negativo (50%) Positivo (50%)
Glucosa (mg/dL)	Negativo	Negativo	Negativo (50%), 100(25%) 250 (25%)
Volumen (mL)	66.17 ± 7.70	57.33 ± 16.43	22 ± 25.14 * 58(25%); 20(25%); 8(25%); 2(25%)

Especies reactivas de oxígeno. Los resultados obtenidos indicaron que la presencia de especies reactivas de oxígeno fue diferente en cada uno de los grupos de estudio; sin embargo, el grupo preexpuesto a plomo por cuatro meses presentó mayor nivel de especies reactivas de oxígeno en los tres órganos. A continuación, se describe lo que sucedió en cada uno. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 11.

Cerebro. Al comparar el grupo expuesto a $HgCl_2$ vía ip con el grupo preexpuesto 4 meses, se observó que existió una diferencia significativa de 133.9 unidades menos en el primer grupo.

Además, se observó una diferencia significativa en el control y los grupos con exposición inicial por 4 meses y con tratamiento posterior a HgCl_2 . Un resultado no esperado fue que la generación de especies reactivas de oxígeno no aumentó al tratarlo con HgCl_2 , se observa también diferencia significativa con respecto al grupo con tratamiento inicial a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$.

Hígado. El grupo expuesto vía oral a HgCl_2 presentó una disminución significativa de 151.5 unidades en relación con el grupo preexposición cuatro meses a plomo. Entre los grupos expuestos a HgCl_2 previa preexposición a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, se observó una diferencia significativa que indicó que el grupo expuesto vía ip obtuvo un aumento de 110.9 unidades en relación con el grupo expuesto vía oral.

Riñón. Los cambios observados en los tres grupos de experimentación fueron significativamente diferentes. El grupo con exposición posterior a HgCl_2 presentó una disminución de 236 unidades en relación con el grupo tratado con $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ durante cuatro meses. El grupo expuesto vía ip a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ disminuyó 76 unidades en relación con el grupo expuesto a plomo por cuatro meses. Entre los grupos tratados con HgCl_2 se encontró concentración de ERO's mayor en el expuesto vía ip, siendo la diferencia de 160 unidades en relación con el grupo expuesto vía oral.

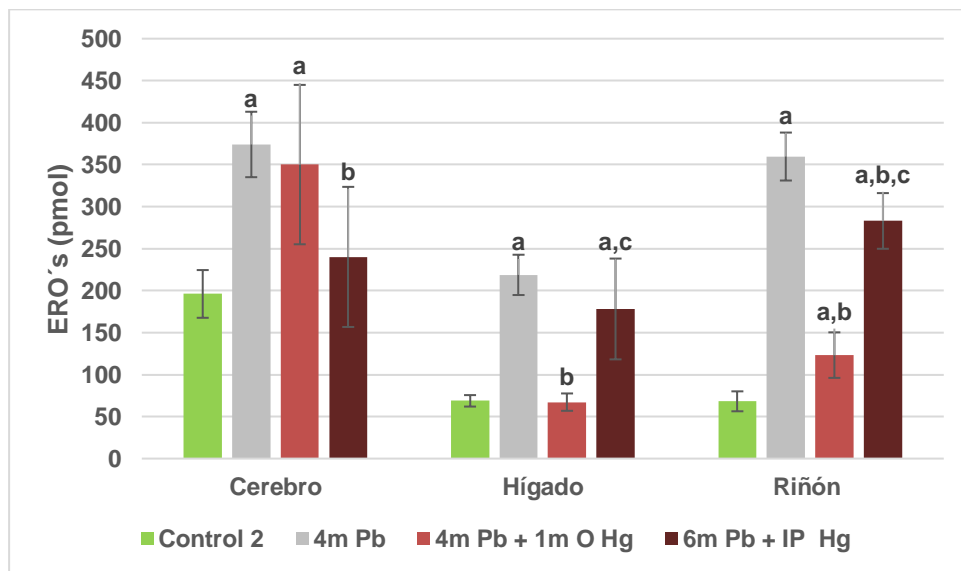


Figura 11. Determinación de ERO's en cerebro, hígado y riñón (n=4 a 6). Los resultados se muestran con media \pm desviación estándar. ^ap<0.05 vs control 2, ^bp<0.05 vs 4m Pb (exposición inicial), ^cp<0.05 vs 4m Pb + 1m O Hg (exposición posterior con HgCl_2 vía oral). Ajustado a 1 mg/mL de proteína.

Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en órganos. La Figura 12 muestra los resultados obtenidos en los órganos riñón, hígado y cerebro de los animales de los diferentes grupos de estudio.

Cerebro. El grupo que presentó mayor actividad fue el grupo expuesto a HgCl₂ vía oral. Este grupo aumentó 6.33 unidades la actividad al compararla con el grupo preexpuesto a Pb(C₂H₃O₂)₂ por cuatro meses y de 3.7 unidades con respecto al grupo expuesto vía ip a HgCl₂. Al comparar el grupo con tratamiento inicial a Pb(C₂H₃O₂)₂ y el grupo expuesto a HgCl₂ vía ip se observó que este último aumentó 2.6 veces su actividad.

Hígado. Solo el grupo expuesto con HgCl₂ vía oral presento diferencia significativa respecto al resto de los grupos, mostrando un ligero aumento.

Riñón. La actividad de GST registrada para los grupos preexpuesto a cuatro meses con Pb(C₂H₃O₂)₂ y grupo tratado posteriormente vía ip a HgCl₂ no mostraron diferencia significativa. Al comparar el grupo con exposición inicial y él tratado con HgCl₂ vía oral se observó un aumento de 9.8 unidades de actividad en relación con el grupo de exposición por cuatro meses a Pb(C₂H₃O₂)₂ y de 6.8 en relación con el expuesto vía ip a HgCl₂. Además, se detectó un aumento significativo en la actividad entre el control y los grupos tratados vía oral e ip con HgCl₂.

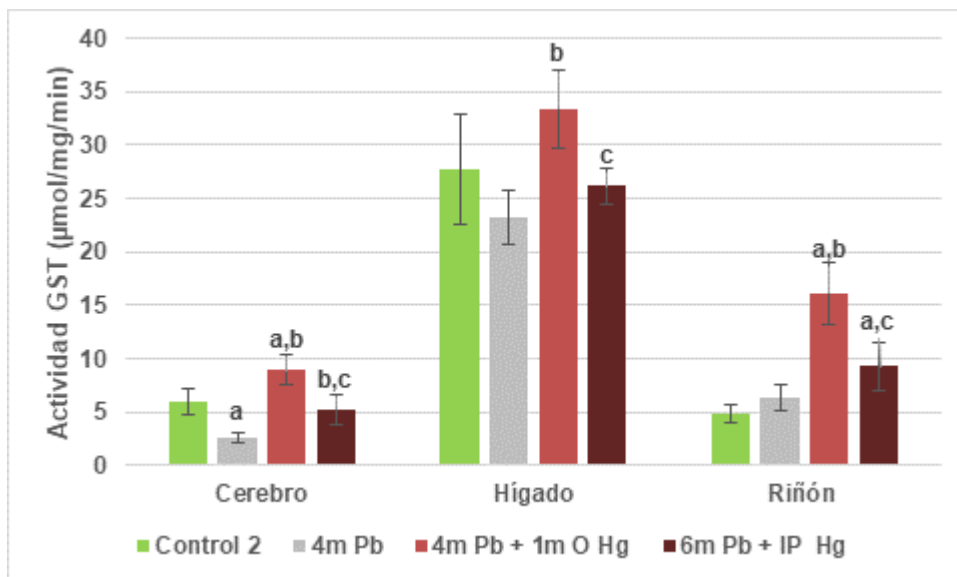


Figura 12. Actividad de GST en cerebro, hígado y riñón. Los resultados se muestran con media ± desviación estándar. ^ap<0.05 vs control 2, ^bp<0.05 vs 4m Pb (exposición inicial a Pb(C₂H₃O₂)₂ 1000 ppm), ^cp<0.05 vs 4m Pb + IP Hg (grupo con exposición posterior a HgCl₂ vía oral).

Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en suero y orina. Al analizar los datos de la Tabla 14 se observó que en el suero la actividad de la enzima solo presento diferencia significativa con respecto al resto de los grupos, observándose una disminución. En el caso de la orina los resultados encontrados fueron diferentes estadísticamente en los 4 grupos. Se observó un aumento de 0.28

unidades entre los grupos con exposición inicial a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ y el grupo expuesto a HgCl_2 vía oral, y de 0.5 unidades entre el grupo con exposición inicial y el grupo expuesto a HgCl_2 vía ip.

Tabla 14. Actividad de GST en suero y orina de los grupos expuestos a metales (n= 4 a 6). Las actividades se representan con media \pm desviación estándar. ^ap<0.05 vs control 2, ^bp<0.05 vs 4 meses a 1000 ppm de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, ^cp<0.05 vs 4 meses a 1000 ppm de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ más 2.5 mg/kg de HgCl_2 vía oral. Ajustado a 1 mg/mL de proteína.

Grupo	Control 2	4 meses a 1000 ppm de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (g)	4 meses a 1000 ppm de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ más 2.5 mg/kg de HgCl_2 vía oral (g)	6 meses a 1000 ppm de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ más 2.5 mg/kg de HgCl_2 vía ip (g)
Suero	1.53 \pm 0.17	1.19 \pm 0.07 ^a	1.66 \pm 0.26 ^b	1.61 \pm 0.06 ^b
Orina	1.60 \pm 0.16	0.74 \pm 0.06 ^a	1.02 \pm 0.05 ^{a,b}	1.24 \pm 0.12 ^{a,b,c}

Actividad de la enzima Catalasa en los órganos A diferencia de los apartados anteriores, en estos grupos experimentales se detectó un cambio significativo en la actividad de la enzima Catalasa en la mayoría de los órganos de los tres grupos. La Tabla 15 muestra los resultados obtenidos.

En el riñón, al comparar los datos obtenidos en el grupo preexpuesto a plomo y grupo expuesto vía oral a HgCl_2 se puede observar que en relación con el grupo expuesto solo a plomo existió un aumento de 5 pmol de actividad y en comparación con el expuesto vía ip a HgCl_2 la diferencia fue de 6 unidades.

Hígado. En este órgano el grupo expuesto a mercurio vía oral mostró un comportamiento diferente y significativo en relación con los otros dos grupos. Al compararlo con el grupo tratado a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ se observó que la diferencia de 7 unidades fue significativa. Cuando se comparó con el grupo expuesto a mercurio vía oral, la diferencia fue de 6 pmol de actividad.

En cerebro, el grupo expuesto de forma oral a HgCl_2 presentó diferencia al compararlo con los dos grupos restantes. En el caso del grupo expuesto a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, la diferencia fue de seis unidades y en el caso del grupo expuesto a HgCl_2 vía ip, el valor fue de 4 unidades de actividad.

Tabla 15. Actividad de Catalasa de los grupos expuestos a metales (n= 4 a 6). Las actividades se muestran con media \pm desviación estándar. ^ap<0.05 vs Control 2, ^bp<0.05 vs 4 meses a 1000ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂, ^cp<0.05 vs 4 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ más 2.5 mg/kg de HgCl₂ vía oral. Ajustado a 1mg/mL de proteína.

Grupo	Control 2	4 meses a 1000ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ (pmol/mg/min)	4 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ más 2.5 mg/kg de HgCl₂ vía oral (pmol/mg/min)	6 meses a 1000 ppm de Pb(C₂H₃O₂)₂ más a 2.5 mg/kg de HgCl₂ vía ip (pmol/mg/min)
Riñón	110.92 \pm 3.42	106.89 \pm 1.68	111.77 \pm 2.89	105.38 \pm 0.84 ^{a,c}
Hígado	110.42 \pm 2.96	109.37 \pm 5.73	108.32 \pm 3.70	102.97 \pm 2.35 ^a
Cerebro	108.80 \pm 1.76	105.92 \pm 4.51	111.66 \pm 1.81 ^b	107.54 \pm 1.74

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para lograr sobrevivir, los seres vivos han logrado desarrollar distintos mecanismos de supervivencia. Las investigaciones realizadas en base a los fenómenos de adaptación se han obtenido mediante métodos netamente observacionales como es el caso del científico Charles Darwin (Darwin, 1921; Ginnobili, 2010) o mediante estudios que implican técnicas avanzadas de biología molecular en donde se conocen los cambios en la expresión de algunos genes implicados en estos procesos (Suarez, 2002; López, 2011).

Durante la preexposición a 1000 ppm de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ por cuatro meses desde el desarrollo embrionario hasta culminar el tratamiento, las ratas de la cepa Wistar no presentaron efectos sistemáticos observables, por ejemplo, la disminución en la tasa de nacimiento o defectos motores. Aunque en este caso no se determinó la concentración de Pb^{2+} en sangre se puede sugerir que bajo el esquema de intoxicación empleado los animales pudieron resistir la presencia del metal debido, posiblemente, a algunos procesos como el aumento de la absorción y el depósito del metal en sistemas como el óseo, el renal y el hepático que representan órganos blanco de la acción del metal. También podría ser que proteínas o moléculas que presentan afinidad por el metal pudieron unirlo. Con cualquiera de las dos opciones, lo que se obtendría sería una disminución en la concentración de plomo libre, el cual en forma de catión constituye la forma reactiva y tóxica del metal. Se ha reportado que el plomo, en mujeres embarazadas, atraviesa la placenta a partir de las 12 a 14 semanas de gestación y que, al avanzar el embarazo, la concentración de plomo puede ser igual en la madre y en el feto. El plomo no solo se puede depositar en el sistema óseo de la madre, sino también en el del feto (Curros et al., 1999). Durante el embarazo y en la vida temprana del feto, se pueden suscitar exposiciones oportunistas y diferenciales, las cuales pueden desencadenar enfermedades en el feto en desarrollo. Los mecanismos placentarios responsables de la regulación de la absorción y excreción de elementos durante el embarazo no se comprenden completamente (Riess y Halm, 1999; Rudge et al., 2009). Se sugiere que las células endoteliales inmaduras que forman los capilares del cerebro en desarrollo son menos resistentes a los efectos del plomo, permitiendo que los fluidos y los cationes (Pb^{2+} , otros), lleguen a los componentes recién formados, en particular los astrocitos y las neuronas; además, la capacidad de los astrocitos y las neuronas de secuestrar el Pb^{2+} en forma de complejos de proteínas- Pb^{2+} ocurre solo en las etapas posteriores del desarrollo fetal, lo que permite que el Pb^{2+} en las células cerebrales maduras interactúe con los orgánulos subcelulares vitales, particularmente las mitocondrias, que son la principal fuente de energía celular; también a nivel intracelular afecta los sitios de unión para el calcio, que puede afectar numerosas funciones celulares, incluida la liberación de neurotransmisores (Goyer, 1990). Además, cuando las ratas hembra se encuentran intoxicadas con plomo, el metal pasa vía circulatoria del hueso al feto

atravesando la barrera transplacentaria y provocando daños neurológicos, hematológicos y de otros órganos (Azcona et al., 2015). Carmichael y colaboradores (1981) expusieron ratas preñadas con tratamiento oral a concentraciones de 300, 600, 1000, 2000, 3000 y 4000 ppm, analizando la cantidad de Pb^{2+} en sangre presente en la rata hembra encontrando $138.7 \pm 28.4 \mu g Pb^{2+}/100 ml$ después del parto, mientras en las crías se obtuvieron $145.1 \pm 39.8 \mu g Pb Pb^{2+}/100 ml$ durante el primer día, posteriormente determinaron Pb^{2+} en sangre a los 21 días después del parto obteniendo un valor de $85.4 \pm 25.3 \mu g Pb^{2+}/100 ml$, una disminución de Pb^{2+} en sangre de $59.7 \mu g Pb^{2+}/100 ml$, este efecto lo observaron desde las concentraciones de 300 ppm hasta la concentración de 3000 ppm, solo en la concentración de 4000 ppm, cantidad de Pb^{2+} en sangre resulto semejante a la cantidad de Pb^{2+} observado al primer día. Este estudio demuestra que durante el desarrollo de la rata, se empiezan a formar y funcionar los órganos y sistemas que inicialmente no se encontraban desarrollados, es por eso que se observó la disminución de la concentración de Pb^{2+} en sangre después que las ratas empezaron a crecer, ya que se fueron depositando en órganos blanco como hígado, huesos, dientes y en menor proporción en otros tejidos, ya que el Pb^{2+} es difícil de excretarse y permanece en tiempos muy prologados en el cuerpo (Poma, 2008).

Las ratas preexpuestas a acetato de plomo ($Pb(C_2H_3O_2)_2$) no mostraron diferencias en su comportamiento cuando fueron comparadas con los controles, lo que puede indicar que el organismo de este grupo de animales pudo poner en marcha alguno de los mecanismos celulares tendientes a disminuir la cantidad de metal libre como la unión a moléculas, el depósito en órganos blanco o haber desarrollado algún proceso de reparación de funciones. Se ha reportado que en niños el nivel de aprendizaje disminuye por efecto de la exposición con Pb^{2+} , lo que se les caracteriza por déficit en el nivel cognitivo. Lo anterior es debido a que el sistema nervioso es más susceptible al daño provocado por el metal, ya que la barrera hematoencefálica no está completa hasta aproximadamente 36 meses de edad. Sin embargo, dentro de los estudios se han detectado niños saludables, en los cuales no se han identificado daños por plomo a nivel neuronal, lo cual indica que la susceptibilidad individual es un proceso determinante dentro del fenómeno de la intoxicación con plomo (Lanphear et al. 2005).

Los resultados de este trabajo reportaron aumento de peso corporal y de los órganos provocado por la intoxicación con $Pb(C_2H_3O_2)_2$. Este efecto fue reportado por Sun y colaboradores (2015) quienes relacionaron la obesidad con la exposición a plomo. Ellos propusieron que el mecanismo responsable de provocar el aumento de peso en la exposición a Pb^{2+} en ratas adultas fue la metilación del ADN. Este proceso se ha sugerido como un mecanismo regulatorio de la obesidad.

También encontraron un aumento de triglicéridos hepáticos en ratas tratadas a una concentración de 0.005 % de Pb^{2+} .

Cuando se determinaron los analitos en el examen general de orina del grupo preexuesto, se observaron pocas variaciones en relación con el grupo control. En contraste, en el caso del grupo tratado con dosis ip a $HgCl_2$, después de la exposición a cuatro meses con plomo se observaron niveles elevados de leucocitos, lo que indica una posible relación entre la exposición al metal y un estado alterado de la salud relacionada, posiblemente con la leucopoyesis de órganos linfoides o con procesos de infección desarrollados en los organismos de estudio (Okediran, et al, 2017). La sal de mercurio usada en este trabajo, al ser soluble en agua, pudo provocar un efecto más directo en el riñón. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que el mercurio puede precipitar muchas de las proteínas sintetizadas por la célula, además de inhibir la acción de los grupos sulfhidrilo (-SH) de varias enzimas esenciales. En estado iónico, se fija a los grupos celulares ricos en grupos -SH (proteínas, péptidos de bajo peso, y aminoácidos) (Perottoni J., et al, 2004) alterando varios sistemas metabólicos y enzimáticos de la célula e inhibiendo la síntesis de proteínas en la mitocondria afectando, de esta manera, su función energética. En el riñón, la exposición a plomo puede disminuir la actividad de las fosfatasas alcalinas de los túbulos proximales y alterar el transporte de K^+ y el funcionamiento de la ATP-asa membranal (Ramírez, 2008). Alguno o algunos de los mecanismos anteriores, fueron posiblemente los responsables de que entre el 50 y el 75 % del grupo expuesto a cloruro de mercurio vía ip presentara proteinuria y glucosuria elevada, sin embargo y aún cuando solo el 50% de la población murió, el otro 50% sobre vivió, reflejando, posiblemente que la exposición crónica a baja dosis de plomo desde la concepción le proporcionó a estos roedores la capacidad de soportar la exposición a mercurio. Se debe resaltar que este esquema de intoxicación con cloruro de mercurio, sin tratar a los animales previamente con plomo, se ha usado en trabajos relacionados con el grupo de investigación de la UNPA, observándose una tasa de mortalidad del 100%. En contraste, el grupo al cual se le administró el $Pb(C_2H_3O_2)_2$ por vía ip presentó resultados en el examen general de orina con daños menores.

En relación con las especies reactivas de oxígeno (ERO's) en los órganos riñón, hígado y cerebro, se encontraron niveles diferentes. En el cerebro de los animales tratados con $HgCl_2$ por vía ip hubo un aumento de 98.88 pmoles de ERO's en relación con el grupo expuesto a $Pb(C_2H_3O_2)_2$ por la misma vía. En el riñón, se encontró un aumento significativo de 99.26 pmoles en el grupo expuesto a mercurio con respecto al grupo intoxicado con plomo por vía ip. El estrés oxidativo se ha asociado a gran cantidad de factores como la exposición a Pb^{2+} . Es posiblemente debido a ello que en la preexposición por 4 meses a plomo se observó un aumento de 162.88 pmoles de especies reactivas

de oxígeno con respecto al grupo control. Sin embargo, al exponerse los animales posteriormente a la dosis ip de 2.5 mg de plomo por Kg de peso, la concentración de ERO's disminuyó aproximadamente 190.65 pmoles. En el tratamiento oral se obtuvo una ligera diferencia observada en el grupo tratado con HgCl_2 pero no en el tratamiento con $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, aquí se mantuvo la cantidad de ERO's con respecto al control. Este comportamiento no se asemeja a los encontrados a Okediran y colaboradores quienes observaron una tendencia en la relación de concentración de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ y la generación de especies reactivas de oxígeno, si se aumentaba la concentración del metal, también aumentaba la cantidad de especies reactivas de oxígeno (Ulberth y Franz, 2000). La disminución de la cantidad de EROS se asocia a una menor lipoperoxidación (Sivaprasad, et al 2004).

Estrés oxidativo y peroxidación lipídica han sido asociados, al analizar muestras de hígado y riñón, con el aumento de EROS; indicando que el sistema antioxidante no es capaz de metabolizar las especies químicas generadas por el contacto directo del plomo con lípidos o proteínas. Gracias al sistema antioxidante presente en las células, estas se protegen contra la peroxidación mediante la conversión de compuestos reactivos a menos dañinos o a su conversión en metabolitos inofensivos. (Ozturk-Urek et al, 2001).

Coffigny y colaboradores (1994), estudiaron los efectos de la intoxicación por Pb^{2+} durante el embarazo en ratas Sprague-Dawley hembras a las que les hicieron inhalar 5 mg/m^3 de óxido de plomo 13 días durante la gestación. Además, observaron que cuando los machos y hembras, se aparearon, su fertilidad era normal, sin aumento en la muerte prenatal o malformaciones, y sin cambios en el tamaño o la proporción de sexos de sus crías, con estos resultados ellos encontraron que la intoxicación con óxido de plomo no provoca perturbación en la función reproductiva de las crías. Cuando los animales fueron expuestos cuatro meses a $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ y posteriormente 1 mes más con mayor concentración de plomo, estos no presentaron diferencia en el peso corporal ni en el cerebro, sin embargo, en el caso del riñón y del hígado si se observaron diferencias, ya que estos órganos tienden a acumular el metal (Emanuelli et al., 1996; Guimarães et al., 2012) y son los que se encuentran implicados dentro de los mecanismos fisiológicos que emplean los organismos para tratar de eliminar las sustancias xenobióticos (George et al., 2017). Esta observación se pudo comprobar al analizar el contenido de ERO's en estos órganos riñón e hígado, mostraron mayor contenido de especies químicas en relación con el grupo control y la actividad de la enzima GST fue mayor también en estos órganos. Lo que indica que la relación entre especies reactivas de oxígeno y actividad de la enzima se conservó (Oztürk, y Gümüşlü, 2004). Los animales presentaron porcentajes bajos de proteína y sangre en orina que no resultaron significativos, los demás analitos fueron semejantes al grupo control. Lo anterior podría indicar que la preexposición a plomo durante el

tiempo de cuatro meses pudo ayudar a los animales a desarrollar condiciones celulares y metabólicas que le ayudaron a tolerar una concentración cinco veces mayor del mismo metal. En este caso se podría confirmar lo anterior al llevar a cabo una serie de determinaciones como el contenido de moléculas con grupos sulfhidrilo (proteínas como metalotioneínas, glutatión y aminoácidos como la cisteína), el contenido de polifosfatos, la existencia de transportadores membranales encargados de la eliminación del metal, la formación de cuerpos de inclusión, procesos de reparación de daño o el estado de las enzimas antioxidantes presentes a nivel celular.

Entre los mecanismos de defensa celular se puede mencionar el sistema antioxidante y el metabolismo de los xenobióticos, los cuales se encuentran relacionados con la finalidad de disminuir el daño provocado por las especies químicas generados dentro del metabolismo de la misma célula. El sistema de defensa antioxidante está dividido en enzimático y no enzimático. El sistema de defensa antioxidante enzimático está formado por tres enzimas especializadas que trabajan en cadena para desactivar selectivamente radicales libres, además, constituye la primera y mejor línea de defensa contra los radicales libres. Está constituido por las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa; además otras tres enzimas, glutatión reductasa, glutatión-S-transferasa y Γ -glutamil cisteinil sintetasa, sin ser estrictamente enzimas antioxidantes, colaboran indirectamente con la enzima glutatión peroxidasa ya que contribuyen a regular los niveles de glutatión reducido; uno de los principales antioxidantes celulares no enzimáticos (Lobo, et al., 2010; Birben et al., 2012). En este trabajo se determinó la actividad de la enzima catalasa en los órganos hígado, riñón y cerebro, a través de la capacidad de descomposición del peróxido de hidrogeno, obteniendo como resultado que no existió variación en los datos, ya que gran parte de ellos no represento diferencia significativa con respecto al control. Este resultado muestra que la actividad de la catalasa fue la misma en gran parte de los órganos, demostrando que posiblemente el Hg^{2+} logró inhibir a la enzima, para así no realizar su función protectora (Benov et al., 1990). Las especies reactivas de oxígeno ayudan a dilucidar la capacidad de reacción de las enzimas antioxidantes, además es muy conocido que se utilizan como biomarcadores de daño oxidativo. La cantidad de EROS en el cerebro de los animales tratados por vía oral muestran diferencia significativa entre el grupo de exposición inicial más tratamiento oral con $Pb(C_2H_3O_2)_2$ con respecto al grupo control (el doble de la cantidad de ERO's), mientras que en el tratamiento ip con acetato de plomo no existió diferencia significativa con respecto al grupo control.

Cuando la segunda exposición fue a mercurio por vía ip los cerebros mostraron mayor denotando una mayor susceptibilidad. La catalasa juega un papel importante en la protección de las células del estrés oxidativo (Hussain et al., 1999). Se ha propuesto que el ion Hg^{2+} se une con grupos tiol y, por lo

tanto, agota el tiol intracelular, especialmente el glutatión, lo que provoca estrés oxidativo celular o predisposición a las células a dicho estado de estrés (Gstraunthaler et al., 1983) en el cual la formación de radicales libres aumenta e induce la peroxidación lipídica. El daño molecular de las células en la toxicidad del Hg^{2+} se debe a la formación de radicales peroxilo que también pueden formarse en sistemas lipídicos y no lipídicos como proteínas (Schara et al., 2001). En los diferentes grupos de experimentación se pudo observar que la actividad de la enzima catalasa permaneció prácticamente sin cambios. Solo los grupos expuesto vía ip u oral a mercurio mostraron cambios significativos en la actividad de la enzima. En el primer caso la actividad disminuyó y en el segundo aumentó, lo cual indica que la vía de administración juega un papel importante, ya que la primera asegura una concentración mayor en los órganos blanco que la segunda, por lo cual los animales expuestos a mercurio vía ip pudieron aumentar el daño oxidativo y dañar directamente la funcionalidad de la enzima. En el caso de la exposición oral, posiblemente el aumento de la dosis de forma gradual pudo activar ya sea la síntesis de la enzima o la actividad de la misma con la finalidad de proteger a las células del daño oxidativo adicional.

Relacionado con las observaciones anteriores, el grupo de Jha y colaboradores evaluaron el efecto prooxidativo y neurotóxico con dosis 0.25 mg/kg de $HgCl_2$ en ratas Wistar, encontrando una disminución significativa de la actividad enzimática de la catalasa con respecto al control, mostrando daño directo del mercurio hacia la enzima catalasa, con este resultado, observaron que las enzimas del sistema antioxidante cumplen un papel muy importante en la defensa celular. Las células intentan contrarrestar el estrés oxidativo utilizando el sistema de defensa de primera línea, sin embargo, una exposición aguda al Hg^{2+} puede inducir una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes y la lipoperoxidación (Teixeira et al., 2018; Salazar-Flores et al., 2019). A diferencia de la dosis utilizada en la descripción anterior, en el tratamiento empleado en el grupo ip con cloruro de mercurio fue 10 veces más la concentración usada por los autores (2.5 mg/kg). Los estudios de Jha y colaboradores refuerzan las graves consecuencias de la susceptibilidad al Hg^{2+} en el cerebro e indican que pueden conducir al deterioro del funcionamiento del mismo, además observaron una arquitectura estructural normal en el grupo de control, mientras que el grupo administrado con Hg^{2+} mostró cambios degenerativos, necrosis, edema perivascular y degeneración de neuronas (Jha et al., 2019).

Se han reportado una gran variedad de compuestos antioxidantes exógenos, los cuales actúan a favor de compuestos oxidables (ADN, proteínas, lípidos). Esta batería de compuestos se oxida antes para retrasar, inhibir o prevenir su oxidación en la producción de radicales libres o los efectos deletéreos de éstos (Kurutas, 2015). Este sistema incluye una larga serie de compuestos de bajo

peso molecular, siendo los más importantes el glutatión reducido, la vitamina E (α -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico) y la vitamina A (trans-retinol/ β -caroteno), los flavonoides, ácidos fenólicos, ácido α -lipóico, ácido úrico, bilirrubina, algunos azúcares y aminoácidos, coenzima Q o ubiquinona (Barrantes-Balcazar y Peche-Silva, 2018). El examen general de orina indicó que los niveles de bilirrubina excretados por del riñón fueron de 1 mg/dL en algunos grupos, indicando valores bajos poco significativos, lo que sugiere que no se encontró un daño directo en el hígado. En los resultados no hay valores que indiquen daño en el hígado, sin embargo, con estos datos no se puede afirmar que la bilirrubina y el resto del sistema antioxidante hayan sido las principales moléculas activadas ante el ataque de las especies reactivas de oxígeno generadas durante la inducción con acetato de plomo. Dobrakowski y colaboradores, evaluaron a trabajadores expuestos al Pb^{2+} de forma subcrónica y crónica, investigaron la influencia del Pb^{2+} en las defensas antioxidantes no enzimáticas, incluidos el ácido úrico y los niveles de quimiocinas, que pueden estar relacionados con las propiedades inmunomoduladoras tanto del Pb^{2+} como del ácido úrico, encontrando que los niveles de ácido úrico y bilirrubina fueron significativamente más altos después de una exposición subcrónica al Pb^{2+} en comparación con el valor inicial en un 22 y un 35%, respectivamente (Dobrakowski et al., 2014). La bilirrubina es el producto final de la degradación del hemo. El hemo es convertido por la hemo oxigenasa en biliverdina, que a su vez se reduce a bilirrubina por la biliverdina reductasa. Se ha demostrado que la bilirrubina tiene un fuerte potencial antioxidante contra los radicales peroxilo; sin embargo, también podría ejercer efectos tóxicos cuando está presente en exceso (Fuhua et al., 2012; Annabi et al., 2007). Uno de los principales puntos a favor del examen general de orina, es que muestran que no hubo excreción elevada de bilirrubina en orina, indicando que no hubo, en primer lugar, una alteración grave en la síntesis del grupo HEMO o que no fue necesario que este sistema antioxidante no enzimático influyera en la regulación del estrés oxidativo originado por el esquema de intoxicación empleado. Estudios en animales han mostrado niveles elevados de bilirrubina como resultado de la exposición al Pb^{2+} . Tal elevación podría ser beneficiosa debido a sus propiedades antioxidantes. Por lo tanto, un nivel alto de bilirrubina podría contribuir a la elevación del valor de capacidad antioxidante total de la célula (Noriega et al., 2003).

Por último, otro de los sistemas de defensa celular es el metabolismo de los xenobióticos, el cual está formado por dos fases: la primera de conversión a compuestos hidrofílicos y la segunda de unión para posterior eliminación. En este trabajo se evaluó la actividad de la enzima glutatión s-transferasa, proteína perteneciente a la segunda fase, en los órganos riñón, cerebro e hígado. Los resultados de este trabajo indicaron que el grupo expuesto por vía oral y por vía ip a $HgCl_2$ fueron más susceptibles con respecto a los intoxicados con $Pb(C_2H_3O_2)_2$ por vía oral en la mayoría de los

órganos. Por vía ip se observó mayor susceptibilidad hacia la sal de mercurio que a la de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ en cerebro y riñón.

Se ha reportado que el cloruro de mercurio entra en contacto directo con los grupos tioles de las biomoléculas, lo que genera que los organismos vivos sufran un daño directo en las enzimas metabólicas; aumento de los productos de oxidación e inhibición de las enzimas antioxidantes (Jan et al., 2015; Sharma et al., 2014; BAS et al., 2015). En muchos estudios se ha encontrado un aumento significativo en la generación de especies reactivas de oxígeno con respecto a la intoxicación con Pb^{2+} y Hg^{2+} (Tchounwou et al., 2012; Ercal et al., 2001). BAS y colaboradores encontraron un mayor aumento en la generación de ERO's, además observaron que este fenómeno provocaba la disminución de las actividades de las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa en cerebro. En la actividad de la enzima GST y catalasa observaron que se encontraban más inhibida con HgCl_2 respecto al grupo intoxicado con nitrato de plomo (BAŞ et al., 2015). En respuesta al peligro representado por los contaminantes ambientales, las células buscan contrarrestar utilizando como medios de protección a las enzimas antioxidantes y detoxificadores (Valavanidis et al., 2006). La actividad de la enzima GST se ha encontrado disminuida significativamente en el riñón de ratas macho y hembras, mientras en el hígado aumentó la actividad del enzima, las diferencias en las respuestas de la enzima antioxidante después de la exposición al Pb^{2+} pueden ser una respuesta compensatoria a la acumulación de Pb^{2+} diferente en los órganos (Alghazal et al., 2008).

Algunos investigadores han propuesto que la susceptibilidad hacia la intoxicación con este metal podría estar relacionada con algunos determinantes genéticos entre ellos los genes que codifican para el enzima ácido δ -aminolevulínico deshidratasa, el gen para el receptor de vitamina D, el gen de la hematocromatosis, debido a que el metabolismo en el cual participan los productos codificados por estos genes se relaciona con procesos que pueden favorecer los efectos del Pb^{2+} . En el caso del primer gen se ha reportado que sus isoformas pueden afectar los niveles de Pb^{2+} en sangre y en hueso en humanos. El segundo también puede afectar la acumulación en hueso y el tercero podría interferir en la absorción del metal (Onalajá y Claudio, 2000; Tian et al., 2013; Szymanska-Chabowska et al., 2015). En los años 2017 y 2018 un grupo de investigadores chinos realizaron investigaciones en humanos expuesto a Pb^{2+} en su país y encontraron que existen dos posibles genes implicados en la susceptibilidad hacia el metal. El primero se conoce como HOTAIR y se ha involucrado en la alteración del nivel de estrés oxidativo, la proliferación celular, la progresión del ciclo celular y la apoptosis. El segundo se ha asociado como un gen crítico involucrado en los procesos de desarrollo, proliferación, diferenciación y también apoptosis y se conoce como Exportina-5. Los

investigadores han propuesto que el Pb^{2+} puede alterar la expresión de los mismos y por ello desencadenar daños en los procesos celulares antes mencionados (Zhang et al., 2017; Lin et al., 2018).

En este trabajo se ha podido observar que la exposición previa a plomo a una concentración de 1000 ppm por vía oral durante el periodo de la gestación, la lactancia y los primeros dos meses de vida condicionó a los animales a tolerar concentraciones mayores de las sales inorgánicas de plomo y mercurio por las vías intraperitoneal y oral. Estas vías de administración implican diferentes dinámicas toxicocinéticas de los metales en el organismo, por lo cual implican daños diferentes a los mismos. El hecho de haber obtenido el 50% de sobrevivencia en animales expuestos a mercurio por vía ip, indica que si bien, los daños mencionados anteriormente por el metal estuvieron presentes, también se pudieron generar condiciones celulares que permitieron que esos animales de estudio sobrevivieran. De ahí la necesidad de establecer una serie de estudios tendientes a explicar que procesos se desencadenaron tanto en el aspecto toxicológico como en el de resistencia.

Las sales de mercurio afectan directamente al riñón, este metal tiene gran afinidad por los grupos tioles (-SH) de las proteínas, estos grupos son tan abundantes que solo le permiten una breve presencia en estado iónico, además el Hg^{2+} se une también a grupos fosfato, carboxilo, amida y amina (Ramírez, 2008). Los resultados indicaron en el grupo ip con $HgCl_2$ representó un 50% de animales sobrevivientes, valores logrados por el aumento del tiempo y el número de individuos a comparación con el 100% de mortalidad en estudios de animales sin preexposición. Los animales aumentaron de peso, así como el hígado y el riñón quienes mostraban tejido graso en exceso, éste puede ser un mecanismo de defensa para tratar de acumular metal y disminuir su toxicidad, se ha reportado que la exposición por plomo puede ser un factor por el aumento de peso (Guimarães et al., 2012; Sun et al., 2017). Cuando se determinaron los ERO's se vio que éstos no disminuyeron con respecto al grupo control ya que se esperaba que aumentaran al administrar el Hg^{2+} (Jha et al., 2017).

Durante el proceso de crecimiento la cantidad de ERO's aumenta, ya que las células envejecen (Luceri et al. 2018). Por tanto, en el resultado mostrado anteriormente el grupo de ratas tratadas con $HgCl_2$, tenían 2 meses más de edad con respecto a los grupos de 4 meses, esto debió provocar el aumento de la cantidad de EROS, también al exponerse posteriormente con cloruro de mercurio, pero ese efecto no se observó. Los sistemas celulares están bien protegidos de las lesiones inducidas por ERO's mediante una serie de defensas compuestas de varios antioxidantes con diferentes funciones, cada vez que las EROS presentes en el sistema celular dominan estos sistemas de defensa, causan estrés oxidativo o daño celular, lo que lleva al desarrollo de enfermedades (Lakshmi et al., 2013). Se sabe que el aumento de la formación de las especies dependiente de la edad se acompaña por una pérdida de grupos tiol, degradación de triptófano y

aumento de la peroxidación lipídica, además de los complejos I y II, otros sitios mitocondriales pueden contribuir a la generación acelerada de estas especies y al daño oxidativo durante el envejecimiento (Kuka et al., 2013).

Kenston y colaboradores (2017), expusieron ratas Sprague Dawley por vía oral una dosis de mezclas los metales pesados (HMM) zinc, cobre, manganeso, cromo, níquel, cadmio, plomo y mercurio, los ocho metales pesados detectables más comunes en el área de Ningbo, China. Las ratas los observaron durante 4 semanas registrando el momento de la muerte y el tiempo de supervivencia de los animales. Concluyeron que la mortalidad podría deberse a la precipitación de metales en el grupo de dosis alta o al efecto protector de la mayor proporción de cobre, zinc y manganeso en el grupo de 1000 mg por kg de peso corporal comparado a la proporción en el grupo de 464 mg/kg de peso corporal que puede tener un efecto protector relativamente menor. Algo similar ocurrió en nuestro grupo expuesto con HgCl_2 , a diferencia de la cantidad de sal de mercurio orgánico que se usó en el estudio anterior, se utilizó una sal de mercurio inorgánico, a dosis baja.

Cruz en el año 2016, observo la mortalidad en cuestión de horas. El efecto de la toxicidad del cloruro de mercurio se vio más reflejado en el tratamiento con HgCl_2 vía intraperitoneal que en la vía oral. Se debe destacar que a cantidad de cloruro de metilmercurio (mayor toxicidad que el HgCl_2) que se administró por el tratamiento vía oral en el trabajo de Kenston fue superior a los 2.5 mg/kg empleados en este trabajo, además de que el tiempo de mortalidad en los animales de este trabajo sucedió en cuestión de horas y la vía de administración fue más directa (Cruz, 2016). Además otro de los puntos interesantes que se observó en el examen general de orina fue el aumento de los leucocitos, proteinuria elevada, presencia de nitritos, glucosa y cetonas en el 50% de las ratas, generalmente la sal de mercurio se dirige al tracto gastrointestinal y los riñones, lo que induce la precipitación extensa de proteínas de enterocitos, con dolor abdominal, vómitos y diarrea sanguinolenta, un característica observa en las ratas tratadas con la sal de mercurio por disentería, con posible necrosis de la mucosa intestinal. Lo que provocó la muerte de nuestras ratas en el uso de este metal fue por peritonitis o por shock séptico o hipovolémico. Un punto muy importante con respecto a las ratas sobrevivientes es que en el transcurso de los días morían ya que se suele desarrollar necrosis tubular renal con anuria (Bernhoft, 2011), la toxicidad renal con HgCl_2 implica necrosis tubular renal o glomerulonefritis autoinmune, o ambas. Los resultados de este trabajo indican que en ratas la preexposición al Pb^{2+} desde el desarrollo embrionario ayudó a los animales a tolerar satisfactoriamente concentraciones mayores del mismo metal por las vías oral e intraperitoneal.

En el caso del plomo resulta de interés el estudio de los mecanismos de defensa que se podrían estar generando. Calderón ha reportado, en su libro “Contaminación e intoxicación por plomo”, que algunos autores han indicado que en el caso de este metal existen procesos que podrían ayudar a tolerar su presencia en seres humanos. Entre ellos menciona factores tendientes a disminuir la entrada del tóxico a la célula, a sacarlo de la misma, su unión con moléculas específicas conocidas como ligandos orgánicos e inorgánicos, procesos enzimáticos que pueden disminuir productos generados de forma indirecta por el mismo, procesos de reparación celular y modificación de procesos celulares (Calderón y Vega, 2018). Esto abre un amplio panorama de investigación y puede ayudar a profundizar el estudio de los procesos de tolerancia o sensibilidad a la intoxicación por metales como el plomo.

X. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVA

Las ratas preexpuestas desde el desarrollo embrionario mostraron comportamientos observables similares a los animales no expuestos. El grupo con exposición a cloruro de mercurio vía intraperitoneal presento mayor tolerancia respecto a un trabajo previo (no sobrevivían), gracias al aumento de tiempo de preexposición a acetato de plomo y al aumento de la población, logrando la supervivencia del 50%. La administración de una dosis baja de acetato de plomo con exposición inicial ayudó a disminuir el daño provocado por los tratamientos posteriores, generando mayor tolerancia.

PERSPECTIVAS.

Debido a las observaciones se plantean las siguientes perspectivas:

- ❖ Determinar la concentración de metales en los diversos órganos de estudio de los grupos experimentales para saber si este es un factor determinante dentro del fenómeno observado, de tal suerte que posiblemente la concentración de plomo juegue un papel esencial en el fenómeno estudiado.
- ❖ Evaluar el comportamiento de los animales de los grupos experimentales usando técnicas especializadas y estandarizadas para roedores.
- ❖ Establecer grupos experimentales usando dosis más bajas de mercurio y periodos más largos de exposición a plomo.
- ❖ Establecer grupos experimentales de preexposición a dosis bajas de otros metales pesados para llevar a cabo los ensayos de tolerancia cruzada o de exposición a dosis mayores de los metales iniciales.
- ❖ Realizar análisis de susceptibilidad genética del plomo para saber si en los animales preexpuestos se encuentran involucrados los genes descritos por los diversos investigadores como posibles responsables de la susceptibilidad hacia el metal.
- ❖ Estudiar los posibles mecanismos de defensa que pueden estar implicados en relación con la susceptibilidad al plomo incluyendo la determinación de moléculas de unión de tipo proteico y no proteico, mecanismos de entrada y salida del metal, células u órganos de depósito y mecanismos de reparación, así como ampliar el estudio de las enzimas del sistema antioxidante.

XI. REFERENCIAS

- Ahamed, M., Verma, S., Kumar, A., y Siddiqui, M. K. (2005). Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. *Sci. Total Environ.*, 346, 48–55.
- Agúndez, J. A. G. (2008). Polymorphisms of human N-acetyltransferases and cancer risk. *Current Drug Metabolism*, 9 (6), 520-531.
- Alghazal, M. A., Lenártová, V., Holovská, K., Sobeková, A., Falis, M., y Legáth, J. (2008). Activities of antioxidant and detoxifying enzymes in rats after lead exposure. *Acta Veterinaria Brno*, 77(3), 347–354.
- Annabi Berrahal, A., Nehdi, A., Hajjaji, N., Gharbi, N., y El-Fazâa, S. (2007). Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *Comptes Rendus Biologies*, 330(8), 581–588.
- Arango, S. S. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 30(1), 75-82.
- ATSDR, (2015). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public health service. Atlanta, GA: United State, Department of health and human services.
- Azcona-Cruz, M. I., Ramirez, A. R., y Vicente-Flores, G. (2015). Efectos tóxicos de Pb. *Rev. Esp. Med. Quir.* 20, 72-77.
- Balazs, T. (1974). Development of tissue resistance to toxic effects of chemicals. *Toxicology*, 2, 247-255.
- Balazs, T., Johnson, G., Joseph, X., Ehrreich, S., y Bloom S. (1983). Sensitivity and resistance of the myocardium to the toxicity of isoproterenol in rats. *J. J. Spitzer (ed.)*, 563-564.
- Baş, K., Kalender, S., Karaboduk, H., y Apaydin, F. (2015). The effects on antioxidant enzyme systems in rat brain tissues of lead Nitrate and mercury chloride. *GU. J. Sci.* 28(2), 169-174.
- Baquero, D. L. E., Castro, R. J. A., y Narváez, C. C. E. (2005). Catalasa, peroxidasa y polifendoxidasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). *Fruits: Ripening and senescence. Acta Biológica Colombiana*, 10(2), 49-59.
- Barrantes-Balcázar, M.V. y Peche-Silva, Y. I. (2018). Actividad antioxidante y antihemolítica *in vitro* del liofilizado de *Passiflora incarnata* “maracuyá”. Tesis, Cajamarca, Perú.
- Barret, J. C., Vainio, H., Peakall, D., y Goldstein, B. D. (1997). 12th Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemicals: susceptibility to environmental hazards. *Environmental Health Perspectives*, 105(4), 699-737.
- Bellinger, D. C. (2004). Lead. *Pediatrics*, 113(4), 1016–1022.
- Benov, L. C., Benchev, I. C., y Monovich, O. H. (1990). Thiol antidotes effect on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. *Chemico-Biological Interactions*, 76(3), 321–332.
- Bernhoft, R. A. (2012). Mercury toxicity and treatment: A review of the Literature. *Journal of Environmental and Public Health*, 1–10.
- Biao, Y. X. (2004). Associations of lead toxicity susceptibility with aminolevulinic acid dehydratase and vitamin d receptor gene polymorphisms. *Epidemiology*, 15(4), S138-S139.
- Bijlsma, N., y Cohen, M. M. (2016). Review: Environmental chemical assessment in clinical practice: Unveiling the elephant in the room. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13, 181, 27 págs.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., y Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19.

- Blackburn, A. C., Tzeng, H. F., Anders, M. W., y Board, P. G. (2000). Discovery of a functional polymorphism in human glutathione transferase zeta by expressed sequence tag database analysis. *Pharmacogenetics*, 10(1), 49–57.
- Bolt, H. M., y Kiesswetter, E. (2002). Is multiple sensitivity a clinical defined entity? *Toxicology Letters*. 128, 99-106.
- Brent, J. A. (2006). Review of: medical toxicology. *Interdiscip Toxicol*, 44, 355–355.
- Calderón, S. J. V., Hernández, L. C., Maldonado V. M., y Sáenz R. D. (1993). Mechanisms of the toxic effect of lead free lead in erythrocyte. *J. Exposure Anal Environ. Epidemiol*, 3, 153-164.
- Calderón, S. J. V., y Florido S. A. (1996). La susceptibilidad individual en el estudio de las enfermedades. *Bol. Edu. Bioq.*, 15(2), 74-77.
- Calderón, S. J. V., y Maldonado V. M. (2008). Contaminación e intoxicación por plomo. CIATEC, CENEVAL, Edit. Trillas, 224 p.
- Cao, T., Xu, N., Wang, Z., y Liu, H. (2017). Effects of Glutathione S-Transferase gene polymorphisms and antioxidant capacity per unit albumin on the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–8.
- Caravanos, J., Dowling, R., Téllez-Rojo, M. M. M., Cantoral, A., Kobrosly, R., Estrada, D. y Fuller, R. (2014). Niveles de plomo en sangre en México y su implicación para la carga pediátrica de la enfermedad. *Annals of Global Health*, 80(4), e1-e11.
- Carmichael, N. G., Winder, C., y Lewis, P. D. (1981). Dose response relationships during perinatal lead administration in the rat: A model for the study of lead effects on brain development. *Toxicology*, 21(2), 117–128.
- Cauteren, V. H., y Van, S. F. J. (1996). Cancer risk evaluation. In: Niesink RJM, de Vries J, Hollinger MA (eds). *Toxicology.*, 384-413.
- Ceron, J. J., Tecles, F., y Tvarijonavičiute, A. (2014). Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 74.
- Checa, C. M. A. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.*, 20(3), 213-221.
- Chen, Z., Myers, R., Wei, T., Bind, E., Kassim, P., Wang, G., ... Wang, X. (2014). Placental transfer and concentrations of cadmium, mercury, lead and selenium in mothers, newborns and young children. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 24(5), 537–544.
- Chibowska, K., Baranowska-Bosiacka, I., Falkowska, A., Gutowska, I., Goschorska, M., y Chlubek, D. (2016). Effect of Lead (Pb) on Inflammatory Processes in the Brain. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(12), 2140.
- Cleveland, L.M., Minter, M. L., Cobb, K. A., Scott, A. A., y German V. F. (2008). Lead hazards for pregnant women and children: Part 1: immigrants and the poor shoulder most of the burden of lead exposure in this country. Part 1 of a two-part article details how exposure happens, whom it affects, and the harm it can do. *Am. J. Nurs.*, 108(10), 40–49.
- Coffigny, H., Thoreux-Manlay, A., Pinon-Lataillade, G., Monchaux, G., Masse, R., y Soufir, JC. (1994). *Human and experimental toxicology*, 13, 241-246.
- Cornelis, R. (2005). Handbook of elemental speciation II: species in the environment, food, medicine & occupational health. Wiley, 768 págs.
- Cruz, D. (2016). Actividad de la enzima Glutathion S-Transferasa expuesta a mercurio y micronutrientes. Congreso AMIDIQ.

Cupul, C. W., Heredia, A. G. P., y Rodríguez, V. R. (2016). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática lignolítica de macromiceto del estado de Veracruz, México. *Rev. Int. Contaminación ambiental*, 32(3), 339-351.

Curros, N. C., Mosteiro, P. C., Pavón, B. P., Fernandez, M. J., Seara, A. A. M., y Castro-Gago, M. (1999). Forma grave de intoxicación congénita y postnatal por plomo. *An. Esp. Pediatr.* 50, 496-498.

Darwin, C. (1921). El origen de las especies por medio de la selección natural. Madrid.

Dobrakowski, M., Kasperczyk, A., Pawlas, N., Birkner, E., Hudziec, E., Chwalińska, E., y Kasperczyk, S. (2016). Association between subchronic and chronic lead exposure and levels of antioxidants and chemokines. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 89(7), 1077–1085.

Dong, S. C., Sha, H. H., Xu, X. Y., Hu, T. M., Lou, R., Li, H., y Feng, J. (2018). Glutathione S-transferase π : a potential role in antitumor therapy. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 3535–3547.

Emanuelli, T., Rocha, J. B. T., Pereira, M. E., Porciuncula, L. O., Morsch, V. M., Martins, A. F., y Souza, D. O. G. (1996). Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on σ -aminolevulinatase dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacology & Toxicology*, 79(3), 136–143.

empendium.com. Recuperado de empendium.com/manualmibe/table/B34.27.3-1.

eScholarium, E-tutoring. The way to personalize education. Recuperado de http://eschoform.educarex.es/useruploads/r/c/1874/scorm_imported/53913722278869543372/page_55.html

Ercal, N., Gurer-Orhan, H. y Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress Part. I: Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.*, 1(6), 529–539.

Estrada-Sánchez, D., Ericson, B., Juárez-Pérez, C. A., Aguilar-Madrid, G., Hernández, L., Gualtero, S. y Caravanos, J. (2016). Perdida de coeficiente intelectual en hijos de alfareros mexicanos. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*.

Fairchild, E. J. (1967). Tolerance Mechanisms: Determinants of Lung Responses to Injurious Agents. *Arch. Environ. Health*, 14, 11-126.

Finley, J. (2014). Compositions and methods for the prevention and treatment of diseases or conditions associated with oxidative stress, inflammation, and metabolic dysregulation. Washington, DC: U. S. Patent No.8, 652, 518. U. S. Patent and Trademark Office.

Flora, G., Gupta, D., y Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdiscip. Toxicol.*, 5(2), 47–58.

Flora, S. J. S., Flora, G., y Saxena, G. (2006). Environmental occurrence, health effects and management of lead poisoning. Editors: José S. Casas, José Sordo, Lead. *Elsevier Science B.V.*, 158–228.

Free, A. H. & Free, H. M. (1972). Urinalysis, Critical Discipline of Clinical Science. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 3(4), 481-531.

Fuhua, P., Xuhui, D., Zhiyang, Z., Ying, J., Yu, Y., Feng, T., ... Xueqiang, H. (2012). Antioxidant Status of Bilirubin and Uric Acid in Patients with Myasthenia Gravis. *Neuroimmunomodulation*, 19(1), 43–49.

- Geldmacher-von, M. M. y Diepgen, T. L. (1988). The human serum paraoxonase-polymorphism and specificity. *Toxicol. Environ. Chem.*, 18, 79-196.
- George, B., You, D., Joy, M. S., y Aleksunes, L. M. (2017). Xenobiotic transporters and kidney injury. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 116, 73–91.
- George-Cherian, M., y Nordberg, M. (1983). Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology*, 28(1-2), 1-15.
- Gil, F., y Pla, A. (1998). Biomarkers as biological indicators to xenobiotic exposure (archivo PDF). *Department of legal medicine and toxicology*. Recuperado de <https://www.ugr.es/~fgil/BIOMARKERS.pdf>
- Ginnobili, S. (2010). La teoría de la selección natural Darwiniana. *Theoria*, 67, 37-58.
- Golka, K., Prior, V., Blaszkewicz, M., y Bolt, H. M. (2002). The enhanced bladder cancer susceptibility of NAT2 slow acetylators towards aromatic amines: a review considering ethnic differences. *Toxicology Letters*, 128(1-3), 229–241.
- Globedia. Plomo-gasolina-forma-parte-vidas. Recuperado de <http://es.globedia.com/plomo-gasolina-forma-parte-vidas>.
- Gonzales, J. C., y Guerra, I. R. (2014). El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. *Revista Cubana Farm.*, 48(3), 1561-2998.
- Goyer, R. A. (1990). Transplacental transport of lead. *Environmental Health Perspectives*, 89, 101–105.
- Grandjean, P. (1992). Individual susceptibility to toxicity. *Toxicology Letters*, 64/65, 43-51.
- Grant, L. D. (2008). Lead and compounds. *Environmental Toxicants: Human exposures and their health effects*. 3rd ed. NJ, USA: Wiley, Hoboken, 757–809.
- Gstraunthaler, G., Pfaller, W., y Kotanko, P. (1983). Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. *Biochemical Pharmacology*, 32(19), 2969–2972.
- Guimarães, D., Carvalho, M. L., Gerales, V., Rocha, I., Alves, L. C., y Santos, J. P. (2012). Lead in liver and kidney of exposed rats: Aging accumulation study. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(4), 285–290.
- Gulson, B. L., Mahaffey, K. R., Jameson, C. W., Mizon, K. J., Korsch, M. J., Cameron, M. A., y Eisman, J. A. (1998). Mobilization of lead from the skeleton during the postnatal period is larger than during pregnancy. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 131(4), 324–329.
- Guyatt, G., Sackett, D., Taylor, D. W., Chong, J., Roberts, R., y Pugsley S. (1986). Determining optimal therapy randomized trials in individual patients. *N. Engl. J. Med.*, 314, 889-892.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I. M., y Jakoby, W. B. (1974). The Identity of Glutathione S-Transferase B with Ligandin, a Major Binding Protein of Liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(10), 3879–3882.
- Hallén, I. P., Jorhem, L., y Oskarsson, A. (1995). Placental and lactational transfer of lead in rats: a study on the lactational process and effects on offspring. *Archives of Toxicology*, 69(9), 596–602.
- Hallén, I. P., y Oskarsson, A. (1993). Dose dependent transfer of lead to milk and tissue uptake in suckling offspring studied in rats and mice. *Pharmacology & Toxicology*, 73(3), 174–179.
- Hattis, D., Erdreich, L., y Ballew, M. (1987). Human variability in susceptibility to toxic chemicals--a preliminary analysis of pharmacokinetic data from normal volunteers. *Risk Anal.*, 7(4), 415-26.

- He, N. G., Awasthi, S., Singhal, S. S., Trent, M. B., y Boor, P. J. (1998). The role of Glutathione S-Transferases as a defense against reactive electrophiles in the blood vessel wall. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 152(1), 83–89.
- Hernández M. (2013). Estudio de los efectos del plomo en roedores desde una perspectiva quimiométrica. Tesis de licenciatura en Ciencias Químicas. Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca, México.
- Hoffman, D. J., Heinz, G. H., y Krynitsky, A. J. (1989). Hepatic glutathione metabolism and lipid peroxidation in response to excess dietary selenomethionine and selenite in mallard ducklings. *J. Toxicol. Environ. Health*, 27(2), 263-71.
- Hussain, S., Atkinson, A., Thompson, S. J., y Khan, A. T. (1999). Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 34(4), 645–660.
- Jaishankar, M., Mathew, B.B., Shah, M.S. y Gowda, K. R. S. (2014). Biosorption of few heavy metal ions using agricultural wastes. *Journal of Environment Pollution and Human Health*, 2(1), 1–6.
- Jan, A., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A., Choi, I., y Haq, Q. (2015). Heavy metals and human health: Mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29592–29630.
- Jangid, A. P., John, P. J., Yadav, D., Mishra, S., y Sharma, P. (2012). Impact of chronic lead exposure on selected biological markers. *Indian J. Clin. Biochem.*, 27, 83–89.
- Jha, A., Saidullah, B., y Bubber, P. (2019). A study on prooxidative and neurotoxic effects of mercury chloride in rats. *EC Pharmacology and Toxicology*, 7.2, 112-124.
- Jha, N., Ryu, J. J., Choi, E. H., y Kaushik, N. K. (2017). Generation and role of reactive oxygen and nitrogen species induced by plasma, lasers, chemical agents, and other systems in dentistry. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–13.
- Kalia, K. y Flora, S.J. (2005). Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. *J Occup Health*, 47(1), 1–21.
- Kenston, S. S. F., Su, H., Li, Z., Kong, L., Wang, Y., Song, X.,... Lin, X. (2018). The systemic toxicity of heavy metal mixtures in rats. *Toxicology Research*, 7, 396-407
- Kuka, S., Tatarkova, Z., Racay, P., Lehotsky, J., Dobrota, D., y Kaplan, P. (2014). Effect of aging on formation of reactive oxygen species by mitochondria of rat heart. *General Physiology and Biophysics*, 32(03), 415–420.
- Kurutas, E. B. (2015). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*, 15(1).
- La-Llave-León, O., Méndez-Hernández, E., Castellanos-Juárez, F., Esquivel-Rodríguez, E., Vázquez-Alaniz, F., Sandoval-Carrillo, A., ... Salas-Pacheco, J. (2017). Association between Blood Lead Levels and Delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase in Pregnant Women. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(4), 432.
- Laguna-Ruiz, J., Abril, N., Prieto-Álamo, J., Barea-López, J., y Pueyo, C. (2005). Tissue, Species, and Environmental Differences in Absolute Quantities of Murine mRNAs Coding for Alpha, Mu, Omega, Pi, and Theta Glutathione S-Transferases. *Gene Expr.* 12(3), 165–176.
- Lakshmi, B. V. S., Sudhakar, M., y Aparna, M. (2013). Protective potential of Black grapes against lead induced oxidative stress in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35(3), 361–368.

- Lanphear, B. P., MD, Hornung, R., y Ho, M. (2005). Screening Housing to Prevent Lead Toxicity in Children. *Public Health Reports*, 120, 305-310.
- Layer, G., Reichelt, J., Jahn, D., y Heinz, D. W. (2010). Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Science*, 19(6), 1137–1161.
- Leal-Escalante, C. R., Baltazar-Reyes, M. C., Lino-Gonzalez, M., Palazuelos-Rendon, E., y Meneses-Gonzales, F. (2007). Concentraciones de plomo en sangre y reprobación de escolares en la Ciudad de México. *Gac. Méd. Méx.* 143(5), 377-381.
- Li, W. F., Furlong, C. E., y Costa, L. G. (1995). Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett*, 76, 219-226.
- Lin, C., Quiu, N, Z., Xiu, R, Q., Bao, L, Z., En, M, D., Bo, S., ...Hong, Y. (2018). Association between the HOTAIR polymorphism and susceptibility to lead poisoning in a chinese population. *Biomed Environ Sci.* 31(6), 473-478.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., y Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118.
- López, C, C.E. (2011). Los nuevos pilares de la teoría evolutiva a la luz de la genómica. *Acta biol. Colomb.*, 16 (3), 89-102.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). *J. Biol. Chem*, 193, 265-275.
- Luceri, C., Bigagli, E., Femia, A. P., Caderni, G., Giovannelli, L., y Lodovici, M. (2018). Aging related changes in circulating reactive oxygen species (ROS) and protein carbonyls are indicative of liver oxidative injury. *Toxicology Reports*, 5, 141–145.
- Mathew, B. B., Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N. y Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol*, 7(2), 60–72.
- Méndez, S. J. V. (2016). Antioxidantes como tratamiento alternativo contra la intoxicación renal con plomo. Universidad del Papaloapan-Tuxtepec, Oaxaca, México.
- Navarro-Moreno, L. G. (1999). Efecto del plomo sobre algunos aspectos fisiológicos de túbulos proximales de riñón de rata. Tesis de maestría Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Enero, 123 p.
- Navarro-Moreno, L. G. (2004). Las proteínas de los cuerpos de inclusión y la susceptibilidad renal hacia la intoxicación con plomo. Tesis de doctorado. Noviembre, 137 p.
- Navarro-Moreno, L. G., Quintanar-Escorza, M. A., González, S., Mondragón, R., Cerbón-Solorzano, J., Valdés, J., y Calderón-Salinas, J. V. (2009). Effects of lead intoxication on intercellular functions and biochemical alterations of renal proximal tubule cells. *Toxicology in vitro*, 23, 1298-1304.
- Noriega, G. O., Tomaro, M. L., y del Batlle, A. M. C. (2003). Bilirubin is highly effective in preventing in vivo δ -aminolevulinic acid-induced oxidative cell damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1638(2), 173–178.
- Noyola, L. (2017). El plomo en la alfarería poblana. *Elementos*, 106, 11-20.
- Oakley, A. (2011). "Glutathione transferases: a structural perspective". *Drug Metab. Rev*, 43(2), 138-51.
- Okediran, B. S., Biobaku, K. T., Olaifa, F. H. y Atata A.J. (2017). Haematological and antioxidant enzyme response to lead toxicity in male Wistar rats. *Ceylon Journal of Science* 46(2), 31-37.
- Onalaja, O. A., y Claudio, L. (2000). Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environ Health Perspect*, 108(1), 23-28.

- Oskarsson, A., Jorhem, L., Sundberg, J., Nilsson, N.-G., y Albanus, L. (1992). Lead poisoning in cattle transfer of lead to milk. *Science of The Total Environment*, 111(2-3), 83–94.
- Otáñez-Durán, W. B. (2015). Darwin y el lenguaje: Un estudio sobre la aplicabilidad del contenido teórico del pensamiento evolutivo darwiniano al origen y desarrollo del lenguaje. Tesis doctoral. Departamento de lengua española y lingüística general facultad de filología UNED, 543 págs.
- Öztürk, O., & Gümüşlü, S. (2004). Age-related changes of antioxidant enzyme activities, glutathione status and lipid peroxidation in rat erythrocytes after heat stress. *Life Sciences*, 75(13), 1551-1565.
- Öztürk-Ürek, R., Bozkaya, L. A., y Tarhan, L. (2001). The effects of some antioxidant vitamin- and trace element-supplemented diets on activities of SOD, CAT, GSH-Px and LPO levels in chicken tissues. *Cell Biochemistry and Function*, 19(2), 125–132.
- Patra, R.C., Rautray, A. K. y Swarup, D. (2011). Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *J. Vet. Intern. Med.*, 9 págs.
- Patrick, L. (2006). Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern. Med. Rev.*, 11, 114–127.
- Pearce, J. M. (2007). Burton's line in lead poisoning. *European neurology*. *Eur. Neurol.*, 57, 118–119.
- Perez, M. C., y Sánchez, D. E. (2010). Uso de Plomo en la Alfarería en México. Mexico, D. F., Blacksmith Institute.
- Perottoni, J., Rodrigues, O. E., Paixão, M., Zeni, G., Lobato, L., Braga, A., ... Emanuelli, T. (2004). Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 42(1), 17–28.
- Piomelli, S. (2002). Childhood lead poisoning. *Pediatr. Clin. North Am.*, 49, 1285–1304.
- Prescott, I. F., y Ansari, S. (1969). The effects of repeated administration of mercuric chloride on exfoliation of renal tubular cells and urinary glutamic-oxaloacetic transaminase activity in the rat. *Toxicology and applied pharmacology*, 14, 97-107.
- Poma, P. A. (2008). Intoxicación por Pb en humanos. Universidad nacional mayor de San Marcos Lima Perú, Anales de la facultad de medicina, 69(2), 120-126.
- Ramirez, V. A. (2008). Intoxicacion ocupacional por mercurio. *An. Fac. Med.*, 69(1), 46-51.
- Raymundo M. (2016). Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutati6n S-transferasa p1. Universidad del Papalopan, Tuxtepec, Oaxaca, México.
- Repetto, M. (1997). Diagn6stico de la intoxicaci6n. En: Repetto M (ed). Toxicología Fundamental. DÍaz de Santos, Madrid, 327-333.
- Riess, M. L., y Halm, J. K. (2007). Lead Poisoning in an Adult: Lead Mobilization by Pregnancy? *Journal of General Internal Medicine*, 22(8), 1212–1215.
- Rose, S., Melnyk, S., Savenka, A., Hubanks, A., Jernigan, S., Cleves, M., y James, S. J. (2008). The Frequency of Polymorphisms affecting Lead and Mercury Toxicity among Children with Autism. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(2), 85-94.
- Rudge, C. V., Röllin, H. B., Nogueira, C. M., Thomassen, Y., Rudge, M. C., y Odland, J. Ø. (2009). The placenta as a barrier for toxic and essential elements in paired maternal and cord blood samples of South African delivering women. *Journal of Environmental Monitoring*, 11(7), 1322.
- Salazar-Flores, J., H. Torres-Jasso, J., Rojas-Bravo, D., M. Reyna- Villela, Z., y D. Torres- Sánchez, E. (2019). Effects of mercury, lead, arsenic and zinc to human renal oxidative stress and functions: A review. *Journal of Heavy Metal Toxicity and Diseases*, 04(01), 16 págs.

- Salim, M. (2015). Evaluation of performance of date palm pollen on urea and creatinine levels in adult female rats exposed to lead acetate intoxication. *Int. J. Biomed. Adv. Res*, 6(1), 20–24.
- Sanders, T., Liu, Y., Buchner, V., y Tchounwou, P. B. (2009). Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: A Review. *Res. Environ Health*, 24(1), 15–45.
- Sanz, P. (1995). Los polimorfismos genéticos como causa de variabilidad individual de la toxicidad. En: Repetto M (ed). *Toxicología avanzada*. Díaz de Santos, Madrid, 87-116.
- Schara, M., Nemeč, M., Falnoga, I., Kobal, A. B., Kveder, M., y Svetek, J. (2001). The action of mercury on cell membranes. *Cellular & molecular biology letters*, 6, 299-304.
- Scinicariello, F., Murray, H. E., Moffett, D. B., Abadin, H. G., Sexton, M. J., y Fowler, B. A. (2007). Lead and δ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: Where does it lead? A meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, 115(1), 35-41.
- sedici.unlp.edu.ar. Recuperado de sedici.unlp.edu.ar /bitstream/handle/ 10915/2739/ Anexo.pdf?sequence=12.
- Sharma, B., Singh, S., y Siddiqi, N. J. (2014). Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. *BioMed Research International*, 1–26.
- Sivaprasad, S., Gupta, B., Gulliford, M. C., Dodhia, H., Mohamed, M., Nagi, D., y Evans, J. R. (2012). Ethnic variations in the prevalence of diabetic retinopathy in people with diabetes attending screening in the United Kingdom (DRIVE UK). *PLoS ONE*, 7(3), e32182.
- Suarez, D, E. M. (2002). Evaluación molecular: el nacimiento de una disciplina. *ULUIL*, 25, 129-158.
- Sujatha, K., Srilatha, C. H., Anjaneyulu, Y., y Amaravathi, P. (2011). Lead acetate induced nephrotoxicity in Wistar albino rats, pathological, immunohistochemical and ultra-structural studies. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*, 2(2), B459–B469.
- Sun, H., Wang, N., Nie, X., Zhao, L., Li, Q., Cang, Z., ... Lu, Y. (2017). Lead exposure induces weight gain in adult rats, accompanied by DNA hypermethylation. *PLOS ONE*, 12(1), e0169958.
- Szymanska-Chabowska, A., Laczanski, L., Jedrychowska, I., Chabowski, M., Gac, P., Janus, A., ...Poreba, R. (2015). The relationship between select VDR, HFE and ALAD gene polymorphisms and several basic toxicological parameters among persons occupationally exposed to lead. *Toxicology*, 334, 12-21.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., y Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 133–164.
- Teixeira, F. B., de Oliveira, A. C. A., Leão, L. K. R., Fagundes, N. C. F., Fernández, R. M., Fernández, L. M. P., ... Lima, R. R. (2018). Exposure to inorganic mercury causes oxidative stress, cell death, and functional deficits in the motor cortex. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11.
- Thiagara, K., Hemavathi, B., Vasundhara, K., Rao, A. D., y Devi, K. N. (2005). Comparative study on glutathione transferases of rat brain and testis under the stress of phenobarbitol and β -methylcholanthrene. *Univ. SCI*, 6B(8), 759-769.
- Tian, L., Zheng, G., Nilsson, S, J., Liang, Y., Lundh, T., Broberg, K., ...Bergdahl, I, A. (2013). Lead concentration in plasma as a biomarker of exposure and risk, and modification of toxicity by S-aminolevulinic acid dehydratase gene polymorphism. *Toxicology letters*, 221, 102-109.
- Tolentino, M. L. (2016). Plomo en las vasijas de barro vidriado. Recuperado de <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/prepa4/article/view/434/5560>.
- Townsend, D. M., Manevich, Y., He, L., Hutchens, S., Pazoles, C. J., y Tew, K. D. (2008). Novel role for GlutathioneS-Transferase π . *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 436–445.

Ulberth, W. O., Franz. (2000). Increased concentration of arachidonic acid in erythrocyte membranes in chronically lead-exposed men. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 59(2), 87–95.

UNL. (2012). *Environmental Health and Safety*, (402), 472-4925. Recuperado de <http://ehs.unl.edu>.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., y Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178–189.

Velaga, M. K., Daughtry, L. K., Jones, A. C., Yallapragada, P. R., Rajanna, S., y Rajanna, B. (2014). Attenuation of lead-induced oxidative stress in rat brain, liver, kidney and blood of male Wistar rats by *Moringa oleifera* seed powder. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 33(4), 323–337.

Winder, C. (2002). Mechanisms of multiple chemical sensitivity. *Toxicology Letters*. 128, 85-97.

Wolfson, J. S., y Swartz, M. N. (1985). Serum bactericidal activity as a monitor of antibiotic therapy. *N. Engl. J. Med.*, 312, 968-975.

www3.uah.es, Valoración de proteínas por el método de Lowry. Recuperado de www3.uah.es/bioquimica/Sancho/farmacia/practicas/Lowry.pdf.

www.edigar.com.mx, tiras-reactivas-para-urianalisis-de-10-parametros. Recuperado de www.edigar.com.mx/producto/tiras-reactivas-para-urianalisis-de-10-parametros/.

www.uaq.mx, Reacción de la catalasa. Recuperado de www.uaq.mx/investigación/difusion/veranos/.../UAQ%20Cedillo%20Jimenez.pdf.

www.wiener-lab.com.ar, urine_strip_sp.pdf. Recuperado de www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/urine_strip_sp.pdf

Yorifuji, T., Debes, F., Weihe, P., y Grandjean, P. (2011). Prenatal exposure to lead and cognitive deficit in 7- and 14-year-old children in the presence of concomitant exposure to similar molar concentration of methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology*, 33(2), 205–211.

Zeise, L. (2013). *Emerging science for environmental health decisions newsletter*, Washington, DC, The National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine.

Zhang, H., Xu, M., Zhao, Q., Sun, K., Gong, W., Zhang, Q., Zhu, B., y An, Y. (2017). Association between polymorphism of exportin-5 and susceptibility to lead poisoning in chinese population.

Zhong, S., Howie, A. F., Ketterer, B., Taylor, J., Hayes, J. D., Beckett, G. J., ... Spurr, N. K. (1991). Glutathione S-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, 12(9),1533–1537.

Zhou, J. P., Wang, F., Yi, X. Q., Wang, X. Y., Jiang, Y. S., Geng, Y., y Wang, J. J. (2017). Effects of embryonic lead exposure on food intake and bowel movement in offspring rats and possible mechanisms. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 19(4), 463-469.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Comparación de los controles experimentales.

Grupos control.

En este trabajo se estudiaron dos poblaciones de ratas Wistar, una de cuatro y otra de cinco meses, debido a que hubo la necesidad de establecer dos poblaciones experimentales. Por esta razón se determinaron las mismas mediciones que se hicieron en los grupos preexposición a plomo y expuestos posteriormente a plomo y mercurio a concentraciones altas y por las vías oral e intraperitoneal.

Pesos corporales. Los datos obtenidos al medir los pesos en los animales control de cuatro y cinco meses sin exponer a metal mostraron que hubo un aumento de peso de 82 gramos en un periodo de 30 días. Los valores fueron 292.33 ± 21.84 y 374.73 ± 32.07 gramos respectivamente.

Pesos de los órganos. Los tres órganos de estudio (riñón, hígado y cerebro) aumentaron de peso en función de la edad. El riñón aumentó 0.55 gramos (inicio: 1.76 ± 0.16 , final: 2.31 ± 0.08 gramos), el hígado presentó un aumento de 2.73 gramos (inicio: 8.45 ± 1.43 , final: 11.18 ± 1.55 gramos) y el cerebro por su parte aumento 0.46 gramos (inicio: 1.78 ± 0.16 , final: 2.24 ± 0.14 gramos) en un periodo de 30 días.

Examen general de orina. Uno de los órganos más afectados por la exposición a varios metales pesados es el riñón, por esta razón se realizó un examen general de orina a todos los grupos de estudio. El volumen de orina recolectado no fue diferente entre los grupos. De la misma forma se puede observar que de los 11 analitos analizados mediante esta metodología solo cuatro mostraron diferencias. En primer lugar, los leucocitos se encuentran aumentados en ambos grupos, incrementándose hasta 70 en cinco animales del grupo control de cinco meses. De la misma manera presentan 15 miligramos de proteínas lo cual es constante en ambos grupos. El pH no sufrió ninguna alteración significativa. En relación con la presencia de sangre a los cuatro meses solo en un roedor dio un valor positivo y a los cinco meses todos los animales dieron resultados negativos. El cambio de gravedad específica no tuvo significancia estadística.

Especies reactivas de oxígeno. Los valores obtenidos indicaron que el nivel de especies reactivas de oxígeno determinadas en riñón fueron diferentes ya que el grupo de cinco meses disminuyó aproximadamente 23 unidades en relación con el grupo de cuatro meses.

Actividad de la enzima Glutación S-transferasa (GST). Los resultados indican que en el cerebro la actividad de la enzima no cambió entre los grupos (control de cuatro meses: 5.19 ± 0.99 vs control

de cinco meses: $5.97 \pm 1.15 \mu\text{mol/mg/min}$). En el caso del hígado se observó un aumento de 8.1 gramos (control de cuatro meses: 19.62 ± 2.88 vs control de cinco meses: $27.71 \mu\text{mol/mg/min}$). En el riñón hubo un aumento de 2.2 unidades (control de cuatro meses 2.59 ± 0.42 vs control de cinco meses: $4.79 \pm 0.82 \mu\text{mol/mg/min}$).

Actividad de GST en orina y suero. En el suero se observó una tendencia a aumentar la actividad. En el caso de la orina, la actividad aumentó 2.4 veces en el grupo de cinco meses. Este aumento coincidió con lo observado al analizar la actividad de la enzima en el riñón.

Actividad de la enzima Catalasa. La actividad de la enzima no cambió en los tres órganos de los dos grupos experimentales. Solo en riñón e hígado se observaron ligeros aumentos, pero no fueron significativamente diferentes.

En resumen, se encontró un aumento de peso de los organismos y de los órganos de los animales control en función de la edad. No se observaron cambios importantes en el examen general de orina. Las especies reactivas de oxígeno solo variaron en el riñón, en el cual disminuyeron y la actividad de la enzima GST solo aumentó en riñón. La actividad de GST aumentó en orina en igual proporción que en riñón. La enzima Catalasa se mantuvo constante en los dos grupos y en todos los órganos. En riñón se observó que las especies reactivas disminuyeron y la actividad de la enzima aumentó. Este hecho resulta diferente a lo que se puede observar en los animales expuestos a plomo sin haber sido antes preexpuestos al mismo.

Anexo 2. Valores e interpretación del examen general de orina.

Parámetro	Valores normales	Interpretación de resultado.
Leucocitos	<5	↑ Leucocituria, infección de las vías urinarias
Nitritos	Negativo	↑ bacteriuria, infección de las vías urinarias
Urobilinógeno	0,1 a 1,0 mg/dL	↑ estados hemolíticos ↓ ictericia mecánica
Proteínas	0-4 mg/dL	↑ proteinuria prerrenal, glomerular, tubular o mixta.
pH	5 a 8.	↓ dieta rica en proteínas, fiebre ↑ dieta pobre en proteínas, acidosis tubular
Sangre	Negativo	
G. específica	1.003 a 1.040 g/mL	↓ alteración de la función renal, diabetes insípida, trastornos electrolíticos, (hipercalcemia, hipopotasemia), hipo/hipertiroidismo ↑ glucosuria importante, fármacos (manitol, dextrano), medios radiológicos de contraste.
Cetonas	Negativo	↑ cetosis/cetoacidosis
Bilirrubina	Negativo	↑ ictericia parenquimatosa/mecánica, estados hemolíticos
Glucosa	Negativo	↑ diabetes descompensada, glucosuria tubular

Tabla 16. Niveles normales de analitos en el examen general de orina y su implicación clínica cuando aumentan o disminuyen (Tomado de edigar.com; empedium.com; Wiener-lab.com).

Anexo 3. Curva de calibración usada para la determinación de proteínas en el ensayo de Lowry.

Para determinar la concentración de proteínas totales en nuestros homogenizados, se realizó una curva de calibración utilizando albumina sérica bovina y su cuantificación a través del uso del método Lowry.

Longitud de onda	Concentración (mg/mL)	Absorbancia
750 nm	0	0
	0.0083	0.0407
	0.0166	0.0586
	0.0249	0.0857
	0.0332	0.085
	0.0415	0.1075
	0.0498	0.122
	0.0581	0.1584
	0.0664	0.1622
	0.083	0.1941
	0.1162	0.2575
	0.166	0.2797

Tabla 17. Absorbancia y concentración utilizados para la obtención de la curva de calibración.
 Ecuación: $y = 4.356290 \times 10^{-2} + 1.619844x$ Error residual: 0.018414
 Coeficiente de correlación: 0.974475

Para el cálculo de la cantidad de proteínas, se despeja x de la ecuación de la recta, y así se obtiene de forma manual la cantidad de proteínas, aunque el equipo UV-vis ya nos calcula la cantidad de proteínas presentes de las muestras automáticamente. En la Figura 13 se observa la curva de calibración obtenido en el espectrofotómetro UV-vis Perkin Elmer para los valores de concentración y absorbancia mostrados en la Tabla 17.

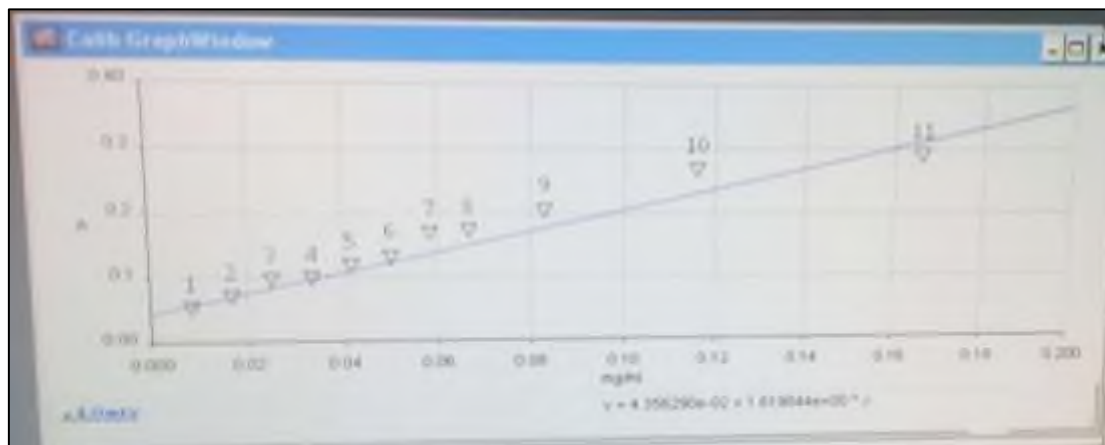


Figura 13. Curva de calibración obtenido en un espectrofotómetro UV-vis Perkin Elmer.

Anexo 4. Constancias de participación realizadas con el trabajo de investigación: Susceptibilidad hacia la intoxicación con plomo.



Figura 14. Participación en el 3to Encuentro Regional de Investigación Multidisciplinaria, presentación de cartel, en la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec (2017).



Figura 15. Participación en el 4to Encuentro Regional de Investigación Multidisciplinaria, presentación de cartel, en la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec (2018).



Figura 16. Participación en la 5ª reunión de materiales, nanotecnología y ciencias aplicadas, en la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec (2017).