

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Tuxtepec

Actividad de la enzima Glutación
S-transferasa en cerebro, hígado y
riñón de ratas Wistar expuestas a
acetato de plomo.

Tesis que para obtener el Título de:

LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta:

HECTOR ANTONIO JACINTO SANCHEZ

Directora de tesis:

DRA. LETICIA GUADALUPE NAVARRO MORENO

Aquí está la ciencia, es para todos, está al alcance de todos. Ciertas personas, llamadas científicos, dedican gran parte de su tiempo a trabajar en ella; otras, aunque no trabajan directamente en ella, contribuyen a que pueda llevarse a cabo, en tanto que otras más, sin saber que existe, la practican a diario, y es así como todos, en algún momento de nuestra vida, hacemos ciencia.

De Erice Zúñiga, 2009

Tomás Alva Edison dijo que nuestras células piensan. Es una afirmación que puede dejar a más de uno perplejo y pensativo. Pero al pasar tanto tiempo pensando en cómo hacen las células su trabajo, como se regulan y cómo saben que rutas tomar en cualquier situación, yo creo que debe ser así, ya que, si nosotros pensáramos por ellas, pocos serían los sobrevivientes a tal caos. Por ello concuerdo con Montaigne, quien dijo: “Dejemos obrar a la naturaleza, porque mejor que nosotros, sabe lo que hace”. Espero que este viaje tan largo haya valido la pena.

Tu profesora. LGNM

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la Universidad del Papaloapan para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA

RESUMEN

La Glutación S-transferasa (GST) pertenece a una superfamilia de enzimas con masas moleculares de 25 a 50 KDa que se encuentran distribuidas ampliamente en prácticamente todos los seres vivos. Esta enzima participa en el proceso de la detoxificación de xenobióticos, en la fase II. Dentro del metabolismo oxidativo algunas isoformas de GST actúan como reguladores de apoptosis y diferenciación celular, activación de enzimas participantes en los procesos de transducción de señales. GST participa en el metabolismo de síntesis de prostaglandinas, en específico la PGS2 y la 15D-PGJ2. Esta enzima se relaciona con los procesos de supervivencia y apoptosis celular. Algunos de los procesos en los que interviene la GST, son la regulación de la familia mitogen-activated protein kinase (MAPK por sus siglas en inglés), y con las especies reactivas de oxígeno (ERO's) debido al aumento de la lipoperoxidación generando el radical lipoperoxilo. La enzima une el sustrato 4-hidroxinonenal con el glutatión para terminar con la cadena de lipoperoxidación. Por lo que se considera como una enzima clave, lo que la convierte en un blanco de estudio importante.

Este trabajo se realizó en tres órganos de ratas macho de la cepa Wistar intoxicadas de forma aguda con acetato de plomo. Se cuantificó la actividad de la enzima GST en función de la edad y de las dosis administradas del metal. Se calcularon las constantes cinéticas (K_m y $V_{máx}$) en función de la concentración de plomo.

Los resultados demostraron que la actividad de la GST incrementa en función del tiempo y del órgano, siendo el hígado el que posee mayor actividad. Así mismo, se observó que, en función de la edad, los valores de ERO's incrementan significativamente en cerebro, hígado y riñón. Cuando los roedores son intoxicados con acetato de plomo, la actividad de GST incrementa en cerebro, disminuye en hígado y no varía en riñón, a comparación del grupo control.

Con relación al tipo de inhibición que puede producir el plomo, se detectó que en hígado y riñón puede actuar como inhibidor mixto, debido a que la constante de disociación del complejo ESI es diferente al complejo ES, por lo tanto, los valores de la K_m y $V_{máx}$ son alteradas sin patrón evidente; mientras que en cerebro no ejerce ningún efecto inhibitorio ya que, en este órgano, el metal provoca el aumento de la actividad.

ABSTRACT

Glutathione S-transferase (GST) belongs to a superfamily of enzymes with molecular masses of 25 to 50 KDa that are widely distributed in practically all living beings. This enzyme participates in the process of detoxification of xenobiotics, in phase II. Within oxidative metabolism, some GST isoforms act as regulators of apoptosis and cell differentiation, activation of enzymes involved in signal transduction processes. GST participates in the metabolism of prostaglandin synthesis, specifically PGS2 and 15D-PGJ2. The enzyme is also related to the processes of cell survival and apoptosis. Within these processes, they can control the activity of members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family. On the other hand, GST is related to reactive oxygen species (ROS) because, when lipid peroxidation increases and lipoperoxyl radical is generated, the enzyme joins the 4-hydroxynonenal substrate with glutathione to end the lipid peroxidation chain. It is, then, an enzyme involved in several cellular processes, which makes it an important study target.

This work shows the study carried out on three organs of male rats of the Wistar strain acutely intoxicated with lead. Enzyme activity was quantified based on age and exposure to metal. The kinetic constants (K_m and V_{max}) were calculated as a function of the lead concentration.

The results showed that GST activity increases as a function of time and of the organ, with the liver being the one with the highest activity. At the same time, it was found that, depending on age, the values of reactive oxygen species increase significantly in the brain, liver, and kidney. When rodents are intoxicated with lead, GST activity increases in the brain, decreases in the liver, and does not vary in the kidneys, compared to the control group.

In relation to the type of inhibition lead can produce, it was found that it can act as a mixed inhibitor in the liver and kidney, while in the brain it does not exert any inhibitory effect since, in this organ, the metal causes increased activity.

ÍNDICE GENERAL

1.	Introducción	
1.1	Plomo	2
1.2	El plomo como problema de salud pública	2
1.3	Efectos del plomo en	
	a) Cerebro	3
	b) Hígado	4
	c) Riñón	4
1.4	Toxicología ocasionada por exposición a plomo	6
1.5	Mecanismos de toxicidad del plomo	7
1.6	Glutación S-Transferasa	9
1.6.1	Inhibidores de la Glutación S-Transferasa	
	a) Ácido etacrínico	11
	b) Etacraplatino	11
	c) NBDHEX	12
	d) Auronofina	12
1.6.2	Clasificación de las enzimas de la superfamilia GST	13
	a) GST clase Alfa (GSTA)	18
	b) GST clase Mu (GSTM)	20
	c) GST clase Pi (GSTP)	23
1.7	Glutación S- Transferasa como bioindicador	25
1.8	Glutación S- Transferasa y su relación con la edad	25
2.	Antecedentes	27
2.1	Glutación S- Transferasa e intoxicación con metales	28
	Antecedentes de investigación sobre la enzima Glutación S- Transferasa realizados	29
2.2	por el grupo de investigación de la UNPA	
3.	Planteamiento del problema	32
4.	Justificación	34
5.	Hipótesis	36
6.	Objetivos	38
7.	Metodología Experimental	40
	A. Grupos en función de la edad	41
	B. Grupos en función de la intoxicación con plomo	41

7.1	Ensayos bioquímicos	42
7.1.1	Homogenizado de órganos	42
7.1.2	Cuantificación de proteínas en orina, sangre, cerebro, hígado y riñones por método de Lowry	42
7.1.3	Actividad de la enzima Glutación S- Transferasa (GST) en riñón, hígado, cerebro, suero y orina	42
7.1.4	Determinación de las constantes cinéticas de la enzima Glutación S- Transferasa (GST) en riñón, hígado y cerebro	43
7.1.5	Medición de especies reactivas de oxígeno en muestras de homogenado de cerebro, hígado y riñón	44
7.2	Análisis estadístico	45
8.	Resultados y discusión	46
8.1	Roedores no expuestos a plomo en función de la edad	47
	A.- Peso corporal	47
	B.-Peso de los órganos	49
	C.- Examen general de orina (EGO)	52
	D.- Especies reactivas de oxígeno	57
	D. 1 Cerebro	58
	D. 2 Hígado	59
	D. 3 Riñón	60
	E.- Actividad de la enzima Glutación S- transferasa (GST)	63
	E.1 Cerebro	63
	E.2 Hígado	64
	E.3 Riñón	65
	E.4 Orina y Suero	67
8.2	Ratas intoxicadas con plomo	70
	A.- Peso corporal	71
	B.- Peso de los órganos en función de las dosis administradas	74
	C.- Examen general de orina	77
	D.- Especies reactivas de oxígeno	83
	D.1 Cerebro	83
	D.2 Hígado	85
	D.3 Riñón	87

E.- Actividad de la Glutación S- transferasa	91
E.1 Cerebro	91
E.2 Hígado	93
E.3 Riñón	95
E.4 Orina y suero	97
F.- Cinética enzimática	101
F.1 Grupo control	102
F.2 Grupo expuesto a plomo	103
1. Hígado	103
2. Riñón	107
3. Cerebro	111
9. Conclusiones y perspectivas	117
10. Referencias	120
11. Anexos y apéndices.	134

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción

Tabla 1	Clases de GST en diferentes organismos	14
Tabla 2	Clasificación de GST de humano	15
Tabla 3	Clasificación de GST de rata	16
Tabla 4	Secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de las GST de las clases alfa, mu y pi	17
Tabla 5	Secuencia de aminoácidos de GST clase alfa de humano	19
Tabla 6	Secuencia de aminoácidos de GST clase alfa de rata	20
Tabla 7	Secuencia de aminoácidos de GST mu de humano	22
Tabla 8	Secuencia de aminoácidos de GST mu de rata	22
Tabla 9	Secuencia de aminoácidos de GST pi de humano	24
Tabla 10	Secuencia de aminoácidos de GST pi de rata	24

Resultados

Tabla 1	Pesos de órganos en función de la edad (días) de ratas de la cepa Sprague-Dawley machos tomado de Schoeffner	52
Tabla 2	Examen general de orina de los grupos de estudio en función de la edad	56
Tabla 3	Examen general de orina de los grupos de estudio	82
Tabla 4	Actividad y constantes cinéticas de GST en hígado, cerebro y riñón e hígado, cerebro y riñón de ratas control	103
Tabla 5	Constantes cinéticas de GST en hígado de ratas control y expuestas a plomo	106
Tabla 6	Constantes cinéticas de GST en riñón de ratas control y expuestas a plomo	110
Tabla 7	Constantes cinéticas de GST en cerebro de ratas control y expuestas a plomo	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1	Efectos patológicos del plomo en el cerebro	4
Figura 2	Mecanismos bioquímicos de nefropatía por exposición a plomo	5
Figura 3	Toxicodinámica de plomo en el medio ambiente y dentro del organismo	6
Figura 4	Efectos asociados a diversos niveles de plomo en sangre en niños y adultos	7
Figura 5	Daño oxidativo celular inducido por plomo	8
Figura 6	Reacción bioquímica catalizada por la enzima Glutación S- Transferasa	9
Figura 7	Inhibición de la GST por el ácido etacrínico	11
Figura 8	Inhibición de la GST por etacraplatino	12
Figura 9	Inhibición de la GST por el NBDHEX	12
Figura 10	Inhibición de la GST por la auronofina	13
Figura 11	Estructura tridimensional para un monómero de GST alfa	19
Figura 12	Estructura tridimensional para un monómero de GST mu	21
Figura 13	Estructura tridimensional para un monómero de GST pi	23

Resultados

Figura 1	Pesos corporales en función del tiempo en ratas macho de la cepa Wistar en condiciones normales	48
Figura 2	Peso de cerebro, hígado y riñón en función del tiempo en ratas Wistar macho en condiciones normales	50
Figura 3	Especies reactivas de oxígeno en cerebro de ratas control en función del tiempo	58
Figura 4	Especies reactivas de oxígeno en hígado de ratas control en función del tiempo	59
Figura 5	Especies reactivas de oxígeno en riñón de ratas control en función del tiempo	61
Figura 6	Actividad de la enzima Glutación S-Transferasa en cerebro. Hígado y riñón de ratas control en función del tiempo	66
Figura 7	Actividad de la enzima Glutación S-Transferasa en orina y suero de ratas control en función del tiempo	68
Figura 8	Diferencia de peso en roedores control y expuestos a plomo por un periodo de 15 días	72

Figura 9	Peso de los órganos cerebro, hígado y riñón de ratas Wistar intoxicadas con 25 mg/Kg de peso	75
Figura 10	Especies reactivas de oxígeno en cerebro de ratas expuestas a plomo vía intraperitoneal siete dosis incluyendo la dosis inicial (A) y mostrando solo el control y las dosis 2 a 7 (B)	84
Figura 11	Especies reactivas de oxígeno en hígado de ratas expuestas a plomo vía intraperitoneal siete dosis incluyendo la dosis inicial (A) y mostrando solo el control y las dosis 2 a 7 (B), así como los subgrupos encontrados en la dosis 5 (C)	86
Figura 12	Especies reactivas de oxígeno en hígado de ratas expuestas a plomo vía intraperitoneal siete dosis incluyendo la dosis inicial (A) y mostrando solo el control y las dosis 2 a 7 (B)	88
Figura 13	Actividad de la enzima Glutación S-transferasa de cerebro de ratas intoxicadas con plomo	91
Figura 14	Actividad de la enzima Glutación S-transferasa de hígado de ratas intoxicadas con plomo (n=6). El recuadro muestra los subgrupos encontrados en los animales expuestos a cinco dosis	93
Figura 15	Actividad de la enzima Glutación S-transferasa de riñón de ratas intoxicadas con plomo	95
Figura 16	Actividad de la enzima Glutación S-transferasa de muestras de orina y suero de ratas intoxicadas con plomo	98
Figura 17	Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en función de la concentración de DNCB en hígado, riñón y cerebro de ratas control	102
Figura 18	Actividad de la enzima glutación S-transferasa en hígado	104
Figura 19	Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en función de la concentración de DNCB en hígado de ratas expuestas a plomo	105
Figura 20	Km y Vmax de GST en hígado de ratas expuestas a diferentes dosis de plomo (En esta gráfica el número 1 corresponde al grupo control)	107
Figura 21	Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en riñón	108
Figura 22	Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en función de la concentración de DNCB en riñón de ratas expuestas a plomo	109
Figura 23	Km y Vmax de GST en riñón de ratas expuestas a diferentes dosis de plomo (En esta gráfica el número 1 corresponde al grupo control)	111

Figura 24	Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en cerebro	112
Figura 25	Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en función de la concentración de DNCB en cerebro de ratas expuestas a plomo	113
Figura 26	Km y Vmax de GST en cerebro de ratas expuestas a diferentes dosis de plomo (En esta gráfica el número 1 corresponde al grupo control)	115

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1	Pesos de los órganos cerebro, hígado y riñón de ratas control en función de la edad	51
Gráfica 2	Especies reactivas de oxígeno en cerebro, hígado y riñón de ratas macho Wistar en función de la edad	62
Gráfica 3	Actividad de la enzima Glutación S- Transferasa en cerebro, hígado y riñón de ratas Wistar en función del tiempo	67
Gráfica 4	Actividad de la enzima Glutación S- Transferasa en orina y suero de ratas Wistar en función del tiempo	69
Gráfica 5	Peso de los órganos en función del número de dosis administrada a ratas Wistar macho	75
Gráfica 6	Especies reactivas de oxígeno en cerebro, hígado y riñón de ratas Wistar macho expuestas a 7 dosis de plomo vía intraperitoneal	89
Gráfica 7	Actividad de Glutación S-transferasa en cerebro, hígado y riñón de ratas Wistar macho expuestas a 7 dosis de plomo vía intraperitoneal	96
Gráfica 8	Actividad de Glutación S-transferasa en orina y suero de ratas Wistar macho expuestas a 7 dosis de plomo vía intraperitoneal	99

ABREVIATURAS

ANOVA	análisis de varianza
CAT	Catalasa
DMSA	ácido dimercapto succínico
DNCB	2,4-dinitroclorobenceno
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
EGO	examen general de orina
EROS	especies reactivas de oxígeno
GPx	Glutación Peroxidasa
GR	Glutación Reductasa
GSH	glutación reducido
GST	Glutación S- Transferasa
GSTA	Glutación S- Transferasa Alfa
GSTM	Glutación S- Transferasa Mu
GSTP	Glutación S- Transferasa Pi
Km	constante de Michaelis-Menten
PBS	amortiguador de fosfato salino
Ppm	partes por millón
Prx	Peroxidasa
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	tiobarbitúricos
Vmax	velocidad máxima
δ-ALAD	Ácido delta aminolevulínico deshidratasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Plomo

El plomo es un metal pesado, gris y blando muy difundido en la corteza terrestre. Se encuentra en la naturaleza como mezcla de tres isótopos (Pb 206, Pb 207 y Pb 208). Su forma más abundante es el sulfuro (PbS), formando las menas de galena. Forma compuestos orgánicos como acetato de plomo [Pb (C₂H₃O₂)₂] y tetraetilo de plomo [Pb (C₂H₅)₄]; también forma compuestos inorgánicos como nitrato de plomo [Pb (NO₃)₂], arseniato de plomo (PbHAsO₄), carbonato de plomo (PbCO₃), así como diversos cloruros, óxidos y silicatos. Por su bajo punto de fusión (327.4 °C) fue uno de los primeros metales empleados por el hombre. Como consecuencia de su uso extensivo, el desarrollo de la intoxicación crónica y el saturnismo en personas expuestas se conocen desde la antigüedad, en civilizaciones como la romana, egipcia y griega (Ferrer, 2003).

Químicamente el plomo II forma un catión divalente que se une fuertemente a los grupos sulfhidrilo (–SH), oxidrilo (–OH), amino (–NH₂), carboxilato y grupos fosfato en las proteínas, enzimas y diversos componentes de las membranas celulares de la mayoría de los seres vivos (Needleman 2004; Srinivas, 2007). El plomo es reconocido como un potente xenobiótico y sus manifestaciones toxicológicas son bien conocidas, aunque sus efectos celulares aún no son del todo claros. La exposición a plomo en los humanos ocurre a través de varias fuentes antropogénicas. Entre ellas se pueden citar: los procesos industriales tales como el fundido de silicatos de plomo y la combustión de carbón; la manufactura de pinturas basadas en acetato de plomo, las tuberías contaminadas con plomo o el uso de soldaduras en sistemas de abastecimiento de agua, las baterías recicladas principalmente y para la protección contra la radiación X y γ (Flora, 2012; IPEN, 2018; Poveda & Plazas, 2020).

Los compuestos de plomo ocasionan efectos adversos en la salud que pueden originar, a la larga, un daño sistémico a todo el organismo. El plomo se distribuye a través del torrente sanguíneo y puede acumularse en los huesos o tejidos blandos como cerebro, hígado y riñón (Flora, 2012).

1.2 El plomo como problema de salud pública

La Organización Mundial de la Salud (W.H.O por sus siglas en inglés), ha manifestado que la exposición a plomo ambiental constituye claramente un peligro para la salud pública de dimensiones globales muy significativo en ciudades que aún están en desarrollo. Por ejemplo, en la Ciudad de México se llevó a cabo un estudio en el cual se determinó el plomo en sangre a una población de 200 niños menores de 5 años, los resultados mostraron un intervalo de 1 a 31 µg/dL de sangre con un promedio de 9.9 µg/dL, siendo toxico a partir de 3.5 µg/dL de sangre dicho por Centers for Disease Control and Prevention. (Tong, 2000).

Por otra parte, se ha observado que los trabajadores que se desempeñan en el ensamblaje de motores automotrices, soldaduras, fabricación de baterías, extracción y fundición de plomo, producción de aleaciones de plomo e industrias de pintura y cerámica, son los más expuestos al metal y representan un riesgo para su familia ya que llevan consigo el tóxico en su piel y ropa al regresar a su hogar (Tong, 2000).

La toxicidad del plomo se puede dividir en: subaguda, aguda, subcrónica y crónica, donde la diferencia es el tiempo de exposición al metal. La primera se manifiesta clínicamente como insuficiencia renal aguda, encefalopatía y enfermedad gastrointestinal; en la segunda, que es la más frecuente, se comprometen los sistemas hematopoyético, nervioso, gastrointestinal y reproductor. Diversos pacientes refieren dolor abdominal (cólico saturnínico), astenia (debilidad física), irritabilidad y estreñimiento y, en una situación de alta exposición puede ocurrir neuropatía periférica (daño al sistema nervioso periférico) que afecta los miembros superiores (Krantz, 2004; Smart and Hodson, 2008).

1.3 Efectos del plomo en cerebro, hígado y riñón

a) Cerebro

En el cerebro, el plomo puede bloquear el flujo de iones a través de un canal de membrana asociado a una clase específica de receptores de glutamato, el cual se encarga de mediar la transmisión sináptica por enlace a diferentes tipos de receptores post sinápticos de la membrana. Afecta también, a los receptores de tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA) inhibiendo los procesos de creación de red neuronal, reduciendo las funciones de memoria y aprendizaje (Marchetti, 2003).

A nivel molecular, una de las proteínas afectadas por el plomo es la proteína cinasa C, accionando la interrupción de la señal con las terminales nerviosas, esto se debe a que el plomo puede sustituir al calcio utilizado por la calmodulina cinasa, alterando la bioquímica de esta e inhibiendo la estimulación de la sinapsina. La sinapsina es una proteína presente en altas concentraciones alrededor de las vesículas sinápticas que son los paquetes de almacenamiento de neurotransmisores de las terminales nerviosas. Aunado a lo anterior, el plomo también altera la barrera hematoencefálica, haciendo que la sangre se filtre por los espacios intersticiales causando daño cerebral irreversible (Goldstein, 1990).

En la Figura 1, se muestra los daños celulares ocasionados por la llegada de plomo al cerebro. Entre ellos se encuentran cambios bioquímicos mediados por la activación de la proteína G la cual media la liberación de calcio facilitando así la entrada de plomo. Como consecuencia, se desencadenan daños metabólicos, inflamación, apoptosis (muerte celular programada), y daño a la respuesta inmune. Estos

daños desencadenan varios efectos neurológicos como edema, encefalopatía y daño cerebral irreversible (Brochin, 2008).

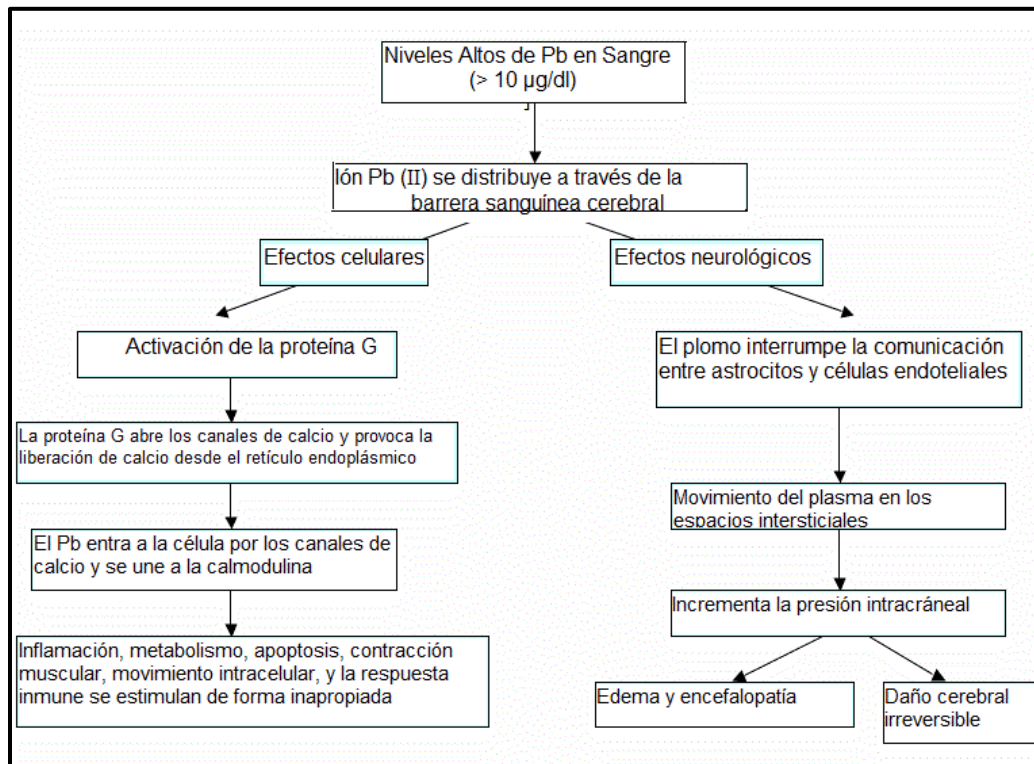


Figura 1. Efectos patológicos del plomo en el cerebro (Modificado de Brochin 2008).

b) Hígado

Estudios recientes sobre el potencial hepatotóxico del plomo en animales experimentales, han reportado alteraciones en el metabolismo de los xenobióticos, el metabolismo del colesterol, la proliferación celular hepática, la homeostasis del calcio, la inhibición de enzimas involucradas en la gluconeogénesis, el aumento de la oxidación de lípidos, la inhibición de la síntesis del grupo hemo, la inhibición del complejo enzimático citocromo P450, y la síntesis de ADN. Otros estudios sugieren que los hepatocitos presentan vacuolas citoplasmáticas, picnosis nuclear y necrosis celular completa, así como también fibrosis periportal y degeneración vacuolar con depleción de glucógeno. (Mudipalli, 2007; Berrahal, 2009; Jarrar, 2012; Hegazy, 2014; Abdel-Moneim, 2011, 2016).

c) Riñón

En el riñón, la alteración de la función por el efecto de la intoxicación con plomo puede ser de dos tipos: nefropatía aguda y nefropatía crónica. La nefropatía aguda se caracteriza celularmente por un

mecanismo de transporte tubular desacoplado y morfológicamente por la aparición de cambios degenerativos a lo largo del epitelio tubular con la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares, los que, básicamente, son complejos formados por uniones plomo-proteína (Navarro, 2009); también se observa una reducción en la filtración glomerular y fibrosis intersticial; la nefropatía crónica es caracterizada por cambios en el túbulo intersticial y en el glomérulo causando un incremento de enzimas lisosomales y proteínas de bajo peso molecular excretados en la orina (Flora, 2012; Rastogi, 2008).

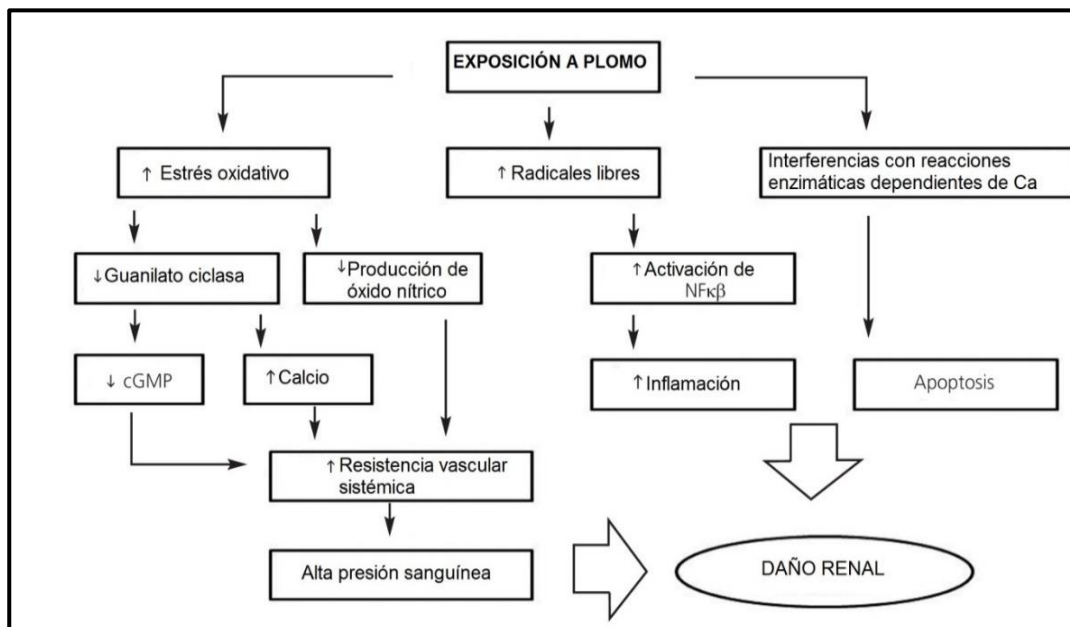


Figura 2. Mecanismos bioquímicos de nefropatía por exposición a plomo (Sabath 2012).

La figura 2 muestra que la exposición a plomo puede interferir con las reacciones dependientes de calcio lo cual puede acelerar el proceso de apoptosis, también el plomo puede inducir el aumento de estrés oxidativo y este a su vez disminuir la actividad de la enzima guanilato ciclasa aumentando la concentración de calcio, desencadenando así, una elevación de la presión sanguínea. Por otra parte, el plomo puede inducir el aumento de radicales libres que activan el factor nuclear kappa B encargado de la inflamación. Todos estos procesos conducen a un solo evento final: daño renal (Sabath 2012).

Los humanos estamos expuestos al plomo ambiental. En este caso las vías de entrada del metal pueden ser de tres formas diferentes: ingestión, contacto o inhalación. El metal es absorbido y movilizado en el torrente sanguíneo, distribuyéndose a la piel, huesos, cerebro, hígado y riñón. Parte del plomo absorbido es desechado por medio de la orina, heces, exhalación y raramente en cabello y uñas. Lo anterior se muestra en la Figura 3 (Salinas, 2008).

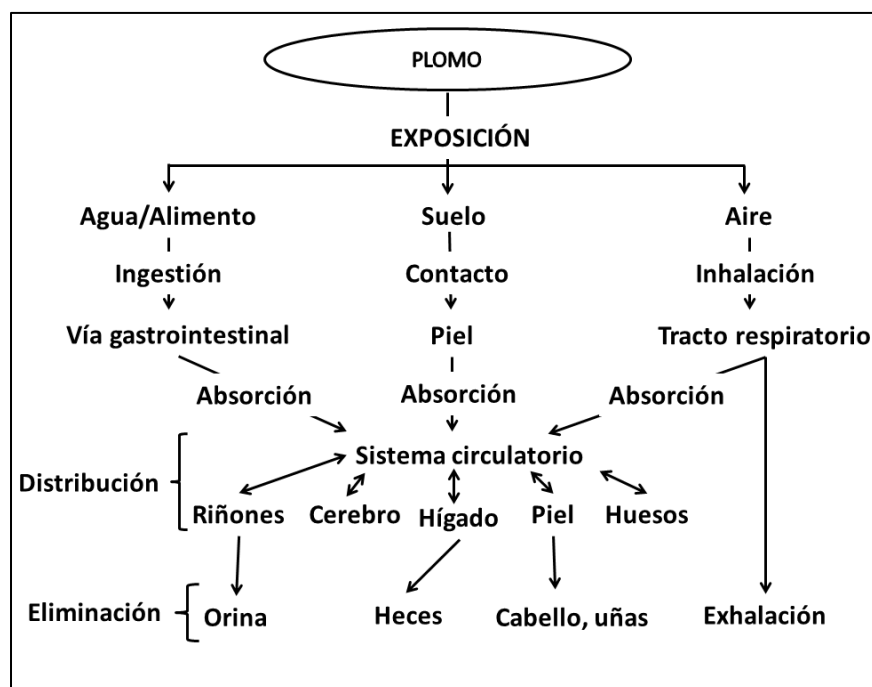


Figura 3. Toxicodinámica de plomo en el medio ambiente y dentro del organismo (Modificado de Salinas, 2008).

1.4 Toxicología ocasionada por exposición a plomo

En humanos, los niño(a)s y los adultos mayores son los más afectados por la intoxicación con plomo, Mazundar propuso, en el 2011, que la concentración de plomo en sangre puede promover manifestaciones clínicas particulares, ya que la progresión de los daños en los infantes puede iniciar a concentraciones menores que en los adultos. Sin embargo, Garza, en 2005, indicó que a concentraciones menores a 10 μg de Pb/dL en sangre, tanto niños como adultos pueden ser afectados, ya que la respuesta a la intoxicación con plomo se encuentra en función de la sensibilidad del individuo y aunque las manifestaciones pueden ser leves, se debe dar la importancia médica pertinente. La figura 4 muestra los diferentes eventos asociados a concentraciones crecientes ($\mu\text{g}/\text{dL}$) de plomo en sangre. Por ejemplo, entre 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{dL}$, los niños presentan un desarrollo neuronal deficiente en contraste de los adultos. También en los adultos hay un aumento de protoporfirina eritrocitaria. A 40 $\mu\text{g}/\text{dL}$ de la concentración de hemoglobina en los niños disminuye, aumenta la coproporfirina urinaria y la síntesis del ácido delta aminolevulínico; mientras que los adultos sufren de neuropatía periférica, nefropatía, aumento de coproporfirina urinaria, aumento de la síntesis del ácido delta aminolevulínico y en el caso de los hombres, infertilidad. A concentraciones más altas, por ejemplo 100 $\mu\text{g}/\text{dL}$, los niños pueden morir mientras que los adultos son afectados con encefalopatía sin llegar a la muerte. Estos efectos ocasionados por la intoxicación con el metal pueden variar, esto significa que la susceptibilidad de cada

individuo (la cual se encuentra determinada por los factores físicos y químicos del tóxico y por los propios del individuo) determinará, en gran medida, el daño ocasionado por la exposición al metal (Peña, 2001; Klaassen 2011).

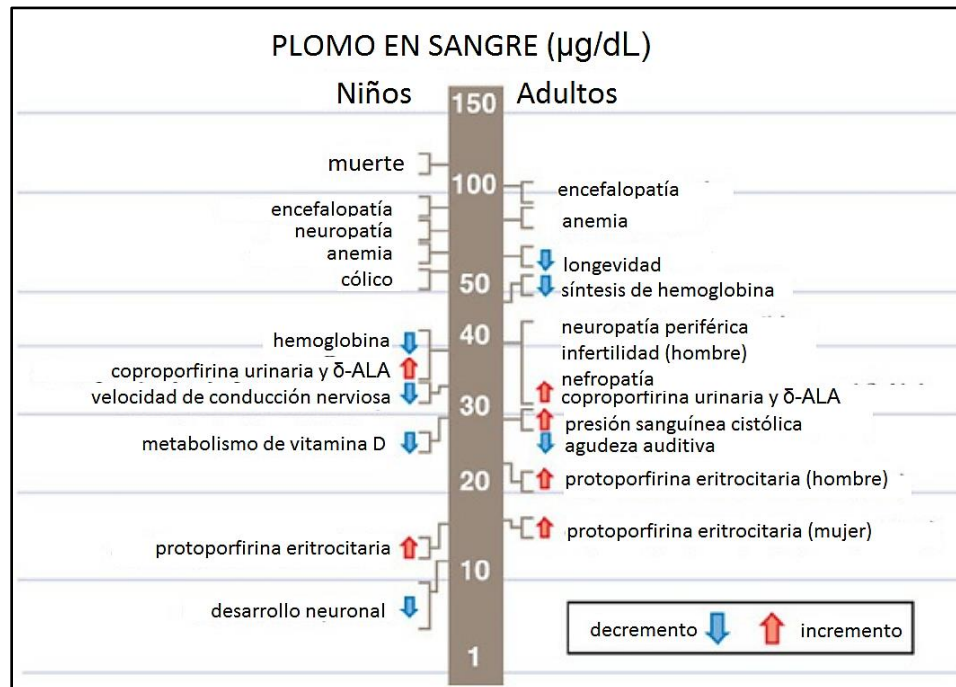


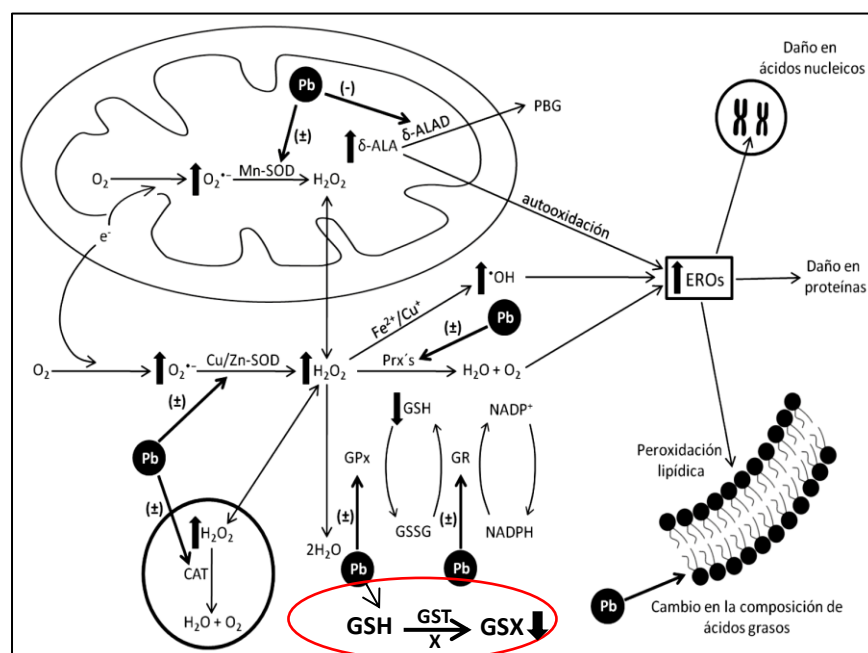
Figura 4. Efectos asociados a diversos niveles de plomo en sangre en niños y adultos (Modificado de Klaassen, 2011).

1.5 Mecanismos de toxicidad del plomo

En células sanas que tienen un metabolismo homeostático normal, se sabe que las especies reactivas de oxígeno (ERO's) se generan constantemente como producto de varios procesos bioquímicos, por ejemplo, en la respiración mitocondrial. Estas especies desempeñan varios papeles fisiológicos ya que normalmente participan en la proliferación celular; en la adaptación a condiciones más oxidantes; en la apoptosis celular; en la diferenciación celular y ayudan a los leucocitos y fagocitos a eliminar microorganismos por medio de una "explosión oxidativa". Sin embargo, al suceder algún proceso que pueda romper el balance normal entre las ERO's y el sistema antioxidante, se generará el fenómeno conocido como estrés oxidativo (Szymański, 2014; Hansberg 2002).

En el caso anterior, las especies reactivas de oxígeno en exceso pueden interactuar con las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos ocasionando en estas estructuras modificaciones, daño e inactivación de sus funciones (Szymański, 2014; Hansberg 2002).

La figura 5 muestra los daños directos e indirectos ocasionados por el plomo cuando entra a la célula. Primordialmente el plomo inhibe el sistema antioxidante celular induciendo el aumento de las especies reactivas de oxígeno y se sabe también, que inactiva la función catalítica de la Glutación S-transferasa, ocasionando daño metabólico. Lo anterior debido a que esta enzima posee un papel importante en el balance del estrés oxidativo, así como también, en la eliminación de xenobióticos (Martínez 2011).



Página | 8

1.6 GLUTATION S-TRANSFERASA

La Glutathión S-transferasa (EC 2.5.1.18) pertenece a una familia de isoenzimas con masas moleculares promedio de 25 y 50 KDa que se encuentran distribuidas ampliamente en la mayoría de los seres vivos (microorganismos, insectos, plantas, peces, aves y mamíferos) (Hayes, 1995). La Glutathión S-transferasa tiene como papel fundamental formar parte de la fase II del metabolismo de los xenobióticos (Armstrong, 1991).

Estas enzimas, también, tienen varias funciones no catalíticas que se relacionan con el secuestro de agentes carcinógenos, el transporte intracelular de un amplio espectro de ligantes hidrofóbicos y la modulación de las vías de transducción de señales (Sherrat, 2002). Además, están involucradas en la síntesis e inactivación de prostaglandinas, en la biosíntesis de leucotrienos, prostanoïdes y moléculas de señalización lipídica endógena (Jakobsson, 1996).

Desde hace aproximadamente 21 años, se ha propuesto que la Glutathión S-transferasa podría tener un papel primordial relacionado con las especies reactivas de oxígeno (ERO's), protegiendo a las macromoléculas celulares (incluyendo lípidos y DNA) de los efectos oxidativos de las diferentes especies reactivas de oxígeno (Hayes, 1995). De la misma manera, existen trabajos de investigación donde se ha propuesto que la Glutathión S-transferasa podría tener relación con el cáncer.

Lo anterior debido a lo que se ha observado que la enzima puede prevenir el inicio del proceso de carcinogénesis por inactivación o detoxificación de compuestos como benzopirenos, aminoazobencenos metilados, nitrosaminas metiladas, entre otros potentes carcinógenos, ya sea antes o después de ser formados (Tsuchida, 1992).

La mayoría de estas enzimas pueden catalizar la conjugación del glutathión reducido (GSH) con compuestos que contienen un centro electrofílico (entre ellos epóxidos, aldehídos y cetonas α,β -insaturados, haluros de alquilo, de arilo y otros), catalizando la formación de un enlace tioéter entre el átomo de azufre del GSH y el carbono del sustrato (Sherratt, 2002). La reacción anterior se muestra en la figura 6.

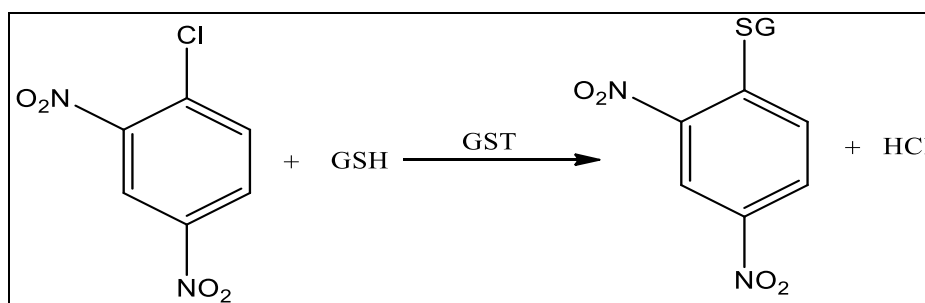


Figura 6. Reacción bioquímica catalizada por la enzima Glutathión S-transferasa, usando como sustrato al 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) (Fuente: Elaboración propia).

La GST juega un papel importante dentro del proceso de la lipoperoxidación atenuándolo. En 2007 Valko mencionó que esta enzima puede unir un producto de la cascada de reacciones de los radicales libres al glutatión y, de esta manera, terminar con la misma. El esquema 1 muestra este proceso.

The diagram illustrates the oxidative stress pathway, showing the conversion of O_2 to $O_2^{\cdot -}$ by NAD(P)H oxidases (1) and xanthine oxidase in mitochondria. $O_2^{\cdot -}$ is converted to H_2O_2 by SOD (2). H_2O_2 is then converted to H_2O by GPX (3) using GSH, or to $LOH + O_2$ by GPx (13). GSH is oxidized to GSSG in both processes. H_2O_2 can also be converted to $\cdot OH$ by Fe^{2+} (5) or by the Fenton-like reaction (6) involving Fe^{2+} and H_2O_2 . $\cdot OH$ leads to DNA damage. The diagram also shows the lipid peroxidation process initiated by $LOO^{\cdot}$ (7) and $LO^{\cdot}$ (8), leading to $LOOH$ (9) and then to malondialdehyde (MDA) (18) and 4-hydroxynonenal (16). MDA is further converted to deoxyguanosine (M_1G) (23), deoxyadenosine (M_1A) (22), and deoxycytosine (M_1C) (21). 4-hydroxynonenal is converted to a thiol adduct (17) by GST using GSH. The diagram is numbered 1 through 23 and includes various chemical structures and enzyme names.

Durante el curso de la lipoperoxidación, iniciado por la oxidación del NADPH, se forman los radicales lipoperoxilo ($\text{LOO}^\bullet$) y alcoxilipídico ($\text{LO}^\bullet$) como consecuencia de un proceso de óxido-reducción de intermediarios como la vitamina C, la vitamina E y los lípidos insaturados de membrana. Una ciclasa forma un compuesto cíclico inestable que aún conserva su electrón libre en forma de radical. Este radical, en presencia de oxígeno, protones, agua y fierro es escindido nuevamente formando un compuesto insaturado de nueve carbonos: el 4-hidroxinonenal (4-HNE) que es un sustrato de la enzima GST, la cual lo une al glutatión reducido (GSH) formando un complejo que puede ser eliminado vía renal.

1.6.1 Inhibidores de la Glutatión S-Transferasa

La mayoría de las actividades catalíticas de las enzimas están reguladas, ya sea por hormonas o por otras proteínas. Sin embargo, existen otros factores que pueden alterar el comportamiento de las enzimas como las condiciones como el pH, la concentración de sales, la temperatura los cuales contribuyen a un posible decremento de la actividad. Además, existen compuestos químicos con la capacidad de inhibir a las enzimas, pudiendo causar complicaciones en el organismo. Algunos de estos inhibidores de la GST han sido reportados por Allocati que desfavorecen su actividad son los mencionados por Allocati en 2018 y serán detallados a continuación.

a) Ácido etacrínico.

Es una cetona α , β -insaturado usado como un fármaco diurético. Es un sustrato/inhibidor común de varias isoformas de GST. El ácido etacrínico es activo contra las células tumorales, en particular a través de su actividad inhibitoria sobre la GSTP1-1 mediante un enlace covalente del complejo GSH-EA. Sin embargo, a pesar de las buenas propiedades farmacológicas que se muestran por esta molécula en varios cánceres, su uso clínico es problemático por sus fuertes propiedades diuréticas (figura 7).

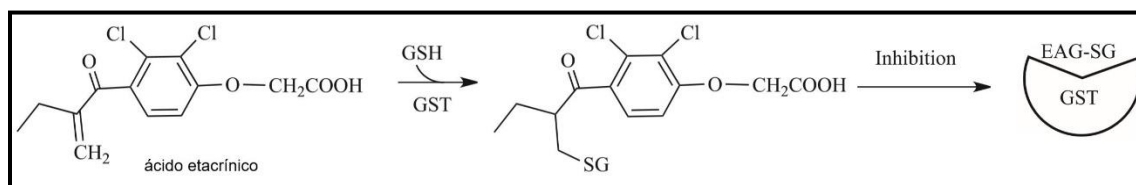


Figura 7. Inhibición de la GST por el ácido etacrínico (Tomado de Allocati 2018).

b) Etacraplatino.

Es un fármaco bifuncional desarrollado para inhibir a la GST mediante el cisplatino como acarreador. Esta molécula está conformada por un cisplatino coordinado con dos ácidos etacrínicos como ligantes,

permitiendo la inhibición de la actividad enzimática de la GSTP1-1 irreversiblemente como consecuencia de este complejo EA-GST-EA (Figura 8).

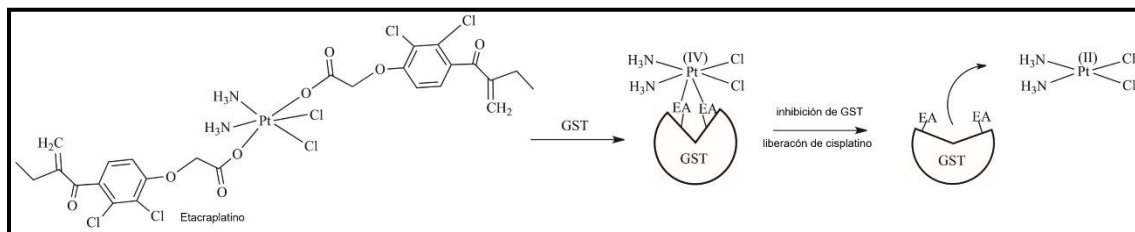


Figura 8. Inhibición de la GST por el Etacraplatino (Tomado de Allocati 2018).

c) NBDHEX.

El 6-(7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-iltio) hexanol o NBDHEX, es un inhibidor altamente eficiente de la GSTP1-1 y otras GST's, lo que desencadena la apoptosis en varias células cancerosas. La GSTP1-1 se sobre expresa en varios tipos de cáncer, donde estas mismas protegen a las células de la apoptosis por medio de la inhibición de la actividad de JNK o su cascada de activación. Sin embargo, uno de los problemas en el uso clínico del fármaco NBDHEX, puede ser la falta de especificidad para la GSTP1-1. Por ejemplo, se demostró que tiene alta afinidad por la GSTM2-2 que por la GSTP1-1 (Figura 9).

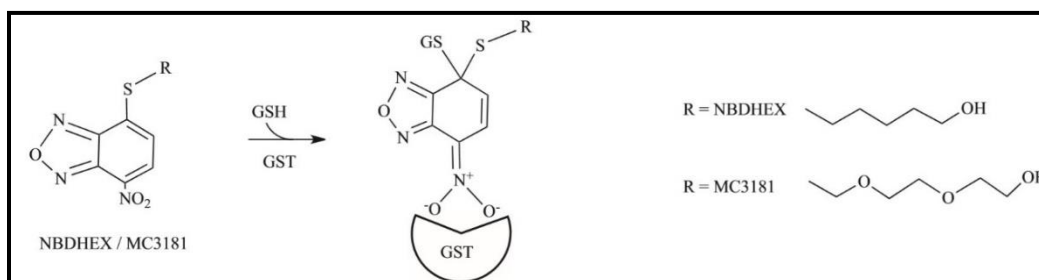


Figura 9. Inhibición de la GST por el NBDHEX (Tomado de Allocati 2018)

d) Auronofina.

Es un compuesto de fosfina de oro antiartrítico que también, muestra efectos anticancerígenos similares a los de cisplatino. Recientes estudios sugieren que una de las enzimas que pueden ser inhibidas por este compuesto es la GSTP1-1. En particular, se observaron inhibiciones similares tanto con la enzima de tipo nativo como sus mutantes de cisteína, lo que sugiere que la conjugación de tío es dispensable para la inactivación de GST por Auronofina en contraste con otras enzimas blanco (Figura 10).

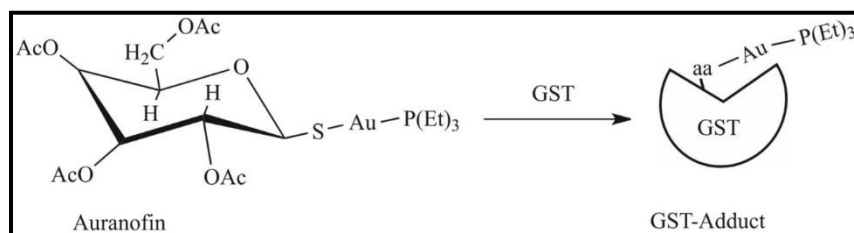


Figura 10. Inhibición de la GST por la Auranofina (Tomado de Allocati 2018).

En este trabajo se estudiará la actividad de GST y se evaluará el papel del plomo como posible inhibidor. En la actualidad no se tiene bien estudiado los efectos de los metales pesados sobre esta enzima, sin embargo, la inhibición de la misma resulta de suma importancia debido a sus múltiples funciones metabólicas.

1.6.2 Clasificación de las enzimas de la superfamilia GST

Esta familia de enzimas está compuesta por una agrupación compleja de proteínas, que han evolucionado de tal manera que, en ciertos casos, la GST puede estar involucrada en la biosíntesis de ligandos para los receptores de la misma superficie celular, y por otro, la enzima posee la capacidad de inactivar los ligandos para los receptores de la misma superficie celular o inactivar compuestos que sirven como agonistas de vías de señalización por respuesta al estrés intracelular. Alternativamente la GST puede fosforilarse interactuando con las proteínas cinasas que son parte de las vías de transducción de señales (Hayes, 2000).

La clasificación más aceptada para esta familia enzimática incluye las formas citosólicas, mitocondriales y microsomales (Morgenstern, 1982; Sherrat, 2002). Los mamíferos poseen las tres formas. A su vez, estas formas han sido divididas en familias o clases; las clases son designadas por los nombres de las letras griegas: Alfa, Mu, Pi, etc., y se abrevia utilizando letras capitales romanas: A, M, P, así sucesivamente. Una clase puede contener una o varias secuencias proteicas (subunidades de proteínas) y dentro de la clase, la subunidad secuencial es numerada usando numeración arábica. Hasta la fecha se han identificado quince clases, las cuales son: Alfa (α), Mu (μ), Pi (π), Sigma (σ), Teta (θ), Zeta (ζ), Omega (ω), y Kappa (κ) encontradas en los mamíferos; Beta (β), Teta (θ), Zeta (ζ), Nu (ν), Rho (ρ) encontradas en bacterias; Delta (δ), Épsilon (ϵ), Omega (ω), Sigma (σ), Theta (θ) y Zeta (ζ) encontradas en insectos; Phi (Φ), Zeta (ζ), Tau (τ), y Teta (θ) encontradas en plantas. (Mannervik, 1985; Sherrat 2002; Dixon 2002; Allocati 2009; Fang 2012;). La tabla 1 muestra las clases de enzimas reportadas para cuatro especies de seres vivos.

Tabla 1. Clases de GST en diferentes organismos (Fuente: Sherrat, 2002; Mannervik, 2005; Dixon 2002; Fang 2012; Allocati 2009). (X significa la especie en la cual la clase de GST es predominante).

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

La tabla muestra que las clases zeta y teta se encuentran en cuatro especies de organismos, sin embargo, la primera es predominante en plantas y la segunda en mamíferos (especialmente en pulmón). Las clases sigma y omega se encuentran en humanos y en insectos, siendo más expresadas en los segundos. La tabla muestra que algunas clases de GST solo se encuentran en una especie, es decir son predominantemente expuestas en esos organismos. Lo anterior, no constituye una verdad inmutable ya que se están realizando estudios moleculares que podrían demostrar diversos resultados complementarios a los mostrados en esta tabla.

La tabla 2 muestra la clasificación, el gen y la banda de cromosomas de la GST de humano y la tabla 3 expone la clasificación, el gen y las designaciones de la GST en rata. En ambos casos la clase sigma es conocida como Glutación sintetasa dependiente de prostaglandina D2 (Mannervik 2005).

Tabla 2. Clasificación de GST de humano (Modificado de Mannervik 2005).

Clases y localización cromosomal de los genes de la Glutación S-transferasa de humano (<i>Homo sapiens</i>).			
Designación de enzima	Clase	Gen	Banda de cromosoma
GST A1-1	Alfa	<i>GSTA1</i>	6p12
GST A2-2	Alfa	<i>GSTA2</i>	6p12
GST A3-3	Alfa	<i>GSTA3</i>	6p12
GST A4-4	Alfa	<i>GSTA4</i>	6p12
GST A5-5	Alfa	<i>GSTA5</i>	6p12
GST M1-1	Mu	<i>GSTM1</i>	1p13
GST M2-2	Mu	<i>GSTM2</i>	1p13
GST M3-3	Mu	<i>GSTM3</i>	1p13
GST M4-4	Mu	<i>GSTM4</i>	1p13
GST M5-5	Mu	<i>GSTM5</i>	1p13
GST P1-1	Pi	<i>GSTP1</i>	11q13
GST T1-1	Theta	<i>GSTT1</i>	22q11.2
GST T2-2	Theta	<i>GSTT2</i>	22q11.2
GST Z1-1	Zeta	<i>GSTZ1</i>	14q24.3
GST O1-1	Omega	<i>GSTO1</i>	14q24.3
GST O2-2	Omega	<i>GSTO2</i>	14q24.3
PGD2/GST S1-1	Sigma	<i>PGD2</i>	4q22.3

Las clases Alfa, Mu y Pi han sido las más estudiadas debido a su presencia en diversos mamíferos además que se encuentran en mayor concentración en relación con las clases restantes.

Al analizar ambas tablas se puede observar que los humanos y algunas especies de roedores como las ratas (*Rattus norvegicus*) comparten las mismas clases de GST alfa y pi y que las ratas poseen una clase más de GST mu (M6). Debido a las similitudes anteriores y a que, como ya se ha expresado anteriormente, las tres clases mencionadas son las más abundantes en adelante se detallarán las características estructurales y bioquímicas de estas tres clases.

En relación con la GST de mamíferos se ha observado que en el caso de la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal se conserva un porcentaje alto de homología entre las diferentes especies que comparten las diferentes clases de enzima (Mannervik 1985).

Tabla 3. Clasificación de GST de rata (Modificado de Mannervik, 2005).

Glutathión S-Transferasas solubles en ratas (<i>Rattus norvegicus</i>)			
Designación de enzima	Clase	Gen	Otras designaciones
GST A1-1	Alfa	<i>GSTA1</i>	GST B, GST 1-1, ligandina, Ya ₁ , 1a-1a SP:GST A1
GST A2-2	Alfa	<i>GSTA2</i>	Ya ₂ , 1b-1b SP:GSTA2
GST A3-3	Alfa	<i>GSTA3</i>	GST AA, GST 2-2, Yc ₁ , 2 SP:GSTC1_RAT
GST A4-4	Alfa	<i>GSTA4</i>	GST K, GST 8-8, Yk SP:GSTA3_RAT
GST A5-5	Alfa	<i>GSTA5</i>	Yc ₂ SP:GSTC2_RAT
GST M1-1	Mu	<i>GSTM1</i>	GST A, GST 3-3, Yb ₁
GST M2-2	Mu	<i>GSTM2</i>	GST D, GST 4-4, Yb ₂
GST M3-3	Mu	<i>GSTM3</i>	GST 6-6, Yb ₃ , Yn
GST M4-4	Mu	<i>GSTM4</i>	Yb ₄
GST M5-5	Mu	<i>GSTM5</i>	GST 11-11, Yo
GST M6-6	Mu	<i>GSTM6</i>	GST 9-9, Yn ₂
GST P1-1	Pi	<i>GSTP1</i>	GST P, GST 7-7, Yf, Yp
GST T1-1	Theta	<i>GSTT1</i>	GST E, GST 5-5, Yrs
GST T2-2	Theta	<i>GSTT2</i>	GST M, GST 12-12, Yrs
GST Z1-1	Zeta	<i>GSTZ1</i>	MAAI
GST O1-1	Omega	<i>GSTO1</i>	DHAR
GST O2-2	Omega	<i>GSTO2</i>	
PGD2/GST S1-1	Sigma	<i>PGD2</i>	

La tabla 4 muestra las secuencias de aminoácidos del extremo amino terminal de las clases alfa, mu y pi. Los recuadros señalan las secuencias conservadas para las clases alfa, mu y pi en las especies en las que se ha analizado la secuencia.

Tabla 4. Secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de las GST de las clases alfa, mu y pi
(Modificado de Mannervik, 1985)

Secuencia de aminoácidos terminales de Glutatión S-Transferasa																										
	Secuencia de aminoácidos																									
Clase alfa																										
Rata 1-1 (cDNA)	(M)	S	G	K	P	V	L	H	Y	F	N	A	R	G	R	M	E	C	I	R	W	L	L	A	A	A
Rata 1-2		P	G	K	P	V	L	H	Y	F	N	G	R	G	R	M	E	P	I							
Rata 2-2		P	G	K	P	V	L	(H)	Y	F																
Rata 2-2 (cDNA)	(M)	P	G	K	P	V	L	H	Y	F	D	G	R	G	R	M	E	P	I							
Clase mu																										
Humano		P	M	I	L	G	Y	W	D	I	R	G	L	A	H	A	I	R	L	L	L	E	Y	T	D	T
Rata 3-3		P	M	I	L	G	Y	W	N	V	R	G	L	T	H	P	I	R	L	L						
Rata 4-4		P	M	T	L	G	Y	W	D	I	R	G	L	A	H	A	I	R	L	F	L	E	Y	T		
Ratón MIII		P	M	I	L	G	Y	W	N	V	R	G	L	T	H	P	I	R	M	L	L	Q	Y	T	D	X
Ratón GT-8.7		P	M	I	L	G	Y	X	N	V	R	G	L	X	H	P	I	R	M	L	L	E	Y	X	D	S
Ratón GtT-9.3		P	M	T	L	G	Y	W	N	T	R	G	L	T	H	S	I	R	L	L	L	E	Y	X		
Enzima bovina		P	M	I	L	G	Y	W	D	I	R	G	L	A	H	A	I	S	L	L	L					
Clase pi																										
Humano		P	P	Y	T	V	V	Y	F	P	V	R	G	R	C	A	A	L	R	M	L	L	A	D		
Rata 7-7		P	P	Y	(T)	I	V	Y	F	P	V															
Ratón MII		P	P	Y	T	I	V	Y	F	P	V	V	D	G	C	E	A	M								

El hecho de que las clases alfa, mu y pi son muy similares entre especies, justifica el uso de ratas Wistar macho como modelo de experimentación. La especie *R. Norvegicus*, en particular las ratas de la cepa Wistar, desarrolladas en el instituto Wistar en 1906 para su uso en la investigación biológica y médica, son una cepa de ratas que sirven como organismo modelo para el estudio y entendimiento de diversos procesos bioquímicos llevados a cabo en mamíferos. Una amplia variedad de investigaciones sobre el efecto de sustancias exógenas y dañinas al organismo, se han llevado a cabo con esta cepa. Por ejemplo, el daño renal inducido por arsénico e intensificado a través de la aplicación de imidacloprid (un insecticida usado en el manejo de insectos y plagas en la agricultura y el control de pulgas en perros y gatos). El daño celular fue determinado a través de la medición de los niveles de MDA y además se

cuantificó la actividad de distintas enzimas antioxidantes como la CAT, SOD, GPx, GR y GST. Esta última determinada a través de la formación del complejo GSH-DNCB. Se encontró pues que el imidacloprid potencia el daño renal inducido por arsénico (*Mahajala et al, 2018*).

Por todo lo anterior se podría sugerir, que la Glutación S-transferasa juega un papel importante en la mayoría de los seres vivos. Se ha observado, que algunas clases de GST que se han detectado en mamíferos como la alfa, la teta, y la zeta, se pueden encontrar en algunas especies de bacterias y de plantas, demostrando que las clases no son exclusivas de una sola especie, y que muy posiblemente han jugado un papel esencial en la evolución y supervivencia de una gran variedad de especies de nuestro planeta.

a) GST clase Alfa (GSTA)

Esta clase constituye una de las primeras en ser caracterizadas bioquímicamente y debido a su capacidad de formar enlaces con ligantes hidrofílicos se le acuñó el término “ligandina”. Los genes de la clase alfa contienen siete exones y se encuentran en una distancia entre 12-18 Kb de longitud. Además, son dímeros y se expresan a varios niveles en la mayoría de los tejidos, la expresión de las subunidades GSTA1 y GSTA2 es mayor en el hígado (Board 2013).

La enzima está constituida por 222 aminoácidos por monómero y consta de un dominio amino terminal que involucra a los aminoácidos 3 a 83 y un extremo carboxilo terminal que comprende de los aminoácidos 85 a 207. La tabla 5 y la tabla 6 muestran la secuencia de aminoácidos de la GST alfa de humano y de rata respectivamente.

(UNIPROT. <http://www.uniprot.org/uniprot/P08263>; <http://www.uniprot.org/uniprot/P00502>).

El dominio carboxilo terminal puede formar parte del sitio de unión al sustrato, pero parece no estar involucrado directamente en el enlace con el glutatión (GSH) y no resulta esencial para la actividad catalítica. Sin embargo existen isoformas en algunas especies que son capaces de unir glutatión o compuestos derivados de éste.

La estructura cuaternaria contiene 10 alfa hélices y 5 láminas beta plegada. Posee un punto isoeléctrico (pI) de 8.9; un pH óptimo de 10 y una temperatura óptima de 37 °C.

La figura 11 muestra la estructura cuaternaria de la GST alfa y la unión de bencilglutatión al sitio carboxilo terminal (Armstrong, 1997).

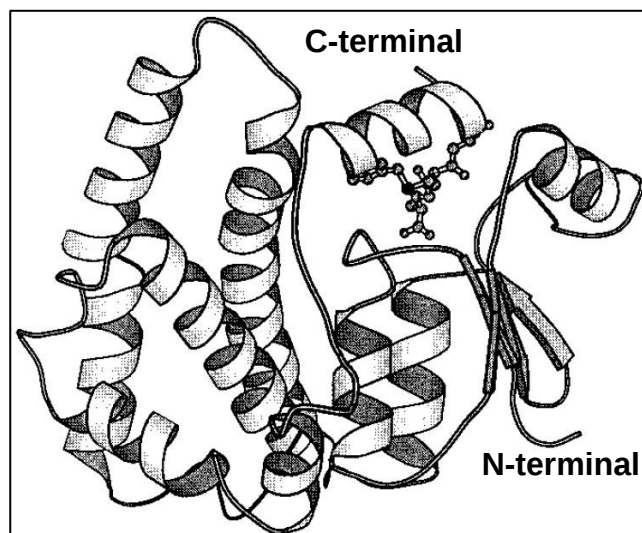


Figura 11. Estructura tridimensional para un monómero de GST alfa en complejo con S-bencilglutación (Tomado de Armstrong 1997).

La constante de Michaelis-Menten (K_m) para el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno es de 1.2 mM para humano (hígado) y 0.11 mM para rata (hígado). La velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) para el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno es de $3.58 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ para humano y $3 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ para rata. (Base de datos BRENDA; <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.18&UniProtAcc=P08263&OrganismID=2681>; <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.18&UniProtAcc=P09211&OrganismID=2681>).

Tabla 5. Secuencia de aminoácidos de GST clase alfa de humano (UNIPROT. <http://www.uniprot.org/uniprot/P08263>).

10	20	30	40	50
MSGKPVLHYF	NAGRMECIR	WLLAAAGVEF	DEKFIQSPED	LEKLKKGDNL
60	70	80	90	100
MFDQVPMVEI	DGMKLAQTRA	ILNYIATKYD	LYGKDMKERA	LIDMYTEGIL
110	120	130	140	150
DLTEMIMQLV	ICPPDQKEAK	TALAKDRTKN	RYLPAFEKVL	KSHGQDYLVG
160	170	180	190	200
NRLTRVDIHL	LELLLYVEEF	DASLLTSFPL	LKAFKSRIS	LPNVKKFLQP
210	220	222		
GSQRKLPVDA	KQIEEARKIF	KF		

La secuencia de aminoácidos para la GST clase alfa de humano (obtenida de la base de datos Uniprot) y la de rata demuestran en las tablas 5 y 6 respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la GST alfa de humano muestra una cisteína en la posición 112, once ácidos aspárticos y 20 ácidos glutámicos. El plomo es más afín a los grupos sulfhidrilo que a los grupos carboxilo. Por ello el plomo podría unirse a la estructura proteica más probable en algunos de estos residuos de aminoácidos que en la cisteína 112. Sin embargo, dicha unión dependerá de pH del medio celular (Srinivas 2007; <http://www.uniprot.org/uniprot/P08263>).

Tabla 6. Secuencia de aminoácidos de GST clase alfa de rata (Uniprot: <http://www.uniprot.org/uniprot/P00502>)

10	20	30	40	50
MAEKPKLHYF	NARGRMESTR	WLLAAAGVEF	EEKFIKSAED	LDKLRNDGYL
60	70	80	90	100
MFQQVPMVEI	DGMKLVQTRA	ILNYIASKYN	LYGKDIKERA	LIDMYIEGIA
110	120	130	140	150
DLGEMILLLP	VCPPEEKDAK	LALIKEKIKN	RYFPAPFEKVL	KSHGQDYLVG
160	170	180	190	200
NKLSRADIHL	VELLYYVEEL	DSSLISSFPL	LKALKTRISN	LPTVKKFLQP
210	220	222		
GSPRKPPMDE	KSLEEARKIF	RF		

En la secuencia de aminoácidos de la GST alfa de rata (obtenida de la base de datos Uniprot) se encuentran 20 ácidos glutámicos y 8 ácidos aspárticos lo que sugiere que el plomo podría unirse a estos residuos de aminoácidos ya que, aunque el plomo tiene afinidad por los grupos sulfhidrilo (-SH), también puede unirse a los grupos hidroxilo (-OH) y a los amino (-NH₂) (Srinivas 2007; <http://www.uniprot.org/uniprot/P00502>).

b) GST clase Mu (GSTM)

Los genes de la clase Mu generalmente están compuestos de ocho exones (nueve en el caso de GSTM3) y se encuentran a una distancia entre 6 y 16 kb de longitud. Esta enzima es dimérica y su expresión es específica en algunos tejidos; por ejemplo, en el hígado se expresa la GSTM1 de manera predominante; la GSTM2 se expresa en los músculos preferentemente y la GSTM3 en cerebro y testículos (Board 2013). La enzima está constituida por 218 aminoácidos por monómero y consta de un dominio amino terminal que contiene los aminoácidos 2 a 88 y un dominio carboxilo terminal que comprende los aminoácidos

90 a 208. La tabla 7 y la tabla 8 muestran las secuencias de aminoácidos de la GST mu de humano y de rata respectivamente.

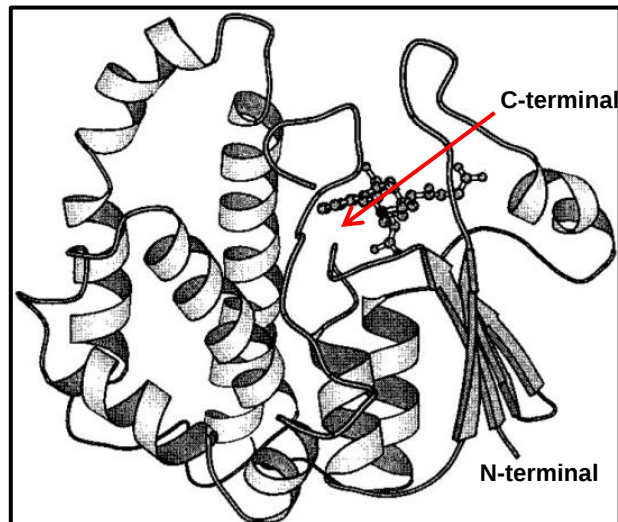


Figura 12. Estructura tridimensional para un monómero de GST mu en complejo con (9S, 10S)-9-(S-glutationil)-10-hidroxi-9,10-dihidrofenantreno (Tomado de Armstrong 1997).

La estructura está constituida por 8 alfa hélices y 7 láminas beta plegada. Posee un punto isoeléctrico (pI) de 6.24; un pH óptimo de 6.5 y una temperatura óptima de 25 y 30 °C. La figura 12 muestra la estructura cuaternaria de la enzima y la unión de (9S, 10S)-9-(S-glutationil)-10-hidroxi-9,10-dihidrofenantreno al sitio amino terminal.

La constante de Michaelis-Menten (Km) para el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno es de 18.7 μM y la velocidad máxima (Vmáx) para el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno es de 26.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ para rata (hígado). No se encontraron reportes sobre Km y Vmáx de la GSTM en humanos.

(Base de datos Uniprot y Brenda: <http://www.uniprot.org/uniprot/P09488>;

<http://www.uniprot.org/uniprot/P04905>; [http://www.brenda-](http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.18&UniProtAcc=P08263&OrganismID=2681)

[enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.18&UniProtAcc=P08263&OrganismID=2681](http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.18&UniProtAcc=P08263&OrganismID=2681); [http://www.brenda-](http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.18&UniProtAcc=P09211&OrganismID=2681)

[enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.18&UniProtAcc=P09211&OrganismID=2681](http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.18&UniProtAcc=P09211&OrganismID=2681)).

Tabla 7. Secuencia de aminoácidos de GST mu de humano (<http://www.uniprot.org/uniprot/P09488>).

10	20	30	40	50
M P M I L G Y W D I	R G L A H A I R L L	L E Y T D S S Y E E	K K Y T M G D A P D	Y D R S Q W L N E K
60	70	80	90	100
F K L G L D F P N L	P Y L I D G A H K I	T Q S N A I L C Y I	A R K H N L C G E T	E E E K I R V D I L
110	120	130	140	150
E N Q T M D N H M Q	L G M I C Y N P E F	E K L K P K Y L E E	L P E K L K L Y S E	F L G K R P W F A G
160	170	180	190	200
N K I T F V D F L V	Y D V L D L H R I F	E P K C L D A F P N	L K D F I S R F E G	L E K I S A Y M K S
210	218			
S R F L P R P V F S	K M A V W G N K			

La secuencia de aminoácidos de la GST clase mu en humano presenta tres cisteínas (posición 88, 97 y 184), 13 ácidos aspárticos y 18 ácidos glutámicos. Lo que indica que si las cisteínas se encuentran localizadas a una distancia específica podrían interactuar con los iones de plomo a una razón de dos residuos sulfhidrilo por un átomo de plomo. De la misma manera los grupos carboxilo representan sitios probables de unión al plomo (Srinivas 2007; <http://www.uniprot.org/uniprot/P09488>).

Tabla 8. Secuencia de aminoácidos de GST mu de rata (<http://www.uniprot.org/uniprot/P04905>).

10	20	30	40	50
M P M I L G Y W N V	R G L T H P I R L L	L E Y T D S S Y E E	K R Y A M G D A P D	Y D R S Q W L N E K
60	70	80	90	100
F K L G L D F P N L	P Y L I D G S R K I	T Q S N A I M R Y L	A R K H H L C G E T	E E E R I R A D I V
110	120	130	140	150
E N Q V M D N R M Q	L I M L C Y N P D F	E K Q K P E F L K T	I P E K M K L Y S E	F L G K R P W F A G
160	170	180	190	200
D K V T Y V D F L A	Y D I L D Q Y H I F	E P K C L D A F P N	L K D F L A R F E G	L K K I S A Y M K S
210	218			
S R Y L S T P I F S	K L A Q W S N K			

La secuencia de aminoácidos de la GST clase mu en rata se encuentran 3 cisteínas (posición 87, 115 y 174), 15 ácidos aspárticos y 15 ácidos glutámicos donde el plomo puede formar interacciones con esos residuos. En este caso se deben de tomar en cuenta las consideraciones de unión con plomo descritas en el párrafo anterior. De manera adicional se debe decir que la unión del plomo con los residuos carboxilo y sulfhidrilo dependerá del pH (Srinivas 2007; <http://www.uniprot.org/uniprot/P04905>).

c) GST clase Pi (GSTP)

La enzima GST clase pi es una isoforma con un gen único correspondiente al cromosoma 11q13.2 y forma un dímero. Se han realizado diversos estudios debido a su relación con la resistencia a las drogas farmacéuticas para tumores, además, existen reportes de diversos casos en la que la enzima se encuentra involucrada con distintos tipos de cáncer, ya que aumenta su expresión en las células cancerígenas, participa en las respuestas de estrés y en la transducción de señales como un inhibidor de la enzima c-Jun N-terminal cinasa (JNK). En una persona sana, la expresión es mayor en los riñones (Kusano 2012; Database NCBI

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?ascbn=8&maxaln=10&seltype=2&uid=239374&feature=1&querygi=4139536&aln=2,2,0,39,42,39,34>).

La enzima está constituida por 210 aminoácidos por monómero y contiene un dominio amino terminal que comprende los aminoácidos 2 al 81 y otro dominio que involucra a los aminoácidos 83 al 204. La tabla 9 y la tabla 10 muestran las secuencias de aminoácidos para humano y para rata respectivamente. La estructura está formada por 12 alfa hélices y 8 láminas beta plegada. Posee un punto isoeléctrico (pI) de 5.43; un pH óptimo de 11 y una temperatura óptima de 37 °C. La figura 13 muestra la estructura cuaternaria de la enzima y la unión de glutatión sulfonato en una región $\beta\alpha\beta$ cercano al dominio amino terminal. La constante de Michaelis-Menten (Km) para el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno es de 82 mM y la velocidad máxima (V_{máx}) para el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno es de 75.9 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ en humano (hígado). No se encontró reportes sobre Km y V_{max} sobre la GSTP en rata.

(<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.18&UniProtAcc=P08263&OrganismID=2681>;

<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.18&UniProtAcc=P09211&OrganismID=2681>).

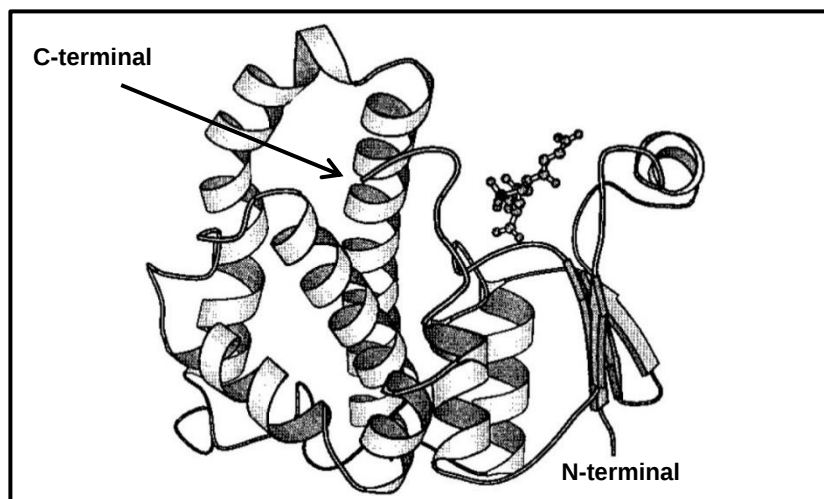


Figura 13. Estructura tridimensional para un monómero de GST pi en complejo con glutatión sulfonato (Tomado de Armstrong 1997).

Tabla 9. Secuencia de aminoácidos de GST pi de humano (<http://www.uniprot.org/uniprot/P09211>).

10	20	30	40	50
MPPYTVVYFP	VRGRCAALRM	LLADQGQSWK	EEVVTVETWQ	EGSLKASCLY
60	70	80	90	100
GQLPKFQDGD	LTLYQSNLIL	RHLGRTLGLY	GKDQQEAALV	DMVNDGVEDL
110	120	130	140	150
RCKYISLIYT	NYEAGKDDYV	KALPGQLKPF	ETLLSQNQGG	KTFIVGDQIS
160	170	180	190	200
FADYNLLDLL	LIHEVLAPGC	LDAFPLLSAY	VGRLSARPKL	KAFLASPEYV
210				
NLPINGNGKQ				

La secuencia de aminoácidos de la GST clase pi en humano contiene 4 cisteínas (posición 25, 58, 112 y 170), 13 ácidos aspárticos y 10 ácidos glutámicos, que constituyen sitios probables de unión al plomo dependientes del potencial de hidrógeno (Srinivas 2007; <http://www.uniprot.org/uniprot/P09211>).

La secuencia de aminoácidos de la GST clase pi en rata contiene 4 cisteínas (posición 15, 48, 102 y 170), 12 ácidos aspárticos y 8 ácidos glutámicos donde el plomo puede interactuar con estos residuos como ya se ha mencionado en las descripciones anteriores de cada uno (Srinivas 2007; <http://www.uniprot.org/uniprot/P04906>).

Tabla 10. Secuencia de aminoácidos de GST pi de rata (<http://www.uniprot.org/uniprot/P04906>).

10	20	30	40	50
MPPYTIVYFP	VRGRCEATRM	LLADQGQSWK	EEVVTIDVWL	QGSLKSTCLY
60	70	80	90	100
GQLPKFEDGD	LTLYQSNAIL	RHLGRSLGLY	GKDQKEAALV	DMVNDGVEDL
110	120	130	140	150
RCKYGTLIYT	NYENGKDDYV	KALPGHLKPF	ETLLSQNQGG	KAFIVGNQIS
160	170	180	190	200
FADYNLLDLL	LVHQVLAPGC	LDNFPLLSAY	VARLSARPKI	KAFLSSPDHL
210				
NRPINGNGKQ				

1.7 Glutación S-transferasa como bioindicador

Se ha reportado que la Glutación S-transferasa citosólica se considera un biomarcador de daño en hígado y riñón por mostrar una localización regio-específica de las diferentes isoformas. En humanos, la clase alfa (α GST), es la isoforma predominante en el hígado. La distribución uniforme junto con niveles hepáticos relativamente altos y una corta vida media en el plasma (90 minutos), la convierte en una enzima más sensible (aún más que las aminotransferasas) y un posible indicador del estado de los hepatocitos. Una distribución similar regio-específica única de la Glutación S-transferasa alfa (α GST) y la Glutación S-transferasa pi (π GST) ocurre en los riñones donde varios estudios en muestras de orina, han demostrado que estas enzimas indican daño específico en el túbulo proximal o distal por fármacos (Kilty, 1998). La cuantificación tanto de la Glutación S-transferasa alfa como de la Glutación S-transferasa pi, se puede utilizar como biomarcador sensible y relativamente simple para la detección temprana de efectos tóxicos que puedan afectar el sistema tubular renal. Por ejemplo, en estudios tanto en humanos como en animales, los niveles de la Glutación S-transferasa alfa en orina se han correlacionado estrechamente con la dosis de varias toxinas como fármacos y drogas (Finn, 2008).

En el cerebro, la GST tiene un papel importante en la detoxificación de neurotoxinas como la acrilamida, la colchicina, el cloranfenicol y el óxido nítrico entre otros. También se le ha encontrado una relación entre los gliomas y tumores en el cerebro y la expresión de diferentes isoformas de la enzima (Das 1981; Wrensch 2004).

1.8 Glutación S-transferasa y su relación con la edad

Un artículo de Journal of Neurochemistry, el equipo de Das Mukul y colaboradores. en 1981, realizaron un estudio sobre la actividad de la enzima en cerebro y si hay diferencias entre especies, sexo, y edad. Sus conclusiones fueron que la actividad relacionada con la especie si es notoria, mostrando que en los mamíferos hay más actividad en comparación con las aves (ratón, conejillo de india, rata, paloma, buitre y cuervo). En cuanto a la diferencia de sexo, se observó que la actividad catalítica en rata y ratón es mayor en hembras en comparación con los machos, el autor sugiere que sea debido a estado hormonal en el que se encontraba el animal. En el estudio de la actividad de la GST con relación a la edad, se obtuvieron datos que indican la presencia de la enzima desde la etapa neonatal, esto sugiere su importancia como protector contra xenobióticos y que aumenta la actividad conforme pasa el tiempo (estudios realizados en ratas de 7, 14, 21, 28, 35 y 90 días de edad).

Otro estudio realizado en el año 2010 por Pawan Kumar, reportaron que el aumento de la actividad de la Glutación S-Transferasa está relacionada con el envejecimiento humano y este a su vez al

decremento tanto del potencial antioxidante en el plasma, como, la concentración de glutatión reducido.

2. ANTECEDENTES

La GST ha sido estudiada desde hace más de 40 años. Los estudios incluyen la purificación de la enzima, el análisis de aminoácidos y el estudio de la actividad enzimática con diferentes sustratos. Como consecuencia de estas investigaciones se sabe que esta enzima cuenta con 18 de los 20 aminoácidos conocidos y que presenta actividad con sustratos electrofílicos como el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB), el cloruro de *p*-nitrobencilo, y el iodometano, entre otros (Habig, 1974). También, se han evaluado los mecanismos de reacción, estructura y función de la enzima, observando que ésta cataliza reacciones de sustitución nucleofílica aromática y apertura de anillos de epóxidos (Armstrong, 1991). Se ha ensayado su relación con órganos dañados, proponiendo que la actividad de la enzima puede ser indicador de daño en órganos (Kilty, 1998). Desde hace 10 años aproximadamente, la GST ha sido comparada con otros biomarcadores de daño renal, ya que durante este proceso, la enzima se encuentra presente en la orina indicando posiblemente nefrotoxicidad por fármacos (Rouse, 2011).

2.1 Glutación S-transferasa e intoxicación con metales

Se han reportado trabajos de estudios *in vitro* sobre la actividad de la GST y su inhibición con mercurio 2+. Se ha observado que al aumentar la concentración de glutatión reducido (ligante de la enzima GST) o al añadir cisteína al sistema, se puede disminuir la inhibición de la actividad de la enzima. La unión de mercurio a la Glutación S-transferasa puede estar influenciada por muchos factores, incluyendo la disponibilidad de glutatión reducido y el estado de oxidación del metal, la dosis, la exposición frente a otros compuestos reactivos con el grupo funcional tiol (-SH), y la funcionalidad general de la Glutación S-transferasa. Mientras el mercurio reacciona espontáneamente con el GSH intracelular, la GST también puede ayudar en el proceso de desintoxicación del metal a través de la catálisis de la reacción de unión al GSH y el transporte del conjugado de forma temporal previniendo la inhibición de la actividad de otras proteínas clave intracelulares como la Superóxido dismutasa y la Catalasa (Goodrich, 2012).

No existen reportes suficientes relacionados con los efectos del plomo sobre la enzima Glutación S-transferasa. Sin embargo, se han realizado ensayos *in vitro* donde se ha observado que la actividad de la Glutación S-transferasa disminuyó conforme aumentó la concentración de plomo en el medio. Un estudio dosis-respuesta realizado *in vivo* en sangre humana demostró que la actividad de la enzima aumentó al utilizar una dosis baja de metal (1.14 mg/Kg), mientras que otros ensayos *in vivo* mostraron que la Glutación S-transferasa puede sufrir cambios conformacionales y que el plomo puede actuar como potenciador oxidativo (Wright, 1998; Dagget, 1998; Hunaiti, 2000).

2.2 Antecedentes de investigación sobre la enzima Glutación S-transferasa realizados por el grupo de investigación de la UNPA

Navarro en 1999, realizó un estudio *in vivo* en ratas expuestas a 500 ppm de plomo durante siete meses vía oral. Los resultados mostraron una relación entre la actividad de la Glutación S-transferasa en el riñón, la orina y suero, la cual es directamente proporcional a la concentración de plomo; de la misma manera propuso que el incremento de la actividad enzimática podría implicar una relación directa con la formación de las especies reactivas de oxígeno.

Hernández en 2013, estableció un modelo experimental *in vivo* fundamentado quimiométricamente, en donde se refuerza la propuesta por Navarro de la relación entre la actividad enzimática de la Glutación S-transferasa con el posible aumento de las especies reactivas de oxígeno como consecuencia de la intoxicación con plomo.

Méndez en 2016, estudió la actividad de la Glutación S-transferasa *in vivo* en ausencia y presencia de plomo en el riñón y un posible tratamiento con diferentes antioxidantes. Observó que el daño renal por la intoxicación con plomo aumentó la concentración de las especies reactivas de oxígeno y también aumentó la actividad de la Glutación S-transferasa. El tratamiento con extractos naturales, ricos en antioxidantes externos (Aloe vera y Blue Berry) ayudaron a disminuir el aumento de las especies reactivas de oxígeno ocasionado por exposición al metal, así como a reestablecer la actividad de la Glutación S-transferasa y finalmente a disminuir los daños renales (filtración y absorción) observados en presencia de plomo.

Cruz en 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. 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 reestableció.

Raymundo en 2016, estudió la dinámica molecular de la interacción de la Glutación S-transferasa con el ligante glutación reducido (GSH) y el sustrato 2,4-dinitro-1-clorobenceno (DNCB), observando los residuos involucrados en la catálisis enzimática, el efecto estructural ocasionado por el plomo y el establecimiento de un posible modelo teórico-experimental de la actividad de la Glutación S-transferasa y la inhibición por plomo.

Feliciano en 2019, evaluó la susceptibilidad a la intoxicación con plomo en ratas Wistar macho. El expuso ratas gestantes a una sal de plomo vía oral durante todo el periodo gestacional; posteriormente las crías fueron intoxicadas con la misma sal de plomo durante cuatro meses por vía oral. Al terminar este período se administraron 7 dosis de la sal de plomo vía intraperitoneal durante 15 días más. El resultado fue que las ratas pre expuestas desde el proceso embrionario se comportaron de forma parecida a los que no fueron expuestos al metal, posiblemente porque pudieron desarrollar mecanismos de respuesta que les ayudaron a vivir en constante contacto con el plomo. A nivel bioquímico, se observó que la actividad de la enzima GST aumentó como respuesta a la intoxicación con plomo, lo que podría sugerir que esta enzima podría participar, de alguna manera, en la resistencia contra la exposición al metal.

Zilli en 2020, estudió el efecto de la intoxicación con plomo en ratas gestantes. Administró 1000 ppm de una sal de plomo durante el tiempo de gestación hasta la lactancia. Como resultado se observó que no hubo alteraciones en el proceso de concepción (cantidad de embarazos y número de crías) en comparación al grupo control, también se observó que las especies reactivas de oxígeno (ERO's) aumentaron, pero la actividad de la GST disminuyó en comparación al grupo control. Sin embargo, en otro grupo se administró plomo combinado con un tratamiento hormonal anticonceptivo, el resultado mostró que el 50% de la población no se embarazó. En el otro 50% (que sí lograron embarazarse) el período de gestación duró más a diferencia del tiempo que se reporta en la literatura. Se registró que las especies reactivas de oxígeno y la actividad de la enzima GST aumentaron en comparación con el grupo control y el grupo expuesto a plomo. Lo que indica que puede haber relación entre los anticonceptivos y el metal durante el embarazo.

Pulido en 2022, estudió el efecto de la exposición a mercurio y cadmio en la actividad de la enzima Glutación S-Transferasa de las especies *Hafnia Alvei*, *Candida Parapsilosis*, *Penicillium sp* y *Rattus Norvegicus* (Wistar). Observó que, en microorganismos expuestos a mercurio y cadmio, la GST ejerció una acción de respuesta ante la producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO's), bajo una estrecha relación dosis-tiempo de exposición. En cuanto a las ratas, se observó que, en hígado y riñón, no hubo incremento de ERO's, pero sí daño en estos órganos, el cual se evidenció en el análisis del examen general de orina y en la morfología de los órganos al ser expuestos a cada uno de los metales. En estos casos se observó un aumento de la actividad de la enzima GST, sugiriendo una participación de esta enzima ante la intoxicación con los metales pesados, posiblemente bajo la acción de mecanismos de transcripción que podrían promover su inducción ante la presencia de dichos metales.

En cuanto al cerebro no observaron alteraciones significativas, esto puede deberse a la barrera hematoencefálica como estructura de protección al paso de los metales pesados.

Para el desarrollo del presente trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica extensa relacionada con la determinación de la actividad de la enzima en varios organismos y con diferentes xenobióticos. Como resultado de lo anterior se han identificado cinco artículos relacionados con los metales mercurio y plomo con la expresión de isoformas y actividad enzimática (Moser 1995, Daggett 1997; Wright 1998; Daggett 1998; Goodrich 2012). Los artículos citados hacen énfasis en aspectos relacionados con otros tóxicos y otros sistemas de estudio, sin embargo, no abordan el estudio de la cinética enzimática y el efecto en sus variables cinéticas (K_M y V_{max}) que tienen los metales pesados como el plomo, el cual es un xenobiótico usado en este trabajo debido a las características del tóxico mencionadas en los párrafos anteriores.

Al realizar el estudio de la actividad y la determinación de las características cinéticas conocidas como constante de Michaelis (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}) mediante la metodología de Hanes-Woolf (Hanes, 1932, referencia original) se podrá ahondar en el estudio del efecto del plomo sobre la actividad de la enzima determinando de esta manera el tipo de cinética, la afinidad de la enzima por su sustrato en ausencia y presencia de plomo, el tipo de inhibición que ejerce el plomo sobre la GST y la actividad enzimática en función de la edad y la concentración de plomo.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día los biomarcadores de daño por intoxicación con plomo existentes incluyendo la determinación de plomo en hueso y en sangre, han demostrado no ser lo suficientemente confiables para determinar daño en algún órgano o sistema. Lo anterior se debe a que, en el primer caso, la determinación se lleva a cabo mediante radiografías. Sin embargo, el problema consiste en la interpretación de las mismas ya que no existe una manera precisa de determinar daño por el metal sin confundirlo con otros padecimientos en los cuales el daño al tejido óseo se encuentra comprometido. En relación a la medición de plomo en sangre, este método solo refleja una aproximación al grado de daño que una persona podría presentar ya que, como se ha mencionado anteriormente, la susceptibilidad individual juega un papel muy importante dentro del fenómeno de la intoxicación por plomo.

Varios autores consideran que la actividad de la enzima Glutación S-transferasa podría constituir un biomarcador de exposición a metales como plomo y mercurio indicando nefrotoxicidad. Por otro lado, algunos científicos han propuesto que la Glutación S-transferasa podría constituir un biomarcador de efecto, al existir una relación entre la actividad de la enzima y el aumento de las especies reactivas de oxígeno causando daño en el riñón. De la misma manera, el cáncer constituye una enfermedad en donde la actividad de la GST es considerada como biomarcador de efecto debido a que la enzima puede tener un papel importante en la modulación de los efectos biológicos de los agentes carcinogénicos. Sin embargo, lo anterior se relaciona más con un proceso metabólico en donde la enzima desempeña un papel no propiamente de indicador sino de efector.

Al aumentar el interés sobre el comportamiento de esta enzima dentro del ambiente clínico, el estudio de la actividad de la Glutación S-transferasa, así como la determinación de sus características cinéticas (K_m , V_{max}), contribuirán a comprender mejor el comportamiento de la misma en función de la edad y de la intoxicación con elementos tóxicos como el plomo, que es ya considerado, en la actualidad, como un problema de salud.

4. JUSTIFICACIÓN

La enzima Glutación S-transferasa es una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza; tiene la capacidad de expresar diferentes isoformas (15 descritas hasta la fecha de este trabajo); se encuentra compartimentalizada (mitocondria, microsoma y citosol); puede ser un monómero o dímero; es capaz de reconocer diferentes sustratos; tiene participación en el metabolismo celular (metabolismo de los xenobióticos, transducción de señales, metabolismo de leucotrienos y prostaglandinas, así como el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno); se ha considerado como un biomarcador por su facilidad de medir su actividad en fluidos corporales (suero y orina); existe una relación entre la actividad de la GST en orina y suero con la enfermedad renal y se ha observado la relación entre plomo-EROs-actividad de GST.

Por todo lo anterior y por ser una enzima con carácter evolutivo, la enzima posee una importancia esencial dentro de los seres vivos y justifica la necesidad de realizar la investigación de sus constantes cinéticas en presencia de plomo, el cual constituye uno de los metales tóxicos para los seres vivos. Al estudiar la actividad y las constantes cinéticas de la Glutación S-transferasa y el efecto que la exposición al metal puede tener sobre ellas, se podrá determinar el tipo de inhibición que este elemento ocasiona en la enzima y, con ello, se comprenderá mejor el mecanismo de daño. De esta manera, este trabajo contribuirá con los estudios sobre el mecanismo de acción del plomo sobre la enzima.

5. HIPÓTESIS

El plomo es un metal no esencial para las células, por lo que su administración en modelos animales ocasiona daños en sus órganos. Entre ellos se encuentra la inhibición de varios procesos metabólicos, la gran mayoría mediados por enzimas. La presencia de este metal en diferentes órganos podrá ocasionar disminución de la actividad y alteración de las constantes cinéticas de la enzima Glutación S-transferasa.

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la actividad y las características cinéticas (K_m , V_{max}) de la enzima Glutación S-transferasa en función de la edad y de la concentración de plomo en órganos (riñón, hígado y cerebro) y fluidos (orina y sangre) de ratas Wistar macho.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar la actividad enzimática de la Glutación S-transferasa en función de la edad en riñón, hígado, cerebro, suero y orina.
2. Evaluar las características cinéticas (K_m y V_{max}) de la enzima Glutación S-transferasa en función de la edad en hígado, cerebro y riñón.
3. Evaluar la actividad enzimática de la Glutación S-transferasa en función de la concentración de plomo en riñón, hígado, cerebro, suero y orina.
4. Evaluar los parámetros cinéticos (K_m , V_{max}) de la enzima Glutación S-transferasa en función de la concentración de plomo en riñón, hígado y cerebro.

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para la realización de este trabajo se utilizaron grupos de 6 ratas de la especie Wistar macho bajo las siguientes condiciones y tratamientos:

A. En función de la edad

Se formaron grupos de acuerdo a las siguientes edades: 14, 21, 28, 40, 60 y 90 días.

Al terminar de cada periodo de experimentación, se colectó una muestra de orina de 12 horas y se guardó a -24°C después de realizar el examen general de orina mediante el uso de un kit de uroanálisis (Apéndice 1). Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (1mg/2.5Kg de peso) para llevar a cabo una disección y la toma de una muestra de sangre en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 15 µg/mL) como anticoagulante; la sangre se refrigeró y posteriormente se separó el suero. Los riñones, el hígado y el cerebro fueron extraídos y se guardaron a una temperatura de -24 °C hasta que se realizaron los ensayos bioquímicos.

Para la realización de las pruebas bioquímicas, los órganos se homogenizaron en un amortiguador de fosfatos 1M y pH 7.2 (PBS). Posteriormente se midió el contenido de proteína total por el método de Lowry. Finalmente se cuantificó la actividad enzimática de la Glutación S-transferasa y la concentración de especies reactivas de oxígeno.

B. En función de la intoxicación con plomo

Se formaron grupos de seis ratas de dos meses de edad (180 g en promedio) ya que, a esta edad, sus procesos metabólicos son óptimos (Cossio-Bolaños 2013). Cada grupo fue inyectado vía intraperitoneal con 100 µL de una solución de 25 mg/Kg de acetato de plomo por intervalos de 48 horas (Navarro *et al*, 2009).

Grupo 1: no se aplicó plomo (control)

Grupo 2: una sola dosis.

Grupo 3: dos dosis.

Grupo 4: tres dosis.

Grupo 5: cuatro dosis.

Grupo 6: cinco dosis.

Grupo 7: seis dosis.

Grupo 8: siete dosis.

Las ratas se colocaron en cajas metabólicas y se tomó una muestra de orina al inicio y al final del experimento; se realizó un examen general de orina (EGO) y después se guardó a -24°C. Los animales

se anestesiaron con pentobarbital sódico (1mg/2.5Kg de peso) y se procedió a una disección donde se obtuvo una muestra de sangre en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 15 µg/mL) como anticoagulante, la sangre se refrigeró y posteriormente se separó el suero. Los riñones, el hígado y el cerebro fueron extraídos y se guardaron a una temperatura de -24 °C hasta que se realizaron los ensayos bioquímicos.

Se cuantificó la actividad enzimática de la Glutación S-transferasa y la concentración de especies reactivas de oxígeno.

7.1 Ensayos bioquímicos

7.1.1.- Homogenizado de órganos.

Los órganos se lavaron con agua destilada para, posteriormente, ser homogenizados en un amortiguador de fosfatos 1M y pH 7.4 con un homogenizador de vidrio con pistilo de teflón:

- a) El cerebro se usó completo.
- b) Al hígado se le cortaron los lóbulos principales.
- c) Los riñones se cortaron de forma longitudinal para retirar la médula.

7.1.2.- Cuantificación de proteínas en orina, sangre, cerebro, hígado y riñones por método de Lowry (Peterson, 1979).

En un tubo se colocaron 790 µL de agua destilada, 10 µL de muestra, 100 µL de desoxicolato de sodio ($C_{24}H_{39}NaO$), 2 mL de una solución compuesta por sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) al 0.5%, 2 gramos de hidróxido de sodio (NaOH) y 0.134 gramos de tartrato de sodio potasio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) y 100 µL de Folin-Ciocalteu ($C_{10}H_5NaO_5S$, usando una dilución 1:3). Se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Se realizó una curva de calibración con bovina sérica bovina. La metodología detallada de la construcción de la curva se presenta en el Apéndice 2.

Una vez preparados los tubos, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV/VIS (Perkin Elmer Lambda 25) a una longitud de onda de 750 nm.

7.1.3.- Actividad de la enzima Glutación S-transferasa (GST) en riñón, hígado, cerebro, suero y orina.

En una celda de vidrio se agregó el volumen correspondiente de un amortiguador de fosfatos 0.1 M y pH 6.5, el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno a una concentración final de 1 mM y el ligante glutatión reducido también a una concentración final de 1 mM (Jacoby, 1985). Esta mezcla se homogenizó por

inversión y finalmente se adicionó el volumen correspondiente a 1 mg/ml de proteína total. Se midió la absorbancia a 350 nm por un tiempo de cinco minutos con intervalos de 20 segundos en un espectrofotómetro UV/Vis (Perkin Elmer Lambda 25). La actividad de la GST se determinó por la ecuación de Lambert-Beer de la siguiente manera.

$$A = \epsilon cl$$

En donde:

A es la absorbancia

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

c es la concentración de la enzima GST

l es paso óptico (1 cm).

7.1.4.- Determinación de las constantes cinéticas de la enzima Glutación S-transferasa (GST) en riñón, hígado y cerebro.

La metodología fue similar a la usada en la determinación de la actividad de la enzima. La enzima une al sustrato 2,4-dinitroclorobenceno para poder ligarlo al glutatión reducido (GSH). En base a ello, para obtener las constantes cinéticas (K_m y V_{max}) del sustrato, se variaron sus concentraciones mientras se mantuvo constante la concentración del ligante. Las concentraciones de sustrato fueron: 2.0, 1.75, 1.50, 1.25, 1.0, 0.75, 0.50 y 0.21 mM. La metodología fue la siguiente.

En una celda de vidrio se agregó el volumen correspondiente de un amortiguador de fosfatos 0.1 M y pH 6.5, el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno y el ligante glutatión reducido (Jacoby. 1985). Esta mezcla se homogenizó por inversión y finalmente se adicionó el volumen correspondiente a 1 mg/ml de proteína total. Se midió la absorbancia a 350 nm por un tiempo de cinco minutos con intervalos de 20 segundos en un espectrofotómetro UV/Vis (Perkin Elmer Lambda 25).

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

$$A = \epsilon cl$$

En donde:

A es la absorbancia

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

c es la concentración de la enzima GST

l es el paso óptico (1 cm).

Al final se graficó la cinética enzimática (Actividad/concentración de sustrato) y se eligió el modelo matemático de Hanes-Woolf para calcular la K_m y V_{max} . Un ejemplo del cálculo realizado en cada experimento se muestra en el Apéndice 3.

7.1.5.- Medición de especies reactivas de oxígeno en muestras de homogenado de cerebro, hígado y riñón.

En un tubo de ensayo 0.2 mL de homogenado + 0.8 mL PBS. Para llevar a cabo la reacción se adicionaron 0.025 mL de butirilhidroxitolueno (BHT) [88 mg de BHT en 10 mL de etanol absoluto] y 300 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 30%. Posteriormente la muestra fue agitada en un vortex y colocada en hielo durante 2 horas. Transcurrido el tiempo se centrifugó en una microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5424) a 2000 rpm por un tiempo de 15 minutos. Posteriormente se separó el sobrenadante y un mililitro de éste se adicionó a un tubo de ensayo limpio. Se añadieron, 0.075 mL de EDTA 0.1 M y 0.25 mL de una solución 1% de ácido tiobarbitúrico (TBA). La mezcla se agitó y se 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 532 y 600 nm en el espectrofotómetro UV/VIS (Perkin Elmer Lambda 25) (Ohkawa, 1979), el fundamento de este experimento se encuentra en el Apéndice 4.

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

$$A = \epsilon cl$$

En donde:

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

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

c es la concentración de las especies reactivas de TBA

l es el paso óptico.

7.2 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. La metodología del Minitab, Versión 2016, se utilizó para todos los análisis estadísticos. El Apéndice 5 muestra un ejemplo de los cálculos realizados por este procedimiento.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 ROEDORES NO EXPUESTOS A PLOMO EN FUNCION DE LA EDAD

Para iniciar, se realizó un estudio en función de la edad para conocer los cambios corporales, fisiológicos y bioquímicos de los roedores y, en base a ello, seleccionar el grupo de estudio adecuado para evaluar el efecto de la exposición aguda a plomo sobre la actividad y las constantes cinéticas en riñón cerebro e hígado en ratas Wistar macho.

A.- Peso corporal

Diversos estudios han demostrado que las ratas Wistar tienen un ciclo de vida aproximadamente 27 veces más rápido que los seres humanos y por esa razón resulta complicado diferenciar las etapas de desarrollo equivalentes entre esta especie y la primera. Sin embargo, el grupo de Vargas, en el 2020 estableció una correlación aproximada entre la edad y la etapa de vida. Para ello determinó el peso de los animales a diferentes periodos de tiempo, y los relacionó con etapa diferente de crecimiento y desarrollo. Para este autor una rata que se encuentra entre los días 1 y 7 de edad se puede colocar dentro de la etapa neonatal, presentando un peso corporal aproximado de 14 gramos; de 14 a 28 días se considera que los animales se encuentran en la fase de destete y que su peso corporal es en promedio 45 gramos; la etapa preadolescente se estima a una edad de 35 a 49 días y el peso en el cual se encuentran es de 115 gramos en promedio. Una rata considerada como adulto joven es aquella que tiene entre 56 y 70 días de edad y un peso promedio de 300 gramos. A partir de esta edad y hasta los 98 días los animales se consideran adultos y su peso puede ser mayor a 300 gramos.

Cossio en 2013 define el crecimiento físico como el aumento en el número y tamaño de las células que componen los diversos tejidos del organismo. Este se determina por factores biológicos intrínsecos sensibles a múltiples contingencias mesológicas (Mesología es la ciencia que estudia las relaciones e influencias recíprocas que unen los seres a los medios en los cuales están inmersos) que modulan la expresión del potencial genético. Esta definición se utiliza en general para todos los seres vivos y se utiliza como guía para evaluar el sano crecimiento de los organismos.

Dentro del trabajo de muchos laboratorios, tanto de educación como de investigación, las ratas Wistar representan una de las cepas más utilizadas para la investigación en el laboratorio, por lo que este mamífero sirve como un organismo modelo para el análisis de un número importante de características biomédicas y toxicológicas, así como para estudiar la nutrición y la investigación de las condiciones que

afectan a los seres humanos y que pueden ser simuladas en ratas. La investigación de laboratorio en este modelo animal exige el control estricto de algunas variables que permiten conseguir resultados reproducibles. Estas variables incluyen la edad, el sexo y el peso corporal. Los patrones de crecimiento pueden ser utilizados en situaciones relacionadas a la salud, permitiendo reflejar las condiciones del estado nutricional, enfermedad, toxicidad, etc., al identificar el crecimiento acelerado, normal o lento de los mismos (Cossio-Bolaños, et. al, 2013). Lo anterior, entonces se relaciona con una medida de la salud de los organismos.

En este trabajo se observó que las ratas Wistar macho en condiciones normales (control) aumentaron de peso en función del tiempo. En el lapso total de 76 días, el aumento fue, en promedio, de 326 gramos. En función de tiempo se observó que los animales aumentaron 21 gramos en 7 días; 60 en 14 días; 149 en 26 días; 250 en 46 y 326.73 en 76 días. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en todas las comparaciones. Los datos anteriores implican un aumento gradual de peso corporal en función del tiempo de la siguiente manera: de 14 a 21 día aumentaron 21.5 gramos; de 21 a 28 el aumento fue de 39.2 gramos; de 28 a 40 día se determinó un incremento de 88.42 gramos; de 40 a 60 día el peso subió 101 gramos y finalmente de 60 a 90 días el peso se vio incrementado 76.52 gramos. Estos datos concuerdan con las mediciones llevadas a cabo por el grupo de Cossio (2013), quien estableció una metodología para desarrollar curvas de referencia del crecimiento en ratas Wistar macho. Los datos obtenidos en este trabajo son semejantes a los encontrados por este grupo, ya que los pesos encontrados por ellos fueron los siguientes: a los 21 días el peso registrado fue de 62.71 gramos; a los 40 días 101.5 gramos; a los 60 días 265.5 gramos y a los 90 día de 381 gramos. Lo anterior indica que el crecimiento de las ratas que se utilizaron en este trabajo corresponde al de ratas en estado de salud óptimo. La figura 1 muestra los resultados obtenidos.

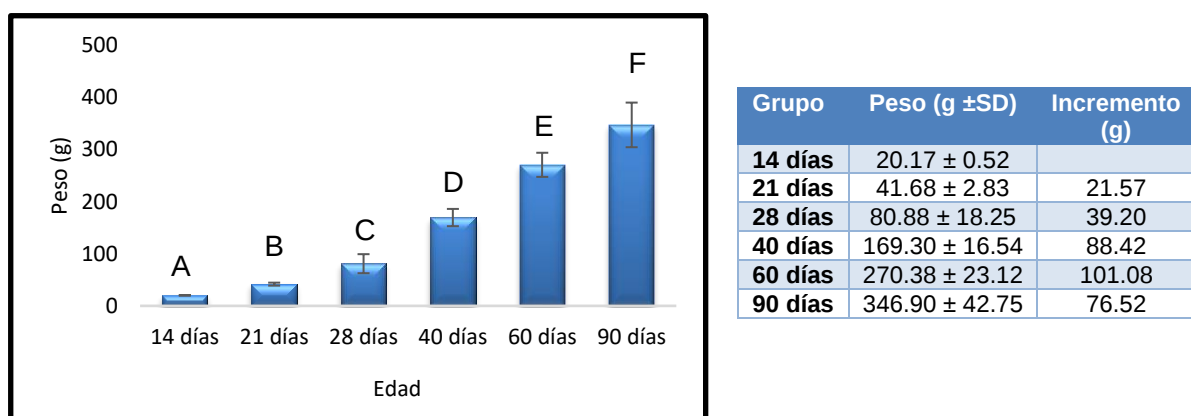


Figura 1. Pesos corporales en función del tiempo en ratas macho de la cepa Wistar en condiciones normales (n=6).

Por otro lado, Schoeffner en 1999 realizó un estudio relacionando el crecimiento de ratas de la cepa Sprague-Dawley en función del tiempo y encontró que a los 28 días de vida mostraron un peso de 77.58 ± 18.49 ; a los 42 pesaron 176.75 ± 5.30 ; a los 56 alcanzan 267.45 ± 8.57 y por último a los 84 días obtuvieron 381.73 ± 13.23 gramos. Estos datos se asemejan a los resultados obtenidos en los grupos experimentales de este estudio, aun cuando se trata de dos cepas diferentes. Estos datos ayudan a afirmar que existe una relación de aumento de peso corporal semejante en ratas sanas aun cuando las especies no sean las mismas; comprobando la relación directa que existente entre el crecimiento y el aumento de talla y peso corporal en las ratas.

B.- Peso de los órganos

El peso del cerebro aumento en función de la edad. Del inicio al final del periodo experimental (76 días) el órgano incrementó 0.99 gramos en promedio. Al analizar los datos, se vio que el aumento fue significativamente diferente entre los grupos de 14, 21 y 28 días ($p < 0.05$). Sin embargo, a partir de los 28 días no se encontraron diferencias significativas entre comparar los grupos ($p > 0.05$). En el hígado el peso también aumentó con el transcurso del tiempo. Al final del periodo experimental se observó un aumento de 11.43 gramos en promedio. Se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en el aumento de peso del hígado en todos los grupos experimentales. Partiendo desde el inicio, a los 7 días se detectó un aumento de 0.92 gramos; 3.68 en 14 días; 6.39 a los 28 días; 8.59 en 46 días y, finalmente 11.43 en 76 días. El aumento de peso al final en el riñón fue de 2.12 gramos. Al realizar el análisis estadístico se observó un aumento de peso con respecto a la edad estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Comenzando con grupo de 14 días, se registró un peso de 0.33 ± 0.03 gramos. Posteriormente, a los 7 días, se registró un aumento de 0.38 gramos; a los 14 días un aumento de 0.81 gramos; 1.7 en 26 días; de la misma manera se observó un incremento de 1.78 gramos en 46 días y, finalmente, la diferencia de peso ganado fue de 2.12 gramos en 76 días. La figura 2 muestra los resultados.

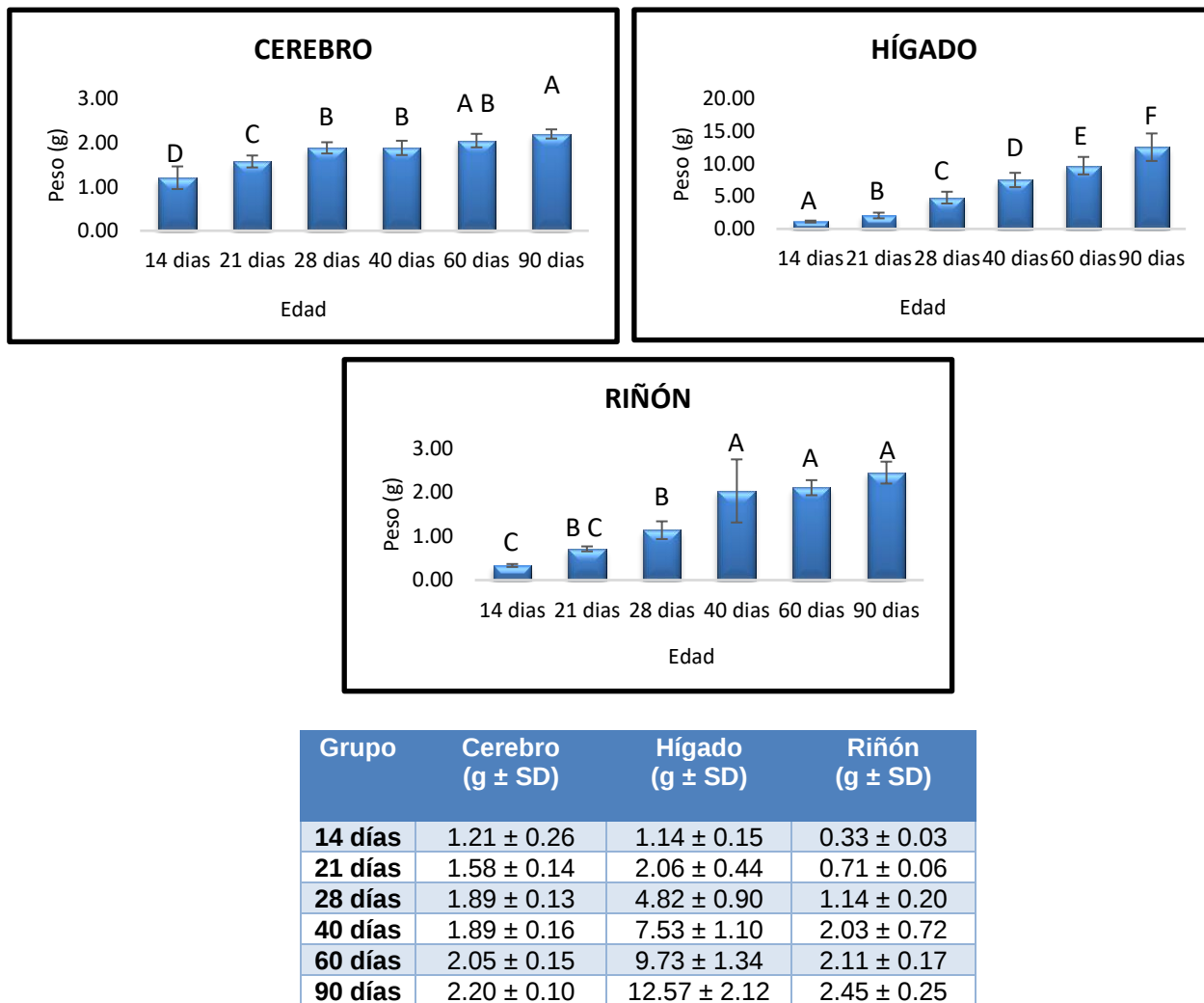
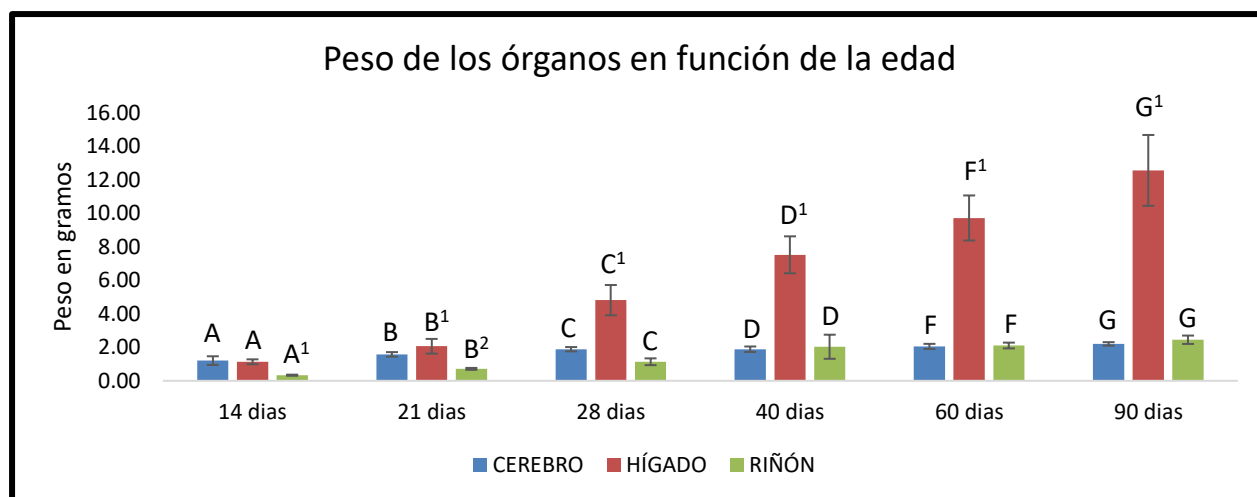


Figura 2. Peso de cerebro, hígado y riñón en función del tiempo en ratas Wistar macho en condiciones (n=6).

La gráfica 1 muestra el peso de los tres órganos de estudio en función de la edad. En ella se puede observar que el órgano que ganó más peso en función del tiempo fue el hígado, aumentando alrededor de 11 gramos en 76 días. El cerebro y el riñón son los órganos que menos peso ganaron a lo largo del periodo experimental. Sin embargo, el primero aumentó 1.1 gramos y el segundo 2.12 gramos en el periodo experimental, en relación con sus respectivos grupos iniciales.



Grafica 1. Pesos de los órganos cerebro, hígado y riñón de ratas control en función de la edad. El eje x representa la edad de las ratas medida en días.

El grupo de Schoeffner (1999) analizó el peso de los órganos en ratas Sprague-Dawley macho en función de la edad. Los datos obtenidos en este estudio se muestran en la tabla 1. Si se comparan los registros obtenidos con los de este autor, se puede ver que la tendencia al aumento de peso en función de la edad. En ambas cepas, hubo un aumento progresivo del peso de sus órganos, siendo el hígado el que más peso ganó (2.35 y 2.9 g respectivamente), seguido de cerebro y de riñón. La relación peso de los órganos peso corporal es un indicativo de un buen desarrollo en condiciones de salud. El aumento del peso de los órganos puede ser signo de enfermedades o anormalidades patológicas. La literatura muestra diferentes estudios que han llevado a la elaboración de tablas con los pesos estándar de los diferentes órganos en diversos grupos poblacionales. Diversos estudios han determinado que la edad es un factor que influye en el del peso de algunos órganos, así como el peso corporal (Sheikhazad *et al.*, 2010).

Tabla 1. Pesos de órganos en función de la edad (días) de ratas de la cepa Sprague-Dawley machos (Tomado y modificado de Schoeffner, 1999)

Tiempo (días)	Cerebro (g ± SD)	Hígado (g ± SD)	Riñón (g ± SD)
28	1.55 ± 0.09	3.90 ± 1.11	1.00 ± 0.21
42	1.77 ± 0.07	8.52 ± 0.53	1.70 ± 1.10
56	2.01 ± 0.06	11.01 ± 0.99	2.23 ± 0.27
70	1.97 ± 0.08	12.71 ± 0.75	2.85 ± 0.14
84	2.04 ± 0.06	13.24 ± 0.94	3.03 ± 0.30
94	2.05 ± 0.05	13.70 ± 3.57	2.92 ± 0.18
280	1.99 ± 0.24	17.49 ± 2.26	3.56 ± 0.31

C.- Examen general de orina (EGO)

El examen general de orina (EGO) es un examen rápido, de bajo costo y fácil acceso en los servicios de salud. Proporciona información importante para el diagnóstico de diversas enfermedades como infecciones del tracto urinario, diabetes y enfermedades renales, así como hepáticas y desordenes en el metabolismo. Es considerado como un examen de rutina ya que brinda información general del estado de salud. La orina se ha descrito como una biopsia líquida, obtenida de forma indolora, y para muchos la mejor herramienta de diagnóstico no invasiva de las que dispone el médico. Este examen ya era realizado en Babilonia, aproximadamente 6000 años atrás cuando Hipócrates desarrolló un método de mucha utilidad denominado uroscopia, que consistía en la observación macroscópica de la muestra; hasta la invención, en 1964, de las tiras de diagnóstico. En el EGO se evalúa el aspecto fisicoquímico y el microscópico. El examen fisicoquímico evalúa las propiedades organolépticas y mediante tiras reactivas examinamos: la densidad, pH, glucosa, proteínas, bilirrubina, urobilinógeno, hemoglobina, cuerpos cetónicos y nitritos. El examen microscópico del sedimento urinario evalúa la presencia o ausencia de células, bacterias y cristales (Free, 1972; Tietz, 1976; Burtis, 1994; Arbeláez, 2007; Arispe *et al.*, 2019).

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en el grupo control en función del tiempo. Estos demostraron la presencia de leucocitos en todos los grupos, los valores variaron de 10 a 75 leucocitos/ μ L indicando posible presencia de infección urinaria en algunos de los miembros de los grupos. La orina normalmente tiene algunos leucocitos (valores de referencia: 0 a 4 por campo de alto poder), sin embargo, la presencia elevada de ellos (leucocituria) sugiere una infección urinaria. Las leucociturias son indicativos de alguna enfermedad inflamatoria de las vías urinarias como uretritis,

cistitis y pielonefritis. La prueba de esterasa leucocitaria se considera una medida indirecta para indicar la presencia en la orina de glóbulos blancos. (Free, 1972; Campuzano, 2007; Lozano, 2016).

En relación con los nitritos, el 66% del primer grupo (14 días) dio positivo. En los siguientes grupos (21, 28 y 40 días) el resultado fue negativo. A los 60 días el 50 % de la población presentó nitritos en orina mientras que a los 90 días la presencia del analito dio positiva en el 33.3 % de la población, lo cual indicó que, en algunos miembros, posiblemente, existió una infección por bacterias. La literatura menciona que en condiciones normales el valor de los nitritos debe ser cero. Esta determinación constituye un método indirecto para determinar la presencia de bacterias en la orina. La prueba es muy específica pero poco sensible, por lo que un resultado positivo es útil, pero un resultado negativo no descarta la infección en el tracto urinario (Campuzano, 2007; Lozano, 2016).

En el caso del urobilinógeno, se observaron valores positivos en todos los grupos (10 mg/dL para cada uno). En los grupos de 14, 60 y 90 días el porcentaje de casos positivos no fue 100 %, como se observó en los casos restantes, lo que indicó que varios miembros de la población podrían indicar daño temprano del parénquima hepático, generalmente antes de que se presenten manifestaciones clínicas. Este analito está relacionado directamente a la presencia de bilirrubina indirecta y se encuentra normalmente en concentraciones bajas, alrededor de 1 mg/dL e incluso su lectura puede ser menor o negativa. Este compuesto cuando aparece en la orina de manera acentuada puede indicar de manera temprana un daño del parénquima hepático, así como enfermedades hepatocelulares y anemias hemolíticas (Campuzano, 2007; Lozano, 2016).

La bilirrubina en orina puede ser conjugada o directa. Al ser hidrosoluble, este compuesto puede pasar el glomérulo renal, lo cual haría sospechar la presencia de obstrucción intra o extra-hepatobiliar como sucede en la ictericia obstructiva; en la enfermedad hepatocelular; en el síndrome de Rotor; en la enfermedad Dubin-Johnson y en el cáncer del páncreas o de los conductos biliares (Tietz, 1976; Campuzano, 2007; Lozano, 2016). Los valores obtenidos en los grupos de estudio variaron. En el grupo de 14 días fueron de negativos hasta 4 mg/dL; en el grupo de 21 días de 1 mg/dL a más del límite; el grupo 28 presentó valores de negativo a más del límite; el grupo 40 días de 1 mg/dL a más del límite; mientras que en los grupos 60 y 90 días los valores fueron de cero a 1 mg/dL.

En condiciones normales no se deben reportar proteínas en la orina; su valor debe ser menor a 4 mg/dL. La tira reactiva tiene una sensibilidad y especificidad de 99% para detectar albuminuria, pero es insuficiente para detectar globulinas, glucoproteínas, ribonucleasas, lisozomas y mucoproteínas como la de Tamm Horsfall. Las proteinurias más pronunciadas se detectan en pacientes con síndrome nefrótico, es decir daño en el glomérulo. Por otro lado, la proteinuria tubular puede estar relacionada

con lesiones de las células tubulares y / o trastornos de la absorción tubular de las proteínas del filtrado glomerular (Campuzano, 2007; Lozano, 2016). En todos los grupos se encontró la presencia de proteínas en la orina mayores a los reportados como normales, pero bajos en relación con los niveles que pueden detectar las tiras reactivas. Esto indicó la presencia de una ligera proteinuria en los animales de experimentación.

En la mayoría de los grupos se encontraron eritrocitos en orina con valores desde traza hasta 50 eritrocitos / μ L excepto en el grupo de 60 días. Estos valores constituyen todo el espectro de valores que se pueden detectar y su interpretación incluye varios aspectos, como se explica a continuación. La hematuria (presencia de eritrocitos en la orina) se subdivide en glomerular, no glomerular y de etiología urológica. La hematuria glomerular típicamente está asociada con proteinuria significativa, cilindros eritrocitarios y eritrocitos dismórficos. Sin embargo, hasta el 20% de los pacientes con glomerulonefritis diagnosticada por biopsia se presentan sólo con hematuria. La no glomerular es secundaria a trastornos tubulointersticiales, renovasculares o metabólicos. También se encuentra asociada con proteinuria significativa; sin embargo, no está asociada con eritrocitos dismórficos o cilindros eritrocitarios.

Las causas urológicas de hematuria incluyen los tumores, los cálculos y las infecciones. Esta se diferencia de otras hematurias por la ausencia de proteinuria significativa, eritrocitos dismórficos y cilindros eritrocitarios (Yoder, 1965; Campuzano, 2007; Lozano, 2016).

Cuando se evaluó el pH, se encontró que el grupo de 14 días fue significativamente diferente con respecto a todos los demás grupos. Los grupos de 21, 28, 40 y 90 días no tuvieron diferencias significativas. Los de 40 y 60 días resultaron diferentes significativamente ya que el pH urinario varió de 4.5 a 8. Normalmente la orina es ligeramente ácida, entre 5 a 6.5; cuando la orina es alcalina ($\text{pH} > 7$) puede deberse a una posible infección del tracto urinario, mientras que la orina ácida ($\text{pH} < 6$) puede deberse a insuficiencia renal, acidosis tubular renal o acidosis respiratoria por retención de CO_2 en el caso de presentar enfisemas eritrocitarios (Yoder, 1965; Campuzano, 2007; Lozano, 2016). De acuerdo con lo anterior, se puede afirmar que el pH de los animales de los grupos estudiados se encuentra en el intervalo normal. Los resultados obtenidos para pH fueron analizados por la metodología ANOVA utilizando el método de Tukey ($p < 0.5$).

La gravedad específica es una medición de la concentración y de dilución del riñón; refleja el peso de los solutos en la orina medidos a través de la tira reactiva. Cualquier alteración que se presente en la densidad urinaria está asociada a daños en la función del túbulo renal (Campuzano, 2007; Lozano, 2016). A los resultados obtenidos se les sometió a un análisis estadístico por ANOVA utilizando el método de Tukey ($p < 0.5$). Gracias a ello, se encontró que el grupo de 14 días fue diferente significativamente en

comparación con los grupos restantes. El grupo de 28 días fue diferente a los de 60 y 90. El grupo de 40 fue diferente de los grupos de 60 y 90 días. Los demás resultaron iguales.

Los resultados indicaron que los grupos de estudio no presentaron problemas en el metabolismo de los ácidos grasos y de los carbohidratos, ya que los valores encontrados al determinar las cetonas fueron negativos. El valor de los cuerpos cetónicos en orina debe ser cero; la presencia de cetonuria está relacionada con alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos y de los carbohidratos. Desde el punto clínico, la cetonuria se encuentra muy asociada a la diabetes mellitus y descompensada, pero también puede ocurrir durante el embarazo (McGarry, 1978; Williamson, 1971; Fraser, 1965 Campuzano, 2001; Lozano, 2016).

Normalmente la glucosa es filtrada por el glomérulo, pero ésta es reabsorbida casi completamente en el túbulo proximal. La glucosuria ocurre cuando la carga de glucosa filtrada excede la capacidad de reabsorción del túbulo o sufre daño, es decir 180 mg/dL (Yoder, 1965; Shchersten, 1967, Campuzano, 2007; Lozano, 2016). Los resultados indicaron la ausencia de glucosa en la orina en el 100 % de la población, lo que es indicativo de un buen estado renal.

Finalmente se observó que, en general, el volumen urinario aumentó en función de la edad, variando desde 1.76 hasta 52.67 mL recolectados en un periodo de 12 horas.

Estos resultados indican que, el estado de la población del grupo control se encontraba en estado normal ya que muchos de los analitos cuantificados se encontraron a niveles bajos lo cual se debe al metabolismo de los animales y su estado de salud general, la cual está relacionada con la edad, la dieta y el ambiente en el cual se desarrollan.

Tabla 2. Examen general de orina de los grupos de estudio (n=6).

Grupo	Leucocitos (Leu/ μ L)	Nitritos	Urobilinógeno (mg/dL)	Bilirrubina (mg/dL)	Proteína (mg/dL)
14 días	75 (83.4%) Negativo (16.6%)	Positivo (66.7%) Negativo (33.3%)	10 (66.6%) Negativo (33.6%)	1.0 (50%) 4 (33.33%) Negativo (16.7%)	30 (83.3%) Negativo (33.6%)
21 días	10 (33.3%) Negativo (66.6%)	Negativo (100%)	10 (100%)	1.0 (83.4%) Más de 12 (16.6%)	100 (16.6%) 30 (33.4%) Negativo (50%)
28 días	10 (16.6%) Negativo (83.4%)	Negativo (100%)	10 (100%)	Negativo (66.6%) 1.0 (16.6%) Más de 12 (16.6%)	100 (16.6%) 30 (33.3%) Traza (16.6%)
40 días	10 (100%)	Negativo (100%)	10 (100%)	1.0 (16.6%) Más de 12 (83.3%)	100 (16.6%) 30 (66.6%) Traza (16.6%)
60 días	Negativo (50%) 10 (50%)	Positivo (50%) Negativo (50%)	10 (50%) Negativo (50%)	1.0 (50%) Negativo (50%)	30 (50%) Traza (16.6%) Negativo (33.3%)
90 días	75 (66.6%) 10 (33.3%)	Negativo (66.6%) Positivo (33.3%)	10 (16.6%) Negativo (83.3%)	1.0 (66.6%) Negativo (33.3%)	30 (100%)

Tabla 2. Examen general de orina de los grupos de estudio (n=6) continuación.

Grupo	Sangre (Ery/ μ L)	pH	Gravedad Específica	Cetona (mmol/L)	Glucosa	Volumen (mL)
14 días	50 (16.6%) 25 (16.6%) 5 (16.6%) Negativo (50%)	6.33 $\pm$ 0.52 C	1.014 $\pm$ 0.004 A	Negativo	Negativo	1.76 $\pm$ 1.26 (0.50 a 4)
21 días	Traza (83.3%) Negativo (16.6%)	7.83 $\pm$ 0.26 A, B	1.003 $\pm$ 0.004 B, C	Negativo	Negativo	6.67 $\pm$ 4.13 (2 a 14)
28 días	5 (16.6%) Traza (50%) Negativo (33.3%)	8.25 $\pm$ 0.27 A	1.000 $\pm$ 0.000 C	Negativo	Negativo	17.67 $\pm$ 8.04 (6 a 20)
40 días	Traza (33.3%) Negativo (66.6%)	8.25 $\pm$ 0.27 A	1.001 $\pm$ 0.002 C	Negativo	Negativo	15.33 $\pm$ 5.47 (6 a 20)
60 días	Negativo (100%)	7.42 $\pm$ 0.49 B	1.007 $\pm$ 0.004 B	Negativo	Negativo	32.00 $\pm$ 9.63 (18 a 44)
90 días	25 (16.6%) 5 (33.3%) Negativo (50%)	7.67 $\pm$ 0.52 A, B	1.008 $\pm$ 0.003 B	Negativo	Negativo	52.67 $\pm$ 18.79 (24 a 70)

D.- Especies reactivas de oxígeno (EROs)

En la literatura se han reportado varias teorías sobre el envejecimiento, entre ellas las no programadas genéticamente, en particular la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo. Esta indica que dentro del metabolismo aeróbico se producen incidentalmente y de forma incontrolable especies reactivas de oxígeno, las cuales ocasionan daños a varios tipos de macromoléculas de forma irreversible. Este daño, que se acumula con el tiempo, resulta en una pérdida gradual de los mecanismos hemostáticos, interferencia de patrones de expresión génica y pérdida de la capacidad funcional de la célula (Ramírez *et al*, 2013).

En este trabajo, se realizó la cuantificación de las especies reactivas de oxígeno (EROs) en cerebro, hígado y riñón para cada grupo experimental. Los resultados demostraron que los tres órganos

presentaron un comportamiento similar. A continuación, se detallan los resultados obtenidos para órgano.

D.1 Cerebro

Se observó que existió diferencia significativa ($p < 0.05$) en varios de los grupos. De los 14 a los 60 días se observaron valores que fluctuaron entre 17 hasta 57 pmol TBAR/mg de proteína. La figura 3 muestra como la presencia de las especies reactivas de oxígeno fluctuó en función del tiempo, siendo mayor a los 21 días. A los 90 días, correspondientes al término del periodo experimental, se cuantificó un aumento de 225.9 unidades en relación con el grupo inicial.

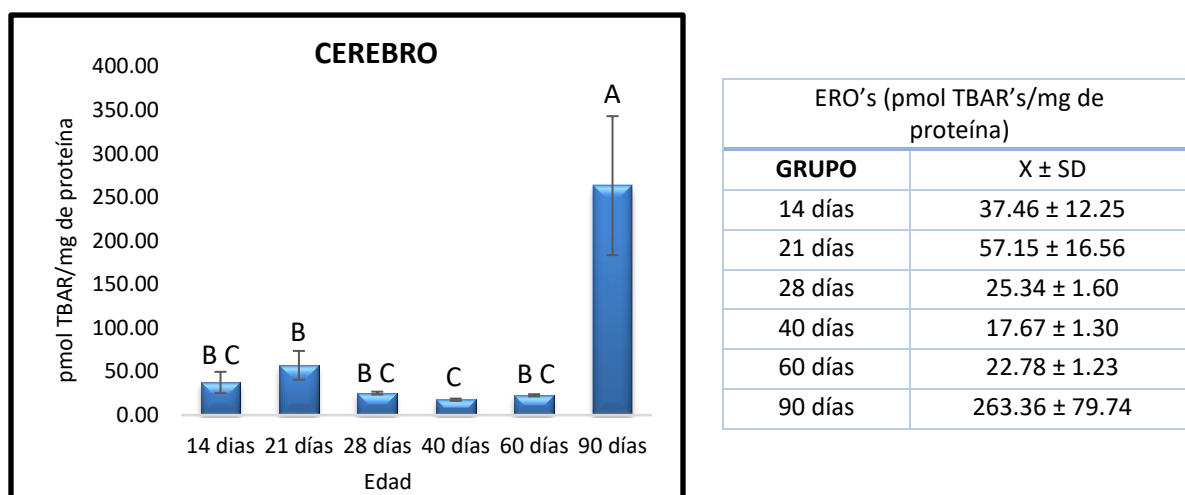


Figura 3. Especies reactivas de oxígeno en cerebro de ratas control en función del tiempo (n=6).

En el año 2000 Driver y colaboradores estudiaron los cambios en la producción de las especies reactivas de oxígeno y su relación con la edad en cerebro de ratas Sprague Dawley. Realizaron diferentes cortes del cerebro y cuantificaron EROs, encontrando que los valores aumentaban en función de la edad en diferentes partes del cerebro (corteza frontal, núcleo estriado, hipocampo y cerebelo). El periodo de tiempo fue de 7 a 90 días observándose un aumento en todas las zonas estudiadas. Se observó que, al determinar la actividad por una metodología de fluorescencia, en la corteza frontal se registró un aumento de 2.3 pmol DCF/mg de proteína, para el núcleo estriado de 3.4 pmol DCF/mg de proteína, y para el hipocampo y el cerebelo de 4.1 pmol DCF/mg de proteína. Navarro y Boveris en 2004, estudiaron como el envejecimiento puede desarrollar estrés oxidativo y disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes en el cerebro. Los resultados obtenidos para poder afirmar lo anterior

consistieron en la medición de la generación de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias de cerebro de ratas con edades de 28, 60 y 92 semanas. Obtuvieron los valores de 11.5 ± 1.3 ; 16.9 ± 1.4 y 18.5 ± 1.4 pmol TBAR's/mg de proteína respectivamente.

D.2 Hígado. Los resultados obtenidos en el hígado siguieron el mismo comportamiento que el observado en el cerebro. De los 14 a los 60 días los valores fluctuaron entre 22.80 y 51.58 pmol TBARS /mg de proteína. A los 90 días el incremento observado correspondió a 83.65 unidades en relación con el primer grupo. Entre los grupos de 14 y 40 días se observó una disminución de 0.87 unidades pero sin significancia estadística. Realizando las comparaciones entre los días 21, 28 y 90 se observó que la diferencia si fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Para el grupo de 90 días, al analizar la desviación estándar se pudo ver que existían dos subgrupos de organismos con valores muy diferentes de EROS medidos, la mitad de la población con valores cercanos a los 90 y el otro 50 % de la población con valores cercanos a los 180. Lo anterior denota un ejemplo de variabilidad de estos organismos ante la generación endógena de especies reactivas de oxígeno.

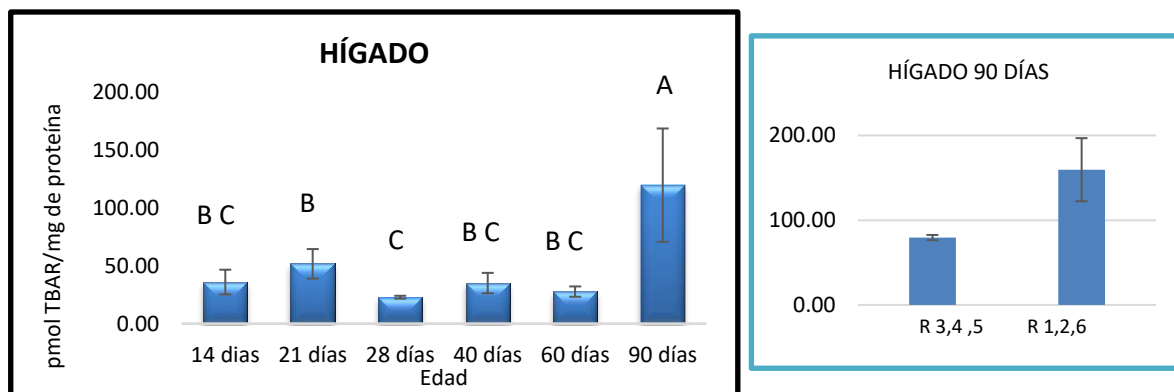


Figura 4. Especies reactivas de oxígeno en hígado de ratas control en función del tiempo. El eje x representa la edad de las ratas medida en días (n=6).

Un equipo de investigación argentino-español publicó que el envejecimiento puede desarrollar estrés oxidativo y disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes en el hígado de ratas Wistar macho adultos jóvenes. Sus resultados indicaron que el aumento de las especies reactivas de oxígeno puede ser un indicador de estrés oxidativo en relación con el tiempo. Ellos obtuvieron niveles de 3.3 ± 0.3 ; 4.1 ± 0.4 ; 4.8 ± 0.4 pmol/mg de proteína para animales de 28, 60 y 92 semanas de edad, respectivamente (Navarro & Boveris, 2004). Kregel y Zhang (2007) escribieron una revisión sobre los mecanismos básicos, los efectos funcionales y las consideraciones patológicas del estrés oxidativo en el envejecimiento. La evidencia más común fue la correlación entre envejecimiento y aumento en el daño oxidativo en los tejidos de todo el cuerpo en mamíferos. También, en otros estudios reportaron que el daño oxidativo al ADN nuclear y mitocondrial aumenta significativamente en todos los tejidos principales de los organismos envejecidos como por ejemplo roedores y humanos. Finalmente, Yang y colaboradores, en 2015, reportaron que los cambios en el sistema antioxidante dependen de la edad en hígado de ratas Wistar. Observaron que altos niveles de estrés oxidativo en hígado de ratas “viejas” (23 meses) estaban relacionados con el incremento de la actividad catalítica de la enzima Superóxido dismutasa (SOD). De la misma manera encontraron que la expresión de la catalasa citosólica decrecía ligeramente.

D.3 Riñón

El comportamiento de los grupos fue semejante al observado en los órganos cerebro e hígado en función del tiempo. Sin embargo, en este caso se cuantificó una disminución de las especies reactivas del día 14 al día 40, aumentando 7 unidades en el grupo de 60 días en relación con el de 40. A los 90 días el peso del riñón incrementó, en promedio, 223.46 pmol TBAR's/mg de proteína. En este caso, la diferencia estadística no diferenció subpoblaciones de individuos. Los resultados se muestran en la gráfica de la figura 5.

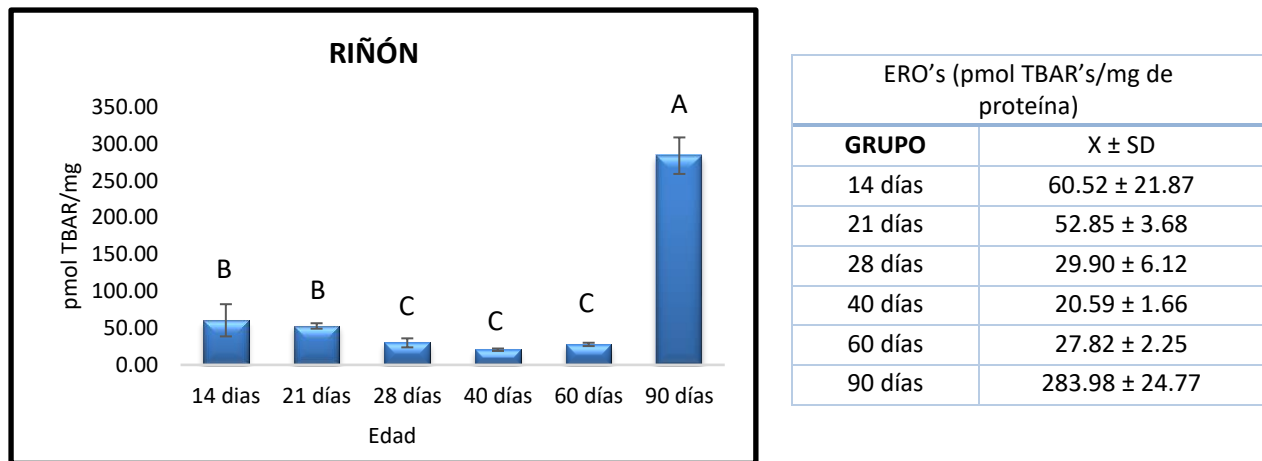
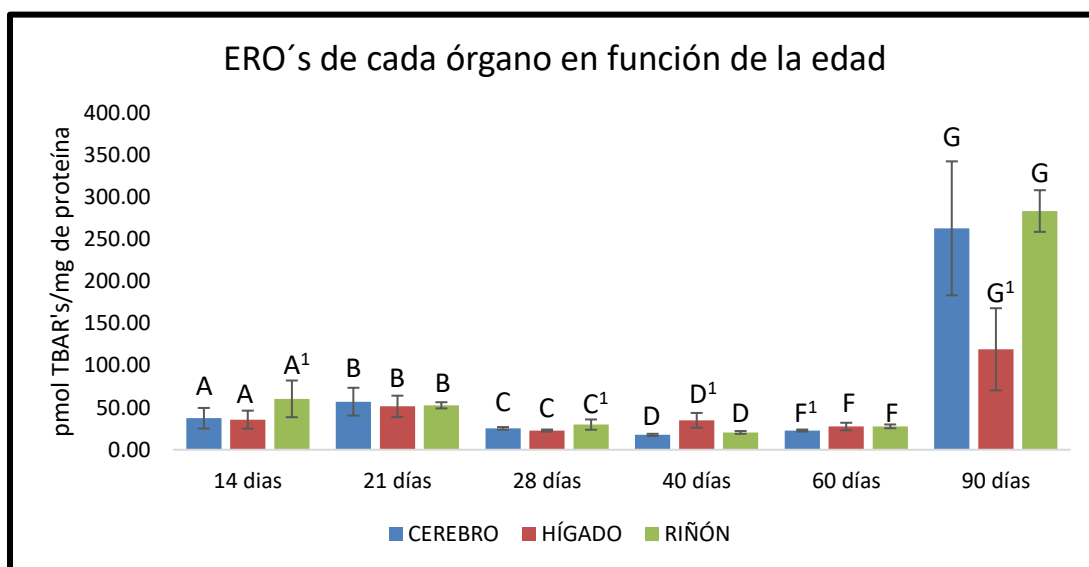


Figura 5. Especies reactivas de oxígeno en riñón de ratas control en función del tiempo. El eje x representa la edad de las ratas medida en días (n=6).

En relación con el riñón, varios estudios han propuesto que el incremento del estrés oxidativo está asociado, de igual forma que en hígado, al envejecimiento, además de que la mayoría de los cambios en el riñón son dependientes de la edad. A este respecto, Alabarse y colaboradores en 2011, afirmaron que el estrés oxidativo está relacionado con el envejecimiento y que éste se encuentra acompañado por un incremento de enfermedad renal incidente y una mortalidad asociada. Entre sus resultados observaron que el envejecimiento y/o la actividad reproductiva aumentan el daño oxidativo, en ratas Wistar macho. También en animales con 24 meses de edad se mostró que los niveles de óxido nítrico y nítrico (NO_2 y NO_3) son muy altos y que la causa de ello podría ser la función del riñón a esta edad. Se encontró que la especie reactiva de oxígeno más común en el riñón es ion superóxido (O_2^-) y que, además, se incrementan los niveles de malondialdehído (MDA) en este órgano. Estas alteraciones se pueden asociar con la aparición de fibrosis excesiva, la disminución de la capacidad regenerativa y el aumento de la apoptosis. Las células del túbulo proximal contienen un gran número de mitocondrias y éstas son dependientes de la fosforilación oxidativa y por ende son más susceptibles a la apoptosis o mutaciones inducidas por agentes oxidantes. Los riñones son muy susceptibles a dañarse por especies reactivas de oxígeno. Esto puede ser debido al gran número de cadenas largas de ácidos grasos insaturados en la composición lipídica de los riñones. Hay evidencias experimentales que sugieren que las especies reactivas de oxígeno están involucradas en isquemia tóxica e inmunológica mediada por daño renal (Harun, 2021). Con la finalidad de contrastar el comportamiento de las especies reactivas de oxígeno en los órganos en función de la edad, se procedió a comparar la concentración de estas especies en los tres órganos en función del tiempo. La gráfica 2 muestra los resultados.



Gráfica 2. Especies reactivas de oxígeno en cerebro, hígado y riñón de ratas control en función de la edad. El eje x representa la edad de las ratas medida en días (n=6).

Los resultados mostraron que a lo largo de los periodos de destete, preadolescencia y juventud de las ratas (días 14 a 77), la concentración de especies reactivas de oxígeno se mantuvo en un intervalo de 17.67 hasta 60.52 picomoles de TBAR's en los tres órganos de estudio. Al llegar a la etapa correspondiente a la adultez (90 días) se detectó un aumento de EROS en los tres órganos. Las especies reactivas de oxígeno en el cerebro y riñón aumentaron 143.86 pmol y 164.48 pmol más que en el hígado (119.50 pmol); en este se observó que a los sesenta días se la concentración fue de 27.63 pmol incrementando 432.5% en esta etapa.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que en los tres órganos el nivel de especies reactivas de oxígeno aumenta en función de la edad, siendo las ratas de 90 días en las que se nota más el aumento. En relación con la literatura consultada se pudo verificar que los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los de los autores que han usado ratas de las cepas Wistar y Sprague Dawley, ya sea en experimentos con homogenados de órganos completos o cortes de los mismos, empleando la metodología tradicional de determinación de ERO's o la técnica de fluorescencia. Bioquímicamente, los datos obtenidos en este y los trabajos consultados sugieren un posible cambio metabólico el cual generó el aumento de las especies debido, posiblemente, a la disminución de la actividad del sistema antioxidante total. Este sistema comprende tanto la maquinaria enzimática como a las macromoléculas con capacidad de quelación de especies reactivas de oxígeno. Se sabe que este puede ser alterado en función de la edad (Quintanar, 2009). Al analizar los resultados, se puede decir que este efecto es mayor

en cerebro y riñón, ya que en el hígado el aumento de las especies reactivas de oxígeno es menor, lo que se puede explicar argumentando que en este órgano la disminución de los sistemas antioxidantes fue menor.

E.- Actividad de la enzima Glutación S-transferasa (GST)

La Glutación S-Transferasa (GST) constituye una familia de enzimas presentes en diversos organismos, distribuidos a lo largo del árbol filogenético. Éstas presentan una variedad de actividades metabólicas, entre las cuales destacan su participación como parte del mecanismo de desintoxicación de la fase II del metabolismo de los xenobióticos y como un posible agente antioxidante. Además, también han sido relacionadas en mamíferos y en otras especies como bioindicadores de daño en órganos como hígado, riñón y cerebro y del estrés oxidativo, respectivamente. Recientemente, se le ha conferido otra función metabólica importante dentro del metabolismo oxidativo como una enzima de respuesta ante el estrés. Por ejemplo, en mamíferos y plantas se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), molécula precursora de los radicales libres, es capaz de inducir la síntesis de la enzima. Dicha inducción parece representar una respuesta adaptativa de parte de los organismos, teniendo en cuenta que estas enzimas participan en la desintoxicación de los metabolitos tóxicos que contienen grupos carbonilos, peróxidos y epóxidos, producidos dentro de la célula a causa del estrés oxidativo (Pulido, 2022, Sherrat and Hayes, 2002; Thiendedsakul *et al.*, 2022; Raijmakers *et al.*, 2001).

De acuerdo con los resultados referentes a los órganos, no fue posible determinar un comportamiento similar de la enzima. Sin embargo, la actividad de la enzima a cualquier tiempo fue mayor en hígado que en cerebro y riñón. Además, al finalizar el tiempo de experimentación, la actividad de la GST fue mayor en cerebro (3.1 unidades), hígado (16.07 unidades) y riñón (2.87 unidades) en comparación con el grupo control. Cerebro y riñón presentaron actividad enzimática muy parecida a lo largo del periodo de estudio. La figura 6 muestra los resultados obtenidos.

E.1 Cerebro

De los 14 a los 90 días (76 días en total) se observó un aumento significativo de 3.1 unidades de actividad. Los grupos de 14 a 60 días presentaron actividades menores en relación con el grupo de 90; sin embargo, aun cuando las diferencias resultaron significativas, estas no fueron tan altas. De nueva cuenta el grupo de ratas adultas presentó la mayor actividad, de forma similar a la determinación de especies reactivas de oxígeno.

En el año 2000 Venu y sus colaboradores evaluaron la actividad de GST en homogenados de cerebro de ratas de la cepa Sprague-Dawley con edades de 1 a 24 meses. Los resultados indicaron que la actividad varió en función de la edad. Para ratas de 1 a 12 meses, la actividad aumentó, de 12 a 18 meses disminuyó y de 18 a 24 meses la actividad se mantuvo a bajos niveles. En dicho trabajo no se reportaron valores numéricos. Tres años más tarde, Martínez, en 2003, estudió la respuesta de las isoenzimas de GST frente al envejecimiento. El estudio se realizó en cortex cerebral y en cerebelo de ratas Wistar. Los resultados demostraron que en el primer tejido la actividad aumento de los 2 a los 4 meses de edad (0.155 ± 0.016 a 0.271 ± 0.018 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína/min respectivamente) y que a los 30 meses disminuyó (0.247 ± 0.030 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína/min) sin tener información de los meses intermedios, mientras que en cerebelo el aumento fue proporcional a la edad de los animales (2 meses: 0.143 ± 0.023 , 4 meses: 0.186 ± 0.015 y 30 meses: 0.190 ± 0.012 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína/min).

E.2 Hígado

En este órgano, la actividad de la enzima varió de forma no proporcional al tiempo ya que, como se puede ver en la figura 6, la actividad sube y baja en función del tiempo. Aun así, se pudo determinar que existió una tendencia a subir la actividad a través del tiempo de crecimiento y que al comparar el inicio y el final del periodo experimental hubo un aumento significativo de 16.07 unidades. La enzima presentó una mayor actividad en los tiempos 28 (7.04 unidades), 60 (10.28 unidades) y 90 (16.07 unidades) días, mientras que el los restantes, la actividad fue menor. Estos valores fueron significativamente diferentes entre ellos ($p < 0.05$).

En relación con la determinación de la actividad de GST en hígado Stohs, en 1982 publicó un estudio realizado en hígado, pulmón y mucosa intestinal de ratones hembra envejecidas. Las mediciones se realizaron los meses 1, 3, 6, 9, 12, 15, y 18. De 1 a 9 meses hubo un aumento en la actividad (1071.9 ± 104.2 a 3919.3 ± 109.7 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína respectivamente). A partir de los 12 meses hasta los 18 la actividad disminuyó (1500.9 ± 97.6 a 969.8 ± 88.5 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína). La explicación proporcionada ante estos cambios se atribuyó a una posible baja del contenido de glutatión intracelular. Se sabe que la actividad de las enzimas puede disminuir debido a dos cosas: la inhibición de la actividad y la disminución de la expresión genética como consecuencia de la edad.

En relación con ello, Tee y colaboradores en 1992, publicaron una investigación sobre la expresión de la Glutatión S- transferasa durante el desarrollo del hígado en ratas. La expresión de la enzima aumentó en función de la edad, encontrándose que cuando el órgano se encuentra en una etapa temprana de vida (feto) la Glutatión S-transferasa clase Pi es predominante. De igual manera descubrieron que

cuando comienza el crecimiento, después de nacer, las clases Alfa y Mu son esenciales para el desarrollo del órgano, mostrando, además, un aumento en su actividad.

E.3 Riñón

Al término de los 76 días del experimento, se registró un aumento de 2.87 unidades de actividad enzimática. Todos los valores fueron significativamente significativos ($p < 0.05$). La actividad de la enzima en este órgano fue semejante a la observada en el hígado; es decir, no se presentó un comportamiento de tipo lineal observándose altas y bajas de la actividad. La actividad a los 28 y 90 días fue muy semejante representando la actividad más alta en todo el tiempo experimental. Estos resultados pueden reflejar cambios metabólicos a lo largo del tiempo podrían modificar la actividad de la enzima o la existencia de diferentes isoenzimas a lo largo de periodo experimental, siendo algunas más o menos activas.

Suvakov en 2012, relacionó el daño oxidativo en pacientes con hemodiálisis y la actividad de GST, haciendo énfasis en los diferentes genotipos de la enzima y los biomarcadores de daño oxidativo. Uno de ello, el malondialdehído (MDA) muestra un incremento cuando las enzimas GSTM1, GSTA1, GSTP1 Y GSTT1 presentan baja o nula actividad. Reportó, además que la nula actividad de GSTM1 y la baja actividad de GSTP1 se puede relacionar con el riesgo de desarrollar alguna enfermedad renal asociada al daño oxidativo. Lo anterior indica que la variación de genotipos en el riñón juega un papel importante dentro de los procesos de oxidación y susceptibilidad a sufrir diversas enfermedades renales, sin embargo, no indica las variaciones de ellos en función del tiempo. Como ejemplo de lo anterior, el trabajo de Cole en 2005 se centró en el estudio de la GSTA4, isoforma que ha sido encontrada en hígado, piel, músculo y riñón. Dentro de esta familia, GSTA1 ha sido localizada en hígado, intestino delgado, testículos y riñón, mientras que GSTA3 se ha identificado en glándula renal, páncreas, ovarios, glándula mamaria, placenta y adrenales, además de pulmón, estómago y tráquea. Las variaciones de la expresión de la GST pueden influenciar la susceptibilidad a enfermedades en humanos que se encuentran expuestos a diferentes factores ambientales. Sin embargo, aún faltan estudios por realizarse debido a que el polimorfismo genético puede ser usado en estudios epidemiológicos.

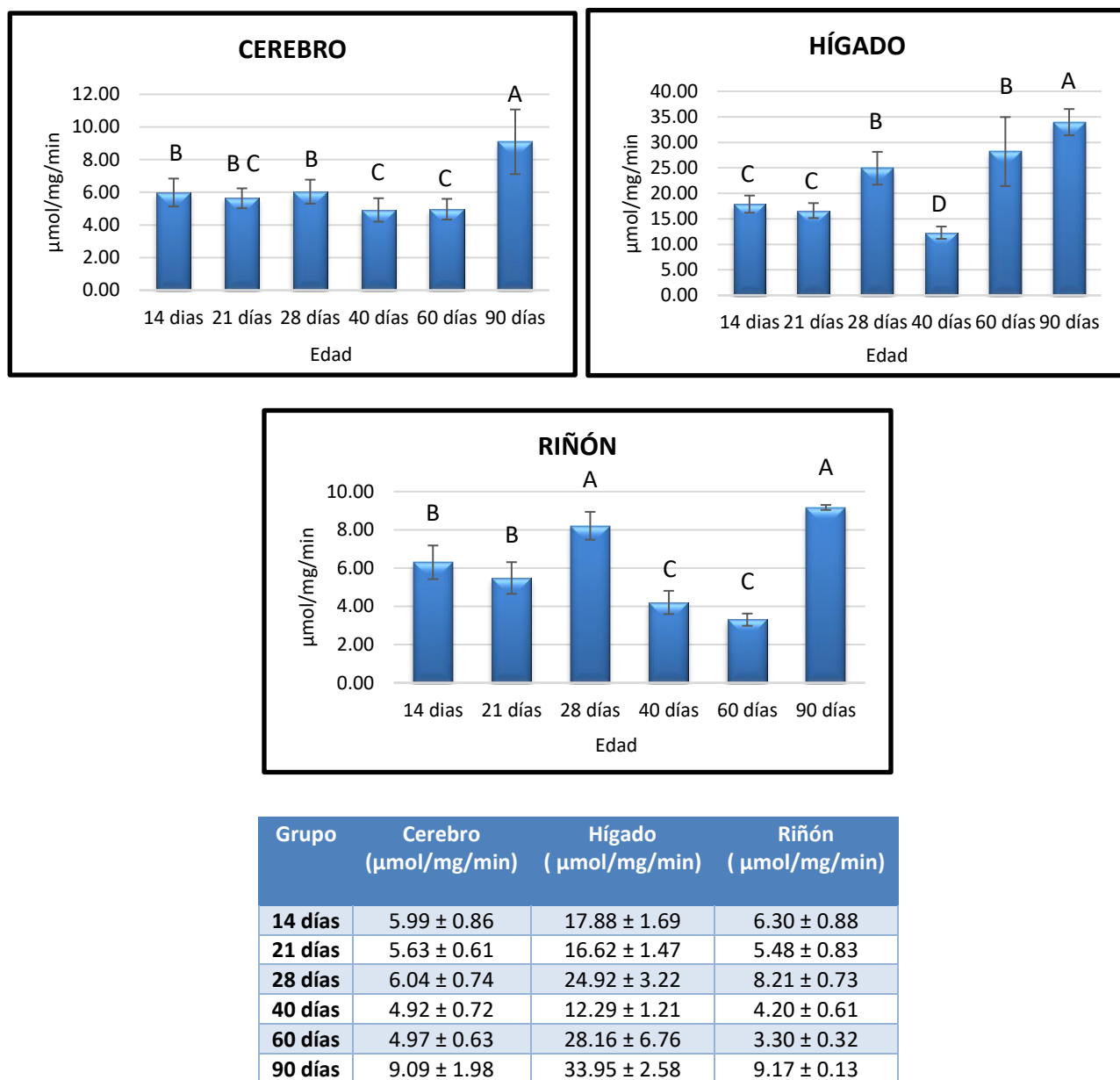
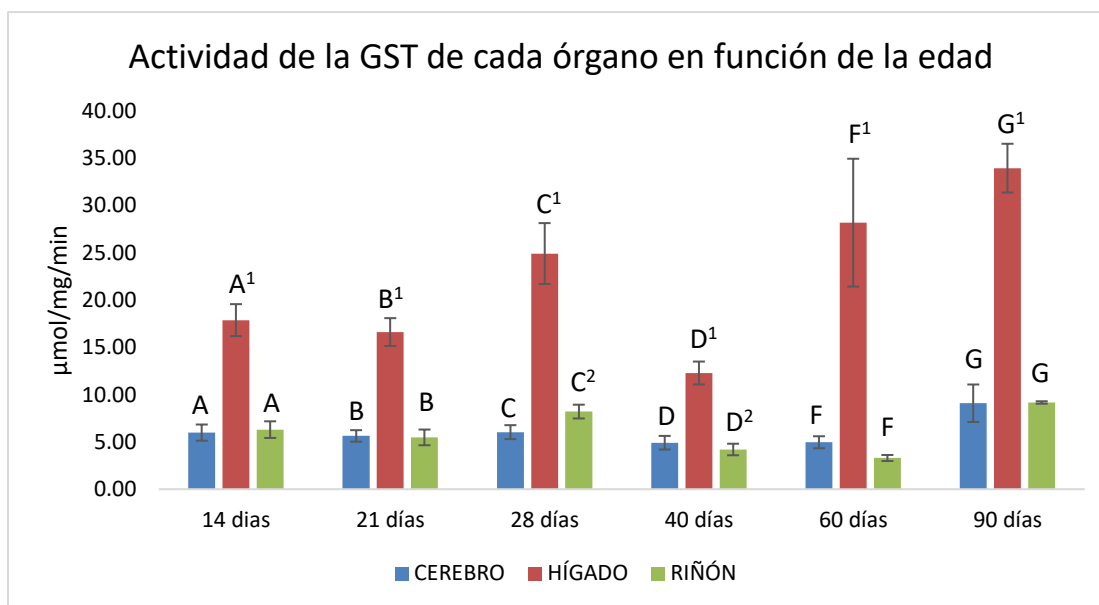


Figura 6. Actividad de la enzima Glutathión S-transferasa en cerebro, hígado y riñón de ratas control en función del tiempo. El eje x representa la edad de las ratas medida en días (n=6).

En la gráfica 3 se muestra la actividad de la enzima en función del tiempo en los órganos de estudio. El hígado es el órgano en donde fue más evidente el aumento de la actividad enzimática. El cerebro y el riñón presentaron una actividad enzimática sin diferencia significativa entre ellos durante todo el periodo experimental.



Gráfica 3. Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en cerebro, hígado y riñón de ratas Wistar macho en función del tiempo. el eje x representa la edad de las ratas medida en días.

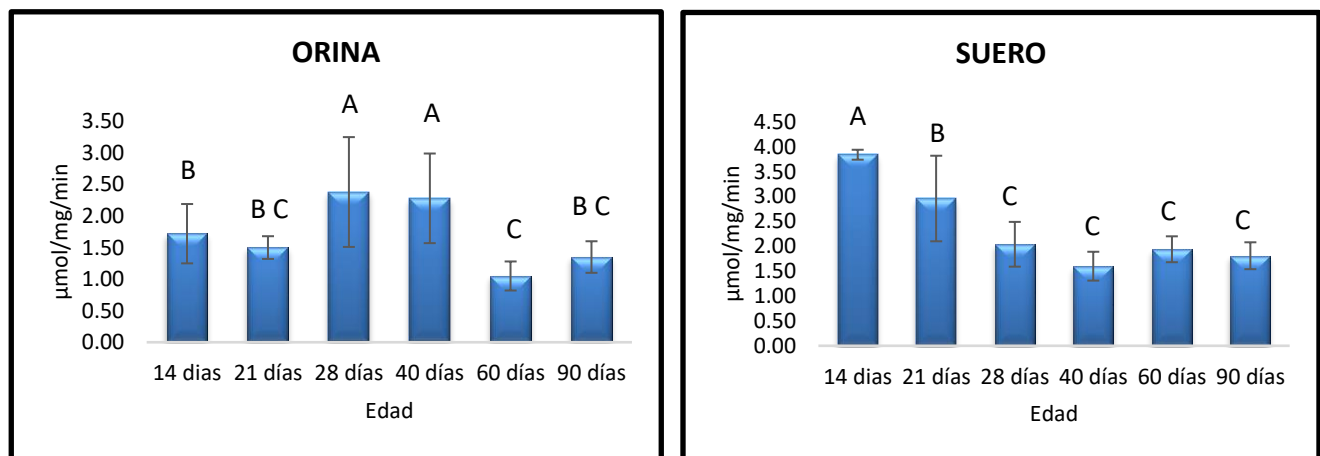
En el hígado la actividad de la enzima aumentó aproximadamente 14 unidades en todo el periodo experimental (17.88 a 33.95 $\mu\text{mol/mg/min}$). En el cerebro y riñón la actividad de la enzima aumentó ligeramente y de forma significativa desde los catorce días hasta los noventa días. El hecho de que en el hígado fuera más evidente la actividad de la Glutación S-Transferasa puede deberse a que, en este órgano la GST se encuentra en mayor concentración debido a su participación en el metabolismo de los xenobióticos. La relación entre la actividad de la enzima con la edad no es muy clara, sin embargo, se puede asumir que siempre será mayor en hígado y menor en riñón y cerebro, así como las funciones que tienen cada uno de ellos. Además, se deberá tomar en cuenta la conformación de isoenzimas y su susceptibilidad al daño oxidativo generado por la edad y las condiciones fisiológicas de las especies estudiadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo se asemejan a los reportados para hígado y cerebro. En el caso del riñón se detectó una variabilidad en la actividad, la cual se puede explicar por la expresión diferencial de las isoformas de la enzima en función de la edad.

E.4 Orina y suero

La figura 7 muestra los resultados obtenidos. En ella se observa que en orina la actividad de la enzima fue mayor en los tiempos de 28 y 40 días, en aproximadamente 0.8 unidades para los dos tiempos. 14, 21, 60 y 90 días presentaron una actividad menor. El grupo de 14 días tuvo una actividad enzimática de $1.72 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$, después de 7 días la actividad disminuyó $0.22 \mu\text{mol}$ ($p > 0.05$); a los 28 días aumentó 0.66 unidades ($p < 0.05$); a los 40 incrementó en $0.56 \mu\text{mol}$ ($p < 0.05$); llegando a los 60 días la actividad disminuyó $0.67 \mu\text{mol}$ ($p < 0.05$) y por último a los 90 días se detectó una disminución de $0.37 \mu\text{mol}$ unidades de actividad ($p > 0.05$).

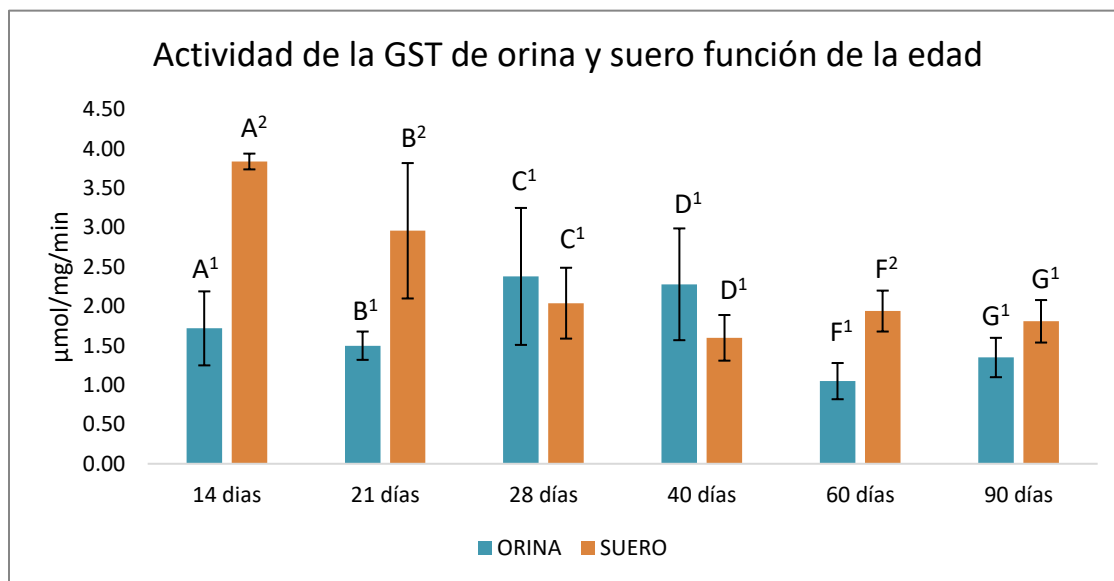
En cuanto al suero, se observó una tendencia de disminuir la actividad enzimática en función del tiempo. De 14 a 90 días la actividad disminuyó en total $2.03 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$. Por tiempos se observó lo siguiente: el grupo de 14 días tuvo una actividad de $3.84 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$; después de 7 días disminuyó $0.88 \mu\text{mol}$; a los 28 días $1.8 \mu\text{mol}$; a los 40 días $2.24 \mu\text{mol}$; a los 60 días 1.9 unidades y finalmente, a los 90 días la disminución fue de $2.03 \mu\text{mol}$, en relación con el grupo inicial. Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$).



Grupo	Orina ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	Suero ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)
14 días	1.72 ± 0.47	3.84 ± 0.10
21 días	1.50 ± 0.18	2.96 ± 0.86
28 días	2.38 ± 0.87	2.04 ± 0.45
40 días	2.28 ± 0.71	1.60 ± 0.29
60 días	1.05 ± 0.23	1.94 ± 0.26
90 días	1.35 ± 0.25	1.81 ± 0.27

Figura 7. Actividad de la enzima Glutathión S-transferasa en riñón orina y suero de ratas control en función del tiempo (n=6).

Cuando se compararon los resultados de la actividad medida en los dos fluidos, se encontró que el comportamiento de la actividad de GST en ambos fue diferente en los tiempos iniciales de crecimiento (14, 21 y 60 días) mientras que en los tiempos restantes fue semejante. Al comparar la actividad de GST en orina y suero con la determinada en el riñón, se observó que solo la determinada en orina tuvo un comportamiento similar a la cuantificada en riñón. Esto indica que la actividad de GST en orina refleja, en las etapas tempranas de crecimiento y al inicio de la etapa adulta, la de GST en riñón. La gráfica 4 Muestra la comparación realizada.



Gráfica 4. Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en orina y suero de ratas Wistar macho en función del tiempo. El eje x representa la edad de las ratas medida en días.

Se ha propuesto que los bioindicadores de daño pueden ser proteínas, enzimas o metabolitos determinados en fluidos corporales como suero y orina. La determinación de GST en orina puede reflejar la actividad de la enzima en riñón. Por esta razón, se determinó la actividad en estos fluidos. Mukhtar, en 1977 determinó la actividad de esta enzima en suero de ratas jóvenes-adultas expuestas a tetracloruro de carbono. En relación con el grupo control, la actividad de GST en suero de las ratas intoxicadas aumentó un promedio de 13.65 nmol/min/mg. Por su parte, Kumar en 2010 indicó que existen cambios en la actividad de la enzima en plasma de humanos en función de la edad. Ellos, con base en sus estudios de la capacidad antioxidante plasmática sugirieron que el proceso de envejecimiento, en humanos, es dependiente del incremento de la actividad de GST así como de la disminución del potencial antioxidante y la concentración de glutatión reducido en el plasma.

Por otro lado, se ha asociado la actividad de esta enzima con el estado de salud de los organismos. Lo anterior confirma que GST es una enzima que, al tener demasiadas funciones celulares, se ve afectada por diferentes factores, como el metabolismo celular. Muchas alteraciones metabólicas originan episodios de inflamación y condicionan el estado de salud de los individuos, trayendo como consecuencia un compromiso metabólico alterado en enfermedades como la diabetes. Como ejemplo de lo anterior, el trabajo de Holmquist y Liuba en 2012, relacionaron la expresión de la enzima, en orina, con la función arterial y el estado de inflamación en pacientes jóvenes con Diabetes tipo I. Propusieron que los niveles de GST en orina podrían estar relacionados con la función de las arterias periféricas vasomotoras endoteliales y la disminución elástica, especialmente en pacientes expuestos al humo de tabaco. En contraste, observaron que la concentración de enzima en orina, en pacientes con marcadores elevados de inflamación sistémica, se encuentra aumentada. En 2014 el equipo de Scholten cuantificó la presencia de Glutathión S-transferasa alfa y pi (GST- α , GST- π) en orina y las propuso como marcadores de daño de los túbulos proximal y distal del riñón en pacientes adultos (53 años en promedio) con diabetes tipo I. Los resultados indicaron que la presencia de ambas enzimas fue significativamente más alta en mujeres que en hombres en función de la edad pero no con el tiempo que llevan cursando la enfermedad. Por lo tanto, este estudio puede sugerir que no existe una asociación entre la presencia de la GST y la función renal.

8.2 Ratas intoxicadas con plomo

Los compuestos tóxicos pueden inducir efectos a través de mecanismos fisiológicos y metabólicos distintos. Si se realiza una curva dosis-respuesta, estos compuestos se pueden dividir en dos categorías.

- a) Compuestos sin umbral, es decir, que en la curva no se identifica una dosis por debajo de la cual no se detecta un efecto.
- b) Compuestos con umbral, lo que significa que se identifica claramente una dosis a partir de la cual se observa un efecto.

Se considera que algunos tóxicos pueden causar efectos incluso a dosis extremadamente bajas, aunque la probabilidad de ocurrencia sea muy reducida. En este caso, no existe un grado seguro de exposición. Cuando la magnitud de la exposición aumenta, también crece el riesgo. Por otro lado, se piensa que la mayoría de ellos no provocan efectos adversos hasta que se alcanza un nivel mínimo de exposición que corresponde a una dosis llamada dosis umbral. Una vez que la dosis de exposición se encuentra por encima de esta dosis, la severidad de la respuesta aumentará proporcionalmente. Por debajo de la

dosis umbral se considera que la sustancia tóxica no tiene la capacidad de causar un efecto dañino. Los compuestos anteriores se denominan tóxicos con umbral. Algunos agentes tóxicos pueden ocasionar ambos efectos, entre ellos los metales pesados (Lema, 2010). La naturaleza de las manifestaciones de toxicidad depende no sólo de la magnitud de la exposición sino también de las características del organismo expuesto (Sanin, *et al.*, 1998, Londoño-Franco *et al.*, 2016).

En este trabajo se eligieron ratas Wistar macho que se encontraban en la etapa correspondiente a jóvenes-adultos para asegurarnos que su metabolismo no se encontrara comprometidas con la edad adulta y los animales pudieran soportar la exposición al metal. Este esquema de intoxicación ha demostrado que los animales logran sobrevivir al 100% presentando, aun así, daños en muchas funciones metabólicas y fisiológicas.

A.- Peso corporal

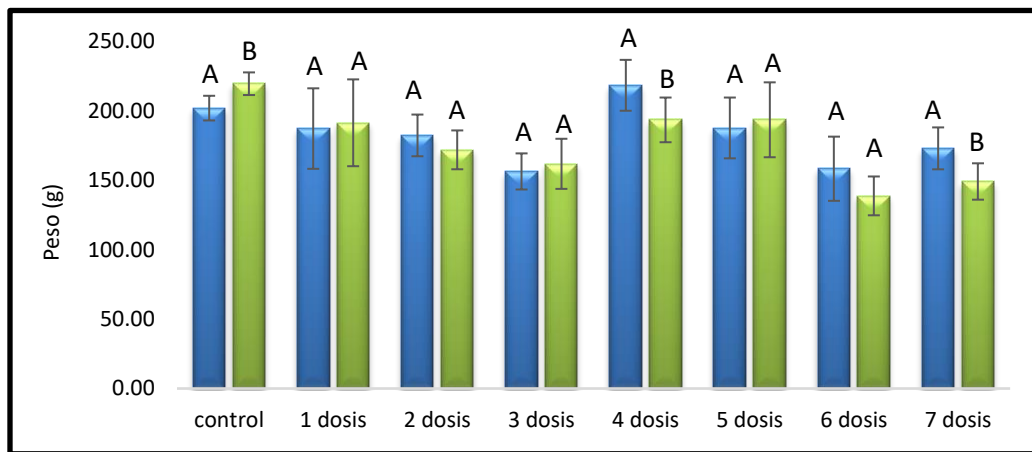
Los resultados demostraron diferencias entre los grupos en función de la dosis y a comparación con el grupo control. La figura 8 muestra los resultados obtenidos. Las barras de color azul representan el peso inicial y las barras en color verde el peso al finalizar el periodo de exposición al metal.

Los roedores del grupo control aumentaron 17 gramos al terminar los quince días de experimentación. A lo largo del esquema de intoxicación y en cada día correspondiente a la aplicación del metal, los pesos fueron obtenidos y comparados con el grupo control y a las diferentes dosis del metal.

Los cambios de peso al inicio y al final de cada dosis variaron de la siguiente manera. El grupo expuesto a una dosis incremento de 4.15 g de forma no significativa ($p > 0.05$). La segunda dosis ocasionó una disminución no significativa de 10.40 g ($p < 0.05$). Cuando los animales recibieron la tercera dosis se observó un aumento no significativo de 5.48 g ($p > 0.05$). La aplicación de cuatro dosis generó una disminución de peso significativa de 24.92 gramos ($p < 0.05$). El grupo de cinco dosis no presentó un incremento significativo de peso ($p > 0.05$). El grupo expuesto a seis dosis disminuyó 19.57 g de forma no significativa ($p > 0.05$). Finalmente, el grupo que recibió siete dosis presentó un decremento significativo de 23.85 g ($p < 0.05$).

Al comparar el grupo control con el grupo de 7 dosis de plomo vía intraperitoneal se observó una disminución significativa de 23.85 gramos a esta dosis. Representando el efecto fisiológico general de las siete dosis aplicadas. En función de las dosis intermedias se vio que hubo incrementos y disminuciones de peso que no fueron significativos. Se ha reportado que el plomo puede ocasionar efectos cardiovasculares, en la salud reproductiva y en el peso corporal del individuo. Lo anterior se

debe a que cuando el organismo se expone al metal este se bioacumula en huesos y se redistribuye por medio del torrente sanguíneo (Han et. al., 1999; Valdivia, 2005; Lyn, 2006; Flora et. al., 2012).



grupo	promedio inicial	promedio final	diferencia
control	201.98 ± 8.89	219.55 ± 8.15	17.57
1 dosis	187.25 ± 29.00	191.40 ± 31.28	4.15
2 dosis	182.32 ± 15.01	171.92 ± 14.00	-10.40
3 dosis	156.37 ± 13.01	161.85 ± 18.04	5.48
4 dosis	218.42 ± 18.32	193.50 ± 16.09	-24.92
5 dosis	187.70 ± 21.89	193.57 ± 26.97	5.87
6 dosis	158.32 ± 23.12	138.75 ± 13.98	-19.57
7 dosis	172.98 ± 15.09	149.13 ± 13.10	-23.85

Figura 8. Diferencia de peso en roedores control y expuestos a plomo por un periodo de 15 días (n=6).

Los datos que se obtuvieron en este trabajo indicaron que, cuando los animales son expuestos de forma aguda, a siete dosis de plomo (25 mg/Kg de peso), los roedores bajaron de peso; gran porcentaje presentaron problemas estomacales como diarrea y el 100% sufrieron pérdida de pelo además de mostrarse agresivos, en algunos casos, o muy pasivos, en otros.

Un estudio realizado en Torreón Coahuila, México indicó que la exposición al plomo, aún a niveles bajos, afecta a niños y a adultos. En cantidades muy pequeñas, el plomo interfiere con el desarrollo del sistema neurológico, causa crecimiento retardado y problemas digestivos. En casos extremos causa convulsiones, colapsos e incluso la muerte (Valdés y Cabrera, 1999).

Amjad y colaboradores en 2013, realizaron un estudio sobre los efectos del plomo en el peso corporal y renal de ratas Wistar. El plomo fue administrado vía peritoneal diariamente a una dosis de 8 mg/Kg de peso hasta cumplir seis semanas. Los resultados demostraron que la intoxicación con el metal provocó la pérdida de 34 gramos aproximadamente al final del periodo experimental (172.7 ± 8.38 y

138.8 ± 8.46, peso inicial y final respectivamente. Los resultados de este trabajo concuerdan con este autor, ya que, a pesar de exponer a las ratas a una concentración más baja y un tiempo mayor, se observó una disminución de peso corporal.

Por otro lado, se ha reportado que cuando las ratas son intoxicadas de forma crónica existe una ganancia en peso. En relación con lo anterior Sun y colaboradores (2017) utilizaron ratas Wistar y las intoxicaron con acetato de plomo vía oral por 21 semanas, concluyendo que como resultado de una exposición crónica al metal se pueden generar desordenes metabólicos y, con ello, provocar un aumento de peso. Aunque estos estudios muestran condiciones diferentes realizados en este trabajo, nosotros comprobamos que el metal puede causar alteraciones en el peso dependiendo del cuadro de intoxicación y susceptibilidad del individuo.

La condición metabólica podría jugar un papel importante dentro del proceso de intoxicación del plomo. Por lo tanto, los resultados obtenidos en los grupos de estudio de este trabajo reflejaron los efectos del plomo en ratas en estado pasivo. En relación con lo anterior, Han y colaboradores, en 1999, publicaron un estudio sobre los efectos del metal (250 µg/mL, vía oral) en ratas Sprague-Dawley pasivas y ratas a las cuales les inducían el ejercicio al ponerlas a nadar. Sus resultados indicaron que no existió diferencia entre los dos grupos. Sin embargo, mediante estudios de absorción atómica encontraron que la mayor concentración de plomo se acumuló en los huesos y que una pequeña parte pudo salir de estos y distribuirse al torrente sanguíneo y pasar a los diferentes tejidos, trayendo como consecuencia que este metal se acumulara en los mismos. En relación con los humanos, un estudio relacionó el nivel de plomo en sangre y su asociación con el índice de masa corporal y obesidad en China. Sus modelos fueron hombres y mujeres de tres regiones del este del país expuestos a plomo ocupacionalmente y clasificados como grupo control, sobrepeso y obesidad. Mediante absorción atómica de muestras de sangre completa determinaron una variación de plomo significativa solo en el grupo de las mujeres normales, con sobrepeso y con obesidad (36.35 µg/L, 40.30 µg/L y 44.35 µg/L respectivamente). De la misma manera determinaron el índice de masa corporal en ellas. Como resultado obtuvieron una asociación positiva entre los niveles de plomo en sangre y el aumento de masa corporal en mujeres con obesidad, pero ninguna asociación en hombres (Wang et. al., 2015).

B.- Peso de los órganos en función de las dosis administradas

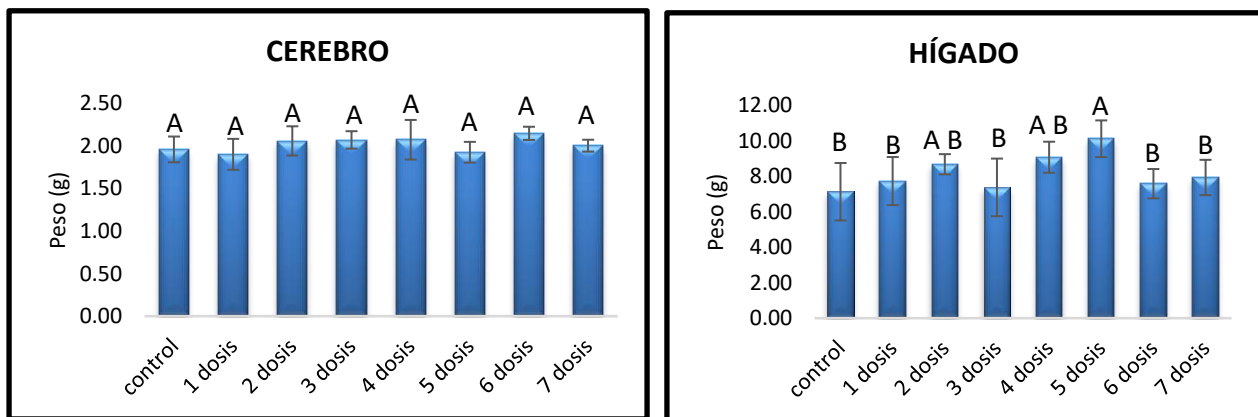
El plomo ocasionó la disminución del peso corporal de las ratas de estudio, esto indica que el metal ocasionó un efecto sistémico al ser administrado vía intraperitoneal. Como siguiente paso se obtuvieron los pesos de los órganos de los animales después de las siete dosis de plomo.

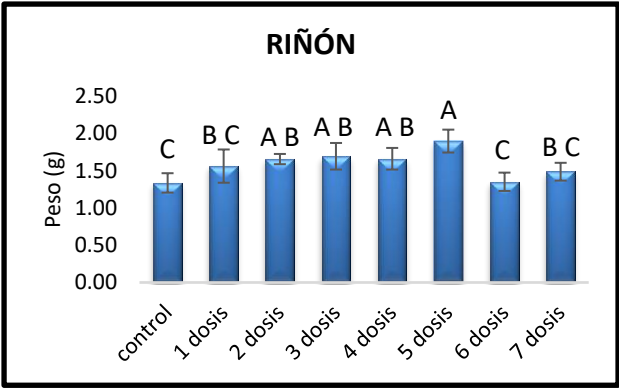
El órgano que tuvo mayor peso fue el hígado, mientras que riñón y cerebro presentaron pesos muy semejantes. La figura 9 muestra los resultados obtenidos.

Cerebro. El peso promedio del órgano a lo largo de todo el periodo experimental no presentó variación significativa, manteniéndose constante a lo largo del tiempo.

Hígado. El peso promedio del órgano a lo largo de todo el periodo experimental fue variable y no mostro dependencia con el tiempo de exposición. Solo los grupos correspondientes a 2, 4 y 5 dosis mostraron diferencias significativas de 1, 2 y 3 unidades respectivamente ($p < 0.05$).

Riñón. De forma similar al hígado, el riñón tuvo un comportamiento no dependiente del tiempo de exposición al tóxico. En este caso los grupos con las dosis 2, 3, 4 y 5 mostraron una tendencia a subir de forma significativa ($p < 0.05$), sin embargo, al final el peso de este órgano no fue diferente al del grupo control.

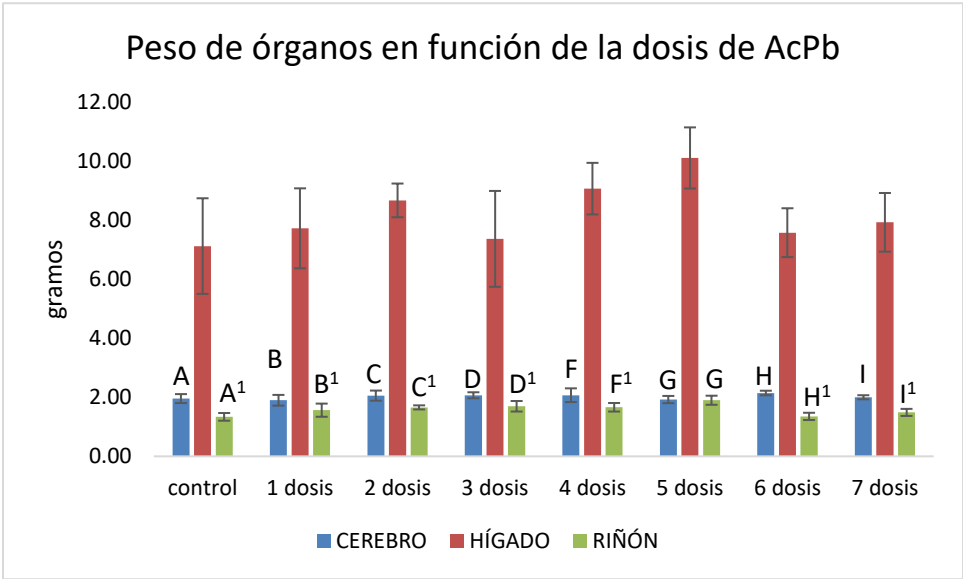




Dosis	Cerebro (g ± SD)	Hígado (g ± SD)	Riñón (g ± SD)
Control	1.96 ± 0.15	7.12 ± 1.62	1.34 ± 0.13
1	1.90 ± 0.18	7.72 ± 1.35	1.56 ± 0.22
2	2.06 ± 0.17	8.67 ± 0.57	1.66 ± 0.07
3	2.07 ± 0.10	7.37 ± 1.62	1.70 ± 0.18
4	2.07 ± 0.23	9.07 ± 0.87	1.66 ± 0.15
5	1.92 ± 0.12	10.11 ± 1.03	1.90 ± 0.15
6	2.15 ± 0.08	7.58 ± 0.83	1.35 ± 0.12
7	2.00 ± 0.07	7.93 ± 0.99	1.49 ± 0.12

Figura 9. Peso de los órganos cerebro, hígado y riñón de ratas Wistar intoxicadas con 25 mg/Kg de plomo (n=6).

La gráfica 5 muestra el peso de los órganos en función de la dosis de plomo. Se puede observar que, en general, el metal no ocasionó aumento significativo en los órganos bajo las condiciones experimentales establecidas. Esto no implica, no obstante, que las funciones bioquímicas no hayan sido alteradas. Estos resultados podrían deberse a que el lapso de tiempo fue muy corto y que, por lo tanto, no se pudo detectar una diferencia significativa entre los órganos en ausencia y en presencia de plomo.



Gráfica 5. Peso de los órganos en función del número de dosis administrada a ratas Wistar macho (n=6).

Se han reportado trabajos de investigación utilizando ratas expuestas a plomo por periodos largos de tiempo en donde se ha observado que la exposición al metal puede alterar el peso de los órganos de los animales. En relación con ello, un estudio histológico demostró que en cerebro de ratas Sprague-

Dawley intoxicadas con plomo (los animales bebieron por 8 semanas un mililitro de una solución de 50 mg/Kg de acetato de plomo), se observó que las ratas intoxicadas perdieron peso cerebral de manera significativa al compararlas con el grupo control (1.76 ± 0.08 y 1.47 ± 0.07 respectivamente) (Sidhu y Nehru, 2004). De la misma forma, Berrahal y colaboradores, en 2009, estudiaron los efectos del plomo en el hígado y riñón de ratas Wistar intoxicadas de forma oral con 50 mg/L. Los animales seleccionados correspondieron a los grupos de destete hasta joven adulto de animales que desde la etapa fetal estuvieron en contacto con el metal debido a que sus madres fueron intoxicadas vía oral con la misma concentración de plomo. Observaron que no hubo cambio significativo en ambos órganos debido, posiblemente, a la concentración de plomo utilizado. Un experimento similar fue realizado por Feliciano, en 2019, el utilizó ratas embarazadas a las cuales intoxicó con 1000 ppm de plomo vía oral, después del nacimiento estas ratas continuaron con la intoxicación hasta que las crías fueron destetadas. Estas continuaron con la exposición a plomo cuatro meses más. Se encontró que el peso de los órganos riñón, hígado y cerebro disminuyó de forma significativa. Los resultados obtenidos en este trabajo son en cerebro son diferentes a los reportados por Shidu y Nehru posiblemente debido a que se utilizaron ratas de diferentes especies y se relacionan con los observados por los otros investigadores en el caso de hígado y riñón.

Los efectos de los metales sobre los organismos se han estudiado en modelos experimentales planeados, sin embargo, los efectos que éstos ejercen en los seres vivos se encuentran influenciados por varios factores como es la coexistencia con otros elementos, ya sea tóxicos o no, que se encuentran en el medio ambiente. El grupo de Reddy, en 2015, realizó estudios relacionados con lo anterior en ratas de laboratorio de la cepa Wistar. Para ello tomaron muestras de agua de un río contaminado con metales pesados. Sus determinaciones, por absorción atómica, indicaron la siguiente composición: Zn (2.73 mg/L), Pb (5.41 mg/L), Ba (0.16 mg/L), Mn (0.32 mg/L), Ni (0.46 mg/L), Cr (0.48 mg/L), Cu (0.67 mg/L), Sb (0.001 mg/L), Co (0.005 mg/L), Ag (0.01 mg/L), Cd (0.01 mg/L), As (0.01 mg/L), Mo (0.03 mg/L) y Sn (0.06 mg/L). Los grupos experimentales establecidos para el estudio de la determinación de biomarcadores de daño fueron un control y tres experimentales. Estas últimas fueron tratadas con agua del río contaminado vía oral a 3 dosis diferentes [alta (agua del río sin diluir), media (diluido 1:10) y baja (1:100)] durante 28 días. Entre sus resultados observaron que el peso del hígado disminuyó significativamente comparado a control a dosis media y alta. En el caso del riñón, el peso decreció significativamente a dosis alta y por último, el peso del cerebro no presentó cambios. Sin embargo, no propusieron ninguna explicación para sus resultados pero sus experimentos demostraron que los

metales pesados en general pueden provocar alteraciones en el peso de los órganos de los animales expuestos ambientalmente.

C.- Examen general de Orina

El riñón, el hígado y el cerebro se han reportado como los órganos más dañados por exposición a este metal. El plomo (Pb) podría tener un papel causal en el desarrollo de enfermedad renal crónica, sin embargo, es difícil atribuir a este elemento las alteraciones renales que pudieran aparecer en un individuo, debido al desconocimiento de la exposición que pudieran tener determinadas personas. Las complicaciones ocurridas por una excesiva absorción del metal pueden producir daño renal y no estar relacionados directamente al mismo. La exposición aguda al metal puede presentarse tanto en niños como en adultos y pueden expresarse con la aparición de encefalopatías y defectos en la reabsorción a nivel de los túbulos renales proximales, cuadro clínico conocido como síndrome de Fanconi (Cabrera *et al*, 2016). Se conoce que una exposición a plomo superior a 5 años puede inducir atrofia tubular renal progresiva con fibrosis intersticial, que clínicamente se traduce en insuficiencia renal crónica y gota (Palencia, *et al*, 2018).

La intoxicación aguda por plomo suele ser difícil de diagnosticar debido a la alta variedad de síntomas gastrointestinales, hematológicos, neuronales y renales que presenta. En el riñón interfiere con la conversión de la vitamina D a su forma activa. La nefropatía se caracteriza por la citomegalia en las células del epitelio del túbulo proximal y se manifiesta como aminoaciduria, hipofosfaturia y glucosuria; así como la presencia de cuerpos de inclusión nuclear, cambios mitocondriales y disfunción de los túbulos proximales. Así mismo, nefritis intersticial ha sido reportada en concentraciones de plomo mayores a 40 µg/dL (Navarro, *et al*. 2009., Rodríguez, 2017).

El examen general de orina orienta en la determinación de los efectos de diferentes tóxicos en los sistemas renal (proteína, sangre, pH, gravedad específica), hepático (bilirrubina, urobilinógeno), inmunológico (leucocitos y nitritos) y el metabolismo de carbohidratos (cetonas). Un estudio sugiere que, en una intoxicación con plomo, la urea es el primer marcador de un daño renal agudo. La hipouricemia puede ser un síntoma proveniente de un incremento en la excreción de ácido úrico renal. Lo que conlleva a un defecto en el túbulo renal que puede ser observado después de una intoxicación con metales pesados. Este síndrome es caracterizado por la disfunción general del túbulo renal proximal, donde resulta en la pérdida de aminoácidos, monosacáridos, calcio, fosfato, ácido úrico y proteínas en la orina (Berrahal, 2009).

Leucocitos. Se observó presencia de leucocitos en todos los grupos incluyendo el control. Se registró un aumento de ratas con presencia de niveles elevados de leucocitos (75 leu/dL) al comparar el grupo control con el grupo expuesto a siete dosis de plomo. Lo anterior puede indicar que a lo largo de la exposición al tóxico un número creciente de animales desarrolló leucocituria sugiriendo alguna infección urinaria o la presencia de alguna enfermedad inflamatoria como uretritis, cistitis o pielonefritis (Free, 1972; Campuzano, 2007; Lozano, 2016). El plomo es un metal que ocasiona perturbaciones en el sistema inmune a varios niveles aumentando los casos de alergias en humanos y animales de experimentación. Al suprimir la respuesta inmune, puede provocar el aumento de infecciones. Existen diferentes estudios que muestran que el plomo inhibe la respuesta inmune celular. Una de las causas de lo anterior es que el plomo puede interferir con las interacciones antígeno específicas entre macrófagos y células T, al inhibir el desarrollo y activación de macrófagos, teniendo como consecuencia el aumento de enfermedades por infección (Goytia-Acevedo et al., 2002). En cuanto al aspecto la orina habitualmente es clara, pero puede tornarse turbia por la presencia de leucocitos, células epiteliales u otros elementos esto pudiéndose confirmar en el análisis del sedimento, las bacterias pueden causar turbidez, en especial si la muestra se queda a temperatura ambiente, la precipitación de partículas de algunos cristales como uratos amorfos en orinas ácidas y fosfato amorfo en orinas alcalinas esto dependiendo del pH de la muestra, también pueden causar turbidez (Laura Patricia, 2019).

Nitritos. Los resultados varían de valor positivos al inicio hasta valores negativos al final del periodo de intoxicación, con variaciones en los valores en las dosis intermedias. En condiciones normales el valor de los nitritos debe ser cero. Esta determinación constituye un método indirecto para determinar la presencia de bacterias en la orina. (Campuzano, 2007; Lozano, 2016). El daño renal por exposición a tóxicos se refleja en la determinación de proteínas, sangre, pH y gravedad específica. Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

Proteína. Se observó presencia de proteínas en la orina en los grupos control, una, dos, cuatro, seis y siete dosis. El aumento de animales con proteinuria aumento de 50 a 83 % al final del periodo de intoxicación, reflejando el aumento de daño a nivel glomerular en función de la dosis de plomo acumulado a lo largo de la exposición al metal. Como ya se ha mencionado, la proteinuria tubular puede estar relacionada con lesiones de las células tubulares y / o trastornos de la absorción tubular de las proteínas del filtrado glomerular (Campuzano, 2007; Lozano, 2016).

Sangre. Los grupos presentaron bajos niveles de eritrocitos en orina, variando el porcentaje por cada grupo. Tres animales presentaron un nivel de 50 eritrocitos/ μ L en los grupos de tres, cuatro y seis dosis, mientras que en este último grupo, un roedor presentó 250 Ery/ μ L. Sin embargo, el porcentaje de animales con resultado negativo fue mayor en todos los grupos. Lo anterior demuestra que los organismos presentan diferente susceptibilidad a la intoxicación con el metal. Se puede decir, por lo tanto, que la hematuria solo estuvo presente en un bajo porcentaje de los animales intoxicados, reflejando posible daño glomerular, tubulointersticial, renovascular o metabólico que pudo ejercer el metal como pueden ser tumores, los cálculos e infecciones (Yoder, 1965; Campuzano, 2007; Lozano, 2016).

Glucosa. Los valores son negativos en todos los grupos. Esto indica que no existen daños a nivel de túbulo contorneado proximal, que es el encargado de la reabsorción de la glucosa, por ello la homeostasis de la glucosa se conserva en el riñón. La glucosuria ocurre cuando la carga de glucosa filtrada excede la capacidad de reabsorción del túbulo o sufre daño (Yoder, 1965; Shchersten, 1967, Campuzano, 2001; Lozano, 2016).

Varios autores han postulado que el metabolismo de la glucosa tiene un papel importante en las patogénesis renales, cerebrales y hematológicas inducidas por el plomo. Kasperczyk y colaboradores en 2015 realizaron un estudio para estimar el efecto de la exposición ocupacional al metal sobre la concentración de glucosa en sangre y de varias enzimas involucradas en la glucólisis, el ciclo de Krebs y la vía de las pentosas fosfatos. Observaron que la actividad de la Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) disminuye significativamente, los niveles de malondialdehído incrementan significativamente en trabajadores con alta exposición a plomo (60 μ g/dL). Concluyeron que el plomo interfirió con el metabolismo de los carbohidratos, pero los mecanismos compensatorios parecieron ser eficientes, ya que la homeostasis de la glucosa no se alteró. La disminución de la actividad de la vía de las pentosas fosfatos inducido por el plomo, puede causar una menor disponibilidad de glutatión reducido que es esencial para la defensa contra las especies reactivas de oxígeno. Das Pritha en 2017, realizó un estudio dosis-respuesta para observar si una exposición subaguda a plomo puede alterar el metabolismo de los carbohidratos. Se intoxicaron ratones albinos con acetato de plomo a una concentración de 5 a 20 mg/Kg de peso vía orogástrica durante 30 días. A partir de los resultados se sugirió que la exposición subaguda al plomo influye de manera significativa en el metabolismo de la glucosa junto de forma dependiente a la dosis. También se observó una alteración dependiente de las dosis en los niveles de glucosa en sangre e hígado.

pH. Se realizó el análisis estadístico por ANOVA utilizando el método de Tukey ($p < 0.5$). Se observó que hay diferencia significativa entre los grupos. Esto indica que el valor del pH se hizo alcalino en presencia de plomo, aumentando de 6.33 a 7.5 al final del periodo experimental. Esto podría estar relacionado a alguna disfunción a nivel del Asa de Henle o a posibles infecciones del tracto urinario, según lo reporta el trabajo de Campuzano específicamente en el túbulo contorneado proximal (Yoder, 1965; Campuzano, 2007; Lozano, 2016).

Gravedad específica. El análisis ANOVA utilizando el método de Tukey ($p < 0.5$) demostró que el grupo control fue diferente significativamente con respecto a los demás grupos excepto con los grupos de seis y siete dosis. Los grupos de una dosis a siete dosis no tienen diferencia significativa. Los resultados indican que posiblemente existen diferencias en el contenido de iones en los grupos en función de la dosis.

Cetona. Se encontró presencia de cuerpos cetónicos en el grupo de dos dosis, en los demás grupos restantes fue negativos. Esto indica que el metabolismo de los carbohidratos no se ve afectado por la presencia de plomo en las células. El valor de los cuerpos cetónicos en orina debe ser cero; la presencia de cetonuria está relacionada con alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos y de los carbohidratos. La cetonuria se encuentra muy asociada a la diabetes mellitus, pero también puede ocurrir durante el embarazo (McGarry, 1978; Williamson, 1971; Fraser, 1965 Campuzano, 2001; Lozano, 2016).

Urobilinógeno. Se encontró presencia de 10 mg/dL de urobilinógeno en los grupos de una, dos, tres y cinco dosis, mientras que en los grupos control, cuatro, seis y siete dosis fue negativo. Cuando aparece en la orina de manera acentuada, puede indicar de manera temprana un daño del parénquima hepático, así como enfermedades hepatocelulares y anemias hemolíticas (Campuzano, 2007; Lozano, 2016). En los grupos de estudio existió un comportamiento con grupos en los que el 100 % de la población dio negativo o positivo, por lo que no se puede dar una explicación del significado fisiológico de estos resultados. Lo que sí se puede afirmar es que se observaron daños en la fisonomía de los hígados de los animales intoxicados.

Bilirrubina. De la misma forma que en el analito anterior, la presencia de bilirrubina vario de forma no directa a la dosis, ya que los grupos presentaron animales con resultados positivos y animales con resultados negativos. Los resultados positivos variaron de 1 a más de 12 mg/dL. En los animales que

presentaron bilirrubina positiva se podría decir que posiblemente cursen por una obstrucción intra o extra-hepatobiliar como sucede en la ictericia obstructiva; en la enfermedad hepatocelular; en el síndrome de Rotor; en la enfermedad Dubin-Johnson y en el cáncer del páncreas o de los conductos biliares (Tietz, 1976; Campuzano, 2007; Lozano, 2016). El daño hepático se manifiesta debido que el plomo altera la función de la enzima hepática citocromo P450 y estimula la síntesis de lípidos en el hígado. Varios estudios reportan que la peroxidación de la membrana celular lipídica es un mecanismo clave en los efectos tóxicos del plomo en el metabolismo de lípidos en modelos in vitro e in vivo. Sin embargo, el plomo no induce la peroxidación de forma directa, los iones aceleran el proceso promoviendo la producción de lípidos superóxidos y la generación de especies de oxígeno libres (Rodríguez, 2016).

Tabla 3. Examen general de orina de los grupos de estudio (n=6).

Grupo	Leucocitos (μL)	Nitritos	Urobilinógeno (mg/dL)	Bilirrubina (mg/dL)	Proteína (mg/dL)
control	10 (66.6%) 75 (16.6%) Negativo (16.6%)	Positivo (66.6%) Negativo (33.3%)	Negativo (100%)	1.0 (66.6%) Negativo (33.3%)	30 (50%) Negativo (50%)
1 dosis	Traza (100%)	Negativo (100%)	10 (100%)	1.0 (50%) Negativo (50%)	30 (33.3%) Traza (16.6%) Negativo (50%)
2 dosis	500 (16.6%) Traza (50%) Negativo (33.3%)	Positivo (50%) Negativo (50%)	10 (100%)	1.0 (66.6%) Más de 12 (33.3%)	1000 (16.6%) 30 (16.6%) Traza (33.3%) Negativo (33.3%)
3 dosis	10 (16.6%) traza (83.3%)	Positivo (33.3%) Negativo (66.6%)	10 (100%)	1.0 (50%) Más de 12 (16.6%) Negativo (33.3%)	30 (16.6%) Traza (16.6%) Negativo (66.6%)
4 dosis	Negativo (66.6%) 75 (33.3%)	Positivo (50%) Negativo (50%)	Negativo (100%)	4.0 (50%) 1.0 (33.3%) Negativo (16.6%)	30 (66.6%) Negativo (33.3%)
5 dosis	Traza (100%)	Positivo (16.6%) Negativo (83.3%)	10 (100%)	4.0 (16.6%) 1.0 (33.3%) Más de 12 (16.6%) Negativo (33.3%)	30 (16.6%) Traza (33.3%) Negativo (50%)
6 dosis	10 (83.3%) Negativo (16.6%)	Positivo (33.3%) Negativo (66.6%)	Negativo (100%)	4.0 (16.6%) 1.0 (66.6%) Negativo (16.6%)	30 (100%)
7 dosis	75 (66.6%) 10 (33.3%)	Negativo (100%)	Negativo (100%)	4.0 (16.6%) 1.0 (50%) Negativo (33.3%)	30 (83.3%) Negativo (16.6%)

Tabla 3. Examen general de orina de los grupos de estudio (n=6) continuación.

Grupo (Dosis)	Sangre (Ery/ μ L)	pH	Gravedad Específica	Cetona (mmol/L)	Glucosa	Volumen (mL)
Control	5 (16.6%) Negativo (83.3%)	6.33 ± 0.52^B	1.014 ± 0.002^A	Negativo (100%)	Negativo (100%)	27.33 ± 10.41 (16 a 42)
1 dosis	Traza (16.6%) Negativo (83.3%)	7.67 ± 0.41^A	1.006 ± 0.005^B	Negativo (100%)	Negativo (100%)	24.33 ± 14.83 (8 a 42)
2 dosis	5 (50%) Traza (16.6%) Negativo (33.3%)	$7.25 \pm 0.61^{A,B}$	1.006 ± 0.002^B	2.0 (66.6%) Negativo (33.3%)	Negativo (100%)	18.33 ± 10.69 (6 a 34)
3 dosis	Traza (50%) Negativo (50%)	7.50 ± 0.55^A	1.006 ± 0.006^B	2.0 (33.3%) Negativo (66.6%)	Negativo (100%)	31.67 ± 8.52 (22 a 42)
4 dosis	50 (16.6%) 25 (16.6%) 5 (33.3%) Negativo (33.3%)	8.17 ± 0.75^A	1.006 ± 0.006^B	Negativo (100%)	Negativo (100%)	19.67 ± 11.55 (10 a 38)
5 dosis	Traza (33.3%) Negativo (66.6%)	7.57 ± 0.27^A	1.006 ± 0.004^B	2.0 (16.6%) Negativo (83.3%)	Negativo (100%)	44.33 ± 19.33 (16 a 66)
6 dosis	250 (16.6%) 50 (16.6%) 25 (33.3%) 5 (33.3%)	7.50 ± 0.55^A	$1.008 \pm 0.004^{A,B}$	Negativo (100%)	Negativo (100%)	15.67 ± 6.50 (8 a 24)
7 dosis	Negativo (100%)	7.50 ± 0.55^A	$1.010 \pm 0.003^{A,B}$	Negativo (100%)	Negativo (100%)	29.00 ± 10.64 (16 a 40)

D.- Especies reactivas de oxígeno

D.1 Cerebro. La concentración de ERO's promedio del grupo control fue de 25.18 pmol TBAR's/mg de proteína y al final del experimento hubo un aumento de 2.72 picomoles. Comparando los demás grupos contra el control se encontró lo siguiente. A la primera dosis se observó un aumento de 108.46 picomol; a la segunda dosis decreció 4.83 picomol; a la tercera dosis 7.73 picomol; a la cuarta dosis se observó un decremento de 15.29 picomol; a la quinta dosis decreció 7.8 picomol; a la sexta dosis disminuyó 5.1

picomol y por último a la séptima dosis aumentó 2.72 picomol. En todas las comparaciones son significativamente diferentes ($p < 0.05$). La figura 10A muestra los resultados obtenidos, se observa que la dosis 1 provocó un efecto mucho mayor a las restantes y al control y la figura 10B muestra las diferencias en los grupos control, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 dosis.

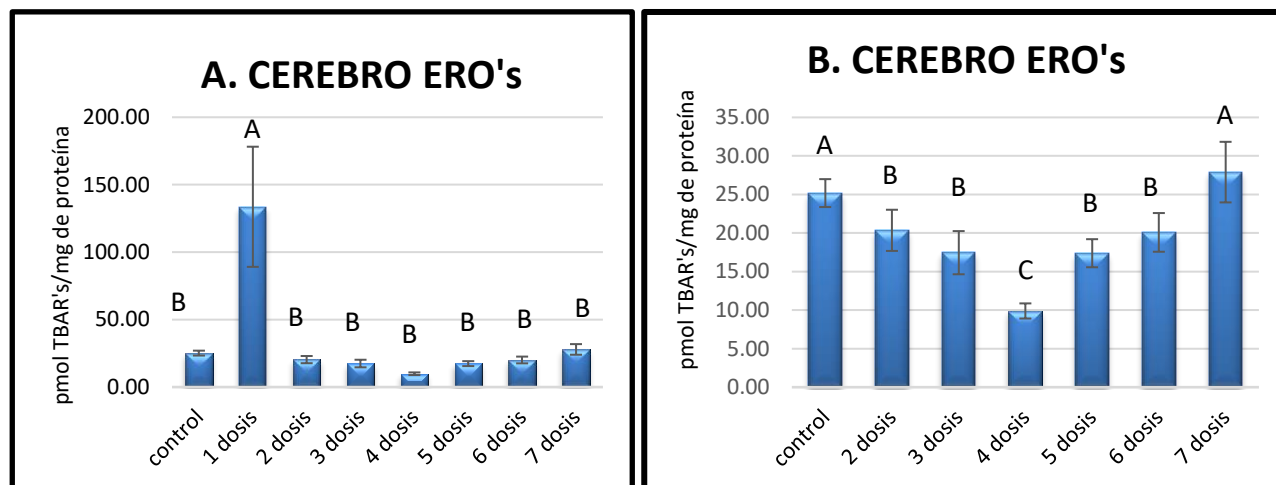


Figura 10. Especies reactivas de oxígeno en cerebro de ratas expuestas a plomo vía intraperitoneal siete dosis incluyendo la dosis inicial (A) y mostrando solo el control y las dosis 2 a 7 (B). (n=6).

En relación con los resultados obtenidos, se publicó un estudio relacionado con el daño oxidativo por intoxicación con plomo en cerebro. Usaron como modelo ratas Wistar en etapa de destete que fueron intoxicadas vía oral con una solución de 1g/L de acetato de plomo por 8 semanas. Determinaron la concentración de sustancias reactivas a los tiobarbitúricos (TBARS) después del tiempo de intoxicación y observaron que los niveles de TBARS fueron significativamente mayores al compararlos con el grupo control (84 ± 2 y 77 ± 1 nmol/g de tejido, respectivamente). Adicionalmente encontraron que la actividad de algunas enzimas antioxidantes como la Glutación reductasa y la Glutación peroxidasa fueron mayores en las ratas intoxicadas que en el grupo control. La actividad de la Superóxido dismutasa no mostró diferencia alguna entre las ratas experimentales y el grupo control. Este estudio sugiere que una intoxicación crónica con plomo puede inducir una situación de estrés oxidativo en el cerebro de las ratas (Adonaylo and Oteiza, 1999). Por otro lado, Sidhu y Nehru, en 2004, estudiaron el daño oxidativo que puede provocar la intoxicación con plomo en el cerebro de ratas Sprague-Dawley. Las ratas recibieron una dosis de 50 mg/Kg de acetato de plomo vía oral (1 mL de la dosis) durante 8 semanas. Determinaron el daño oxidativo midiendo la actividad de las enzimas Superóxido dismutasa

(SOD), Catalasa (CAT) y Glutación peroxidasa (GPx), también midieron los niveles de glutación reducido en el tejido. Como resultado se observó que el plomo causó una disminución significativa de la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx, al mismo tiempo observaron niveles de glutación reducido menores que en el grupo control. Se sabe que el cerebro es un órgano que es susceptible al daño por oxidación y que esto puede deberse a factores como la alta tensión de oxígeno; el alto contenido de lípidos; así como a una baja concentración de enzimas antioxidantes. La exposición a plomo afecta más al cerebro que en otros órganos ya que el metal puede causar alteraciones en el estado de óxido-reducción celular por inhibición de las enzimas involucradas en la defensa antioxidante (Sidhu and Nehru, 2004).

D.2 HÍGADO

El comportamiento fue parecido al observado en el cerebro, siendo la dosis 1 la que mostró un mayor efecto. La concentración de ERO's en este órgano en el grupo control fue de 12.50 picomol y al finalizar el experimento a las siete dosis se observó un aumento de 4.1 picomol. Realizando la comparación tomando como referencia el grupo control se encontró lo siguiente. La primera dosis ocasionó un aumento de 155.51 picomol; la dosis 2 aumentó 1.79 picomol; la tres 1.15 picomol; la cuatro disminuyó 1.90 picomol; la cinco aumentó 18.42 picomol; la seis incrementó 5.93 picomol y por último la séptima dosis aumentó 4.1 picomol en relación con el grupo control. Todas las comparaciones fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$). En el caso del grupo de cinco dosis se encontró que el promedio con desviación estándar fue de 30.92 ± 20.91 , por ello se analizaron de nuevo y se detectaron dos poblaciones diferentes, el primero es conformado por R1, R2 y R3 (48.27 ± 15.43) y R4, R5 y R6 (13.57 ± 1.19). Estos dos subgrupos fueron significativamente diferentes entre ellos ($p < 0.05$). Lo anterior se debe a la diferente susceptibilidad que los individuos poseían ante la intoxicación con el metal. La figura 11 muestra los resultados obtenidos. De la misma forma que en cerebro, la figura 11 A muestra todos los datos y la 11 B solo los de las dosis 2 a 7 más el control. El recuadro muestra los subgrupos encontrados al administrar la dosis 5.

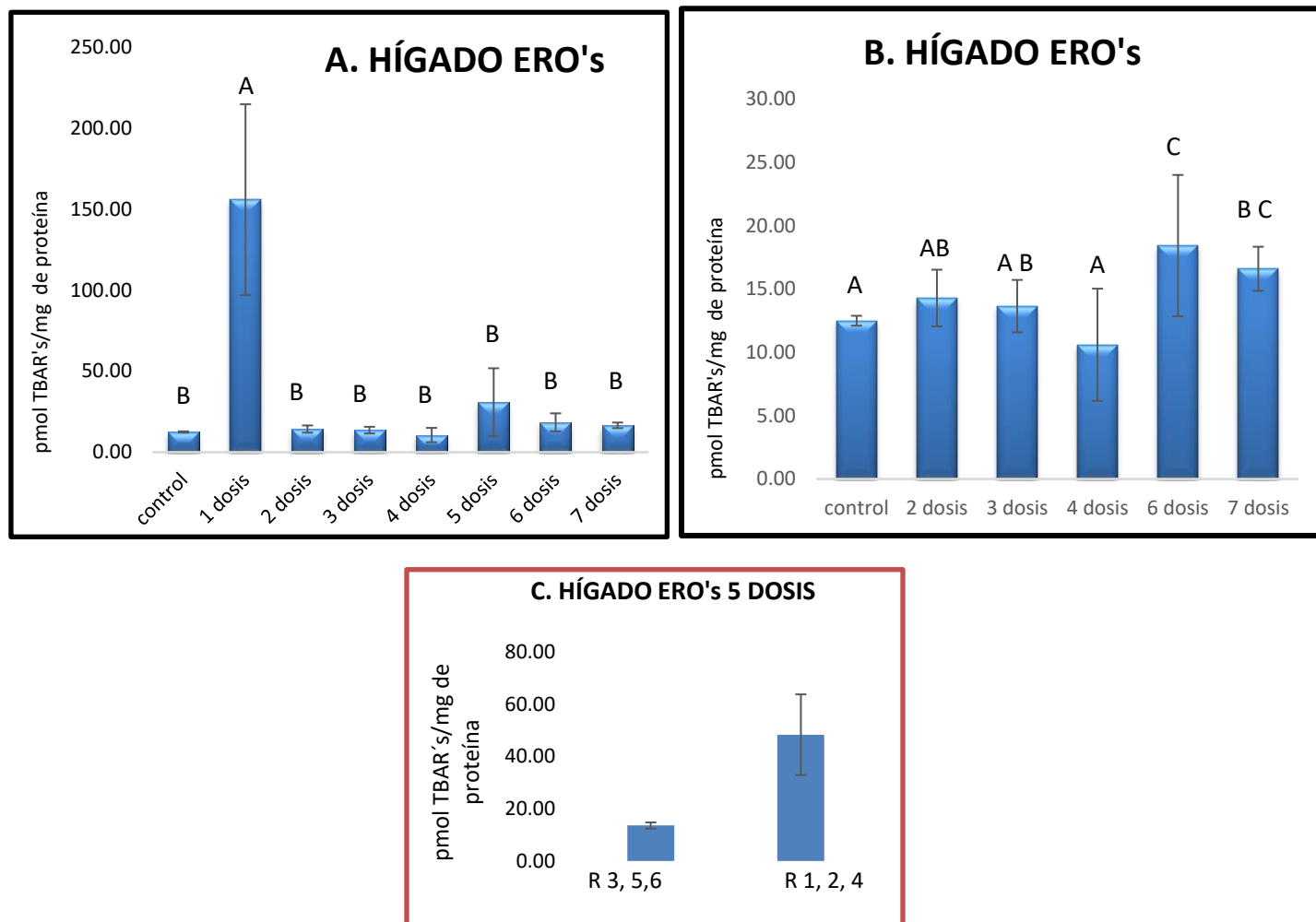


Figura 11. Especies reactivas de oxígeno en hígado de ratas expuestas a plomo vía intraperitoneal siete dosis incluyendo la dosis inicial (A) y mostrando solo el control y las dosis 2 a 7 (B), así como los subgrupos encontrados en la dosis 5 (C). (n=6).

Al realizar una búsqueda de los efectos del plomo en hígado, se encontró que el grupo de investigación a cargo de Markiewicz-Górka, en 2015, estudió los efectos de la exposición crónica a plomo y a una mezcla de metales (plomo, cadmio y manganeso) sobre el estrés oxidativo en hígado de ratas macho de la cepa Wistar. Durante 9 meses se administró vía oral una dosis diaria de 0.2 mg/L de plomo y para la mezcla se usaron las concentraciones de 0.2 mg/L (plomo), 1 mg/L (cadmio) y 2 mg/L (manganeso). Como marcador de estrés oxidativo se midieron los niveles de malondialdehído (MDA), encontrando que en el hígado intoxicado solo con plomo, los niveles fueron muy similares a los medidos en el grupo control; mientras que, en el hígado tratado con la mezcla de los metales, los niveles de MDA

incrementaron significativamente. Se encontró que la actividad de la SOD hepática fue significativamente alta en el grupo intoxicado con Pb comparado con el control, pero sin diferencia en la mezcla de los metales. Las actividades de la CAT y la GPx no tuvieron diferencia significativa entre los grupos intoxicados y control. Estos resultados fueron explicados al relacionar la función detoxificante de este órgano y por los altos niveles enzimas antioxidantes que contiene, en particular la Superóxido dismutasa y la Catalasa.

Alghazal y colaboradores, en 2008, evaluaron los efectos del plomo sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y detoxificantes en ratas macho y hembras de la cepa Wistar. Las ratas fueron intoxicadas vía oral con 100 mg y 1000 mg por litro de acetato de plomo (AcPb) durante 18 semanas. También midieron las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en riñones e hígado, como un indicador de estrés oxidativo. En el hígado se observó que los niveles de TBARS fueron bajos en comparación con el control en ratas de ambos sexos, pero solo con diferencia significativa en el grupo de 1000 mg. Además, tanto para 100 mg y 1000 mg los valores de TBARS fueron menores en machos. En cuanto el riñón, se encontró que en el grupo intoxicado con 100 mg de acetato de plomo los niveles de TBARS fueron menores a comparación con el grupo control en ratas de ambos sexos, pero solo con diferencia significativa en hembras. En el grupo de 1000 mg, los TBARS incrementaron significativamente comparado con el control en ratas macho, pero en las hembras disminuyeron, aunque sin diferencia significativa. Finalmente, los niveles de TBARS resultaron menores en machos cuando se intoxican con 100 mg de metal.

D.3 RIÑÓN

Se observó que el efecto de la primera dosis fue semejante a los dos órganos anteriores. La concentración de ERO's promedio de los riñones en el grupo control fue de 17.83 picomol, al finalizar el experimento se observó un aumento de 7.41 picomol ($p > 0.05$). Tomando como referencia al grupo control, se realizaron las comparaciones con los demás grupos y estas se describen a continuación. En la primera dosis se observó una producción de 268.32 picomol; la segunda dosis disminuyó 2.24 picomol; la tercera aumentó de forma no significativa 0.05 picomol ($p > 0.05$); la cuarta dosis disminuyó 7.77 picomol ($p < 0.05$); la quinta dosis disminuyó 2.36 picomol ($p > 0.05$); la sexta dosis aumentó 6.82 picomol ($p < 0.05$) y por último a la séptima dosis aumentó 7.41 picomol ($p < 0.05$). La figura 12 muestra los resultados obtenidos.

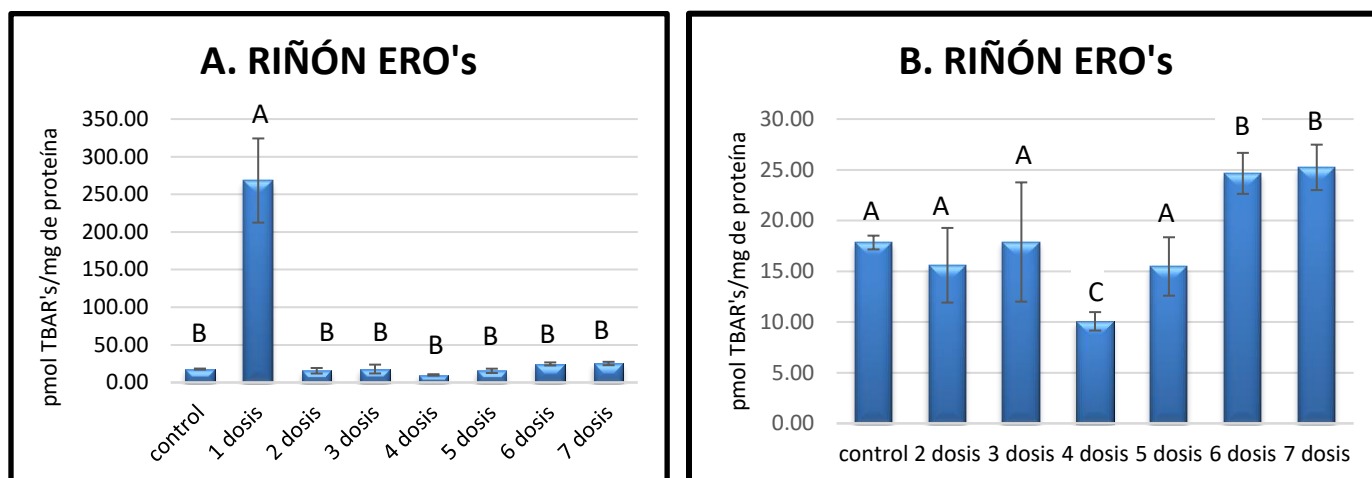
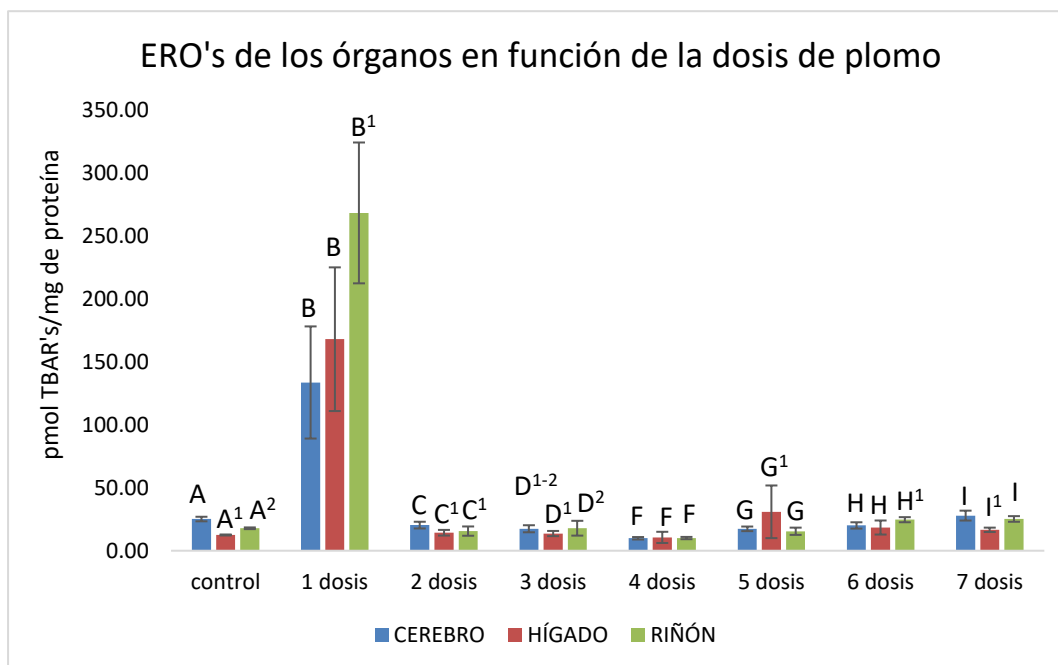


Figura 12. Especies reactivas de oxígeno en hígado de ratas expuestas a plomo vía intraperitoneal siete dosis incluyendo la dosis inicial (A) y mostrando solo el control y las dosis 2 a 7 (B) (n=6).

Berrahal y colaboradores, en 2009, investigaron los efectos de una exposición crónica a plomo sobre los riñones y el hígado de dos diferentes grupos por edad de ratas macho Wistar. Seleccionaron ratas neonatas y fueron intoxicadas con 50 mg/L de acetato de plomo vía oral desde el destete hasta cumplir la edad requerida (joven=40 días y adulto joven=65). Sus resultados mostraron que el plomo causa daño oxidativo en riñones y el hígado ya que observaron que incrementan las TBARS significativamente, además de una disminución de tioles totales y alteraciones de la actividad de la Superoxido dismutasa en ambos órganos. En las ratas jóvenes se observó que las funciones hepáticas y renales son perturbadas por la exposición a plomo. Sin embargo, en las ratas adultas jóvenes fue más evidente la nefropatía. Como conclusión, sugieren que el plomo induce una toxicidad severa en hígado y riñones, pero a la vez estos efectos pueden depender de la edad y el órgano blanco.

La gráfica 6 muestra la producción de especies reactivas de oxígeno en los tres órganos de estudio. Lo primero que resalta es que la concentración de especies reactivas de oxígeno en el cerebro, hígado y riñón es mucho mayor a la primera dosis que el resto de las mismas. Siendo el riñón con mayor concentración significativamente (268.32 pmol) que los otros órganos (168.01 pmol en hígado y 133.64 pmol en cerebro). Dejando de lado la primera dosis, el comportamiento de las especies reactivas de oxígeno desde el grupo control hasta el grupo de siete dosis se mantuvo casi igual con una tendencia aumentar casi imperceptible (desde 10.60 pmol hasta 30.92 pmol). De manera individual el órgano más afectado fue el riñón ya que aumentó 7.41 pmol desde el grupo control hasta la séptima dosis. Esto

puede deberse a que el plomo puede concentrarse en las células de los túbulos renales formando cuerpos de inclusión y/o alterar el metabolismo de las enzimas antioxidantes. En el caso de la primera dosis no se cuenta con una explicación clara, sin embargo, se piensa que pudo deberse a un efecto de carácter osmótico de tipo óxido-reducción (del Arenal-Mena, 2020) donde la primera exposición lo detonó. El efecto a partir de la dosis 2 en adelante disminuyó en relación con la primera dosis, sugiriendo que la dosis 1 ocasionó alteraciones en el metabolismo de los órganos estudiados.



Dosis	Cerebro (g ± SD)	Hígado (g ± SD)	Riñón (g ± SD)
Control	25.18 ± 1.81	12.50 ± 0.39	17.83 ± 0.68
1	133.64 ± 44.53	168.01 ± 57.06	268.32 ± 55.94
2	20.35 ± 2.67	14.29 ± 2.24	15.59 ± 3.68
3	17.45 ± 2.80	13.65 ± 2.07	17.88 ± 5.88
4	9.89 ± 0.98	10.60 ± 4.43	10.06 ± 0.91
5	17.38 ± 1.82	30.92 ± 20.91	15.47 ± 2.88
6	20.08 ± 2.51	18.43 ± 5.58	24.65 ± 2.02
7	27.90 ± 3.93	16.60 ± 1.74	25.24 ± 2.24

Grafica 6. Especies reactivas de oxígeno en cerebro, hígado y riñón de ratas Wistar macho expuestas a 7 dosis de plomo vía intraperitoneal. (n=6).

Un concepto actual del envejecimiento lo describe, como una colección de daños acumulativos en la estructura molecular y celular del organismo adulto, resultado de los procesos metabólicos esenciales, que una vez que progresan demasiado, incrementan la desorganización del metabolismo, llevando a la patología y a la muerte. Las teorías programadas desde el punto de vista genético suponen que el envejecimiento ocurre de forma predeterminada. Muchos científicos consideran que las claves de la vejez se encuentran en el ADN. En las teorías del envejecimiento no programadas genéticamente, en particular la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo, el dogma central radica en cómo durante el metabolismo aeróbico se producen incidentalmente y de forma incontrolable, especies de radicales derivadas del oxígeno, las macromoléculas se dañan irreversiblemente, daño que se acumula con el tiempo y esto resulta en una pérdida gradual de los mecanismos hemostáticos, interferencia de patrones de expresión génica y pérdida de la capacidad funcional de la célula. Las especies reactivas del oxígeno (ERO) más comunes y de mayor significación biológica son: el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, el oxígeno singulete, el radical peroxilo, el ácido hipocloroso, el óxido nítrico y el peroxinitrito. Los lípidos representan el grupo de moléculas más susceptible al daño, debido a la presencia de dobles enlaces en sus ácidos grasos. El estrés oxidativo estimula los procesos de peroxidación lipídica y conduce por tanto a la formación de hidroperóxidos lipídicos. Estos a su vez guiarán, a través de reacciones ulteriores, a la liberación de aldehídos reactivos tales como: el malonildialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE), los cuales constituyen los productos finales de la oxidación de los lípidos. Se ha demostrado que el daño oxidativo a proteínas puede ser un factor crucial en el envejecimiento, puesto que las proteínas oxidadas pierden la integridad estructural y catalítica, siendo preferencialmente hidrolizadas. El primer sistema de defensa correspondiente a las enzimas antioxidantes enzimáticas está basado en un complejo enzimático de defensa que puede incluir la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPX) y el glutatión transferasa (GST). Los antioxidantes no enzimáticos, están integrados principalmente por el glutatión reducido (GSH), vitaminas A, E, C, coenzima Q y los minerales selenio y Zinc (Ramírez, *et al.*, 2022).

Al compararse los resultados obtenidos en este trabajo con los trabajos de otros grupos de investigación se observó que no existen coincidencias debido a los modelos animales, las dosis y las vías de administración, sin embargo, todos los trabajos indican que el plomo puede aumentar las ERO's en diferentes condiciones de experimentación.

E.- ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA

Los resultados demostraron que los efectos del plomo sobre la actividad de la enzima dependieron de la dosis y del órgano estudiado. En cerebro se observó un aumento al comparar los datos obtenidos en el grupo control y el expuesto a siete dosis. En el caso del hígado y realizando la misma comparación se vio que la actividad disminuyó y en el riñón no se encontraron cambios en la actividad. Los resultados se detallan a continuación.

E.1 Cerebro. El promedio de la actividad enzimática en el grupo control fue de 5.24 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$. Al finalizar el experimento después de siete dosis, se observó que la actividad aumentó 1.5 unidades de forma significativa. Al realizar las comparaciones necesarias entre los grupos experimentales con el grupo control, se encontró lo siguiente (la significancia se muestra entre paréntesis). La primera dosis aumentó 1.57 unidades la actividad enzimática ($p < 0.05$); la segunda dosis, disminuyó 0.06 ($p > 0.05$); la tercera dosis aumentó a 0.51 ($p > 0.05$); la cuarta dosis disminuyó 0.43 ($p > 0.05$); la quinta dosis disminuyó 0.01 ($p > 0.05$); la sexta dosis produjo un aumento de 0.62 unidades y la séptima dosis el aumento de 1.5, estos dos últimos resultados fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$). La figura 13 muestra los resultados.

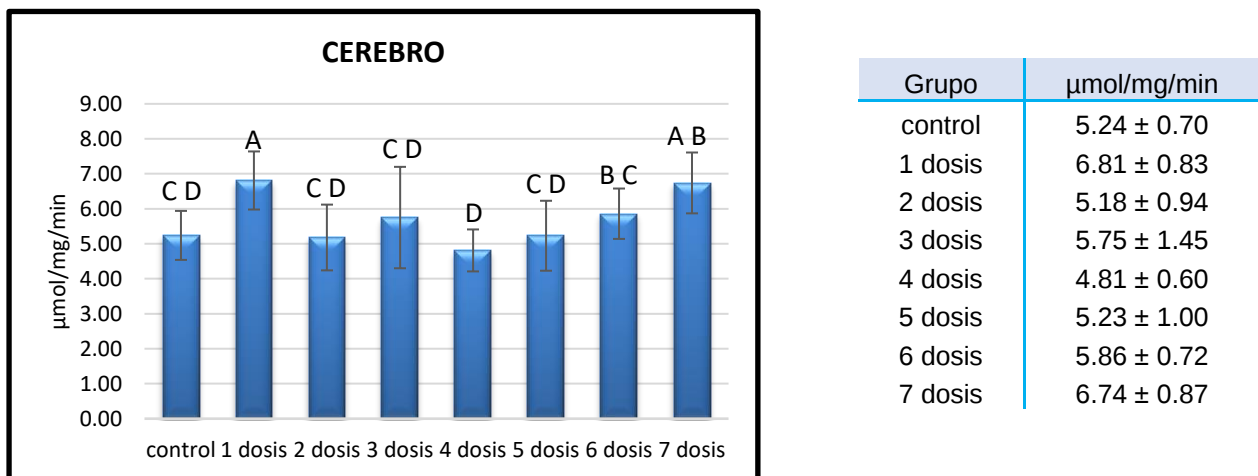


Figura 13. Actividad de la enzima Glutati3n S-transferasa de cerebro de ratas intoxicadas con plomo (n=6).

Chand en 1982 public3 el estudio sobre la toxicidad del trietil de plomo y su relaci3n con la Glutati3n S-transferasa en cerebro. Para ello se intoxicaron ratas hembra Wistar a diferentes dosis del metal v3a intraperitoneal durante tres d3as, de ellas la dosis m3s alta fue de 8 mg/kg. Como resultado se observ3 un aumento significativo de siete unidades de actividad enzim3tica. Kumar estudi3 la influencia del

acetato de plomo sobre las enzimas relacionadas con el glutatión en diferentes regiones del cerebro en ratas macho de la cepa Wistar. Las ratas fueron expuestas vía oral a una solución de 500 ppm de acetato de plomo durante 8 semanas. Se determinó la actividad enzimática de la Glutatión S-transferasa en diferentes regiones del cerebro (cerebelo, hipocampo, córtex frontal y tronco encefálico) y los resultados mostraron que al término del tiempo de intoxicación, la actividad incrementó significativamente en cerebelo, hipocampo y córtex frontal. En base a experimentos similares, varios autores han descrito que la distribución celular de las isoformas de GST puede ser específica para cada región del cerebro, explicando, así, la susceptibilidad al estrés oxidativo mediado por neurotóxicos. Ellos concluyen que el plomo podría alterar, de manera diferencial, la actividad de las enzimas asociadas al glutatión como la Glutatión S-transferasa en el cerebro (Kumar *et al.* 2009; Beiswanger *et al.* 1995; Beiswanger *et al.* 1995). Los datos obtenidos en este trabajo indican un aumento en la actividad enzimática al comparar el control con las siete dosis de exposición, pero no a las dosis intermedias, las cuales, en nuestro caso, tuvieron un comportamiento variable. En este trabajo se estudió el comportamiento de GST en función del curso de la intoxicación con el metal, sin embargo, no se encontraron referencias relacionadas o parecidas. Los animales presentaron alteraciones en su comportamiento pasando de un estado de calma a un estado alterado con caída de pelo y cabellos erizados. Lo anterior indica un efecto a nivel neuronal, buscando en la bibliografía, se encontró lo siguiente.

Se sabe que los efectos neurotóxicos de la intoxicación con plomo son complejos. Se ha reportado que el metal interfiere con algunos receptores acoplados a segundos mensajeros como la proteína cinasa C, relacionada con la liberación de neurotransmisores como acetilcolina, dopamina, noradrenalina y GABA. Se ha reportado que en animales en desarrollo el plomo produce una disminución significativa en la formación de mielina, las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, que son las primeras en estar expuestas al plomo, lo almacenan y acumulan en diferentes zonas del cerebro como la corteza parietal, el hipocampo y el cerebelo. Los astrocitos son dañados por el metal y la concentración de la proteína glial fibrilar se puede incrementar en el encéfalo de ratas expuestas a plomo en un esquema de intoxicación vía intraperitoneal empleando tres dosis de 25 mg/Kg de peso (Struzynska *et al.*, 2001). Se han reportado tres factores relacionados con la neurotoxicidad del plomo: 1) el efecto que ejerce en la liberación de glutamato; 2) la función de los receptores tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) los cuales son afectados produciendo elevada excitotoxicidad; y 3) el efecto que tiene el plomo en la producción de óxido nítrico vía la activación de la sintasa del óxido nítrico; por lo

que la formación y consolidación de la memoria y el aprendizaje se ven afectados en niños que han sufrido exposición a este metal (Nava-Ruiz, 2011).

E.2 HÍGADO

La actividad enzimática del grupo control fue de 36.83 ± 3.68 mientras que a las siete dosis se observó una actividad de 15.00 ± 2.48 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$, lo que implica una disminución de más de la mitad de la actividad. Todas las dosis de plomo ocasionaron la disminución de la actividad enzimática, de la siguiente manera. La primera dosis fue de 15.39 unidades; la segunda de 18.93; la tercera dosis de 19.72; la cuarta dosis de 11.59; la quinta dosis de 26.54; la sexta dosis de 19.5 μmol y por último a la séptima dosis disminuyó 21.83 unidades. En todos los casos las disminuciones fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). En el caso del grupo de cinco dosis se detectaron dos poblaciones. La primera conformada por tres individuos, cuya actividad promedio fue 14.34 ± 4.46 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ y tres individuos con una actividad promedio de 7.07 ± 2.03 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$. En ambos casos los resultados fueron significativamente diferentes. Los resultados se muestran en la figura 14.

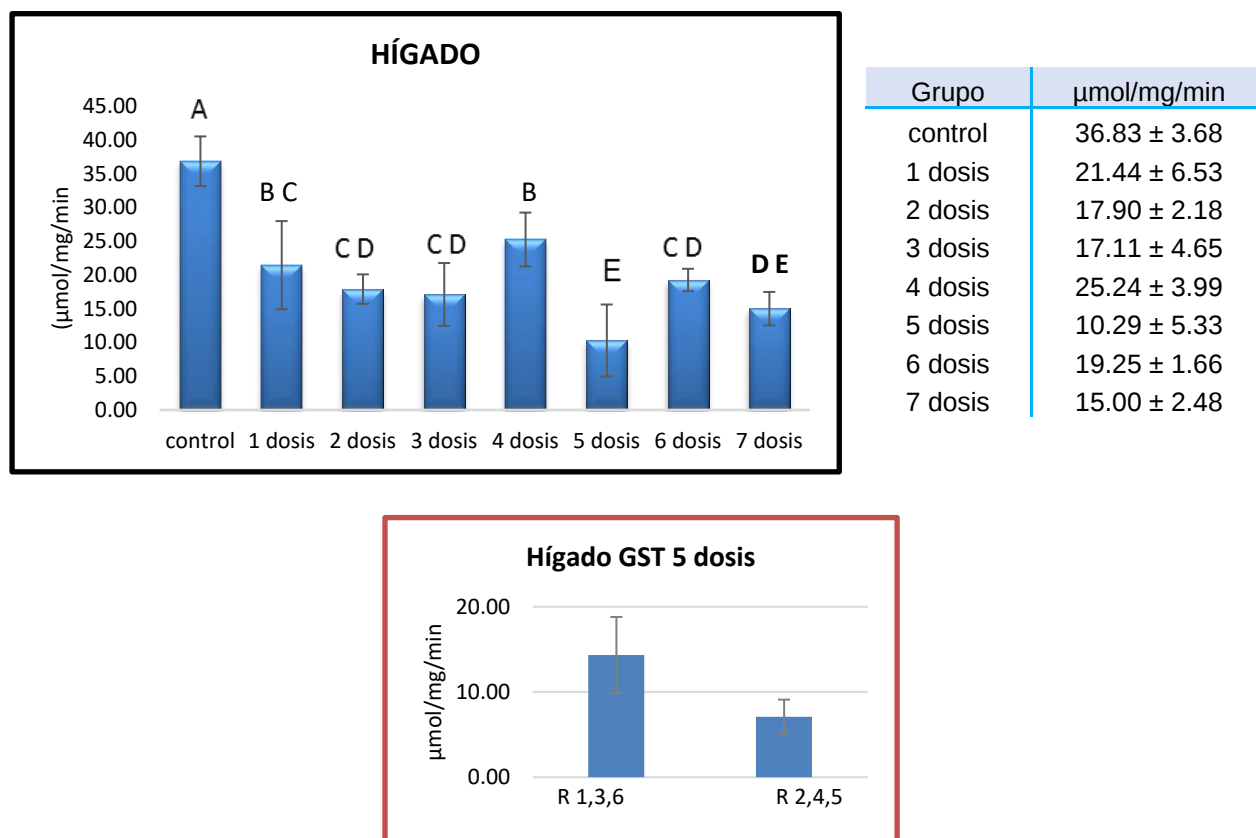


Figura 14. Actividad de la enzima Glutación S-transferasa de hígado de ratas intoxicadas con plomo ($n=6$). El recuadro muestra los subgrupos encontrados en los animales expuestos a cinco dosis.

Utilizando un esquema de intoxicación crónica vía oral, empleando dos dosis de plomo, Alghazal y colaboradores, en 2008, estudiaron los efectos del plomo sobre la actividad de algunas de las enzimas de los metabolismos antioxidante y de xenobióticos en ratas Wistar de ambos sexos intoxicados por vía oral. Se utilizaron dos concentraciones (100 mg y 1000 mg por litro) de acetato de plomo por un periodo de 18 semanas. La Glutación S-transferasa fue evaluada en los órganos riñón e hígado. Realizando el análisis de los datos, los autores pudieron determinar que la actividad de la enzima se ve más inhibida en el riñón de machos y hembras a la concentración de 100 mg. Cuando los animales fueron expuestos a 1000 mg de plomo se observó la inhibición de la actividad enzimática en ratas hembra y el aumento de la misma en ratas macho. En el caso del hígado se observó que solo existe relación entre concentración, sexo de los animales y daño a la actividad de la enzima en machos expuestos a las dos concentraciones.

Por otro lado, en 1991, Freundt e Ibrahim realizaron un estudio sobre el efecto del acetato de plomo sobre la actividad de la Glutación S-transferasa en hígado de rata Sprague-Dawley. Se utilizaron dos modelos, uno *in vivo* y otro *in vitro*. Para el primero, los animales fueron tratados con 100 ppm de acetato de plomo durante 15, 30 y 90 días vía oral. En el segundo utilizaron varias concentraciones de la sal de plomo (5, 10, 50 y 250 $\mu\text{mol/L}$). En cuanto al experimento *in vivo*, se vio que la actividad de la enzima disminuyó significativamente en los días 15 y 90 días con respecto al control (253 ± 2 vs 232 ± 2 y 255 ± 6 vs 243 ± 3 respectivamente) pero no existió cambio alguno a los 30 días. En el modelo *in vitro* se observó que la actividad de la enzima disminuyó en función de la concentración de plomo. Los investigadores propusieron, en base a sus observaciones, que los efectos inhibitorios del plomo en forma iónica sobre la actividad de la Glutación S-transferasa podrían deberse a una reacción directa del metal con los grupos sulfhidrilo presentes en la enzima.

Sheweita estudió los efectos de algunos metales pesados en los niveles de glutatión reducido y la actividad de la Glutación S-transferasa en hígado de ratón. La intoxicación consistió en aplicar una dosis única de acetato de plomo (15 mg/Kg) vía intraperitoneal y posteriormente extraer el hígado después de 1, 24 y 72 horas. La primera observación fue que los niveles de glutatión hepático disminuyeron drásticamente desde la primera hora hasta el tercer día (hasta 79% menos que el control). Por otro lado, la actividad de la Glutación S-transferasa disminuyó después de una hora hasta las 24 horas (54% menos que el control) incrementando después de las 72 horas (47% más que el control). Este estudio sugiere que los niveles de glutatión reducido se vieron afectados por la exposición al plomo, posiblemente al unirse al tripéptido y, de alguna manera, bloqueando el proceso de reducción del glutatión oxidado. En cuanto al aumento de la actividad de la enzima, ellos sugieren que podría ser un

mecanismo adaptativo de algunos tipos de células hepáticas para disminuir la concentración del tóxico, posiblemente al conjugarlo con el glutatión favoreciendo su posterior eliminación (Sheweita, 1998). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los trabajos de Freudt y Alghazal quienes reportaron una disminución de la actividad de la enzima en función de tiempo y concentración de plomo. Pero son contrarios a los de Sheweita quien reporto la disminución de la actividad de GST a las 24 horas y un aumento a las 72 en ratones. Esta diferencia indica que la especie también determina el efecto del metal en hígado.

E.3 RIÑÓN

La actividad del grupo control fue de 3.95 ± 0.43 y la del grupo expuesto a siete dosis fue de 4.00 ± 1.20 , indicando que entre estos dos grupos no hubo diferencias en la actividad. Las dosis 1, 2, 3 y 5 ocasionaron aumentos significativos ($p < 0.05$) de 3, 2.7, 1.1 y 6.9 unidades de actividad enzimática. Las dosis 4, 6 y 7 no ocasionaron el aumento significativo ($p > 0.05$) de la actividad al compararlas con el grupo control. La figura 15 muestra los resultados obtenidos.

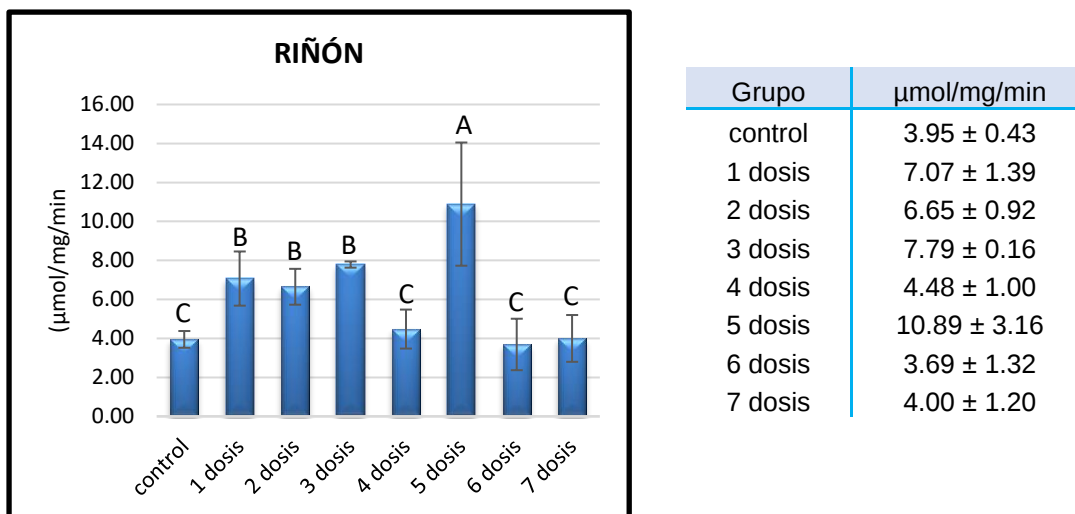
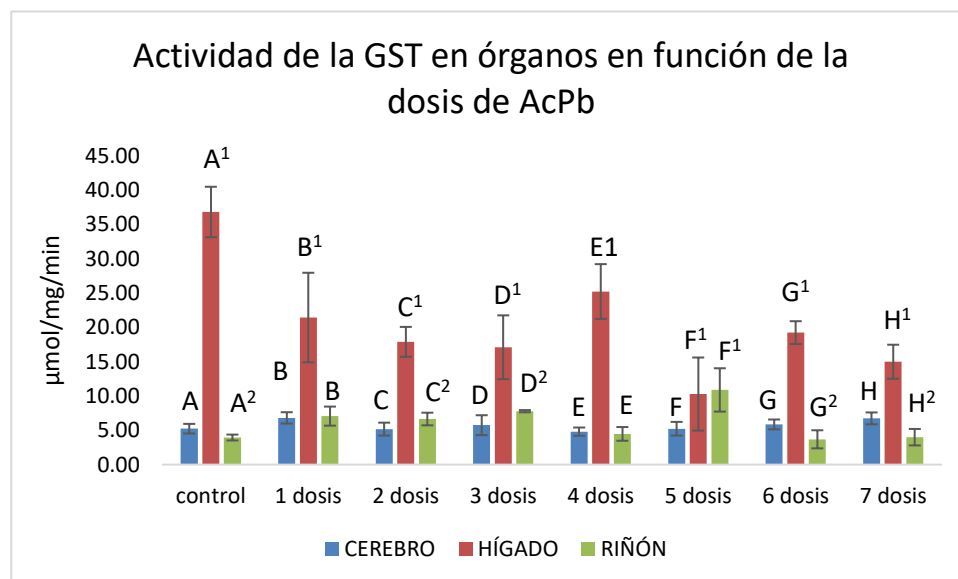


Figura 15. Actividad de la enzima Glutatión S-transferasa de riñón de ratas intoxicadas con plomo (n=6).

El equipo de investigación a cargo de Moser en 1995, estudió los efectos del plomo sobre la actividad de la Glutatión S-transferasa en riñones de ratas en desarrollo. Se formaron grupos conformados por ratas recién nacidas para cada concentración de acetato de plomo (50, 250 y 500 ppm). El tóxico fue administrado vía oral desde el inicio del periodo de lactancia hasta un mes de crecimiento. Se observó que la actividad de la enzima mostró aumentos significativos a las dosis de 250 y 500 ppm en

comparación al control. En el grupo expuesto a 500 ppm se determinó un incremento mayor que en el grupo control (280 y 124 nmol/min/mg respectivamente). Por su parte Wright realizó un estudio dosis-respuesta para determinar el efecto del plomo sobre la expresión y la actividad de la Glutación S-transferasa en riñones de ratas Sprague-Dawley. El esquema de intoxicación consistió en la aplicación de una dosis diaria (por tres días) de diferentes concentraciones de acetato de plomo (0.11, 0.38, 1.14, 3.8, 11.4, 38 y 114 mg/Kg). Al finalizar los experimentos ellos observaron que la expresión y la actividad de la enzima incrementaron en función de la concentración de plomo, sugiriendo que tanto la expresión como la actividad de esta enzima pueden constituir un biomarcador de exposición a metales como el plomo (Wright *et al.* 1998). Los resultados obtenidos en estos estudios contrastan con los de este trabajo ya que los autores encontraron aumento en la actividad de GST en función del tiempo y la concentración de forma dependiente en un esquema crónico, sin embargo, en la intoxicación aguda, este comportamiento no es el, denotando que la ruta de exposición influye en la toxicidad del metal. En la gráfica 7 se observa la actividad de la enzima en los órganos de estudio en función de la dosis de plomo. Esta indica que a cualquier concentración de plomo, la actividad de GST en hígado es mayor que en cerebro y riñón. De la misma forma, se observa que, en función de la concentración del tóxico, la actividad tiende a disminuir de forma proporcional al aumento de la concentración. En condiciones normales, la actividad de la enzima tiende a incrementar en función de la dosis en cerebro y riñón.



Grafica 7. Actividad de Glutación S-transferasa en cerebro, hígado y riñón de ratas Wistar macho expuestas a 7 dosis de plomo vía intraperitoneal. (n=6).

E.4 Orina y suero

Los fluidos como la orina y riñón tienen importancia clínica porque son muestras de alto valor diagnóstico, en ella se pueden determinar metabolitos y actividades enzimáticas que indican posibles perturbaciones en el estado de salud de los individuos. Al comparar los efectos de la exposición a plomo, se pudo observar que, al finalizar el periodo de intoxicación, en el caso de la orina la actividad bajo en relación con el grupo control. En el suero se observó que no existió cambio significativo en la actividad del grupo final de exposición al compararlo con el grupo control. Navarro y colaboradores, en 2009 demostraron que existe una relación entre la exposición crónica con plomo (7 meses) y el daño renal. De la misma forma demostraron que hay una correlación entre la actividad de GST en suero y orina en ratas expuestas al metal (Navarro *et al*, 2009). Por otro lado, Amador-Hernández y colaboradores demostraron mediante estudio quimiométrico la existencia de una correlación entre el daño oxidativo y actividad de GST en riñón de ratas expuestas a plomo en un modelo agudo (Hernández *et al*, 2013). Por lo anterior se procedió a cuantificar la actividad total de la enzima en estos fluidos.

Orina. La actividad enzimática del grupo control fue de 0.52 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$. Al final del tiempo de exposición se cuantificó una disminución significativa ($p < 0.05$) de 0.32 micromol. Dosis por dosis, los resultados fueron los siguientes: para las dos primeras dosis se registró un aumento de 0.37 unidades; la tercera dosis ocasionó un aumento de 0.38 unidades de actividad; las dosis cuatro y cinco incrementaron la actividad 0.54 y 0.25 micromol; finalmente las dosis 6 y 7 tuvieron como efecto disminuir la actividad 0.20 y 0.32 unidades. Todas las comparaciones fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$). En el caso del grupo de siete dosis, se observaron dos poblaciones ($n=4$, $n=2$) cuya actividad fue 0.14 ± 0.04 y 0.31 ± 0.09 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ respectivamente.

Suero. El promedio de la actividad de la GST en el grupo control fue de 1.03 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ mientras que al final del experimento con el grupo de siete dosis se observó una disminución de 0.16 micromol. De acuerdo con las dosis administradas, los resultados fueron los siguientes. Las seis dosis continuas ocasionaron un aumento en la actividad de la enzima, aunque solo en la segunda y quinta dosis fueron significativos ($p < 0.05$) y sus valores fueron: 0.48, 0.57, 0.31, 0.32, 1.30 y 0.43 respectivamente. La ultima dosis no ocasionó un cambio significativo en relación con el grupo control ($p > 0.05$) De la misma manera que en el caso de la orina, en el grupo de siete dosis, se observaron dos poblaciones ($n=4$, $n=2$) cuyas actividades fueron 0.59 ± 0.11 y 1.41 ± 0.21 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$.

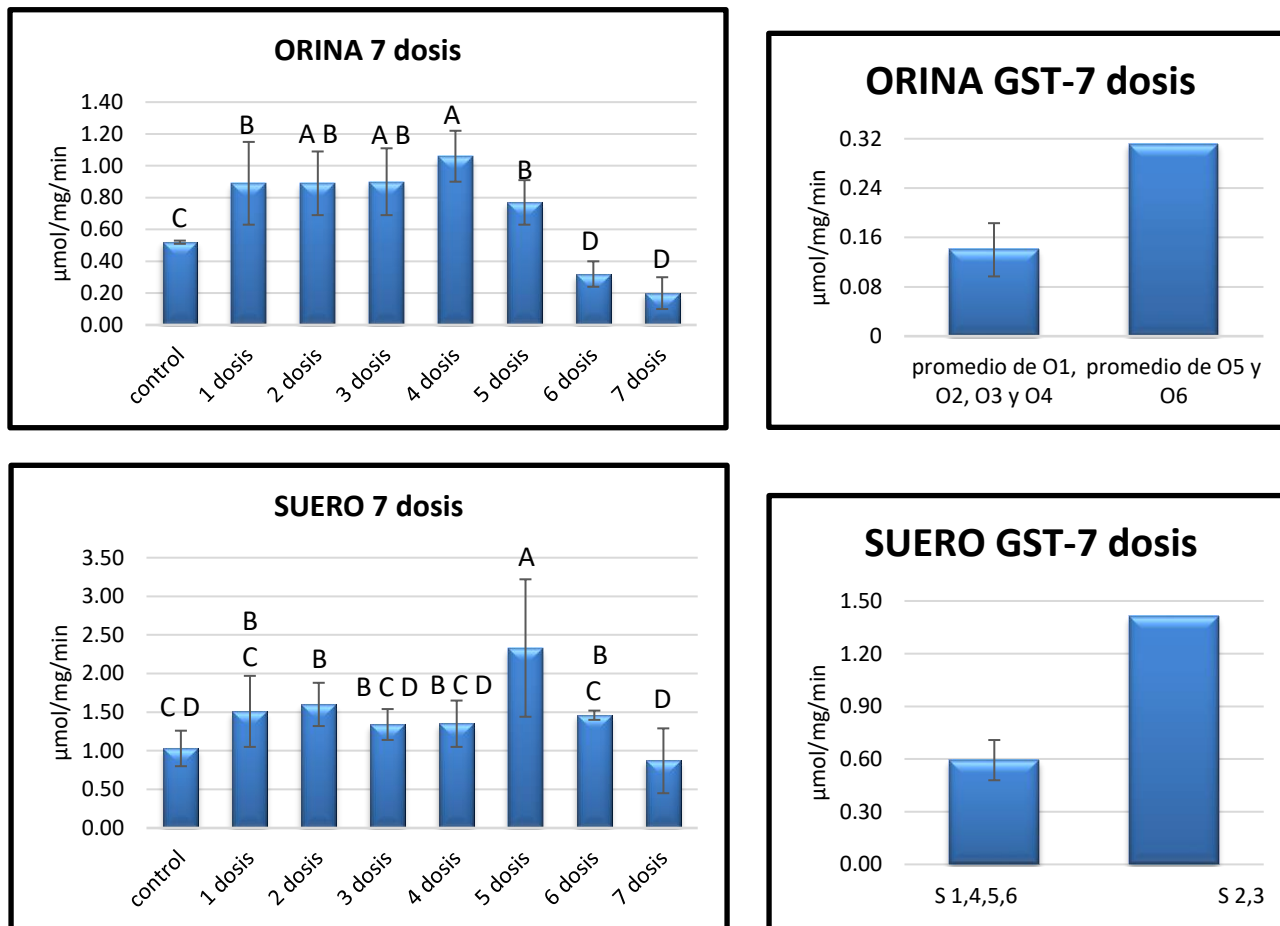
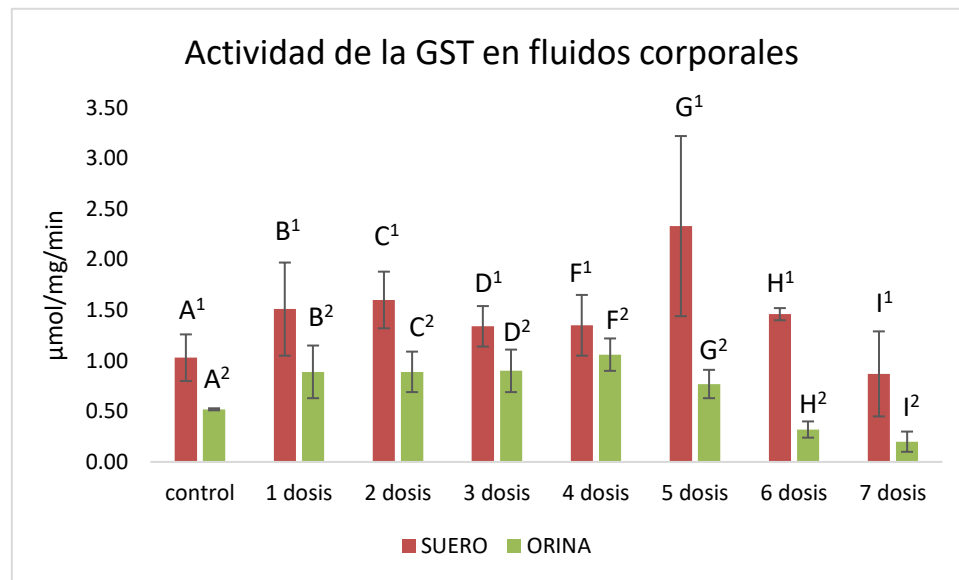


Figura 16. Actividad de la enzima Glutación S-transferasa de muestras de orina y suero de ratas intoxicadas con plomo (n=6).

La gráfica 8 muestra la comparación de la actividad de GST en muestras de orina y suero de las ratas intoxicadas con plomo en función del tiempo. La gráfica deja ver que, en todos los casos, la actividad de la GST sérica fue mayor que la de orina, aunque ambos comportamientos fueron semejantes, demostrando mayores actividades en las dosis anteriores a la última, semejando una campana de gauss.

Solo la actividad de GST en suero presenta un comportamiento similar con la determinada en el riñón. Estos resultados indican, posiblemente, daño hepático (al tener actividades de GST elevadas en suero) y renal (al observar actividades elevadas de GST urinaria) en el curso de las diferentes dosis de plomo. Este daño podría disminuir después de un tiempo, que en este caso corresponde a la séptima dosis. No obstante como perspectivas relacionadas con estas determinaciones y las anteriores se abre la posibilidad de realizar estudios en ratas con numeros mayores de dosis del metal. Relacionado con esta idea se ha reportado que α -GST y π -GST se liberan exclusivamente en la orina durante la lesión renal, lo que las ha

convertido en indicadores muy tempranos de daño tubular. En contraste, los niveles séricos elevados de α -GST probablemente se derivan del hígado durante la hepatotoxicidad y no cruzan la barrera de filtración glomerular debido a su alto peso molecular. En consecuencia, la medición de α -GST y π -GST en orina permite un enfoque diagnóstico topológico de la lesión renal debido a la expresión específica del sitio de estas proteínas en los túbulos renales (Henschler *et al*, 1995; Bruning *et al*, 2000).



Grafica 8. Actividad de Glutación S-transferasa en orina y suero de ratas Wistar macho expuestas a 7 dosis de plomo vía intraperitoneal. (n=6).

Dentro de la literatura científica se ha reportado que las GST urinarias son biomarcadores renales definidos histológicamente y bien validados, cuyos orígenes celulares son la clave para su interpretación diagnóstica. En la nefrona, las proteínas GST son específicas del sitio; la isoforma α -GST se localiza principalmente en el túbulo proximal y la π -GST en el túbulo distal. Estos biomarcadores son enzimas citosólicas preformadas y forman el 2% de la proteína soluble de los túbulos renales. En estudios *in vitro* que utilizaron células tubulares renales proximales de rata, en ausencia de daño renal, la actividad de α -GST expresada constitutivamente es baja, pero es altamente inducible tanto a nivel de ARNm como de proteína en respuesta a agentes citoprotectores, como la 3H-1,2-ditio-3-tiona, que puede proteger contra el peróxido de hidrógeno y la citotoxicidad inducida por 4-hidroxinonenal (HNE). Las GST urinarias se han propuesto como biomarcadores para el estudio de lesiones específicas del sitio en partes definidas de la nefrona. La utilidad clínica de las isoenzimas GST como biomarcadores de lesión renal se ha estudiado en una variedad de entornos clínicos, incluida la nefrotoxicidad inducida por ciclosporina, la exposición a cadmio y la

administración de antibióticos nefrotóxicos, el rechazo agudo de trasplantes, pacientes diabéticos con diversos grados de albuminuria, pacientes sometidos a cirugía vascular y cardíaca (Blaithin *et al.* 2010). Todo lo anterior sostiene la importancia de medir la actividad de GST en casos de toxicidad por metales pesados como el plomo y muchos otros compuestos tóxicos.

En relación con lo anterior Green y colaboradores en 2004 evaluaron la función renal en trabajadores expuestos a tricloroetileno de manera ocupacional. Para ello se tomaron muestras de orina de 70 trabajadores y evaluaron la actividad de varias enzimas, entre ellas la GST. Los resultados demostraron que la enzima podría ser un biomarcador de toxicidad renal inducida por este agente tóxico a concentraciones más altas.

Por otro lado, Devi en 2007 y su equipo de investigación, estudiaron el estrés oxidativo causado por los metales plomo, cadmio y níquel en trabajadores de motores de Diesel. Tomaron muestras de sangre en 100 trabajadores y midieron la actividad de la Glutación S-transferasa en suero. Observaron que la actividad de la enzima en los trabajadores fue significativamente mayor que en las personas del grupo control (no trabajadores), lo que sugirió que el incremento podría representar un mecanismo de defensa ante los metales pesados presentes en el Diesel.

Se ha realizado una amplia búsqueda de bibliografía sobre la actividad de la Glutación S-transferasa en suero y orina en organismo expuestos a metales pesados. Pero este tema no ha sido muy estudiado. Sin embargo, en una investigación realizada en la Universidad del Papaloapan en el 2015, Navarro y colaboradores propusieron la quimiometría como una herramienta para establecer correlaciones entre biomarcadores e identificar los más significativos en relación a la exposición aguda de ratas Wistar a plomo. Utilizaron parámetros bioquímicos como el contenido de proteínas, la actividad de la Glutación S-Transferasa y el análisis de orina. Se observó que el aumento de la actividad de GST en riñón fue significativamente mayor en el grupo intoxicado en comparación con el grupo control ($4.2 \times 10^{-3} \pm 4.0 \times 10^{-4}$ y $1.5 \times 10^{-3} \pm 4.0 \times 10^{-4}$ respectivamente) lo que indicó, posiblemente, una consecuencia del daño causado por la exposición a plomo. Además, la actividad enzimática en orina fue menor significativamente en ratas expuestas que en el control, mientras que en suero fue menor en las ratas intoxicadas que en ratas control. Tomando en cuenta este estudio, se puede sugerir que existe una relación entre la intoxicación con plomo y la actividad de la GST en suero y orina (Navarro & Hernández, 2015). Esta relación se conservó en todos los tiempos de medición de la actividad y, al igual que varios autores se puede decir que la actividad de la enzima en estos fluidos podría ser utilizada como un biomarcadore de toxicidad renal.

Como siguiente paso y conociendo los efectos que este esquema de intoxicación tuvo en los animales, se procedió a realizar los estudios de cinética enzimática en las muestras de los órganos de estudio en ratas control y expuestas a plomo.

F.- CINÉTICA ENZIMÁTICA

A mediados y finales del siglo XIX, la mayoría de las leyes que rigen el efecto de las concentraciones de los reactantes sobre las velocidades de las reacciones químicas eran conocidas. Sin embargo, las reacciones dependientes de las enzimas no siempre siguen estas leyes. En 1902 Víctor Henri propuso la primera ecuación útil para una reacción dependiente de la enzima. La ecuación de Henri tomó en cuenta las propiedades enzimáticas conocidas, tales como la alta afinidad enzimática por un sustrato particular (o varios sustratos), que los sustratos a menudo protegen a las enzimas de la inactivación por calor y que las gráficas de velocidad inicial contra la concentración de sustrato eran hiperbólicas (todas esas propiedades indican la participación de un complejo enzima-sustrato). Investigadores como Michaelis-Menten (1913), Van Slyke y Cullen (1914), Briggs y Haldane (1925), confirmaron y/o extendieron la ecuación de Henri (Lubert, 1995). La ecuación más utilizada en la cinética enzimática es la de Michaelis-Menten que puede expresarse de la siguiente forma:

$$V = V_{max} \frac{(S)}{(S) + K_m}$$

El estudio de los mecanismos cinéticos de enzimas y transportadores, así como el efecto de sus inhibidores y activadores sigue siendo una herramienta útil para entender mejor la naturaleza y regulación de las vías metabólicas involucradas en los procesos bioquímicos de todas las células. Para determinar las constantes cinéticas se utilizan algunos métodos de linealización como: Lineweaver–Burk ($1/v$ versus $1/S$), Eadie–Hofstee (v versus v/S), Hanes (S/V versus S) y Scatchard (v/S versus v) donde v es velocidad inicial, S la concentración de sustrato. Estos métodos se pueden aplicar a la ecuación de Michaelis-Menten $v = (V_{max} [S]) / (K_m + [S])$, para determinar la K_m y V_{max} . Además, cuando se estudia la cinética enzimática con un inhibidor presente, se podría determinar de manera general, que tipo de inhibición ocurre partiendo de las definiciones existentes: la inhibición competitiva se caracteriza por disminuir la afinidad de la enzima por su sustrato sin afectar la velocidad máxima aparente (en presencia de inhibidor). La inhibición acompetitiva disminuye la V_{max} y no afecta la eficiencia catalítica;

y la inhibición no competitiva disminuye el valor de ambos parámetros (V_{max} y V_{max}/K_m) (Lira & Jasso, 2013).

los siguientes grupos experimentales se representan como una “1 dosis”, “2 dosis” etc. Lo que significa que comprende un grupo de 6 ratas que reciben la cantidad de dosis requerida para el estudio.

F.1 Grupo control

Se determinaron los valores cinéticos de la Glutación S-transferasa utilizando concentraciones variables del sustrato 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) en los órganos de estudio. Los valores de K_m y V_{max} se obtuvieron primero realizando la gráfica concentración vs actividad y después aplicando la metodología de Hanes-Woolf.

La figura 17 muestra las gráficas de la actividad de GST en función de la concentración de DNCB en los órganos del grupo control. Se puede ver que la actividad siguió una cinética de tipo micaleana en los tres órganos y que el órgano que presentó mayor actividad fue el hígado mientras que entre el cerebro y el riñón no se observó mucha diferencia.

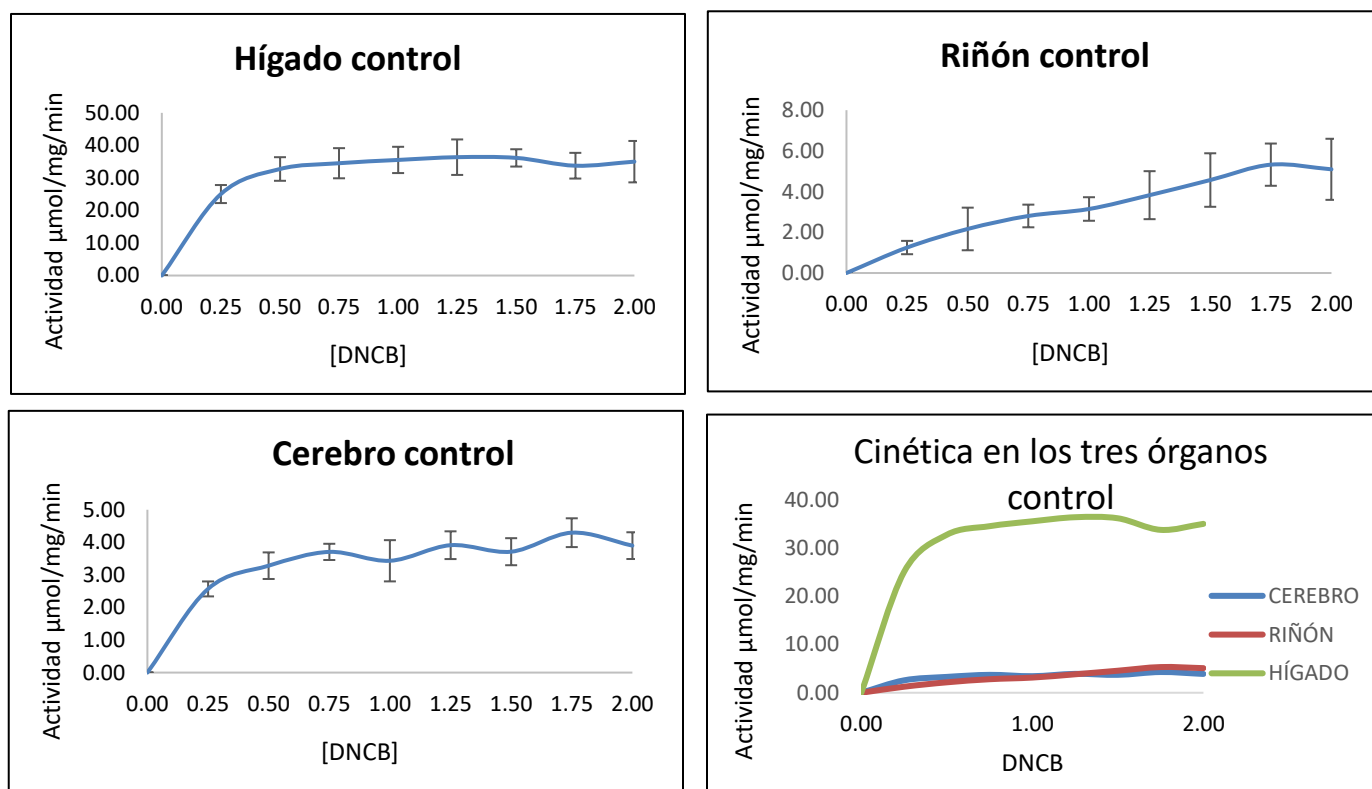


Figura 17. Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en función de la concentración de DNCB en hígado, riñón y cerebro de ratas control (n=6).

La tabla 4 muestra los parámetros cinéticos de los grupos control, obtenidos al analizar los datos por la metodología de Hanes-Woolf, la cual consiste en graficar en el eje de las abscisas la concentración de sustrato [S] y en el eje de las ordenadas, la relación [S]/V (Chieng-Tai et al, 2014).

Tabla 4. Actividad y constantes cinéticas de GST en hígado, cerebro y riñón de hígado, cerebro y riñón de ratas control (n=6).

Grupo	Km (mM)	Vmax (μmol/mg/min)	Isoforma dominante
Hígado	0.07	37.25	Alfa
Cerebro	0.18	4.36	Alfa
Riñón	1.22	7.32	Pi

Los resultados indicaron que el hígado presentó un valor de Km menor y un valor de velocidad máxima mayor en relación con los órganos cerebro y riñón. Se ha definido a la velocidad máxima como el número de centros activos de una enzima, así como la velocidad que se obtendría cuando toda la enzima se encuentre unida al sustrato. De esta manera, se sabe que la Vmax depende de dos cosas, por un lado, de la cantidad de enzima presente y por otro de su capacidad catalítica, es decir, de la velocidad con la que transforma al sustrato. Por su parte Km denota la afinidad de la enzima por el sustrato. Un valor alto de Km indica una baja afinidad y un valor bajo de Km indica una mayor afinidad (Lubert, 1995). De acuerdo con ello, la GST en hígado, bajo condiciones normales, posee una mayor afinidad por el sustrato, así como una mayor capacidad catalítica dentro de los tres órganos estudiados. Por la literatura se sabe que el mayor porcentaje de GST, en el organismo, se encuentra en el hígado, ya que es el lugar en donde se lleva a cabo de forma preferencial el metabolismo de los xenobióticos y esta enzima es integrante de la fase II del mismo. Se conoce, de la misma forma, que GST se encuentra en otros órganos y tipos celulares ya que también participa en el metabolismo oxidativo y en el metabolismo antioxidante. La tabla 4 también muestra la isoforma dominante, reportada, en cada órgano no olvidando que pueden existir varias a la vez.

F.2 Grupo expuesto a plomo.

En este caso las comparaciones se realizaron órgano por órgano para poder entender lo que sucedió tanto con la actividad como con las constantes cinéticas de GST en cada uno de ellos.

1. Hígado. La figura 18 muestra la actividad de la enzima en función de la concentración de DNCB en los animales expuestos a las diferentes dosis de plomo. De la misma manera se muestra el control.

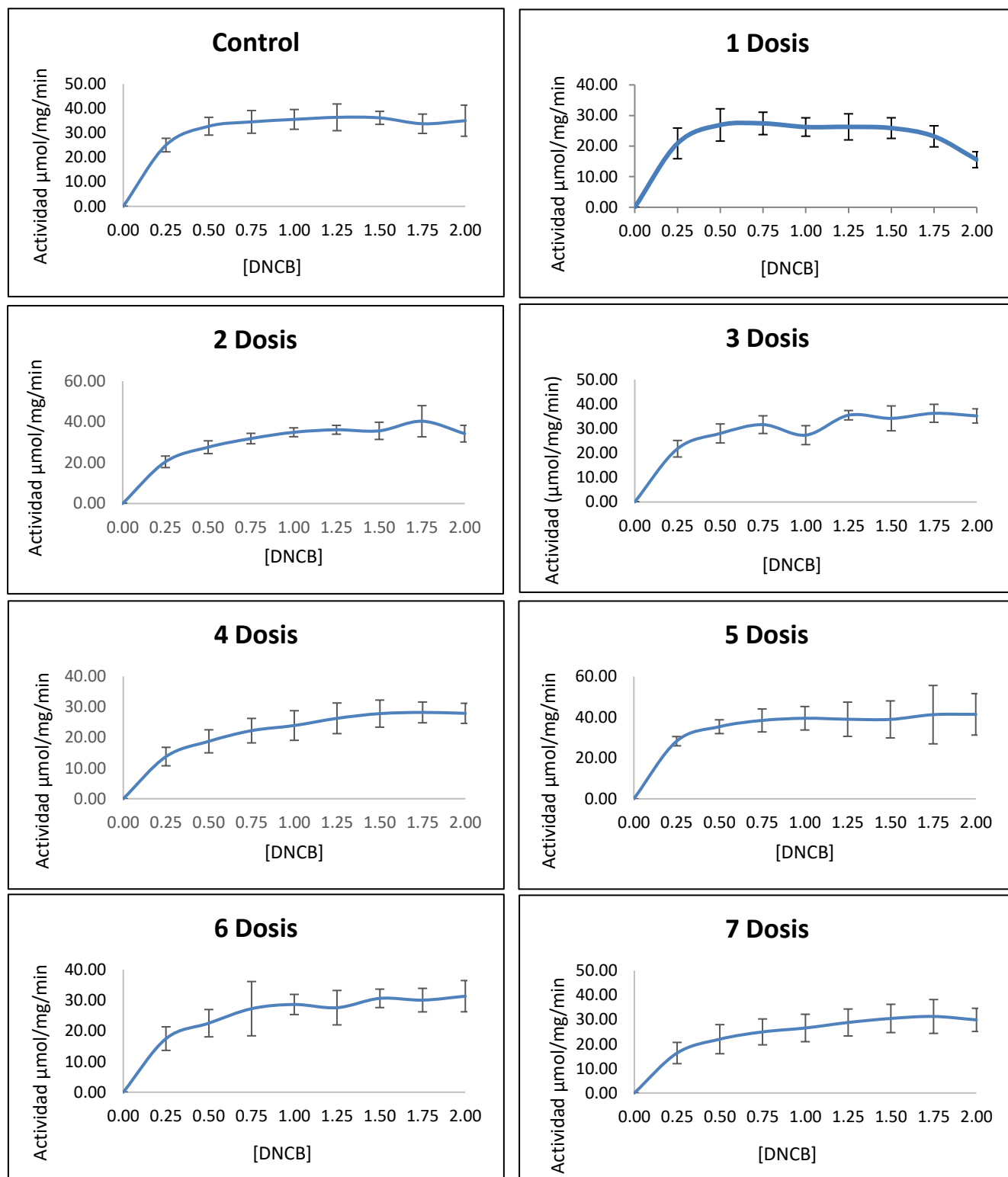


Figura 18. Actividad de la enzima glutatión S-transferasa en hígado (n=3).

Las gráficas anteriores muestran que las cinéticas obtenidas en función de la concentración de plomo muestran un comportamiento de tipo micaleano, es decir una cinética de saturación. Para observar el efecto de la exposición a plomo de forma general, se realizó una gráfica en donde se compararon todas las cinéticas. Esta se muestra en la figura 19, en donde se observa la tabla con los valores y la gráfica correspondiente.

Actividad de GST en hígado de rata								
DNCB (mM)	Control	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	Dosis 4	Dosis 5	Dosis 6	Dosis 7
0.25	25.04 ± 2.77 ^A	20.88 ± 5.02 ^A	20.44 ± 2.82	21.76 ± 3.38	13.79 ± 3.02	28.27 ± 2.27 ^B	17.52 ± 3.85	16.34 ± 4.34 ^B
0.50	32.74 ± 3.63 ^A	26.91 ± 5.27 ^B	27.60 ± 3.13	28.01 ± 3.89	18.77 ± 3.76	35.37 ± 3.38 ^A	22.55 ± 4.46	22.00 ± 5.94 ^B
0.75	34.52 ± 4.63 ^A	27.41 ± 3.66 ^B	31.85 ± 2.55	31.60 ± 3.62	22.26 ± 4.00	38.44 ± 5.63 ^A	27.30 ± 8.87	24.97 ± 5.29 ^B
1.00	35.53 ± 4.04 ^A	26.24 ± 3.01 ^B	34.92 ± 2.18	27.31 ± 3.87	23.93 ± 4.84	39.51 ± 5.76 ^A	28.67 ± 3.29	26.57 ± 5.60 ^B
1.25	36.38 ± 5.46 ^A	26.28 ± 4.26 ^B	36.15 ± 2.17	35.45 ± 1.91	26.29 ± 5.01	39.03 ± 8.39 ^A	27.62 ± 5.62	28.81 ± 5.50 ^B
1.50	36.16 ± 2.66 ^A	25.89 ± 3.37 ^B	35.62 ± 4.22	34.17 ± 5.08	27.82 ± 4.43	38.95 ± 9.07 ^A	30.67 ± 3.02	30.47 ± 5.78 ^B
1.75	33.76 ± 3.95 ^A	23.19 ± 3.44 ^B	40.34 ± 7.64	36.23 ± 3.67	28.22 ± 3.40	41.28 ± 14.32 ^A	30.10 ± 3.84	31.28 ± 6.92 ^A
2.00	35.00 ± 6.36 ^A	15.55 ± 2.60 ^B	34.25 ± 4.07	35.16 ± 2.91	27.92 ± 3.28	41.44 ± 10.17 ^A	31.38 ± 5.11	29.87 ± 4.73 ^B

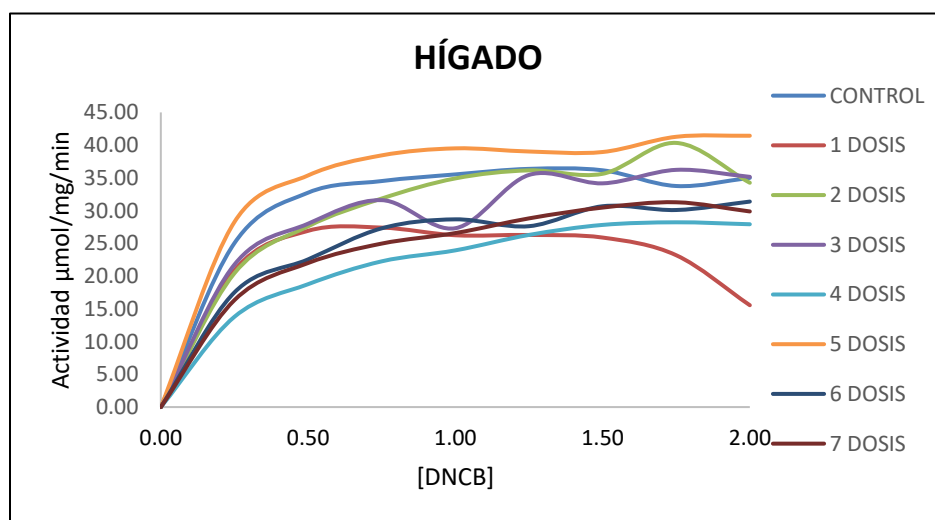


Figura 19. Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en función de la concentración de DNCB en hígado de ratas expuestas a plomo (n=3).

La figura 19 muestra que el grupo expuesto a cinco dosis posee una actividad mayor a la del grupo control pero que estadísticamente no fue significativa. La cinética de los grupos expuestos a las dosis 1, 4, 6 y 7 presentaron inhibición de la actividad en comparación con el grupo control mientras que las dosis 2 y 3 no mostraron diferencia. El grupo expuesto a la dosis 1 fue en el que la actividad enzimática

tuvo una disminución mayor y estadísticamente diferente. Lo anterior indica que como una consecuencia de la intoxicación con plomo, la actividad de GST puede ser inhidida en función de la dosis de tóxico administrada. Sin embargo, los efectos no son proporcionales a las dosis, lo cual puede reflejar, por un lado, la susceptibilidad de los animales o, por otro, alteraciones metabólicas resultantes del proceso de intoxicación.

Para cada dosis administrada de plomo se calcularon los valores de Km y Vmax y estos se muestran en la tabla 5. Los valores de Km variaron en función de la concentración de plomo, con una tendencia a aumentar, lo cual indicó que, posiblemente, la enzima estaba perdiendo su afinidad por el sustrato como consecuencia de la intoxicación con el metal, sin embargo, en la dosis 5 se observe un descenso del valor de Km el cual aumento de Nuevo en los puntos 6 y 7. Los valores de Vmax mostraron una tendencia a aumentar y disminuir en función de la dosis de plomo de una forma aleatoria sin encontrar un comportamiento lineal.

Tabla 5. Constantes cinéticas de GST en hígado de ratas control y expuestas a plomo (n=3).

Grupo	Km (mM)	Vmax (μ mol/mg/min)
Control	0.07	37.25
1 dosis	0.04	24.19
2 dosis	0.17	38.76
3 dosis	0.19	39.45
4 dosis	0.38	33.99
5 dosis	0.12	43.33
6 dosis	0.25	35.11
7 dosis	0.30	35.53

Debido a las observaciones anteriores, se graficaron los valores de Km y Vmax obtenidos en hígado en función de la dosis de plomo administrada y se obtuvieron los comportamientos observados en la figura 19. Se realizó una correlación entre los puntos y se observó que los coeficientes de correlación obtenidos fueron muy bajos, lo cual indicó que no existe un comportamiento lineal. Todo lo anterior puede estar indicando que el plomo en efecto disminuye la actividad de la enzima GST en hígado en función de la dosis de plomo administrada, observando que al final del periodo de experimentación la actividad disminuyó, Km aumentó y Vmax disminuyó en relación con el grupo control. Sin embargo, a lo largo del curso de la intoxicación no existe un comportamiento lineal en ninguno de los parámetros evaluados, de tal forma que no resulta del todo fácil determinar el tipo de inhibición ocasionada por la presencia de plomo.

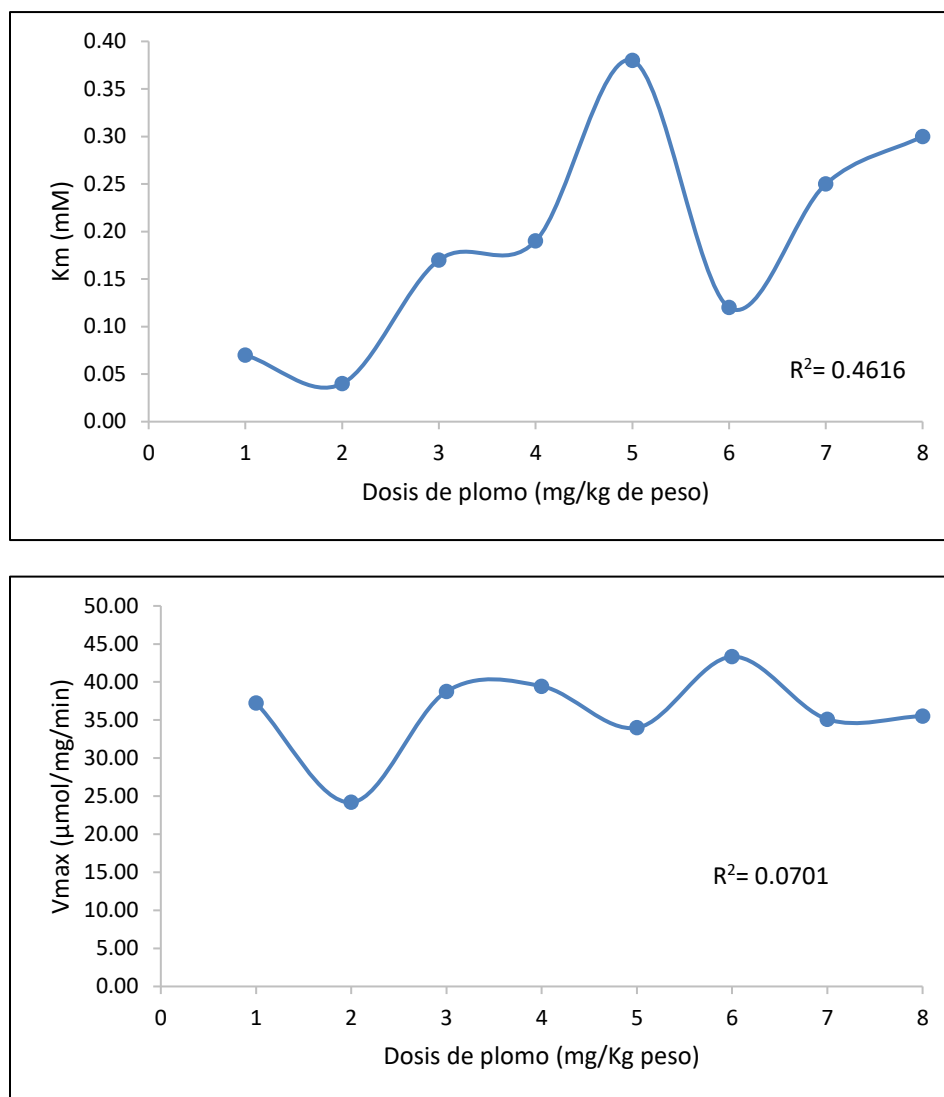


Figura 20. Km y Vmax de GST en hígado de ratas expuestas a diferentes dosis de plomo (En esta gráfica el número 1 corresponde al grupo control) (n=3).

2. Riñón. La figura 21 muestra la actividad de la enzima en función de la concentración de DNCB en los animales expuestos a las diferentes dosis de plomo.

En este caso, las gráficas mostradas en la figura 21 dejan ver que existe un comportamiento en donde no es muy clara la zona de saturación de la enzima y en el caso de las dosis 2 y 5 se observó que existe una zona de disminución muy prolongada entre los dos últimos puntos de medición. Este comportamiento es diferente al observado en el hígado. Lo anterior podría ser debido a que la forma más predominante en el riñón sea la Pi.

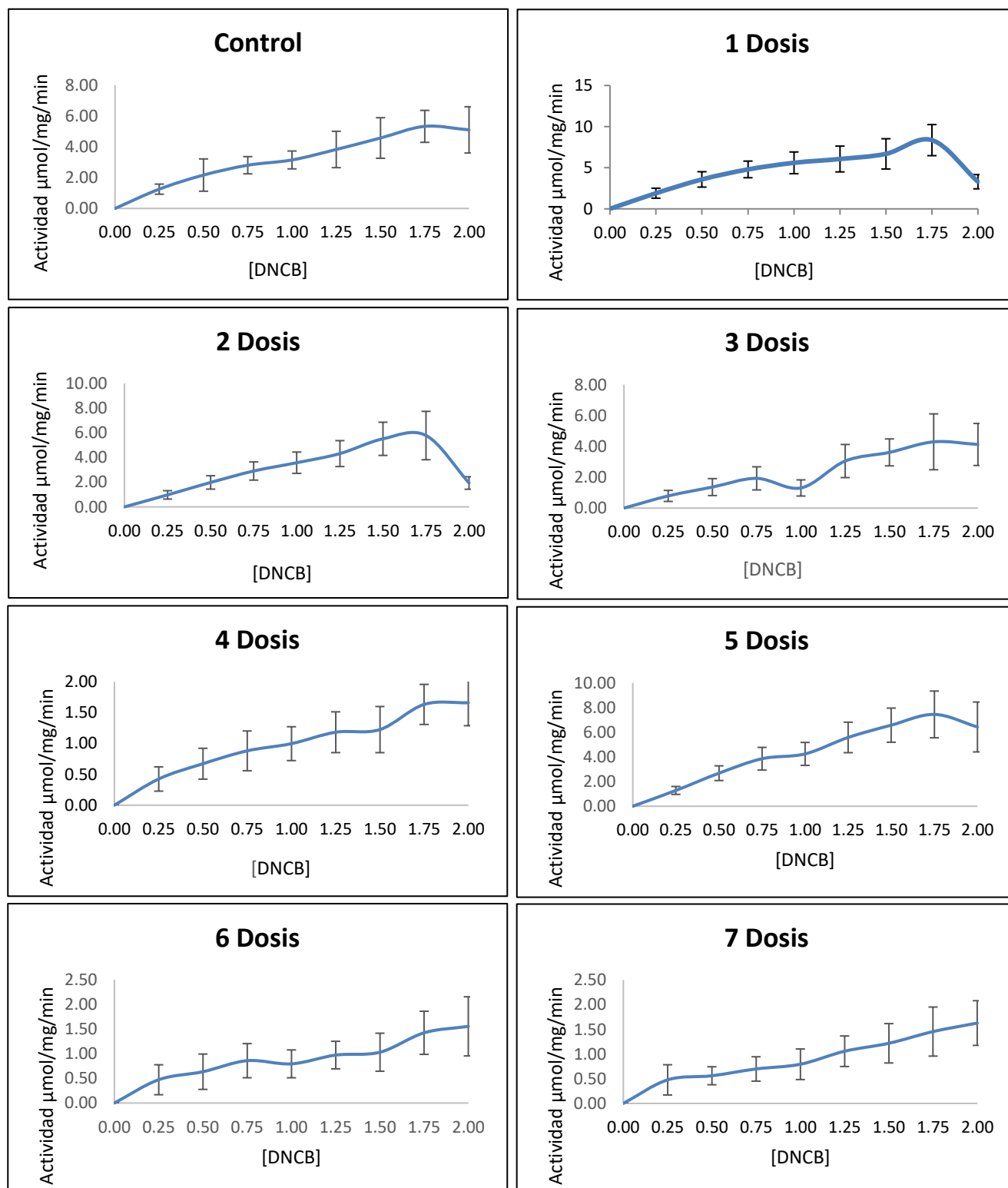


Figura 21. Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en riñón (n=3).

De la misma forma que con hígado, se realizó la comparación de la actividad de GST a las diferentes dosis de plomo administrado y los resultados se muestran en la figura 22.

Actividad GST en riñón de rata								
DNCB (mM)	Control	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	Dosis 4	Dosis 5	Dosis 6	Dosis 7
0.25	1.25 ± 0.33 ^A	1.90 ± 0.61 ^B	0.97 ± 0.34 ^A	0.79 ± 0.36 ^B	0.42 ± 0.20	1.28 ± 0.32 ^A	0.47 ± 0.30	0.48 ± 0.31
0.50	2.16 ± 1.05 ^A	3.58 ± 0.94 ^B	1.98 ± 0.54 ^A	1.36 ± 0.55 ^B	0.67 ± 0.25	2.68 ± 0.60 ^A	0.63 ± 0.36	0.56 ± 0.18
0.75	2.80 ± 0.56 ^A	4.79 ± 1.01 ^B	2.91 ± 0.74 ^A	1.93 ± 0.75 ^B	0.88 ± 0.32	3.85 ± 0.92 ^B	0.86 ± 0.35	0.70 ± 0.25
1.00	3.14 ± 0.58 ^A	5.60 ± 1.32 ^B	3.58 ± 0.87 ^A	1.31 ± 0.52 ^B	1.00 ± 0.27	4.24 ± 0.93 ^B	0.79 ± 0.28	0.79 ± 0.31
1.25	3.82 ± 1.18 ^A	6.06 ± 1.57 ^B	4.32 ± 1.05 ^A	3.05 ± 1.07 ^A	1.18 ± 0.33	5.58 ± 1.24 ^B	0.97 ± 0.28	1.06 ± 0.31
1.50	4.57 ± 1.31 ^A	6.68 ± 1.84 ^B	5.52 ± 1.35 ^A	3.61 ± 0.87 ^A	1.23 ± 0.37	6.57 ± 1.38 ^B	1.03 ± 0.39	1.22 ± 0.40
1.75	5.32 ± 1.04 ^A	8.36 ± 1.89 ^B	5.78 ± 1.96 ^A	4.30 ± 1.81 ^A	1.63 ± 0.32	7.44 ± 1.89 ^B	1.42 ± 0.44	1.46 ± 0.50
2.00	5.09 ± 1.50 ^A	3.30 ± 0.87 ^B	1.93 ± 0.51 ^B	4.13 ± 1.36 ^A	1.66 ± 0.37	6.42 ± 2.02 ^A	1.55 ± 0.60	1.63 ± 0.45

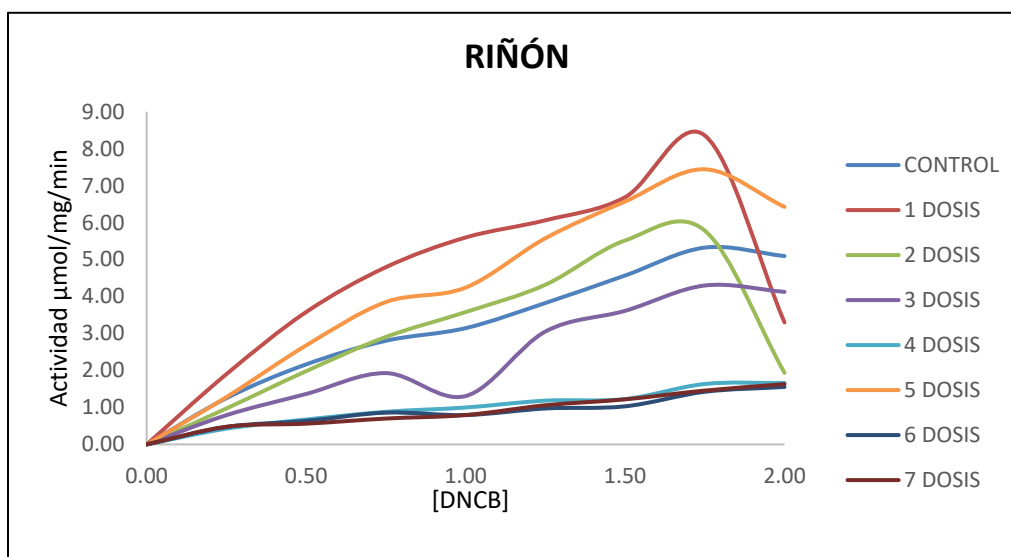


Figura 22. Actividad de la enzima Glutati3n S-transferasa en funci3n de la concentraci3n de DNCB en ri3n3n de ratas expuestas a plomo (n=3).

En relaci3n con el control, y al realizar el an3lisis estadística, se pudo observar que las dosis 1 y 5 ocasionaron el aumento de la actividad de forma significativa; la dosis 2 se comport33 igual que el control a las concentraciones iniciales de susutrato, mostrando una disminuci3n significativa en los puntos finales de la cinética. La tercera dosis no fue diferente al control en los puntos finales de la

cinética y, finalmente, las dosis 4, 6 y 7 ocasionaron una disminución significativa en relación con el control y fueron semejantes entre ellas.

La tabla 6 y la figura 23 muestran los valores de K_m y V_{max} obtenidos a partir de las gráficas y la metodología matemática elegida. Al analizar los datos se puede ver que el comportamiento de la constante de Michaelis como la V_{max} resultaron semejantes, pero no mostraron una linealidad en relación con la dosis de plomo. Se observó que hubo aumentos y disminuciones en relación con el grupo control. Al realizar las gráficas se encontraron coeficientes de relación que confirmaron la no existencia de un comportamiento lineal. Por ello no es posible indicar que tipo de inhibidor es el plomo en este órgano.

Tabla 6. Constantes cinéticas de GST en riñón de ratas control y expuestas a plomo (n=3).

Grupo	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)
Control	1.22	7.32
1 dosis	1.33	12.74
2 dosis	5.40	23.34
3 dosis	3.84	12.31
4 dosis	1.02	2.08
5 dosis	4.04	24.29
6 dosis	0.52	1.35
7 dosis	1.10	2.00

Raymundo en 2016 demostró, mediante estudios estructurales utilizando metodologías computacionales, que el plomo se puede unir a sitios con carga negativa pertenecientes a cisteínas en el sitio activo, por ejemplo la Cys 101 localizada en el monómero A de GST P1 de riñón. Sin embargo, este trabajo no reportó evidencia cinética experimental, por lo que sus afirmaciones se basaron en el hecho de proponer que el ión metálico Pb^{2+} se puede unir a sitios cargados negativamente, los cuales podrían localizarse en el sitio activo impidiendo, de esta manera, la unión del sustrato en el sitio catalítico de la enzima. Si se piensa solo en la parte estructural, se puede decir que el ión de plomo también podría unirse a cualquier sitio con cargas negativas, de tal forma que, si esta unión interfiere con la estereoquímica del proceso de catálisis, se obtendrá como consecuencia la inhibición de la actividad. El tipo de inhibición que se podría generar, entonces, se conoce como inhibición mixta.

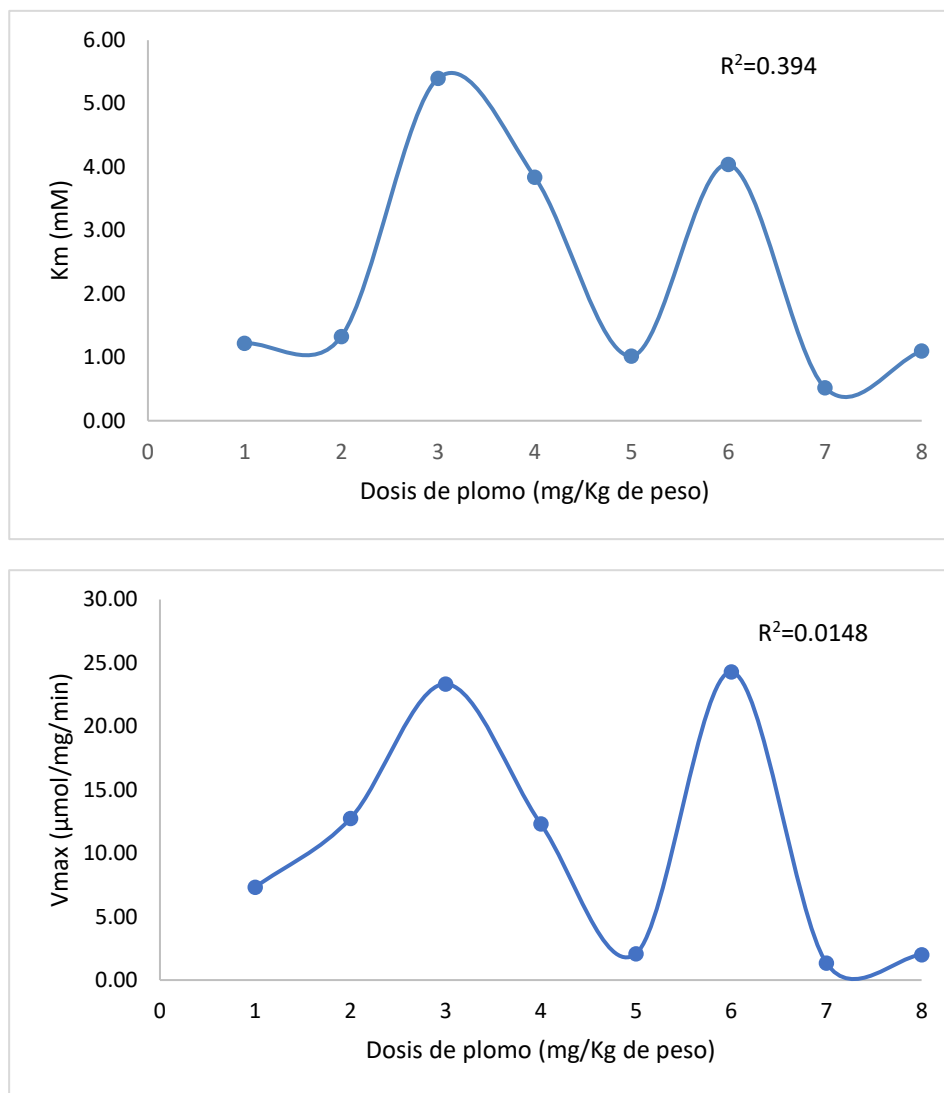


Figura 23. Km y Vmax de GST en riñón de ratas expuestas a diferentes dosis de plomo (En esta gráfica el número 1 corresponde al grupo control) (n=3).

3. Cerebro. Este es el órgano con menos velocidad máxima comparado con el hígado y el riñón. La velocidad máxima mayor registrada fue de 9.94 $\mu\text{mol/mg/min}$ y la mayor Km de 0.21 mM. La figura 24 muestra las gráficas correspondientes a cada dosis de plomo utilizada y su efecto en la actividad de GST en cerebro. Las gráficas muestran una cinética de saturación semejante a la observada en hígado.

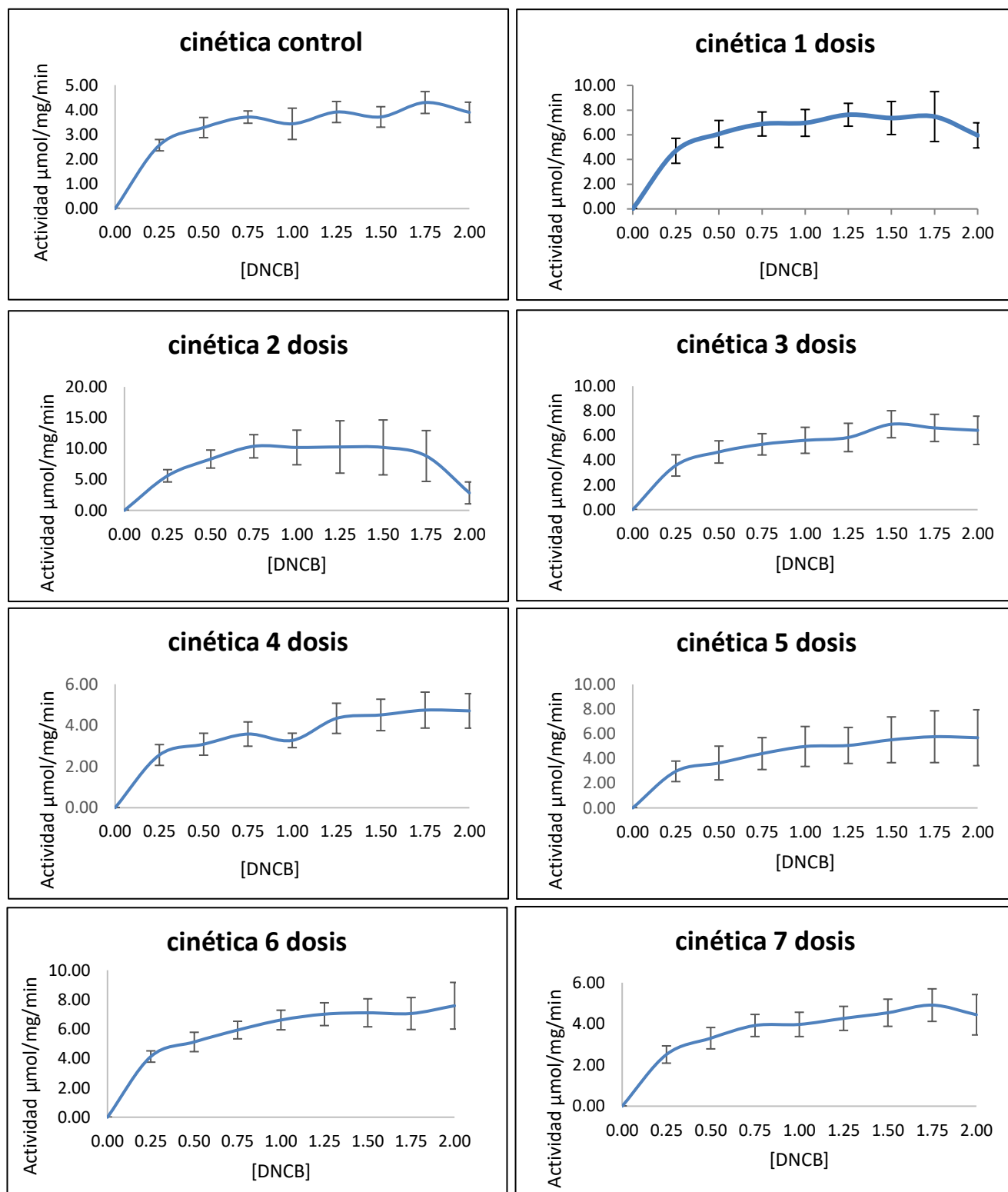


Figura 24. Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en cerebro (n=3).

Al graficar las cinéticas juntas, se obtuvieron los datos que se muestran en la figura 25. Las dosis 4, 5 y 7 mostraron un comportamiento significativamente similar al grupo control. Las dosis 1, 2, 3 y 6 ocasionaron un aumento significativo en la actividad de la enzima, mientras que la dosis 2 presento un aumento notorio hasta la dosis de 1.75 mM de DNCB. A 2 mM la actividad disminuyó drásticamente. Lo anterior muestra que en el cerebro, el efecto de la exposición a plomo es diferente al de los dos órganos anteriores ya que mostró aumento mayoritarios de actividad (en diferentes proporciones) en lugar de las disminuciones observadas en hígado y riñón.

Actividad GST en cerebro de rata								
[DNCB]	Control	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	Dosis 4	Dosis 5	Dosis 6	Dosis 7
0.25	2.57 ± 0.23 ^A	4.71 ± 1.01 ^B	5.60 ± 1.00	3.58 ± 0.86 ^B	2.56 ± 0.51	2.96 ± 0.83 ^A	4.13 ± 0.38	2.51 ± 0.42
0.50	3.28 ± 0.41 ^A	6.07 ± 1.09 ^B	8.31 ± 1.46	4.68 ± 0.90 ^B	3.09 ± 0.53	3.64 ± 1.37 ^A	5.12 ± 0.66	3.30 ± 0.52
0.75	3.71 ± 0.25 ^A	6.88 ± 0.97 ^B	10.38 ± 1.88	5.29 ± 0.86 ^B	3.58 ± 0.59	4.40 ± 1.29 ^A	5.93 ± 0.60	3.92 ± 0.54
1.00	3.43 ± 0.63 ^A	6.97 ± 1.08 ^B	10.19 ± 2.81	5.62 ± 1.05 ^B	3.27 ± 0.35	4.98 ± 1.62 ^B	6.61 ± 0.67	3.97 ± 0.59
1.25	3.91 ± 0.43 ^A	7.63 ± 0.92 ^B	10.28 ± 4.24	5.85 ± 1.15 ^B	4.34 ± 0.73	5.06 ± 1.46 ^A	7.01 ± 0.77	4.27 ± 0.58
1.50	3.71 ± 0.42 ^A	7.36 ± 1.34 ^B	10.20 ± 4.45	6.92 ± 1.09 ^B	4.51 ± 0.76	5.52 ± 1.85 ^B	7.10 ± 0.95	4.54 ± 0.66
1.75	4.30 ± 0.44 ^A	7.48 ± 2.02 ^B	8.81 ± 4.12	6.62 ± 1.10 ^B	4.74 ± 0.87	5.77 ± 2.10 ^A	7.05 ± 1.09	4.91 ± 0.79
2.00	3.90 ± 0.41 ^A	5.96 ± 1.02 ^B	2.83 ± 1.77	6.43 ± 1.15 ^B	4.71 ± 0.84	5.69 ± 2.26 ^A	7.58 ± 1.59	4.44 ± 0.98

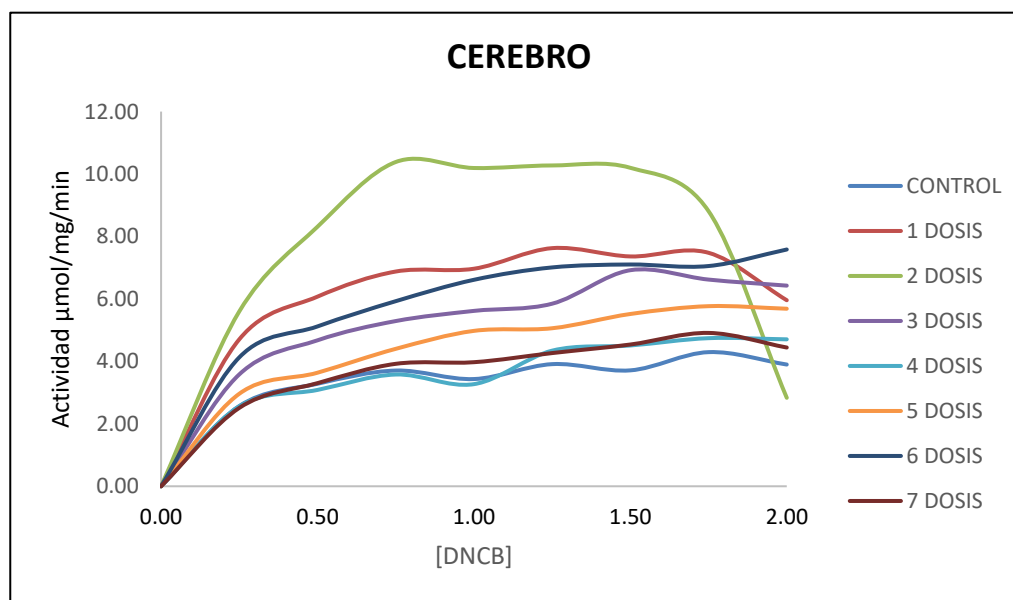


Figura 25. Actividad de la enzima Glutathión S-transferasa en función de la concentración de DNCB en cerebro de ratas expuestas a plomo (n=3).

La tabla 7 y la figura 26 muestran los valores de Km y Vmax obtenidos en función de la dosis de plomo. En relación con la Km, se observó que hasta la dosis 6 el comportamiento fue lineal en relación con las dosis de tóxico, sin embargo, a partir de ese punto, el valor fue disminuyendo. La Vmax mostró puntos de subida y bajada, lo cual indica que no presentó un comportamiento lineal. Las gráficas muestran los valores de correlación obtenidos, los cuales indican que no existe una relación entre los valores de Km y Vmax con la dosis de plomo utilizada.

Los resultados mostrados en los tres órganos corresponden a estudios realizados in vivo, es decir muestran el efecto que el plomo ocasionó en los órganos de estudio al ser administrado a los animales por vía intraperitoneal. Durante el curso de una intoxicación, muchos son los factores que pueden estar involucrados en los efectos que se ocasionan en los diferentes órganos y sistemas y de forma puntual en las células que los conforman. Los tres órganos estudiados corresponden a los más dañados durante el curso de una intoxicación con plomo, los tres poseen estructuras, funciones y células diferentes, así como contenidos de enzimas variables. En relación con la GST, se ha reportado la existencia de varias isoformas en los diferentes órganos. Los resultados observados pueden indicar posibles diferencias en la susceptibilidad de las isoformas de hígado, riñón y cerebro. No obstante, se observó que la actividad enzimática fue alterada en los tres órganos como consecuencia de la exposición al xenobiótico. Los valores de Km y Vmax no siguieron un comportamiento que permitiera clasificar el tipo de inhibición del plomo como competitivo o acompetitivo, por lo cual se podría sugerir que por lo menos en hígado y riñón la inhibición sea de tipo mixta, mientras que en cerebro, el efecto del plomo fue la inducción de la actividad enzimática.

Tabla 7. Constantes cinéticas de GST en cerebro de ratas control y expuestas a plomo (n=3).

Grupo	Km (mM)	Vmax (μ mol/mg/min)
Control	0.18	4.36
1 dosis	0.18	8.33
2 dosis	0.22	12.12
3 dosis	0.30	7.48
4 dosis	0.37	5.62
5 dosis	0.40	6.89
6 dosis	0.32	8.74
7 dosis	0.25	5.10

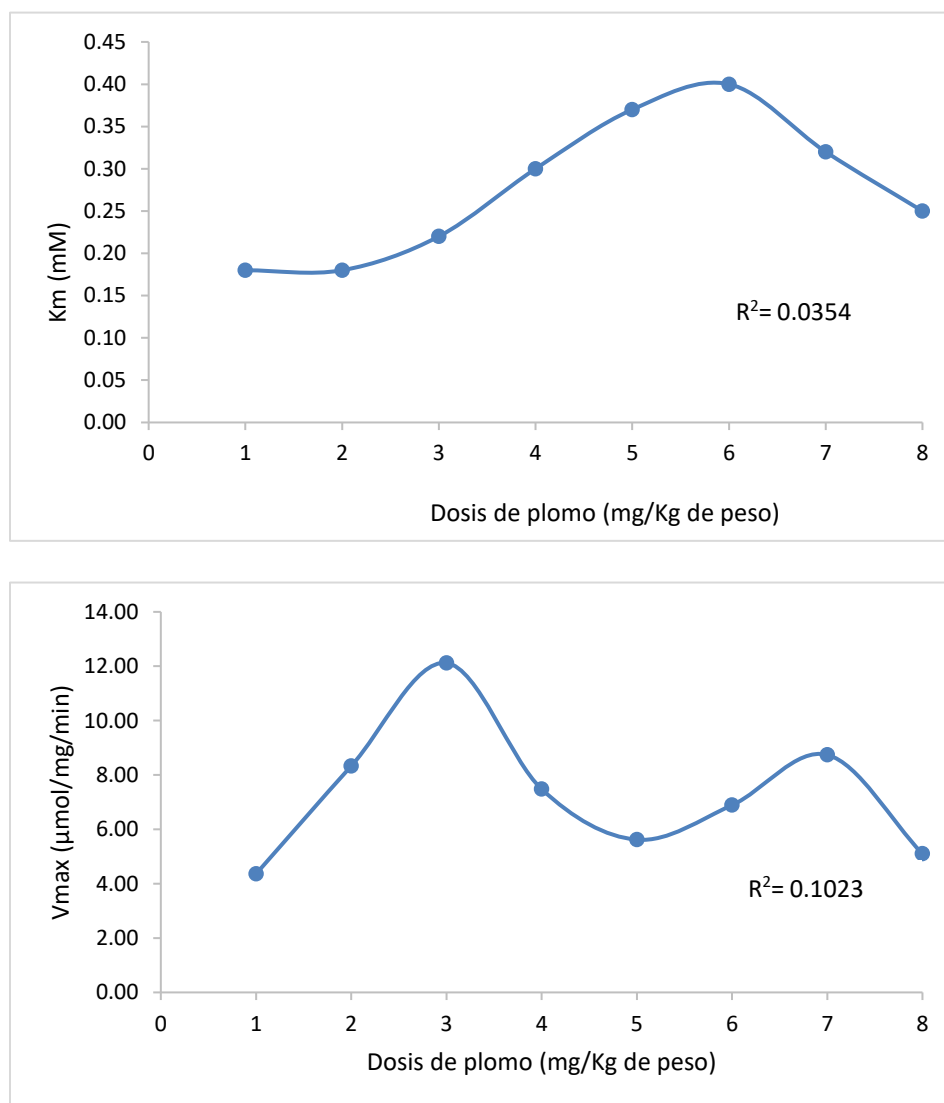
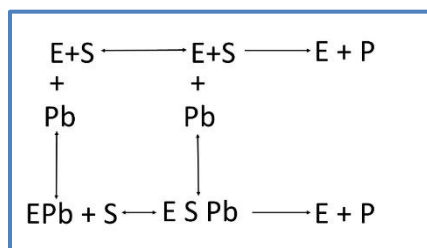


Figura 26. Km y Vmax de GST en cerebro de ratas expuestas a diferentes dosis de plomo (En esta gráfica el número 1 corresponde al grupo control) (n=3).

Debido a los resultados obtenidos, del efecto del plomo en la cinética enzimática y de los valores de la Km y Vmax de la GST, sugerimos que el metal podría ejercer una inhibición tipo mixta en los órganos hígado y riñón. Para poder dar a entender la idea y poder explicar los resultados observados proponemos el siguiente modelo.



Modificado de Lira y Jasso, 2013.

En una medida asombrosamente grande las enzimas son responsables de nuestra salud. Los bioquímicos las han descrito como la “mano de obra del cuerpo” o la “energía vital” de todos los organismos. A pesar de ello, por algunos años la medicina les prestó una atención limitada a esos componentes vitales de los diferentes seres vivos. Debido a los avances tecnológicos, ha resurgido nuevamente el interés por las enzimas en el ámbito del diagnóstico y tratamiento médico, así como otras aplicaciones. En el presente, la importancia predominante de algunas enzimas en medicina reside en la determinación de sus niveles o actividades como medio de diagnóstico en muestras como sangre, orina, líquidos corporales o tejidos. En el diagnóstico se ha logrado un gran progreso gracias a que se dispone de una gran variedad de enzimas puras y estables y al mismo tiempo se cuenta con equipos y técnicas altamente sofisticadas para los ensayos enzimáticos. Debido a estas razones, el equipo de trabajo ha encontrado la importancia de la enzima Glutación S- Transferasa como una proteína de interés ante los efectos de la intoxicación con metales pesados y su posible rol como un biomarcador de daño (López *et al.* 1995), sin embargo se debe considerar que las enzimas son proteínas que tiene una actividad catalítica la cual depende de factores como la temperatura, la concentración de sustratos, la necesidad de cofactores orgánicos e inorgánicos que facilitan su actividad, el pH y el ambiente que las rodea. Cuando una enzima se enfrenta a factores estresantes endógenos o exógenos su actividad puede ser alterada de dos formas, por un lado, puede aumentar o por el otro, puede disminuir. Todo lo anterior también se complica cuando se tiene el caso de familias de enzimas, las cuales se encuentran dentro de los órganos en proporciones diferentes y muestran características propias como la sensibilidad a los agentes tóxicos endógenos o exógenos, por lo cual el efecto de éstos variará en función del órgano al que afecten y la respuesta celular que pueda ser desencadenada ante su presencia.

9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

En ratas no expuestas a plomo el peso corporal y el peso de los órganos en las ratas aumentaron de manera significativa en función del tiempo. La presencia de especies reactivas de oxígeno aumentó en función de la edad y del órgano en estudio, siendo el cerebro y el riñón los que presentaron mayor concentración de estas especies. Al llegar a la etapa adulta los animales presentaron algunos problemas ligeros en riñón dentro del intervalo de la normalidad. En relación con la actividad de la enzima, ésta aumentó en función de la edad en cerebro, riñón e hígado. Todo lo anterior podría deberse a los procesos metabólicos que cursan los animales y que son función de la edad.

En presencia de plomo el peso corporal y el peso de los órganos variaron en función de la dosis, con variaciones en algunos grupos en donde se pudieron ver aumentos o disminuciones que no siguieron un comportamiento lineal. Lo anterior resulta normal al tener en cuenta que el trabajo tuvo como modelo un ser vivo, el cual está sujeto a cambios metabólicos inducidos frente a procesos de estrés ambiental, la edad, el sexo, los factores nutricionales y los procesos de susceptibilidad individual. Sin embargo, los cambios sí pudieron distinguirse. A comparación con el grupo de animales crecidos en ausencia del tóxico, los animales expuestos a plomo presentaron alteraciones relacionadas con infecciones y daño tubular.

El efecto de los iones metálicos en las macromoléculas biológicas depende de la estructura de las mismas y por lo tanto la afinidad por diferentes ligandos. El plomo tiene la capacidad de inhibir la actividad de muchas enzimas, sin embargo y en relación con la GST no se sabe qué tipo de inhibición ejerza sobre esta proteína. No obstante, dentro de este grupo de investigación se ha determinado que el metal se puede unir a sitios ricos en cisteínas en la GST Pi de riñón. Lo anterior ha sido determinado de forma teórica. Experimentalmente, en este trabajo se comprobó que lo anterior reflejó solo una parte de los estudios necesarios para entender el efecto del plomo en la GST de los órganos cerebro, hígado y riñón. La enzima presenta diferentes isoformas e isoenzimas en función del órgano en el que se encuentre y por lo tanto los daños dependerán, además de ello, de factores del organismo y del agente tóxico. El daño oxidativo ocasionado por el metal fue mayor a la primera dosis reflejando, posiblemente, un problema de tipo osmótico y una respuesta celular al mismo, después de esa dosis el comportamiento varió en función del órgano y la dosis. Al final de la intoxicación en cerebro no se observó un cambio significativo mientras que en hígado y riñón hubo incremento de especies reactivas de oxígeno.

Las enzimas cuentan con una estructura diseñada para ser el centro de acción de su actividad. Se debe recordar que al final de una reacción metabólica, las enzimas no sufren alteración en su estructura, recobrando su conformación inicial. No obstante, existen un grupo de moléculas que pueden actuar

como inhibidores de las enzimas. La inhibición dependerá de que tan estéricamente afín sea el inhibidor con el sitio activo. Ellos originarán dos tipos principales de inhibición, la competitiva (en donde el inhibidor es estructuralmente parecido al sustrato) y la no competitiva (en donde el inhibidor no es parecido estructuralmente al sustrato). En estos casos los diferentes inhibidores pueden ser identificados al obtener las constantes cinéticas de las enzimas. La constante de Michaelis (K_m) representa la afinidad de la enzima por el sustrato y la velocidad máxima (V_{max}) la capacidad con la cual la enzima transforma al sustrato en producto.

El plomo, bajo un esquema agudo utilizando una sal orgánica de plomo e intoxicando a los animales mediante la administración intraperitoneal del tóxico, podría ejercer un tipo de inhibición mixta en los órganos hígado y riñón.

PERSPECTIVAS

- 1.- Determinar la concentración de plomo en tejidos y fluidos de ratas intoxicadas con plomo en un esquema agudo.
- 2.- Estudiar la actividad enzimática de la Glutación S-transferasa, especies reactivas de oxígeno en cerebro, hígado y riñón de ratas en etapa de adulto mayor a 90 días.
- 3.- Realizar la cinética enzimática de la Glutación S-transferasa en cerebro, hígado y riñón de ratas intoxicadas con plomo de manera crónica.
- 4.- Realizar la cinética enzimática de la Glutación S-transferasa en cerebro, hígado y riñón de ratas intoxicadas en un esquema agudo con otros metales pesados.
- 5.- Determinar la constante de inhibición K_i a diferentes concentraciones de plomo en modelos *in vivo* e *in vitro*.

10. REFERENCIAS

Abdel-Moneim, A. Mohamed, A. & Al-Quraishy, S. (2011). The Redox Status in Rats Treated with Flaxseed Oil and Lead-Induced Hepatotoxicity. *Biological Trace Element Research*, 143, pp. 457-467.

Abdel-Moneim, A. (2016). *Indigofera oblongifolia* Prevents Lead Acetate-Induced Hepatotoxicity, Oxidative Stress, Fibrosis and Apoptosis in Rats. *PLOS ONE*, 11(7), e0158965.

Adonaylo, V. & Oteiza, P. (1999). Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidativ damage in rat brain. *Toxicology*, 135, pp.77-85.

Alabarse, P. Salomon, T. Medeiros, T. Hackenhaar, F. Schüller, A. Ehrenbrink, G. & Benfato, M. (2011). Oxidative stress in the kidney of reproductive male rats during aging. *Experimental Gerontology*, 46, pp.773-780.

Alghazal, M. Lenártova, V. Holovska, K. Sobeková, A. Falis, M. & Legáth J. (2008). Activities of antioxidant and detoxifyng enzymes in rats after lead exposure. *Acta Vet. BRNO*, 77, pp.347-354.

Allocati, N. Federici, L. Masulli, M. & Di Ilio, C. (2009). Glutathione transferases in bacteria. *The FEBS Journal*, 276(1), pp.58-75.

Allocati, N. Masulli, M. Di Ilio, C. & Federici, L. (2018). Glutathione tranferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, 7(8), pp.1-15.

Amjad, Z. Iqbal, M. & Shoro, A. (2013). Lead-induced reduction in body and kidney weight of wistar albino rats ameliorated by Ginkgo biloba extract. *Biochemistry & Physiology*, 2, p.113

Arbeláez, M. & Campuzano, G. (2007). El uroanálisis: Un gran aliado del médico. *Revista Urología Colombiana*, XVI(1), pp.67-92.

Arispe, Melany. Callizaya, L. Marianela, K. Yana, L. Adriana, A. Mendoza, M. Mixto, J. Valdez, B. Mendoza, E. Magariños, L. & Walter, B. (2019). Importancia del examen general de orina, en el diagnóstico preliminar de patologías de vías urinarias renales y sistémicas, en mujeres aparentemente sanas. *REVISTA CONCIENCIA*, 1(7), pp.93-101.

Armstrong, R. N. (1997). Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases. *Chemical Research in Toxicology*, 10, pp.2-188.

Armstrong, R. N. (1991). Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chemical Research in Toxicology*, 4(2), pp.131-140.

Beiswanger, CM. Diegmann, MH. Novak, RF. Philbert, MA. Graessle, TL. Reuhl, KR. & Lowndes, HE. (1995). Developmental changes in the cellular distribution of glutathione and glutathione S-transferases in the murine nervous system. *Neurotoxicology*, 16, pp.425-440.

Beiswanger, CM. Manson, MM. Novak, RF. Philbert, MA. Green, JA. Primiano, T. Reuhl, KR. & Lowndes, HE. (1995). Glutathione S-transferase and gammaglutamyl transpeptidase in the rat nervous system: a basis for differential susceptibility to neurotoxicants. *Neurotoxicology*, 16, pp.349-362.

Berrahal, A. Lasram, M. Elj, N. Kerkeni, A, Gharbi, N. & El-Fazâa. (2009). Effect of Age-Dependent Exposure to Lead on Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in Male Rats. *Environmental Toxicology*, 26, pp.68-78.

Board, P. & Menon, D. (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, pp.3267-3288.

Brochin, R. & Leone, S. (2008). The Cellular Effect of Lead Poisoning and Its Clinical Picture. *The Georgetown Undergraduate Journal of Health Sciences*, 5(2), pp.1-8.

Bruning, T. & Bolt, HM. (2000). Renal toxicity and carcinogenicity of trichloroethylene: key results, mechanisms, and controversies. *Crit Rev Toxicol*, 30, pp.253-285.

Burtis, C. & Ashwood, E. (1994). *Tietz textbook of clinical chemistry*. Philadelphia: Saunders.

Cabrera, W. Behets, G. Lamberts, L. & D'Haese, P. (2016). Plomo y nefropatía. Biomarcadores urinarios en la detección de daño renal precoz. *Rev. Med. Chile*, 144, pp.704-709.

Campuzano, M. & Gómez, M. (2007). El uroanálisis: el gran aliado del médico. *Urología colombiana*, 1, pp.67-92.

Chand, P. & Clausen, J. (1982). Triethyl lead toxicity in relation to brain glutathione and glutathione S-Transferase. *Toxicology letters*, 12, pp.181-184.

Chien-Tai, T. & Meyer, A. (2014). Enzymatic Cellulose Hydrolysis: Enzyme Reusability and Visualization of β -Glucosidase Immobilized in Calcium Alginate. *Molecules*, 19, pp.19390-19406.

Childhood Lead Poisoning Prevention. <https://www.cdc.gov/nceh/lead/prevention/blood-lead-levels.htm> consultado el 21/03/2023. Centers for Disease Control and Prevention.

Coles, B. & Kadlubar, F. Human Alpha class Glutathione S-transferases: genetic polymorphism, expresión and susceptibility to disease. *Methods in enzymology*, 401(2), pp.9-42.

Cossio-Bolaños, M. (2013). Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutrición Hospitalaria*, 28(6), pp.2151-2156.

Cruz, D. (2016). Actividad de la enzima Glutación S-Transferasa expuesta a mercurio y micronutrientes. [Tesis para obtener grado de licenciatura, Universidad del Papaloapan].

Daggett, D. Nuwaysir, E. Nelson, S. Wright, L. Kornguth, S. & Siegel, F. (1997). Effects of triethyl lead administration on the expression of Glutathione S-Transferase isoenzymes and quinone reductase in rat kidney and liver. *Toxicology*, 128, pp.191-206.

Daggett, D. Oberley, T. Nelson, S. Wright, L. Kornguth, S. & Siegel, F. (1998). Effects of lead on rat and liver: GST expresión and oxidative stress. *Toxicology*, 128(3), pp.191-206.

Das, M. & Dixit, R. (1981). Glutathione S- Transferase activity in the brain: species, sex, regional and age differences. *Journal of Neurochemistry*, 36(4), pp.1439-1442.

Del Arenal, I. Guevara, A. & Martinez, J. (2020). Homeostasis redox. *Mensaje bioquímico*, 44, pp.72-86.

Devi, S. Biswas, A. Biswas, R. Vinayagamoorthy, N. Krishnamurti, K. Shinde, V. Hengstler, J. Hermes, M. & Chakrabarti, T. (2007). Heavy metal status and oxidative stress in diesel engine tuning workers of central Indian population. *Journal occupational environmental medicine*, 49, pp.1228-1234.

Dixon, D. Laphorn, A. & Edwards, R. (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biology*, 3(3), pp.3004.1-3004.10.

Driver, A. Kodavanti, P. & Mundy, W. (2000). Age related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicology and Teratology*, 22, pp.175-181.

Fang, S. (2012). Insect glutathione S-transferase: a review of comparative genomic studies and response to xenobiotics. *Bulletin of insectology*, 65(2), pp.265-271.

Feliciano, D. (2019). Susceptibilidad a la intoxicación con plomo en roedores. [Tesis para obtener grado de licenciatura, Universidad del Papaloapan].

Ferrer, A. (2003). Intoxicación por metales. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 26, pp.141-153.

Finn, W. F. & Porter G. A. (2008). Urinary biomarkers and nephrotoxicity. *Clinical Nephrotoxins: Renal Injury from Drugs and Chemicals*, Springer US, pp.92-130.

Flora, G. Gupta, D. & Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology*, 5(2), pp.47-58.

Fraser, J. (1965). Studies with a simplified nitroprusside test for ketone bodies in urine, serum, plasma and milk. Clin. Chem. Acta II, 1, pp.372-378.

Free, AH. & Free, HM. (1972). Urinalysis, Critical discipline of clinical science. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 3(4), pp.481-531.

Freundt, K. & Ibrahim, H. (1991). Influence of Pb, Cd, Zn, Mn, Cu, Hg, or Be salts on the Glutathione S-transferase of the rat liver. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 46, pp.618-624.

García-González, M. Quintero, E. Benito, R. Strunk, M. Nicolás, D. Parra-Blanco, A. Santolaria, S. Sopeña, F. Piazuelo, E. Jiménez, P. Espinal, J. Campo, R. Manzano, M. Geijo, F. Badía, M. Pellise, M. González-Huix, F. Nieto, M. Espinós, J. & Lanas, A. (2009). IMPORTANCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LAS ISOFORMAS GSTM1, GSTT1 Y GSTP1 DE LA GLUTATION S-TRANSFERASA EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER GÁSTRICO. Gastroenterología y Hepatología, 32(3), pp.233-234.

Garza, A. Chávez, H. Vega, R. & Soto, E. (2005). Mecanismos celulares y moleculares de la neurotoxicidad por plomo. Salud mental, 28(2), pp.48-58.

Goldstein, G. W. (1990). Lead poisoning and brain cell function. Environmental Health Perspectives, 89, pp.91-94.

Goodrich, J. M. & Basu N. (2012). Variants of Glutathione S- Transferase Pi 1 exhibit differential enzymatic activity and inhibition by heavy metals. Toxicology in Vitro, 26(4), pp.630-635.

Goytia-Acevedo, R. Meza-Velázquez, R. & Rosales-Gonzales, M. (2002). El plomo como posible factor de riesgo para el desarrollo de alergia. Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas, 11(3), pp.101-105.

Green, T. Dow, J. Ong, C. Ong, H. Zhuang, Z. Yang, X. & Bloemen, L. (2004). Biological monitoring of kidney function among workers occupationally exposed to trichloroethylene. Journal occupational environmental medicine, 61, pp.312-317.

Habig, W. H. Pabst M. J. & Jakoby W. B. (1974). Glutathione S- Transferases: The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. Journal of Biological Chemistry, 249(22), pp.7130-7139.

Han, S. Li, W. Jamil, U. Dargan, K. Orefice, M. Kemp, F. & Bodgen, J. (1999). Effects of weight and exercise on the distribution of lead and essential trace elements in rats with prior lead exposure. Enviromental health perspectives, 107(8), pp.657-662.

Hanes, CS. (1932). Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. Biochemical Journal, 26(5), pp.1406-1421.

- Hansberg, W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje Bioquímico UNAM, 26, pp.19-54.
- Harun, H. (2021). Lipid Peroxidation: Aging Kidney. Accenting Lipid Peroxidation. doi: 10.5772/intechopen.95801.
- Hayes, J. D. & Strange R. C. (2000). Glutathione S- Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences. Pharmacology, 61(3), pp.154-166.
- Hayes, J. D. (1995). The Glutathione S- Transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 30(6), pp.445-600.
- Hegazy, A. & Fouad, U. (2014). Evaluation of Lead Hepatotoxicity: histological, histochemical and ultrastructural study. Forensic Medicine and Anatomy Research, 2, pp.70-79.
- Henschler, D. Vamvakas, S. Lammert, M. (1995). Increased incidence of renal cell tumours in a cohort of cardboard workers exposed to trichloroethylene. Arch Toxicol, 70, pp.291-299.
- Hernandez, J. Navarro, L. Velázquez, M. de la Garza, I. Colunga, E. & Hernandez, M. (2015). Chemometrics as a tool in the study of lead toxicity in rats. J. Mex. Chem. Soc. 59(1), pp.5-11.
- Hernández, M. (2013). Estudio de los efectos del plomo en roedores desde una perspectiva quimiométrica. [Tesis para obtener grado de licenciatura, Universidad del Papaloapan].
- Holmquist, P. & Liuba, P. (2012). Urine α -Glutathione S- transferase systemic inflammation and arterial function in juvenile type 1 diabetes. Journal of diabetes and its complications, 26, pp.199-204.
- Hunaiti, A. & Soud, M. (2000). Effect of lead concentration on the level of glutathione, Glutathione S- Transferase, Reductase and Peroxidase in human blood. The Science of the Total Environment, 248, pp.45-50.
- Jacoby, W. (1985). Glutathione Transferases: An Overview. Methods in Enzymology, 61, pp.495-496.
- Jakobsson, P. J. (1996). Identification and characterization of a novel human microsomal Glutathione S- Transferase with leukotriene C4 synthase activity and significant sequence identity to 5-lipoxygenase-activating protein and leukotriene C4 synthase. Journal Biological Chemistry, 271(36), pp.22203-22210.
- Jarrar, B. M. & Taib N. T. (2012). Histological and histochemical alterations in the liver induced by lead chronic toxicity. Saudi Journal of Biological Sciences, 19, pp.203-210.

- Kasperczyk, A. Dobrakowski, M. Ostalowska, A. Zalejska, J. & Birkner, E. (2015). The metabolism of carbohydrates and lipid peroxidation in lead-exposed workers. *Toxicology and Industrial Health*, 31(12), pp.1318-1324.
- Kilty, C. Doyle, S. Hassett, B. & Manning F. (1998). Glutathione S- Transferases as biomarkers of organ damage: applications of rodent and canine GST enzyme immunoassays. *Chemico-Biological Interactions*, 111-112, pp.123-135.
- Klaassen, C. (2011). Heavy metals and heavy-metal antagonists. En *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (pp.1851-1875). United States: McGraw Hill.
- Krantz, A. & Dorevitch, S. (2004). Metal exposure and common chronic diseases: a guide for the clinician. *Disease-A-Month*, 50(5), pp.220-262.
- Kregel, K. & Zhang, H. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanism, functional effects, and pathological considerations. *American journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology*, 229(1), pp.18-36.
- Kumar, K. Blaylock, I. Brown, S. Bettaiya, R. Rajanna, S. & Yallapragada, P. (2009). Influence of lead acetate on glutathione and its related enzymes in different regions of rat brain. *John Wiley & Sons*, 29, pp.452-458.
- Kumar, P. & Ibrahim, S. (2010). Age-dependent changes in Glutathione S- transferase: correlation with total plasma antioxidant potential and red cell intracellular glutathione. *Indian journal of clinical biochemistry*. 25(4), pp.398-400.
- Kusano, Y. Horie, S. Morishita, N. Shibata, T. & Uchida K. (2012). Constitutive expresión of an antioxidant enzyme, glutathione S-transferase P1, during differentiation of human intestinal Caco-2 cells. *Free radical biology & medicine*, 53(2), pp.347-356.
- Laura Patricia Morales Pérez. (2019). Examen General de Orina. *Lister Laboratorios*, 1, pp.1-8. <https://www.lister.com.mx/wp-content/uploads/2019/01/4342-R-Flyer-Orina-blog.pdf>
- Lema, I. Zuk, M. & Rojas, L. (2010). Introducción al análisis de riesgos ambientales. México D. F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Lira, E. & Jasso, R. (2013). Comparación de los diferentes métodos de análisis cinéticos para determinar el tipo de inhibición de dos compuestos. *Revista de Educación Bioquímica*, 32(1), pp.19-32.

- Londoño, L. Londoño, P. & Muñoz, F. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 14(2), pp.145-153.
- López, D. Williams, R. Miehke, K. & Manzana, J. (1995). Las enzimas en el diagnóstico médico. *Enzimas la fuente de la vida*, EDIKA MED, Barcelona, España.
- Lowry, H. Rosebrough, N. Farr, L. & Randall, J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological chemistry*, 193, pp.265-275.
- Lozano, C. (2016). Examen general de orina: una prueba útil en niños. *Rev. Fac. Med.* 64(1), pp.137-147.
- Lubert, S. (1995). *Bioquímica*. (pp.191-194). España: Editorial Reverté S.A.
- Mahajan, L. Verma, P. Raina, R. Pankaj, N. Sood, S. Maninder, M. (2018). Alteration in thiols homeostasis, protein and lipid peroxidation in renal tissue following subacute oral exposure of imidacloprid and arsenic in Wistar rats. *Toxicology Reports*, 5, pp.1114-1119
- Mannervik, B. Alin, P. Guthenberg, C. Jensson, H. Kalim, M. Warholm, M. & Jornvall H. (1985). Identification of three classes of cytosolic Glutathione Transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, pp.7202-7206.
- Mannervik, B. Board, P. Hayes, J. Listowsky, I. & Pearson, W. (2005). Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymology*, 401, pp.1-8.
- Marchetti, C. (2003). Molecular Targets of Lead in Brain Neurotoxicity. *Neurotoxicity Research*, 5(3), pp.221-236.
- Markiewicz, I. Januszewska, L. Michalak, A. Prokopowicz, A. Januszewska, E. Pawlas, N. & Pawlas, K. (2015). Effects of chronic exposure to lead, cadmium and manganese mixtures in oxidative stress in rat liver and heart. *Arch High Rada Toksikol*, 66, pp.51-62.
- Martínez, S. A. Cancela, L. M. & Virgolini, M. B. (2011). El estrés oxidativo como mecanismo de acción del plomo: Implicancias terapéuticas. *Acta toxicológica argentina*, 19, pp.61-79.
- Mazundar, M. D. Bellinger, D. C. Gregas, M. Abanilla, K. Bacic, J. & Needleman, H. L. (2011). Low-level environmental lead exposure in childhood and adult intellectual function: a follow-up study. *Environmental Health*, 10(24), pp.1-7.
- McGarry, JD. (1978). New perspectives in the regulation of ketogenesis. *Diabetes*, 28, pp.517-523.

- Méndez, S. (2016). Antioxidantes como tratamiento alternativo contra la intoxicación renal con plomo. [Tesis para obtener grado de licenciatura, Universidad del Papaloapan].
- Morgenstern, R. Guthenberg, C. Depiere, J. W. (1982). Microsomal Glutathione S-transferase. *European Journal of Biochemistry*, 128, pp.243-248.
- Moser, R. Oberley, T. Daggett, D. Friedman, A. Johnson, J. & Siegel, F. (1995). Effects of Lead Administration on Developing Rat Kidney. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 131, pp.85-93.
- Mudipalli, A. (2007). Lead hepatotoxicity & potential health effects. *Indian J Med Res*, 126(6), pp.518-527.
- Mukhtar, H. & Bend, J. (1977). Serum Glutathione S- transferases: perinatal development, sex difference and effect of carbon tetrachloride administration on enzyme activity in the rat. *Life Sciences*. 21(9), pp.1277-1286
- Mukul, D. Rakesh, D. Prahlad, K. & Mukhtar, H. (1981). Glutathione -S-Tranferases Activity in the Brain: Species, Sex, Regional and Age Differences. *Journal of Neurochemistry*, 36(4), pp.1439-1442.
- Navarro, A. & Boveris, A. (2004). Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *The american journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology*, 287, pp.1244-1249
- Navarro-Moreno, L. G. (1999). Efecto del plomo sobre algunos aspectos fisiológicos de túbulos proximales de riñón de rata. [Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias, CINVESTAV-IPN-México, DF.]
- Navarro-Moreno, L. G. Quintanar-Escorza, M. A. González, S. Mondragón, R. Cerbón-Solorzáno, J. Valdés, J. & Calderón-Salinas, J. V. (2009). Effects of lead intoxication on intercellular junctions and biochemical alterations of the renal proximal tubule cells. *Toxicology in Vitro*, 23(7), pp.1298-1304.
- Nava-Ruíz, C. & Méndez-Armenta, M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch Neurocién (Mex)*, 16(3), pp.140-147.
- Needleman, H. (2004). Lead poisoning. *Annu Rev Med*, 55, pp.209-222.
- Oakley, A. (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug metabolism reviews*, 43(2), pp.138-151.
- Ohkawa, H. Ohishi, N. & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, pp.351-358.

Palencia, A. Romero, G. Figueredo, A. Barrades, O. Álvarez, Y. Acosta, H. & González M. (2018). Función renal, niveles urinarios de cadmio y plomo en niños del municipio de Naguanagua (estado Carabobo, Venezuela), expuestos a humo de tabaco ambiental. *Archivos de Medicina*, 18(2), pp.254-274.

Pawan, K. & Rizvi, S. (2010). Age-dependent changes in Glutathione S-transferase: correlation with total plasma antioxidant potential and red cell intracellular glutathione. *Indian Journal Clinical Biochemistry*, 25, pp.398-400.

Peña, C. Carter, D. & Ayala-Fierro F. (2001). Toxicología Ambiental: Evaluación de riesgos y restauración ambiental. Distributed in the internet vía the Southwest Hazardous Waste Program Website at <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>.

Peterson, G. (1979). Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry*, 100, pp.201-220.

Pietro, G. Magno, L. A. & Rios-Santos, F. (2010). Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*, 6(2), pp.153-170.

Poma, P. A. (2008). Intoxicación por plomo en humanos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 69, pp.120-126.

Pritha, D. & Sudipta, P. (2017). ALTERATION IN CARBOHYDRATE METABOLISM BY SUB-ACUTE LEAD EXPOSURE: A DOSEDEPENDENT STUDY. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(3), pp.254-261.

Pulido, B. (2022). Efectos de la exposición a mercurio y cadmio en la actividad de la enzima Glutathión S-transferasa de las especies *Hafnia Alvei*, *Candida Parapsilosis*, *Penicilium sp* y *Rattus Novergicus* (Wistar). [Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias, Universidad del Papalopan].

Quintanar, M. & Calderón, J. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de educación bioquímica. REB*. 28(3), pp.89-101.

Raijmakers, M. T. M., Steegers, E. A. P. & Peters W. H. M. (2001). Glutathione S-transferases and tiol concentrations in embryonic and early fetal tissues. *Human Reproduction*. 16(11), pp.2445-2450.

Ramírez, A. V. (2013). Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia. *Anales de la Facultad de Medicina*, 67(1), p.10.

Ramírez, D. Valenti, J. García, M. Batista, Z. & Estrada, J. (2013). Estrés oxidativo en ratas envejecidas. *Revista Finlay*, 3(4), pp.1-5.

- Rastogi, S. K. (2008). Renal effects of environmental and occupational lead exposure. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 12(3), pp.103-106.
- Raymundo, M. (2016). Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutathión S-transferasa p1. [Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias, Universidad del Papaloapan].
- Reddy, U. Prabhakar, P. Sankara, G. Rajasekhar, P. Sandeep, K. Rahman, M. Indu, S. Grover, P. Khan, H. & Mahboob, M. (2015). Biomarkers of oxidative stress in rat for assessing toxicological effects of heavy metal pollution in river water. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, pp.13453-13463.
- Rodríguez, D. (2017). Intoxicación ocupacional por metales pesados. *MEDISAN*, 21(12), p.7003.
- Rouse, R. L. Zhang, J. Stewart, S. R. Rosenzweig, B. A. Espandiari, P. & Sadrieh, N. K. (2011). Comparative profile of commercially available urinary biomarkers in preclinical drug-induced kidney injury and recovery in rats. *Kidney International*, 79 (11), pp.1186-1197.
- Sabath, E. & Robles-Orsorio, M. (2012). Renal health and the environment: heavy metal nephrotoxicity. *Revista Nefrología*, 33(3), pp.279-286.
- Salinas, J. V. C. & Vega, M. M. (2008). Contaminación e intoxicación por plomo/Contaminación and lead poisoning. México: Editorial Trillas S.A. de C.V.
- Sanín, L. González, T. Romieu, I. & Hernández, M. (1998). Acumulación de plomo en hueso y sus efectos en la salud. *Salud pública de México*, 40(4).
- Schoeffner, D. Warren, D. Muralidhara, S. & Bruckner, J. (1999). Organ weights and fat volume in rats as a function of strain and age. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 56, pp.449-462.
- Shchersten, B. & Fritz, H. (1967). Subnormal levels of glucose in urine. *JAMA*, 201, pp.129-132.
- Sheikhazadi, A. Sadr, S. Ghadyani, M. Taheri, S. Manouchehri, A. Nazparvar, B. Mehrpour, O. & Ghorbani, M. (2010). Study of the normal internal organ weights in Tehran's population. *J. Forensic Leg. Med.*, 17(2), pp.78-83.
- Sherratt, P. J. & Hayes, J. D. (2002). Glutathione S-transferases. *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. John Wiley & Sons, pp.319-352.
- Sheweita, S. (1998). Heavy metal-induced changes in the glutathione levels and Glutathione Reductase/Glutathione S-transferase activities in the liver of male mice. *International Journal of Toxicology*, 17, pp.33-392.

Scholten, B. Theilade, S. Lajer, M. & Rossing, P. (2014). Urinary Alpha- and Pi-Glutathione S-transferases in adult patients with type 1 diabetes. *Nephron Extra*, 4, pp.127-133.

Sidhu, P. & Nehru, B. (2004). Lead intoxication: Histological and oxidative damage in rat cerebrum and cerebellum. *The Journal of trace elements in experimental medicine*, 17, pp.45-53

Skoog, D. Holler, F. & Crouch, S. (2008). *Principios de análisis instrumental*. U.S.A : Editoria Cengagen Learning.

Srinivas, S. Kaul, P. & Prakash, V. (2007). Mechanism of Interaction of Pb (II) with milk proteins: a case study of α -Casein, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), pp.9283-9288.

Stohs, S. J. Al-Turk, W. A. Angle, C. R. & Heinicke, R. J. (1982). Glutathione S-Transferase activity in liver, lung and intestinal mucosa of aging female mice. *General Pharmacology: The Vascular System*, 13(6), pp.519-522.

Struzynska, L. Bubko, I. Walski, M. & Rafalowska, U. (2001). Astroglial reaction during the early of acute lead toxicity in the adult rat brain. *Toxicology*, 165, pp.121-131.

Sun, H. Wang, N. Nie, X. Zhao, L. Li, Q. Cang, Z. Chen, C. Lu, M. Cheng, J. Zhai, H. Xia, F. Ye, L. & Lu, Y. (2017). Lead exposure induces weight gain in rats, accompanied by DNA hypermethylation. *PLoS ONE*, 12(1): e0169958

Suvakov, S. Damjanovic, T. Stefanovic, A. Pekmezovic, T. (2013). Glutathione S-transferase A1, M1, P1 and T1 null or low-activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage among haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant*, 28, pp.202-212.

Szymánski (2014). Molecular mechanism of lead toxicity. *Journal of biotechnology, computational biology and bionanotechnology*, 95(2), pp.137-149.

Tee, L. Gilmore, K. Meyer, D. Ketterer, B. Vandenberghe, Y. & Yeoh, G. (1992). Expression of glutathione S-transferase during rat liver development. *Biochemical journal*, 282, pp.209-218.

Thiendedsakul, P. Santativongchai, P. Boonsoongnarm, P., Yodsheewan, R. & Tulayakul, P. (2022). Glutathione S-Transferase activity in various organs of *Crocodylus siamensis* and its attenuation role in aflatoxin B1-induced cell apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Veterinary World*, 15(1), pp.46-54.

Tietz, NW. (1976). *Clinical Guide to Laboratory Test*. Saunders Company, 1, p.1.

Tong, S. Schirnding, Y. E. & Prapamontol, T. (2000). Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bulletin of the world health organization*, 78(9), pp.1068-1077.

Tsuchida, S. & Sato, K. (1992). Glutathione transferases and cancer. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 27(4-5), pp.337-384.

U.S Department of Health and Human Services. (2020). Toxicological Profile For Lead. United States: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Valdés, F. & Cabrera, V. (1999). La contaminación por metales pesados en Torreón. Coahuila, México: Texas Center for Policy Studies.

Valdivia, M. (2005). Intoxicación por plomo. Rev. Soc. Per. Med. Inter. 18(1), pp.22-27

Valko, M. Leibfritz, D. Moncol, J. Cronin, M. Mazur, M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology, 39, pp.44-84

Vargas, J. (2020). Parámetros fisiológicos y metabólicos de la rata de laboratorio (*Ratus Norvegicus*). Revista Médica Basadrina, 14(2), pp.64-68.

Venu, G. Sriram, A. Sharma, D. & Singh, R. (2000). Glutathione-S-Transferase in the ageing rat brain cerebrum and the effect of chlorpromazine. Gerontology, 46, pp.7-11.

Von Scholten, B. Theilade, S. Lajer, M. & Rossing, P. (2014). Urinary Alpha and Pi-Glutathione S- transferase in adult patients with type 1 diabetes. Nephron Extra, 4, pp.127-133.

Wang, N. Chen, C. Nie, X. Han, B. Li, Q. Chen, Y. Zhu, C. Chen, Y. Xia, F. Cang, Z. Lu, M. Meng, Y. Zhai, H. Lin, D. Cui, S. Jensen, M. & Lu, Y. (2015). Blood lead level and its association with body mass index and obesity in China-Results from SPECT-China study. Scientific reports, 5(18299).

Williamson, DH. (1971). Physiological ketoses, or why ketone bodies?. Postgrad. Med. J., 1, pp.372-375.

Wrensch, M. & Kelsey, K. (2004). Glutathione S- transferase variants and adult glioma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 13(3), pp.461-467.

Wright, L. Kornguth, S. Oberley, T & Siegel, F. (1998). Effects of lead on Glutathione S-Transferase Expression in Rat Kidney: Adose-Response Study. Toxicological Sciences, 46, pp.254-259.

Yang, W. Burkhardt, B. Fischer, L. Beirow, M. Bork, N. Wönne, E. Wagner, C. Husen, B. Zeilinger, K. Liu, L. Nussler, A. (2015). Age-dependent changes of the antioxidant system in rat livers are accompanied by altered MAPK activation and a decline in motor signaling. EXCLI Journal, 14, pp.1273-1290.

Yoder, J. Adams, EC. Free, AH. (1965). Simultaneous Screening for urinary occult blood, protein, glucose, and pH. Amer. J. Med Tech., 31, p.285.

Zilli, S. (2020). Efecto de la intoxicación con plomo en ratas gestantes. [Tesis para obtener grado de licenciatura, Universidad del Papaloapan].

Base de datos.

Uniprot

GSTA1 Humano consultado el día 27-03-17. <http://www.uniprot.org/uniprot/P08263>

GSTA1 Rata consultado el día 27-03-17. <http://www.uniprot.org/uniprot/P00502>

GSTM1Humano consultado el día 27-03-17. <http://www.uniprot.org/uniprot/P09488>

GSTM1 Rata consultado el día 27-03-17. <http://www.uniprot.org/uniprot/P04905>

GSTP1 Humano consultado el día 27-03-17. <http://www.uniprot.org/uniprot/P09211>

GSTP1 Rata consultado el día 27-03-17. <http://www.uniprot.org/uniprot/P04906>

NCBI

GSTP consultado el día27-03-17.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?ascbn=8&maxaln=10&seltype=2&uid=239374&feature=1&querygi=4139536&aln=2,2,0,39,42,39,34>.

BRENDA

GST Humano consultado el día 27-03-17.

<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.18&UniProtAcc=P08263&OrganismID=2681>

<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.18&UniProtAcc=P09211&OrganismID=2681>

GST Rata consultado el 27-03-17.

<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.18&UniProtAcc=P04905&OrganismID=%d>

GST General consultado el 27-03-17.

<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5>.

11. ANEXOS Y APÉNDICES

ANEXO 1

Cálculo de Km y Vmax mediante el método de Hanes-Woolf.

En bioquímica, el diagrama Hanes–Woolf se emplea como herramienta gráfica para calcular los parámetros cinéticos de una enzima. En él se representa la relación concentración de sustrato/velocidad de reacción frente a la concentración de sustrato [S]. Es una de las formas de linealizar la ecuación de Michaelis-Menten.

$$([S])/v = ([S])/V_{\max} + K_m/V_{\max}$$

Donde:

V es la velocidad de reacción, Km es la constante de Michaelis-Menten, Vmax es la velocidad máxima, y [S] es la concentración de sustrato.

La ecuación se puede obtener a partir de la de Michaelis siguiendo los siguientes pasos:

$$v = (V_{\max}[S])/(K_m + [S])$$

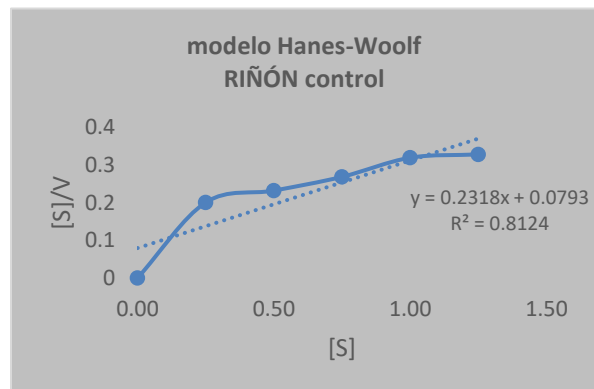
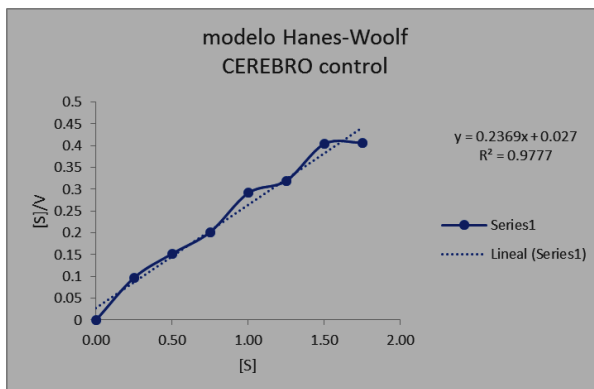
Invirtiendo y multiplicando por [S]:

$$([S])/v = ([S](K_m + [S])/(V_{\max}[S])) = (K_m + [S])/V_{\max}$$

Reordenando:

$$([S])/v = 1/V_{\max} [S] + K_m/V_{\max}$$

La representación gráfica de Hanes permite identificar el Km y Vmax; el punto de corte con el eje de ordenadas es el equivalente a Km/Vmax, y el de abscisas es el valor de -Km. Esta representación refleja de manera más fiel los errores cometidos al medir el valor de v. Por este motivo, este método es mejor que otras linealizaciones de la ecuación de Michaelis-Menten, ya que admite relativamente bien una amplia gama de [S]. Es mucho menos sensible que el procedimiento de Eadie-Hofstee a errores sistemáticos en la medición de la velocidad (Hanes, 1932). A continuación se muestran dos ejemplos.

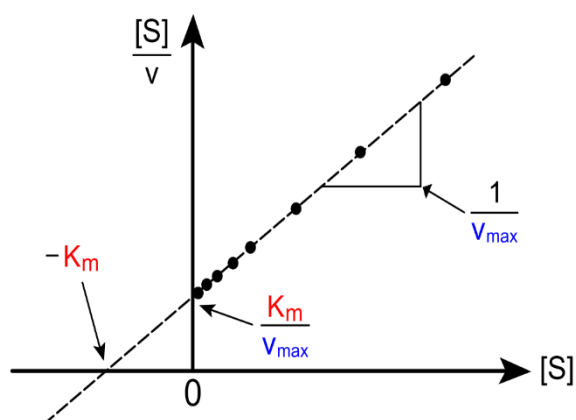


La metodología empleada se muestra en un ejemplo con el análisis de los resultados obtenidos en la muestra de hígado. Los datos experimentales fueron los siguientes.

[GSH]	Actividad $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$
0.25	25.04 ± 2.77
0.50	32.74 ± 3.63
0.75	34.52 ± 4.63
1.00	35.53 ± 4.04
1.25	36.38 ± 5.46
1.50	36.16 ± 2.66
1.75	33.76 ± 3.95
2.00	35.00 ± 6.36

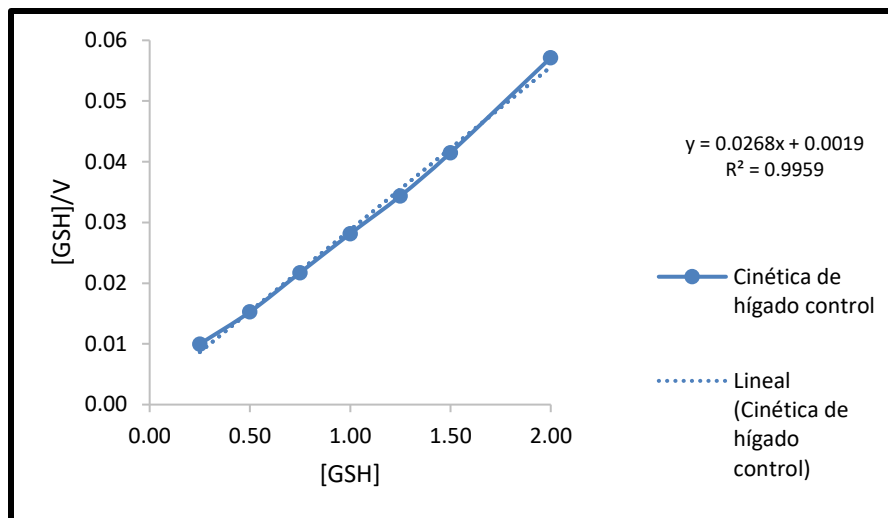
La linealización nos muestra que la pendiente de la línea recta será igual a la inversa de la velocidad máxima, el punto donde se corta la ordenada es igual a la constante K_m entre la velocidad máxima y, por último, el punto donde se corta la abscisa será igual a la constante K_m .

[GSH]	[GSH]/V
0.25	0.01
0.50	0.02
0.75	0.02
1.00	0.03
1.25	0.03
1.50	0.04
2.00	0.06



Cómo se observa en la figura anterior, primero se realiza una gráfica donde el eje de las ordenadas pertenece a la división de la concentración de sustrato entre la velocidad (actividad) y el eje de las abscisas corresponde a la concentración de sustrato.

Para los datos obtenidos, la gráfica siguiente representa lo que se obtuvo con el modelo aplicado para estos datos.



Realizando una regresión lineal a la ecuación de la recta se obtiene

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0.998
Coeficiente de determinación R^2	0.996
R^2 ajustado	0.995
Error típico	0.001
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0.002	0.002	1222.84508	3.60E-07
Residuos	5	6.42E-06	1.28E-06		
Total	6	0.002			

	Coefficient es	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%
Intercepción	0.002	0.001	2.132	0.086	-3.96E-04
Variable X 1	0.027	0.001	34.969	3.60E-07	0.025
	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%		
Intercepción	0.004	-3.96E-04	0.004		
Variable X 1	0.029	0.025	0.029		

Donde al final la ecuación de la recta ($y = mX+b$) es la siguiente.

$$y = 0.0268x + 0.0019$$

Y la pendiente $m=1/V_{max}=0.0268$ entonces

$$\frac{1}{V_{max}} = 0.0268 \Rightarrow V_{max} = \frac{1}{0.0268} = 37.25$$

Sabiendo el valor de la velocidad máxima, podemos deducir ahora la constante K_m . Recordando que el punto donde corta la ordenada es igual a K_m/V_{max} y tomando en cuenta la ecuación de la recta obtenida, se realiza lo siguiente.

$$y = mX + b \text{ Si } X = 0 \text{ entonces } y = b = \frac{K_m}{V_{max}}$$

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 0.0019 \Rightarrow K_m = 0.0019 * V_{max} \Rightarrow$$

$$K_m = (0.0019)(37.25) = 0.07$$

Como el valor de m y b no tienen unidades, a los resultados se les asigna las unidades correspondientes como a continuación.

$$K_m = 0.07 \text{ mM}$$

$$V_{max} = 37.25 \text{ } \mu\text{mol/mg/min}$$

Y estos son las constantes cinéticas para el hígado de ratas control. Este procedimiento se aplicó para cada cinética realizada en este trabajo.

APÉNDICE 1.

Examen general de orina.

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

Se utilizarán 10 microlitros de muestra, se colocará sobre la tira reactiva de uroanálisis (10 LG parameter Urine Reagent Strip 100 Strips URI-10P) la cual indicará por colorimetría la concentración de glucosa, bilirrubina, cetonas, gravedad específica, sangre, pH, proteínas, nitritos y leucocitos. Cada uno de los parámetros se explica detalladamente.

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

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

3) **Proteínas.** La determinación se basa en el denominado error de proteína de los indicadores de pH. La zona de reacción de la tirilla contiene una mezcla tampón y un indicador que cambia de color amarillo a verde en presencia de proteínas en la orina, aunque el pH se mantenga constante. Estos cambios cromáticos pueden ser detectados por el lector de tirillas o mediante una tabla de comparación para determinar la presencia de proteínas en la orina. La reacción es particularmente sensible a la albúmina, siendo positiva a partir de concentraciones de ésta proteína mayores de 6 mg/dL

4) **Glucosa.** La detección de la glucosa se basa en una reacción específica de la glucosa oxidasa/ peroxidasa (método GOD/POD), en la cual la D-glucosa se oxida y se convierte en D-gluconolactona. El peróxido de hidrógeno resultante de la reacción anterior, oxida, bajo la catálisis de la peroxidasa, al indicador tetra-metil-bencidina (TMB) para dar una coloración azul-verdosa sobre el papel amarillo reactivo de la tirilla, que mediante una tabla de comparación o con el lector de tirillas puede detectar la presencia de glucosa en la orina. La reacción es específica para glucosa y no depende del pH ni de la gravedad específica de la orina, ni se ve afectado significativamente por la presencia de cuerpos cetónicos.

- 5) **Cetona.** La prueba se basa en el principio de la prueba de Legal. El ácido acetoacético y la acetona reaccionan con nitroprusiato sódico y glicina en un medio alcalino para formar un complejo color violeta, que mediante una tabla de comparación o el lector de tirillas detectará la presencia de cetonas en la orina. La reacción es específica para el ácido acetoacético y la acetona. No es interferida por el ácido beta-hidroxibutírico ni por la presencia de glucosa, proteínas y ácido ascórbico en la muestra.
- 6) **Urobilinógeno.** Una sal de diazonio estable, p-metoxibenceno diazoniofluoborato presente en la tira reactiva, reacciona casi inmediatamente con el urobilinógeno, dando lugar a la formación de un colorante azoico rojo.
- 7) **Bilirrubina.** La prueba se basa en la unión de la bilirrubina con una sal de diazonio estable (2,6-diclorobenceno-diazoniofluoborato) en un medio ácido del papel reactivo.
- 8) **Nitritos.** La prueba se basa en el principio del ensayo de Griess y es específica para el nitrito. La reacción revela la presencia de nitrito y por lo tanto, indirectamente, la existencia de bacterias formadoras del mismo en la orina, coloreando el amortiguador de la prueba de color rosa rojizo, que mediante una tabla de comparación o con el lector de tirillas puede detectar la presencia de nitritos en la orina.
- 9) **Leucocitos.** La tira reactiva tiene una zona que contiene un éster de hidroxilo que es disociado por la esterasa leucocitaria. El hidroxilo libre reacciona con una sal de diazonio para formar una tinción violeta, que se puede interpretar mediante una tabla de comparación puede leer o un lector de tirillas.
- 10) **Sangre.** La prueba detecta sangre completa (eritrocitos), sangre lisada (hemoglobina) y mioglobina. Para lograr el objetivo, la prueba se basa en la acción peroxidativa de la hemoglobina o la mioglobina que cataliza la oxidación del indicador cromático TMB mediante un hidroperóxido orgánico, el 2,5-dimetilhexano-2,5-dihidroperóxido, para producir un color azul verdoso que sobre el papel amarillo de la tirilla pueda determinar la presencia de hemoglobina (en forma de eritrocitos o hemoglobina libre) o mioglobina en la orina. En las zonas de reacción, de acuerdo al patrón de coloración es posible distinguir eritrocitos intactos de hemolizados. Los eritrocitos intactos se hemolizan sobre el papel reactivo y la hemoglobina liberada inicia la reacción de color, formando puntos verdes visibles.
- 11) **Hemoglobina.** Como se ha expresado, además de los eritrocitos la prueba detecta hemoglobina libre (hemoglobinuria) y mioglobina (mioglobinuria) en la orina. Cuando hay hemoglobinuria la tirilla toma un color verde uniforme, y en el sedimento no se observan eritrocitos. Las tirillas reactivas detectan la presencia de hemoglobina libre en la orina a partir de 100 mg/dL y de mioglobina a partir de 15 a 20 mg/dL. La hemoglobinuria o mioglobinuria se presentan en anemia hemolítica severa, intoxicaciones graves, enfermedades infecciosas graves, quemaduras extensas, ejercicio físico intenso, lesiones y enfermedades musculares progresivas. También se puede presentar mioglobinuria en pacientes con rabdomiolisis por medicamentos como las estatinas, aún con daño renal.

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

Apéndice 2

Análisis estadístico por ANOVA de un solo factor: 14, 21, 28, 40 y 60 días

Comparación de pesos corporales por edad.

Metodología.

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$
<i>Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.</i>	

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	6	14 días, 21 días, 28 días, 40 días, 60 días, 90 días

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	483221	96644.2	214.63	0.000
Error	29	13058	450.3		
Total	34	496279			

Resumen del modelo

S	R ²	R ² (ajustado)	R ² (pred)
21.2197	97.37%	96.92%	96.03%

Medias

Factor	N	Media	Desviación estándar	IC de 95%
14 días	6	20.167	0.516	(2.449, 37.884)
21 días	6	41.68	2.83	(23.97, 59.40)
28 días	6	80.88	18.25	(63.17, 98.60)
40 días	6	169.30	16.54	(151.58, 187.02)
60 días	6	270.38	23.12	(252.67, 288.10)
90 días	5	346.9	42.7	(327.5, 366.3)

Desv.Est. agrupada = 21.2197

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación				
90 días	5	346.9	A				
60 días	6	270.38		B			
40 días	6	169.30			C		
28 días	6	80.88				D	
21 días	6	41.68					E
14 días	6	20.167					E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias.

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	T	Valor p ajustado
21 días - 14 días	21.5	12.3	(-15.8, 58.9)	1.76	0.508
28 días - 14 días	60.7	12.3	(23.4, 98.1)	4.96	0.000
40 días - 14 días	149.1	12.3	(111.8, 186.5)	12.17	0.000
60 días - 14 días	250.2	12.3	(212.9, 287.6)	20.42	0.000
90 días - 14 días	326.7	12.8	(287.6, 365.9)	25.43	0.000
28 días - 21 días	39.2	12.3	(1.9, 76.5)	3.20	0.035
40 días - 21 días	127.6	12.3	(90.3, 165.0)	10.42	0.000
60 días - 21 días	228.7	12.3	(191.4, 266.0)	18.67	0.000
90 días - 21 días	305.2	12.8	(266.1, 344.4)	23.75	0.000
40 días - 28 días	88.4	12.3	(51.1, 125.8)	7.22	0.000
60 días - 28 días	189.5	12.3	(152.2, 226.8)	15.47	0.000
90 días - 28 días	266.0	12.8	(226.9, 305.2)	20.70	0.000
60 días - 40 días	101.1	12.3	(63.7, 138.4)	8.25	0.000
90 días - 40 días	177.6	12.8	(138.4, 216.8)	13.82	0.000
90 días - 60 días	76.5	12.8	(37.4, 115.7)	5.95	0.000

Nivel de confianza individual = 99.51%

Comparación de pesos en cerebro por edad.

ANOVA de un solo factor: 14, 21, 28, 40, 60 y 90 días

Metodología.

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	6	14 días, 21 días, 28 días, 40 días, 60 días, 90 días

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	3.6966	0.73932	26.70	0.000
Error	29	0.8031	0.02769		
Total	34	4.4997			

Resumen del modelo

S	R ² .	R ² (ajustado)	R ² (pred)
0.166411	82.15%	79.08%	74.18%

Medias

Factor	N	Media	Desviación estándar	IC de 95%
14 días	6	1.207	0.258	(1.068, 1.346)
21 días	6	1.5772	0.1367	(1.4383, 1.7162)
28 días	6	1.8873	0.1281	(1.7483, 2.0262)
40 días	6	1.8862	0.1631	(1.7473, 2.0251)
60 días	6	2.0529	0.1539	(1.9140, 2.1918)
90 días	5	2.2040	0.1042	(2.0518, 2.3562)

Desv.Est. agrupada = 0.166411

Comparaciones en parejas de Tukey. Confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación			
90 días	5	2.2040	A			
60 días	6	2.0529	A	B		
28 días	6	1.8873		B		
40 días	6	1.8862		B		
21 días	6	1.5772			C	
14 días	6	1.207				D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias.

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	T	Valor p ajustado
21 días - 14 días	0.3705	0.0961	(0.0777, 0.6633)	3.86	0.007
28 días - 14 días	0.6805	0.0961	(0.3877, 0.9733)	7.08	0.000
40 días - 14 días	0.6795	0.0961	(0.3866, 0.9723)	7.07	0.000
60 días - 14 días	0.8461	0.0961	(0.5533, 1.1390)	8.81	0.000
90 días - 14 días	0.997	0.101	(0.690, 1.304)	9.90	0.000
28 días - 21 días	0.3101	0.0961	(0.0173, 0.6029)	3.23	0.033
40 días - 21 días	0.3090	0.0961	(0.0162, 0.6018)	3.22	0.034
60 días - 21 días	0.4757	0.0961	(0.1829, 0.7685)	4.95	0.000
90 días - 21 días	0.627	0.101	(0.320, 0.934)	6.22	0.000
40 días - 28 días	-0.0011	0.0961	(-0.2939, 0.2917)	-0.01	1.000
60 días - 28 días	0.1656	0.0961	(-0.1272, 0.4584)	1.72	0.528
90 días - 28 días	0.317	0.101	(0.010, 0.624)	3.14	0.040
60 días - 40 días	0.1667	0.0961	(-0.1261, 0.4595)	1.74	0.521
90 días - 40 días	0.318	0.101	(0.011, 0.625)	3.15	0.039
90 días - 60 días	0.151	0.101	(-0.156, 0.458)	1.50	0.667

Nivel de confianza individual = 99.51%

Comparación de concentración de TBARS en cerebro por edad.

ANOVA de un solo factor: 14, 21, 28, 40, 60 y 90 días

Metodología

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$
<i>Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.</i>	

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	6	14 días, 21 días, 28 días, 40 días, 60 días, 90 días

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	475942	95188.5	108.53	0.000
Error	72	63150	877.1		
Total	77	539092			

Resumen del modelo

S	R ²	R ² (ajustado)	R ² (pred)
29.6156	88.29%	87.47%	85.63%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
14 días	20	37.46	12.25	(24.26, 50.66)
21 días	12	57.15	16.56	(40.10, 74.19)
28 días	12	25.344	1.605	(8.302, 42.387)
40 días	12	17.672	1.301	(0.629, 34.714)
60 días	12	22.782	1.232	(5.739, 39.825)
90 días	10	263.4	79.7	(244.7, 282.0)

Desv.Est. agrupada = 29.6156

Comparaciones en parejas de Tukey. Con confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación		
90 días	10	263.4	A		
21 días	12	57.15		B	
14 días	20	37.46		B	C
28 días	12	25.344		B	C
60 días	12	22.782		B	C
40 días	12	17.672			C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	T	Valor p ajustado
21 días - 14 días	19.7	10.8	(-12.0, 51.3)	1.82	0.460
28 días - 14 días	-12.1	10.8	(-43.8, 19.5)	-1.12	0.871
40 días - 14 días	-19.8	10.8	(-51.4, 11.9)	-1.83	0.454
60 días - 14 días	-14.7	10.8	(-46.3, 17.0)	-1.36	0.752
90 días - 14 días	225.9	11.5	(192.3, 259.5)	19.69	0.000
28 días - 21 días	-31.8	12.1	(-67.2, 3.6)	-2.63	0.103
40 días - 21 días	-39.5	12.1	(-74.9, -4.1)	-3.26	0.020
60 días - 21 días	-34.4	12.1	(-69.8, 1.0)	-2.84	0.062
90 días - 21 días	206.2	12.7	(169.1, 243.3)	16.26	0.000
40 días - 28 días	-7.7	12.1	(-43.1, 27.7)	-0.63	0.988
60 días - 28 días	-2.6	12.1	(-38.0, 32.8)	-0.21	1.000
90 días - 28 días	238.0	12.7	(200.9, 275.1)	18.77	0.000
60 días - 40 días	5.1	12.1	(-30.3, 40.5)	0.42	0.998
90 días - 40 días	245.7	12.7	(208.6, 282.8)	19.38	0.000
90 días - 60 días	240.6	12.7	(203.5, 277.7)	18.97	0.000

Nivel de confianza individual = 99.54%

Comparación de concentración de actividad de GST en cerebro por edad.

ANOVA de un solo factor: 14, 21, 28, 40, 60 y 90 días

Metodología

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$
<i>Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis</i>	

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	6	14 días, 21 días, 28 días, 40 días, 60 días, 90 días

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	186.27	37.2548	37.44	0.000
Error	99	98.51	0.9950		
Total	104	284.78			

Resumen del modelo

S	R ²	R ² (ajustado)	R ² (pred)
0.997506	65.41%	63.66%	60.70%

Medias

Factor	N	Media	Desviación estándar	IC de 95%
14 días	18	5.985	0.856	(5.519, 6.452)
21 días	18	5.633	0.610	(5.166, 6.099)
28 días	18	6.036	0.737	(5.569, 6.503)
40 días	18	4.918	0.718	(4.451, 5.384)
60 días	18	4.965	0.635	(4.499, 5.432)
90 días	15	9.093	1.980	(8.582, 9.604)

Desv.Est. agrupada = 0.997506

Comparaciones en parejas de Tukey con confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación		
90 días	15	9.093	A		
28 días	18	6.036		B	
14 días	18	5.985		B	
21 días	18	5.633		B	C
60 días	18	4.965			C
40 días	18	4.918			C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	T	Valor p ajustado
21 días - 14 días	-0.353	0.333	(-1.319, 0.614)	-1.06	0.896
28 días - 14 días	0.051	0.333	(-0.916, 1.017)	0.15	1.000
40 días - 14 días	-1.067	0.333	(-2.034, -0.101)	-3.21	0.022
60 días - 14 días	-1.020	0.333	(-1.986, -0.054)	-3.07	0.032
90 días - 14 días	3.108	0.349	(2.094, 4.121)	8.91	0.000
28 días - 21 días	0.403	0.333	(-0.563, 1.370)	1.21	0.829
40 días - 21 días	-0.715	0.333	(-1.681, 0.252)	-2.15	0.271
60 días - 21 días	-0.667	0.333	(-1.634, 0.299)	-2.01	0.346
90 días - 21 días	3.461	0.349	(2.447, 4.474)	9.92	0.000
40 días - 28 días	-1.118	0.333	(-2.084, -0.152)	-3.36	0.014
60 días - 28 días	-1.071	0.333	(-2.037, -0.104)	-3.22	0.021
90 días - 28 días	3.057	0.349	(2.044, 4.071)	8.77	0.000
60 días - 40 días	0.047	0.333	(-0.919, 1.014)	0.14	1.000
90 días - 40 días	4.175	0.349	(3.162, 5.189)	11.97	0.000
90 días - 60 días	4.128	0.349	(3.114, 5.141)	11.84	0.000

Nivel de confianza individual = 99.55%

Comparación de concentración de TBARS en cerebro en función de la dosis de plomo

ANOVA de un solo factor: control, 2 a 7 dosis

Metodología

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	7	Control, 2 dosis, 3 dosis, 4 dosis, 5 dosis, 6 dosis, 7 dosis

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	2455.2	409.194	64.77	0.000
Error	77	486.5	6.318		
Total	83	2941.6			

Resumen del modelo

S	R ²	R ² (ajustado)	R ² (pred)
2.51352	83.46%	82.17%	80.32%

Medias

Factor	N	Media	Desviación estándar	IC de 95%
Control	12	25.181	1.805	(23.736, 26.626)
2 dosis	12	20.355	2.667	(18.910, 21.800)
3 dosis	12	17.449	2.796	(16.004, 18.894)
4 dosis	12	9.888	0.982	(8.443, 11.333)
5 dosis	12	17.376	1.821	(15.931, 18.821)
6 dosis	12	20.082	2.507	(18.637, 21.527)
7 dosis	12	27.90	3.93	(26.46, 29.35)

Desv.Est. agrupada = 2.51352

Comparaciones en parejas de Tukey con confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación		
7 dosis	12	27.90	A		
Control	12	25.181	A		
2 dosis	12	20.355		B	
6 dosis	12	20.082		B	
3 dosis	12	17.449		B	
5 dosis	12	17.376		B	
4 dosis	12	9.888			C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	T	Valor p ajustado
2 dosis - Control	-4.83	1.03	(-7.93, -1.72)	-4.70	0.000
3 dosis - Control	-7.73	1.03	(-10.84, -4.63)	-7.53	0.000
4 dosis - Control	-15.29	1.03	(-18.40, -12.19)	-14.90	0.000
5 dosis - Control	-7.81	1.03	(-10.91, -4.70)	-7.61	0.000
6 dosis - Control	-5.10	1.03	(-8.20, -1.99)	-4.97	0.000
7 dosis - Control	2.72	1.03	(-0.39, 5.83)	2.65	0.126
3 dosis - 2 dosis	-2.91	1.03	(-6.01, 0.20)	-2.83	0.082
4 dosis - 2 dosis	-10.47	1.03	(-13.57, -7.36)	-10.20	0.000
5 dosis - 2 dosis	-2.98	1.03	(-6.08, 0.13)	-2.90	0.069
6 dosis - 2 dosis	-0.27	1.03	(-3.38, 2.83)	-0.27	1.000
7 dosis - 2 dosis	7.55	1.03	(4.44, 10.65)	7.35	0.000
4 dosis - 3 dosis	-7.56	1.03	(-10.67, -4.46)	-7.37	0.000
5 dosis - 3 dosis	-0.07	1.03	(-3.18, 3.03)	-0.07	1.000
6 dosis - 3 dosis	2.63	1.03	(-0.47, 5.74)	2.57	0.151
7 dosis - 3 dosis	10.45	1.03	(7.35, 13.56)	10.19	0.000
5 dosis - 4 dosis	7.49	1.03	(4.38, 10.59)	7.30	0.000
6 dosis - 4 dosis	10.19	1.03	(7.09, 13.30)	9.93	0.000
7 dosis - 4 dosis	18.01	1.03	(14.91, 21.12)	17.55	0.000
6 dosis - 5 dosis	2.71	1.03	(-0.40, 5.81)	2.64	0.129
7 dosis - 5 dosis	10.52	1.03	(7.42, 13.63)	10.26	0.000
7 dosis - 6 dosis	7.82	1.03	(4.71, 10.92)	7.62	0.000

Nivel de confianza individual = 99.66%

Comparación de actividad de GST en cerebro en función de la dosis de plomo

ANOVA de un solo factor: control, 1 a 7 dosis

Metodología

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$
<i>Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis</i>	

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	8	Control, 1 dosis, 2 dosis, 3 dosis, 4 dosis, 5 dosis, 6 dosis, 7 dosis

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	7	69.11	9.8722	11.63	0.000
Error	136	115.46	0.8490		
Total	143	184.57			

Resumen del modelo

S	R ²	R ² (ajustado)	R ² (pred)
0.921398	37.44%	34.22%	29.87%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control	18	5.244	0.696	(4.815, 5.674)
1 dosis	18	6.812	0.832	(6.382, 7.241)
2 dosis	18	5.181	0.940	(4.752, 5.611)
3 dosis	18	5.755	1.449	(5.325, 6.184)
4 dosis	18	4.812	0.595	(4.383, 5.242)
5 dosis	18	5.225	1.000	(4.796, 5.655)
6 dosis	18	5.857	0.716	(5.427, 6.286)
7 dosis	18	6.742	0.874	(6.313, 7.172)

Desv.Est. agrupada = 0.921398

Comparaciones en parejas de Tukey con confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación			
1 dosis	18	6.812	A			
7 dosis	18	6.742	A	B		
6 dosis	18	5.857		B	C	
3 dosis	18	5.755			C	D
Control	18	5.244			C	D
5 dosis	18	5.225			C	D
2 dosis	18	5.181			C	D
4 dosis	18	4.812				D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
1 dosis - Control	1.567	0.307	(0.623, 2.512)	5.10	0.000
2 dosis - Control	-0.063	0.307	(-1.008, 0.882)	-0.21	1.000
3 dosis - Control	0.510	0.307	(-0.435, 1.455)	1.66	0.712
4 dosis - Control	-0.432	0.307	(-1.377, 0.513)	-1.41	0.853
5 dosis - Control	-0.019	0.307	(-0.964, 0.926)	-0.06	1.000
6 dosis - Control	0.612	0.307	(-0.333, 1.557)	1.99	0.491
7 dosis - Control	1.498	0.307	(0.553, 2.443)	4.88	0.000
2 dosis - 1 dosis	-1.630	0.307	(-2.575, -0.686)	-5.31	0.000
3 dosis - 1 dosis	-1.057	0.307	(-2.002, -0.112)	-3.44	0.017
4 dosis - 1 dosis	-1.999	0.307	(-2.944, -1.055)	-6.51	0.000
5 dosis - 1 dosis	-1.586	0.307	(-2.531, -0.642)	-5.17	0.000
6 dosis - 1 dosis	-0.955	0.307	(-1.900, -0.011)	-3.11	0.046
7 dosis - 1 dosis	-0.070	0.307	(-1.014, 0.875)	-0.23	1.000
3 dosis - 2 dosis	0.573	0.307	(-0.371, 1.518)	1.87	0.576
4 dosis - 2 dosis	-0.369	0.307	(-1.314, 0.576)	-1.20	0.930
5 dosis - 2 dosis	0.044	0.307	(-0.901, 0.989)	0.14	1.000
6 dosis - 2 dosis	0.675	0.307	(-0.270, 1.620)	2.20	0.359

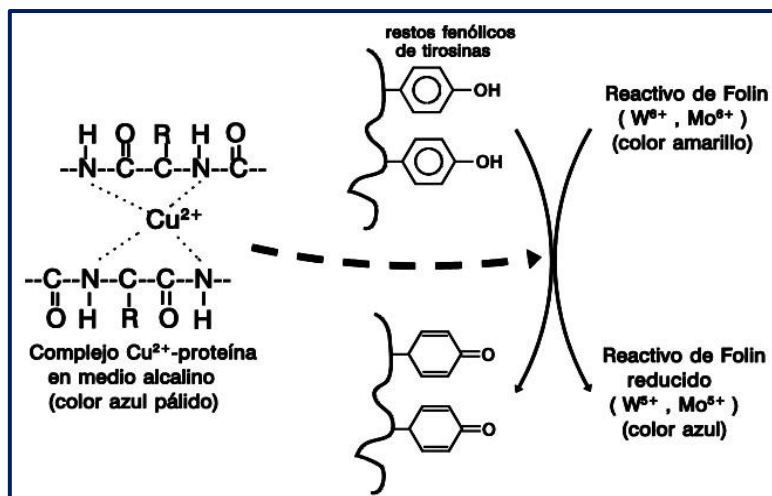
7 dosis - 2 dosis	1.561	0.307	(0.616, 2.506)	5.08	0.000
4 dosis - 3 dosis	-0.942	0.307	(-1.887, 0.003)	-3.07	0.052
5 dosis - 3 dosis	-0.529	0.307	(-1.474, 0.416)	-1.72	0.672
6 dosis - 3 dosis	0.102	0.307	(-0.843, 1.047)	0.33	1.000
7 dosis - 3 dosis	0.988	0.307	(0.043, 1.932)	3.22	0.034
5 dosis - 4 dosis	0.413	0.307	(-0.532, 1.358)	1.34	0.880
6 dosis - 4 dosis	1.044	0.307	(0.099, 1.989)	3.40	0.020
7 dosis - 4 dosis	1.930	0.307	(0.985, 2.874)	6.28	0.000
6 dosis - 5 dosis	0.631	0.307	(-0.314, 1.576)	2.05	0.450
7 dosis - 5 dosis	1.517	0.307	(0.572, 2.462)	4.94	0.000
7 dosis - 6 dosis	0.886	0.307	(-0.059, 1.830)	2.88	0.084

Nivel de confianza individual = 99.75%

APÉNDICE 3.

Curva de calibración de albúmina. Método de Lowry.

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 LambertBeer ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$). Este método consta de dos etapas (la interacción de los reactivos y las proteínas se señalan en la figura siguiente. 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 FolinCiocalteu 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).

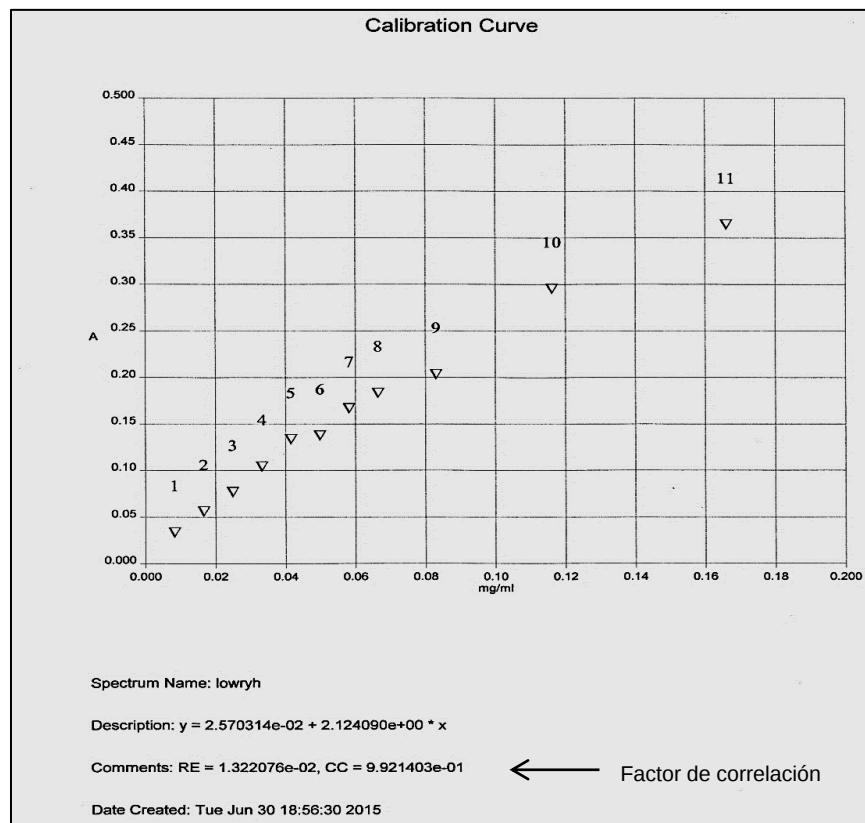


La curva de calibración se realiza para cuantificar la concentración de proteínas en una muestra. Se compara con la concentración de proteína de referencia estándar, en este caso, la referencia es albúmina sérica bovina. La curva de calibración de albúmina se lleva a cabo de la siguiente manera:

Tubo	concentración de albúmina (mg/mL)	volumen de agua (μL)	volumen de albúmina (μL)	volumen de desoxicolato de sodio (μL)	volumen de solución C (μL)	volumen de Folín Ciocalteu (μL)
blanco	0	800	0	100	2000	100
1	0.0083	795	5	100	2000	100
2	0.0166	790	10	100	2000	100
3	0.0249	785	15	100	2000	100
4	0.0332	780	20	100	2000	100
5	0.0415	775	25	100	2000	100
6	0.0498	770	30	100	2000	100
7	0.0581	765	35	100	2000	100
8	0.0664	760	40	100	2000	100
9	0.0830	750	50	100	2000	100
10	0.1162	730	70	100	2000	100
11	0.1660	700	100	100	2000	100

Nota: la solución C está compuesta por sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 0.5%, 2 gramos de hidróxido de sodio (NaOH) y 0.134 gramos de tartrato de sodio potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

La siguiente figura muestra un ejemplo de la curva de calibración con la albúmina sérica bovina (BSA). Es importante obtener un factor de correlación con un valor entre 0.99 y 1. Ya que, al estar normalizada la técnica, se cuantificará la concentración real de proteínas en la muestra.



Esta curva de calibración se lee en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda a 750 nm y se obtiene una ecuación de la recta, de la forma

$$y = mX + b$$

Dónde

“y” es la absorbancia

“m” es la pendiente de la recta

“b” es la ordenada al origen

“X” es la concentración de proteína que se desea conocer

De tal manera que usando la ecuación

$$X = \frac{y - b}{m}$$

Se podrá calcular la concentración de diferentes muestras analizadas. El programa proporciona de manera automática las concentraciones de las muestras analizadas.

La siguiente figura muestra la concentración de cada punto de la curva de calibración, además se obtiene la ecuación de la recta. Con ella, se puede calcular la concentración real de proteínas de cada muestra.

Date : 30/6/2015 Time : 18:56:30					
CALIBRATION					
Date: 30/06/2015 Time: 06:48:42 p.m.					
Instrument: PerkinElmer Lambda 25 Serial No: 501S08112712					
Method: lowryh					
Ordinate mode: Single wavelength					
Baseline: No correction (0.00 0.00)					
Analyst: sat					
Wavelength(s)	Sample ID	Concentration	Ord. value	Comment	
750.0	0.0 5.A01	0.0083 mg/ml	0.0280		
750.0	0.0 10.A02	0.0166 mg/ml	0.0505		
750.0	0.0 15.A03	0.0249 mg/ml	0.0712		
750.0	0.0 20.A04	0.0332 mg/ml	0.0986		
750.0	0.0 25.A05	0.0415 mg/ml	0.1279		
750.0	0.0 30.A06	0.0498 mg/ml	0.1319		
750.0	0.0 35.A07	0.0581 mg/ml	0.1612		
750.0	0.0 40.A08	0.0664 mg/ml	0.1777		
750.0	0.0 50.A09	0.0830 mg/ml	0.1976		
750.0	0.0 70.A10	0.1162 mg/ml	0.2898		
750.0	0.0 100.A11	0.1660 mg/ml	0.3586		
Equation: $y = 2.570314e-02 + 2.124090e+00 * x$					
Residual error: 0.013221					
Correlation coefficient: 0.992140					
Ecuación de la recta					

La siguiente tabla muestra la concentración de proteínas presentes en 10 µL de muestra.

Date : 30/6/2015 Time : 19:34:27					
Concentration Results					
Date: 30/06/2015 Time: 07:01:04 p.m.					
Instrument: PerkinElmer Lambda 25 Serial No: 501S08112712					
Method: lowryh					
Ordinate mode: Single wavelength					
Slit: UV/VIS: 1.00 nm					
Baseline: No correction (0.00 0.00)					
Result Filename: sam1.RCO					
Autozero performed: 30/06/2015 06:48:41 p.m.					
Analyst: sat					
Wavelength(s)	Sample ID	Ordinate	Factor	Concentration	Sample Info
750.0	0.0 sam1	0.3929	1.0000	0.1729 mg/ml	
750.0	0.0 sam2	0.4355	1.0000	0.1929 mg/ml	
750.0	0.0 sam3	0.6347	1.0000	0.2867* mg/ml	
750.0	0.0 sam4	0.5530	1.0000	0.2482* mg/ml	
750.0	0.0 sam5	0.6083	1.0000	0.2743* mg/ml	
750.0	0.0 sam6	0.6264	1.0000	0.2828* mg/ml	
750.0	0.0 sam7	0.4223	1.0000	0.1867 mg/ml	
750.0	0.0 sam8	0.4013	1.0000	0.1768 mg/ml	
750.0	0.0 sam9	0.6111	1.0000	0.2756* mg/ml	
750.0	0.0 sam10	0.6673	1.0000	0.3020* mg/ml	
750.0	0.0 sam11	0.6512	1.0000	0.2945* mg/ml	
750.0	0.0 sam12	0.5293	1.0000	0.2371* mg/ml	
750.0	0.0 sam13	0.7088	1.0000	0.3216* mg/ml	
750.0	0.0 sam14	0.5569	1.0000	0.2501* mg/ml	
750.0	0.0 sam15	0.7773	1.0000	0.3538* mg/ml	
750.0	0.0 sam16	0.7830	1.0000	0.3565* mg/ml	
750.0	0.0 sam17	0.7562	1.0000	0.3439* mg/ml	
750.0	0.0 sam18	0.7470	1.0000	0.3396* mg/ml	
750.0	0.0 sam19	0.4439	1.0000	0.1969 mg/ml	
750.0	0.0 sam20	0.4562	1.0000	0.2027 mg/ml	
750.0	0.0 sam21	0.7343	1.0000	0.3336* mg/ml	
750.0	0.0 sam22	0.7602	1.0000	0.3458* mg/ml	
750.0	0.0 sam23	0.7154	1.0000	0.3247* mg/ml	
750.0	0.0 sam24	0.8015	1.0000	0.3652* mg/ml	
750.0	0.0 sam25	0.4088	1.0000	0.1804 mg/ml	
750.0	0.0 sam26	0.3683	1.0000	0.1613 mg/ml	
750.0	0.0 sam27	0.4474	1.0000	0.1985 mg/ml	
750.0	0.0 sam28	0.4941	1.0000	0.2205 mg/ml	
750.0	0.0 sam29	0.4175	1.0000	0.1844 mg/ml	
750.0	0.0 sam30	0.4225	1.0000	0.1868 mg/ml	
750.0	0.0 sam31	0.3856	1.0000	0.1695 mg/ml	
750.0	0.0 sam32	0.3680	1.0000	0.1612 mg/ml	
750.0	0.0 sam33	0.3685	1.0000	0.1614 mg/ml	
750.0	0.0 sam34	0.4460	1.0000	0.1979 mg/ml	
750.0	0.0 sam35	0.3720	1.0000	0.1630 mg/ml	
750.0	0.0 sam36	0.4771	1.0000	0.2125 mg/ml	
750.0	0.0 sam37	0.6272	1.0000	0.2832* mg/ml	
750.0	0.0 sam38	0.6558	1.0000	0.2967* mg/ml	
750.0	0.0 sam39	0.3959	1.0000	0.1743 mg/ml	
750.0	0.0 sam40	0.4154	1.0000	0.1835 mg/ml	

El análisis se realiza por duplicado, y se obtienen dos concentraciones. A continuación, se realizan los cálculos para determinar el volumen de muestra (en mL) necesaria para obtener un miligramo de

proteína. Después se procede a estudiar la “Actividad de la enzima Glutación S-transferasa (GST) en riñón, hígado, cerebro, suero y orina.” Donde el proceso ya fue explicado en la metodología, inciso c. En este caso el cálculo se obtendrá de la siguiente manera.

Cálculo para determinar el volumen (mL) correspondiente a un miligramo de proteína.

1.- Por cada muestra se obtendrán dos concentraciones a partir del uso de la curva de calibración.

Por ejemplo:

Concentración 1: 0.1729 mg/mL

Concentración 2: 0.1929 mg/mL

2.- Se realizará el promedio de las concentraciones.

$$(0.1729 + 0.1929) / 2 = 0.1829 \text{ mg/mL}$$

3.- Se hará una relación de la siguiente manera:

0.1829 mg/mL corresponden a 10 µL

1 mg/mL ¿a cuánto corresponderá?

$$(1 \text{ mg/mL} * 10 \text{ µL}) / 0.1829 \text{ mg/mL} = 54.67 \approx 55 \text{ µL}$$

Y se hará una tabla para medir la actividad de la GST como se presenta a continuación:

Muestra	Amortiguador (µL)	DNCB (µL)	GSH (µL)	Proteína (µL)
cerebro R1	2364	300	300	36
cerebro R2	2362	300	300	38
cerebro R3	2361	300	300	39
cerebro R4	2358	300	300	42
cerebro R5	2364	300	300	36
cerebro R6	2366	300	300	34

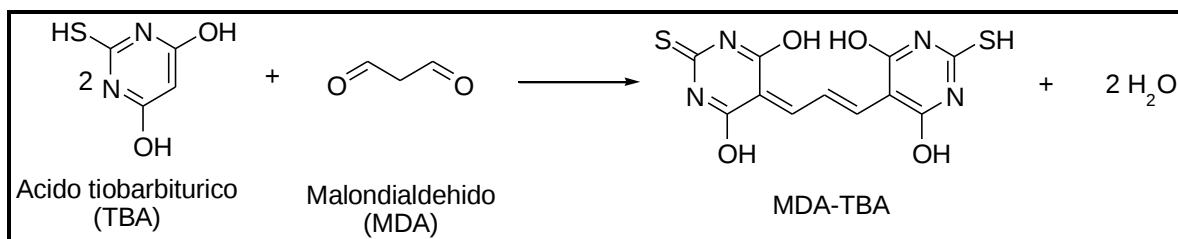
La función principal de las GST es desintoxicar los xenobióticos catalizando el ataque nucleofílico por GSH sobre átomos electrofílicos de carbono, azufre o nitrógeno de dichos sustratos xenobióticos no polares, evitando así su interacción con proteínas celulares cruciales y ácidos nucleicos. La función 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 otros modos exógenos, 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 mercaptúrico 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-dinitrobenceno, y los ensayos espectrofotométricos que utilizan este sustrato se usan comúnmente para informar la actividad de GST (Habig *et al*, 1974)

APÉNDICE 4.

Determinación de especies reactivas de oxígeno.

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 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).



Esquema de la reacción entre malondialdehído y ácido tiobarbitúricos (Feliciano, 2019).