



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
Campus Tuxtepec

LICENCIATURA EN CIENCIAS QUÍMICAS

***ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL PLOMO EN ROEDORES
DESDE UNA PERSPECTIVA QUIMIOMÉTRICA***

T E S I S

Presentado por:

MARIAZEL HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

Para obtener el título de:

LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Dra. Judith Amador Hernández

Director de Tesis

Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno

Codirector de Tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca

Mayo, 2013

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Del Papaloapan por haberme aceptado como una estudiante más de este plantel, por los beneficios otorgados durante mi permanencia.

A mi Directora de tesis la Dra. Judith Amador Hernández por la confianza, amistad, apoyo, motivación, y consejos brindados durante el desarrollo de este trabajo, por todo lo enseñado para completar mi formación profesional y personal.

A mi Co-Directora la Dra. Leticia G. Navarro Moreno por su colaboración, apoyo, observaciones, y consejos durante la escritura de la tesis, y por la gran amistad brindada.

Los sinodales encargados de la revisión de mi tesis, por sus observaciones y consejos para la mejora de la tesis. A los profesores que formaron parte de mi formación académica, agradezco a todos por sus consejos y su apoyo.

A mi tutora la Dra. María Concepción Salas Solís, por su amistad, cariño y consejos dados para seguir adelante en el camino del estudio.

A mi tutora MC. Roxana Martínez Pascual y al Dr. Omar Viñas Bravo, por brindarme su amistad, por los regañones, por las buenas charlas y el gran apoyo brindado para la culminación de este trabajo.

A la Dra. Sandra Del Moral por ser una gran amiga, por escucharme por los buenos consejos que me daba y por la motivación brindada durante mi permanencia en la universidad.

A las Químicas Luz del Carmen Quevedo Zarate y Leticia Saldaña Medina por su amistad brindada, apoyo y motivación durante mi estadía en la universidad.

Mis amigos Brenda, Raúl, Jade, Christopher, Thania, Yuritze, Narel, Goretty les agradezco infinitamente su amistad, apoyo y por estar siempre a mi lado.

DEDICATORIAS

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres el Sr. Candido Hernández Martínez (Q.E.P.D) y la Sra. Rosa Elena Sánchez Quevedo por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí, por toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

Mis abuelos Juana Quevedo Salomón (Q.E.P.D), Anselmo Sánchez Contreras, Inés Martínez Gómez y Francisco Hernández León (Q.E.P.D), por quererme y apoyarme en todo momento.

A mi hermano José Antonio por estar siempre conmigo apoyarme, quererme mucho, y por ser unos de los motores que me impulsaba día a día.

Agradezco a mi tía Guadalupe, a mi tío Antonio, a mi tía Silvia, a mi tío Anselmo a mis primos y sobrinos, y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

Agradezco infinitamente al amor de mi vida Ana Laura Rodríguez Pulido por su amor, su cariño, su apoyo brindado, por estar siempre conmigo, y los buenos consejos dados para seguir adelante.

Brenda por soportarme tanto tiempo, por todos los consejos y regaños que me dio cuando me sentía sola, por los momentos llenos de alegría, las risas, el llanto, la tristeza, por todo eso y más le agradezco infinitamente la dicha de que sea mi amiga.

Todos aquellos familiares y amigos que no recordé al momento de escribir esto. Ustedes saben quiénes son les agradezco mucho por todo el apoyo brindado.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
Capítulo 1. Introducción	
1.1. El plomo	3
1.1.1. Cuantificación de plomo en los seres humanos	12
1.1.2. Determinación de los efectos bioquímicos del plomo en los seres humanos	13
Justificación	15
Hipótesis	16
Objetivos	17
Capítulo 2. Antecedentes	
2.1. Efectos tóxicos del plomo	19
2.1.1. El plomo como agente nefrotóxico	19
2.1.2. El primer caso de estudio de intoxicación renal por plomo	23
2.1.3. El estudio de los efectos del plomo en los seres vivos	26
2.1.4. Exposición a plomo, generación de especies reactivas de oxígenos y daño celular	36
2.1.5. Glutatión S-transferasa	44
2.2. Análisis de la información a través de la quimiometría	49
2.2.1. Medidas de tendencia central	50
2.2.2. Pruebas de hipótesis	51
2.2.2.1. Pruebas de distribución	52
2.2.2.2. Identificación de datos aberrantes	55
2.2.2.3. Comparación de varianzas	55
2.2.2.4. Comparación de medias experimentales	56
2.2.2.5. Análisis de varianza (ANOVA)	57
2.2.3. Resumir, correlacionar y visualizar: los objetivos del Análisis de Datos	60
2.2.3.1. Preprocesamiento de datos	61
2.2.3.2. Coeficiente de correlación de Pearson	62

ÍNDICE GENERAL

Covarianza y correlación	64
2.2.3.3. Correlación en series de tiempo	65
2.2.3.4. Análisis de conglomerados	66
Análisis Jerárquico de Conglomerados	69
Método de las K-medias	70
2.2.3.5. Análisis de Componentes Principales (PCA)	72
2.2.3.6. Análisis Procrusteano Generalizado (GPA)	76
Capítulo 3. Metodología	
3.1. Equipos y reactivos	81
3.2. Selección de roedores y grupos de estudio	81
3.3. Determinación de plomo en muestras biológicas	82
3.3.1. Preparación de las muestras de suero y eritrocitos de acuerdo a la NOM-199-SSA1-2000	82
3.3.2. Preparación de las muestras de orina	84
3.3.3. Preparación de muestras sólidas	84
3.4. Cuantificación de plomo por espectrometría de absorción atómica con vaporización electrotérmica	85
3.5. Ensayos bioquímicos	86
3.5.1. Medición de proteínas por el método de Lowry	86
3.5.1.1. Curva de calibración	86
3.5.1.2. Medición de proteínas totales en las muestras seleccionadas	87
3.5.2. Medición de la actividad de la enzima Glutación S-transferasa (GST)	87
3.5.3. Medición de Especies Reactivas de Oxígeno (EROS)	88
3.5.4. Examen general de orina (EGO)	88
3.6. Análisis estadístico de datos	89
Capítulo 4. Resultados	
4.1. Modelo experimental	92

ÍNDICE GENERAL

4.2. Peso corporal	92
4.3. Peso de los órganos	93
4.4. Volumen de orina	94
4.5. Determinación de plomo en riñón, hígado, cerebro, sangre (suero y paquete globular) y orina	94
4.6. Determinación de proteína total	95
4.7. Actividad de GST	96
4.8. Especies reactivas de oxígeno	96
4.9. Examen general de orina	97
4.10. Análisis quimiométrico de los datos obtenidos	99
4.11. Comparación de los grupos experimentales (control y expuesto)	102
4.11.1. Parámetros físicos	102
4.11.2. Parámetros químicos: concentración de plomo	107
4.11.3. Parámetros bioquímicos	107
4.12. Correlación de parámetros en organismos expuestos	110
4.13. Análisis de componentes principales y análisis de conglomerados por el método de las K medias	110
4.14. Análisis de Conglomerados por Jerarquías	117
4.15. Análisis Procrusteano Generalizado	124
4.16. Examen general de orina (EGO)	128
4.16.1. Grupo control y expuesto antes del tratamiento	128
4.16.2. Grupo control y expuesto después del tratamiento	129
Capítulo 5. Discusión	
5.1. Parámetros individuales	135
5.2. Análisis multivariante	143
Capítulo 6. Conclusiones y Perspectivas	
6.1. Conclusiones	150
6.2. Perspectivas	151
Bibliografía	152

ÍNDICE GENERAL

Anexo

165

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mediciones Realizadas para diferentes parámetros en ratas expuestas a plomo bajo esquemas de intoxicación diferentes	32
Tabla 2. Organización de datos para el ANOVA simple	59
Tabla 3. Resumen de las sumas de cuadrados	59
Tabla 4. Comparación de medias por ANOVA simple	60
Tabla 5. Composición de muestras estándar, suero y eritrocitos por calibración directa. Las concentraciones de las disoluciones de trabajo están dadas en $\mu\text{g/L}$	83
Tabla 6. Programa de temperatura del horno de grafito empleado para la cuantificación de plomo	85
Tabla 7. Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry modificado (Lowry, 1951)	86
Tabla 8. Peso de los animales en diferentes etapas del proceso experimental. Los valores muestran el promedio más la desviación estándar del número de determinaciones mostradas entre paréntesis	93
Tabla 9. Peso de los órganos de animales control y expuesto a una dosis de 25 mg de plomo/Kg de peso, al finalizar el periodo de experimentación. Los valores muestran el promedio más la desviación estándar del número de determinaciones mostradas entre paréntesis	93
Tabla 10. Valor promedio y desviación estándar del volumen de orina. Los valores muestran el promedio más la desviación estándar del número de determinaciones mostradas entre paréntesis	94
Tabla 11. Concentración de plomo en las diferentes muestras estudiadas de ratas control y expuestas. Los valores muestran el promedio más la desviación estándar del número de determinaciones mostradas entre paréntesis	95
Tabla 12. Concentración de proteína en las diferentes muestras de ratas control y expuestas. Los valores muestran el promedio más la desviación estándar del número de determinaciones mostradas entre paréntesis	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 13. Actividad de GST en las diferentes muestras. Los valores muestran el promedio más la desviación estándar del número de determinaciones mostradas entre paréntesis	96
Tabla 14. Concentración de EROS en las muestras de ratas control y expuestas. Los valores muestran el promedio más la desviación estándar del número de determinaciones mostradas entre paréntesis	97
Tabla 15. Examen general de orina de ratas control (C1-C5) y ratas expuestas (E1-E6) al inicio del tratamiento con plomo	98
Tabla 16. Examen general de orina de ratas control (C1, C2) y ratas expuestas (E1-E6) al final del tratamiento con plomo	98
Tabla 17. Concentración de Plomo en las diferentes muestras	100
Tabla 18. Actividad de GST en las diferentes muestras	101
Tabla 19. Análisis de Varianza en dos sentidos para el volumen de orina registrado durante el estudio	106
Tabla 20. Coeficientes de correlación de Pearson estimados para las variables identificadas como significativas en la sección 4.1	111
Tabla 21. ANOVA multivariante	125
Tabla 22. Examen general de orina de los grupos control y expuesto antes del tratamiento	128
Tabla 23. Examen general de orina de los grupos control y expuesto al final del tratamiento	129

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fuentes principales de exposición al plomo por los seres humanos (modificado de Calderón, 2008)	4
Figura 2. Distribución del plomo en los órganos (tomado de Navarro, 2004)	19
Figura 3. Procesos por los cuales el plomo entra a las células renales del túbulo proximal (tomado de Navarro, 2004)	20
Figura 4. Cambios morfológicos en riñones expuestos plomo de manera crónica. A, B y C muestran la membrana basal, las mitocondrias y los núcleos de células de túbulo proximal de animales sin exponer al metal y D, E y F los cambios que ocurren en las células de animales expuestos a plomo (tomado de Navarro, 2009)	22
Figura 5. Reacción tipo Fenton por la generación de radicales libres (tomado de SWARA, 2009)	37
Figura 6. Reacciones de generación directa de especies reactivas de oxígeno por metales (tomado de Birben, 2012)	38
Figura 7. Modo de acción de las especies reactivas de oxígeno (Modificado de Swaran, 2009)	39
Figura 8. Esquema general de acción del plomo (Modificado de Gurer, 2000)	42
Figura 9. Daño en humanos ocasionado por plomo (la columna de en medio se refiere a la concentración de plomo en sangre dada en mg/dL) (Modificado de Gurer, 2009)	43
Figura 10. Estructura general de la Glutación S-transferasa (A) y metabolismo de los xenobióticos (B). La flecha indica el lugar de participación de la enzima (tomado de Recombinant_Human_Glutation_S_transferase_pi_1)	45
Figura 11. Familia de genes codificantes para GST citosólica, mitocrosomal y mitocondrial (tomado de Pool-Zobel, 2005)	48
Figura 12. Reconocimiento de Pautas (tomado de Sharaf, 1986)	67
Figura 13. Tipos de técnicas de Reconocimiento de Pautas (tomado de Sharaf, 1986)	68
Figura 14. Representación de un dendograma	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 15. Principales pasos de la técnica de Análisis de Conglomerados por K-medias: a) inicialización con K centroides, b) aplicación de la regla de distancia mínima para identificación de grupos, donde las líneas punteadas muestran la distancia de cada objeto hacia todos los centroides, c) integración de grupos, d) re-estimación de centroides (tomado de Mirkin, 2011)	72
Figura 16. Representación de la serie de objetos en función de las variables originales	73
Figura 17. Proyección de dos Componentes Principales (líneas punteadas) en los ejes de coordenadas originales	74
Figura 18. Representación de las etapas del GPA: a) datos originales, b) traslación, c) reflexión, d) rotación, e) rotación general para PCA y f) consenso (tomado de Massart, 1998)	77
Figura 19. Peso a lo largo del estudio: organismos control (negro) y expuestos (rojo)	102
Figura 20. Peso de hígado, riñón y cerebro de animales control al inicio (negro) y al final del estudio (rojo). (H: hígado, R: riñón, C: cerebro)	104
Figura 21. Peso de hígado (H), riñón (R) y cerebro (C) de organismos control (negro) y expuestos (rojo) al final del periodo de experimentación	105
Figura 22. Volumen de orina al inicio y al final del periodo de experimentación de organismos control (negro) y expuestos (rojo) (In: inicial, Fi: final)	106
Figura 23. Contenido de plomo en las diferentes muestras analizadas: organismos control (negro) y expuestos (rojo). (H: hígado, R: riñón, E: eritrocitos, Sr: suero, Or I: orina inicial, Or Fi: orina final)	107
Figura 24. Contenido de proteínas en muestras biológicas: organismos control (negro) y expuestos (rojo). (Sn: sangre, H: hígado, R: riñón, C: cerebro, Or I: orina inicial, Or Fi: orina final)	108
Figura 25. Actividad de GST en muestras de sangre (Sn), hígado (H), riñón (R), cerebro (C), orina inicial (Or I) y orina final (Or Fi) de animales control (negro) y expuestos (rojo)	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 26. Especies reactivas de oxígeno medidas como especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hígado, riñón, cerebro y suero de organismos control (negro) y expuestos a plomo (rojo)	109
Figura 27. Identificación de factores significativos en función del PRESS de validación	112
Figura 28. Representación de los objetos en el espacio definido por los tres factores considerados como significativos, considerando todas las variables estimadas en el estudio. (e: expuesto, c: control)	113
Figura 29. Representación de todas las variables originales, en el espacio definido por los tres factores considerados como significativos	114
Figura 30. Identificación de factores significativos en función del PRESS de validación	115
Figura 31. Representación de los objetos en el espacio definido por los dos factores considerados como significativos, considerando sólo nueve variables para describirlos	116
Figura 32. Representación de las nueve variables originales, en el espacio definido por los dos factores considerados como significativos	117
Figura 33. Representación del Análisis Jerárquico por objeto, considerando el método de enlace o acoplamiento completo, a partir de 27 variables independientes	118
Figura 34. Representación del Análisis Jerárquico por objeto, considerando el método de enlace o acoplamiento completo, a partir de 9 variables independientes	119
Figura 35. Representación del Análisis Jerárquico por objeto, considerando el método de enlace o acoplamiento completo, a partir de las coordenadas de los dos Factores	119
Figura 36. Representación del Análisis Jerárquico de 27 variables, considerando el método de enlace o acoplamiento simple	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 37. Representación del Análisis Jerárquico de 27 variables, considerando el método de enlace o acoplamiento completo	121
Figura 38. Representación del Análisis Jerárquico de 27 variables, considerando el método de enlace o acoplamiento por centroide	122
Figura 39. Representación del Análisis Jerárquico de 9 variables, considerando el método de enlace o acoplamiento simple	123
Figura 40. Representación del Análisis Jerárquico de 9 variables, considerando el método de enlace o acoplamiento por centroide	123
Figura 41. Representación del Análisis Jerárquico de nueve variables, considerando el método de enlace o acoplamiento completo	124
Figura 42. Residuales por parámetro, derivados del Análisis Procrusteano Generalizado. (Peso H: peso hígado, Peso R: peso riñón, Vol Or F: volumen de orina final, Pb Sro: plomo en suero, Pb E: plomo en eritrocitos, Pb R: plomo en riñón, Prot Sn: proteína en sangre, Prot C: proteína en cerebro, GST R: GST riñón)	126
Figura 43. Consenso derivado del Análisis Procrusteano Generalizado	127
Figura 44. Identificación de factores significativos en función del PRESS de validación en el PCA aplicado a los parámetros medidos de forma semicuantitativa en el examen general de orina	130
Figura 45. Representación de los objetos en el espacio definido por los dos factores considerados como significativos en el PCA aplicado a los parámetros de EGO	131
Figura 46. Representación de las cuatro variables, en el espacio definido por los dos factores considerados como significativos en el PCA aplicado a EGO	132
Figura 47. Representación del Análisis Jerárquico por objeto, considerando el método de enlace o acoplamiento completo en el análisis de EGO	132
Figura 48. Representación del Análisis Jerárquico por variable, considerando el método de enlace o acoplamiento completo en análisis de los parámetros de EGO	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 49. Modelo propuesto sobre el efecto de la intoxicación con plomo mediante un esquema de intoxicación aguda empleando siete dosis de 25 mg/kg de peso vía intraperitoneal utilizando datos bioquímicos experimentales analizados por técnicas quimiométricas 148

RESUMEN

El plomo constituye uno de los elementos contaminantes con mayor abundancia en la tierra. En este trabajo se realizó el estudio de los efectos del plomo en un modelo animal mediante el uso de un esquema de intoxicación aguda constituida por siete inyecciones administradas vía intraperitoneal en un periodo de 15 días. Los estudios bioquímicos proporcionaron resultados que fueron analizados por técnicas quimiométricas, mismas que sirvieron para establecer las relaciones entre los diversos parámetros evaluados y con ello, poder restablecer un posible modelo relacionado con los efectos que el plomo tiene al llegar a las células y romper el equilibrio de las mismas.

Para conocer a fondo el daño que causa el plomo se hicieron determinaciones bioquímicas en hígado, riñón, cerebro, sangre, orina tales como: concentración de proteína, actividad de la enzima Glutación S-transferasa, determinación de la concentración de plomo por absorción atómica, medición de las especies reactivas al ácido barbitúrico y examen general de orina; también se registró el peso corporal de los animales, el peso de los órganos y el volumen de orina al inicio y final del tratamiento.

Para la evaluación de los resultados, se usaron diversas herramientas quimiométricas, entre las que destacan la aplicación del Análisis de Componentes Principales (PCA), el Análisis Jerárquico de Conglomerados y Análisis Procrusteano Generalizado (GPA). Finalmente, los resultados obtenidos del análisis quimiométrico fueron interpretados desde el punto de vista bioquímico y/o fisiológico.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL PLOMO

El plomo es un metal pesado que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, sin embargo no es esencial para los seres vivos. Se le considera como el elemento más abundante en el medio ambiente. Debido a lo anterior y a sus características fisicoquímicas, este elemento ha formado parte esencial en la vida de los seres humanos a lo largo de su historia. Bastaría con realizar una búsqueda a lo largo de las diferentes etapas en la vida del hombre para comprobar que este elemento ha sido utilizado por la mayoría de las civilizaciones desde tiempos anteriores a la era Cristiana (Aguilar, 1996).

De acuerdo a sus propiedades químicas y físicas el plomo puede formar diferentes compuestos y aleaciones, ya sean naturales o industriales; orgánicos o inorgánicos. Entre los compuestos más utilizados en la industria se encuentran, entre otros, los óxidos de plomo, el tetraetilo de plomo y los silicatos de plomo (Ferrer, 2003).

Lo anterior nos ayuda a comprender el porqué, actualmente, las fuentes más frecuentes de exposición a plomo se encuentran constituidas por las emisiones provenientes de las industrias minero-metalúrgicas y las metal-mecánicas; los establecimientos recicladores de baterías; los pigmentos para pinturas, así como la producción y el uso de la alfarería vidriada para la preparación y almacenamiento de alimentos (NOM-199-SSA1-2000).

Los seres humanos pueden entrar en contacto con el plomo mediante diferentes formas de exposición, mismas que se explican a continuación. En primer lugar se encuentra la exposición laboral, la cual se caracteriza por la exposición del trabajador a este metal por arriba de los niveles recomendados para una industria que maneja grandes concentraciones de plomo. En segundo lugar se tiene la contaminación para-laboral, la cual sucede cuando el trabajador se contamina en el trabajo y, por un mal sistema de protección y de seguridad,

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

lleva el plomo a su domicilio transportándolo en su ropa y/o herramientas de trabajo y contaminando, de esta manera, a los miembros de su familia. En tercer lugar está la contaminación laboral-domiciliaria, misma que ocurre cuando se realizan en el domicilio las actividades laborales, como en las comunidades rurales o artesanales. El cuarto lugar lo ocupa la contaminación ambiental, la que es común en ambientes abiertos, debido a la cercanía con las industrias sin medidas de protección ambiental, yacimientos naturales o sitios de desechos industriales. Por último, se encuentra a la contaminación domiciliaria, la que ocurre cuando los elementos contaminantes se encuentran en el interior del hogar, ya sea en la forma de preparar, consumir o almacenar alimentos o agua, o por la presencia del contaminante en la pintura de las paredes u otros accesorios en el mismo (Figura 1) (Calderón, 2008).

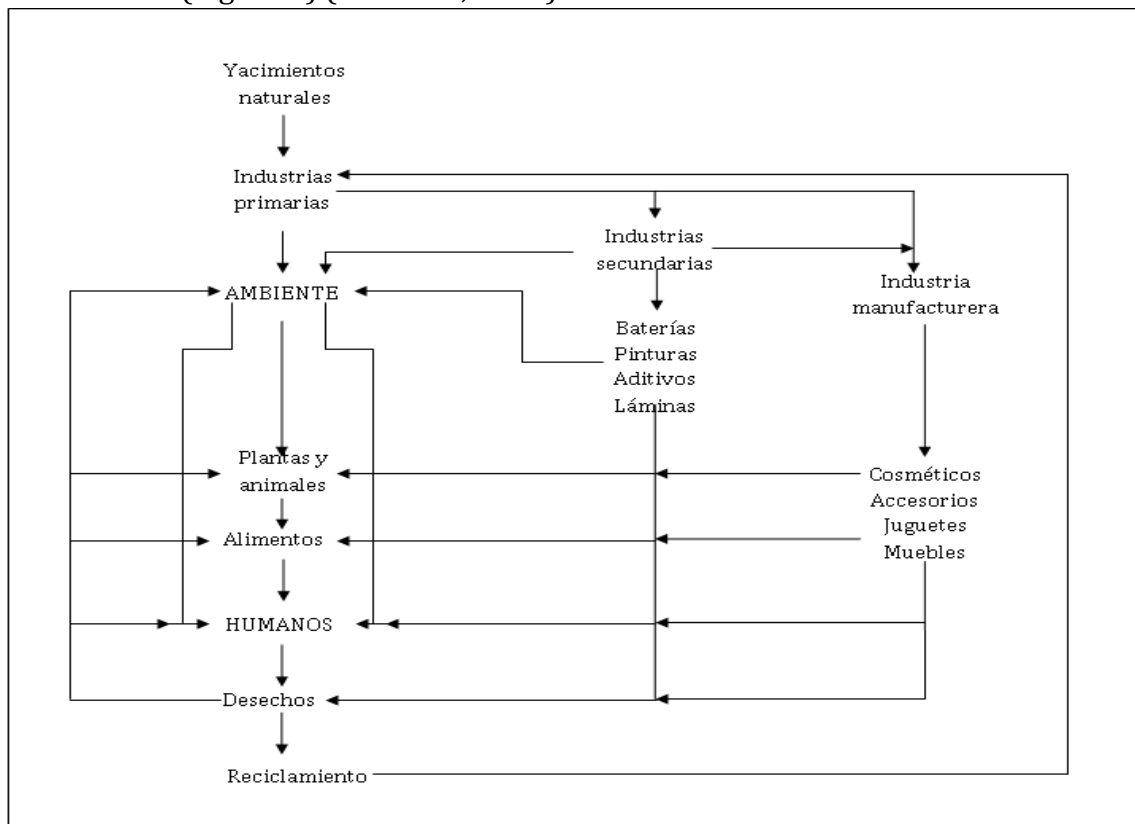


Figura 1. Fuentes principales de exposición al plomo por los seres humanos (modificado de Calderón, 2008).

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Como consecuencia del uso exagerado del plomo, los estudios de toxicidad del mismo han demostrado que éste puede acumularse en el organismo debido a su dispersión en el aire, la comida, el agua y el polvo (Patra, 2001; Sivaprasad, 2003). La exposición aguda y prolongada a plomo causa severos daños a la salud en los seres humanos y animales, donde afecta a los sistemas gastrointestinal, hematopoyético, cardiovascular, nervioso, inmune, reproductivo y excretor (Clarkson, 2006).

Una pregunta que puede surgir a lo largo del estudio de este metal es la siguiente: ¿Por qué el plomo es tan dañino? Una de las posibles respuestas puede encontrarse dentro del siguiente extracto del artículo titulado: “Una historia como otra cualquiera: el tetraetilplomo” misma que se narra a continuación.

Gasolinas: Plomo en nuestras vidas.

Lamentablemente la historia se repite de innumerables formas...corrupción, manipulación de la información, violación de los derechos humanos elementales incluso en países "libres" y se destapa un escándalo para nacer otro en cualquier otro lugar... seguimos sin revelarnos para exigir enérgicamente a los tribunales constitucionales más transparencia y menos influencia política, en la que al final rebuscando, se encuentran grandes corporaciones que mueven a muchas marionetas.

“Hacia finales de la década de los años cuarenta, un estudiante de la Universidad Norteamericana de Chicago, llamado Clair Patterson estaba intentando encontrar un método de medición para determinar la edad de la Tierra que en aquella época rompía la cabeza de algunos científicos.

Todas las muestras de rocas de aquellos experimentos, terminaban contaminadas. Casi todas aquellas muestras contenían unas 200 veces más plomo del que debía haber de forma natural. Patterson tardaría muchos años en

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

averiguar que la razón de aquello era causa de un inventor de Ohio conocido por Thomas Midgley, hijo.

Midgley era ingeniero y se interesó mucho en las aplicaciones industriales de la química. En 1912 trabajaba para la General Motors Research Corporation en Dayton (Ohio) e investigó sobre un compuesto, el tetraetilo de plomo, y descubrió que reducía de forma significativa el fenómeno conocido como trepidación o golpeteo del motor al a cabo la combustión

En aquellos primeros años del siglo XX ya era conocida la peligrosidad del plomo y se podía encontrar este metal pesado en muchos productos de consumo alimentario.

Las latas de conservas se sellaban con plomo y los depósitos de agua se recubrían igualmente. Los de nuestra generación aún hemos conocido las casas de nuestros abuelos con tuberías de este metal tóxico.

Hasta se rociaba la fruta con arseniato de plomo que era utilizado como pesticida. Estaba presente también en la composición de los tubos de la pasta dentífrica, algo que hacía que se acumulase restos de este metal en la dentadura humana (estudios que a lo largo de los años, han ayudado a esclarecer los efectos nocivos del plomo en nuestras vidas).

Pero nada tuvo unos efectos tan nefastos para LA SALUD HUMANA y en la dispersión de este veneno en la atmósfera como en los ecosistemas de la toda la Tierra, como su uso como aditivo en los combustibles.

El plomo es neurotóxico. Si ingieres mucho, puede dañar el cerebro y afectar al sistema nervioso central de una forma irreversible. No hay antídotos ni medicamentos que puedan reducir las dosis almacenadas en el organismo ya que no existe forma conocida en la actualidad para que puedan ser eliminadas.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Entre los síntomas detectables relacionados con la exposición excesiva al contaminante, esta la ceguera, el insomnio, la insuficiencia renal, la pérdida de audición, el cáncer, la parálisis y las convulsiones. Produce alucinaciones bruscas y aterradoras, que perturban por igual a víctimas manipulantes de este producto como a observadores, que suelen ir seguidas de estado de coma y muerte. Y no hace falta incorporar demasiado tóxico de este en el organismo para notar sus efectos. Quieren hacernos creer que somos los responsables de esta situación cuando son las administraciones ineficaces, y las leyes que no se aplican, las responsables de los usos inadecuados y suicidas ante las tecnologías nada verificadas de sus productos no controlados éticamente hacia una sociedad que no conoce, que no sabe, que cree a pies juntillas que los gobiernos y sus políticos velan por su salud... por su bienestar.

Pues NO... NO es del todo así.

En aquella época el plomo era fácil de extraer y de trabajar, y era vergonzosamente rentable producirlo a escala industrial. Una vez más en la historia social podemos ser testigos de los pocos escrúpulos y de los pocos remordimientos que se tuvo para incorporarlo a los combustibles por el pelotazo económico que suponía frente a los carburantes mezclados con alcohol menos rentables comercialmente hablando, y menos impactantes sobre el medio ambiente.

Así que en 1923, tres grandes empresas estadounidenses, General Motors, Du Pont y Standard Oil de Nueva Jersey (hoy EXXON) crearon una empresa conjunta, la Ethyl Gasoline Corporation (más tarde sólo Ethyl Corporation) para fabricar y distribuir el plomo tetraetílico, tanto como el mundo estuviese dispuesto a comprar, y eso ha resultado a lo largo del tiempo, muchísimo más de lo imaginable en aquel momento.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Le llamaron "etilo" a aquel componente, porque les pareció un nombre más amistoso y menos tóxico que "plomo" y lo introdujeron para el consumo público el 1 de febrero de 1923. Los trabajadores de aquellas fábricas casi de inmediato empezaron a acusar sus efectos, a tambalearse y la confusión mental característica del recién envenenado. La empresa de inmediato se sumergió en una política de manipulación de la realidad inflexible y serena, que les resultaría rentable durante decenios.

En las primeras semanas los delirios irreversibles se fueron extendiendo y murieron unas 15 personas, y otros tantos enfermaron en muchos casos de gravedad. El número exacto de afectados no se conoció ni se conoce en nuestros días ya que la empresa consiguió silenciar las noticias y a los medios de comunicación a su alcance.

Cuando empezaron a circular los rumores sobre los peligros de este producto, el inventor Thomas Midgley, decidió ofrecer unas demostraciones a los periodistas pero ya estaba afectado por los efectos nocivos cuando investigaba y no se acercaba al producto o a las instalaciones donde se fabricaba, si podía evitarlo.

Volviendo a los experimentos de Patterson, que intentaba averiguar el hecho de que hubiera tanto plomo en la atmósfera después de 7 años de experimentos, se quedó asombrado al enterarse de lo poco que se sabía sobre los efectos del plomo en los humanos... cosa nada sorprendente si tenemos en cuenta que durante cuarenta años todos los estudios sobre los efectos del plomo los habían costado en exclusiva los fabricantes de aditivos de plomo.

En uno de los estudios, un médico que no estaba especializado en patología química, emprendió un programa que pedía a voluntarios que aspirasen o ingiriesen elevadas cantidades de plomo. Luego les examinaban la orina y las heces. No se sabía que el plomo no se excreta como producto de

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

desecho. Se acumula más bien en los huesos y en la sangre -eso es lo que lo hace tan peligroso- y entonces las autoridades sanitarias no examinaron ni los huesos ni la sangre de los voluntarios. Y en consecuencia entonces -creemos que con la influencia de las grandes corporaciones implicadas- se dio el visto bueno sanitario al plomo.

Pero Patterson no se dio por vencido y siguió persiguiendo al plomo comprobando que aproximadamente el 90% de este metal pesado presente en el medio provenía de los tubos de escape de los automóviles, pero no podía demostrarlo. El problema es el de siempre, el que los afectados son los que tienen que demostrar contra aquellos que producen y se enriquecen, comprando las voluntades, abogados y gabinetes que inundan de informes amañados todos los despachos a los que tienen acceso, pasando años hasta que se puedan obtener pruebas. Y las vidas que se lleva todo ello por delante nunca cuentan... siempre se llega demasiado tarde.

Lo que Patterson descubrió fue que antes de 1923 casi no había plomo en la atmósfera y que los niveles de plomo habían ido aumentando constante y peligrosamente desde entonces. A partir de aquel momento fue la obsesión de este hombre que convirtió su vida en la misión de que se retirase el plomo de la gasolina.

Aquello resultaría una campaña infernal contra los intereses de la Ethyl, una empresa poderosa con muchos amigos en puestos elevados (entre sus directivos habían figurado el magistrado del Tribunal Supremo Lewis Powell y Gilbert Grosvenor de la National Geographic Society).

Patterson se encontró con la sorpresa de que retiraron sus fondos para continuar sus investigaciones o que le resultaban difíciles de conseguir. El Instituto Americano del Petróleo canceló su contrato de investigación que tenía con él y lo mismo hizo el servicio de Salud Pública de Estados Unidos, un

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

organismo oficial supuestamente neutral. Patterson fue convirtiéndose cada vez en un problema para su institución, y los miembros del consejo de administración del Instituto Tecnológico de California fueron objeto de repetidas presiones de directivos de la industria del plomo para que le hiciesen callar o prescindiesen de él.

Según decía en el año 2000 Jamie Lincoln Kitman en *The Nation*, ejecutivos de Ethyl se ofrecieron a financiar una cátedra en el instituto "si se mandaba a Patterson hacer las maletas". Se llegó al absurdo de excluirle de una comisión del Consejo Nacional de Investigación que se creó en 1971 para investigar los peligros del envenenamiento con plomo atmosférico, a pesar de ser por entonces indiscutiblemente el especialista más destacado del país en plomo atmosférico.

Para gran honra suya, Patterson se mantuvo firme a las presiones y amenazas que recibió de forma constante. Finalmente gracias a sus esfuerzos, se aprobó la Ley de Aire Limpio de 1970 y acabaría consiguiendo que se retirase del mercado toda la gasolina plomada en los Estados Unidos en 1986. Casi inmediatamente se redujo en un 80% el nivel de plomo en la sangre de los estadounidenses. Pero como el plomo es para siempre, los habitantes actuales del país tienen cada uno de ellos 625 veces más plomo en la sangre del que tenían los que vivieron en el país hace un siglo.

La cantidad de plomo en la atmósfera sigue aumentando también, de una forma completamente legal, en unas cien mil toneladas al año, procedentes sobre todo de la minería, la fundición y las actividades industriales. Estados Unidos prohibió también el plomo en la pintura de las casas para interior "44 años después que la mayoría de los países de Europa", como indica Macgrayne. Resulta notable que no se prohibiese la soldadura de plomo en los envases de alimentos en el país hasta 1993, pese a su toxicidad alarmante.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

En cuanto a la Ethyl Corporation, aún es fuerte, a pesar de que la General Motors, la Standard Oil y Dupont no tengan ya acciones de ella (se las vendieron a una empresa llamada Albert Marle Paper en 1962).

Según Macgrayne, Ethyl seguía sosteniendo aún en febrero de 2001 "que la investigación no ha conseguido demostrar que la gasolina plomada constituya una amenaza para la salud humana ni para el medio ambiente".

En su portal de la red de Internet, hay una historia de la empresa en la que no se menciona siquiera el plomo (ni tampoco a Thomas Midgley) y sólo se dice del producto original que contenía "cierta combinación de sustancias químicas".

Ethyl no fabrica ya gasolina plomada, aunque, de acuerdo con su balance de la empresa del año 2001, todavía hubo unas ventas ese año de plomo tetraetílico (o TEL, como le llaman ellos) por el importe de 25 millones en el 2000 (de un total de ventas de 795 millones de dólares) más que los 24 millones de 1999, pero menos que los 117 millones de 1998. La empresa comunicó en su informe que había decidido "maximizar los ingresos generados por TEL, aunque su utilización siga descendiendo en el mundo". Ethyl comercializa TEL en todo el mundo mediante un acuerdo con Associated Octel LTD, de Inglaterra.

Clair Patterson murió en 1995. No ganó el premio Nobel por su trabajo. Los geólogos nunca lo ganan. Ni tampoco se hizo famoso, lo que es más desconcertante. Ni siquiera consiguió que le prestasen demasiada atención pese a medio siglo de trabajos coherentes y cada vez más laboriosos. Sin duda podría afirmarse que fue el geólogo más influyente del siglo XX. Sin embargo, ¿Quién ha oído hablar de alguna vez de Clair Patterson? La mayoría de los textos de geología no lo mencionan. Dos libros recientes de divulgación sobre la historia de la datación de la Tierra, se las arreglan incluso para escribir mal su nombre. A principios de 2001, un crítico que hacía una valoración de uno de esos libros en

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

la revista "Nature", cometió el error adicional, bastante asombroso de creer que Patterson era una mujer.

Lo cierto es que, pese a todo, gracias al trabajo de Clair Patterson, en 1953 la Tierra tenía al fin una edad en la que todos podían estar de acuerdo. El único problema era que resultaba ser más vieja que el universo que la contenía" (<http://es.globedia.com/plomo-gasolina-forma-parte-vidas>).

1.1.1. Cuantificación de plomo en los seres humanos

Una de las maneras existentes para determinar la toxicidad del plomo en los seres vivos es su cuantificación en fluidos corporales, principalmente suero y la orina. Cabe mencionar que este procedimiento debe ser acompañado por pruebas clínicas y ensayos bioquímicos para poder hacer un buen diagnóstico de intoxicación por este elemento, de tal manera que los ensayos bioquímicos, fisiológicos y clínicos junto con los métodos analíticos de cuantificación del metal podrán determinar, de manera integral, si un paciente o alguna persona expuesta a plomo se encuentra en situación de riesgo.

Los métodos analíticos destinados a la determinación de plomo se clasifican en dos, los destructivos y los no destructivos. En los primeros, la muestra es oxidada para destruir toda la materia orgánica y la ceniza es disuelta en medio acuoso y sujeta a análisis instrumental por los métodos de Espectrometría de Absorción Atómica (AAS), Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente (OES-ICP), Espectrometría UV-VIS previa extracción líquido-líquido, Voltamperometría, Polarografía, entre otros. Los procedimientos no destructivos tienen un origen más reciente y se suelen basar principalmente en la Fluorescencia de Rayos X, y la Espectrometría de Emisión Atómica Inducida por Láser (Dieterich, 1975).

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

En algunos de los métodos anteriores, se utilizaba con mayor frecuencia, como una estrategia de preconcentración de la muestra a la extracción líquido-líquido del complejo de plomo-ditizona con un disolvente organoclorado. Sin embargo al utilizar este método se observó que los niveles de concentración en las muestras analizadas se encontraban por debajo de los límites de detección de las técnicas instrumentales. En la actualidad existen técnicas muy sensibles como la Espectrometría de Absorción Atómica con Vaporización Electrotérmica (ETAAS) donde la preconcentración ya no suele ser necesaria.

1.1.2. Determinación de los efectos bioquímicos del plomo en los seres humanos

En la actualidad se han establecido diferentes sustancias como biomarcadores de exposición al plomo; es decir, su concentración o actividad puede aumentar o disminuir como consecuencia, directa o indirecta de la exposición a plomo. McCarthy y Shugart, (1990) han propuesto que los niveles de plomo (sangre) pueden indicar la exposición y la magnitud de la respuesta del organismo a tal contaminante

Uno de los indicadores más utilizados para determinar un posible daño ocasionado por exposición a plomo es la medición indirecta de la actividad de la enzima ácido δ -aminolevulínico deshidratasa (δ -ALAD) determinada como la acumulación de ácido aminolevulínico (sustrato de esta enzima, la cual se inhibe en presencia de plomo). Uno de los métodos utilizados para la determinación de la concentración de sustrato ha sido desarrollado por Mauzerall y Granick (1956); aunque algunos autores las han modificado debido a que la separación de las sustancias involucradas resultaba difícil en la práctica. También se han desarrollado métodos para la determinación de la actividad de δ -ALAD en muestras de sangre. Otros métodos desarrollados para la determinación de daño por exposición a plomo han sido la medición de protoporfirinas IX,

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

coproporfirinas y porfirinas en sangre y orina principalmente, mediante la técnica de espectrofotometría UV-Vis (Dieterich, 1975).

En general, los biomarcadores incluyen determinaciones bioquímicas, fisiológicas, histológicas, morfológicas (incluyendo aspecto, pigmentación, malformaciones, etc.) del estado de “salud”, excluyendo, en algunas ocasiones, los efectos sobre el comportamiento. En la actualidad, se han reportado como los biomarcadores más utilizados en estudios ecotoxicológicos son (AAE, 2012) los siguientes:

- a) Actividad de las enzimas colinesterásicas (acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, colinesterasas totales).
- b) Actividad de las enzimas ATPsintetasas dependientes de sodio, potasio o magnesio (Na^+ -ATPasa, K^+ -ATPasa y Mg^{2+} -ATPasa)
- c) Actividad de las enzimas detoxificadoras (Glutación S-Transferasa, Catalasa, Peroxidasa)
- d) Respuestas genotóxicas (Deshidrogenasa Láctica, Alfafetoproteína, Fosfatasa Ácida Prostática)
- e) Parámetros hematológicos (punteado basófilo)
- f) Proteínas de estrés (proteínas de choque térmico (HSP), proteínas del metabolismo de la glucosa)
- g) Estabilidad de membranas de lisosomas (liberación de enzimas)
- h) Estudios histopatológicos (Ultraestructura, inmuno histoquímica para determinar las uniones intercelulares)
- i) Respuestas fisiológicas y morfológicas (disminución de hemoglobina, reducción de la vida media de eritrocitos, cambios físicos)
- j) Parámetros endocrinos (cambios en el perfil hormonal)
- k) Expresión de genes relacionados con la detoxificación de xenobióticos (Glutación S-transferasa μ , HPS de diferentes pesos moleculares)

JUSTIFICACIÓN

Actualmente se reconoce como una necesidad el llevar a cabo la cuantificación de algunos parámetros físicos, biológicos y bioquímicos en seres humanos, con el fin de estudiar la toxicidad que la exposición a plomo puede ocasionar en su organismo. Sin embargo, la discusión integral de la información suele dificultarse en gran medida, dada la heterogeneidad en los siguientes aspectos:

- a) La naturaleza de los parámetros evaluados,
- b) Los procedimientos de medición,
- c) La magnitud en los intervalos de medida y variaciones de los parámetros cuantificados,
- d) La respuesta de los organismos (conocida como variabilidad genética).

Por lo anterior, resulta de suma importancia explorar la aplicabilidad de herramientas analíticas mismas que faciliten tal discusión.

HIPÓTESIS

Si se aplican los conocimientos quimiométricos en un modelo experimental se podrían obtener datos o correlaciones más precisas y útiles para entender un fenómeno bioquímico.

OBJETIVOS

Como objetivo general de este trabajo se plantea el aplicar herramientas quimiométricas al estudio de la intoxicación con plomo en un modelo constituido por roedores.

Para cumplir con el objetivo general se plantean los siguientes objetivos particulares.

- a) Establecer grupos de animales no expuestos (control) y expuestos a plomo mediante una exposición aguda al metal administrado por vía intraperitoneal.
- b) Cuantificar el contenido de plomo en matrices biológicas de los organismos control y expuestos.
- c) Realizar determinaciones bioquímicas, morfológicas y analíticas en ambos grupos de estudio.
- d) Aplicar la Quimiometría en el análisis de los resultados.
- e) Interpretar la información obtenida desde el punto de vista bioquímico y/o fisiológico.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1. EFECTOS TÓXICOS DEL PLOMO

2.1.1. El plomo como agente nefrotóxico

La exposición ocupacional y medioambiental a plomo ha sido asociada con un deterioro significativo en la función renal (Payton, 1994). Varios investigadores han reportado efectos nefrotóxicos en animales a los que se les administran dosis diferentes de plomo (Vyskocil, 1989).

Después de la absorción del plomo por la vía respiratoria, gastrointestinal y cutánea; aproximadamente el 50% pasa a la sangre y el resto es eliminado. Ya presente en la sangre es distribuido uniformemente en todos los tejidos y órganos (Figura 2).

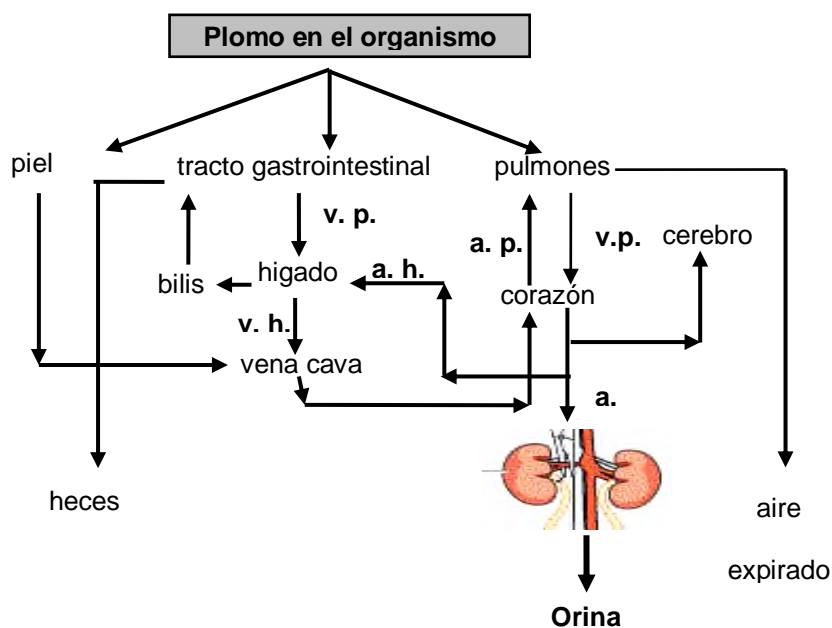


Figura 2. Distribución del plomo en los órganos (v. p: vena porta, v. h: vena hepática, a. h: arteria hepática, a. p: arteria porta, a: aorta) (tomado de Navarro, 2004)

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Su acumulación inicial ocurre primeramente en el riñón, esta toma lugar principalmente por filtración glomerular y subsecuente reabsorción, así como en pequeña medida por absorción directa en la sangre (resorción) (Voslta, 1968; Vander, 1977; Victery, 1979). El plomo puede ser captado por las células epiteliales tubulares renales a través de la membrana basolateral por transporte activo en forma de ión libre (Figura 3) (Vander, 1979).

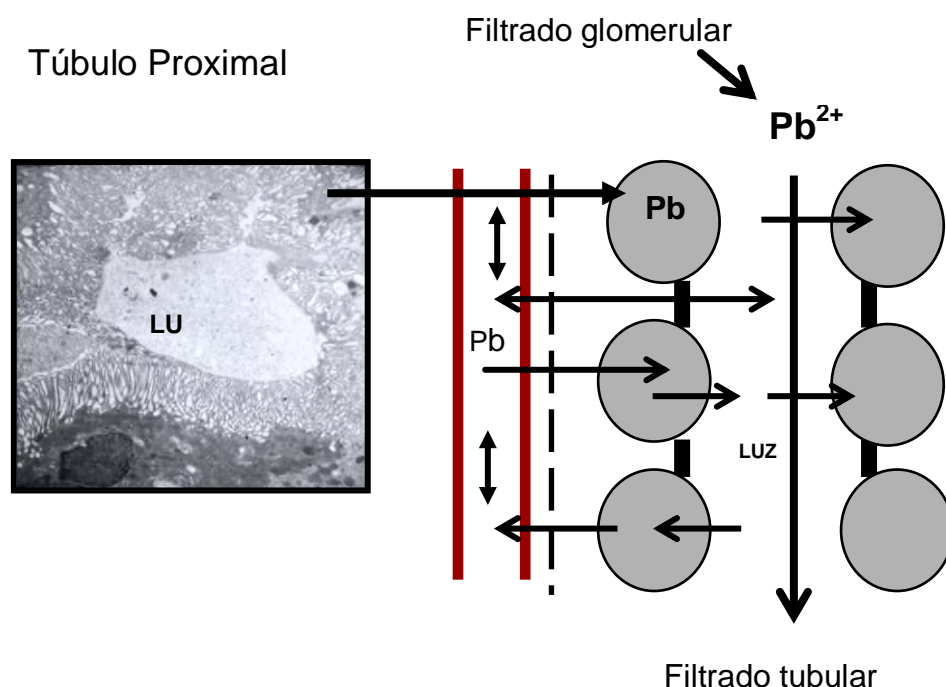


Figura 3. Procesos por los cuales el plomo entra a las células renales del túbulo proximal (Lu: luz del túbulo proximal) (tomado de Navarro, 2004).

De acuerdo con Goyer (1989), los efectos renales del plomo ocurren en tres fases. La fase 1, o fase de exposición aguda, se caracteriza por disfunción tubular proximal, un síndrome tipo Fanconi que consiste en fosfaturia (perdida excesiva de ácido fosfórico por la orina), glucosuria (presencia anormal de glucosa en la orina) y aminoaciduria (presencia anormal de aminoácidos en la orina) y está acompañada por hipofosfatemia (niveles anormalmente bajos de fósforo en la sangre), hiperuricemia (aumento de la concentración del ácido

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

úrico en la sangre) y nefritis intersticial (inflamación del intersticio hístico del riñón, incluyendo los túbulos) (Chisholm, 1962; Goyer, 1971). También ocurren cambios mitocondriales y la formación de cuerpos característicos de inclusión. La exposición crónica puede conducir a la fase 2, la cual se caracteriza por la atrofia progresiva tubular y fibrosis intersticial, donde hay una reducción en la incidencia de cuerpos de inclusión (inciso F de la Figura 4) y la filtración glomerular se ve afectada (Wedeen, 1975; Cramer, 1974). Finalmente, la insuficiencia renal puede ocurrir en esta fase (Goyer, 1971). La fase 3 es caracterizada por neoplasia renal tubular o adenocarcinoma y ha sido observada en ratas expuestas de manera crónica al metal (Van Esch, 1962; Dobryszczycka, 1984).

El daño que el plomo puede originar en los órganos del ser humano se pueden clasificar en dos tipos: agudo y crónico. Esta clasificación se relaciona con el periodo de exposición al metal. El daño agudo al riñón a causa del plomo se manifiesta principalmente en los túbulos proximales (Goyer, 1971; Goyer, 1973; Wedeen, 1975; Huguet, 1982, Navarro 2009). En la exposición crónica el daño ocurre a nivel de ambos túbulos (proximal y distal) y en el glomérulo, lo cual origina que las funciones de filtración y reabsorción tubular se alteren originando insuficiencia renal en grados variables.

La Figura 4 muestra los efectos de la exposición crónica a plomo en células de túbulo proximal de ratas expuestas. En general los daños se pueden observar en las membranas apicales, las cuales se cierran y pierden las microvellosidades características (comparar la fotografía A con la fotografía D). El daño en las mitocondrias se puede apreciar como la aparición de espacios blancos dentro de su estructura. Estos espacios son vacuolas y muchas veces se relacionan con los procesos de apoptosis (fotografía E). Cuando las células se encuentran libres del tóxico, su apariencia es la que se muestra en la fotografía B. Cuando los animales se exponen a plomo, mediante un tiempo largo, dentro

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

del núcleo aparecen estructuras densas y fibrosas, las cuales están compuestas de complejos plomo-proteína y que se conocen como cuerpos de inclusión (fotografía F). Estas estructuras se encuentran ausentes en los núcleos de las células renales de los animales no expuestos al tóxico.

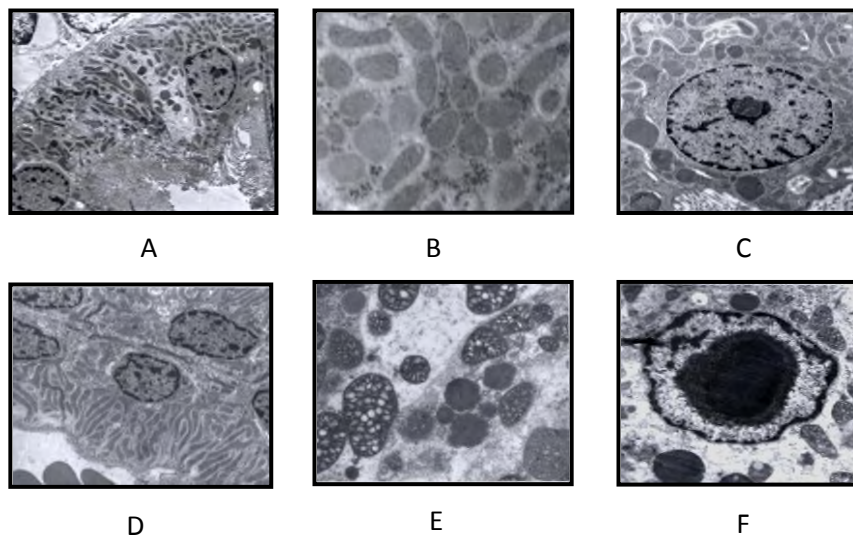


Figura 4. Cambios morfológicos en riñones expuestos plomo de manera crónica. A, B y C muestran la membrana basal, las mitocondrias y los núcleos de células de túbulo proximal de animales sin exponer al metal y D, E y F los cambios que ocurren en las células de animales expuestos a plomo (tomado de Navarro, 2009).

Lo anterior condiciona el gran interés que ha desencadenado el estudio de la intoxicación por plomo en los humanos ya que el riñón tiene como principal función la filtración del fluido sanguíneo unida a los procesos de reabsorción de sustancias utilizables por las células y la posterior eliminación, mediante la excreción de sustancias tóxicas no benéficas para el cuerpo humano.

Debido a las características fisiológicas y bioquímicas de los riñones, metales como el plomo pueden alojarse dentro de las células de túbulo proximal y ocasionar daños como los mencionados anteriormente. En algunas ocasiones

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

las manifestaciones de la intoxicación con este elemento resultan tan poco conocidas que se puede llegar a casos como el que se narra a continuación mismo que demuestra lo que puede llegar a ocurrir cuando existe una exposición crónica al metal.

2.1.2. El primer caso de estudio de intoxicación renal por plomo

En 1931, Black reportó el primer caso clínico de intoxicación con plomo en seres humanos en Queensland, Australia (Black, 1967).

Una niña de cuatro años de edad fue admitida en el hospital con una historia de dos años de intermitentes ataques de vómito, constipación, dolores de cabeza y extrema irritabilidad. A lo anterior se sumaba debilidad de la pierna derecha presente por nueve meses, la cual empeoró dos meses anteriores a la admisión. El examen reveló una debilidad de todos los movimientos de la extremidad inferior derecha, con paresia de los músculos extensores de los pies y la contracción de los músculos de la pantorrilla. No se detectaron líneas de plomo a lo largo de las encías; sin embargo los análisis clínicos demostraron hemoglobina de 9.0 g/100 mL, punteado basófilo, proteinuria leve y concentración sanguínea de urea de 76 mg/100 mL. El examen de orina reveló cristales de ácido úrico, pero no células. Se determinó la presión arterial de 124/76 milímetros de mercurio (mm Hg). La paciente presentaba muchas dificultades con sus tareas escolares. Con base en las observaciones recolectadas se consideró que la niña presentaba envenenamiento por plomo. Fue tratada con sulfato de magnesio y yoduro de potasio observando que los efectos del plomo fueron minimizados.

A la edad de 16 años la misma paciente presentaba ataques ocasionales de dolor de cabeza, con náuseas y vómitos. A la edad de 21 años, y poco después de haberse casado, su presión arterial era de 145/100 mm Hg. Dos años después, cuando tenía 8 semanas de embarazo, presentó proteinuria moderada

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

y una presión arterial sin cambio. Tuvo que pasar los dos últimos meses del embarazo en el hospital logrando la concepción de su hijo. Tres meses más tarde, la presión arterial era de 170/80 mm Hg, persistiendo una proteinuria intensa. Su primer ataque de artritis gotosa aguda, misma que afectó a la articulación metatarsfalángica del dedo gordo, se desarrolló unos 6 meses más tarde. En los siguientes 9 años, aparecieron nuevos ataques intermitentes en pies, tobillos y rodillas. Ella quedó embarazada de nuevo a los 26 años, pero se realizó histerectomía abdominal y salpingectomía.

A la edad de 29 años, desarrolló insuficiencia cardíaca con angina de pecho al hacer esfuerzos. La presión arterial aumentó a 180/115 mm Hg y la urea en sangre fue de 126 mg/100mL. Estos síntomas desaparecieron aparentemente con la restricción de ingesta de sal. A la edad de 31 años, fue afectada por anorexia, vómitos, calambres y moretones que se le hacían con facilidad. Los signos de insuficiencia cardíaca se presentaron de nuevo. La presión sanguínea volvió a aumentar hasta alcanzar un valor de 240/100 mm Hg; el contenido de CO₂ en 100 mL de plasma fue 18 mEq/L; la concentración de creatinina fue de 8.8 mg, la de fosfato de 6.5 mg, la de urato de 9.8 mg y la de urea de 180 mg; la concentración de proteína en orina fue de 0.5 g/L. La excreción de coproporfirina fue normal. La orina hilada mostró elementos celulares sólo ocasionales y cilindros granulados. El electroencefalograma se presentó difusamente anormal, con un exceso de actividad lenta y una lentitud periódica anormal en la región derecha temporo-occipital sugiriendo actividad epileptogénica. Una infusión estándar de 1 g de EDTA cálcico aumentó la excreción de plomo por 2.5 mg, cuatro veces el límite superior de lo normal.

A los 33 años presentó insuficiencia renal crónica. No hubo en ningún momento cualquier sugerencia clínica de pielonefritis. No había antecedentes familiares de la gota o enfermedad renal y las concentraciones de ácido úrico en plasma fueron normales en ambos padres y sus dos hermanos.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Al morir, el examen de autopsia reveló hipertrofia ventricular izquierda, con aterosclerosis y características de insuficiencia cardiaca congestiva. Los riñones pesaron 40 y 55 g, presentando en la cápsula una superficie grumosa. Había atrofia del parénquima renal, la corteza media de 1 a 2 mm de espesor. En la médula, se encontraron depósitos de cristales de urato. El cuadro histológico correspondía a una nefropatía por plomo. El examen de la superficie cartilaginosa de la primera articulación metatarsofalángica izquierda mostró depósitos de cristales de urato. El examen histoquímico de cerebro mostró depósitos de plomo en asociación con hierro y calcio, principalmente en los hemisferios cerebelosos y los ganglios basales. El contenido de plomo en los huesos del cráneo fue de 6.7 mg/100 g.

Este caso constituyó el primer seguimiento clínico de un paciente que sufrió las consecuencias de una intoxicación por plomo. Se puede observar que a la par de los estudios fisiológicos se llevaron a cabo estudios de tipo clínico y determinaciones analíticas de contenido de plomo. Este caso fue el primero en el que se utilizaron herramientas biológicas, bioquímicas y analíticas para estudiar los efectos de la intoxicación por un metal pesado. El anexo 1 muestra un artículo que menciona el uso de la resonancia magnética nuclear y la espectrofotometría en un caso de estudio de un niño de 10 años de edad con niveles elevados de plomo en sangre. Este caso fue reportado en el año 2007.

A partir de entonces la investigación de los efectos del plomo a nivel no solo renal sino sistémico ha incrementado y por ello el número de publicaciones relacionadas con este tema se ha visto acrecentado. De la misma manera los estudios utilizando modelos de animales, en especial roedores y células en cultivo han aumentado y a consecuencia de ello ahora se cuenta con mayor información en relación con los métodos bioquímicos y analíticos mismos que al unir sus esfuerzos podrán, en un futuro, lograr que el diagnóstico de la intoxicación con plomo sea un proceso más preciso.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1.3. El estudio de los efectos del plomo en los seres vivos

Como bien se ha comentado anteriormente, los procesos analíticos pueden ser empleados a la par de los procesos bioquímicos en el estudio de los efectos de muchos agentes xenobióticos, como los metales pesados, en los seres vivos. Dentro de la literatura, se pueden localizar muchos reportes relacionados con trabajos que implican el estudio de los efectos de la exposición a plomo llevados a cabo bajo diferentes modelos experimentales variando vías de exposición, dosis, tiempos y sujetos de estudio.

A continuación se describen algunos de los trabajos realizados en un modelo animal conformado por ratas de laboratorio en las cuales se realizaron pruebas tanto bioquímicas como analíticas (medición de la concentración de plomo en diferentes muestras) para el estudio y la comprensión del fenómeno de la intoxicación con plomo.

En 1983 Rader y sus colaboradores reportaron que al suministrar dosis crónicas de plomo correspondientes a 130, 150, 175 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vía oral durante siete semanas encontraron valores de 8.8, 216 y 31.6 veces más elevados de plomo en muestras de sangre, homogenado de cerebro y riñón de animales expuestos ($44 \pm 13 \mu\text{g}/\text{dL}$, $0.39 \pm 0.19 \mu\text{g}/\text{g}$, $5.38 \pm 1.80 \mu\text{g}/\text{g}$ respectivamente) en comparación a animales control ($5 \mu\text{g}/\text{dL}$, $0.06 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{g}$, $0.17 \pm 0.08 \mu\text{g}/\text{g}$). No encontraron grandes diferencias con el aumento de peso del riñón de ratas expuestas ($1.78 \pm 0.19 \text{ g}$) a diferencia de las ratas control ($1.76 \pm 0.23 \text{ g}$). En experimentos posteriores, ellos emplearon una dosis aguda de plomo al 2% (p/V) vía oral por diez días, encontrando nuevamente valores altos de plomo en el homogenado de cerebro, además de una hiperactividad en animales expuestos comparada con los animales control (Shafiq-Ur-Rehman, 1984). En este trabajo se puede observar que la exposición crónica y aguda a dosis altas de plomo ocasionó un aumento de la concentración del mismo en el cerebro, por lo cual los animales presentaron cambios conductuales que se

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

manifestaron en forma de hiperactividad. Las altas concentraciones de plomo en riñón podrían reflejar daños en este órgano mismos que aunque no fueron reportados se puede intuir sufrían los animales. Al observar los valores de plomo en sangre, se puede observar que los animales expuestos superan en mucho los límites de este metal permitidos en humanos (10 mg/dL).

La administración de una sola dosis de plomo a una concentración de 100 mg/Kg de peso corporal por vía intraperitoneal, mostró que la actividad de la enzima Glutación S-transferasa (GST) en hígado disminuyó 22.8 % en animales expuestos (190 ± 10 nmol/mg de proteína) al metal en comparación con los animales control (246 ± 10 nmol/mg de proteína) (Nakagawa, 1991). En este reporte se estudió el efecto de la exposición a plomo sobre la actividad de una enzima que se considera un biomarcador de daño por exposición al metal. Por lo general se ha reportado que la actividad de esta proteína, al medirse en muestras de orina, aumenta en caso de exposición al metal. Este estudio demostró que la isoenzima localizada en hígado presenta un comportamiento contrario al considerado como "normal". Este resultado podría dar cuenta de que los efectos por la exposición a plomo también pueden depender del órgano o el fluido analizado, lo cual nos puede indicar que pueden existir isoenzimas con diferente susceptibilidad al daño por los efectos directos o indirectos de la exposición al metal (Nakagawa, 1991).

Dagget utilizó una dosis de plomo de 114 mg/ Kg de peso vía intraperitoneal durante 7 días, registrando un aumento de la producción de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en homogenado de riñón (16.2 ± 2.0 nmol/g) e hígado (16.1 ± 3.6 nmol/g) a diferencia de las ratas control (13.1 ± 1.2 nmol/g, 9.3 ± 1.4 nmol/g respectivamente); también se observó un aumento de 3 veces en la actividad de Glutación S-transferasa en riñón (4.2 nmol/min/mg de proteína) en animales expuestos al compararlos con el grupo control (1.3 nmol/min/mg de proteína) (Dagget, 1998). Este artículo demuestra

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

que la actividad de la isoenzima de GST localizada en el riñón aumenta como consecuencia de la exposición a plomo, muy probablemente, debido al aumento de especies reactivas de oxígenos mismas que se forman como consecuencia indirecta de la exposición a plomo.

Empleando una dosis de 1 g Pb/L por vía oral durante ocho semanas, Adonaylo y Oteiza reportaron el aumento de 7 unidades de TBARS en homogenado de cerebro, un incremento de 12.6 veces de los niveles de plomo en sangre y disminución de 14.5 % del peso corporal en ratas expuestas (84 ± 2 nmol/ g de tejido, 126 ± 11 μ g/dL, 316 ± 15 g respectivamente) comparadas con ratas control (77 ± 1 nmol/ g de tejido, 10 ± 1 μ g/dL, 370 ± 16 g) (Adonaylo, 1999). Sin embargo al utilizarse una dosis de 0.2 % (p/V) de plomo en agua por cinco semanas, se determinaron niveles altos de TBARS (1.89 ± 0.19 nmol/mg/min) y disminución de la actividad de GST (0.54 ± 0.04 nmol/min/mg de proteína) en homogenados de riñón del grupo expuesto en relación con el grupo control (1.27 ± 0.11 nmol/mg/min, 0.75 ± 0.06 nmol/min/mg de proteína) (Sivaprasad, 2002). Al utilizar una dosis de plomo de 100 mg/Kg de peso durante 30 días, vía intraperitoneal, se alcanzaron niveles altos de TBARS en homogenados de riñón (56 %) e hígado (46 %) en el grupo expuesto comparado con el grupo control (valor no registrado) (El-Sokkary, 2005). Este trabajo indica que uno de los efectos físicos de la exposición a plomo es el relacionado con la disminución de peso corporal. Además indica que el aumento de la concentración del metal en sangre puede ser tan alto que no solo existirá aumento del contenido de plomo en el cerebro sino, muy probablemente, en muchos de los órganos de esos animales.

Al utilizar una dosis de 500 mg de plomo por kilogramo de peso por vía oral (en la comida) durante seis semanas, se obtuvieron valores relativamente diferentes de plomo en sangre en el grupo expuesto (0.48 ± 0.05 μ g/dL) comparado con el grupo control (0.32 ± 0.05 μ g/dL) (Shalan, 2005). Por otro

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

lado, al suministrar una sola dosis de plomo de 100 mg/Kg de peso vía intraperitoneal, se reportaron aumentos de 3.1 veces en la concentración de TBARS y una disminución de 37.7% en la actividad de GST en homogenado de hígado de animales expuestos (31 ± 0.082 nmol/h/g de tejido, 84 ± 4.12 nmol/min/mg de proteína respectivamente) al metal en comparación con los animales no expuestos (10 ± 0.077 nmol/h/g de tejido, 135 ± 9.97 nmol/min/mg de proteína) (Rahman, 2006). La administración de una dosis correspondiente a 300 mg/L en agua durante 21 días en ratas embarazadas, originó niveles altos en la producción de TBARS en homogenado de hígado, niveles altos de plomo en muestras de sangre y homogenado de hígado, en el grupo expuesto (35% nmol/g de tejido, 22.8 ± 0.50 μ g/100 mL y 1.09 ± 0.12 μ g/100 mL respectivamente) comparado con el grupo control (valor no registrado). En cuanto al peso corporal y peso del hígado no encontraron variaciones entre el grupo expuesto (30 ± 3.5 g, 0.93 ± 0.18 g respectivamente) y el grupo control (33.6 ± 2.0 g, 1.06 ± 0.16 g) (Luján, 2007).

Wang, El-Nekeety, Hamed y Whittaker cada uno con su grupo de investigación realizaron experimentos por separado utilizando esquemas de intoxicación diferentes cuyos resultados se describen a continuación. El uso de una dosis de plomo de 342 μ g/mL vía oral por seis semanas, reportó niveles altos de plomo en sangre y homogenizado de cerebro de animales expuestos (1.5 μ g/dL, 6.6 μ g/g) comparado con los animales control (valor no registrado) (Wang, 2007). Al emplear una dosis de 20 mg/Kg vía oral por 30 días, se determinó un aumento de 3.9 veces en los niveles altos de TBARS en homogenizado de hígado y una disminución de 60 gramos en el peso corporal del grupo expuesto (150.8 ± 0.74 nmol/g de tejido, 115 g) comparado con el grupo control (38.43 ± 1.01 nmol/g de tejido, 175 g) (El-Nekeety, 2009). Al utilizar una dosis de 0.4 % (p/p) de plomo en agua por seis semanas, se encontraron niveles altos de TBARS en sangre y homogenizado de cerebro;

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

disminución en la actividad de GST en homogenizado de cerebro y niveles altos de plomo en sangre y homogenizado de cerebro en el grupo expuesto ($5.815 \pm 0.910 \mu\text{mol/g}$, $2.801 \pm 0.711 \text{ nmol/mg}$, $50.04 \pm 6.150 \text{ mM/min/g}$, $0.773 \pm 0.187 \text{ ppm}$, $1.927 \pm 0.769 \text{ ppm}$) comparados con el grupo control ($2.595 \pm 0.598 \mu\text{mol/g}$, $1.857 \pm 0.353 \text{ nmol/mg}$, $56.380 \pm 6.200 \text{ mM/min/g}$, $0.071 \pm 0.014 \text{ ppm}$, $0.5357 \pm 0.178 \text{ ppm}$) (Hamed, 2010). Cuando se administró una dosis de 25 mg/Kg de plomo en agua por 180 días, se reportaron niveles altos de plomo en homogenizado de riñón de animales expuestos (6.1 mg/g tejido) comparado con los animales controles (1.4 mg/g de tejido) (Whittaker, 2011). Estos experimentos demuestran que, en general, bajo esquemas de intoxicación crónica el nivel de plomo en sangre aumenta ocasionando, consecuentemente, que el contenido del metal en órganos como el cerebro y el riñón aumente. Una posible consecuencia podría ser el aumento que se observa en la concentración de TBARS tanto en sangre como en cerebro. De la misma manera, se observa una disminución en la actividad de la enzima GST en el cerebro debido, muy probablemente, a que el metal actúa de manera directa o indirecta sobre esta isoenzima cerebral. Macroscópicamente uno de los efectos de la intoxicación con plomo es la disminución de peso corporal en los animales sometidos a estos esquemas de intoxicación.

Navarro y colaboradores en 2009 realizaron la medición de la generación de especies reactivas de oxígeno en ratas macho de la cepa Wistar expuestas de manera crónica a 500 ppm de plomo en el agua de bebida por un periodo de siete meses, encontrando que los animales expuestos a plomo presentaron un aumento de 2.7 veces de TBARS en homogenizado de riñón en relación con el grupo control ($455 \pm 66 \text{ pmol/mg}$ y 170 ± 10 respectivamente), así como aumentos de hasta 10 veces en las concentraciones de plomo en sangre ($43.0 \pm 76 \mu\text{g/dL}$) y plomo en riñón ($7.2 \pm 1.2 \mu\text{g/mg}$ de tejido) en los animales expuestos en relación con los animales no expuestos al metal ($4.3 \pm 0.8 \mu\text{g/dl}$ y

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

0.2 ± 0.002 µg/mg de tejido, respectivamente). Este trabajo resulta ser el antecedente directo del presente estudio. En él se observa que el plomo no solo es capaz de aumentar el daño oxidativo, sino de dañar la ultraestructura celular dañando procesos como el transporte de sustancias esenciales para el metabolismo como los aminoácidos y el calcio, ocasionar glucosuria, proteinuria, aumento en el pH urinario y presencia de sangre. Todos estos efectos condicionan el daño renal ya que se alteran las funciones glomerulares de filtración, las de reabsorción tubular y las de formación de orina. Lo anterior condiciona el estado de daño renal que muchos autores también han reportado, indicando los posibles blancos de acción del plomo.

Para tener una idea del campo de investigación en relación con el proceso de intoxicación con plomo en riñón, se muestra la siguiente tabla en la cual se confrontan los esquemas de intoxicación con los resultados reportados. La Tabla 1 se ha realizado de acuerdo con los estudios reportados en los párrafos anteriores.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Tabla 1. Mediciones Realizadas para diferentes parámetros en ratas expuestas a plomo bajo esquemas de intoxicación diferentes.

Dosis	Plomo en sangre	Plomo en cerebro	Plomo en riñón	Plomo en hígado	Actividad de GST en hígado	Actividad de GST en riñón	Actividad de GST en cerebro	Peso corporal	Peso del riñón	Peso del hígado	TBARS en cerebro	TBARS en riñón	TBARS en hígado	TBARS en sangre
130, 150, 175, 200 µg/ml vía oral, 7 sem.	44 ±13 (5 µg/dL)	0.39±0.19 (0.06 ±0.02 µg/g)	5.38±1.8 (0.17 ± 0.08 µg/g)	ND	ND	ND	ND	ND	1.70 ± 0.19 (1.76 ± 0.23 g)	ND	ND	ND	ND	ND
100 mg/Kg vía i.p, 1 dosis	ND	ND	ND	ND	190 ± 10 (246 ± 10 nmol/mg de proteína/min)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
114 mg/Kg vía oral, 7 sem.	ND	ND	ND	ND	ND	4.2 (1.3 nmol/min/mg de proteína a)	ND	ND	ND	ND	ND	16.2 ± 2.0 (13.1 ± 1.2 nmol/g)	16.1 ±3.0 (9.3 ±1.4 nmol/g)	ND

ND: No Determinado, el valor en paréntesis corresponde al grupo control.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Continuación Tabla 1

Dosis	Plomo en sangre	Plomo en cerebro	Plomo en riñón	Plomo en hígado	Actividad de GST en hígado	Actividad de GST en riñón	Actividad de GST en cerebro	Peso corporal	Peso del riñón	Peso del hígado	TBARS en cerebro	TBARS en riñón	TBARS en hígado	TBARS en sangre
1 g/L vía oral, 8 sem.	126±11 (10 ± 1 µg/dL)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	316 ±15 (370 ± 16 g)	ND	ND	84 ± 2 (77 ± 1 nmol/g)	ND	ND	ND
0.2 % vía oral, 5 sem.	ND	ND	ND	ND	ND	0.54 ± 0.04 (0.75 ± 0.06 nmol/min/mg de proteína)	ND	ND	ND	ND	ND	1.89 ± 0.19 (1.27 ± 0.11 nmol/mg de proteína/min)	ND	ND
100 mg/kg vía i.p, 30 días	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	56 %	46 %	
500 mg/Kg vía oral, 6 sem.	0.48 ± 0.05 (0.32 ± 0.05 µg/dL)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: No Determinado, el valor en paréntesis corresponde al grupo control.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Continuación Tabla 1

Dosis	Plomo en sangre	Plomo en cerebro	Plomo en riñón	Plomo en hígado	Actividad de GST en hígado	Actividad de GST en riñón	Actividad de GST en cerebro	Peso corporal	Peso del riñón	Peso del hígado	TBARS en cerebro	TBARS en riñón	TBARS en hígado	TBARS en sangre
100 mg/Kg vía i.pl, 1 dosis	ND	ND	ND	ND	84 ± 4.12 (135 ± 9.97 nmol/hr/g de tejido)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	31 ± 0.082 (10 ± 0.077 nmol/mg de proteína)	ND
300 mg/L vía oral, 21 días, ratas embarazadas 342	22.8 ± 0.5 (NR)	ND	ND	1.09 ± 0.12 (NR)	ND	ND	ND	30 ± 3.5 (33.6 ± 2.0 g)	ND	0.93 ± 0.18 (1.06 ± 0.16 g)	ND	ND	35 % (NR)	ND
342 µg/mL vía oral, 6 sem.	6.6 (NR)	1.5 (NR)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: No Determinado, el valor en paréntesis corresponde al grupo control.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Continuación Tabla 1

Dosis	Plomo en sangre	Plomo en cerebro	Plomo en riñón	Plomo en hígado	Actividad de GST en hígado	Actividad de GST en riñón	Actividad de GST en cerebro	Peso corporal	Peso del riñón	Peso del hígado	TBARS en cerebro	TBARS en riñón	TBARS en hígado	TBARS en sangre
20 mg/Kg vía oral, 30 días	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	115 (175 g)	ND	ND	ND	ND	150.8 ± 0.74 (38.43 ± nmol/g)	ND
0.4 % vía oral, 6 sem.	0.773 ± 0.187 (0.071 ± 0.014 ppm)	1.927 ± 0.769 (0.5357 ± 0.178 ppm)	ND	ND	ND	ND	50.04 ± 6.150 (56.380 ± 6.200 nmol/mg)	ND	ND	ND	2.801 ± 0.711 (1.857 ± 0.178 nmol/mg)	ND	ND	5.815 ± 0.910 (2.595 ± 0.598 μmol/g)
25 mg/Kg vía oral, 180 días	ND	ND	6.1 (1.4)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
500 mg/Kg, vía oral, 7 meses	43.0 ± 7.6 (4.3 ± 0.8) μg/dL	ND	7.2 ± 1.2 (0.2 ± 0.002) μg/mg de tejido	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	455 ± 66 (170 ± 10) pmol/mg	ND	ND

ND: No Determinado, el valor en paréntesis corresponde al grupo control.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Como se puede observar en la tabla, existe una gran variedad en cuanto a los esquemas de intoxicación en relación con los resultados obtenidos. Por lo general, los autores incluidos analizan las concentraciones de plomo en fluidos como la sangre, y en tejidos. De la misma manera se cuantifica la actividad de la enzima GST, en órganos como hígado y riñón; y la generación de especies reactivas de oxígeno. En este trabajo se llevará a cabo el análisis por quimiometría de los resultados obtenidos mediante un esquema agudo de intoxicación, determinando las actividades de la GST, la concentración de TBARS, el análisis de las funciones renales por un examen general de orina y la variación de pesos corporales y del riñón.

Por lo anterior se describirá a continuación sobre las generalidades tanto de la enzima GST como la generación de estrés oxidativo por la intoxicación con plomo y como este proceso, al ser un efecto indirecto de la exposición al metal, podría llegar a constituir una condicionante en el desarrollo de los procesos cancerosos.

2.1.4. Exposición a plomo, generación de especies reactivas de oxígeno y daño celular

El plomo puede inducir daño oxidativo a través de tres rutas principales, dos de las cuales pueden considerarse por separado, aunque en realidad representan dos mecanismos relacionados. Una tercera ruta se relaciona con los fenómenos de antagonismo que puede presentar el plomo en relación con elementos esenciales para las células.

En primera instancia, se ha reportado que el plomo puede inducir, en animales y humanos, la formación de especies reactivas de oxígeno entre las cuales se encuentran los hidropéroxidos, el oxígeno singlete y el peróxido de hidrógeno. Se ha propuesto que lo anterior puede ocurrir debido probablemente a que el plomo podría participar en reacciones tipo Fenton u originar un

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

desequilibrio en el balance intracelular de oxidantes/antioxidantes al interactuar directamente con proteínas responsables de la actividad antioxidante o al repletar a la célula de sustratos esenciales para sus actividades, como por ejemplo el glutatión, quien desempeña un papel esencial dentro del metabolismo de la detoxificación celular.

La Figura 5 muestra como se generan las diferentes especies reactivas de oxígeno. En esta figura se puede ver que estas especies tienen electrones desapareados, mismos que son los responsables de su gran actividad química.

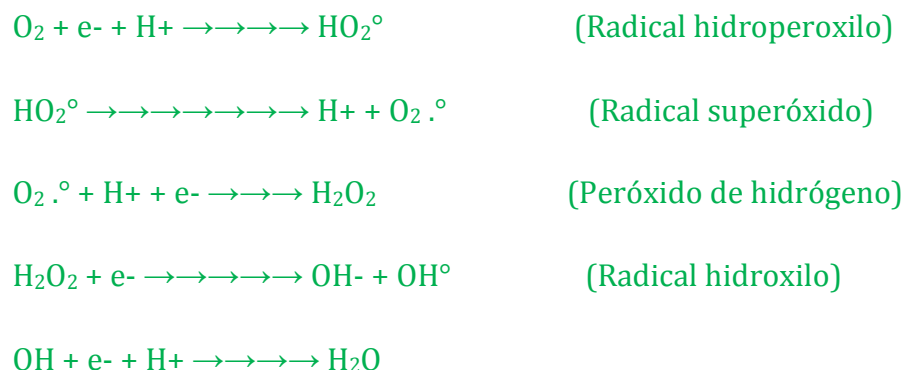


Figura 5. Reacción tipo Fenton por la generación de radicales libres (tomado de SWARA, 2009).

El plomo al igual que otros metales como el hierro, el cobre, el cadmio, el mercurio, el níquel y el arsénico pueden inducir directamente la generación de especies reactivas de oxígeno y ocasionar daño celular, vía depleción de actividades enzimáticas a través de la lipoperoxidación y reacción con proteínas nucleares o con el ADN.

Uno de los mecanismos más importantes mediante los cuales los metales pueden generar el estrés oxidativo es mediante una reacción tipo Haber-Weiss acoplada a una reacción tipo Fenton. La Figura 6 muestra las reacciones de

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

generación de radicales libres de oxígeno generados directamente por la acción de algunos de los metales, cuya característica es que pueden cambiar de valencia, de tal forma que los electrones pueden moverse de un átomo a otro, dando lugar a sus efectos tóxicos.



Figura 6. Reacciones de generación directa de especies reactivas de oxígeno por metales (tomado de Birben, 2012).

Estos radicales constituyen especies muy reactivas que se pueden unir a grupos reactivos (los cuales requieren de electrones libres para estabilizar su estructura) electrofílicos, originando, de esta manera, procesos de oxidación de ácidos grasos insaturados, proteínas con compuestos que posean dobles ligaduras y con algunas de las bases que constituyen la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN). Cuando ocurre la interacción con éste último, se da lugar a un proceso que promueve el continuo daño al material genético (conocido como proliferación). Cuando este fenómeno progresa se desarrollan los episodios de formación de tumores. Esta es la razón por la cual, la presencia de plomo en los organismos puede llegar a desencadenar fenómenos de tipo canceroso.

La Figura 7 muestra el esquema general del modo de acción de las especies reactivas de oxígeno sobre las células hasta llegar a la formación de tumores, así como la posible participación del plomo en estos eventos.

En segunda instancia el plomo puede formar conjugados con el glutatión (GSH) citosólico por lo cual puede alterar la actividad de las enzimas que dependen de este como la Glutatión peroxidasa y la Glutatión S- transferasa. El glutatión es un tripéptido que contiene cisteína; ésta posee un grupo sulfhidrilo

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

(SH) libre, el cual queda expuesto y puede unirse con alta afinidad al plomo, formando complejos estables, ocasionando la disminución de GSH y como consecuencia de la actividad de las enzimas mencionadas. De esta manera, el plomo es responsable de romper el equilibrio oxidante/antioxidante celular, generando el fenómeno conocido como estrés oxidativo.

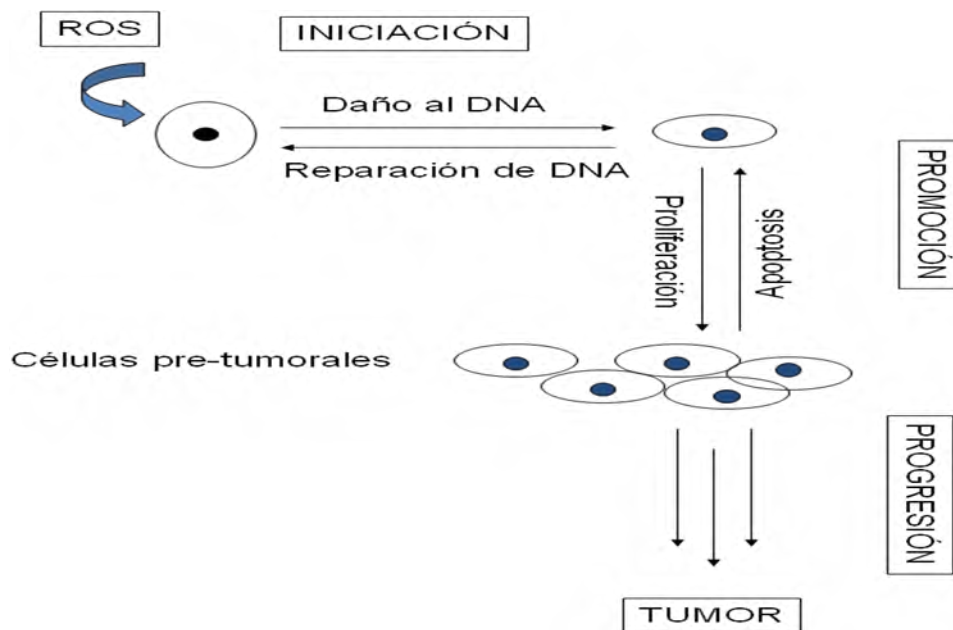


Figura 7. Modo de acción de las especies reactivas de oxígeno (modificado de Swaran, 2009).

Se ha observado que el plomo también afecta la actividad de enzimas con alto contenido de grupos SH dentro de su estructura, entre ellas se puede citar a la ácido δ -aminolevulínico deshidrogenasa (δ -ALAD) como la más importante y en la cual el metal se une a los grupos SH de las cisteínas localizadas en el sitio activo. Como consecuencia la síntesis del grupo HEMO puede disminuir generando severos problemas relacionados con anemia y transporte de oxígeno a las células. Esto traerá como consecuencia la disminución de la producción de energía celular.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Como tercera causa de daño por plomo se encuentran algunos procesos de antagonismo de este elemento con los metales esenciales que forman parte de algunas proteínas. Se sabe que las enzimas Superóxido dismutasa, Catalasa y Glutación peroxidasa son metaloproteínas, lo cual indica que dentro de su sitio activo o como parte de su estructura tridimensional se encuentran iones metálicos, mismos que resultan esenciales para su actividad. Debido a que el plomo es un ión con características químicas especiales, se han observado fenómenos de antagonismo entre algunos de los iones presentes en los centros activos y el plomo. Se tiene conocimiento que el plomo ejerce un efecto antagónico con el selenio, ocasionando que la captación del selenio disminuya y por ello la actividad de la Glutación peroxidasa también disminuya, aumentando su susceptibilidad al ataque de los radicales libres. En el caso de la Catalasa, la cual requiere hierro para llevar a cabo sus funciones, se sabe que el plomo disminuye la captación del metal esencial en el tracto gastrointestinal abatiendo, con ello, la biosíntesis del grupo HEMO. Como consecuencia se inhibe la actividad de la proteína. La enzima Superóxido dismutasa es una molécula dependiente de iones metálicos como el cobre, el manganeso y el zinc, en función de la isoenzima de la cual se trate. En el caso del cobre, el plomo puede ejercer un efecto antagónico disminuyendo la actividad de la enzima dependiente de cobre. Se ha observado que este efecto disminuye cuando las células son sometidas a un exceso del metal esencial.

El plomo puede ejercer su efecto también al interactuar con otras enzimas, mismas que indirectamente participan en el metabolismo de defensa antioxidante. Una de estas enzimas es la Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, primera enzima de la ruta de las pentosas fosfato. Esta inhibición origina que la concentración de NADPH (formado como uno de los productos de la reacción) disminuya y por consecuencia se reduzca la concentración de glutatión reducido (GSH) mismo que sirve como sustrato de la enzima Glutación peroxidasa. La

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa posee muchos grupos SH mismos que le ayudan a conservar su estructura terciaria. En presencia del plomo, estos grupos forman conjugados y/o complejos S-Pb-S. Estos conjugados han sido demostrados al utilizar compuestos de naturaleza tiólica, mismos que previenen la unión del plomo a los sulfhidrilos, restableciendo la actividad de la enzima de la ruta de las pentosas fosfato.

La exposición a plomo induce la lipoperoxidación y la acumulación de malondialdehído (MDA), alterando la fluidez de la membrana. Se ha demostrado que el plomo puede inducir apoptosis en una gran variedad de líneas celulares, fenómeno en el cual, el plomo actúa como un mimético del calcio, ya que estos dos metales comparten ligeramente la misma naturaleza química.

El fenómeno de lipoperoxidación se ha relacionado con la disminución de glutatión y la generación de las especies reactivas de oxígeno (Franco, 2009; Swaran, 2009; Jomova, 2011; Gurer, 2000).

La Figura 8 muestra el esquema general de acción del plomo al entrar en las células. El fenómeno de la intoxicación por plomo resulta un proceso complicado en el que intervienen muchos factores como la susceptibilidad al daño de las macromoléculas dentro de las células, así como la generación de especies aún más tóxicas que el propio plomo, dado que la interacción directa del plomo con el material genético puede dar lugar a mutaciones, mismas que a lo largo terminarán expresándose en diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer, por el cual se desencadena la muerte celular (apoptosis) de manera desregulada y, como consecuencia dando lugar a la muerte del organismo.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

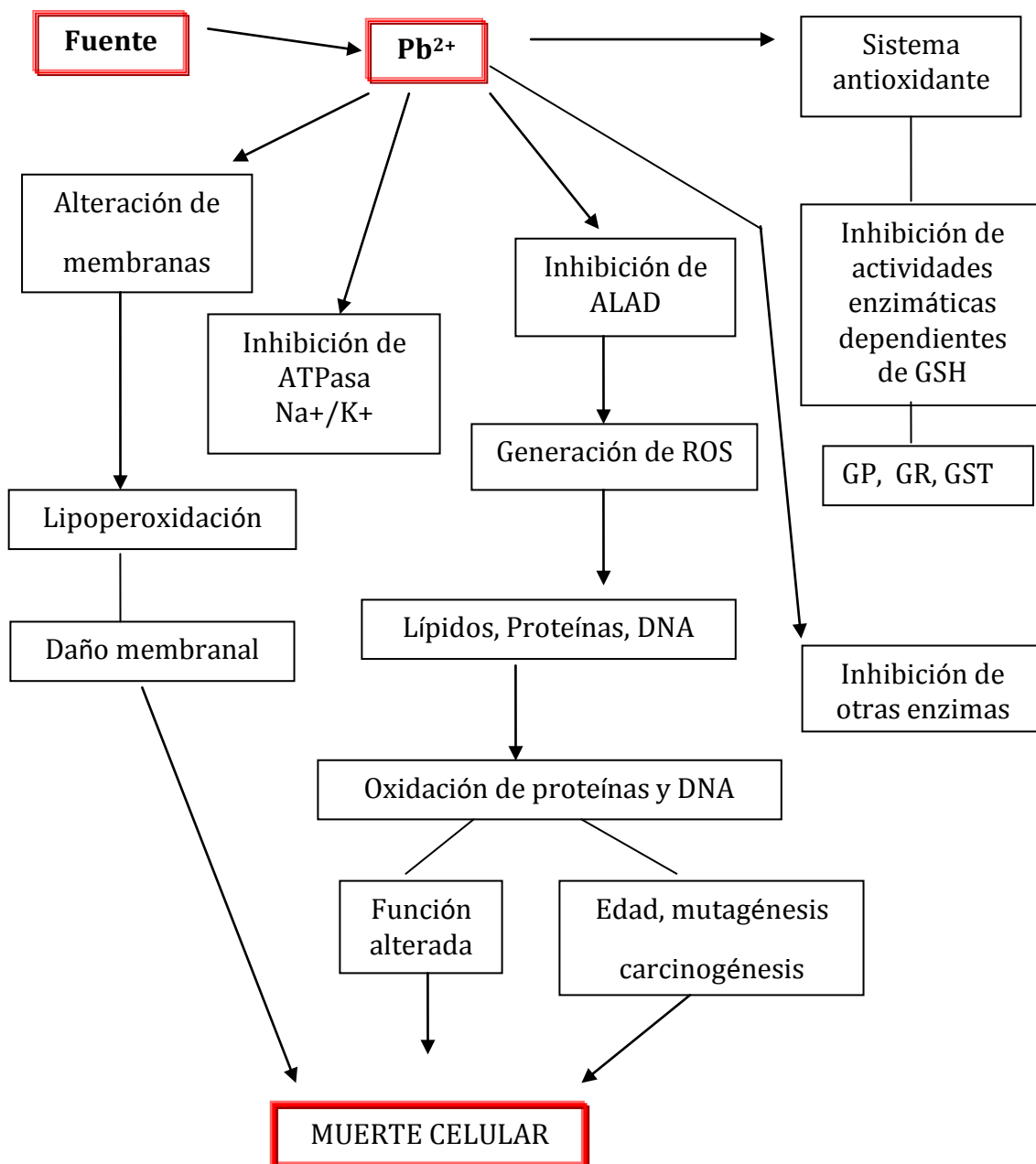


Figura 8. Esquema general de acción del plomo (modificado de Gurer, 2000).

Todos los mecanismos de acción mencionados para el plomo conllevan al daño celular. En el humano se ha tratado de relacionar la concentración de

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

plomo en sangre con el daño ocasionado por la exposición a plomo. La figura 9 muestra la propuesta de Swaran, en relación a lo explicado anteriormente.

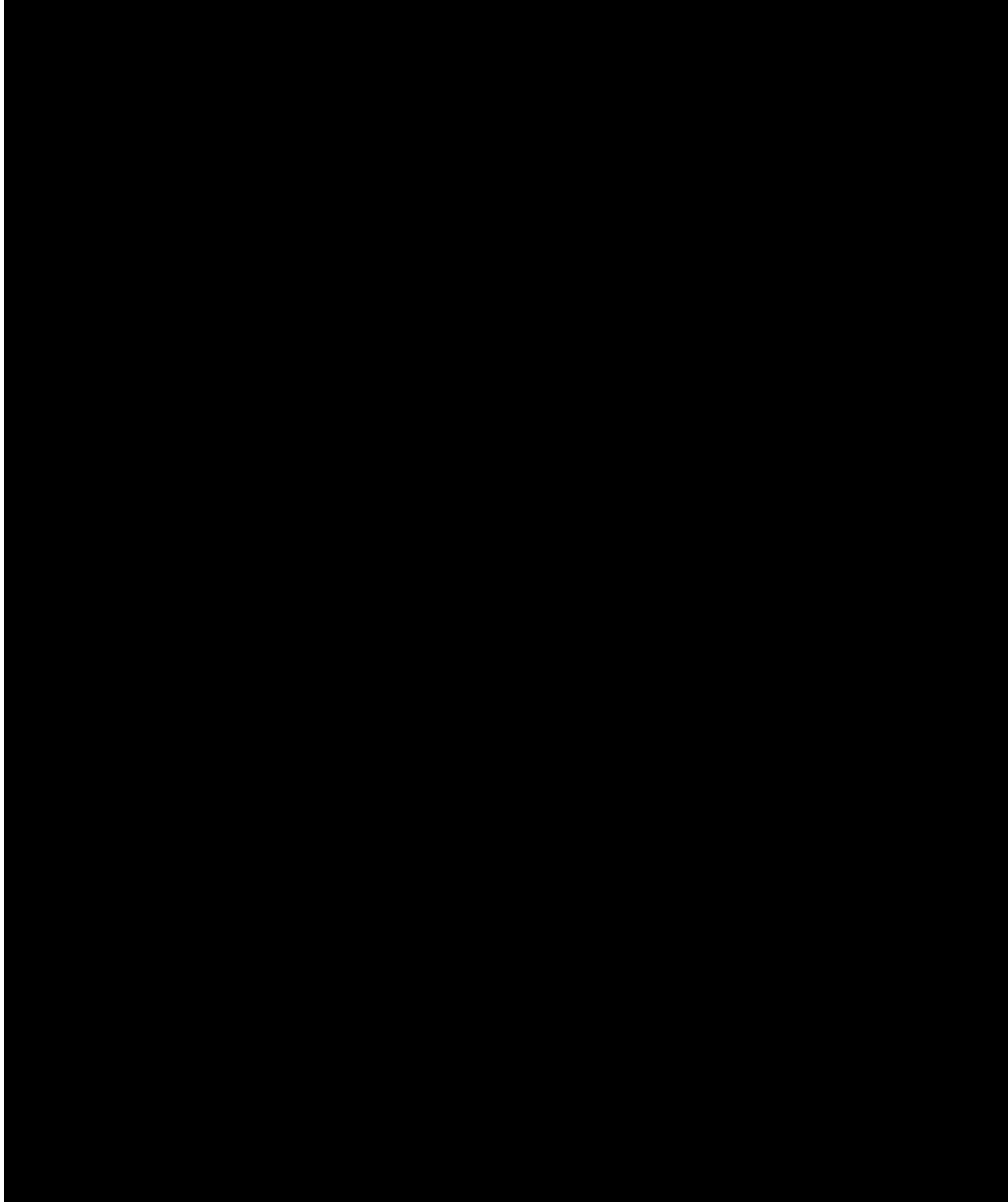


Figura 9. Daño en humanos ocasionado por plomo (la columna de en medio se refiere a la concentración de plomo en sangre dada en mg/dL) (modificado de Gurer, 2009).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

En este esquema se pueden apreciar las diferentes concentraciones de plomo determinadas en sangre y su posible relación con los padecimientos que los seres humanos pueden llegar a desarrollar. Entre los efectos observados existen diferencias con el sexo y la concentración de plomo en sangre. Por ejemplo; en relación con la disminución de la síntesis de Hemoglobina, los hombres no muestran efectos hasta alcanzar la concentración de 50 mg/dL de plomo en sangre aproximadamente, mientras que las mujeres, muestran este efecto a concentraciones 10 veces menores. Los hombres sufren de infertilidad, mientras que en mujeres, este efecto no se ha reportado.

2.1.5. Glutación S-transferasa

El proceso de detoxificación es una capacidad metabólica y de defensa de los seres vivos. En los mamíferos este proceso se lleva a cabo en el hígado, en donde se localiza toda la maquinaria enzimática utilizada para proteger a los organismos de los procesos de intoxicación de agentes endógenos o exógenos a quienes comúnmente se conocen como xenobióticos. Este metabolismo se lleva a cabo en dos fases. La primera se encuentra a cargo de la familia del citocromo P₄₅₀ y se caracteriza por la transformación de los compuestos tóxicos en derivados hidrofílicos, mismos que entran a la fase 2. En esta los compuestos recién formados se conjugan con una serie de ligandos que los vuelven solubles en agua y fácilmente excretables a través de la orina. Uno de éstos es el glutatión (tripéptido formado por tres aminoácidos orientados en forma de γ -glutamilcisteinilglicina). Esta reacción de conjugación se lleva a cabo por la enzima Glutatión S-transferasa. La Figura 10 muestra el metabolismo general de los xenobióticos y la participación de la GST.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

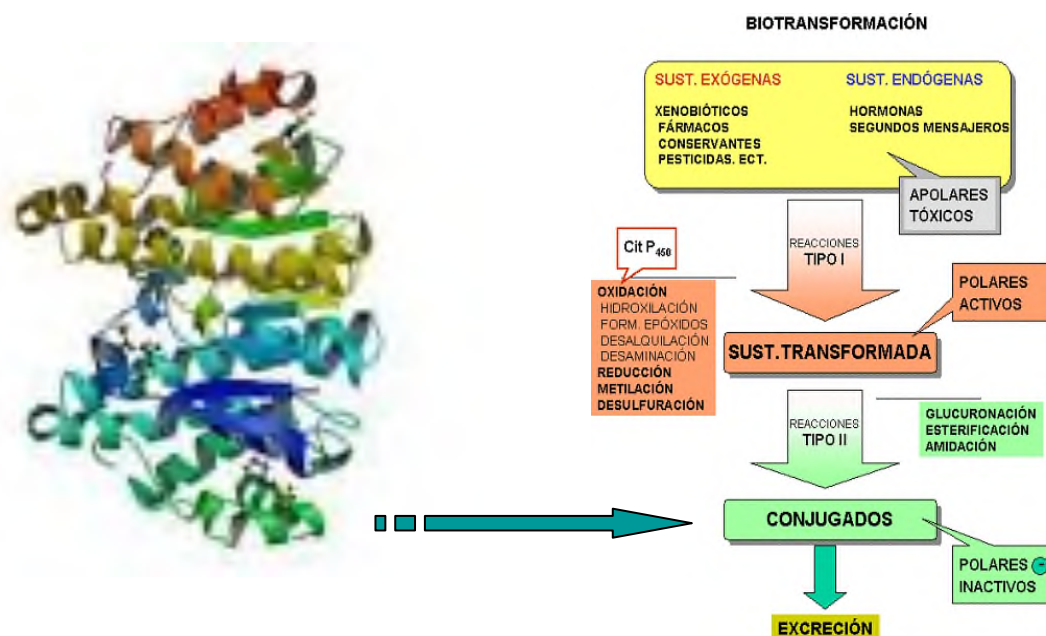


Figura 10. Estructura general de la Glutathion S-transferasa(A) y metabolismo de los xenobióticos (B). La flecha indica el lugar de participación de la enzima. (tomado de *Recombinant_Human_Glutathion_S_transferase_pi_1*).

La Glutathion S-transferasa (GSTs; EC 2.5.1.18) es una familia de enzimas solubles en agua, con masa moleculares típicas de 25 a 50 kDa y cada una de ellas se encuentra compuesta de dos unidades polipeptídicas. Se pueden encontrar en bacterias, levaduras, nemátodos, insectos, peces, pájaros y mamíferos. En los humanos y muchos mamíferos, estas enzimas se pueden localizar en diferentes tejidos con patrones de expresión órgano-específicos. Clásicamente, la Glutathion S-transferasa cataliza la transferencia del tripéptido glutathion (γ -glutamilcisteinilglicina) a un co-sustrato (R-X; puede ser de diferente naturaleza como drogas terapéuticas, carcinógenos y contaminantes ambientales) conteniendo un centro electrofílico reactivo para formar un producto de reacción S-glutationilado polar (R-SG), mismo que puede ser desechado por vía urinaria.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Los eucariontes poseen múltiples isoenzimas citosólicas unidas a la membrana, cada una de ellas tienen propiedades de unión catalíticas o no catalíticas. Las enzimas citoplásmicas son codificadas por al menos cinco genes relacionados (isoformas alfa, pi, mu, sigma y teta), mientras que las enzimas unidas a membrana, la GST microsomal y la leucotrienos C4 sintetasa se encuentran codificadas por genes simples. Su nivel de expresión puede tener efectos profundos en la susceptibilidad a las agresiones químicas por lo cual una sobreexpresión puede originar eventos de resistencia y una expresión pobre puede dar lugar a eventos de susceptibilidad. El control biológico de estas enzimas resulta un proceso muy complejo ya que involucra factores como sexo, edad, tejido, especie y patrones de expresión tumor-específicos. GST es regulada por un intervalo estructural de xenobióticos muy diverso y a la fecha se han identificado aproximadamente cerca de 100 químicos inductores de actividad. Dentro de estas sustancias se han identificado elementos no nutritivos que se encuentran en vegetales y frutas cítricas, debido posiblemente a la gran contaminación con fertilizantes e insecticidas dentro de la agricultura.

Muchos inductores, pero no todos, afectan la activación transcripcional de los genes de GST a través del elemento de respuesta antioxidante (ARE), el elemento de respuesta a xenobióticos (XRE), el enhancer GST P 1 (GPE), o el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE). Los barbitúricos pueden activar transcripcionalmente a GST a través de la caja Barbie. Recientemente se estudia la participación de compuestos como el receptor AH, Maf, NRL, Jun, Fos y NF-kappa B en la inducción de GST.

Muchos de los compuestos que inducen a la GST son sustancias químicas que sirven como sustratos para estas enzimas o son metabolizados por citocromo P₄₅₀ mono oxigenasas a compuestos que pueden servir como sustratos de GST. Esto sugiere que la inducción de GST representa parte de un

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

mecanismo de respuesta adaptativo al estrés químico causado por especies electrofílicas.

Se ha sugerido la posible regulación *in vivo* de la GST por las especies reactivas de oxígeno. En plantas y células de mamífero se ha observado que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) induce la expresión de GST.

En cuanto a la relación de la GST con los procesos cancerosos, la mayoría de los tumores humanos expresan cantidades significantes de GST clase pi y en menor proporción la expresión de las clases mu y alfa. Los mecanismos responsables para la sobre expresión de GST incluyen activación transcripcional, estabilización del RNA mensajero o proteínas y la amplificación genética. En los humanos existen diferencias interindividuales marcadas en la expresión de las clases mu, alfa y teta involucrados en diferentes procesos patológicos (Hayes, 1995).

Estas enzimas fueron descubiertas primero en animales, en la década de 1960 y posteriormente en plantas a partir de 1970. Muchas isoformas han sido purificadas a partir de tejidos de animales desde hace aproximadamente 30 años y se han clasificado de acuerdo a sus características bioquímicas e inmunológicas. La Figura 11 muestra la existencia de un gran número de genes codificantes para los tres grupos de GST en mamíferos.

Las GST también catalizan la conjugación con ligandos endógenos y la catálisis de reacciones en vías metabólicas no asociadas con el proceso de en el cual normalmente actúan. Estas proteínas pueden llevar a cabo el proceso de detoxificación de cancerígenos químicos y contaminantes medioambientales transformadas en xenobióticos electrofílicos por las enzimas de la fase I. Dentro de las actividades no detoxificantes, la GST se encuentra involucrada en la biosíntesis de prostaglandinas, testosterona y progesterona, así como en la degradación de tirosina. Además y debido a la interacción de la acción de

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

conjugación de GST con factores de transcripción puede influir en los procesos metabólicos relacionados con el metabolismo de las prostaglandinas. La GST que se encuentra en el citosol de las células de humanos puede mostrar polimorfismo genético y su variación puede incrementar la susceptibilidad a los procesos cancerosos o a daños inflamatorios. La isoforma MAPEG, se ha asociado con alteración de la función pulmonar y con el riesgo incrementado de infarto al miocardio (Sheehan, 2001; Hayes, 2005).

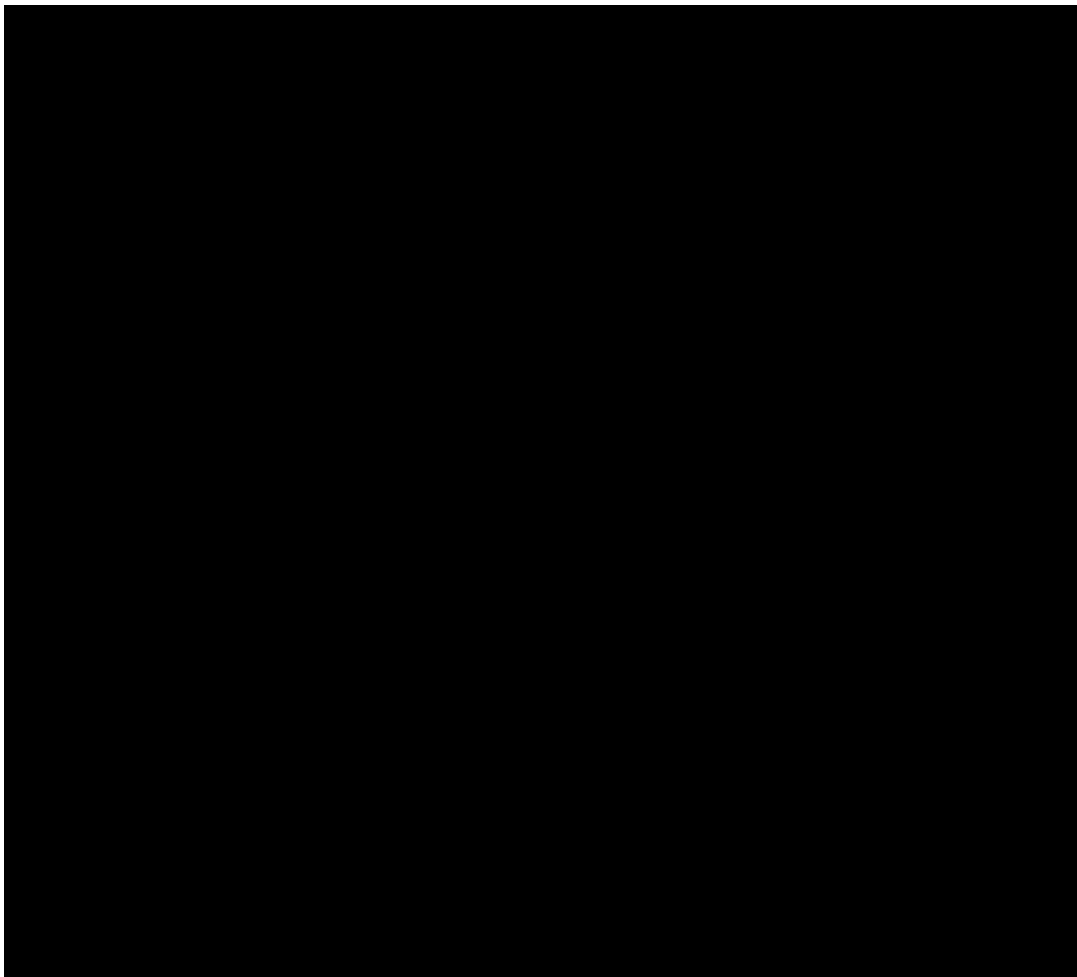


Figura 11. Familia de genes codificantes para GST citosólica, microsomal y mitocondrial (tomado de Pool-Zobel, 2005).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

En relación al efecto del plomo sobre la actividad de la GST, este puede ser tanto de forma directa (al unirse al sitio activo inhibiendo la actividad) como de forma indirecta (mediante la depleción de glutatión o de NADP). Se debe tomar en cuenta, dentro de este fenómeno, que el efecto del metal también depende del órgano, el modelo de estudio, la dosis y la vía de administración del tóxico. Lo anterior transforma al fenómeno de la intoxicación con plomo un fenómeno muy complejo, mismo que requiere, para su estudio, de técnicas de análisis bioquímico y analítico, mismas que al interaccionar podrán proporcionar una información más completa y ayudarán a esclarecer más el efecto de metales como el plomo en los seres vivos.

2.2. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN A TRAVÉS DE LA QUIMIOMETRÍA

De acuerdo a Massart (1997), "la Quimiometría puede definirse como aquella parte de la Química que utiliza matemáticas, estadística y lógica formal como herramientas para: a) diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, b) identificar la mayor cantidad de información relevante a través del análisis de datos químicos, y c) obtener conocimiento acerca de los sistemas químicos". Beebe (1998) prefiere definirla de una manera más simple como "el uso de herramientas matemáticas y estadísticas para analizar datos químicos" o incluso como "el proceso mediante el cual los datos son transformados en información para la toma de decisiones". Por su parte, Adams (1995) considera que "abarca técnicas y operaciones asociadas a la manipulación matemática e interpretación de datos químicos". Los tres casos coinciden en la utilización de herramientas matemáticas y estadísticas para generar información a partir de datos químicos.

Para su utilización eficaz, Beebe (1998) sugieren los seis hábitos de un quimiométrico efectivo:

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

1. *Examinar los datos*, generalmente a través de su visualización en tablas o gráficas, mediante las cuales puedan identificarse a simple vista datos sospechosos o tendencias en los datos observados.
2. *Preprocesar los datos*, según se requiera.
3. *Estimar un modelo*, y con ello realizar un diagnóstico.
4. *Examinar los resultados*. Ya que todo proceso quimiométrico genera números, tablas o representaciones gráficas, es necesario evaluar qué tan válidos o significativos son tales resultados.
5. *Utilizar el modelo para predecir*. Para aquéllos ejercicios donde se generan modelos predictivos, este paso consiste en aplicarlos a objetos desconocidos para conocer sus propiedades o clasificarlos.
6. *Validar la predicción*. A través de herramientas de diagnóstico, es posible determinar si el modelo es o no aplicable a los datos a analizar.

En todo caso, nunca debe perderse de vista que los conocimientos previos sobre el sistema bajo estudio son fundamentales para utilizar con éxito la Quimiometría. En otras palabras, el conocimiento químico prevalece siempre sobre el quimiométrico. A continuación se da una breve descripción de las herramientas quimiométricas utilizadas en este trabajo.

2.2.1. Medidas de tendencia central

Para representar una serie de mediciones, comúnmente se utilizan dos parámetros que reflejan su tendencia: el valor promedio (una medida de la localización del valor central) y el grado de variabilidad (o dispersión).

La media aritmética (también conocida como media o promedio, \bar{x}) representa la ubicación del centro de un grupo de n datos x_i ($i=1, 2, 3, \dots, n$) en una distribución estadística y se calcula de acuerdo a:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (1)$$

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

La desviación estándar (s) es la medida de la dispersión de los datos respecto a la media ($n < 30$), la cual está dada por la siguiente fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (2)$$

Otro parámetro importante es el intervalo de confianza de la media, que se usa para identificar el intervalo en el cual se encuentra el valor verdadero de x de acuerdo a:

$$\bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Donde t se obtiene de la tabla de distribución *t de student*, con un nivel de significancia α y $n-1$ grados de libertad (Miller, 2002).

2.2.2. Pruebas de hipótesis

Es el área más importante de la estadística, junto con la estimación de parámetros. Se usa para evaluar si se acepta o rechaza una hipótesis estadística, generalmente sobre parámetros, distribuciones de probabilidad o la bondad del ajuste entre dos poblaciones (teóricas o empíricas). Se basa en la aplicación de una prueba estadística a las observaciones realizadas (Frank, 1994).

La hipótesis a evaluar se llama hipótesis nula (H_0); la hipótesis alternativa (H_1) es aquella que se acepta en caso de que la hipótesis nula sea rechazada. El error cometido al rechazar una hipótesis nula verdadera se llama error α o tipo I, mientras que el cometido al aceptar una hipótesis nula falsa recibe el nombre de error β o tipo II.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

La región de rechazo es aquella región de la distribución que lleva a rechazar la hipótesis nula si el valor de la prueba estadística cae en ella. Una prueba de hipótesis en la cual la región de rechazo se encuentra en un sólo lado de la distribución se llama prueba de una cola, un extremo o unilateral. Por el contrario, si la región de rechazo comprende áreas a ambos extremos de la distribución recibe el nombre de prueba de dos colas, dos extremos o bilateral. Generalmente, se usan pruebas bilaterales cuando se desea establecer si dos parámetros son iguales o diferentes, en cuyo último caso no importa quién es mayor o menor; las pruebas unilaterales se aplican cuando se desea evaluar si un parámetro es mayor o igual (o menor o igual) a otro (Miller, 2002).

El nivel de significancia de una prueba de hipótesis equivale a la probabilidad de cometer un error tipo I; es decir, a la probabilidad de rechazar una hipótesis nula verdadera (Frank, 1994).

2.2.2.1. Pruebas de Distribución

Las pruebas de distribución o bondad de ajuste permiten evaluar si los datos cumplen una distribución particular. Se basan en la comparación de la distribución observada con una distribución teórica o esperada.

Es común asumir que una muestra pertenece a una población con distribución normal, ya que la mayoría de las pruebas estadísticas se basan en ello (pruebas paramétricas). Las pruebas usadas comúnmente para evaluar si una serie de datos sigue una distribución normal son la Prueba Chi cuadrada y la Prueba de Kolmogorov-Smirnov. Sin embargo, se recomienda aplicarlas cuando $n > 50$ (Massart, 1997), siendo n el número de datos.

Si bien no hay pruebas que a partir de tres o cuatro datos puedan evaluar con gran confiabilidad si éstos siguen o no una distribución normal (Hibbert,

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2006), existen pruebas dirigidas a pocos de ellos. Todas parten de las siguientes hipótesis:

H_0 : los datos están normalmente distribuidos

H_1 : los datos no están normalmente distribuidos

La prueba de Shapiro-Wilk es considerada como la prueba más potente cuando $n < 30$. La prueba W se calcula de acuerdo a:

$$W = \frac{(\sum_{i=1}^n a_i x_i)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (4)$$

Donde x_i son los valores evaluados previamente ordenados y a_i son constantes generadas de las medias, varianzas y covarianzas del estadístico para una serie de n datos con distribución normal. La hipótesis es aceptada si su nivel de significancia es menor a 0.05 (Peña, 1997).

La prueba no paramétrica de Anderson-Darling es una modificación de la prueba de Kolmogorov-Smirnov test y se aplica cuando los parámetros de la distribución deben determinarse. Permite evaluar una distribución normal, log-normal, exponencial, Weibull y logística. La prueba A se estima a partir de:

$$A^2 = -N - S \quad (5)$$

Donde

$$S = \sum_{i=1}^N \frac{(2i-1)}{N} [\ln F(Y_i) + \ln(1 - F(Y_{N+1-i}))] \quad (6)$$

Siendo $y_1 < \dots < Y_N$ los datos previamente ordenados ascendentemente y F es la función de distribución acumulativa de la distribución a evaluar. La prueba es

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

unilateral y la hipótesis de que los datos siguen cierta distribución es rechazada si A es mayor que el valor crítico (NIST/SEMATECH, 2012).

La prueba de Lilliefors es una modificación de la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se aplica en casos en los que la media y la varianza no se conocen y deben ser estimados. La prueba estadística D se define en base a la mayor diferencia absoluta entre $S(x)$ y $F(x)$, esto es:

$$D = \max|F(x) - S(x)| \quad (7)$$

Donde $S(x)$ es la distribución acumulativa de la muestra y $F(x)$ es la probabilidad acumulativa normal. Si la hipótesis nula es cierta, entonces ambas distribuciones debieran ser similares. $S(x)$ se define como la proporción de los valores de la muestra que tienen valores menores o iguales a los valores en x . Si la D estimada es menor al valor crítico, se acepta la hipótesis nula (Dickinson, 2003).

La prueba Jarque-Bera se basa en que la asimetría y curtosis de una distribución normal es igual a cero; por ello, el valor absoluto de estos parámetros puede ser una medida de la desviación de una distribución normal. La Prueba SB se calcula de acuerdo a:

$$JB = \frac{n}{6} \left\{ (asimx_s)^2 + \frac{(curtx_s)^2}{4} \right\} \quad (8)$$

Entonces, el valor p se calcula usando una tabla de distribución de cuantiles. La prueba es más poderosa conforme aumenta el número de muestras, ya que conforme aumenta el número de n converge en la distribución Chi cuadrada con dos grados de libertad. La hipótesis es aceptada si su nivel de significación es menor a 0.05 (ALGLIB, 2012).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.2.2.2. Identificación de datos aberrantes

Un dato sospechoso, aberrante o anormal es aquél que a simple vista se observa alejado de la tendencia central del resto de datos. Las pruebas más comunes para su identificación son la Prueba de Dixon (Q_{10}) y la Prueba de Grubbs (G), que parten de las siguientes hipótesis:

H_0 : todos los datos provienen de la misma población.

H_1 : un dato proviene de diferente población que el resto.

Donde:

$$Q_{10} = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1} \quad (9)$$

para un tamaño de muestra de $n=3$ a 7 y una población normal, así como

$$G = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \quad (10)$$

En casos donde el valor de Q_{10} o G calculado sea menor que $Q_{10, crítica}$ o $G_{crítica}$, entonces se acepta la hipótesis nula, sin el rechazo del dato sospechoso. Cuando el valor calculado de Q_{10} o G sea mayor que el valor crítico, entonces el dato se identifica como aberrante y se retira de la serie.

2.2.2.3. Comparación de varianzas

La comparación de varianzas de dos series de datos independientes se realiza a través de la Prueba F , partiendo de las hipótesis:

$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$

$H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Donde las varianzas poblacionales σ_1^2 y σ_2^2 son estimadas por las varianzas muestrales s_1^2 y s_2^2 , respectivamente. En tal caso,

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (11)$$

Siendo F el valor a comparar con la $F_{crítica}$ de n_1-1 y n_2-1 grados de libertad, s_1 y s_2 la mayor y menor varianza, respectivamente. Si $F_{calculada} < F_{crítica}$, la hipótesis nula se acepta y las dos varianzas se consideran estadísticamente iguales. Si $F_{calculada} > F_{crítica}$, la hipótesis nula se rechaza y se acepta la hipótesis alternativa, considerándose ambas varianzas diferentes.

2.2.2.4. Comparación de medias experimentales

Para la comparación de dos medias aritméticas de series de datos independientes donde $n < 30$, se consideran como hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Donde \bar{x}_1 y \bar{x}_2 son estimaciones de μ_1 y μ_2 , las medias poblacionales. Entonces,

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (12)$$

y

$$s^2 = \frac{[(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2]}{[(n_1) + n_2 - 2]} \quad (13)$$

Donde t es el valor a comparar con la distribución t de Student con $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad; n_1 y n_2 son los datos relacionados con la mayor \bar{x}_1 y menor \bar{x}_2 media aritmética, respectivamente; s es la desviación estándar combinada.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Esta expresión se utiliza en los casos en que las varianzas sean homogéneas (es decir, no hay una diferencia estadísticamente significativa entre ellas). Para varianzas estadísticamente diferentes, se usan las ecuaciones:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (14)$$

y

$$\text{grados de libertad} = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}\right)} \quad (15)$$

Si $t_{calculada} < t_{crítica}$, entonces se acepta la hipótesis nula, considerándose que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias. En el caso de que $t_{calculada} > t_{crítica}$ la hipótesis nula se rechaza y se acepta la alternativa, considerándose ambas medias estadísticamente diferentes.

2.2.2.5. Análisis de Varianza (ANOVA)

ANOVA es una herramienta estadística que permite comparar más de dos medias e identificar qué factores de los evaluados influyen en los resultados. El análisis se sustenta en que para una serie de datos obtenidos en las mismas condiciones, cada resultado individual x_{ij} se puede representar como:

$$x_{ij} = \mu + e_{ij} \quad (16)$$

Donde x_{ij} es el i -ésimo resultado en la columna j , μ es la media verdadera y e_{ij} es la desviación de x_{ij} respecto a μ . Se asume que e_{ij} tiene una distribución normal, con media igual a cero y varianza $\sigma_e^2 = \sigma^2$

Sin embargo, si un factor o más influyen significativamente en los datos, entonces:

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

$$x_{ij} = \mu + a_j + e_{ij} \quad (17)$$

$$\sum a_j = 0 \quad (18)$$

Donde a_j es el efecto del factor influyente en relación a la media total. En tales condiciones, la varianza de x_{ij} alrededor de μ no puede determinarse solamente por e_{ij} y no será igual a σ^2 . El término a_j introduce varianza adicional a los datos, de manera que será mayor a σ_e^2 . Por lo tanto, puede esperarse que el análisis de la varianza permita determinar si ciertos factores tienen un efecto en los datos, o no. No se requiere que los efectos sean independientes, pero sí que los datos tengan una distribución normal.

Así, ANOVA en general permite determinar si hay una diferencia significativa entre diferentes condiciones de un mismo factor (*ANOVA simple, en un sentido*), o entre diferentes factores (*ANOVA múltiple, en múltiples sentidos*). Se parte de la hipótesis nula de que todos los datos provienen de una población con media μ y varianza σ^2 . Por lo tanto, σ^2 puede estimarse de dos formas: a través de la variación al interior de los grupos o de la variación entre los grupos. Si no hay diferencia estadísticamente significativa entre ellos, entonces se acepta la hipótesis nula y se deduce que el factor (o factores) no influye en los resultados.

Para el ANOVA simple, considere una serie de k grupos, cada uno integrado por n medidas, dispuestas de acuerdo a la Tabla 2.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Tabla 2. Organización de datos para el ANOVA simple.

	Grupo 1	Grupo 2	...	Grupo k
	x_{11}	x_{12}	...	x_{1k}
	x_{21}	x_{22}	...	x_{2k}
	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots
	x_{n1}	x_{n2}	...	x_{nk}
Media	\bar{x}_1	\bar{x}_2	...	\bar{x}_k
Varianza	s_1^2	s_2^2	...	s_k^2
Gran media = \bar{x}				

Aritméticamente, la relación entre las fuentes de variación puede establecerse a través de la estimación de las sumas de cuadrados y grados de libertad, de acuerdo a la Tabla 3.

Tabla 3. Resumen de las sumas de cuadrados.

Fuente de variación	Suma de cuadrados
Entre grupos	$SS_A = \sum_{j=1}^k n_j (\bar{x}_j - \bar{x})^2$
Dentro de grupos	$SS_R = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2$
Total	$SS_T = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x})^2$

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Finalmente, se contrasta la existencia de diferencias significativas entre las medias de más de dos grupos; las fórmulas utilizadas se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Comparación de medias por ANOVA simple.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Entre grupos	$k-1$	SS_A	$MS_A = \frac{SS_A}{k-1}$	$\frac{MS_A}{MS_R}$
Dentro de grupos	$n-k$	SS_R	$MS_R = \frac{SS_R}{n-k}$	
Total	$n-1$	SS_T		

Si $F < F_{0.05; k-1, n-k}$ entonces se acepta la hipótesis nula.

Cabe destacar que en ANOVA se consideran ciertas premisas. La primera es que la varianza de errores aleatorios es prácticamente la misma en todos los grupos, por lo que se asume una homogeneidad de las varianzas. En segundo lugar, se considera que la variación no controlada es aleatoria; por ello, de existir la posibilidad de que se presenten factores no controlados, se recomienda la aleatoriedad en el orden de obtención de datos o la definición de bloques (Massart, 1997; Miller, 2002).

2.2.3. Resumir, correlacionar y visualizar: los objetivos del Análisis de Datos

A partir de una serie de datos es posible generar conocimientos, a través de a) desarrollar nuevos conceptos sustentados en ellos, o bien b) establecer nuevas relaciones entre conceptos ya existentes a través del análisis de la correlación de datos.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Cabe destacar que en el Análisis de Datos, el término "correlación" va más allá de la expresión de una relación lineal entre dos o más variables; supone una afinidad entre dos o más aspectos de una serie de datos, que generalmente involucra cinco aspectos (Mirkin, 2011):

- a) Búsqueda de estructuras matemáticas en los datos.
- b) Modelos computacionales que relacionan los datos con estructuras matemáticas.
- c) Criterios para evaluar la correspondencia entre los datos y las estructuras matemáticas.
- d) Métodos para optimizar tal correspondencia.
- e) Visualización de los resultados.

Entiéndase por estructuras matemáticas:

- a) Combinaciones lineales de las características que describen el sistema bajo estudio.
- b) Redes neuronales que establecen las conexiones entre información de entrada y salida.
- c) Esquemas de decisión.
- d) Conglomerados.

2.2.3.1. Preprocesamiento de datos

Esta es una etapa muy importante del Análisis de Datos. Se divide en dos grandes grupos: preprocesamiento por objetos o por variables (Infometrix, 1998; Beebe, 1998).

En el *preprocesamiento por objetos*, se opera sobre todas las variables de un objeto, antes de pasar al siguiente. Si un objeto se identificase como aberrante y se eliminase de la serie, esto no afectaría a los datos relacionados con el resto

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

de objetos. Las herramientas de preprocesamiento más destacadas son las siguientes:

- a) Normalización. Pone todos los objetos en la misma escala, dividiendo sus variables por la misma constante en todos los casos.
- b) Ponderación. Da a un objeto mayor influencia en el análisis que al resto.
- c) Suavizado. Reduce la cantidad de variación aleatoria (ruido).
- d) Corrección de línea base. Reduce la variación sistemática.

En el *preprocesamiento por variables*, se opera sobre la misma variable de todos los objetos, antes de pasar a la siguiente. Si se identificase un objeto como aberrante y se eliminase de la serie, o se adicionara un objeto a la misma, cambiaría el resultado del preprocesamiento, por lo que debería repetirse. Las herramientas más destacadas son:

- a) Centrado sobre la media. Se utiliza para identificar el centro de los datos en la serie de objetos; es de gran utilidad para visualizar los datos y sus tendencias. Se realiza a través de las siguientes expresiones:

$$\bar{x}_j = \frac{1}{n} \sum_i^n x_{ij} \quad (19)$$

$$x_{ij(mc)} = x_{ij} - \bar{x}_j \quad (20)$$

- b) Escalamiento sobre la varianza. Se recomienda en aquéllos casos donde las variables están dadas en diferentes órdenes de magnitud, o diferentes unidades (por corresponder a diferentes propiedades). Se calcula mediante:

$$s_j^2 = \frac{1}{n-1} \sum_i^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 \quad (21)$$

$$x_{ij(vs)} = \frac{x_{ij}}{s_j} \quad (22)$$

c) Autoescalamiento. Consiste en centrar sobre la media y escalar sobre la varianza, simultáneamente. Cuando se recurre a este algoritmo, se dice que se han estandarizado los datos; se aplica cuando se persiguen los beneficios de ambos tipos de preprocesamiento, de acuerdo a:

$$x_{ij(as)} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j} \quad (23)$$

d) Escalamiento por rango. Todos los valores de las variables se llevan al intervalo entre 0 y 1; debe tenerse especial cuidado por la presencia de objetos aberrantes, que afectarían en gran medida los resultados. Se realiza a través de la expresión:

$$x_{ij(rs)} = \frac{x_{ij} - x_{j(\min)}}{x_{j(\max)} - x_{j(\min)}} \quad (24)$$

2.2.3.2. Coeficiente de correlación de Pearson

En algunos casos resulta de interés establecer si dos variables, características o parámetros del mismo sistema están relacionados (de manera que el cambio de uno tienda a ocurrir con cambios en el otro), con el fin de:

- Predecir los valores de una variable a partir de la otra.
- Generar conocimiento, a través de la interpretación y/o explicación de tal relación en función de conocimientos previos (Mirkin, 2011).

Sin embargo, debe tenerse siempre presente que la correlación no debe confundirse con la causalidad. Es decir, ante las preguntas:

1. ¿Existe una relación causal detrás de una correlación alta entre dos variables?
2. ¿Son independientes dos variables que presentan una correlación baja?

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

3. Si existe una relación causal entre dos variables, ¿se traduce en una gran correlación?

La respuesta es: no necesariamente, en todos los casos. El hecho de que x se incremente conforme lo hace y , puede deberse a un cambio en una tercera variable z , por ejemplo (Mirkin, 2005; Berthouex, 2002).

Covarianza y correlación

La covarianza entre las variables x y y es una medida de su dependencia lineal; se estima de acuerdo a:

$$Cov(x, y) = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{N} \quad (25)$$

Donde μ_x y μ_y son las medias poblacionales de las variables x y y , mientras que N es el tamaño de la población. Si x y y son independientes, la $Cov(x, y)$ es cero. Sin embargo, si $Cov(x, y) = 0$ no necesariamente significa que las variables son independientes.

La covarianza depende de la escala de las variables, lo que hace imposible en la práctica establecer si la covarianza es grande o pequeña. Por ello, se suele recurrir a una covarianza sin influencia de escalas, que es el coeficiente de correlación $\rho(x, y)$ o simplemente ρ , el cual se obtiene al dividir la covarianza por las dos desviaciones estándar σ_x y σ_y , respectivamente. Los posibles valores de ρ varían entre -1 y +1. Si x es independiente de y , entonces ρ es cero. Valores cercanos a -1 ó +1 indican una gran correspondencia entre x y y (Berthouex, 2002).

El coeficiente de correlación del producto-momento de Pearson, coeficiente de correlación de Pearson ρ ó simplemente r se calcula de acuerdo a:

$$\rho = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} \quad (26)$$

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

La prueba de hipótesis aplicada a ρ para determinar si las variables de origen tienen correlación significativa parte de $H_0: \rho=0$ y $H_1: \rho \neq 0$, en la que:

$$t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (27)$$

En este caso, t representa el valor a comparar con la distribución t de Student con $n-2$ grados de libertad y un nivel de significación α (Massart, 1997). Si $t_{calculado} < t_{crítico}$, entonces se acepta la hipótesis nula y la correlación entre ambas variables es despreciable; en caso contrario, se rechaza la hipótesis nula, se acepta la alternativa y la correlación entre x y y es significativa.

2.2.3.3. Correlación en series de tiempo

Una serie de tiempo consiste en un conjunto de datos discretos ordenados $x_1, x_2, \dots, x_{t-1}, x_t, x_{t+1}, \dots, z_n$, cuyas observaciones ocurren a intervalos de tiempo determinados. Es decir, el valor de x_1 corresponde a un tiempo t_1 , el valor de x_2 a un tiempo t_2 , y así sucesivamente. El valor de x puede conocerse con precisión, o bien ser una medición con un error asociado. Las series pueden ser univariantes o multivariantes, dependiendo si están representadas por una variable o varias. También pueden diferenciarse las estacionarias (la media y varianza no cambian con el tiempo) de las no estacionarias (la media aumenta o disminuye).

Cualquiera que sea el caso, existen factores que provocan variaciones en uno u otro sentido, lo cual es "recordado" por el sistema; por ende, las observaciones dependen de las que les anteceden, lo cual se conoce como autocorrelación (Berthouex, 2002; Mitsa, 2010). Así, el Análisis de las Series de Tiempo consiste en un conjunto de herramientas que permiten describirlas y estudiarlas, generalmente para descubrir patrones (tales como la periodicidad estacional o ciclos), al igual que predecir información (Fichet, 2011).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Generalmente, el primer paso de un análisis de esta naturaleza consiste en representar gráficamente los datos, de acuerdo a:

$$x = f(t) \tag{28}$$

Donde x es la variable dependiente del tiempo, t el tiempo y $x(t)$ la serie de tiempo. Este ejercicio permite reconocer visualmente periodicidad, tendencias, fluctuaciones y datos aberrantes, para decidir posteriormente los pasos a seguir.

Entre las herramientas de análisis más simples, se encuentran las técnicas de correlación, las cuales comprenden las funciones de autocorrelación, correlación cruzada y autocorrelación parcial. El objetivo es comparar una o más funciones y estimar su relación con respecto a un intervalo en tiempo o espacio (τ). De esta forma, pueden revelarse los efectos de memoria dentro de la serie de tiempo o entre series (Einax, 1997).

La correlación entre dos series de tiempo recibe el nombre de *correlación cruzada* $\rho_{xy}(0)$; suele calcularse igual que un coeficiente de correlación convencional (ecuación 26) y sirve para establecer si hay una relación lineal entre ambas series. Su significación se evalúa igualmente a través de la prueba de hipótesis expresada en la ecuación 27. Para ejecutar este análisis, se sustituyen las fechas por números enteros consecutivos (Einax, 1997).

2.2.3.4. Análisis de Conglomerados

Debido a que las técnicas analíticas modernas generan gran cantidad de información cualitativa y cuantitativa, con frecuencia es necesario aplicar métodos formales capaces de resaltar las similitudes y diferencias entre series de objetos. El Análisis de Conglomerados integra una serie de herramientas de exploración que permiten determinar las tendencias o estructuras latentes en tablas de datos aparentemente no relacionados. Se sitúa dentro de las técnicas de Reconocimiento de Pautas Sin Supervisión (*Unsupervised Pattern*

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Recognition). Para su aplicación no es necesario conocer a priori las características de las clases existentes en la información de partida, ya que éstas son determinadas a partir del propio análisis (Adams, 1995). En la Figura 2 se sitúa el Reconocimiento de Pautas no Supervisado en el contexto de la Inteligencia Artificial, de acuerdo a Sharaf (1986).

En general, las técnicas de Análisis de Conglomerados requieren que los datos sean manejados en términos de proximidades. La proximidad es una medida cuantitativa de cercanía; denota similitud, en base a distancia: dos objetos están cerca cuando su distancia es pequeña, o bien su similitud es grande: véase Figura 12 (Govaert, 2009).

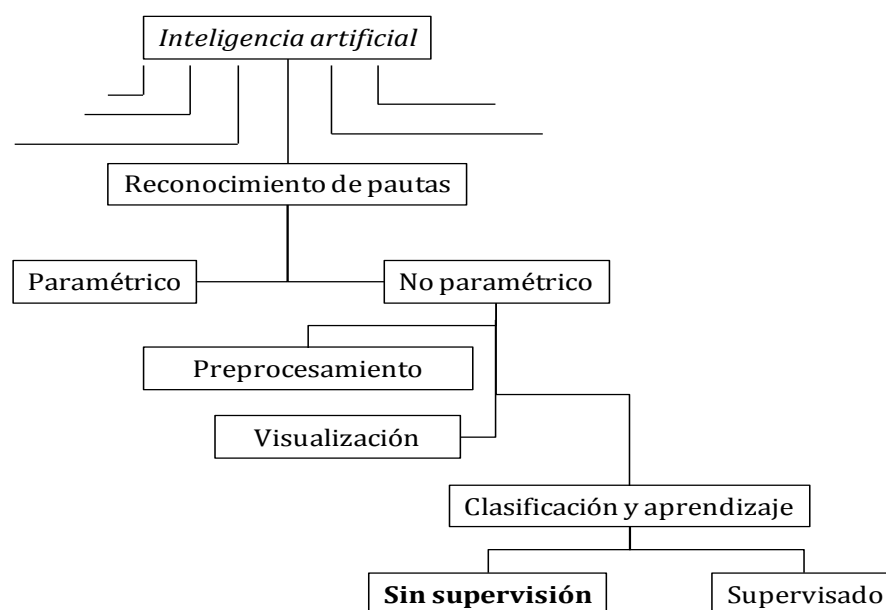


Figura 12. Reconocimiento de Pautas (tomado de Sharaf, 1986).

Actualmente existen diferentes algoritmos basados en los conceptos de proximidad. La diferencia entre ellos radica en las estrategias utilizadas para construir o dividir los grupos. En términos generales, se subdividen en:

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

- a) Técnicas jerárquicas, donde los objetos se agrupan para formar nuevos objetos representativos, repitiéndose el proceso en distintos niveles hasta crear una estructura de árbol, el *dendograma*.
- b) Técnicas que emplean algoritmos iterativos para la optimización de la división de los objetos en grupos, hasta alcanzar variaciones mínimas; una de las más populares se basa en el *algoritmo de las K medias (K-Means)*.
- c) Técnicas con las que no sólo se reúnen los objetos en grupos de acuerdo a sus proximidades, sino también se evalúa el grado en que cada uno de los objetos pertenece a un grupo en particular; la técnica más reconocida es la de *Agrupamiento Difuso (Fuzzy Clustering)* (Adams, 1995).

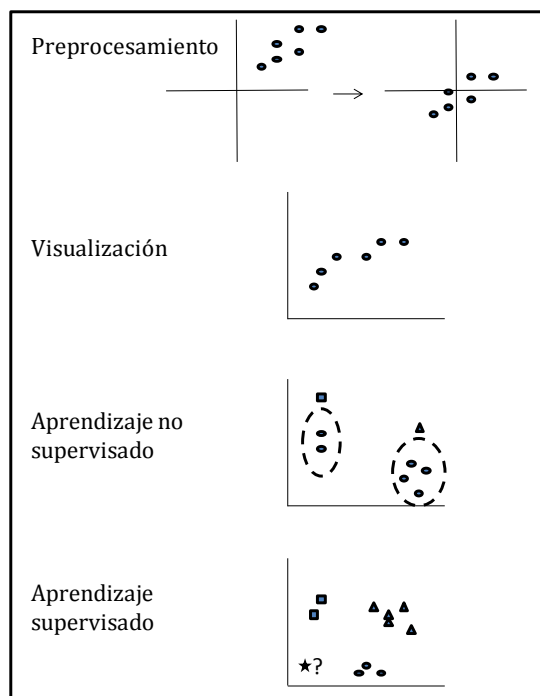


Figura 13. Tipos de técnicas de Reconocimiento de Pautas (tomado de Sharaf, 1986).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Análisis Jerárquico de Conglomerados

La técnica suele basarse en la distancia euclidiana para identificar la similitud entre objetos, expresada por:

$$d_{ab} = \left[\sum_j^m (x_{aj} - x_{bj})^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (29)$$

Donde d_{ab} es la distancia entre dos vectores muestra, \mathbf{a} y \mathbf{b} , calculada para m objetos.

Debido a que las distancias entre objetos varían de un caso a otro, se transforman a una escala estándar de similitud, de acuerdo a:

$$\text{Similitud}_{ab} = 1 - \frac{d_{ab}}{d_{\max}} \quad (30)$$

Donde d_{\max} es la mayor distancia euclidiana calculada en la serie de datos. En esta escala, un valor de 1 se asigna a muestras idénticas y el valor 0 corresponde a las muestras más diferentes (Infometrix, 1998).

En este caso, la técnica es del tipo aglomerativa; es decir, va de abajo hacia arriba. Se parte de objetos individuales que se van asociando (o acoplando) con los más cercanos, hasta formar un solo grupo. En otras palabras, después de estimar las distancias entre todos los pares de muestras, las dos muestras más similares se acoplan y forman un nuevo grupo. Se calculan entonces las distancias entre el nuevo grupo y los ya existentes, para identificar a quién acoplarlo de acuerdo a la distancia más pequeña, y así sucesivamente (Mirkin, 2011).

La distancia entre un nuevo grupo A-B y un grupo ya existente C se calcula comúnmente de acuerdo a los siguientes algoritmos: a) acoplamiento sencillo, b) acoplamiento completo y c) acoplamiento por centroide. Si el

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

acoplamiento sencillo y el completo coinciden, la asociación es la más pertinente; si no, se recurre al acoplamiento por centroide para elegir el acoplamiento más apropiado (Massart, 1997).

Los resultados se visualizan a través de dendogramas (véase Figura 14). El eje y corresponde a la altura del nodo. El nodo raíz es el más alto, con una altura del 100%, que integra a todos los objetos de estudio. Cada nodo interno representa una subdivisión del grupo; asocia a todos los objetos ligados a él. Nótese que cada nodo se subdivide en dos (Mirkin, 2011).

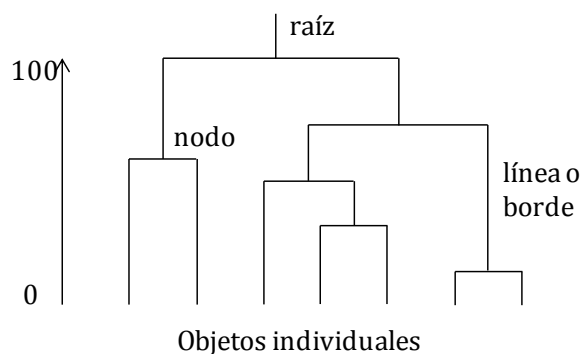


Figura 14. Representación de un dendograma.

Método de las K -medias

Ésta es la técnica más usada en el Análisis de Conglomerados. En la Figura 15 se representan los principales pasos de esta técnica. En su forma genérica, el método se basa en los siguientes pasos:

1. Inicialización. El usuario elige K número de grupos y se generan entonces K centroides hipotéticos entre los I objetos de estudio (Figura 15a).
2. Identificación de grupos. Dados K centroides c_k ($k=1, 2, \dots, K$), cada uno de los objetos $i \in I$ es asignado a uno de los centroides de acuerdo a la regla de la distancia mínima: se calculan las distancias entre i y cada c_k , asignándose i al

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

c_k más cercano (Figura 15b). Para cada centroide c_k , los objetos asignados a él forman el grupo S_k ($k=1, 2, \dots, K$), de acuerdo a la Figura 15c.

3. Actualización de centroides. Para cada uno de los K grupos S_k , se calcula su centro de simetría y se generan nuevos centroides c_k' ($k=1, 2, \dots, K$), como se observa en la Figura 15d.
4. Evaluación. Los nuevos centroides c_k' son comparados con los c_k previos. Si $c_k'=c_k$ en K casos, se finaliza la operación y se proporciona como información de salida c_k' y S_k para los K grupos. Si no, se vuelve al paso 2.

Se reconocen como ventajas que los cálculos son fáciles y rápidos. Sin embargo, entre sus desventajas están:

- a) La definición del número de grupos la da el usuario, no se identifica a partir de la estructura latente de los datos.
- b) La interpretación de la información es muy limitada (Mirkin, 2011).

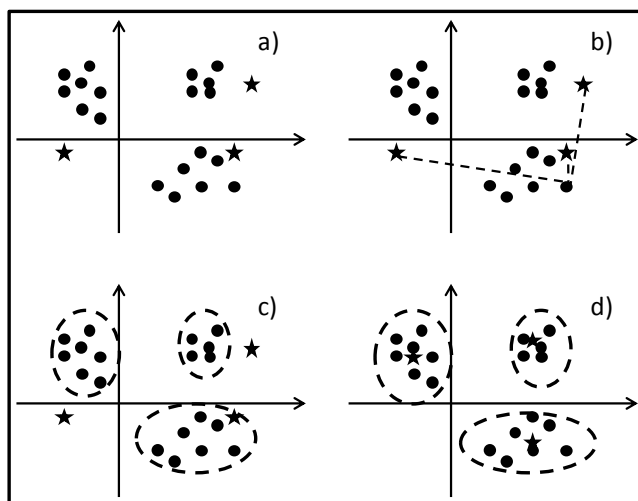


Figura 15. Principales pasos de la técnica de Análisis de Conglomerados por K-medias: a) inicialización con K centroides, b) aplicación de la regla de distancia mínima para identificación de grupos, donde las líneas punteadas muestran la distancia de cada objeto hacia todos los centroides, c) integración de grupos, d) re-estimación de centroides (tomado de Mirkin, 2011).

2.2.3.5. Análisis de Componentes Principales (PCA)

Es una técnica exploratoria que permite la descripción gráfica de la información contenida en un conjunto de datos muy grande, a través de la síntesis de toda la información en un formato sencillo y entendible (Govaert, 2009). Es probablemente la técnica quimiométrica multivariante más utilizada por los químicos, que más ha incidido en la forma en que se visualiza el Análisis de Datos actualmente.

Si bien es de gran utilidad cuando se dispone de información multivariante (es decir, se tienen múltiples mediciones por cada muestra analizada), para su comprensión se suele partir de un ejemplo simple. Considérese una serie de 10 objetos representados en la Figura 16 por tres variables obtenidas experimentalmente (x_1 , x_2 y x_3).

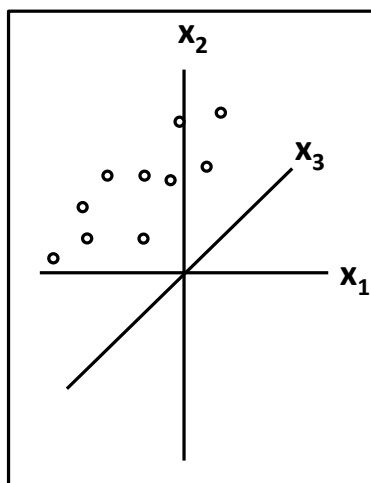


Figura 16. Representación de la serie de objetos en función de las variables originales.

A simple vista, puede observarse una tendencia en la distribución de tales objetos. Sin embargo, no toda la información que los describe es relevante, debido a la presencia de errores aleatorios en los datos experimentales. Por ello, estos objetos pueden representarse en función de una nueva variable, llamada Componente Principal (*PC*) o Factor, que se integra a la representación grafica anterior como un nuevo eje que servirá para identificar los objetos originales (véase PC_1 en Figura 17). El nuevo *PC* se proyecta de tal manera que describa la mayor variabilidad contenida en los datos, ya que ello se traduce en la descripción de mayor cantidad de información. Ahora, cada objeto estará representado por un nuevo “score” o punto, que corresponde a su coordenada en el nuevo eje o *PC*.

Sin embargo, puede apreciarse que algunos objetos que no son iguales adquieren las mismas coordenadas en el nuevo *PC*, por lo que no se está considerando suficiente información relevante para distinguirlos. La solución está en incorporar un segundo *PC*, proyectado perpendicularmente al primero. Así, la serie de 10 objetos puede describirse exitosamente a través de dos nuevas

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

variables (PC_1 y PC_2), en lugar de las tres variables originales (x_1 , x_2 y x_3), lo que ha dado lugar a la compresión de información, tras encontrar PC que sean combinaciones lineales de las variables originales.

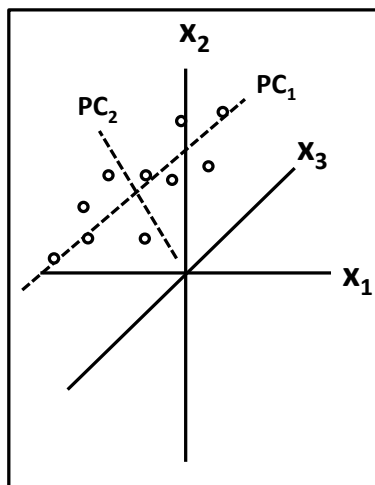


Figura 17. Proyección de dos Componentes Principales (líneas punteadas) en los ejes de coordenadas originales.

Así, PCA consiste en una transformación matemática de la matriz de datos originales en:

$$X = T.P \quad (31)$$

Donde T es la matriz de “scores” o coordenadas de los objetos en las nuevas variables (PC), mientras que P es la matriz de “loadings” o vectores carga, que son coeficientes de regresión.

Existen diversos algoritmos a través de los cuales puede llevarse a cabo el PCA. Sin embargo, el Algoritmo de Nipals está entre los más populares, el cual se describe simplifcadamente a continuación. En éste, cada PC se obtiene iterativamente por regresiones repetidas de X en los vectores de puntos \hat{t} para

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

obtener los vectores carga óptimos $\hat{\mathbf{p}}$, y regresiones de \mathbf{X} en estos $\hat{\mathbf{p}}$ para optimizar $\hat{\mathbf{t}}$.

El algoritmo procede como sigue (Martens, 1989). Inicialmente se recomienda preprocesar mediante el centrado sobre la media, para obtener \mathbf{X}_0 . Así, para el componente principal $a=1, 2, 3, \dots, A$ se calcularán $\hat{\mathbf{t}}_a$ y $\hat{\mathbf{p}}_a$ a partir de \mathbf{X}_{a-1} . Para los valores de partida, $\hat{\mathbf{t}}_1$ puede ser igual a la columna en \mathbf{X}_0 que tiene la suma de cuadrados más alto. El proceso iterativo es:

- i) Optimice el vector carga $\hat{\mathbf{p}}_a$ para este factor proyectando la matriz \mathbf{X}_{a-1} en $\hat{\mathbf{t}}_a$, de acuerdo a:

$$\hat{\mathbf{p}}_a' = \left(\hat{\mathbf{t}}_a' \hat{\mathbf{t}}_a \right)^{-1} \hat{\mathbf{t}}_a' \mathbf{X}_{a-1} \quad (32)$$

- ii) Escale la longitud de $\hat{\mathbf{p}}_a$ a 1 para evitar ambigüedad de escalas:

$$\hat{\mathbf{p}}_a' = \hat{\mathbf{p}}_a \left(\hat{\mathbf{p}}_a' \hat{\mathbf{p}}_a \right)^{-0.5} \quad (33)$$

- iii) Optimice el vector $\hat{\mathbf{t}}_a$ para este factor proyectando la matriz \mathbf{X}_{a-1} en $\hat{\mathbf{p}}_a$:

$$\hat{\mathbf{t}}_a = \mathbf{K}_{a-1} \hat{\mathbf{p}}_a \left(\hat{\mathbf{p}}_a' \hat{\mathbf{p}}_a \right)^{-1} \quad (34)$$

- iv) Optimice el eig en valor $\hat{\tau}_a$:

$$\hat{\tau}_a = \hat{\mathbf{t}}_a' \hat{\mathbf{t}}_a \quad (35)$$

- v) Verifique convergencia. Si $\hat{\tau}_a$ menos $\hat{\tau}_a$ en la iteración previa es menor que cierto valor predefinido (por ejemplo $0.0001 \hat{\tau}_a$), el método ha convergido para este factor. Si no, vuelva al paso i). Finalmente, sustraiga el efecto de este factor en la matriz de datos originales:

$$\mathbf{X}_a = \mathbf{X}_{a-1} - \hat{\mathbf{t}}_a \hat{\mathbf{p}}_a' \quad (36)$$

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Repita desde el paso i) para el siguiente factor.

En la práctica, la elección del preprocesamiento de datos adecuado, la eliminación de datos aberrantes, así como la identificación del número de *PC* relevantes en la descripción del sistema, condicionan el éxito en la aplicación de la técnica (Brereton, 2007).

2.2.3.6. Análisis Procrusteano Generalizado (GPA)

Esta herramienta se usa ampliamente en el Análisis Sensorial para evaluar variables categóricas (atributos), cuando se desea relacionar dos conjuntos de datos multivariantes **X** y **Y**.

El GPA tiene una interpretación preponderantemente geométrica. Los datos (u objetos) son visualizados como puntos en un espacio de variables de grandes dimensiones. El objetivo es encontrar una transformación que permita que la configuración de los datos en el espacio **X** coincida de la mejor manera con la configuración de los datos en el espacio **Y**. Sin embargo, no se permite cualquier transformación, ya que debe preservarse la configuración interna de los datos (es decir, la distancia entre los objetos). Así, en GPA se tratan los dos conjuntos de datos simétricamente; es decir, no hay una diferencia esencial entre transformar a **Y** para corresponder con **X** o aplicar la transformación inversa para que **X** corresponda con **Y**. Generalmente, ambas configuraciones se transforman para encontrar un punto medio. Cabe destacar que si los conjuntos de datos no tienen el mismo número de variables, el de menor dimensión debe completarse con variables de relleno que tienen ceros como valores.

En la Figura 18 se representa gráficamente la evolución del análisis. Comúnmente, el primer paso es preprocesar los datos, mediante un centrado sobre la media, con el fin de que los centroides

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

$$m_x = \frac{X^T \mathbf{1}}{n} \quad (37)$$

$$m_y = \frac{Y^T \mathbf{1}}{n} \quad (38)$$

sean movidos hacia el centro de un plano cartesiano (Figura 18b). El centrado de las columnas es una transformación admisible debido a que no altera las distancias entre objetos al interior de cada conjunto. El siguiente paso es la reflexión, que igualmente deja las distancias entre objetos sin alteración alguna (Figura 18c). Posteriormente se da la rotación, que cambia la orientación pero no la estructura interna de la configuración (Figura 18d). Cuando se encuentra la mayor correspondencia entre ambos, pueden rotarse libremente (Figura 18e). Finalmente, se estima la configuración promedio o consenso, que representa un estado intermedio entre las configuraciones individuales (Figura 18f).

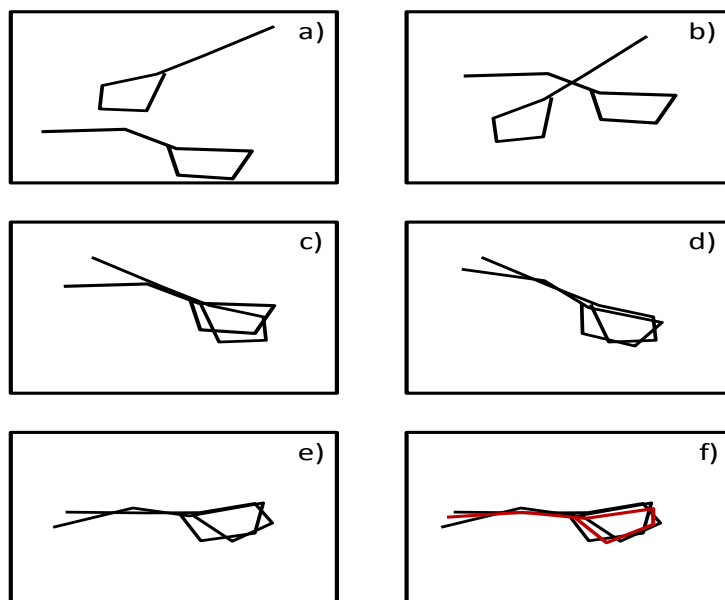


Figura 18. Representación de las etapas del GPA: a) datos originales, b) traslación, c) reflexión, d) rotación, e) rotación general para PCA y f) consenso (tomado de Massart, 1998).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Cabe destacar que el GPA no es una técnica de regresión. Solamente consiste en permitir operaciones de traslación, rotación y reflexión, que permiten preservar las distancias entre objetos. Por el contrario, la regresión permite cualquier transformación lineal.

De acuerdo a Massart (1998), el algoritmo puede resumirse de la siguiente manera:

$$\text{Centrado de columnas} \quad \mathbf{X} \leftarrow \mathbf{X} - \mathbf{1}_n \mathbf{m}_X^T \quad \text{y} \quad \mathbf{Y} \leftarrow \mathbf{Y} - \mathbf{1}_n \mathbf{m}_Y^T \quad (39)$$

$$\text{SVD} \quad \mathbf{W} \mathbf{D} \mathbf{Q}^T \leftarrow \text{SDV}(\mathbf{X}^T \mathbf{Y}) \quad (40)$$

$$\text{Rotación de X} \quad \mathbf{X}^* \leftarrow \mathbf{X} \mathbf{W} \mathbf{Q}^T \quad (41)$$

$$\text{Promedio} \quad \mathbf{Z} \leftarrow \frac{(\mathbf{Y} + \mathbf{X}^*)}{2} \quad (42)$$

$$\text{PCA de Z} \quad \mathbf{V} \leftarrow \text{EIG}(\mathbf{Z}^T \mathbf{Z}) \quad (43)$$

$$\text{Rotación final} \quad \mathbf{Z}^* \leftarrow \mathbf{Z} \mathbf{V}, \quad \mathbf{Y}^* \leftarrow \mathbf{Y} \mathbf{V}, \quad \mathbf{X}^* \leftarrow \mathbf{X} \mathbf{V} \quad (44)$$

Después del análisis, las distancias entre los objetos correspondientes pueden interpretarse como las configuraciones trasladadas, escaladas y rotadas, que son las mínimas que pueden obtenerse a través del algoritmo. En consecuencia, puede establecerse el grado de concordancia entre ambos conjuntos, así como qué variable de un grupo es similar o no a otra variable del otro grupo.

Por otro lado, debe resaltarse que las transformaciones derivadas del GPA se dan en la mayor dimensionalidad posible. Cuando se encuentra la solución óptima, la forma más conveniente de representarla es a través de un PCA de dos dimensiones. Los porcentajes de varianza representada pueden

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

utilizarse para reconocer si es necesario incluir un tercer o cuarto PC para la representación gráfica de la solución (Naes, 1996).

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1. EQUIPO Y REACTIVOS

Equipo

Para la cuantificación de plomo en las muestras biológicas se utilizó un espectrómetro de absorción atómica modelo Analyst 400, acoplado a un horno de grafito modelo HGA-900 y un automuestreador modelo AS-800, todos de la marca Perkin Elmer. Para la determinación de algunos de los parámetros bioquímicos analizados en este trabajo se usó un espectrofotómetro UV-Visible, modelo LABDA 25, marca Perkin Elmer.

Se usó como equipo menor de laboratorio, un potenciómetro, modelo pH209, de la marca Hanna; una balanza analítica, modelo CX220, de Daigger; una microcentrífuga, modelo 5424, marca Eppendorf; un baño ultrasónico, marca Branson; un horno, modelo A62060, de la marca Scorpion Scientific, campana de extracción de humos, marca Scorpion Scientific y cajas metabólicas marca Nalgene.

Reactivos

Todos los reactivos y disolventes fueron al menos grado analítico. La disolución estándar para determinación de plomo por espectrometría de absorción atómica fue de 1 000 mg L⁻¹, grado AAS. Los ácidos nítrico (HNO₃) y clorhídrico (HCl) fueron grado para análisis de metales, de Sigma Aldrich. El agua fue destilada o ultrapura, según se requirió.

3.2. SELECCIÓN DE ROEDORES Y GRUPOS DE ESTUDIO

Se utilizaron ratas Wistar hembras y machos de peso corporal aproximado de 200 g, las cuales fueron depositadas en cajas especiales para roedores acondicionadas con una cama de aserrín estéril bajo un clima constante (16 a 20

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

° C). Se colocaron como máximo dos ratas por caja. Los roedores fueron alimentados mediante una dieta normal y agua potable.

Se formaron dos grupos: el control (con cinco ratas hembra) y el grupo intoxicado con plomo (con dos ratas hembra y cinco machos), los cuales se sometieron a los mismos tratamientos y análisis. Para el grupo expuesto, las ratas fueron intoxicadas vía intraperitoneal con una dosis de 25 mg de acetato de plomo por kilogramo de peso corporal. El tiempo de intoxicación fue de 15 días, periodo en el cual se administraron siete dosis, distribuidas en un periodo de 48 horas.

Las ratas fueron pesadas al inicio del tratamiento llevando un control de peso cada tercer día. Se tomaron muestras de suero, orina, hígado, cerebro y riñón al inicio y al final del tratamiento. Para las muestras de orina los animales se colocaron en cajas metabólicas, bajo condiciones de alimentación normales; la muestra fue recolectada al transcurrir 12 horas. La muestra de sangre fue obtenida directamente de la arteria renal después del sacrificio de la rata. Se separó el suero de los eritrocitos. El hígado, los riñones y el cerebro se colectaron después de la dislocación cervical del animal y se conservaron en PBS (amortiguador de fosfatos pH 7.4) en congelación hasta el análisis.

3.3. DETERMINACIÓN DE PLOMO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.3.1. Preparación de las muestras de suero y eritrocitos de acuerdo a la NOM-199-SSA1-2000

Todo el material de vidrio utilizado se mantuvo en una disolución de ácido nítrico (HNO₃) al 20% V/V durante al menos 24 horas; se lavó con una disolución jabonosa y se enjuagó con agua destilada y finalmente agua ultrapura.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

La muestra de sangre se extrajo después de la dislocación cervical del animal, tomándose de la arteria renal aproximadamente 2 mL de muestra. Se trasvasó a un tubo de ensayo con ácido etilendiaminoetraacético disódico (EDTA) como anticoagulante y se almacenó a 2-8° C. Para la separación de suero y eritrocitos, se centrifugó 5 minutos a 4 000 rpm.

El modificador de matriz se preparó a partir del fosfato dibásico de amonio ((NH₄)₂HPO₄), Tritón X-100 y HNO₃ en agua ultrapura. Para lavar el automuestreador se usó una disolución acuosa de Tritón X-100 al 0.5 % V/V. A partir de la disolución patrón de plomo 1 000 mg/L, se preparó una disolución intermedia y disoluciones de trabajo en concentraciones de plomo de 50, 100, 250, 500 y 750 µg/L en matraces volumétricos de 10 mL. Finalmente, las muestras de calibración y las muestras problema se prepararon de acuerdo a la Tabla 5.

Tabla 5. Composición de muestras estándar, suero y eritrocitos por calibración directa. Las concentraciones de las disoluciones de trabajo están dadas en µg/L.

	Modif. Matriz (µL)	Agua (µL)	Soluciones de trabajo					Muestra (µL)
			50	100	250	500	750	
Blanco reactivo	900	100	-	-	-	-	-	-
Estándar 5	900	-	100	-	-	-	-	-
Estándar 10	900	-	-	100	-	-	-	-
Estándar 25	900	-	-	-	100	-	-	-
Estándar 50	900	-	-	-	-	100	-	-
Estándar 75	900	-	-	-	-	-	100	-
Muestras	900	-	-	-	-	-	-	100

3.3.2. Preparación de las muestras de orina

Después de su recolección se almacenaron de 2 a 8 grados centígrados (°C). Antes de su transferencia al automuestreador del EVAAS, se pasaron a través de un filtro de jeringa con membrana de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro, para evitar el paso de material biológico.

3.3.3. Preparación de muestras sólidas

Se pesó con exactitud de 0.1 a 0.5 g de muestra en peso seco (de acuerdo a su disponibilidad) y se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL para su digestión. Se añadieron al matraz 10 mL de una disolución acuosa de HNO₃ (1:1V/V) y se cubrió con un vidrio de reloj, para después colocarse encima de una parrilla de calentamiento y mantenerse en condiciones de reflujo durante 10 minutos. Se retiró la muestra de la parrilla de calentamiento y se dejó enfriar. Se añadió entonces 5 mL de HNO₃ concentrado, colocándose nuevamente encima del matraz el vidrio de reloj y se regresó éste a la parrilla de calentamiento para mantener en reflujo la muestra durante 30 minutos. Se repitió una vez más este último paso y se separó el matraz de la parrilla de calentamiento para permitir el enfriamiento de la muestra.

Posteriormente, se añadieron 2 mL de agua ultrapura y 3 mL de H₂O₂ al 30 % V/V (presentación comercial). Se colocó nuevamente el matraz conteniendo la muestra encima de la parrilla de calentamiento y se calentó hasta observar efervescencia. Después de ceder la reacción, se añadieron siete alícuotas subsecuentes de 1 mL de H₂O₂ al 30 % V/V cada una, hasta no observar más efervescencia. La cantidad total de H₂O₂ al 30 % V/V añadida a la muestra no excedió de 10 mL. Después, se añadieron a la muestra 10 mL de agua ultrapura y 2 mL de HCL concentrado, se cubrió el matraz con el vidrio de reloj y se dejó en condiciones de reflujo por 15 minutos más (US EPA, 2001).

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

Concluida la digestión, se dejó enfriar la muestra y se pasó a través de una membrana de filtración de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro. La muestra filtrada se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL, aforándose hasta la marca con agua ultrapura. La disolución final se transfirió entonces en un recipiente de polipropileno inerte, a prueba de fugas, para su almacenamiento en refrigeración a 4° C y análisis posterior.

3.4. CUANTIFICACIÓN DE PLOMO POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON VAPORIZACIÓN ELECTROTÉRMICA

Los parámetros instrumentales utilizados fueron los recomendados por el fabricante: a) longitud de onda de 283.3 nanómetros (nm), b) señal de absorbancia integrada midiendo área de pico, c) 2.7 nm de rendija, d) tres réplicas de inyección por muestra, e) corrección de fondo con lámpara de deuterio. El programa de temperatura usado se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6. Programa de temperatura del horno de grafito empleado para la cuantificación de plomo.

Paso	T (°C)	Tiempo (seg)	Flujo gas (L/min)	Lectura
1	100	5	250	No
2	140	15	250	No
3	700	10	250	No
4	1800	0	0	Si
5	2600	1	250	No

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.5. ENSAYOS BIOQUÍMICOS

3.5.1. Medición de Proteína por el método de Lowry

3.5.1.1. Curva de calibración

Se realizó una curva de calibración con albúmina sérica bovina a una concentración patrón de 5 mM. Las muestras se prepararon tal y como se indica en la tabla 7. Se utilizó un blanco de agua para la calibración del equipo.

Tabla 7. Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry modificado (Lowry, 1951).

	Agua (μL)	Albúmina (μL)	Solución D (μL)	Solución C (μL)	Folin (μL)
1 ¹	800	0	100	2000	100
2	795	5	100	2000	100
3	790	10	100	2000	100
4	785	15	100	2000	100
5	780	20	100	2000	100
6	775	25	100	2000	100
7	770	30	100	2000	100
8	765	35	100	2000	100
9	760	40	100	2000	100
10	750	50	100	2000	100
11	730	70	100	2000	100
12	700	100	100	2000	100

¹Blanco de proteína; Solución A: (10 g de Na_2CO_3 , 2 g de NaOH, 0.134 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en 500 mL de agua); Solución B: (0.5% p/V de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); Solución C: 50 volúmenes de solución A más un volumen de solución B. Solución D: desoxicolato de sodio ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$) al 1% p/V. Solución E: solución 1:2 V/V del reactivo de Folin-Ciocalteu.

3.5.1.2. Medición de proteínas totales en las muestras seleccionadas

Una alícuota de 10 μL de cada una de las muestras utilizadas en los ensayos bioquímicos se colocó en un tubo de ensayo conteniendo 790 μL de agua. Posteriormente se adicionaron 100 μL de una solución D, 2 ml de la solución C y finalmente 100 μL de una solución E. Las muestras fueron agitadas en un agitador tipo vortex y se incubaron a temperatura ambiente por un tiempo de 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se programó el espectrofotómetro para medir la concentración de proteína de la curva y a partir de la ecuación obtenida determinar la concentración de proteínas totales en las muestras analizadas. La absorbancia de las muestras se registró a una longitud de onda de 750 nm.

3.5.2. Medición de la actividad de la enzima Glutación S-transferasa (GST)

El hígado, el riñón y el cerebro fueron extraídos después de la dislocación cervical y se homogenizaron en una solución amortiguadora compuesta por fosfatos (K_2HPO_4 , KH_2PO_4), 20 mM, EGTA (etilenglicol tretraacético) 0.1 mM y KCl 5 mM a pH 7.4.

Mediante la determinación de proteína total por el método de Lowry se realizaron los cálculos para ajustar el ensayo a una concentración de 1 mg mL^{-1} de proteínas por muestra.

Para el ensayo de la medición de la actividad de la GST se utilizó una celda de vidrio de 1 cm de diámetro y en ella se colocó el volumen correspondiente del amortiguador de fosfatos (0.1 M, pH 6.5), el sustrato dinitroclorobenceno (DNCB) (1mM) y glutatión reducido (GSH) (1mM). Los reactivos fueron mezclados por inversión y finalmente se colocó el volumen de muestra ajustado a 1mg/mL de proteína. El volumen final del ensayo fue de 3 mililitros. El espectrofotómetro fue programado para la medición de cinética enzimática

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

utilizando periodos de registro de 1 minuto. Durante tres minutos totales de reacción con un tiempo de respuesta de 20 segundos. La celda se introdujo y se registro el incremento de la absorbancia a una longitud de onda de 350 nm.

3.5.3. Medición de Especies Reactivas de Oxígeno (EROS)

Alícuotas de 200 μL de homogenizado celular fueron colocadas cada una en un tubo de ensayo al cual se le adicionaron 800 μL de amortiguador de fosfatos PBS (8.1 g de NaCl, 2.302 g de NaHPO_4 , 0.194 g de NaH_2PO_4 en un volumen final de 1L y un pH de 7.4). Se adicionaron 25 μL de butirihidroxitolueno (BHT: 88 mg de BHT en 10 mL de etanol absoluto), y finalmente se añadieron 500 μL de ácido tricloroacético (TCA 30% p/V). Se agitó y se colocó en hielo durante 2 horas. Se centrifugó a 2000 rpm por 15 minutos en una microcentrífuga. Al finalizar el tiempo se tomó 1 mL de sobrenadante, se colocó en un tubo y se adicionaron 75 μL de una solución 0.1 M de EDTA y 250 μL de una solución al 25 % p/V de ácido tiobarbitúrico (TBA) disuelto en una solución 0.05N de hidróxido de sodio (NaOH). Se agitó y se puso a ebullición por 15 minutos. Se enfrió y se registró la absorbancia en el espectrofotómetro a las longitudes de onda de 532 y 600 nm.

3.5.4. Examen general de orina (EGO)

Para realizar este ensayo se utilizó un kit de tiras reactivas para Uroánalisis (URI-10P). Se usó una muestra de orina sin centrifugar tomada al inicio y al final del tratamiento. Se tomó una tira reactiva y se sumergió brevemente en el tubo de ensayo conteniendo la muestra, procurando que todas las áreas reactivas quedaran en contacto con la muestra. Se secó el exceso de muestra y se sostuvo la tira en posición horizontal. La lectura de los resultados se llevó a cabo comparando los colores obtenidos con la escala de colores proporcionada por el fabricante. Los resultados fueron obtenidos siguiendo instrucciones proporcionadas para cada prueba y respetando el tiempo de reacción de cada reactivo presente en la tira.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Inicialmente se aplicaron las pruebas de distribución normal de datos de Shapiro-Wilk, de Anderson-Darling, de Lilliefors y de Jarque-Bera, utilizando el paquete estadístico de XLSTAT v2012.5.01 de Addinsoft. En el caso de algunas series de datos (GST en orina inicial, GST en orina final, GST en cerebro y GST en sangre) fue necesario transformar los valores originales a su forma logarítmica antes de aplicar las pruebas de distribución.

La obtención de medias aritméticas, desviaciones estándar, varianzas e intervalos de confianza, así como la aplicación de las pruebas de hipótesis para la identificación de datos aberrantes (Pruebas de Dixon y Grubbs), comparación de varianzas (Prueba F) y comparación de medias (Prueba t), se realizó a través de hojas de cálculo de Excel 2007 de Microsoft. Cabe destacar que en todas las pruebas de hipótesis se utilizó un nivel de significación del 5% y los valores críticos se obtuvieron de las tablas correspondientes (Massart, 1997; Miller, 2002).

Se realizó un Análisis de Varianza en dos sentidos para evaluar si había diferencias significativas en el volumen de orina entre los grupos control y expuesto, a través del paquete estadístico Origin Pro 8 SR0 de Origin Lab Corporation.

A través del paquete estadístico Statistica 99 de Statsoft Inc., se estableció el grado de asociación lineal entre pares de series de datos mediante la estimación del coeficiente de correlación de Pearson r y su grado de significación a través de una prueba de hipótesis. Igualmente, se calculó este parámetro en las series de tiempo correspondientes al peso de ratas control ($x(t)$) y expuestas ($y(t)$), en cuyo caso recibe el nombre de coeficiente de correlación cruzada $r_{xy}(0)$, cuya significación se evaluó igualmente a través de una prueba de hipótesis. Para ejecutar este análisis, se sustituyeron los valores de x (fechas) por números enteros consecutivos.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

Se usó el paquete estadístico de Pirouette v3.11 de Infometrix Inc. para la aplicación del Análisis de Componentes Principales y el Análisis Jerárquico de Conglomerados. Para la técnica de reconocimiento de pautas no supervisado de las K medias, se usó el paquete estadístico de Statistica 99 de Statsoft Inc.

Para el Análisis Procrusteano Generalizado, se usó el paquete estadístico de XLSTAT v2012.5.01 de Addinsoft. En tal caso, los datos se organizaron en dos configuraciones (grupos control y expuesto), con 6 dimensiones (especímenes en cada grupo) y 9 objetos (parámetros estimados).

Finalmente, en el análisis de los resultados de EGO por PCA, las variables cualitativas ordinales se transformaron a valores numéricos consecutivos, de acuerdo a Gifi (1990).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. MODELO EXPERIMENTAL

En este trabajo se utilizaron ratas Wistar macho y hembra con una edad de 21 días y peso corporal entre 35 y 40 gramos. Se aplicaron 7 inyecciones durante 15 días, vía intraperitoneal a una dosis de 25 mg de acetato de plomo por kilogramo de peso del animal.

4.2. PESO CORPORAL

Se llevó un control de peso durante el tratamiento. Algunos autores han demostrado que uno de los efectos de la exposición a plomo es el aumento o la disminución del peso corporal dependiendo del esquema de intoxicación y de la dosis de metal al que se exponga el animal.

Antes de iniciar el proceso de intoxicación, los animales fueron adaptados a las condiciones requeridas para iniciar el trabajo de investigación. Entre estas condiciones se encuentran la comida, el agua, la temperatura, los ciclos luz-oscuridad y el aseo. Durante este período las ratas aumentaron entre 100 y 150 gramos, pesos que se utilizaron para calcular el volumen de plomo administrado vía intraperitoneal. Al final del esquema de intoxicación los animales al ser sacrificados aumentaron de 12 a 30 gramos con relación al peso de la primera dosis. La Tabla 8 muestra los pesos de los animales en los diferentes tiempos de intoxicación.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Tabla 8. Peso de los animales en diferentes etapas del proceso experimental. Los valores muestran el promedio más la desviación estándar del número de determinaciones mostradas entre paréntesis.

Grupo	Peso inicial	Primera dosis (42 días)	Tercera dosis (45 días)	Sacrificio (55 días)
Control (g)	35.12±3.13 (n=5)	130.55 (n=2)	147.3 (n=2)	162.95 (n=2)
Expuesto (g)	41.57±7.91 (n=6)	195.62±26.55 (n=6)	199.42±19.18 (n=6)	207.65±23.8 (n=6)

4.3. PESO DE LOS ÓRGANOS

El peso de los órganos fue registrado para analizar el efecto sistémico de la exposición a plomo. Los tres órganos seleccionados resultan blancos fáciles a ser dañados por plomo, el aumento de su tamaño podría constituir un posible indicador de esta intoxicación. La Tabla 9 muestra el peso de los órganos riñón, hígado y cerebro. En los tres se observa una disminución general en el peso. En los animales expuestos existe un aumento en hígado y riñón pero no en cerebro.

Tabla 9. Peso de los órganos de animales control y expuesto a una dosis de 25 mg de plomo/Kg de peso, al finalizar el periodo de experimentación. Los valores muestran el promedio más la desviación estándar del número de determinaciones mostradas entre paréntesis.

Grupo	Hígado (g)	Riñón (g)	Cerebro (g)
Control inicial	7.16±0.71 (n=3)	1.42±0.21 (n=3)	1.69±0.22 (n=3)
Control final	5.06 (n=2)	1.27 (n=2)	1.61 (n=2)
Expuesto	7.44±0.79 (n=6)	2.17±0.33 (n=6)	1.69±0.15 (n=6)

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.4. VOLUMEN DE ORINA

Uno de los principales órganos afectados por la intoxicación con plomo es el riñón. Bajo el esquema de intoxicación utilizado se encontró aumento de su peso. El volumen de orina aumentó también en los animales expuestos en relación con los animales control. La Tabla 10 muestra los volúmenes de orina recolectada por un periodo de 24 horas.

Tabla 10. Valor promedio y desviación estándar del volumen de orina. Los valores muestran el promedio más la desviación estándar del número de determinaciones mostradas entre paréntesis.

Grupo	Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2
Control (mL)	13±6.7 (n=5)		8.5 (n=2)
Expuesto (mL)	12.83±7.65 (n=6)	14.33±3.83 (n=6)	24.5±3.56 (n=6)

4.5. DETERMINACIÓN DE PLOMO EN RIÑÓN, HÍGADO, CEREBRO, SANGRE (SUERO Y PAQUETE GLOBULAR) Y ORINA

Para conocer el contenido de plomo en los diferentes órganos y fluidos corporales, y tratar de establecer un posible mecanismo del daño del metal en los animales expuestos a plomo, se realizaron estudios de determinación de plomo mediante espectroscopia de absorción atómica. La Tabla 11 muestra el contenido de plomo en muestras de los órganos riñón, hígado y cerebro y, en los fluidos sangre y orina. En cerebro no se detectó plomo, mientras que en riñón e hígado la concentración de plomo aumentó. Para el caso de los fluidos, solo en el suero se encontró un incremento en la concentración del metal en los animales

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

expuestos respecto a los no expuestos. En las muestras de orina no se observó un incremento en la concentración de plomo.

Tabla 11. Concentración de plomo en las diferentes muestras estudiadas de ratas control y expuestas. Los valores muestran el promedio más la desviación estándar del número de determinaciones mostradas entre paréntesis.

Grupo	Hígado	Riñón µg/Kg	Cerebro	Eritrocitos	Suero µg/L	Orina I	Orina F
Control	7.14±7.5 2 (n=5)	ND (n=5)	ND (n=5)	41.64±55. 1 (n=5)	13.99±9.34 (n=5)	53.81±9. 4 (n=5)	79.60 (n=1)
Expuesto	9.81±6.1 (n=6)	38.37±19.2 (n=6)	ND (n=6)	348.15±26 3.2 (n=6)	1031.60±605. 2 (n=6)	55.15±4. 9 (n=6)	80.49±13. 3 (n=6)

4.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

La determinación de la concentración de proteínas se determinó en los diferentes órganos y fluidos y los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Concentración de proteína en las diferentes muestras de ratas control y expuestas. Los valores muestran el promedio más la desviación estándar del número de determinaciones mostradas entre paréntesis.

Grupo	Hígado	Riñón	Cerebro	Orina I	Orina F	Sangre mg/mL
Control	0.91±0.08 (n=5)	0.63±0.06 (n=5)	0.57±0.02 (n=5)	1.23±0.68 (n=5)	2.07 (n=2)	0.83±0.06 (n=5)
Expuesto	0.88±0.13 (n=6)	0.66±0.06 (n=6)	0.64±0.05 (n=6)	2.20±1.6 (n=6)	1.27±0.68 (n=6)	0.96±0.10 (n=6)

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.7. ACTIVIDAD DE GST

Un biomarcador importante en la intoxicación por plomo es la actividad de la enzima GST. Se ha establecido que la actividad de esta enzima se ve afectada por el plomo ya sea de manera directa e indirecta. Directamente el efecto podría deberse a la unión del metal a las proteínas a través de enlaces con grupos sulfhidrilo o carboxilo. De manera indirecta al dejar a la célula con poco glutatión reducido (GSH), mismo que sirve como cofactor de la enzima. La Tabla 13 muestra la actividad de GST en las muestras seleccionadas.

Tabla 13. Actividad de GST en las diferentes muestras. Los valores muestran el promedio más la desviación estándar del número de determinaciones mostradas entre paréntesis.

Grupo	Hígado	Riñón	Cerebro	Orina I	Orina F	Sangre
Control	6.49E-03±2E-03 (n=5)	1.51E-03±4E-04 (n=5)	1.74E-03±6.7E-04 (n=5)	7.96E-04±9.6E-04 (n=5)	5.72E-04 (n=2)	1.12E-03±1.3E-03 (n=5)
Expuesto	6.22 E-03±8E-04 (n=6)	4.52 E-03±4E-04 (n=6)	2.83 E-03±2.8E-03 (n=6)	1.48 E-04±1E-04 (n=6)	1.0 E-04±2.71E-05 (n=6)	7.75E-04±6.4E-04 (n=6)

4.8. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las especies reactivas de oxígeno son los causantes del estrés oxidativo ocasionado por la presencia de plomo dentro de las células. Su determinación resulta importante debido a que ello puede indicar el modo de acción del plomo. Los resultados mostrados en la Tabla 14 muestran que no existen cambios en

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

los niveles de TBARS cuantificados, lo cual podría deberse a posibles problemas con los reactivos utilizados.

Tabla 14. Concentración de EROS en las muestras de ratas control y expuestas. Los valores muestran el promedio más la desviación estándar del número de determinaciones mostradas entre paréntesis.

Grupo	Hígado	Riñón	Cerebro	Suero
	nmol/mg de proteína			
Control	3.03E-08±6.68E-09 (n=5)	5.05E-08±3.81E-09 (n=5)	3.54E-08±2.96E-09 (n=5)	6.57E-09±1.72E-09 (n=5)
Expuesto	3.19 E-08±7.30E-09 (n=6)	5.19 E-08±7.36E-09 (n=6)	3.42 E-08±3.19E-09 (n=6)	7.09 E-09±1.87E-09 (n=6)

4.9. EXAMEN GENERAL DE ORINA

Este análisis es utilizado para comprobar si existe daño a nivel renal. Se realizó el examen al inicio del tratamiento para conocer las condiciones de salud de las ratas ya que no se sabía si tenían alguna enfermedad o algún daño debido al lugar de procedencia. La Tabla 15 muestra los resultados obtenidos al inicio del tratamiento para las ratas control y ratas expuestas.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Tabla 15. Examen general de orina de ratas control (C1-C5) y ratas expuestas (E1-E6) al inicio del tratamiento con plomo.

Rata	Glucosa	Bilirrubina	Cetona	G.E	Sangre	pH	Proteína	Urobilinógeno	Nitra	Leuco
C1	ND	ND	ND	1	++	8.5	trazas	0.2 U/dL	+	ND
C2	ND	ND	ND	1.01	+	7.5	ND	0.2 U/dL	+	ND
C3	ND	ND	ND	1	+	8.5	ND	0.2 U/dL	+	ND
C4	ND	ND	ND	1	+	8.5	30 mg/dL	0.2 U/dL	+	ND
C5	ND	ND	ND	1.015	++	6.5	trazas	0.2 U/dL	+	ND
E1	ND	+	5 mg/mL	1	+	8.5	300 mg/dL	0.2 U/dL	+	ND
E2	ND	ND	ND	1.01	TNH	8	100 mg/dL	0.2 U/dL	+	ND
E3	ND	ND	ND	1	+	8.5	ND	0.2 U/dL	+	ND
E4	ND	ND	ND	1.015	++	6.5	ND	0.2 U/dL	+	ND
E5	ND	ND	ND	1	TNH	8.5	100 mg/dL	0.2 U/dL	+	ND
E6	ND	ND	ND	1	trazas	8.5	trazas	0.2 U/dL	+	ND

(TNH: trazas no hemolizadas)

Al final del tratamiento con plomo se realizó de nuevo el examen, esta vez para conocer los estragos que el plomo había causado a nivel renal. La Tabla 16 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 16. Examen general de orina de ratas control (C1, C2) y ratas expuestas (E1-E6) al final del tratamiento con plomo.

Rata	Glucosa	Bilirrubina	Cetona	G.E	Sangre	pH	Proteína	Urobilinógeno	Nitra	Leuco
C1	ND	ND	ND	1.015	ND	6	30 mg/dL	0.2 U/dL	+	ND
C2	ND	ND	ND	1.01	trazas	6.5	30 mg/dL	0.2 U/dL	+	ND
E1	ND	ND	ND L	1	TNH	8	100 mg/dL	0.2 U/dL	ND	ND
E2	ND	+	5 mg/m	1	TNH	8.5	100 mg/dL	0.2 U/dL	+	ND
E3	ND	ND	ND	1.005	++	8	ND	0.2 U/dL	+	ND
E4	ND	ND	ND	1.005	+++	7.5	trazas	0.2 U/dL	+	ND
E5	ND	ND	ND	1.005	+++	8	30 mg/dL	0.2 U/dL	+	ND
E6	ND	ND	ND	1	+++	8.5	30 mg/dL	0.2 U/dL	+	ND

(TNH: trazas no hemolizadas)

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.10. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO DE LOS DATOS OBTENIDOS

En las variables continuas se aplicaron las siguientes pruebas de distribución normal: Shapiro-Wilk, Anderson-Darling, Lilliefors y Jarque-Bera. De acuerdo a los resultados obtenidos, sólo cuatro de los seis parámetros GST no mostraron una distribución normal (GST orina inicial, GST orina final, GST cerebro y GST en sangre). Sin embargo, al transformar sus valores a $\log(x_i)$ se encontró que seguían una distribución normal (Massart, 1997).

Durante la cuantificación de plomo se identificó un valor excesivamente alto en hígado ($682.0464 \mu\text{g/Kg}$) en una de las ratas control, por lo que se aplicaron las pruebas estadísticas de Dixon y Grubbs a la serie de datos correspondiente para determinar si el valor se rechazaba o se mantenía en la serie. El valor de Q_{10} estimado fue mayor que el $Q_{\text{crítico}}$ ($0.976 > 0.710$) usando la prueba a dos extremos, por lo que el valor fue rechazado. El mismo resultado se obtuvo de la prueba de Grubbs, donde el valor estimado fue mayor que el valor crítico ($1.789 > 1.715$). En consecuencia este dato, se retiró de la serie.

Otro dato aberrante se identificó en el contenido de plomo en eritrocitos en una de las ratas expuestas ($1576.4 \mu\text{g/L}$), que se rechazó de acuerdo a la prueba de Grubbs ($257.5 > 1.9$), mientras que el resultado de la prueba de Dixon no fue excluyente ($0.61 < 0.62$). Se identificó otro dato aberrante en el contenido de plomo en orina final en una de las ratas expuestas ($200.5 \mu\text{g/L}$), que fue rechazado de acuerdo a las pruebas de Dixon ($0.75 > 0.6$) y Grubbs ($9.03 > 1.88$). Finalmente, otro dato aberrante en el contenido de plomo en suero en una de las ratas expuestas ($2188.7 \mu\text{g/L}$) fue rechazado a partir de la prueba de Grubbs ($12.08 > 1.88$), si bien el resultado de la prueba de Dixon no fue excluyente ($0.27 < 0.60$). En la Tabla 17 se muestran los datos aberrantes en color rojo.

Otro dato aberrante fue observado en la actividad de GST en orina inicial en una de las ratas control ($0.014 \mu\text{g/L}$), que fue rechazado de acuerdo a las

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

pruebas de Dixon ($0.858 > 0.717$) y Grubbs ($1.77 > 1.715$). También fue identificado un dato aberrante en la actividad de GST en sangre en una de las ratas expuestas ($0.0211 \mu\text{g/L}$) que fue rechazada de acuerdo a las pruebas de Dixon ($0.923 > 0.621$) y Grubbs ($2.03 > 1.88$). De la misma manera se detectó un dato aberrante en la actividad de GST en cerebro en una de las ratas control ($0.00089 \mu\text{g/Kg}$) que se rechazó de acuerdo a la prueba de Dixon ($1.65 > 0.621$), mientras que el resultado de la prueba de Grubbs no fue excluyente ($1.65 < 1.88$). Finalmente, otro dato aberrante en el contenido de GST en orina final en una de las ratas expuestas ($0.0102 \mu\text{g/L}$) fue rechazado a partir de las pruebas de Dixon ($0.993 > 0.621$) y Grubbs ($2.04 > 1.88$). La Tabla 18 muestra los datos aberrantes.

En el resto de las series de datos no se identificaron datos aberrantes.

Tabla 17. Concentración de Plomo en las diferentes muestras.

Rata	Hígado $\mu\text{g/Kg}$	Riñón $\mu\text{g/Kg}$	Eritrocitos	Suero $\mu\text{g/L}$	Orina I	Orina F
C1	18.22	ND	8.6315	ND	48.67	
C2	1.70	ND	ND	3.77	54.48	
C3	3.42	ND	1.49	ND	69.89	79.60
C4	682.04	ND	121.42	22.11	47.84	
C5	5.21	ND	35.01	16.08	48.15	
Promedio	7.14±7.52		41.64±55.1	13.99±9.34	53.81±9.4	79.60
E1	19.50	16.63	678.31	1183.69	48.36	83.77
E3	5.86	45.97	1576.4	2188.7	59.06	88.40
E4	7.80	25.22	218.98	1616.77	60.92	63.06
E5	8.83	44.05	118.91	1472.66	56.73	200.46
E6	2.65	70.06	584.14	767.23	55.32	71.21
E7	14.18	28.29	140.35	117.66	50.49	96.04
Promedio	9.80±6.08	38.37±19.19	348.15±263.2	1031.60±605.2	55.15±4.87	80.49±13.27

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Tabla 18. Actividad de GST en las diferentes muestras.

Rata	Hígado	Riñón µg/Kg	Cerebro	Orina I	Orina F µg/L	Sangre
C1	7.72E-03	1.41E-03	1.52E-03	0.014		2.83E-04
C2	9.00E-03	2.14E-03	1.19E-03	2.22E-03		4.30E-04
C3	4.06E-03	1.31E-03	1.52E-03	2.76E-04	1.42E-04	2.80E-04
C4	6.52E-03	9.68E-04	8.90E-04	2.76E-04		3.36E-03
C5	5.16E-03	1.73E-03	2.72E-03	3.02E-04	1.00E-03	1.24E-03
Promedio	6.49E-03±2E-03	1.51E-03±4E-04	1.74E-03±6.7E-04	7.96E-04±9.6E-04	5.72E-04	1.12E-03±1.3E-03
E1	6.74E-03	3.82 E-03	2.14 E-03	2.76 E-04	8.52 E-05	6.92E-04
E3	5.74E-03	3.84 E-03	1.30 E-03	2.55 E-04	8.25 E-05	2.42E-04
E4	6.84 E-03	4.12 E-03	1.21 E-03	6.41 E-05	8.94 E-05	1.85E-03
E5	4.94 E-03	4.52 E-03	8.54 E-03	1.25 E-04	9.70 E-05	0.0211
E6	6.26 E-03	4.24 E-03	1.70 E-03	9.44 E-05	1.48 E-04	3.33E-04
E7	6.80 E-03	4.96 E-03	2.10 E-03	7.225	0.0102	7.59E-04
Promedio	6.22 E-03±8E-04	4.52 E-03±4E-04	2.83 E-03±2.8E-03	1.48 E-04±1E-04	1.0 E-04±2.71E-05	7.75E-04±6.4E-04

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.11. COMPARACIÓN DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES (CONTROL Y EXPUESTO)

4.11.1. Parámetros físicos

Se registró el peso de los organismos desde su arribo al laboratorio para su adaptación a las condiciones del medio hasta su sacrificio, algunos de los cuales se presentan en la Figura 19. Tres ratas control se sacrificaron, un día antes de la intoxicación de los demás organismos, con el fin de tener parámetros de referencia. Las dos ratas controles restantes se sacrificaron hasta el final del estudio.

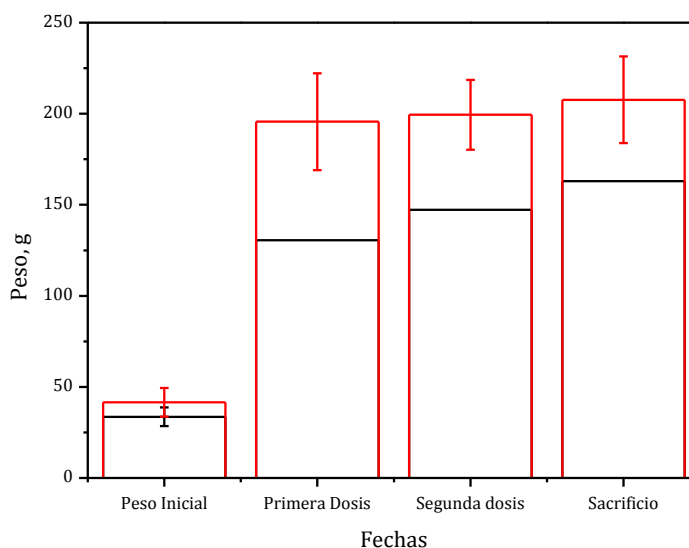


Figura 19. Peso a lo largo del estudio: organismos control (negro) y expuestos (rojo).

Obsérvese que en todos los casos (Figura 19), los pesos de los organismos control fueron menores que los pesos de los animales expuestos. Lo anterior se debe probablemente a que en el segundo grupo se encontraron todos los machos, un tanto más corpulentos por naturaleza que las hembras. Sin embargo, las tendencias observadas parecen no mostrar cambios significativos en estos

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

grupos después de la exposición a plomo durante el periodo de intoxicación (de 15 días).

EL coeficiente de correlación cruzada $r_{xy}(0)$ fue de 0.9795 para las series de tiempo de los promedios de pesos de las ratas control y expuestas. Dado que el valor calculado de t fue mayor que el valor crítico ($22.28 > 2.09$), se rechazó la hipótesis nula y en consecuencia se identificó una correlación significativa entre las dos series de tiempo; es decir, los pesos de las ratas control y las ratas expuestas variaron en una proporción similar a lo largo del periodo de estudio.

Sin embargo, al analizar la fisonomía interna de los organismos, al final del periodo de exposición, se observó una clara diferencia entre los dos grupos. Los organismos expuestos presentaron edemas y formación de tejido graso en exceso, no así los organismos control.

En cuanto al peso de los órganos, en la Figura 20 se presentan los parámetros de tendencia central de los organismos control sacrificados al inicio del proceso de intoxicación ($n=3$) y al final ($n=2$). Como puede observarse, entre los controles sacrificados el 13 y 27 de junio no se aprecian alteraciones evidentes en las muestras de riñón y cerebro, pero sí en el hígado, lo cual se constató a través de la prueba F para el caso de las varianzas y la prueba t para las medias, con pruebas bilaterales. Entre las varianzas no hubo diferencias significativas en el caso del riñón ($6.0 < 799$) ni el cerebro ($8.3 < 799$), ni entre las medias (riñón, $0.88 < 3.18$; cerebro, $0.46 < 3.18$). En cuanto al peso del hígado en ambos grupos, si bien no hubo variaciones significativas en las varianzas ($1.16 < 799$) sí lo hubo entre las medias ($3.32 > 3.18$).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

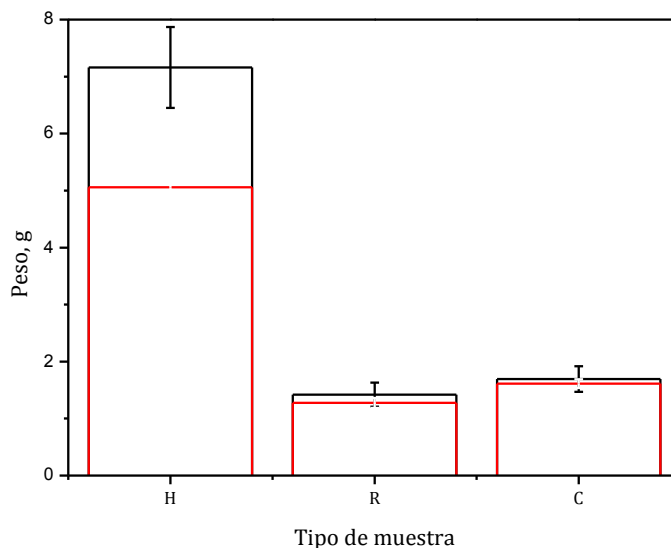


Figura 20. Peso de hígado, riñón y cerebro de animales control al inicio (negro) y al final del estudio (rojo). (H: hígado, R: riñón, C: cerebro).

Estos resultados dieron la pauta para realizar la comparación de pesos de órganos entre los organismos control sacrificado y los expuestos al metal, al final del estudio. Para esto, se consideró organismos con periodos de crecimiento similares. Los resultados se presentan en la Figura 21.

Se observó un aumento de peso en el hígado y riñón para los organismos expuestos, no así en el cerebro. La comparación de los parámetros de tendencia central entre el grupo control y expuesto sacrificados el mismo día, llevó a establecer que no hubo variaciones significativas entre las varianzas, ya que $F_{estimada}$ fue menor en todos los casos que $F_{crítica}$ ($1.26 < 921.8$ en hígado; $2.55 < 921.8$ en riñón; $2.20 < 10.01$ en cerebro). Por otro lado, hubo variaciones significativas en las medias de hígado y riñón ($3.71 > 2.45$ en hígado; $3.44 > 2.45$ en riñón), no así en cerebro ($0.61 < 2.45$). A partir de estos resultados, se consideró que el peso de hígado y riñón pudieran ser parámetros indicadores de intoxicación por plomo, por lo que se conservarían en el resto de las comparaciones, no así el peso de cerebro.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

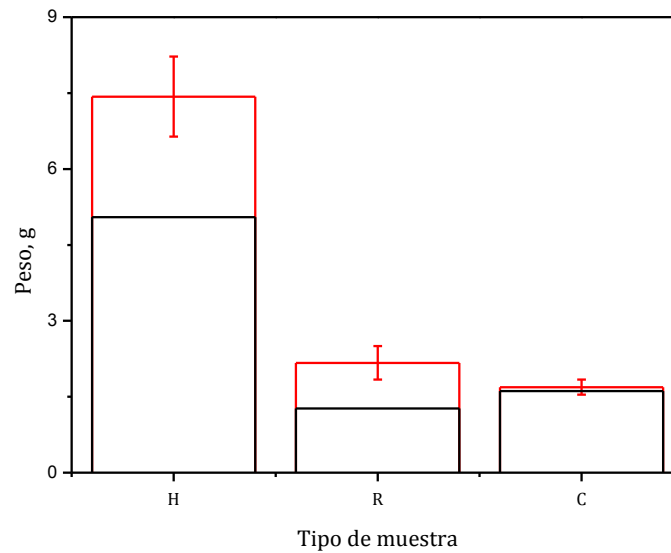


Figura 21. Peso de hígado (H), riñón (R) y cerebro (C) de organismos control (negro) y expuestos (rojo) al final del periodo de experimentación.

El último parámetro físico considerado fue el volumen de orina, cuyos resultados se muestran en la Figura 22. Se aplicó un ANOVA en dos sentidos para evaluar simultáneamente todos los datos. Los resultados se muestran en la Tabla 19. No hubo variaciones significativas entre el estado inicial y final de ambos grupos. Calculando el límite de confianza de las medias del estado inicial y final (13.7 a 27.3 y 1.26 a 18.5, respectivamente), pudo observarse que ambos coincidieron en cierto intervalo, razón por la cual no se identificaron variaciones significativas. Por el contrario, sí pudo distinguirse una clara diferencia entre las ratas control y expuestas al final del tratamiento, debido a que el segundo grupo presentó un incremento significativo en el volumen de orina.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

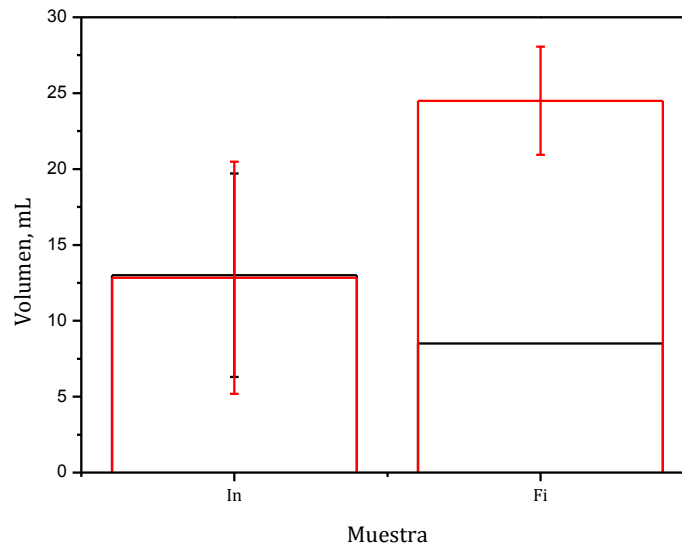


Figura 22. Volumen de orina al inicio y al final del periodo de experimentación de organismos control (negro) y expuestos (rojo) (In: inicial, Fi: final).

Tabla 19. Análisis de Varianza en dos sentidos para el volumen de orina registrado durante el estudio.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	Valor de F	Valor de P
Factor A	1	242.6075	242.6075	6.6306	0.0211
Factor B	1	49.7043	49.7043	1.3584	0.2620
Modelo	3	650.9561	216.9853	5.9303	0.0070
Error	15	548.8333	36.5888	--	--
Total	18	1199.7894	--	--	--

A un nivel de significación de 5%, las medias del Factor A (grupos control y expuesto) son significativamente diferentes.

A un nivel de significación de 5%, las medias del Factor B (estado inicial y final) no son significativamente diferentes.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.11.2. Parámetros químicos: concentración de Plomo

En la Figura 23 se presentan las concentraciones de plomo estimadas en las muestras biológicas por EVAAS. De las pruebas *F* aplicadas, sólo en el contenido de plomo en suero en el grupo control y expuesto se encontraron varianzas estadísticamente diferentes ($64.75 > 6.97$). Las medias de ambos grupos tampoco fueron estadísticamente equivalentes en este rubro ($4.11 > 2.57$), ni en el contenido de plomo en eritrocitos ($2.53 > 2.26$). En el caso del riñón, sólo se muestran la media y desviación estándar del grupo expuesto, ya que en las muestras del grupo control el contenido de plomo estuvo por debajo del límite de detección instrumental, por lo que se reportó como no detectado en todos los especímenes.

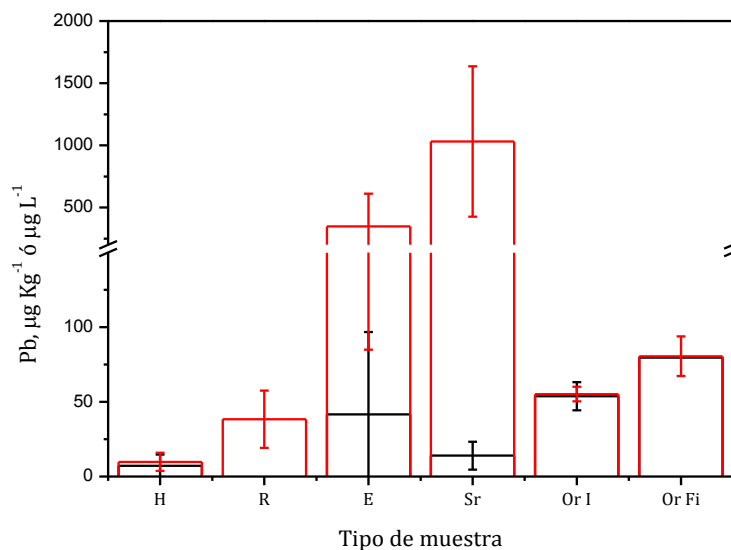


Figura 23. Contenido de plomo en las diferentes muestras analizadas: organismos control (negro) y expuestos (rojo). (H: hígado, R: riñón, E: eritrocitos, Sr: suero, Or I: orina inicial, Or Fi: orina final).

4.11.3. Parámetros bioquímicos

En la Figura 24 se presentan los valores de contenido de proteína en las muestras biológicas. En las pruebas *F* aplicadas en todos los casos, no se

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

encontraron varianzas estadísticamente significativas. En lo que respecta a la prueba t , se encontraron valores estadísticamente diferentes en sangre y cerebro ($2.42 > 2.26$, y $2.81 > 2.26$ respectivamente).

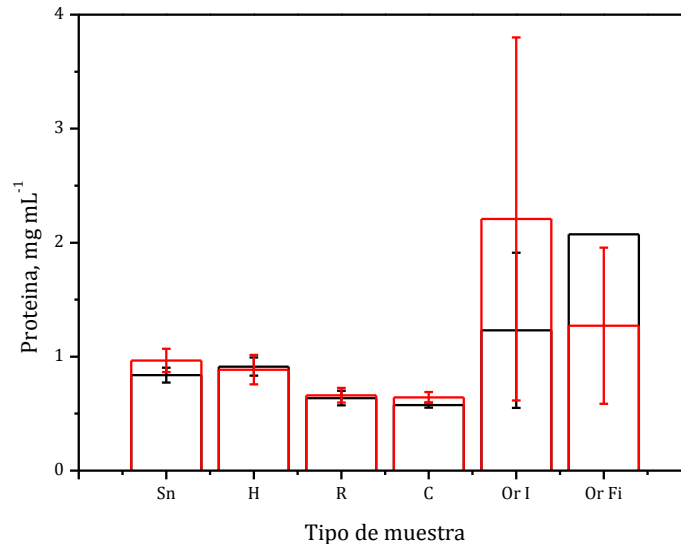


Figura 24. Contenido de proteínas en muestras biológicas: organismos control (negro) y expuestos (rojo). (Sn: sangre, H: hígado, R: riñón, C: cerebro, Or I: orina inicial, Or Fi: orina final).

En relación a la actividad de GST en las muestras biológicas (Figura 25), el análisis estadístico de los valores de tendencia central, establece que las varianzas fueron equivalentes casi en todos los casos, con excepción de la actividad de la enzima GST en orina inicial ($63.79 > 5.98$). Sin embargo, en el valor de t no hubo cambios significativos entre los especímenes control y expuestos en lo que corresponde a este parámetro ($1.33 < 2.57$). Sólo en el caso de la actividad de GST en riñón hubo cambios considerables entre ambos grupos, lo que se reflejó en medias estadísticamente diferentes ($10.26 > 2.26$).

La comparación de EROS estimada en muestras biológicas del grupo control y expuesto llevó a concluir que las varianzas y medias son

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

estadísticamente equiparables. En otras palabras, no hubo cambios significativos entre ambos. La figura 26 muestra los resultados obtenidos.

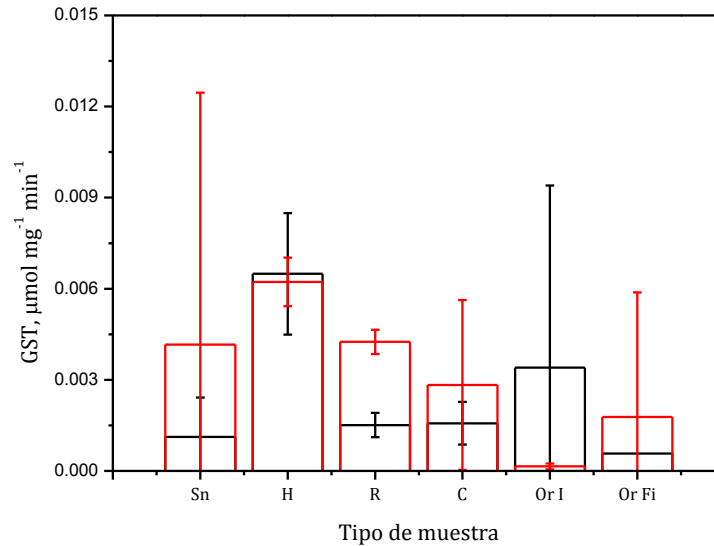


Figura 25. Actividad de GST en muestras de sangre (Sn), hígado (H), riñón (R), cerebro (C), orina inicial (Or I) y orina final (Or Fi) de animales control (negro) y expuestos (rojo).

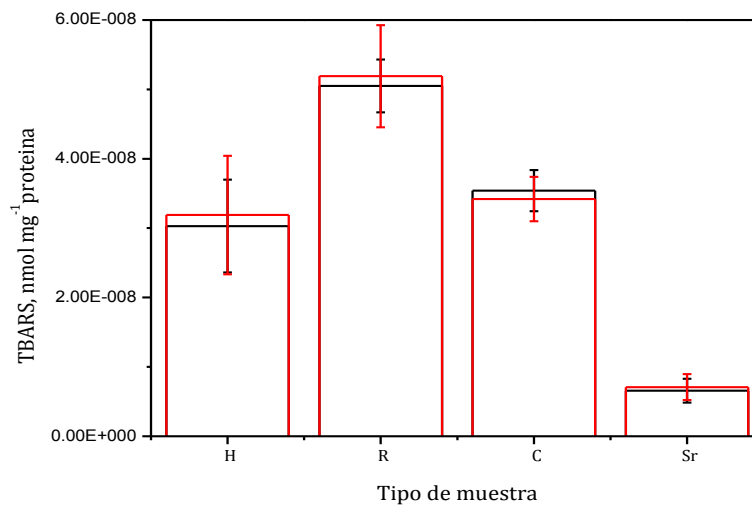


Figura 26. Especies reactivas de oxígeno medidas como especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hígado, riñón, cerebro y suero de organismos control (negro) y expuestos a plomo (rojo).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

En resumen, las variables que mostraron variaciones significativas entre las medias del grupo control y expuesto, fueron: peso de riñón, peso de hígado, volumen de orina final, plomo en suero, plomo en eritrocitos, plomo en riñón, proteínas en sangre, proteínas en cerebro y GST en riñón. Todos ellos se consideran como parámetros tentativamente afectados por la de exposición a plomo.

4.12. CORRELACIÓN DE PARÁMETROS EN ORGANISMOS EXPUESTOS

A partir de los parámetros identificados como representativos de la exposición a plomo en la sección anterior (4.1.), se estimaron los coeficientes de correlación de Pearson con el fin de identificar tendencias de asociación lineal entre pares de variables. En todos los casos se incluyeron los resultados asociados a las ratas control (5 especímenes) y expuestas (6 especímenes). Los resultados se muestran en la Tabla 20. A partir de la aplicación de la ecuación 27, se estimó t para la comparación de tales coeficientes, obteniéndose como resultado que varios pares de variables mostraron una correlación significativa, los cuales se resaltan en negritas en la Tabla 20.

4.13. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES Y ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS POR EL MÉTODO DE LAS K MEDIAS

Inicialmente, se analizaron los datos correspondientes a todas las variables (con cambios significativos o no entre ambos grupos), por lo cual se trabajó con una matriz de 11 objetos representados por 27 variables independientes. Los datos fueron autoescalados como técnica de preprocesamiento, dado que las variables estuvieron expresadas en distintas unidades y por ende diferentes magnitudes en sus intervalos de valores. El número máximo de factores fue de 9.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Tabla 20. Coeficientes de correlación de Pearson estimados para las variables identificadas como significativas en la sección 4.1

	Pb_Suero	Pb_Eritr	Pb_Riñón	Prot_San	Prot_Cer	GST_Riñón	Vol_Or_F	Peso_Hig	Peso_Riñ
Pb_Suero	1.00	0.57	0.62	0.42	0.28	0.71	0.75	0.33	0.60
Pb_Eritr		1.00	0.63	-0.05	0.23	0.56	0.56	0.55	0.52
Pb_Riñón			1.00	0.41	0.40	0.80	0.83	0.55	0.84
Prot_San				1.00	0.80	0.70	0.67	-0.02	0.56
Prot_Cer					1.00	0.76	0.61	0.40	0.69
GST_Riñón						1.00	0.94	0.52	0.87
Vol_Or_F							1.00	0.33	0.82
Peso_Hig								1.00	0.71
Peso_Riñ									1.00

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

En la Figura 27 se presentan los resultados asociados a la elección del número significativo de factores. Se recurrió inicialmente a la comparación de *PRESS* (sumatoria de los errores cuadráticos de predicción) asociados a cada factor a través de la prueba *F* (Haaland, 1988). Se identificó que en todos los casos las varianzas fueron estadísticamente equivalentes ($F_{calculada} < F_{critica}$), por lo que el número óptimo de factores no pudo seleccionarse por este criterio. Entonces, se utilizó el criterio del mínimo local (López de Alba, 1997), eligiéndose 3 factores como significativos.

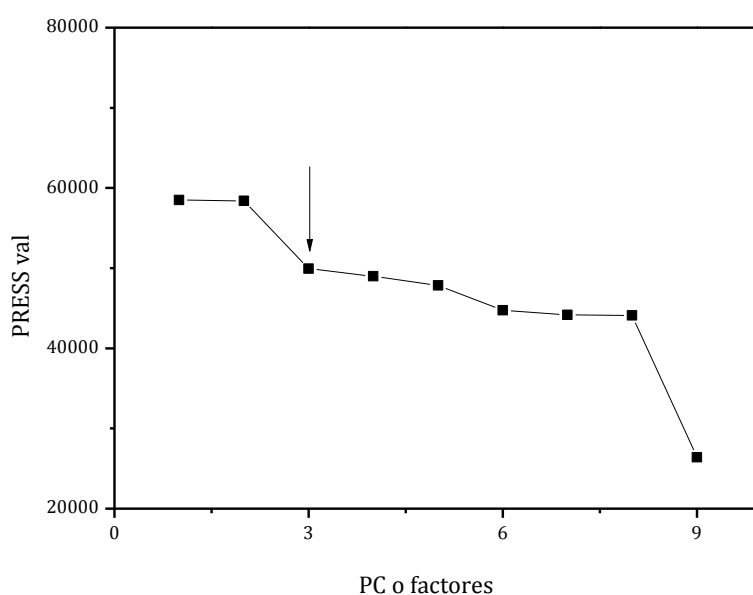


Figura 27. Identificación de factores significativos en función del PRESS de validación.

En la Figura 28 se observa la distribución de objetos (o especímenes) en el nuevo espacio representado por los factores encontrados, a través de las nuevas coordenadas o *scores* que los describen. Ningún objeto se identificó como dato aberrante considerando 3 factores como óptimos, de acuerdo a la distancia de Mahalanobis. Obsérvese que pudo diferenciarse el grupo control (c1 a c5) y el expuesto (e1 a e6), dispuestos principalmente a lo largo del primer factor, que es el que integra la mayor cantidad de la información que describe el sistema.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Al aplicar el Análisis de Conglomerados por el método de las K medias a las nuevas coordenadas derivadas del PCA para 3 factores, pudo observarse la distribución de los especímenes en los dos grupos descritos por los círculos rojos, lo cual coincidieron con la visualización inicial en el PCA.

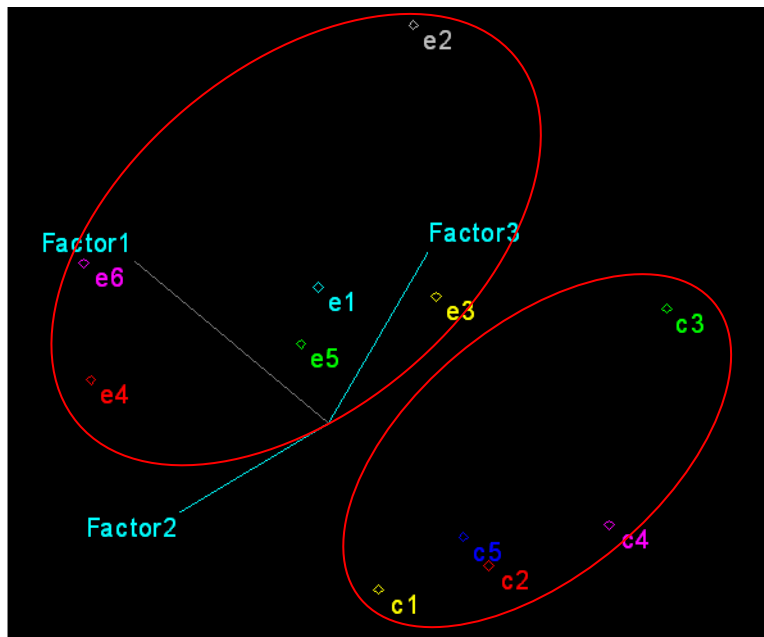


Figura 28. Representación de los objetos en el espacio definido por los tres factores considerados como significativos, considerando todas las variables estimadas en el estudio. (e: expuesto, c: control)

La Figura 29 representa la distribución de variables originales en el espacio definido por tres factores. Dado que resultaba difícil establecer la asociación entre variables originales a través de este PCA (Figura 29), se procedió a realizar un segundo PCA tomando en consideración sólo las variables que mostraron variaciones significativas entre los organismos control y los expuestos. Así, se integró una segunda matriz de datos con 9 variables y 11 objetos (o especímenes, control y expuestos), utilizando también el autoescalado como preprocesamiento, con 4 factores máximos.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

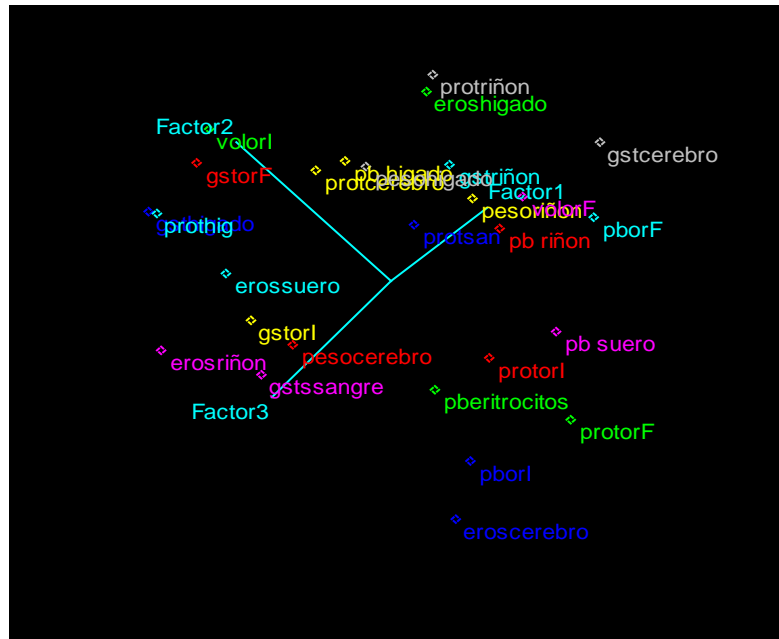


Figura 29. Representación de las todas las variables originales, en el espacio definido por los tres factores considerados como significativos.

En la Figura 30 se muestra la representación del PRESS de validación en relación con el número de factores. De acuerdo a la prueba F a partir de los valores del *PRESS* de validación, son dos los factores que se consideraron como óptimos para describir el sistema, que fueron los elegidos en el resto del PCA.

Nuevamente, ningún objeto o espécimen se identificó como dato aberrante de acuerdo a la distancia de Mahalanobis, considerando dos factores como óptimos.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

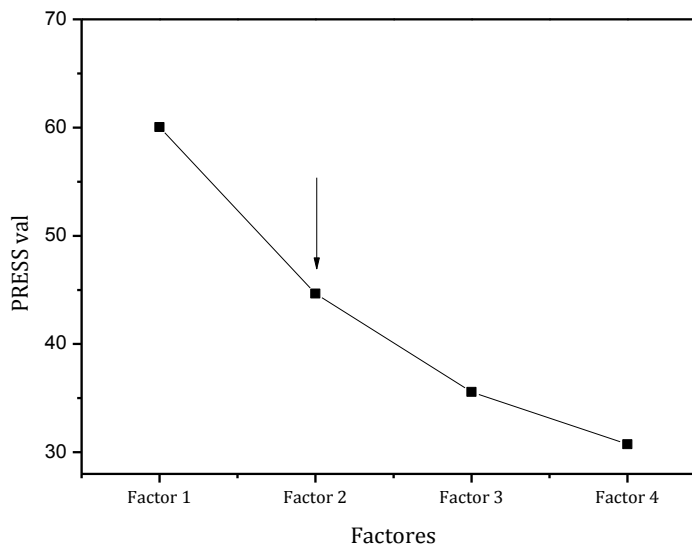


Figura 30. Identificación de factores significativos en función del PRESS de validación.

En la Figura 31 se observa la distribución de los especímenes control y expuestos en el nuevo espacio definido por los 2 factores identificados como los más significativos tras el PCA. Nuevamente, se observó que pudo hacerse una clara distinción entre ambos grupos, dispuestos a lo largo del primer factor, el más importante del análisis, considerando sólo las nueve variables más relevantes (peso de riñón, peso de hígado, volumen de orina final, plomo en suero, plomo en eritrocitos, plomo en riñón, proteínas en sangre, proteínas en cerebro y actividad de GST en riñón). Tras el Análisis de Conglomerados por el método de las K medias, se identificaron los grupos enmarcados por los círculos rojos, considerando como datos sólo los *scores* o nuevas coordenadas que definen los especímenes de los dos factores significativos.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

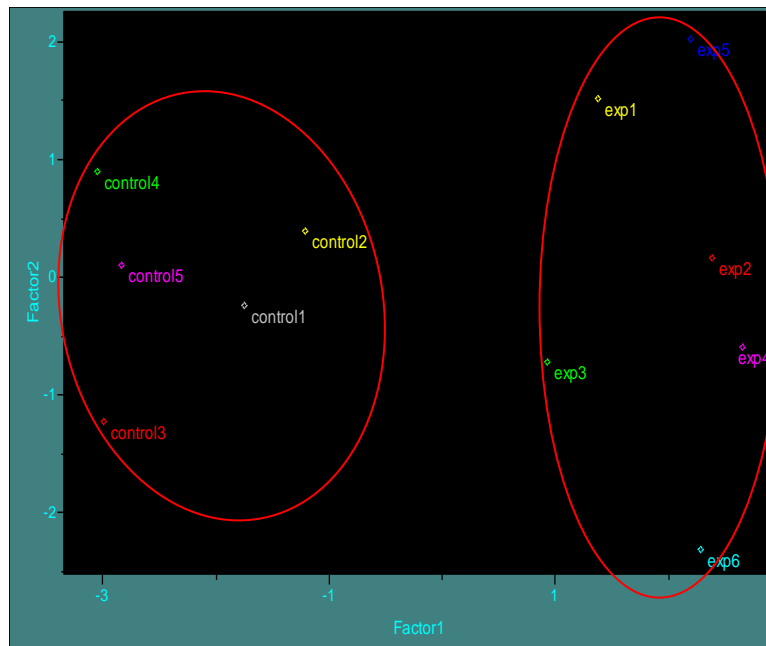


Figura 31. Representación de los objetos en el espacio definido por los dos factores considerados como significativos, considerando sólo nueve variables para describirlos.

En la Figura 32 se observa la distribución de las variables originales en el nuevo espacio definido por los dos factores considerados como significativos. Como pudo apreciarse, existen cuatro variables en el extremo positivo del Factor 1 (plomo en riñón, volumen de orina final, peso del riñón y actividad de GST en riñón) que se identificaron con una tendencia, es decir, que están claramente asociadas entre ellas. Al otro extremo se encontraron el resto de variables. Si se considera la información aportada por el Factor 2, pudo establecerse que plomo en suero, peso de hígado y plomo en eritrocitos mostraron una segunda tendencia por estar asociados en el extremo superior de este factor, y que fueron distinguibles de otro grupo integrado por proteínas en cerebro y proteínas en sangre.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Al realizar el Análisis de Conglomerados considerando a priori tres grupos, se identificaron las asociaciones descritas por los círculos en rojo. A diferencia de lo que hubiera podido pensarse por la visualización de los vectores de regresión o loadings, el plomo en suero fue asociado al grupo de variables correspondientes al riñón.

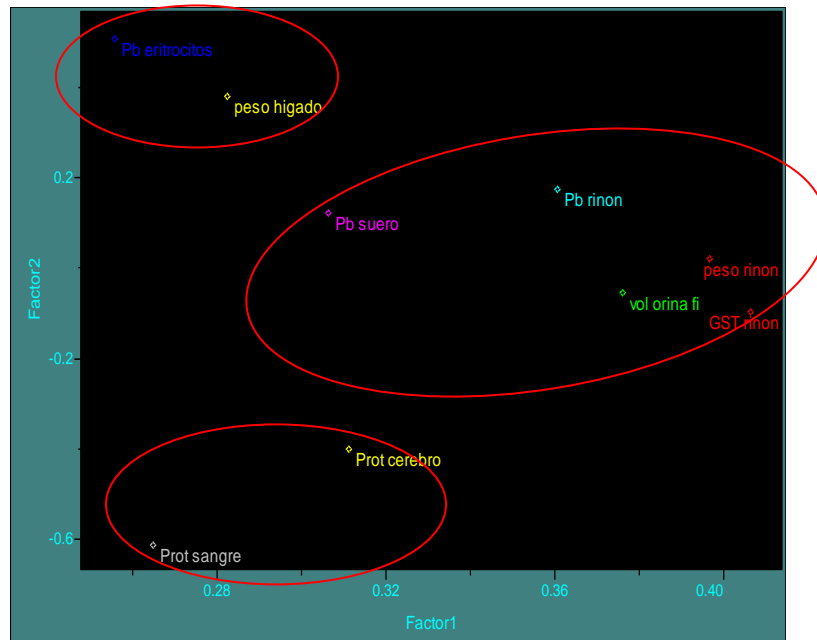


Figura 32. Representación de las nueve variables originales, en el espacio definido por los dos factores considerados como significativos.

4.14. ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS POR JERARQUÍAS

Inicialmente se trabajó con la matriz de 11 objetos (ratas) representados por 27 variables (las mediciones) independientes. Los datos fueron nuevamente autoescalados como técnica de preprocesamiento. Se probaron tres métodos de enlace o acoplamiento: simple, completo y por centroide. Sólo en el acoplamiento completo se observó la distinción correcta de los grupos control y

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

expuesto, a diferencia de los otros acoplamientos, donde la distribución no fue apropiada. La figura 33 muestra el análisis jerárquico.

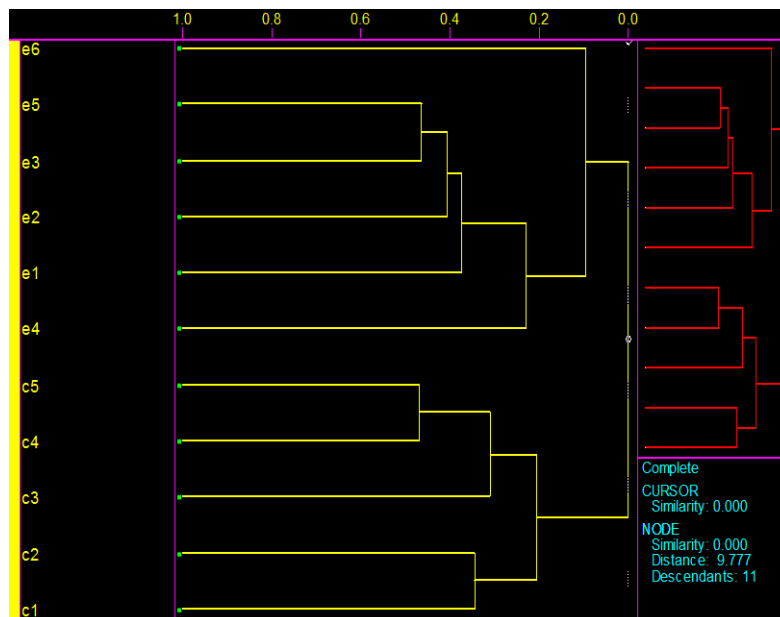


Figura 33. Representación del Análisis Jerárquico por objeto, considerando el método de enlace o acoplamiento completo, a partir de 27 variables independientes.

En segunda instancia, se realizó el Análisis de Conglomerados por Jerarquías considerando 11 objetos representados por 9 variables (las que mostraron variaciones significativas entre los grupos control y expuestos). Con los tres métodos de enlace o acoplamiento se llegó a la asociación esperada entre los grupos control y expuestos, cuyos resultados se presentan en la Figura 34.

Finalmente, se realizó otro Análisis Jerárquico sin preprocesamiento de los datos, ya que se consideró como información de partida una matriz integrada por 11 objetos descritos sólo por dos variables: las nuevas coordenadas asociadas a los Factores 1 y 2 del PCA derivado de las 9 variables significativas.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

En los tres métodos de enlace utilizados se observó la distribución esperada entre los grupos control y expuesto; en la Figura 35 se observan los resultados de uno de ellos.

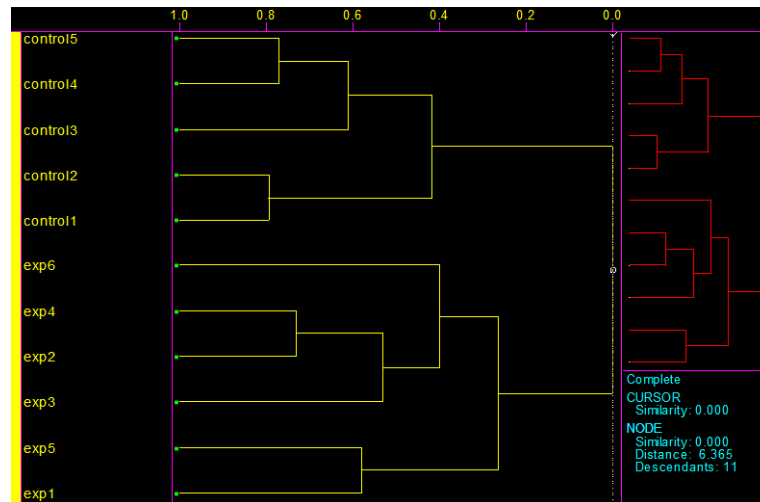


Figura 34. Representación del Análisis Jerárquico por objeto, considerando el método de enlace o acoplamiento completo, a partir de 9 variables independientes.

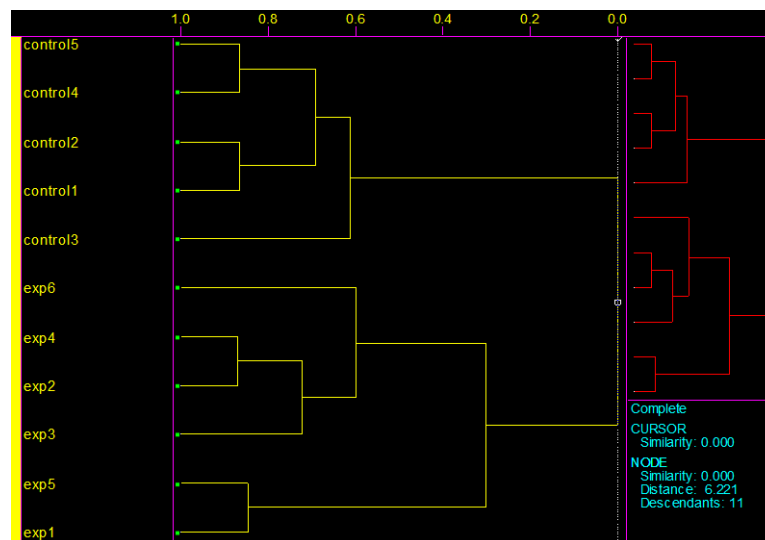


Figura 35. Representación del Análisis Jerárquico por objeto, considerando el método de enlace o acoplamiento completo, a partir de las coordenadas de los dos Factores.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

En cuanto a la asociación por variables, en las Figuras 36 a 38 se presentan las asociaciones entre las 27 variables originales que describen a los 11 especímenes, utilizando el autoescalado como preprocesamiento de los datos. Como puede observarse, los resultados fueron distintos en los tres casos. Cabe destacar que en las Figuras 36 y 38 pudo apreciarse una primera distinción entre la actividad de GST en sangre y el resto de las variables.

Por otro lado, en la Figura 37 se pueden visualizar tres grandes grupos; el primero, integrado por EROS en suero, EROS en riñón, GST en orina final, GST en orina inicial, GST en hígado, proteína en hígado y volumen de orina inicial; el segundo grupo, con EROS en hígado, proteína en cerebro, proteína en sangre, plomo en hígado, GST en cerebro, plomo en orina final, proteína en riñón, GST en riñón, volumen de orina final, peso de riñón, plomo en riñón, plomo en suero, plomo en eritrocitos y peso en hígado; el tercer grupo, con EROS en cerebro, plomo en orina inicial, proteína en orina final, proteína en orinal inicial, GST en sangre y peso del cerebro.

En el segundo grupo, a su vez, puede observarse una subdivisión, donde el primer subgrupo integra a las variables EROS en hígado, proteína en cerebro, proteína en sangre, plomo en hígado, GST en cerebro, plomo en orina final y proteína en riñón, mientras que el segundo subgrupo asocia la actividad de GST en riñón, volumen de orina final, peso de riñón, plomo en suero, plomo en eritrocitos y peso en hígado. Cabe destacar que de las 9 variables independientes iniciales consideradas como las más relevantes, 7 parámetros los ubicó en el segundo subgrupo, mientras que las dos restantes (proteína en cerebro y sangre) las ubicó en el primer subgrupo, asociadas a otras variables consideradas como irrelevantes (sin diferencias significativas entre los grupos control y expuestos). Comparando estos resultados con los derivados del PCA, la distribución en los subgrupos coincidió en gran manera con la distribución de variables asociada al Factor 2.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

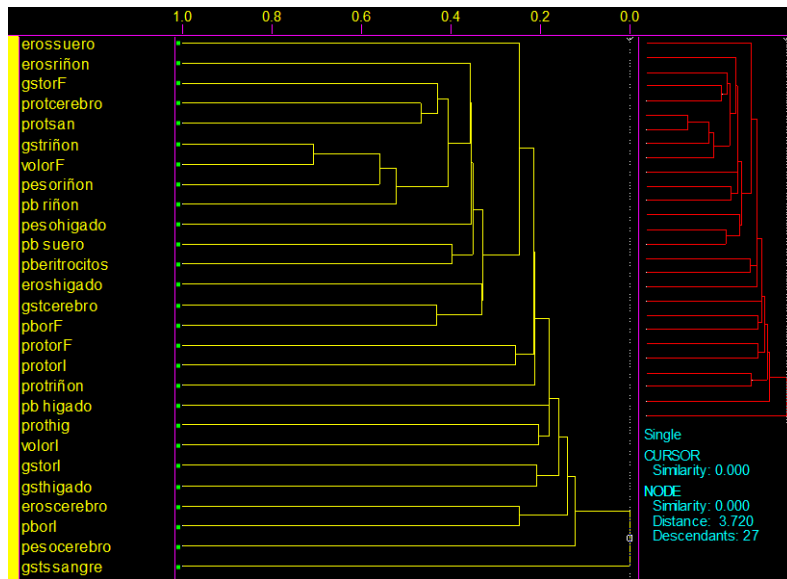


Figura 36. Representación del Análisis Jerárquico de 27 variables, considerando el método de enlace o acoplamiento simple.

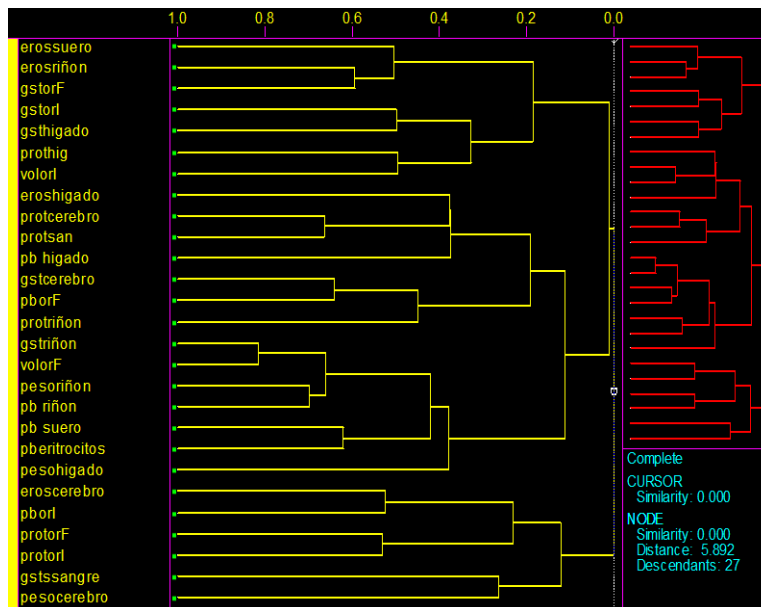


Figura 37. Representación del Análisis Jerárquico de 27 variables, considerando el método de enlace o acoplamiento completo.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

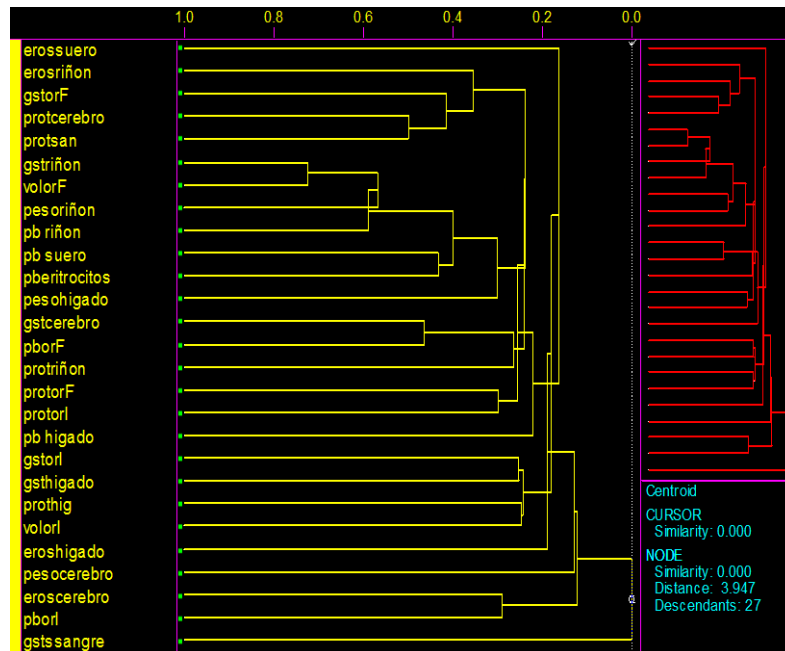


Figura 38. Representación del Análisis Jerárquico de 27 variables, considerando el método de enlace o acoplamiento por centroide.

Posteriormente, se aplicó el Análisis de Conglomerados por Jerarquías a las 9 variables significativas asociadas a los especímenes control y expuestos. De acuerdo a lo observado, los métodos de enlace o acoplamiento simple (Figura 39) y por centroide (Figura 40) derivaron prácticamente en las mismas asociaciones, donde hubo una clara diferencia entre el plomo en eritrocitos y el resto de las variables; en segundo término, se separaron al peso del hígado y plomo en suero del resto, y en un siguiente nivel se diferenció a las proteínas (en sangre y cerebro) de las variables asociadas al riñón (GST en riñón, peso del riñón, volumen de orina final y plomo en riñón).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

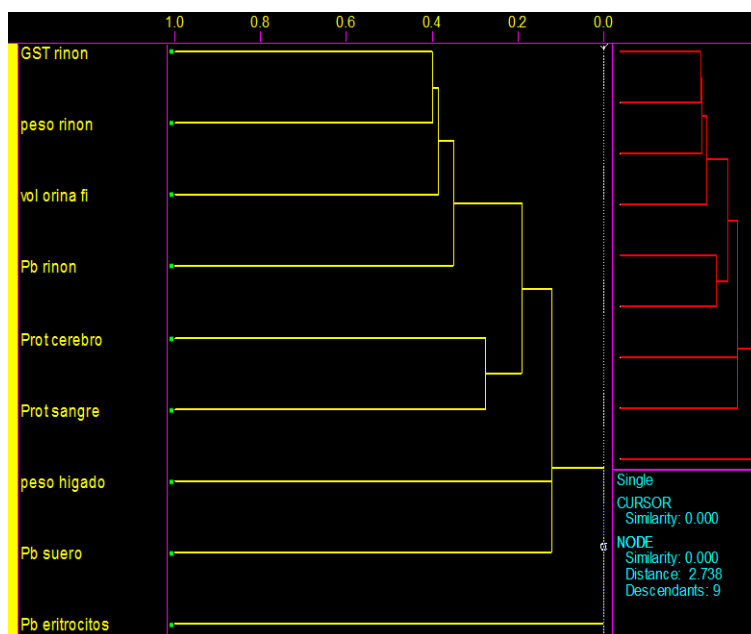


Figura 39. Representación del Análisis Jerárquico de 9 variables, considerando el método de enlace o acoplamiento simple.

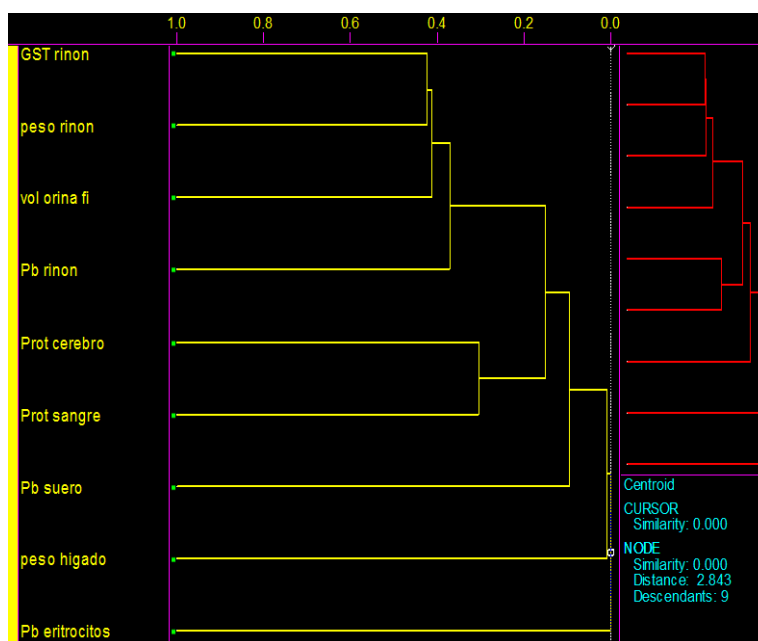


Figura 40. Representación del Análisis Jerárquico de 9 variables, considerando el método de enlace o acoplamiento por centroide.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Respecto al método de acoplamiento completo (Figura 41), pudo apreciarse que en primera instancia se identificaron a las proteínas (en sangre y cerebro) en un grupo, como diferentes del resto de variables. En un segundo nivel de jerarquías, se asoció en un subgrupo al peso en hígado y plomo en eritrocitos, mientras que en el otro subgrupo quedó el resto de variables. A este nivel, la agrupación entre variables fue la misma que la identificada por PCA.

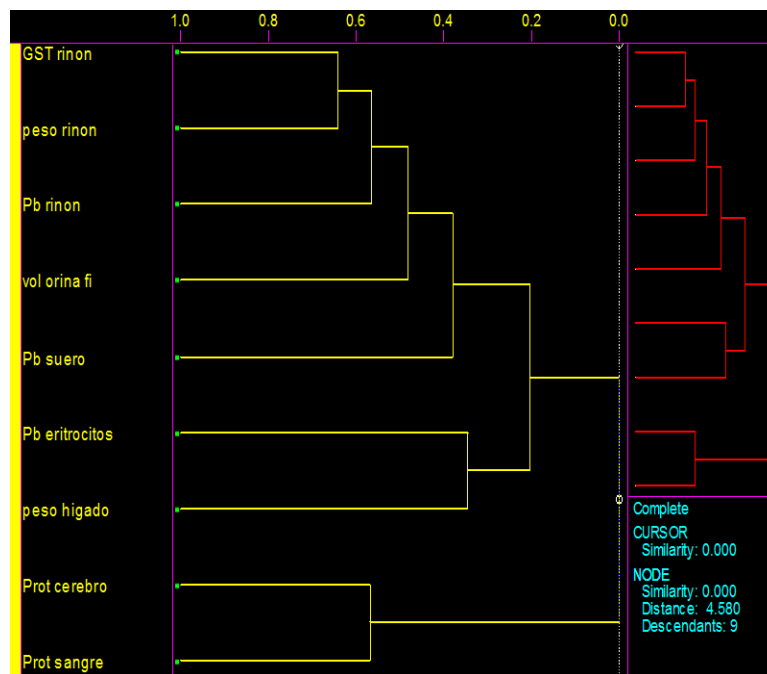


Figura 41. Representación del Análisis Jerárquico de nueve variables, considerando el método de enlace o acoplamiento completo.

4.15. ANÁLISIS PROCRUSTEANO GENERALIZADO

Como última etapa del análisis de variables continuas, se realizó para comparar los dos conjuntos de datos multivariantes (grupo control y expuesto), para

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

encontrar la similitud (o diferencia) entre ellos. Particularmente, se buscó identificar en qué variables había mayores diferencias entre los dos grupos.

Para ello, se construyeron dos matrices de 9 filas (variables con diferencias significativas entre organismos control y expuestos), cada una con 6 columnas (correspondientes a cada organismo). Debido a que el grupo control sólo contaba con 5 organismos, se añadió una columna con ceros (relleno), ya que el algoritmo requiere que haya el mismo número de columnas en ambos conjuntos de datos. Igualmente fue necesario normalizar a 1 los datos correspondientes a cada fila, para minimizar la influencia de las escalas en que fueron medidos cada uno de estos parámetros.

En la Tabla 21 se observan los resultados del ANOVA múltiple. De las tres transformaciones ejecutadas, el reescalamiento fue el único que no se identificó como significativo, lo cual estuvo de acuerdo a lo esperado dado el preprocesamiento realizado a los datos (normalización).

Tabla 21. ANOVA multivariante.

Fuente	GDL	Suma de los cuadrados	Media de los cuadrados	F	P
Reescalamiento	1	0.087	0.087	2.590	0.117
Rotación	15	1.168	0.078	2.310	0.023
Traslación	6	5.463	0.910	26.99	<0.0001

En la Figura 42 se observan los residuales por objeto, donde pudo apreciarse que en el plomo en suero fue donde se identificó el menor consenso (o similitud) entre los dos grupos (control y expuesto), mientras que en el extremo contrario se ubicó al peso de riñón (es decir, donde los datos fueron más parecidos entre los grupos control y expuestos).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

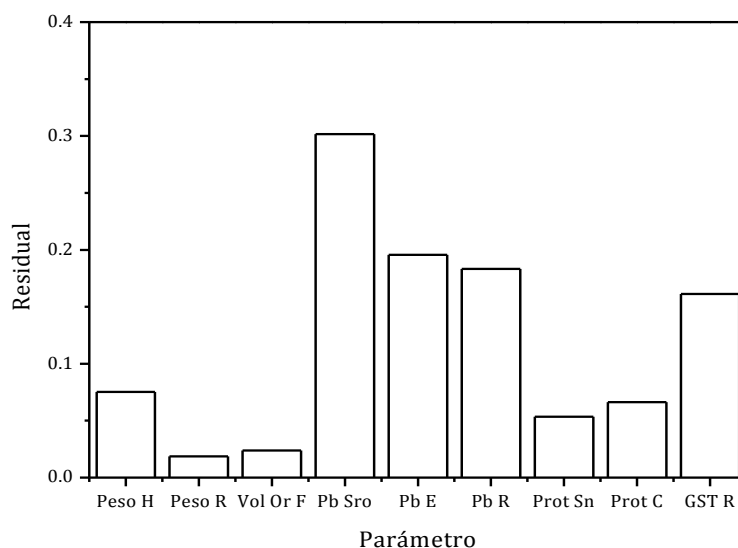


Figura 42. Residuales por parámetro, derivados del Análisis Procrusteano Generalizado. (Peso H: peso hígado, Peso R: peso riñón, Vol Or F: volumen de orina final, Pb Sro: plomo en suero, Pb E: plomo en eritrocitos, Pb R: plomo en riñón, Prot Sn: proteína en sangre, Prot C: proteína en cerebro, GST R: GST riñón).

En la Figura 43 se representa el consenso encontrado entre los dos grupos (control y expuesto). Hay que destacar que los parámetros del plomo en eritrocitos, suero y riñón mostraron tendencias diferentes que el resto (extremo derecho del Factor 1). La mayor diferencia entre el grupo control y el expuesto estuvo en el orden Pb en suero > Pb eritrocitos > Pb en riñón. En la parte central de la Figura se observa la actividad de GST en riñón, igualmente con marcadas diferencias entre el grupo control y expuesto (véase igualmente la Tabla 21). Por último, el parámetro para el cual se identificó la menor diferencia entre ambos grupos fue el peso del riñón, ya que se ubicaron prácticamente en el mismo espacio.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.16. EXAMEN GENERAL DE ORINA (EGO)

4.16.1. Grupo control y expuesto antes del tratamiento

Antes de llevar a cabo la exposición al metal y para conocer el estado renal inicial de los animales control y expuesto se realizó un examen general de orina en ambos grupos. En la Tabla 22 se observa que en general no hay variaciones en las cuantificaciones realizadas en las muestras de orina medidas con excepción de las determinaciones de cetona y proteína, debido posiblemente a las características individuales de cada animal de laboratorio (estado de salud, edad, procedencia y/o alimentación). En relación a los valores de proteína encontrados en las ratas expuestas al momento inicial y antes del tratamiento, solo una de las seis ratas presentó un valor de 300 mg/dL de orina, dos de ellas mostraron valores de 100 y en las restantes no se detectó la presencia de proteínas en orina.

Tabla 22. Examen general de orina de los grupos control y expuesto antes del tratamiento.

	Control (n=5)	Expuesto (n=6)
Glucosa	-	-
Bilirrubina	-	-
Cetona	-	0 a 5 mg/dL
Gravedad específica	1 a 1.015	1 a 1.015
Sangre	poco a moderado	poco a moderado
pH	6.5 a 8.5	6.5 a 8.5
Proteína	0 a 30 mg/dL	0 a 300 mg/dL
Urobilinógeno	0.2 U/dL	0.2 U/dL
Nitritos	+	+
Leucocitos	-	-

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.16.2. Grupo control y expuesto después del tratamiento

En la Tabla 23 se presentan los resultados de la determinación del examen general de orina en los animales control y los expuestos a plomo. Analizando los mismos se pudo observar que los miembros del grupo expuesto presentaron valores más altos que los del grupo control (presencia de sangre, concentración de proteínas y pH).

Tabla 23. Examen general de orina de los grupos control y expuesto al final del tratamiento.

	Control (n=2)	Expuesto (n=6)
Glucosa	-	-
Bilirrubina	-	0 a poco
Cetona	-	0 a 5 mg/dL
Gravedad específica	1.010 a 1.015	1 a 1.005
Sangre	0 a TNH	TNH a mucho
pH	6.0 a 6.5	7.5 a 8.5
Proteína	30 mg/dL	0 a 100 mg/dL
Urobilinógeno	0.2 U/dL	0.2 U/dL
Nitritos	+	0 a +
Leucocitos	-	-

(TNH: trazas no hemolizadas)

Analíticamente, sólo cuatro (pH, sangre, gravedad específica y proteína) de las diez variables medidas en el examen general de orina fueron codificadas de acuerdo a Gifi (1990), debido a que en las otras variables no hubo una distinción clara entre los resultados del grupo control y expuesto. Después de la codificación de las variables cualitativas ordinales, se realizó el PCA y el Análisis de Conglomerados por Jerarquías. En la Figura 44 se muestra la representación

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

del PRESS de validación vs el número de factores. De acuerdo a la prueba F a partir de los valores del *PRESS* de validación, fueron dos los factores que se consideraron como óptimos para describir el sistema.

En la Figura 45 se presenta el PCA por objeto. Pudo observarse que no existe una clara identificación de los grupos control y expuesto. Por otro lado, en la Figura 46 se presenta el PCA por variable, donde pudo observarse que no hay una asociación entre las cuatro variables.

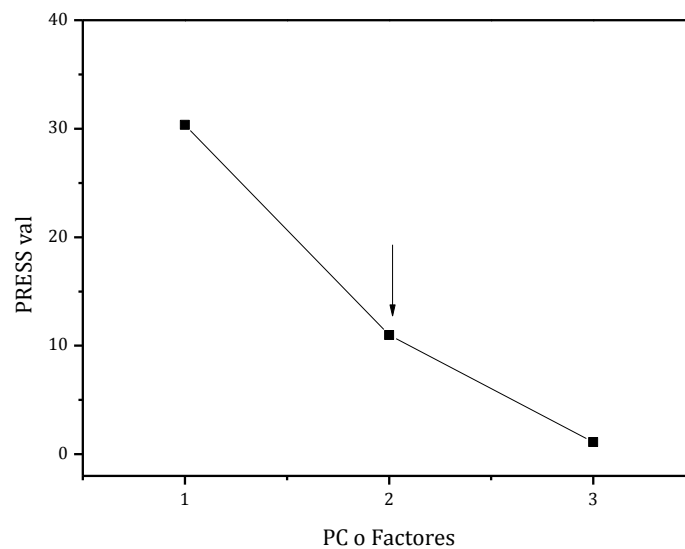


Figura 44. Identificación de factores significativos en función del PRESS de validación en el PCA aplicado a los parámetros medidos de forma semicuantitativa en el examen general de orina.

Debido a estos resultados, se realizó un PCA con las nueve variables significativas (Tabla 20) y las cuatro variables del EGO; los resultados mostraron que las cuatro variables no tenían relación entre ellas ni con las nueve variables agregadas.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Posteriormente se realizó el Análisis de Conglomerados por Jerarquías, a partir de una matriz de 11 objetos representados por 4 variables independientes. Los datos fueron nuevamente autoescalados como técnica de preprocesamiento. Se probaron tres métodos de enlace o acoplamiento: simple, completo y por centroide. En ninguno de los acoplamientos realizados se observó la distinción correcta de los grupos control y expuesto. En la Figura 47 se observan los resultados de clasificación por objetos con acoplamiento completo. Por otro lado, en la Figura 48 se presenta el Análisis Jerárquico por Variable considerando el método de acoplamiento completo.

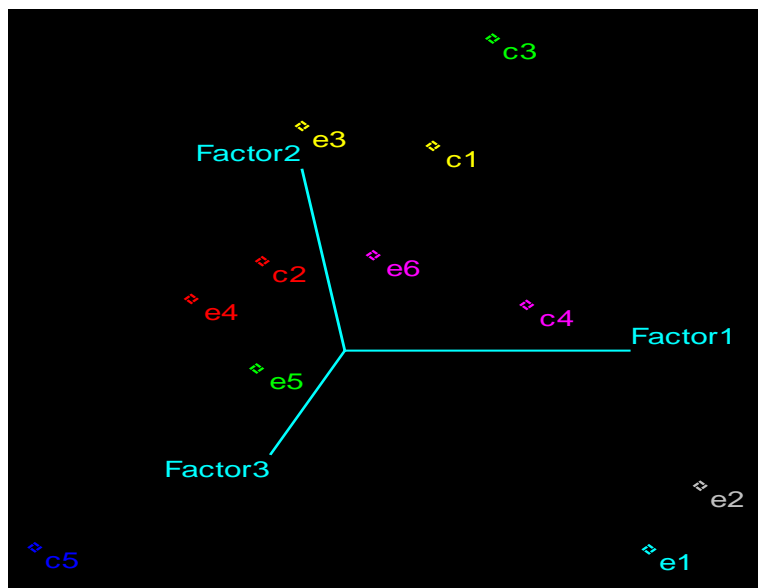


Figura 45. Representación de los objetos en el espacio definido por los dos factores considerados como significativos en el PCA aplicado a los parámetros de EGO.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

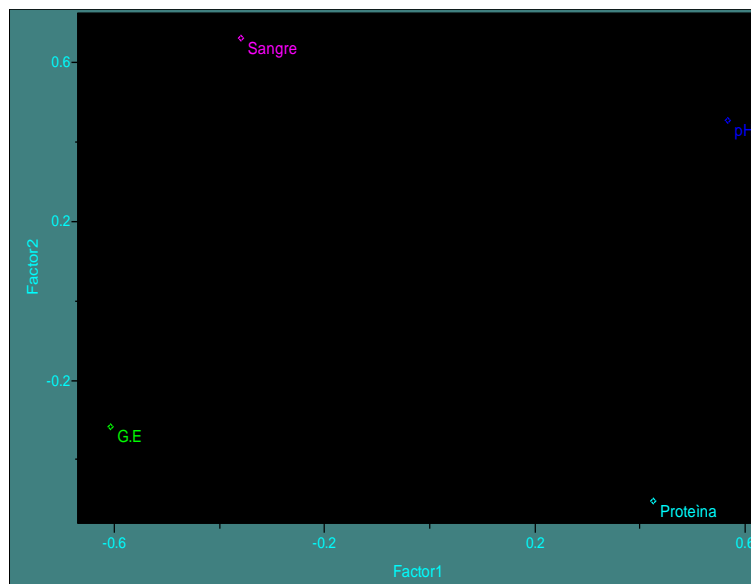


Figura 46. Representación de las cuatro variables, en el espacio definido por los dos factores considerados como significativos en el PCA aplicado a EGO.

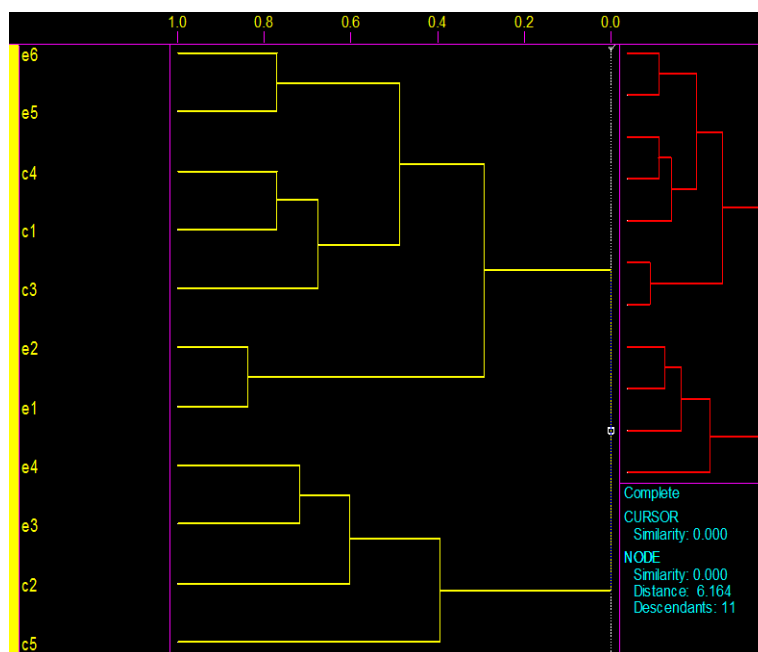


Figura 47. Representación del Análisis Jerárquico por objeto, considerando el método de enlace o acoplamiento completo en el análisis de EGO.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

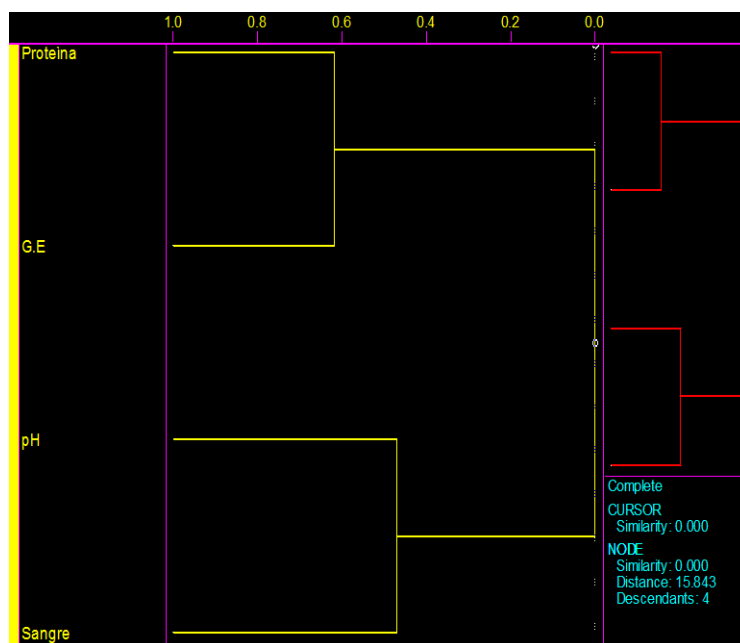


Figura 48. Representación del Análisis Jerárquico por variable, considerando el método de enlace o acoplamiento completo en análisis de los parámetros de EGO.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

5.1. PARÁMETROS INDIVIDUALES

El plomo puede dañar un gran número de órganos vitales en el ser humano y otros seres vivos (Flora, 2000, Villeda-Hernández, 2001; El-Sokkary, 2003). Los tejidos son más susceptibles de acumularlo en altas concentraciones (Shafiq-Ur-Rehman 1984). De ellos el riñón es un órgano sensible a la exposición por cualquier vía a este elemento (Nolan, 1992). Dentro del riñón este metal puede originar alteraciones morfológicas y bioquímicas mismas que se conocen como nefrotoxicidad. Ésta ha sido extensamente reportada en la bibliografía desde 1930 a la fecha (Ercal, 1996; Loghman-Adham, 1997; Patra, 2001; Antonio García, 2004; Muntner, 2007; Wang, 2009a) y se ha observado que la presencia de este metal en el órgano induce extenso daño principalmente en las células del túbulo contorneado proximal (Yiin, 1995; Navarro, 2009).

El daño general ocasionado por plomo varía de acuerdo a la vía de entrada y a la concentración. En este trabajo se utilizó una exposición aguda a una dosis alta por vía intraperitoneal. En relación al peso corporal, los resultados de este trabajo indican que no se encontró una variación significativa en el peso corporal medio de las ratas tratadas con plomo (207 ± 24 g) en relación con las ratas no expuestas al metal (163 ± 17 g) al término del periodo de experimentación. Un resultado similar se reporta por Luján (2007), quien no observó cambios significativos en el peso corporal de las ratas tratadas con plomo (dosis aguda de 300 mg/L en agua durante 21 días). Cabe mencionar que este investigador utilizó ratas preñadas. Sin embargo Adonaylo (1999), El-Nekeety (2009) y Kang (2004) observaron una disminución en el peso corporal (dosis crónica de 1 g/L vía oral por 8 semanas; dosis aguda de 20 mg/L vía oral por 30 días respectivamente) de las ratas expuestas comparadas con el grupo control. La no variación del peso corporal obtenido con este esquema de intoxicación se podría deber probablemente a que la dosis de plomo, la vía de administración y el tiempo que dura la intoxicación no tuvieron un efecto

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

significativo en el peso de los animales. No obstante, el aumento en el tejido graso es notoriamente mayor en el grupo expuesto: este dato no fue cuantificado, simplemente fue detectado por observación directa de los animales al momento de realizar los cortes.

Se registró el peso de los órganos hígado, cerebro y riñón. El peso correspondiente al hígado (7.4 ± 0.8 g) y al riñón (2.2 ± 0.3 g) de las ratas expuestas a plomo fue mayor que los pesos de los órganos de los animales control (hígado 5.06 g, riñón 1.27 g). Una posible explicación de esta observación la constituye la idea de que los órganos podrían estar respondiendo al estrés osmótico producido por la presencia de plomo dentro de las células, incrementando la cantidad de agua en las mismas, para disminuir la concentración del metal, originando edema en los órganos. Un resultado similar fue encontrado por el grupo de Rader (1983), quienes reportaron una variación significativa en el peso del riñón de ratas expuestas de forma crónica a plomo (130, 150, 175 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vía oral durante siete semanas) comparada con el peso del riñón de las ratas control. Sin embargo, Luján y col. (2007) no encontraron variaciones significativas en el peso de hígado de ratas preñadas expuestas a plomo por 21 días (300 mg/L). En cuanto al peso del cerebro no se encontraron variaciones significativas en el grupo expuesto (1.7 ± 0.1 g) comparado con el grupo control (1.61 g), esto podría deberse a que al no haber plomo en el órgano, no se incrementó la cantidad de agua.

El daño celular ocasionado por plomo se debe a los efectos que éste tiene a nivel macromolecular o por generación de estrés oxidativo. Para iniciar el estudio analítico de los efectos del metal, se procedió a cuantificar el contenido del metal en los órganos. La medición de la concentración de plomo en los diferentes órganos podría ser indicativa de que los efectos observados en estos son producto de la presencia del metal.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

Una vez absorbido, el plomo circula en sangre periférica, transportado por los hematíes en un 95%. Se distribuye con lentitud y se deposita en un 90% en los huesos, donde es relativamente inactivo. El 10% restante se distribuye por otros órganos, especialmente cerebro, hígado y riñones. En este trabajo se utilizaron los órganos antes mencionados para ambos grupos experimentales de ratas. El plomo al ser inyectado vía intraperitoneal empieza un transporte por el torrente sanguíneo, principalmente por la vena porta en donde llega al hígado, donde no es metabolizado y por medio de la vena hepática llega a la vena cava de donde se distribuye al riñón y corazón y por medio de la aorta llega al cerebro. Una manera en la que el plomo puede llegar al interior de las células de los órganos mencionados es por medio de los canales de calcio, debido a que el plomo interfiere en su transporte y puede utilizar este mecanismo para interiorizarse en las células.

En el hígado, el plomo se une a proteínas debido a su afinidad por los grupos sulfhidrilos, o es tratado de metabolizarse; pero debido a que es un xenobiótico que no es degradado o absorbido, este metal pasa a los intestinos en donde es desechado en forma de heces. Cuando el hígado degrada sustancias nocivas, los subproductos se excretan hacia la bilis o la sangre. El plomo unido a proteínas de bajo peso molecular, se filtra libremente a través del glomérulo y es reabsorbido por las células del túbulo contorneado proximal por diferentes procesos de transporte. Un porcentaje elevado de plomo es excretado por orina, ya sea de forma libre o unido a ligantes de diferente composición y tamaño.

La exposición a plomo podría ocasionar que este metal se acumule dentro de las células de riñón. Los resultados de este trabajo muestran que la concentración de plomo en homogenizados de riñón de ratas control no fue detectable, en contraste con el nivel de plomo determinado en homogenizados de riñón de ratas expuestas ($38.37 \pm 19.2 \mu\text{g/Kg}$). Rader (1983) reportó resultados similares en sus grupos de estudio. Lo anterior se debe

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

probablemente a que las células de túbulo proximal de riñón podrían poseer mecanismos de transferencia de iones o moléculas que podrían estar siendo utilizados por el plomo para entrar a las células, un ejemplo lo constituye el transportador de cationes divalentes reportado para células renales de mamíferos (DMT) (Sabath, 2012).

El plomo afecta las funciones del riñón. Para estudiar el efecto se llevaron a cabo ensayos de función renal. Al medir el volumen de orina recolectado en un periodo de 12 horas se observó que éste no varió de manera significativa entre los grupos control y expuesto (13 ± 7 mL y 13 ± 8 mL, respectivamente) al inicio del tratamiento; sin embargo se notó una diferencia significativa entre ambos grupos (8.5 mL y 24 ± 5 mL) al final del periodo de experimentación. Este resultado podría indicar que la formación de orina se encuentra afectada por la intoxicación con plomo.

El hígado regula los niveles sanguíneos de la mayoría de los compuestos químicos y excreta un producto llamado bilis, que ayuda a eliminar los productos de desecho del hígado. Toda la sangre que sale del estómago y los intestinos pasa a través del hígado. El hígado procesa esta sangre y descompone los nutrientes y drogas en formas más fáciles de usar para el resto del cuerpo. Cuando el hígado degrada sustancias nocivas, los subproductos se excretan hacia la bilis o la sangre. Los subproductos biliares entran en el intestino y finalmente se eliminan del cuerpo en forma de heces. En el hígado la concentración de plomo fue estadísticamente equivalente en las ratas expuestas (10 ± 6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) y control (7.14 ± 7.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), esto debido probablemente a la variabilidad asociada a la cuantificación (véanse desviaciones estándar en ambos casos). Contrario a esto, Luján (2007) reportan niveles altos de plomo en hígado de ratas expuestas a diferencia de las ratas control.

Tanto en el grupo control como en el expuesto no se detectó plomo en cerebro, aun cuando algunos cambios de conducta como hiperactividad y

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

agresión fueron observados en ratas expuestas y no así en ratas control. Esto podría deberse a que el tiempo de exposición a plomo fue corto y la dosis utilizada no logró afectar este órgano. Probablemente, se necesita un tiempo de exposición prolongado para que este metal llegue al cerebro y pueda causar daño, debido a que es el órgano en el cual se va acumulando lentamente en el espacio endoneural de los nervios periféricos causando edema, aumento en la presión en dicho espacio y finalmente daño axonal. Autores como Rader (1983), Shafiq-Ur-Rehman (1984), Wang (2007) y Hamed (2010) reportan altos contenidos de plomo en cerebro de ratas expuestas al metal a comparación con las ratas control. Otra razón no menos importante es que aun al existir plomo en cerebros de ratas expuestas, éste se encontrara por debajo de los límites de detección de la metodología utilizada. Se sabe que el plomo es un potente neurotóxico que puede ocasionar alteraciones en la conducta y en la función motriz de animales y humanos expuestos, ya sea de manera ocupacional o no al mismo (Shannon, 1992; Lockitch, 1993; Rice, 1993; West, 1994; Goyer, 1996; Meadows, 1996; Ruff, 1996).

El contenido de plomo en sangre (suma del contenido de plomo en suero y eritrocitos) fue estadísticamente diferente entre ratas expuestas (690 ± 434.2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) y las ratas control (27.8 ± 32.2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Este resultado es comparable con el encontrado por algunos grupos de investigación como el de Rader que en 1983 reportó un aumento de la concentración de plomo al medirse en sangre de ratas expuestas (44 ± 13 $\mu\text{g}/\text{dL}$) durante siete semanas a 130, 150, 175 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vía oral. Resultados similares fueron obtenidos por los grupos de Adonaylo (1999), Shalan (2005), Luján (2007) y Hamed (2010). Todos ellos reportaron niveles de plomo estadísticamente diferentes en sangre del grupo expuesto (126 ± 11 $\mu\text{g}/\text{dL}$; 52.94%; 22.8 ± 0.5 ; 0.8 ± 0.2 ppm, respectivamente) comparado con el control (10 ± 1 $\mu\text{g}/\text{dL}$; 50%; NR; 0.07 ± 0.01 ppm, respectivamente). Se ha propuesto que en los eritrocitos la captación celular de plomo se produce a

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

través de intercambio con aniones (Bannon, 2000). El sistema hematológico constituye un importante blanco de toxicidad y de transporte de plomo. Estudios sugieren que las células en sangre tienen una alta afinidad por plomo. Cerca del 99% de plomo presente en sangre se localiza en los eritrocitos, lo cual los hace más vulnerables a daño oxidativo que muchas otras células (Gurrer, 1999). En este trabajo la mayor concentración de plomo fue encontrado en suero de ratas expuestas.

La concentración de proteína en cada muestra sirve para ajustar la concentración de muestra para la medición de la actividad de la Glutación S-Transferasa y de especies reactivas de oxígeno. Se determinó la concentración de proteína en todas las muestras biológicas, teniendo como resultado valores estadísticamente equivalentes en ambos grupos a excepción de proteína en sangre (1.0 ± 0.1 mg/mL) y cerebro (0.64 ± 0.05 mg/mL) de ratas expuestas comparado con ratas control (0.83 ± 0.06 mg/mL; 0.57 ± 0.02 mg/mL respectivamente). Estos valores no se compararon con las de otros autores, debido a que no se han reportado en la literatura.

Las glutación S-transferasas pertenecen a una familia de enzimas de gran importancia en mecanismos de desintoxicación celular, eliminando xenobióticos o sustancias nocivas para las células. Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del sustrato fisiológico, glutación reducido ó GSH, sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas y protege contra los compuestos reactivos producidos durante el estrés oxidativo (Somashekaraiyah, 1992). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la actividad de GST fue equivalente para ambos grupos, a excepción de GST en orina inicial ($1E^{-04} \pm 1E^{-04}$ $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$) y riñón ($4.52E^{-03} \pm 4E^{-04}$ $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$) de ratas expuestas comparados con ratas control ($7.96E^{-04} \pm 6.7E^{-03}$ $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$; $1.5E^{-03} \pm 4E^{-04}$ $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$, respectivamente), lo cual podría indicar que existe un daño a

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

nivel renal, ya que la actividad de GST es un indicador de daño debido a que su actividad en general aumenta por presencia de compuestos tóxicos.

Algunos autores como Dagget (1998) reportan el aumento en la actividad de GST en riñón de ratas expuestas a plomo. Sin embargo, Sivaprasad (2002) reportan una disminución de la actividad de GST en riñón de ratas expuestas al metal (0.54 ± 0.04 nmol/min/mg de proteína) en comparación con las ratas control (0.75 ± 0.06 nmol/min/mg de proteína). Kazuo Nakagawa (1991), Dagget (1998), así como Rahman (2006) reportan disminución en la actividad de GST en hígado de ratas expuestas comparada con las ratas control. Hamed (2010) reportan una disminución de la actividad de GST en cerebro de ratas expuestas a plomo (50 ± 6 nmol/mg) en comparación con las ratas no expuestas (56 ± 6 nmol/mg). Lo anterior se encuentra relacionado con la existencia de isoformas de GST con diferente sensibilidad a los efectos del plomo.

Las especies reactivas de oxígeno se producen a partir del metabolismo celular normal o como consecuencia de la exposición a xenobióticos. La mitocondria es la mayor fuente intracelular de especies reactivas de oxígeno, las cuales a niveles fisiológicos se comportan como mensajeros de óxido-reducción en cascadas de señalización intracelular, mientras a niveles elevados inducen modificaciones de macromoléculas afectando la funcionalidad celular o promoviendo apoptosis. La patogénesis de la toxicidad del plomo es multifactorial puesto que interfiere directamente sobre la activación de ciertas enzimas, interrumpe la síntesis de proteínas estructurales, altera la homeostasis del calcio, inhibe por competición la absorción de elementos trazas y altera el sistema óxido-reducción celular, siendo en la actualidad este último mecanismo el más relacionado con la etiología de las alteraciones observadas en organismos intoxicados con plomo. A pesar de que es un metal que no sufre reacciones químicas de óxido-reducción, tiene la capacidad de incrementar la producción de radicales libres (mediante reacciones tipo Fenton) y disminuir la disponibilidad

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

de reservas antioxidantes del organismo, convirtiendo al estrés oxidativo en un componente clave en las consecuencias fisiopatológicas generadas por metales.

En este trabajo no se encontraron diferencias significativas en el nivel de especies reactivas de oxígeno entre ambos grupos (los valores oscilan entre $6.57E^{-09}$ nmol/mg de proteína a $5.19E^{-08}$ nmol/mg de proteína). Sin embargo, debido a que las muestras permanecieron congeladas durante un largo periodo, ya que no se tenía el reactivo para su medición, el resultado es poco confiable.

Algunos autores reportan alteraciones en el nivel de especies reactivas de oxígeno (TBARS) en ratas expuestas a plomo. Por ejemplo, Dagget (1998) reportó un aumento en la producción de TBARS en hígado (16.1 ± 3.0 nmol/g) y riñón (16.2 ± 2.0 nmol/g); Sivaprasad (2002) reportó niveles altos de oxidación en riñón (1.89 ± 0.19 nmol/mg de proteína/min); El-Sokkary (2005) y Rahman (2006) reportan niveles altos de TBARS en hígado (46%, 31.00 ± 0.08 nmol/min/mg de proteína respectivamente); Adonaylo (1999) reportó niveles altos de TBARS en cerebro (84 ± 2 nmol/g).

El último parámetro determinado fue el examen general de orina el cual se realizó para medir el efecto de la intoxicación con plomo sobre el funcionamiento renal. La detección de sangre y proteínas en orina indica daño glomerular, mientras que la presencia de glucosa indica daño en túbulo proximal. Una variación en el pH de la orina indica daño en asa de Henle y túbulo distal. Por su parte, la presencia de leucocitos y nitritos indican probable presencia de bacterias. Finalmente contenidos de cetona y bilirrubina indican perturbación en metabolismo de cuerpos cetónicos y hemoglobina.

Cabe destacar que uno de los animales del grupo expuesto presentó valores altos de proteína en orina al inicio del tratamiento, y al final del tratamiento el valor disminuyó. Esto podría haber sido producto de alguna enfermedad previa en el animal antes de incorporarlo al laboratorio para los

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

estudios. Así al someterlo a la exposición a plomo, este no se afectó como el resto, o en su caso el efecto fue diferente.

Al final de la exposición al metal se puede observar que en el grupo expuesto, los valores de proteínas en sangre y pH son mayores que en el grupo control, lo cual podría deberse a que existe un daño a nivel glomerular, un daño en el asa de Henle y tubo distal.

5.2. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

El plomo provoca un amplio espectro de efectos adversos multisistémicos en los organismos, a consecuencia de su capacidad de interferir en diversos procesos bioquímicos a nivel celular (Kosnett, 2007). Por ende, en un esfuerzo por encontrar relación entre los biomarcadores estimados en este trabajo, se utilizaron herramientas quimiométricas multivariantes.

En primera instancia, se observó que el Análisis de Conglomerados asociado al Análisis de Componentes Principales permitió distinguir claramente entre los organismos expuestos y los controles, considerando los 27 parámetros originales o sólo los nueve identificados como significativos. Por otro lado, también fue exitosa la identificación de los dos grupos (control y expuesto) a través del Análisis Jerárquico por el método de acoplamiento completo, ya fuese a partir de las 27 variables estimadas originalmente, las nueve variables significativas o los *scores* o coordenadas derivadas de los dos componentes principales identificados por PCA. Sin embargo, a partir del examen general de orina, ni el Análisis de Componentes Principales ni el Análisis Jerárquico con acoplamiento completo permitieron clasificar adecuadamente los especímenes de ambos grupos. Posiblemente la transformación de variables categóricas a numéricas fue demasiado robusta, derivando en un modelo de clasificación poco significativo.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

Respecto a la relación entre los nueve biomarcadores o parámetros significativos, el Análisis de Conglomerados acoplado al Análisis de Componentes Principales permitió identificar tres grupos o asociaciones:

- a) El más significativo (por estar definido preponderantemente por el primer PCA), fue el integrado por plomo en suero, plomo en riñón, GST en riñón, volumen de orina final y peso de riñón.
- b) Otro grupo se integró a partir de proteína en sangre y proteína en cerebro.
- c) Un grupo más asoció a plomo en eritrocitos y peso de hígado.

Estos tres grupos se repitieron nuevamente en el Análisis Jerárquico con acoplamiento completo, derivado del análisis de las nueve variables significativas. Por otro lado, se encontraron pequeñas diferencias respecto a los resultados del Análisis de Componentes Principales, en el Análisis Jerárquico con acoplamiento simple o por centroide; sólo cuatro de las cinco variables del grupo principal de PCA se asociaron nuevamente, quedando fuera plomo en suero, lo que modificó al resto de los grupos.

Revisando los coeficientes de Pearson y comparándolos con los de Análisis de Conglomerados y Análisis de Componentes Principales, pudo observarse que plomo en suero presentó correlaciones significativas con plomo en riñón, GST en riñón y volumen final de orina; sólo con el peso de riñón tuvo una correlación por arriba de 0.5, pero no significativa. Por otra parte, proteína en sangre y proteína en cerebro también tuvieron una correlación significativa, coincidiendo con su integración a un grupo por las otras técnicas. Plomo en eritrocitos y peso de hígado no tuvieron una correlación significativa, aunque estuvieron asociados en el mismo grupo por PCA.

Finalmente, del Análisis Procrusteano Generalizado se derivó que el plomo en suero fue la variable que mayor diferencia mostró entre los

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

organismos expuestos y los controles, seguida de plomo en eritrocitos y en tercer término el plomo en riñón.

A través de estudios con animales y seres humanos, se ha observado que el plomo absorbido por los organismos se distribuye rápida y simultáneamente hacia eritrocitos, tejidos blandos y huesos. Tanto en seres humanos como en ratas, las mayores concentraciones de plomo en tejido blando se encuentran en el hígado y el riñón, con una proporción mucho menor en cerebro (IARC, 2006).

El plomo en sangre se encuentra asociado principalmente a los eritrocitos, más que al plasma o suero (Bergdahl, 1997). Sin embargo, varios autores han propuesto que el plomo en suero refleja mejor la fracción del elemento que está disponible en la circulación para intercambio con órganos como el sistema nervioso central o los riñones (Manton, 1984; Schütz, 1996; Hernández-Ávila, 1998; Bergdahl, 1999). Por ejemplo, la concentración de plomo excretada en orina en seres humanos es directamente proporcional a la concentración de plomo en suero, pero no a la concentración de plomo en eritrocitos (O'Flaherty, 1993). Otro aspecto a considerar es que la relación entre la concentración de plomo en suero y en sangre no es lineal, debido en parte a los sitios limitados de los eritrocitos para enlazarse al metal (Marcus, 1985); por ello, la fracción del elemento en el suero se incrementa no proporcionalmente a altas concentraciones de plomo en sangre (Manton, 2001).

En base a lo anterior, puede justificarse el hecho de que el plomo en suero y no en eritrocitos fuese el biomarcador asociado con la concentración de plomo en riñón y otros parámetros relacionados con este órgano (GST en riñón, volumen de orina final y peso de riñón), a través del Análisis de Conglomerados-Análisis de Componentes Principales, así como del Análisis Jerárquico. Igualmente, los coeficientes de correlación de Pearson resaltaron la correlación entre plomo en suero y estas variables, a excepción del peso del riñón. Además, se respalda la observación hecha a través del Análisis Procrusteano

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

Generalizado de que el plomo en suero fue la variable con mayores diferencias entre el grupo control y expuesto, seguido de plomo en eritrocitos y plomo en riñón; es decir, que pudo considerarse como el indicador más evidente de la intoxicación con plomo.

En cuanto a las demás variables asociadas al riñón en un mismo grupo, resulta evidente que esta tendencia es el resultado de la nefrotoxicidad del elemento. La exposición aguda a éste provoca alteraciones en el túbulo proximal, tales como inclusiones intranucleares que se ha demostrado están integradas fundamentalmente por plomo y proteínas enlazadas a plomo, que actúan como depósitos del metal que no pudo difundirse (IARC, 2006); de ahí las altas concentraciones identificadas en este órgano. También se ha identificado un incremento en la excreción urinaria (ídem), tal como lo observado en este trabajo. El incremento de peso puede asociarse a una falla renal generalizada. Finalmente, la GST interviene en el metabolismo que permite la detoxificación del organismo debido a la presencia de compuestos exógenos (Hayes, 1995), razón por la fue encontrada en concentraciones apreciables en este órgano.

En cuanto a la proteína en sangre y proteína en cerebro, se ha identificado un incremento en el contenido de proteínas de bajo peso molecular en orina, sangre y ciertos órganos blandos en seres humanos expuestos a este elemento, como resultado de un proceso de detoxificación (Gonick, 2011; Raghavan, 1977; Raghavan, 1980). Ambas variables fueron asociadas en el mismo grupo por Análisis de Conglomerados-Análisis de Componentes Principales y Análisis Jerárquico, al igual que el coeficiente de correlación de Pearson fue significativo entre ellas.

En lo que respecta a plomo en eritrocitos y peso de hígado, no se identificó ninguna relación fisiológica entre ellos. Probablemente esta asociación se deba a que todas las técnicas de reconocimiento de pautas no supervisado realizan una clasificación exhaustiva; es decir, de todas las variables

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

suministradas. Tales técnicas integran muchas de las veces en un mismo grupo a aquéllas variables que a priori no tienen relación alguna entre sí, una de sus principales limitaciones (Sharaf, 1986).

Finalmente, debe destacarse que los resultados obtenidos en el Análisis de Componentes Principales del análisis en general de orina no fueron positivos, debido a que sólo 4 variables (gravedad específica, sangre, pH y proteína) fueron cuantificadas, y no existe agrupación entre ellas, ya que están distribuidas individualmente. El resultado en el Análisis Jerárquico no es el esperado ya que la asociación entre las variables no tuvo sentido.

En la Figura 49 se puede observar que el plomo al entrar al organismo vía intraperitoneal se une a la sangre (Pb-S) y se transporta por la vena porta (v.p.) hasta llegar al hígado, en donde por la aorta es dirigido al cerebro. Mediante la vena cava (v.c.) es distribuido al corazón y al riñón. La concentración de plomo en riñón se ve involucrado con el aumento del peso del mismo, afecta la actividad enzimática de la GST, podría relacionarse con el aumento de las especies reactivas de oxígeno; y aunque no se sabe a ciencia cierta podría participar en el aumento o disminución de GSH ó en la actividad de enzimas antioxidantes. Finalmente y debido a que la concentración de plomo en riñón es elevada, parte de este metal se excreta por la orina, en donde existe aumento en la concentración de proteínas y aumento en la concentración de sangre, lo cual indica daños severos tanto en glomérulos como en túbulos proximales. La figura muestra los dos órganos en donde también se realizaron determinaciones de plomo, pero que, sin embargo y en base a los análisis de quimiometría no se relacionaron satisfactoriamente con otros parámetros.

Todo lo anterior nos permite decir que la intoxicación con plomo, bajo el esquema aplicado, daña de manera preferente al riñón de los animales intoxicados bajo el esquema empleado.

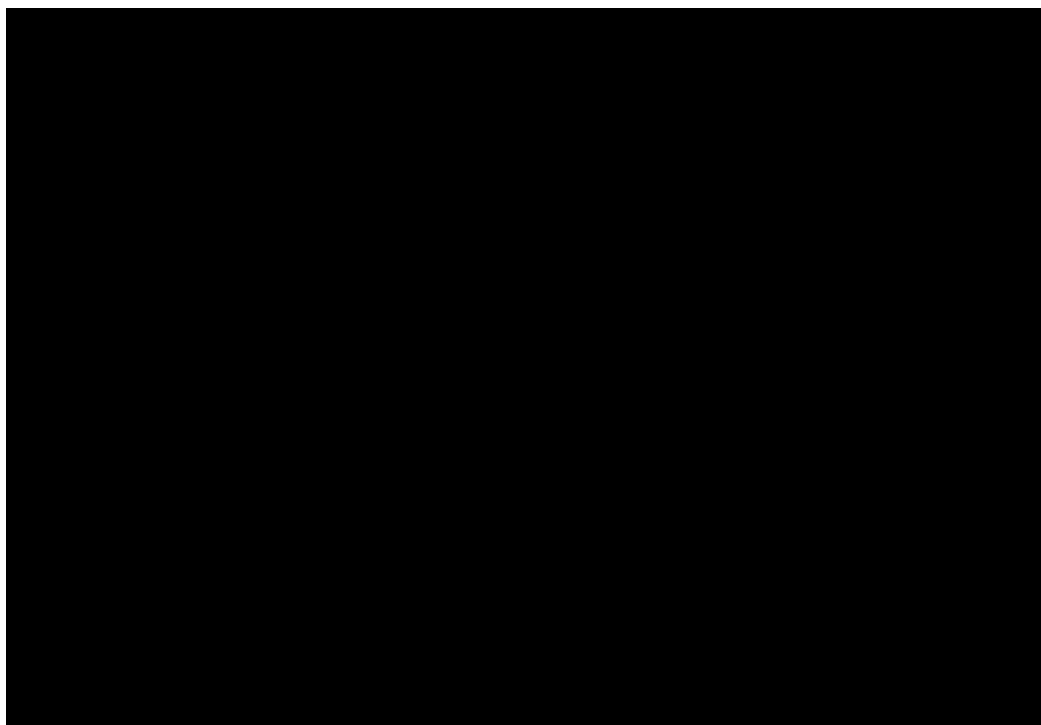


Figura 49. Modelo propuesto sobre el efecto de la intoxicación con plomo mediante un esquema de intoxicación aguda empleando siete dosis de 25 mg/ kg de peso vía intraperitoneal utilizando datos bioquímicos experimentales analizados por técnicas quimiométricas.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y

PERSPECTIVAS

6.1. CONCLUSIONES

- a) El uso de las técnicas quimiométricas ayuda a establecer un posible modelo bioquímico de intoxicación aguda con plomo en ratas Wistar expuestas al metal por vía intraperitoneal.
- b) El uso de estrategias quimiométricas facilitan la comparación de los grupos control y expuestos, identificar los parámetros más significativos en la intoxicación con plomo y analizar variables dependientes del tiempo.
- c) Los resultados asociados a las variables identificadas como significativas estuvieron acordes a los encontrados por otros autores en estudios similares.
- d) No todos los parámetros estudiados mostraron diferencias entre el grupo control y el expuesto. En algunos de los casos negativos, debido al tiempo corto de exposición del organismo al elemento, mientras que en algunos otros la variabilidad en la medición de tales parámetros fue alta, lo que impidió observar cambios significativos entre ambos grupos.
- e) Particularmente, las técnicas multivariantes de Reconocimiento de Pautas no Supervisado, como el Análisis de Conglomerados-Análisis de Componentes Principales y el Análisis Jerárquico permitieron identificar asociaciones entre variables acordes a la fisiología de los organismos intoxicados, por lo que resultaron de gran valor en el análisis de la información analizada.
- f) El análisis de variables categóricas no arrojó resultados contundentes en este trabajo, por lo que resulta necesario aplicar estrategias quimiométricas distintas.

6.2. PERSPECTIVAS.

- a) Explorar estrategias quimiométricas más acordes a variables categóricas, con el fin de encontrar relaciones estadísticamente significativas entre estas variables y las continuas.
- b) Analizar el efecto del plomo en cuanto al contenido de glutatión y la actividad de enzimas antioxidantes para profundizar en el estudio de este modelo de intoxicación.
- c) Establecer técnicas quimiométricas más especiales para llevar a cabo análisis con datos proporcionados por ensayos cualitativos como el examen general de orina.
- d) Establecer nuevos grupos de intoxicación con el fin de analizar más a fondo el efecto tóxico en otros órganos y con ello poder establecer un modelo sistémico del efecto de la intoxicación con plomo.
- e) Profundizar el estudio del efecto del plomo en la producción de TBARS con la finalidad de poder explicar el papel del plomo como agente causante de daño por estrés oxidativo.

BIBLIOGRAFÍA

AAE. 2012. Biomarcadores de la exposición a sustancias tóxicas. Asociación Argentina de Ecotoxicología, <<http://www.aae.org.ar/biomarcadores.htm>. Acceso: 29 de octubre 2012.

Adams M. J. 1995. Chemometrics in analytical spectroscopy. Royal Society of Chemistry, Cambridge UK.

Adonaylo V. N., Oteiza P. I. 1999. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology*, **135**, 77-85.

Aguilar G., Orlando A. 1996. Efectos sobre la salud humana y el ambiente por la combustión de gasolina sin plomo. Centro de Investigaciones Energéticas y Ambientales. Universidad Tecnológica de Panamá.

ALGLIB. 2012. User's guide, <http://www.alglib.net/statistics/hypothesistesting/jarqueberatest.php>, acceso: 7 de septiembre, 2012.

Antonio García T., Corredor L. 2004. Biochemical changes in the kidneys after perinatal intoxication with lead and/or cadmium and their antagonistic effects when coadministered. *Ecotox. Environ. Safe*, **57**, 184-189.

Bannon D. I., Olivi L., Bressler J. 2000. The role of anion exchange in the uptake of Pb by human erythrocytes and Madin-Darby canine kidney cells. *Toxicology*, **147**, 101-107.

Beebe K. R., Pell R. J., Seasholtz M. B. 1998. Chemometrics: a practical guide. Wiley-Interscience, New York.

Bergdahl I. A., Schütz A., Gerhardsson L., Jensen A., Skerfving S. 1997. Lead concentrations in human plasma, urine and whole blood. *Scand. J. Work Environ. Health*, **23**, 359-363.

BIBLIOGRAFÍA

Bergdahl I. A., Vahter M., Counter S. A., Schutz A., Buchanan L. H., Ortega F., Laurell G., Skerfving S. 1999. Lead in plasma and whole blood from lead-exposed children. *Environ. Res.*, **80**, 25-33.

Berthouex P. M., Brown L. C. 2002. Statistics for environmental engineers, second edition. Lewis Publishers, Boca Raton FL.

Birben E., Murat U., Sackesen C., Erzuman S., Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *Wao Journal* **5**, 9-19.

Black D. A. K. 1967. Renal Disease. Blackwell Scientific Publications, Great Britain, Oxford, pp 569-570.

Brereton R. G. 2007. Applied chemometrics for scientists. Wiley, Chichester UK.

Calderón-Salinas J. V., Maldonado V. M. 2008. Contaminación e intoxicación por plomo. Trillas editorial, México, pp. 21-28.

Chisholm Jr J. J. 1962. Aminoaciduria as a manifestation of renal tubular injury in lead intoxication and a comparison with patterns of aminoaciduria seen in other diseases. *J. Pediatr.*, **60**, 1-2.

Clarkson T. W., Magos I. 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit. Rev. Toxicol.*, **36**, 609-662.

Cramer K., Goyer R. A., Jagenburg R., Wilson M. H. 1974. Renal ultrastructure, renal function and parameters of lead toxicity in workers with different periods of lead exposure. *Br. J. Ind. Med.*, **31**, 113-114.

Daggett D. A., Oberley T. D., Nelson S. A., Wright L. S., Kornguth S. E., Siegel F. L. 1998. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. *Toxicology*, **128**, 191-206.

BIBLIOGRAFÍA

Dickinson J., Chakraborti S. 2003. Non-parametric statistical inference. Marcel Dekker, New York.

Dieterich B. H. 1975. Environmental Health Criteria for Lead. United Kingdom, pp. 19-29.

Dobryszczycka W., Zamirska B., Owczarek H., Grzebieluch M., Dzik T. 1984. Morphological and biochemical effects of chronic low level cadmium and lead feeding in rats. *Acta. Pol. Pharm.*, **41**, 111-114.

Dulka J. J., Risby T. H. 1976. Ultratracemetals in some environmental and biological systems. *Anal. Chem.*, **48**, 640A-653A.

Einax J. W., Zwanziger H. W., Geib S. 1997. Basic methods in time series analysis. In: Chemometrics in environmental analysis. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp 205-247.

El-Nekeety A. A., El-Kady A. A., Soliman M. S., Hassan N. S., Abdel-Wahhab M. A. 2009. Protective effect of *Aquilea vulgaris* (L.) against lead acetate-induced oxidative stress in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **47**, 2209-2215.

El-Sokkary G. H., Abdel-Rahman G. H., Kamel E. S. 2005. Melatonin protects against lead-induced hepatic and renal toxicity en male rats. *Toxicology*, **213**, 25-33.

El-Sokkary G. H., Kamel E. S., Reiter R. J. 2003. Prophylactic effect of melatonin in reducing lead-induced neurotoxicity in the rat. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **8**, 461-470.

Ercal N., Treeratphan P., Hammond T. C., Matthews R. H., Grannemann N., Spitz D. 1996. In vivo indices of oxidative stress in lead exposed C57BL/6 mice are reduced by treatment with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid or N-acetyl cysteine. *Free Radic. Biol. Med.*, **21**, 157-161.

BIBLIOGRAFÍA

Ferrer A. 2003. Intoxicación por metales. ANALES Sis San Navarra. Vol26 (Supl. 1): 141-153.

Fichet B., Piccolo D., Verde R., Vichi M. (eds). 2011. Classification and multivariate analysis for complex data structures. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Flora G. J., Seth P. K. 2000. Alterations in some membrane properties in rat brain following exposure to lead. *Cytobios.*, **103**, 103-109.

Franco R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E. M., Panayiotidis M. I. 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménade á trios. Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis, **674**, 3-22

Frank I. E., Todeschini R. 1994. The data analysis handbook. Elsevier, Amsterdam.

Gifi A. 1990. Nonlinear multivariate analysis. Wiley, Chichester UK.

Gonick H. C. 2011. Lead binding proteins. *J. Toxicol.*, vol. 2011, doi:10.1155/2011/686050.

Govaert G. (ed.) 2009. Data Analysis. ISTE-Wiley, New York.

Goyer R. A. 1971. Lead in the kidney. *Cur. Top. Pathos.*, **55**, 147-150.

Goyer R. A. 1989. Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity. *Toxicol. Lett.*, **46**, 153-160.

Goyer R. A. 1996. Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences. *Environ. Health Perspect.*, **104**, 1050-1054.

Goyer R. A., Rhyne B. C. 1973. Pathological effects of lead. *Int. Rev. Pathol.*, **12**, 1-2.

BIBLIOGRAFÍA

Gurer H., Ercal N. 2000. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning?. *Free radical biology & medicine*, **29** (10), 927-945.

Gurer H., Neal R., Yang P., Oztezcan S., Ercal N. 1999. Captopril as an antioxidant in lead-exposed Fischer 344 rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, **18**, 27-32.

Haaland D. M., Thomas E. V. 1988. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Anal. Chem.*, **60**, 1193-1202.

Hamed E. A., Meki A. R. M. A., El-Mottaleb N. A. A. 2010. Protective effect of green tea on lead-induced oxidative damage in rat's blood and brain tissue homogenates. *J. Physiol. Biochem.*, **66**, 143-151

Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey J. R. 2005. Glutathione transferases. *Annue. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 51-88.

Hayes J. D., Pulford D. J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30** (6), 445-600.

Hayes J. D., Pulford D. J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **30**, 445-600.

Hernández-Ávila M., Smith D., Meneses F., Sanin L. H., Hu H. 1998. The influence of bone and blood lead on plasma lead levels in environmentally exposed adults. *Environ. Health Perspect.*, **106**, 473-477.

Hibbert D. B., Gooding J. J. 2006. Data analysis for chemistry, an introductory guide for students and laboratory scientists. Oxford University Press, New York.

BIBLIOGRAFÍA

Huguet J. M., Braun J. P., Burgat-Sacaze V., Bernard P., Rico A. G. 1982. Acute kidney disturbances by lead acetate in the rat. *Toxicol. Lett.*, **10**, 395-397.

<http://es.globedia.com/plomo-gasolina-forma-parte-vidas>.

IARC. 2006. Inorganic and organic lead compounds, Vol. 87. World Health Organization, International Agency of Research on Cancer, Lyon, France.

Infometrix. 1998. Pirouette User's Manual, v2.6. New York.

Jomova K., Valko M. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, **283**, 65-87.

Jones B. R., Laslett R. E. 2000. Methods for analysis for trace metals in marine and other samples. *Aquat. Environ. Prot. Analyt. Meth.* **11**, 1-29.

Kang J. K., Sul D., Kang J. K., Nam S., Kim H., Lee E. 2004. Effects of lead exposure on the expression of phospholipids hydroperoxidase glutathione peroxidase mRNA in the brain. *Toxicol. Sci.*, **82**, 228-236.

Kong I. C., Bitton G., Koopman B., Jung K. H. 1995. Heavy metal toxicity testing in environmental samples. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **142**, 119-147.

Kosnett M. J., Wedeen R. P., Rotherberg S. J., Hipkins K. L., Materna B. L., Schwartz B. S., Hu H., Woolf A. 2007. Recommendations for medical management of adult lead exposure. *Environ. Health Persp.*, 115,463-471.

Lockitch G. 1993. Perspectives on lead toxicity. *Clin. Biochem.*, **26**, 371-81.

Loghman-Adham M. 1997. Renal effects of environmental and occupational lead exposure. *Environ. Health Perspect.*, **105**, 928-938.

López-de-Alba P. L., López-Martínez L., Wrobel-Kaczmarczyk K., Wrobel-Zasada K., Amador-Hernández J. 1997. Simultaneous determination of uranium (VI) and

BIBLIOGRAFÍA

thorium (IV) ions with arsenazo III by partial least squares method. *J. Radioanal. Nucl. Chem. Lett.*, **220**, 167-171.

Lowry N. J., Rosebrug A. K., Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurements with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

Luján M. E., Corredor L., Antonio M. T. 2007. Oxidative damage in liver after perinatal intoxication with lead and/or cadmium. *J. Trace Elem. Med. Bio.*, **21**, 210-216.

Manton W. I., Cook J. D. 1984. High accuracy (stable isotope dilution) measurements of lead in serum and cerebrospinal fluid. *Br. J. Ind. Med.*, **41**, 313-319.

Manton W. I., Rothenberg S. J., Manalo M. 2001. The lead content of blood serum. *Environ. Res.*, **86**, 263-273.

Marcus A. H. 1985. Multicompartment kinetic model for lead III. Lead in blood plasma and erythrocytes. *Environ. Res.*, **36**, 473-489.

Martens H., Naes T. 1989. *Multivariate Calibration*. Wiley, Chichester UK.

Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J. 1997. *Handbook of chemometrics and qualimetrics: parts A and B*. Elsevier, Amsterdam.

Mauzerall D., Granick S. 1956. The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.*, **219**, 435-446.

McCarthy J. F., Shugart L. R. (eds.). 1990. *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Publishers, BocaRaton FL.

Meadows R. 1996. Growing pains. *Environ. Health Perspect.*, **104**, 146-149.

BIBLIOGRAFÍA

Miller J. N., Miller J. C. 2002. Estadística y quimiometría para química analítica. Pearson Educación, Madrid.

Mirkin B. 2005. Clustering for data mining, a data recovery approach. Taylor & Francis Group, Boca Raton FL.

Mirkin B. 2011. Core concepts in data analysis: summarization, correlation and visualization. Springer-Verlag, London.

Mitsa T. 2010. Temporal data mining. Chapman & Hall/CRC Press, Boca Raton FL.

Muntner P., Menke A., Batuman V., Rabito F. A., He J., Tood A.C. 2007. Association of tibia lead and blood lead with end-stage renal disease: a pilot study of African-Americans. *Environ. Res.*, **104**, 396-401.

Naes T., Risvik E. 1996. Multivariate analysis of data in sensory science. Elsevier, Amsterdam.

Nakagawa K. 1991. Decreased glutathione s-transferase activity in mice livers by acute treatment with lead, independent of alteration in glutathione content. *Toxicol. Lett.*, **56**, 13-17.

NAS-NRC. 1972. *Airborne lead in perspective*. Washington, DC, Nat. Acad. Sci.

Navarro-Moreno L. G. 2004. Proteínas de los cuerpos de inclusión y la susceptibilidad renal hacia la intoxicación con plomo. CINVESTAV-IPN-México, DF.

Navarro-Moreno L. G., Quintanar-Escorza M. A., González S., Mondragón R., Cerbón-Solorzano J., Valdés J., Calderón-Salinas J. V. (2009). Effects of lead intoxication on intercellular functions and biochemical alterations of renal proximal tubule cells. *Toxicology in Vitro*, **23**, 1298-1304.

BIBLIOGRAFÍA

NIST/SEMATECH. 2012. e-Handbook of Statistical Methods. <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, acceso: 7 de septiembre de 2012.

Nolan C. V., Shaikh Z. A. 1992. Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms. *Toxicology*, **73**, 127-146.

O'Flaherty E. J. 1993. Physiologically based models for bone-seeking elements. IV. Kinetics of lead disposition in humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **118**, 16-29.

Oberley T., Friedman A. L., Moser R., Siegel F. 1995. Effect of lead administration on developing rat kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **131**, 94-107.

Patra R. C., Swarup D., Dwivedi S. K. 2001. Antioxidant effects of α -tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead-induced oxidative stress of the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology*, **162**, 81-88.

Payton M., Hu H., Sparrow D., Weiss S. T. 1994. Low-level lead exposure and renal function in the normative aging study. *Am. J. Epidemiol.*, **140**, 821-829.

Peña D. 1997. Estadística: modelos y métodos, vol. 1. Alianza Editorial, Madrid.

Rader J. I., Celesk E. M., Peeler J. T., Mahaffey K. R. 1983. Retention of lead acetate in weanling and adult rats. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **67**, 100-109.

Raghavan S. R. V., Culver B. D., Gonick H. C. 1980. Erythrocyte lead-binding protein after occupational exposure. I. Relationship to lead toxicity. *Environ. Res.*, **22**, 264-270.

Raghavan S. R. V., Gonick H. C. 1977. Isolation of low-molecular-weight lead binding protein from human erythrocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **55**, 164-167.

Rahman S., Sultana S. 2006. Chemopreventive activity of glycyrrhizin on lead acetate mediated hepatic oxidative stress and its hyperproliferative activity in Wistar rats. *Chem. Biol. Interact.*, **160**, 61-69.

BIBLIOGRAFÍA

Sabath E., Robles-Osorio M. L. 2012. Medio ambiente y riñón: nefrotoxicidad por metales pesados. *Nefrología*, **32**, 279-86

Schütz A., Bergdahl I. A., Ekholm A., Skerfving S. 1996. Measurement by ICP-MS of lead in plasma and whole blood of lead workers and controls. *Occup. Environ. Med.*, **53**, 736-740.

Shafiq-Ur-Rehman. 1984. Lead-induced regional lipid peroxidation in brain. *Toxicol. Lett.*, **21**, 333-337.

Sharaf M. A., Illman D. L., Kowalski B. R. 1986. Chemometrics. Wiley, New York.

Sheehan D., Meade G., Foley V. M., Dowd C. A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* **360**, 1-16.

Sivaprasad R., Nagaraj M., Varalakshmi P. 2002. Lipoic acid in combination with a chelator ameliorates lead-induced peroxidative damages in rat kidney. *Arch. Toxicol.*, **76**, 437-441.

Sivaprasad R., Nagaraj M., Varalakshmi P. 2003. Combined efficacies of lipoic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid on lead induced erythrocyte membrane lipid peroxidation and antioxidant status in rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, **22**, 183-192.

Somashekaraiah B. V., Padmaja K., Prasad A. R. K. 1992. Lead-induced lipid peroxidation and antioxidant defense components of developing chick embryos. *Free Radical Bio. Med.*, **13**, 107-114.

Swaran J., S. Flora. 2009. Structural chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative medicine longevity* **2**:4 191-206.

BIBLIOGRAFÍA

US EPA. 2001. Method 2009. Trace elements in water, solids, and biosolids by stabilized temperature, graphite furnace atomic absorption spectrometry. EPA-821-R-01-011.

Van Esch G. J., Van Genderen H., Vink H. H. 1962. The induction of renal tumors by feeding basic lead acetate to rats. *Br. J. Cancer*, **16**, 289-291.

Vander A. J., Mouw D. R., Cox J., Johnson B. 1979. Lead transport by renal slices and its inhibition by tin. *Am. J. Physiol.*, **236**, F373-377.

Vander A. J., Taylor D. L., Kalitis K., Mouw D. R., Victory W. 1977. Renal handling of lead in dogs: clearance studies. *Am. J. Physiol.*, **233**, F532-535.

Victory W., Vander A. J., Mouw D. R. 1979. Effect of acid-base status on renal excretion and accumulation of lead in dogs and rats. *Am. J. Physiol.*, **6**, F398-402.

Villeda-Hernández J., Barroso R., Méndez M., Nava C., Huerta R., Ríos C. 2001. Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. *Brain Res. Bull.*, **55**, 247-51.

Vostal J., Heller J. 1968. Renal excretory mechanisms of heavy metals: transtubular transport of heavy metal ions in the human kidney. *Environ. Res.*, **2**, 1-5.

Vyskocil A., Pancl J., Tusl M., Ettlerova E., Semecky V., Kasparova L., Luwerys R., Bernard A. 1989. Dose-related proximal tubular dysfunction in male rats chronically exposed to lead. *J. Appl. Toxicol.*, **9**, 395-399.

Wang L., Chen D., Cao J., Liu Z. 2009a. Protective effect of n-acetylcysteine on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in immature female rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, **28**, 221-229.

BIBLIOGRAFÍA

Wang Q., Luo W., Zheng W., Liu Y., Xu H., Zheng G., Dai Z., Zhang W., Chen Y., Chen J. 2007. Iron supplement prevents lead induced disruption of blood-brain barrier during rat development. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **219**, 33-41.

Wedeen R. P., Maesaka J. K., Weiner B., Lipat G. A., Lyons M. M., Vitale L. F., Joselow M. M. 1975. Occupational lead nephropathy. *Am. J. Med.*, **59**, 630-636.

Whittaker M. H., Wang G., Chen X-Q., Lipsky M., Smith D., Gwiazda R., Fowler B. A. 2011. Exposure to Pb, Cd and as mixtures potentiates the production of oxidative stress precursors: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **254**, 154-166.

Yiin S. J., Lin T. H. 1995. Lead catalyzed peroxidation of essential insaturated fatty acids. *Biol. Trace Elem. Res.*, **50**, 167-172.

ANEXO

ANEXO

ANEXO
