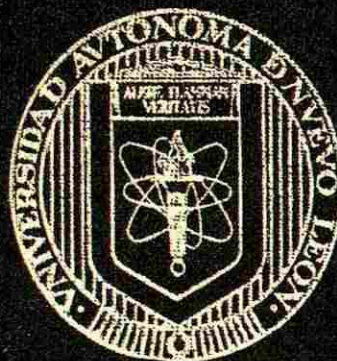


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACION DEL EFECTO DE LA COMBINACION  
DEL ACIDO 2,3- DIMERCAPTOSUCCINICO (DMSA)  
CON ANTIOXIDANTES EN LA INTOXICACION  
POR PLOMO EN RATAS**

**Por**

**Q.F.B. YOLANDA ALCARAZ CONTRERAS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en  
Farmacología y Toxicología**

**Febrero, 2005**

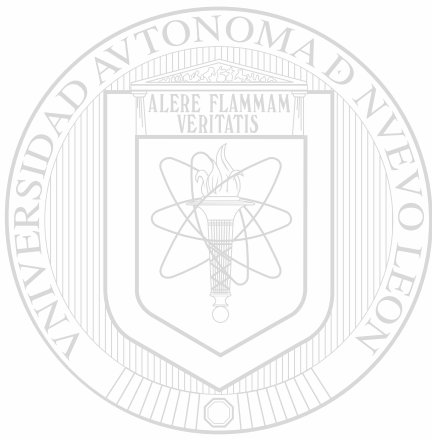


TD  
RA1231  
.L4  
A4  
2005  
e.1

Q.F.B. YOLMINDA ALCARAZ CONTRERAS



1080127183



# UANL

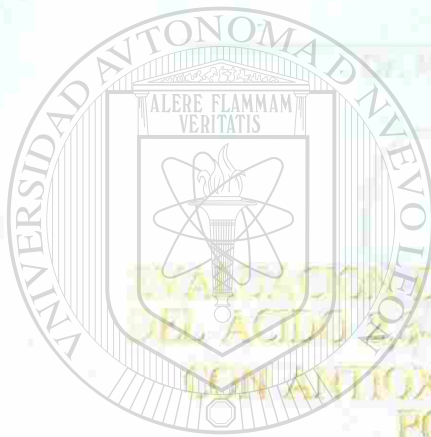
---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
Q.F.B. YOLANDA ALCARAZ CORTIÑAS

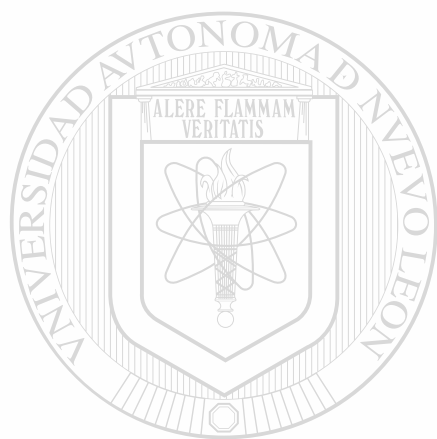
Como requisito parcial para obtener el título de  
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en  
Farmacología y Toxicología  
de la Facultad de Medicina



Salvador 2005



TD  
RA1231  
.24  
A4  
2005



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN


®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA COMBINACIÓN DEL ÁCIDO 2,3-DIMERCAPTOSUCCINICO (DMSA) CON ANTIOXIDANTES EN LA INTOXICACIÓN POR PLOMO EN RATAS**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**Dr. Med. OSCAR TORRES ALANIS**  
Director de Tesis



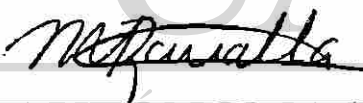
---

**Dr. Med. LOURDES GARZA OCAÑAS**  
Co-Director de Tesis



---

**PhD JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA**  
Co-Director de Tesis



---

**DRA. MARIA TERESA ZANATTA CALDERON**  
Comisión de Tesis

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



---

**DR. VICTOR ARMANDO TAMEZ RODRIGUEZ**  
Comisión de Tesis



---

**DR. DIONICIO A. GALARZA-BELGADO**  
Subdirector  
de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA COMBINACIÓN DEL ÁCIDO 2,3-DIMERCAPTOSUCCÍNICO (DMSA) CON ANTIOXIDANTES EN LA INTOXICACIÓN POR PLOMO EN RATAS.**

Presentado por

Q.F.B. Yolanda Alcaraz Contreras



Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la dirección del Dr. med. Oscar Torres Alanís y la codirección de la Dr. med. Lourdes Garza Ocañas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dr. med. Oscar Torres Alanís  
Director de Tesis

Dr. med. Lourdes Garza Ocañas  
Co-director de Tesis



Yolanda Alcaraz Contreras

Fecha de obtención de grado: Febrero 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Título del Estudio

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA COMBINACIÓN DEL ÁCIDO 2,3-DIMERCAPTOSUCCÍNICO (DMSA) CON ANTIOXIDANTES EN LA INTOXICACIÓN POR PLOMO EN RATAS.

Número de páginas: 90

Candidato para la obtención del Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Farmacología y Toxicología.

Área de Estudio: Farmacología y Toxicología

**Propósito y Método de Estudio:** El plomo (Pb) es un metal tóxico que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Se absorbe por la vía respiratoria, oral y cutánea. Los principales órganos afectados son: el sistema hematopoyético, cerebro, hígado, riñón y hueso (principal sitio de depósito). El Pb ejerce sus efectos tóxicos mediante un gran número de alteraciones bioquímicas, sin embargo, uno de los principales mecanismos de toxicidad es la generación de estrés oxidativo, caracterizado por un desbalance en la producción de radicales libres y las defensas celulares antioxidantes. Lo anterior ha sido motivo de que se haya propuesto el uso de antioxidantes como terapia coadyuvante de la intoxicación por Pb. Sin embargo, existe controversia en relación al posible efecto quelante que éstos pudieran tener; así como, su acción sobre la distribución o redistribución del Pb y el posible efecto sinérgico de los antioxidantes al ser administrados en combinación con terapia quelante. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de Vitamina C, Metionina y Glicina administradas como terapia individual y combinada con el ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) en la intoxicación por Pb en ratas. Los parámetros evaluados fueron: 1) niveles de Pb en sangre, cerebro, hígado, riñón y hueso, 2) la actividad de la enzima ácido delta aminolevulínico deshidratasa (d-ALA) y 3) niveles de glutatión (GSH) y de lipidoperoxidación (LPO) hepático y renal.

**Contribuciones y Conclusiones:** Con los resultados obtenidos se concluye que la Vitamina C, Metionina y Glicina administradas como terapia individual no tuvieron efecto quelante del Pb en sangre ni restituyeron la actividad de d-ALA. Los tres antioxidantes produjeron movilización de Pb de hueso sin redistribución del metal hacia cerebro, hígado o riñón. Se demostró que el DMSA además de quelar el Pb en sangre y órganos y restituir la actividad de d-ALA, incrementó los niveles de GSH y disminuyó la LPO a nivel hepático y renal en el mismo grado que los antioxidantes. Se estableció que la Vitamina C, Metionina y Glicina no tuvieron efecto sinérgico en cuanto a la acción quelante del DMSA al ser administrados como terapia conjunta.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



Dr. med. Oscar Torres Alanís

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi familia por su cariño incondicional y por apoyarme siempre.**

**Al Dr. med. Oscar Torres Alanís y Dr. med. Lourdes Garza Ocañas (Director y Codirector de este trabajo) por su apoyo, sus enseñanzas, su tiempo y sugerencias para la realización de este trabajo.**

**A los miembros del comité de Tesis, PhD Julio Sepúlveda Saavedra, Dr Teresa Zanatta Calderón y Dr. Victor Tamez Rodríguez por sus sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.**

**Al Dr. med. Alfredo Piñeyro López por su apoyo y enseñanzas.**

**Al M.C. Rubén Luján por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de los resultados de este trabajo.**

**Al QCB Arturo Longoria y QCB Mónica González por su apoyo en el manejo del equipo de Absorción Atómica.**

**A PAICYT UANL por el apoyo otorgado mediante el proyecto SA967-04.**

# TABLA DE CONTENIDO

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>20</b>
<b>2.1.1 Material biológico</b>	<b>20</b>
<b>2.1.1.1 Animales</b>	<b>20</b>
<b>2.1.2 Equipo</b>	<b>20</b>
<b>2.1.3 Reactivos y material general</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Métodos</b>	<b>24</b>
<b>2.2.1 Modelo de intoxicación por plomo en ratas Wistar</b>	<b>24</b>
<b>2.2.2 Administración del DMSA y antioxidantes</b>	<b>25</b>
<b>2.2.3 Obtención de muestras</b>	<b>26</b>
<b>2.2.4 Determinación de proteínas por el método de Lowry</b>	<b>27</b>
2.2.4.1 Solución estándar de albúmina	27
2.2.4.2 Curva de calibración	28
2.2.4.3 Procedimiento	28
2.2.4.4 Cálculos	29



**Capítulo** **Página**

**2.2.5 Determinación de los niveles de Pb** 29

2.2.5.1 Tratamiento de la muestra 29

2.2.5.1.1 Sangre 29

2.2.5.1.2 Tejidos 29

2.2.5.2 Estándares de Pb 30

2.2.5.3 Procedimiento 31

2.2.5.4 Curva de calibración 32

2.2.5.5 Cálculos 32

**2.2.6 Determinación de hematocrito** 33

**2.2.7 Evaluación de la actividad de d-ALA** 33

2.2.7.1 Hemólisis de la muestra 34

2.2.7.2 Procedimiento 34

2.2.7.3 Cálculos 34

---

**2.2.8 Determinación de los niveles de glutatión** 35

2.2.8.1 Solución estándar de glutatión 35

2.2.8.2 Tratamiento de la muestra 35

2.2.8.3 Curva de calibración 35

2.2.8.4 Procedimiento 36

2.2.8.5 Cálculos 36

**2.2.9 Determinación de los niveles de lipidoperoxidación** 37

2.2.9.1 Solución estándar de MDA 37

2.2.9.2 Curva de calibración 37

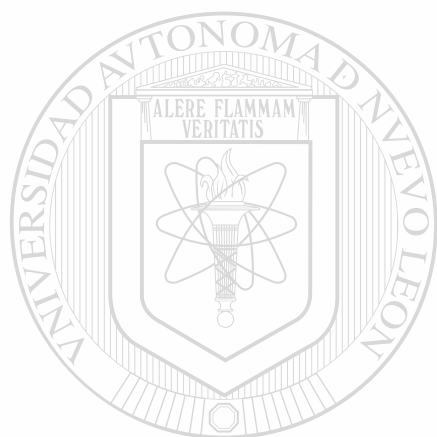
<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
2.2.9.3 Procedimiento	38
2.2.9.4 Cálculos	39
<b>2.3 Análisis estadístico</b>	<b>39</b>
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Modelo de intoxicación por Pb en ratas</b>	<b>40</b>
<b>3.2 Efecto del DMSA y antioxidantes (Vitamina C, metionina y glicina) administrados como terapia individual y combinada sobre los niveles de Pb en sangre</b>	<b>42</b>
3.2.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en sangre	43
3.2.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en sangre	44
3.2.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en sangre	45
<b>3.3 Efecto del DMSA y antioxidantes (Vitamina C, metionina y glicina) administrados como terapia individual y combinada sobre los niveles de Pb en órganos</b>	<b>46</b>
<b>3.3.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en cerebro</b>	<b>46</b>
3.3.1.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en cerebro	47
3.3.1.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en cerebro	48

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
3.3.1.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en cerebro	49
<b>3.3.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de Pb en hígado</b>	50
3.3.2.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en hígado	51
3.3.2.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en hígado	52
3.3.2.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en hígado	53
<b>3.3.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de Pb en riñón</b>	53
3.3.3.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en riñón	54
3.3.3.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en riñón	55
3.3.3.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en riñón	56
<b>3.3.4 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de Pb en hueso</b>	57
3.3.4.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en hueso	58



<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
3.3.4.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en hueso	59
3.3.4.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en hueso	60
<b>3.4 Efecto del DMSA y antioxidantes administrados como terapia individual y combinada sobre la actividad de la enzima d-ALA en sangre</b>	<b>61</b>
<b>3.4.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre la actividad de la enzima d-ALA en sangre</b>	<b>61</b>
<b>3.4.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre la actividad de la enzima d-ALA en sangre</b>	<b>62</b>
<b>3.4.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre la actividad de la enzima d-ALA en sangre</b>	<b>63</b>
<b>3.5 Efecto de los antioxidantes administrados como terapia individual y combinada sobre los parámetros de estrés oxidativo. Niveles de GSH y LPO hepático y renal</b>	<b>64</b>
<b>3.5.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de GSH en hígado</b>	<b>64</b>
<b>3.5.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de GSH en riñón</b>	<b>66</b>
<b>3.5.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de LPO en hígado</b>	<b>67</b>
<b>3.5.4 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de LPO en riñón</b>	<b>68</b>

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>4 DISCUSIÓN</b>	69
<b>5 CONCLUSIONES</b>	80
<b>PERSPECTIVAS</b>	81
<b>REFERENCIAS</b>	82
<b>APÉNDICE I</b>	89
<b>Reactivos para la determinación de proteínas</b>	90



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Efecto del Pb sobre la síntesis del grupo hem	6
2. Oxidación de ALA y generación de radicales libres	7
3. Mecanismo mediante el cual el Pb produce estrés oxidativo	9
4. Niveles de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	43
5. Niveles de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	44
6. Niveles de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta)	45
7. Niveles de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	47
8. Niveles de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	48
9. Niveles de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta)	49
10. Niveles de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	51

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
11. Niveles de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	52
12. Niveles de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta)	58
13. Niveles de Pb en riñón de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	55
14. Niveles de Pb en riñón de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	56
15. Niveles de Pb en riñón de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta)	57
16. Niveles de Pb en hueso de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	59
17. Niveles de Pb en hueso de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	60
18. Niveles de Pb en hueso de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta)	61
19. Actividad de la d-ALA en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	62
20. Actividad de la d-ALA en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	63
21. Actividad de la d-ALA en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta)	64

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I. Esquema de tratamientos evaluados	26
II. Curva de calibración para la determinación de proteínas	28
III. Concentraciones de Pb empleadas para la realización de la curva de calibración y del estándar de optimización de Pb	31
IV. Concentraciones de GSH empleadas para la realización de la curva de calibración	36
V. Concentraciones de MDA empleadas para la realización de la curva de calibración	38
VI. Niveles de Pb en sangre ( $\mu\text{g/dL}$ ) y tejidos( $\mu\text{g/g}$ ) en ratas Wistar machos intoxicadas con Pb	41
VII. Actividad de d-ALA (nmol de PBG/min/ml de eritrocitos)	41
VIII. Valores de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes administrados como terapia individual o combinada con DMSA	42
IX. Valores de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes administrados como terapia individual o combinada con DMSA	46

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
X. Valores de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes administrados como terapia individual o combinada con DMSA	50
XI. Valores de Pb en riñón de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes administrados como terapia individual o combinada con DMSA	54
XII. Valores de Pb en hueso de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes administrados como terapia individual o combinada con DMSA	58
XIII. Niveles de GSH hepático ( $\mu\text{g/g}$ de proteína) de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	65
XIV. Niveles de GSH renal ( $\mu\text{g /g}$ de proteína) de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	66
XV. Niveles de LPO hepático (nmol MDA/g de proteína) de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	67
XVI. Niveles de LPO renal (nmol MDA/g de proteína) de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	68



## NOMENCLATURA

ALA	Ácido delta aminolevulínico
%	Por ciento
$\delta$	delta
$\mu\text{g}$	Microgramos
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
cols	Colaboradores
d-ALA	Ácido delta aminolevulínico deshidratasa
dL	Decilitros
g	Gramos
HCT	Hematocrito
i.p.	Intraperitoneal
kg	Kilogramo
M	Molar
$\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$	Miliohms por centímetro
MCV	Volumen corpuscular medio
MDA	Malondialdehído
min	Minutos
mL	Mililitros
n	Tamaño de la muestra
nm	Nanómetro
nmol	Nanomol
Pb	Plomo
PBG	Porfobilinógeno
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
PQM	Productos Químicos de Monterrey
ROS	Especie reactiva de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
TCA	Ácido tricloroacético
UV	Ultravioleta
v.o.	Vía oral
Vis	Visible

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN**

El plomo (Pb) es un metal pesado, de color gris, flexible, que se encuentra naturalmente en la corteza terrestre. Su forma más abundante es el sulfuro de Pb (PbS) formando las menas de galena. Con frecuencia se encuentra asociado a otros metales, como plata, cobre, zinc, hierro y antimonio. Por su bajo punto de fusión fue uno de los primeros metales utilizados por el hombre y su intoxicación crónica, el saturnismo, se conoce desde la antigüedad. El Pb forma aleaciones con muchos metales y en general, se emplea en esta forma en la mayor parte de sus aplicaciones. El uso más amplio se encuentra en la fabricación de acumuladores, forros para cable, elementos de construcción, pigmentos, gasolinas, soldadura y municiones.

La principal fuente ambiental de Pb ha sido la gasolina, que actualmente contiene concentraciones menores o bien en algunos tipos de ella, el Pb ha sido eliminado. La exposición al Pb en el medio profesional se produce en actividades de minería, fundiciones, fabricación y empleo de pinturas, baterías, tuberías, plaguicidas, envases con soldaduras de Pb, vajillas y cerámica. La intoxicación aguda no es común, sin

embargo, la exposición a dosis bajas a largo plazo ya sea en el medio laboral o a través del aire, el agua o los alimentos produce su acumulación en el organismo y da lugar a la aparición de toxicidad crónica. Debido a que la exposición a una cierta concentración de Pb es inevitable, la Norma Oficial Mexicana establece que los niveles de Pb en sangre en niños menores de 15 años y en mujeres embarazadas no deben sobrepasar los 10  $\mu\text{g/dL}$ , mientras que en los adultos no expuestos ocupacionalmente se aceptan valores no mayores de 25  $\mu\text{g/dL}$ .<sup>1</sup>

El Pb puede ingresar al organismo por la vía oral, respiratoria y cutánea. La absorción gastrointestinal depende de la solubilidad, del tipo de sal y del tamaño de las partículas. Los adultos no absorben por esta vía más del 20-30% de la dosis ingerida pero en los niños la absorción es de hasta un 50%. En los pulmones el Pb se absorbe bien en forma de humos o partículas finas que son fagocitadas por los macrófagos alveolares. La absorción cutánea tiene escasa importancia aunque pueden absorberse de manera abundante las formas orgánicas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La mayor parte del Pb circula unido a los eritrocitos, desde donde se distribuye a los tejidos de acuerdo con la tasa de flujo sanguíneo y en proporción a la afinidad tisular por este metal. La mayor concentración se alcanza en hueso, hígado, riñón, cerebro y bazo. La acumulación de Pb en hueso está influida por prácticamente todos los procesos que afectan el depósito o la movilización del calcio en el mismo. Dado que cerca del 95% de la carga corporal total de Pb se encuentra almacenada en este tejido, cada día se reconoce más el significado toxicológico del Pb, ya que la movilización que éste puede

tener en estados fisiológicos y patológicos en los que aumenta la resorción ósea (embarazo, lactancia, menopausia, inmovilidad, senectud, etc), causa efectos adversos en otros tejidos.<sup>2</sup>

Por otro lado, se ha reconocido que además de funcionar como un reservorio, el tejido óseo, es un importante blanco de la toxicidad causada por el Pb, cuyos efectos incluyen perturbación del desarrollo, formación y resorción ósea.<sup>3,4</sup>

El Pb produce efectos tóxicos en la mayoría de órganos, sistemas y procesos fisiológicos entre los que se incluye el desarrollo de la línea roja hemática, los riñones, el sistema cardiovascular, el aparato reproductor y de mayor gravedad, el desarrollo del sistema nervioso central.

La naturaleza de las manifestaciones de toxicidad depende no sólo de la magnitud de la exposición sino también de las características de la persona expuesta; a este respecto es bien conocido que el factor nutricional y la edad son fundamentales en la intoxicación por Pb, como lo demuestran los estudios realizados tanto en humanos como en animales donde se ha observado que los efectos tóxicos son más severos en niños y en animales jóvenes que en los adultos.<sup>5,6</sup> Lo anterior, ha sido relacionado a las diferencias toxicocinéticas que el Pb sigue en la población joven (mayor absorción gastrointestinal y respiratoria así como menor eliminación) lo que conduce a una mayor carga corporal del metal. Por otro lado, el grado de absorción aumenta en estados de desnutrición o bien, cuando la dieta carece o es deficiente en elementos esenciales, tales como hierro, calcio y zinc.<sup>7</sup>

La similitud química del Pb con el calcio, le permite interferir con diversas vías metabólicas en la mitocondria y en sistemas de segundos mensajeros que regulan el metabolismo energético, así como en los canales de calcio dependientes de voltaje que intervienen en la neurotransmisión sináptica, a los que inhibe, y en las proteínas-quinasas dependientes de calcio, que activa. Diversos sistemas de neurotransmisión afectados por el Pb están regulados por la acetilcolina, dopamina, noradrenalina, GABA y glutamato. El Pb es responsable también de una disminución de la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y un aumento de la bomba de intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  lo que conduce a cambios en la contractilidad del músculo liso vascular.<sup>8-10</sup>

A pesar de la mencionada variedad de alteraciones bioquímicas que produce el Pb, cada vez se hace más evidente que el mecanismo por el cual ejerce sus efectos tóxicos es multifactorial; sin embargo, se ha propuesto que uno de los mecanismos más importantes es debido a la generación de un estado de estrés oxidativo,<sup>11,12</sup> el cual no ha sido completamente aclarado a la fecha. Uno de los primeros estudios al respecto, fue realizado por Willis<sup>13</sup> en 1965, quien reportó el papel de los metales en la oxidación de ácidos grasos insaturados y no fue sino hasta algunos años más tarde que otros investigadores reportaron una correlación directa entre la concentración de Pb y los niveles de lipídoperoxidación evaluados en distintos órganos.<sup>14-17</sup>

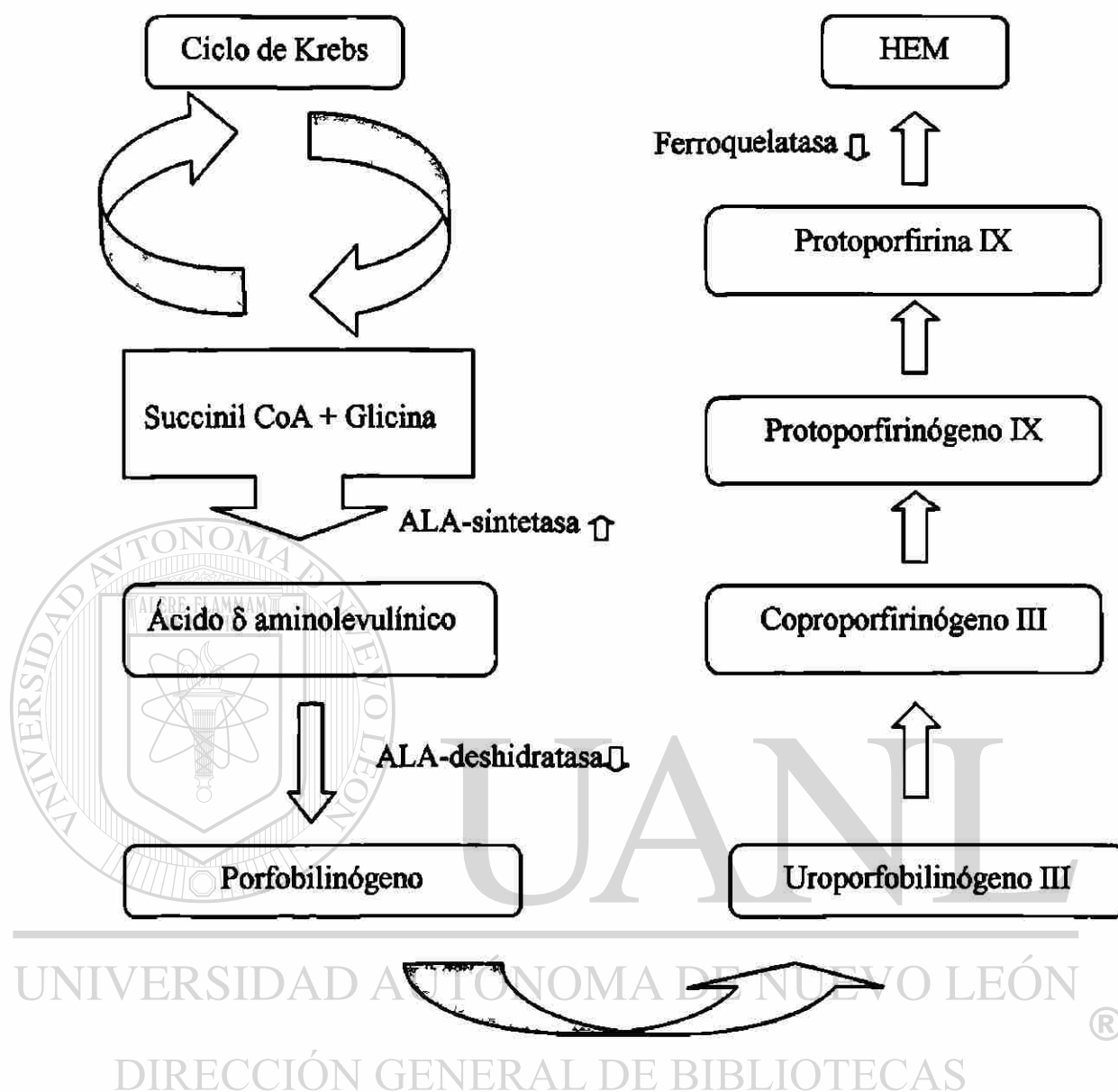
Dentro de los mecanismos propuestos mediante los cuales el Pb induce el estrés oxidativo están tanto el efecto directo producido por la acumulación del ácido delta aminolevulínico (ALA) que induce la generación de radicales libres, como el efecto sobre el sistema de defensa antioxidante de las células.<sup>18,19</sup>

El estrés oxidativo se genera como consecuencia de la producción de especies reactivas de oxígeno (“ROS” por sus siglas en inglés), así como por la disminución de las defensas celulares antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el glutatión (GSH). Las ROS son moléculas que poseen en su estructura uno o más electrones no apareados, por lo que son compuestos altamente inestables en busca de un electrón que puede ser tomado de moléculas vecinas a ellos, lo que los convierte a su vez en otras moléculas inestables. Así, este proceso da lugar a que se inicie una serie de reacciones en cadena que terminan en daño celular.

En el organismo las ROS reaccionan con moléculas biológicas, DNA, proteínas y lípidos lo que conduce a producir mutaciones, alteraciones de proteínas o peroxidación de lípidos de membranas. Esta alteración junto con la inhibición de las enzimas antioxidantes lleva a la célula a ser más vulnerable al daño oxidativo y culmina en muerte celular.<sup>20</sup>

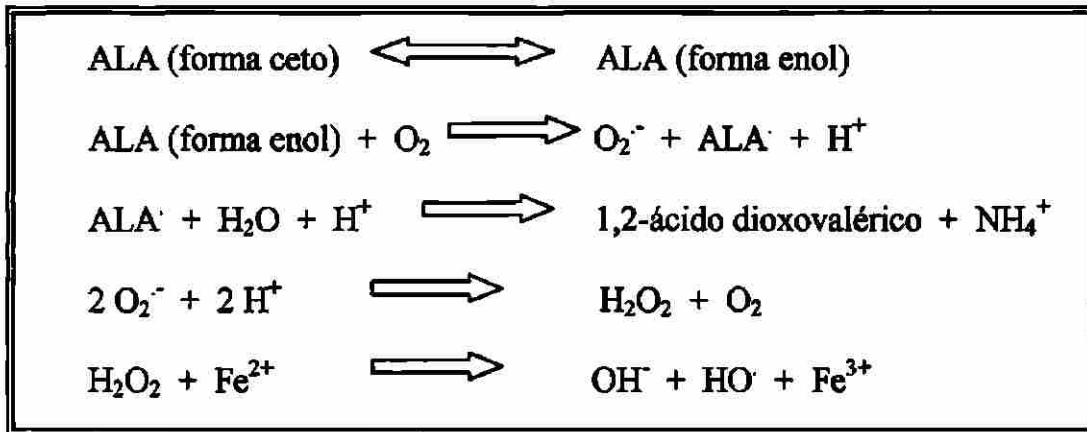
La acumulación del ALA es consecuencia de la inhibición de dos enzimas importantes en la síntesis del grupo hem. Estas enzimas son la ácido  $\delta$  aminolevulínico deshidratasa (d-ALA) que cataliza la conversión del ALA hacia porfobilinógeno<sup>21</sup> y la enzima ferroquelatasa que incorpora hierro al anillo de protoporfirina IX para formar el grupo hem. Esta inhibición lleva a la disminución de la síntesis de hem, lo que a su vez estimula a la enzima ácido delta aminolevulínico sintetasa y como consecuencia ocurre un incremento en la producción de ALA, que se acumula debido a la inhibición en su conversión hacia porfobilinógeno.<sup>18</sup> Figura 1





**Figura 1.** Representación esquemática del efecto del Pb sobre la síntesis del grupo hem.

A su vez, el exceso de ALA genera especies reactivas de oxígeno que se inician con la tautomerización de ALA al pH fisiológico lo que da lugar a una serie de reacciones en cadena que terminan con la producción de intermediarios alquilantes que se incorporan a la estructura del DNA.<sup>22</sup> También se generan radicales hidroxilo que son considerados como las especies más reactivas.<sup>23</sup> Figura 2.



**Figura 2.** Oxidación de ALA y generación de radicales libres.

La célula cuenta con mecanismos de defensa que funcionan cuando el balance prooxidante-antioxidante está alterado. Estos sistemas son de tipo enzimático y no enzimático y ambos son capaces de detener la formación de radicales libres en el interior de la célula o bien de neutralizar los ya existentes.<sup>20</sup>

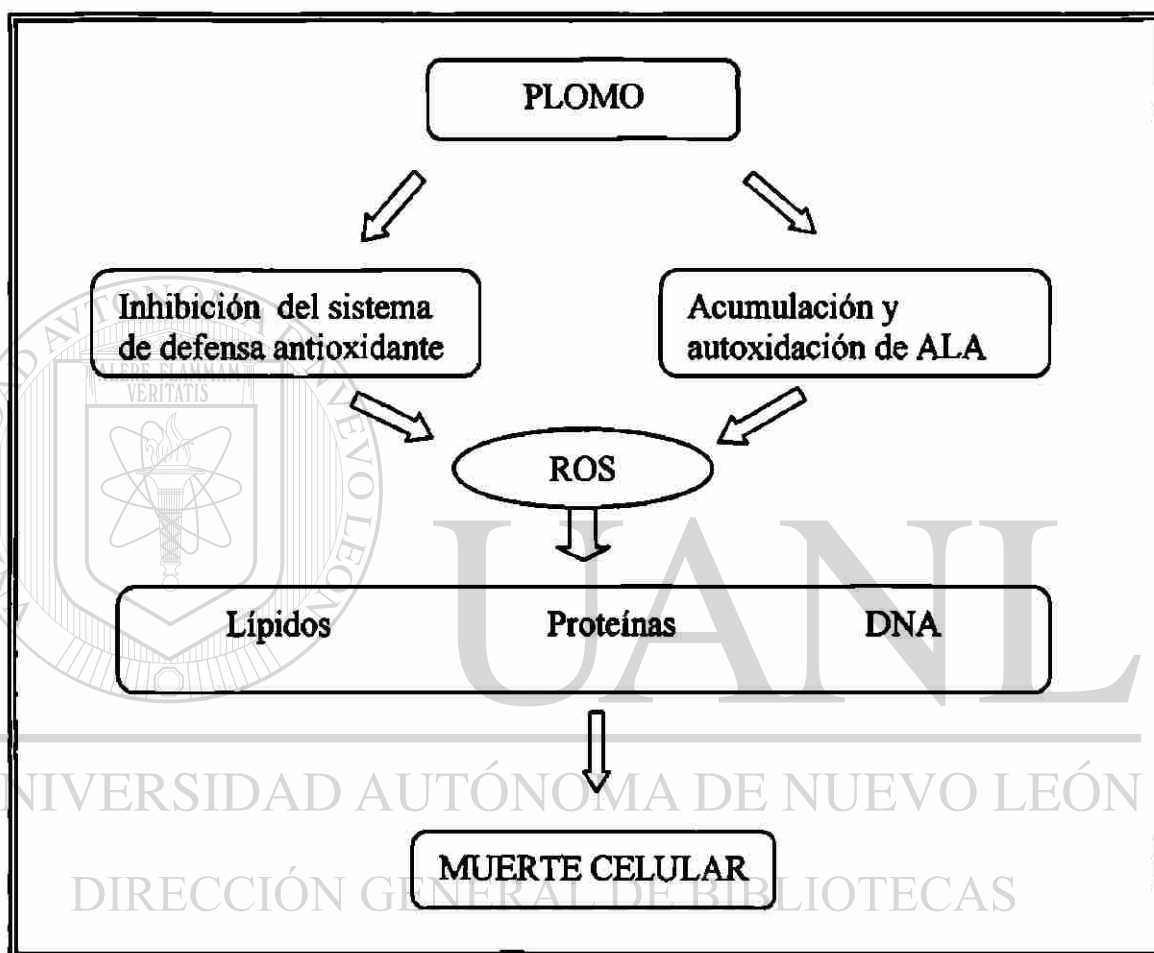
El sistema antioxidante de tipo enzimático es una de las primeras defensas frente a la producción de radicales libres y se origina en el interior del organismo. Las principales enzimas que lo forman son: la glutatión peroxidasa (GPX), CAT y SOD. Estas enzimas son metaloproteínas que ejercen funciones antioxidantes y de detoxificación enzimática de peróxidos, peróxido de hidrógeno y radical superóxido respectivamente, sin consumirse al reaccionar con radicales libres. Son dependientes de ciertos cofactores que generalmente son metales, la GPX y la CAT dependen de selenio y hierro respectivamente; mientras que la SOD depende de cobre y de zinc para mantener la actividad enzimática y la estructura molecular. Se ha reportado que, tanto el cobre como el zinc son metales blanco de la toxicidad del plomo.<sup>24,25</sup> La actividad de la GPX

disminuye al formarse un complejo entre el selenio y el Pb, por otro lado, la CAT es una enzima que contiene un grupo hem en su estructura por lo que en presencia de Pb disminuye su actividad al inhibirse la síntesis del hem.<sup>26,27</sup>

El sistema de defensa antioxidante no enzimático, está formado por distintos compuestos que atrapan o neutralizan radicales libres lo que interrumpe las reacciones en cadena que propagan el daño que éstos producen. Los componentes de este sistema son principalmente exógenos e ingresan al organismo a través de los aportes de Vitamina E, Vitamina C, betacarotenos, polifenoles, flavonoides y oligoelementos. Existen también algunos compuestos de origen endógeno como el GSH, el urato y el ubiquinol los cuales a diferencia de las enzimas son consumidos rápidamente durante su acción antioxidante.

El GSH es un tripéptido formado por L-glutamato, L-cisteína y glicina, y es considerado como uno de los principales mecanismos no enzimáticos de defensa celular contra el estrés oxidativo.<sup>28</sup> Este compuesto actúa como coenzima o cofactor. El grupo sulfhidrilo (-SH) del GSH es altamente reactivo y dado que el Pb tiene una alta afinidad por los grupos tiol, su unión al GSH no es la excepción. De esta manera, el Pb interfiere con la actividad antioxidante del GSH y disminuye los niveles endógenos del mismo.<sup>28,29</sup> De igual forma, la Vitamina E y la Vitamina C son antioxidantes importantes al limitar las reacciones oxidativas en cadena ya que producen la neutralización de los radicales libres mediante la transferencia de electrones pero sin dar lugar a la formación de otras moléculas inestables.

El esquema del mecanismo propuesto para la acción del Pb sobre el sistema de defensa antioxidante, la acumulación de ALA y la generación de ROS responsables del daño celular se muestra en la figura 3.



**Figura 3.** Mecanismo mediante el cual el Pb produce el estrés oxidativo.

Actualmente, los niveles elevados de Pb en sangre (mayores de  $45\mu\text{g/dL}$ ) se tratan con terapia de quelación, donde el principal objetivo es eliminar el Pb del organismo antes de que ocurran cambios irreversibles, lo anterior, se logra mediante la formación de compuestos coordinados atóxicos e hidrosolubles que se eliminan por la orina.

Aunque el uso de los agentes quelantes no está aprobado en nuestro país, en Estados Unidos de América y en Europa, existen varios agentes quelantes disponibles, los cuales son prescritos de acuerdo a la concentración de Pb en sangre. El ácido etilendiamino tetracético disódico cálcico ( $\text{EDTANa}_2\text{Ca}$ ), el 2,3 dimercaprol (British anti-Lewisite, BAL) y la D-penicilamina han sido extensamente utilizados en el tratamiento de esta intoxicación. A pesar de que los agentes quelantes reducen eficazmente los niveles de Pb en sangre, los efectos adversos que la mayoría de ellos producen son el principal limitante en su uso.

En el caso del  $\text{EDTANa}_2\text{Ca}$ , se ha reportado que produce una redistribución del Pb de hueso y riñón hacia el cerebro lo que aumenta el riesgo de encefalopatía, además, incrementa la excreción urinaria de metales esenciales.<sup>30</sup> Otra desventaja del tratamiento es su alto costo ya que se requiere de la hospitalización del paciente para su administración vía endovenosa. Por otra parte, la administración del BAL es vía intramuscular y es dolorosa. Este quelante, puede producir como efectos colaterales fiebre, taquicardia, náusea, vómito, sudoración y en pacientes con deficiencia de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) produce hemólisis.<sup>31</sup> La D-Penicilamina produce náusea, vómito, eosinofilia, leucopenia, trombocitopenia y reacciones de hipersensibilidad. Además se ha reportado que incrementa la excreción urinaria de cobre, zinc y hierro.<sup>32</sup>

Estas desventajas hicieron necesaria la búsqueda de agentes quelantes alternativos más seguros para el tratamiento de individuos con niveles elevados de Pb. Así, surgieron dos derivados análogos del BAL: el ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) y el ácido

2,3-dimercapto 1 propanosulfónico (DMPS). Estos quelantes tienen la ventaja de administrarse por la vía oral.<sup>33</sup>

El DMSA es un quelante soluble en agua, aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso en niños. Moviliza el Pb de sangre y órganos sin producir su redistribución hacia el cerebro.<sup>34-37</sup>

Debido a que parte de la toxicidad del Pb ha sido relacionada con la producción de un desbalance entre el estado prooxidante-antioxidante del cuerpo y la generación de estrés oxidativo que culmina con el abatimiento de los mecanismos de defensa (principalmente glutatión) se ha propuesto que las sustancias antioxidantes pueden ser de beneficio como terapia coadyuvante en esta intoxicación.<sup>38</sup> En este sentido, uno de los antioxidantes más estudiados es la N-acetilcisteína (NAC). Gurer y cols.<sup>39</sup> evaluaron el efecto de NAC en ratas intoxicadas por Pb y tratadas con DMSA o NAC y reportaron que a pesar de que NAC produjo un incremento en los niveles de glutatión hepático abatidos por el Pb, no redujo los niveles de Pb en sangre, hígado o cerebro.

Por otro lado, Neal y cols.<sup>11</sup> reportaron que la NAC puede llegar a producir una disminución en los niveles de Pb en sangre por lo que se le atribuye cierta capacidad de quelación. En estudios realizados por Pande y cols.<sup>40</sup> se encontró que el tratamiento combinado de DMSA y NAC fue más efectivo en reducir la acumulación de Pb en sangre e hígado que la administración de cada uno por separado.



El interés por la evaluación del efecto de la administración de antioxidantes en la intoxicación por Pb ha hecho que muchos de estos compuestos hayan sido estudiados.<sup>41-43</sup> Al respecto, los resultados obtenidos por diferentes investigadores son contradictorios. Por lo anterior, el rol terapéutico de los antioxidantes en el tratamiento de la intoxicación por Pb aún no ha sido establecido.

De particular interés son los estudios realizados con ácido ascórbico y con metionina. El ácido ascórbico o Vitamina C es un potente antioxidante que ha sido evaluado en humanos y en animales con resultados contradictorios, tanto en lo relacionado a su efecto sobre la toxicocinética del Pb, como a su posible capacidad quelante. Goyer y cols.<sup>44</sup> reportaron que el ácido ascórbico tiene acción quelante y que su potencia es semejante a la producida por el EDTANa<sub>2</sub>Ca. Flora y cols.<sup>45</sup> reportaron que la terapia coadyuvante de Vitamina C en la intoxicación por Pb en ratas, resultó ser efectiva al disminuir el Pb de sangre, hígado y riñón, al formarse un complejo de Pb y Vitamina C.

En otros estudios, se evaluó la efectividad de la Vitamina C administrada en combinación con compuestos quelantes como el EDTANa<sub>2</sub>Ca, el ácido  $\alpha$ -mercapto- $\beta$ -(2-furil) acrílico (MFA) y el DMSA en ratas. En estos estudios se observó que la administración de la combinación del antioxidante con los quelantes fue más efectiva en incrementar la eliminación de Pb que la administración individual.<sup>44,46</sup>

Por otro lado, Lauwerys y cols.<sup>47</sup> reportaron que la administración de Vitamina C a trabajadores expuestos a Pb no produjo ningún efecto benéfico sobre la concentración de

Pb en sangre, su eliminación o sobre los marcadores bioquímicos de la toxicidad de este metal. En investigaciones recientes, se ha reportado que existe una relación inversa entre los niveles de Pb en sangre y la ingesta de Vitamina C tanto en niños como en adultos.<sup>48,49</sup> Además, se ha propuesto que la administración de suplementos con antioxidantes que contengan Vitamina C a trabajadores expuestos a Pb puede resultar benéfico al bloquear el estrés oxidativo generado por la exposición al Pb.<sup>50</sup>

Patra y cols.<sup>51</sup> evaluaron el efecto de alfa tocoferol, ácido ascórbico y L-metionina administrados individualmente y compararon su acción con la del EDTANa<sub>2</sub>Ca. Los resultados de este estudio mostraron que los antioxidantes revirtieron el estrés oxidativo producido por el Pb pero no tuvieron ningún efecto sobre la concentración del metal en hígado, riñón y cerebro.

En el caso de la metionina, éste es un aminoácido esencial que contribuye en la síntesis de GSH, es precursor de cisteína y se ha propuesto que el grupo tiol de su estructura actúa como quelante del Pb en los tejidos.

Kachru y cols.<sup>52</sup> evaluaron y compararon el efecto de la metionina con el del EDTANa<sub>2</sub>Ca y la D-penicilamina y reportaron que la administración de metionina produjo un incremento en la excreción fecal de Pb, y que al ser administrada en combinación con los quelantes incrementó la eficacia de éstos en reducir la carga del metal en hígado y riñón, sin embargo, no tuvo ningún efecto sobre la concentración de Pb en sangre.

Flora y cols.<sup>53</sup> evaluaron el efecto de la combinación de zinc y metionina en el tratamiento de la intoxicación por Pb en ratas y reportaron que esta terapia produjo una disminución de la carga del metal en sangre, hígado y riñón. Esta misma combinación fue evaluada como suplemento durante la terapia de quelación con EDTANa<sub>2</sub>Ca y DMPS y se reportó que la disminución en la carga corporal de Pb fue mayor que la que produjo la administración individual del quelante.<sup>54</sup> Por otro lado, Patra y cols.<sup>51</sup> reportaron que el tratamiento con L-metionina en ratas intoxicadas por Pb no produjo disminución en los niveles de Pb en sangre, hígado, riñón y cerebro.

Recientemente, también se ha incrementado el interés por la evaluación del efecto antioxidante que ejerce la glicina. Este aminoácido que interviene en la síntesis de GSH, tiene un efecto protector contra el daño oxidativo producido por compuestos inductores de daño hepático mediado por generación de estrés oxidativo.<sup>55,56</sup> Por otro lado, Shaikh y cols.<sup>57</sup> reportaron que la administración de glicina en ratas intoxicadas por cadmio evitó el daño hepático y renal al bloquear la lipidoperoxidación producido por este metal.

La mayoría de los estudios realizados a la fecha, en relación al efecto terapéutico de los antioxidantes en la intoxicación por Pb, se han enfocado principalmente a la evaluación del efecto de los mismos sobre parámetros indicativos de estrés oxidativo. Al respecto, también es importante señalar que en la mayoría de esos estudios los antioxidantes han sido administrados de manera individual a grupos de animales intoxicados con Pb y en pocos casos se han hecho comparaciones con grupos que recibieron quelante generalmente el EDTANa<sub>2</sub>Ca o bien con grupos que no recibieron

ninguna terapia de quelación. En este contexto, a pesar de que se ha propuesto que algunos agentes antioxidantes pueden tener acción quelante, este efecto no ha sido demostrado. Por otro lado, no existen reportes en cuanto al efecto que estos antioxidantes pudieran producir sobre parámetros toxicocinéticos como son la distribución y/o redistribución del Pb, particularmente, su movilización de uno de sus principales órganos de depósito que es el hueso.

Por otro lado, la evaluación de un esquema de terapia conjunta (antioxidante y quelante) y del posible efecto sinérgico de los mismos basados en el concepto de dosis (concentración por tiempo), no ha sido realizada a la fecha.

Lo anterior, ha contribuido a la controversia que existe en relación al posible efecto benéfico de los antioxidantes en la intoxicación por Pb, a lo que se puede agregar el hecho de que en los estudios realizados, no se ha evaluado de manera sistemática la acción de los antioxidantes en la intoxicación por este metal mediante una correlación de su efecto sobre los niveles de Pb, tanto en sangre como en órganos blanco y de depósito con los parámetros indicativos de estrés oxidativo e indicadores biológicos de daño. La correlación de dichos parámetros permitirá establecer el efecto de los antioxidantes no sólo sobre la concentración de Pb en sangre, sino sobre la carga corporal del metal así como su impacto en el daño oxidativo producido por el Pb.

Algunos aspectos importantes por determinar en cuanto al efecto de los antioxidantes en la intoxicación por Pb son los siguientes:

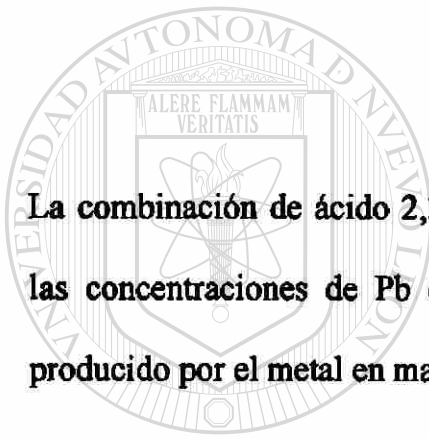
- El posible efecto quelante de los antioxidantes.

- Su efecto sobre la distribución y/o redistribución del Pb (particularmente de hueso).
- La evaluación del posible efecto sinérgico de la terapia combinada (quelante-antioxidante).
- La evaluación de un rango de dosis que permita establecer si estos compuestos tienen o no acción quelante.

En el presente trabajo se evaluó y comparó de manera sistemática el efecto del ácido ascórbico, la L-metionina y la glicina en un esquema de terapia individual y combinada con DMSA en la intoxicación por Pb en ratas. Para la evaluación se consideraron parámetros indicadores de estrés oxidativo (niveles de glutatión y de lipidoperoxidación hepático y renal), niveles de Pb en sangre y órganos blanco de toxicidad (hígado, riñón y cerebro) y de depósito (hueso), así como la actividad de d-ALA.

## **HIPÓTESIS**

**La combinación de ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) y antioxidantes disminuye las concentraciones de Pb en sangre y órganos blanco e inhibe el estrés oxidativo producido por el metal en mayor grado que su administración por separado.**



---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

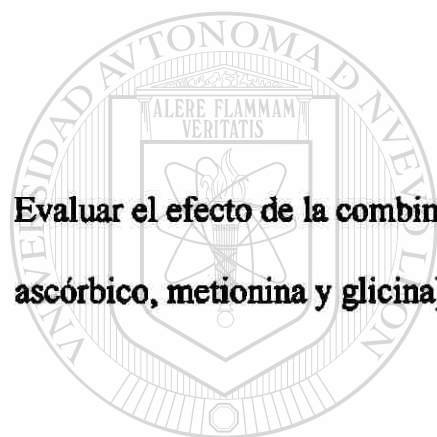


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## **OBJETIVO GENERAL**

**Evaluar el efecto de la combinación de DMSA y sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, metionina y glicina) en un modelo de intoxicación por Pb.**



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer un modelo de intoxicación por Pb en ratas.
2. Evaluar el efecto del tratamiento con DMSA y antioxidantes administrados de forma individual y combinada, sobre la concentración de Pb en ratas intoxicadas con este metal.
3. Evaluar el efecto del tratamiento con DMSA y antioxidantes administrados de forma individual y combinada, sobre la distribución y/o redistribución de Pb en órganos blanco (hígado, cerebro y riñón) y de depósito (hueso).
4. Evaluar el efecto del tratamiento con DMSA y antioxidantes administrados de forma individual y combinada, sobre la actividad de d-ALA en sangre.
5. Evaluar el efecto del tratamiento con DMSA y antioxidantes administrados de forma individual y combinada, sobre los niveles de glutatión y de lipidoperoxidación.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **2.1 Material**

##### **2.1.1 Material Biológico**

###### **2.1.1.1 Animales**

Se utilizaron ratas Wistar machos, con un peso de  $160 \pm 20$  g. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar de laboratorio, con ciclos luz-oscuridad de 12 horas y temperatura de 22°C.

##### **2.1.2 Equipo**

Analizador Hematológico Celldyn 1400

Balanza analítica Mettler Toledo AB204

Balanza granataria Mettler-Toledo PB3002

Centrífuga Beckman Avanti 30

Centrífuga Beckman Spinchron KR

Desionizador de Agua Millipore

Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer. Lámpara de Pb de cátodo hueco. Tubos de grafito pirolítico

Espectrofotómetro UV-Vis Beckman, modelo DU-7500, con arreglo de diodos y controlador de temperatura. Celdas de cuarzo

Homogeneizador Potter-Elvehjem con tubo de vidrio y pistilo de teflón

Horno de Microondas MDS-2000. Vasos para microondas

Potenciómetro Beckman  $\Phi$ 50 pH meter

### 2.1.3 Reactivos y material general

1,1,3,3 tetraetoxipropano Sigma

Ácido  $\delta$  aminolevulínico Sigma

Ácido acético glacial PQM

Ácido etilendiamino tetraacético disódico Sigma

Ácido metafosfórico Sigma

Ácido nítrico Fermont

Ácido perclórico Merck

Ácido tiobarbitúrico Sigma

Ácido tricloroacético Sigma

Agua destilada

Agua tipo I con resistividad de  $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$

Albúmina bovina Sigma

Alcohol butílico Fermont

Argón

Carbonato de sodio Merck

Cloruro de mercurio	Sigma
Cloruro de sodio	Sigma
Controles de Pb en sangre (Material de Referencia)	CONTOX
Disolución espectrofotométrica de Pb	CENAM
DMSA Chemet®	Sanofi-synthelabo
DTNB Reactivo de Ellman	Sigma
Duodecil sulfato de sodio	Sigma
Etanol	Fermont
Folin & Ciocalteu's	Sigma
Fosfato dibásico de amonio	PQM
Fosfato dibásico de potasio	Sigma
Fosfato dibásico de sodio anhidro	Baker
Fosfato monobásico de potasio	Sigma
Fosfato monobásico de sodio monohidratado	Sigma
Glicina	Sigma
Glutación	Sigma
Hidróxido de sodio	PQM
L-ácido ascórbico	Sigma
L-metionina	Sigma
Octal-fenoxi-polietoxietanol (Tritón X-100)	Sigma
Pentobarbital sódico inyectable	Pfizer
Piridina	Fermont
Reactivo de Ehrlich	Sigma

**Sulfato cúprico** Sigma

**Tartrato de sodio y potasio** Sigma

**Tris Base** Sigma

**Matraces volumétricos de diferentes capacidades**

**Pipetas automáticas y puntillas 100-1000  $\mu\text{L}$  y de 1000-5000  $\mu\text{L}$  Eppendorf**

**Pipetas automáticas y puntillas 2-20  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  Oxford**

**Pipetas volumétricas de diferentes capacidades**

**Pipeteador automático**

**Placa de calentamiento con agitador magnético Sigma**

**Sondas**

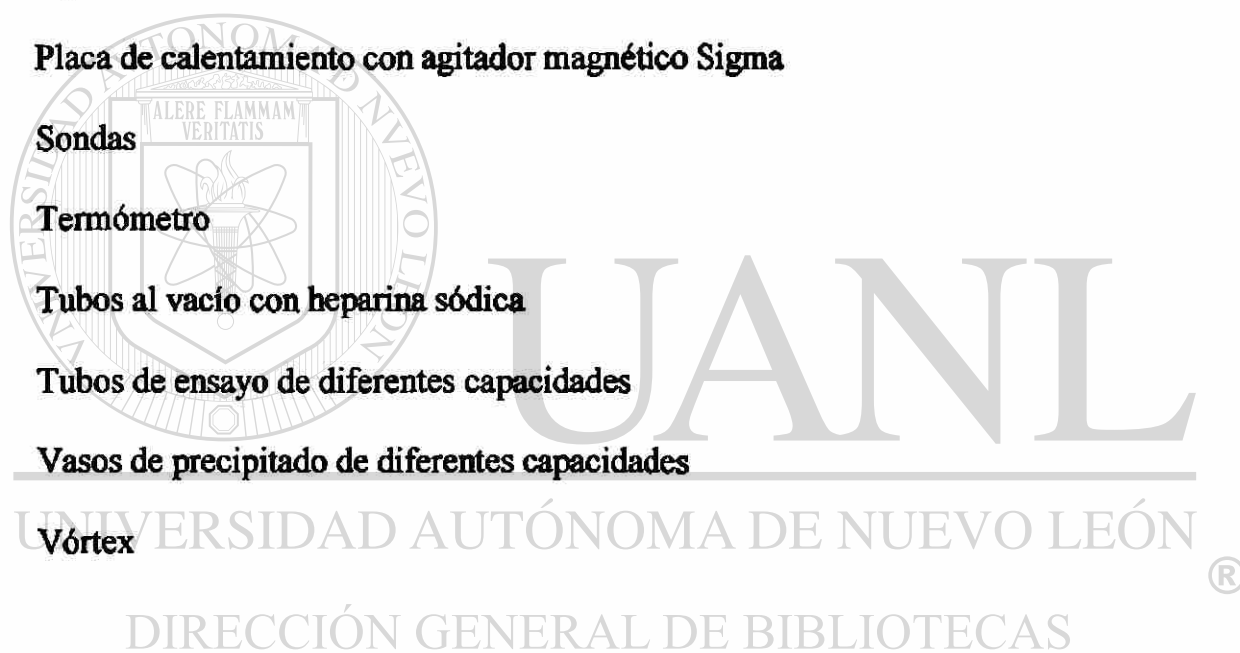
**Termómetro**

**Tubos al vacío con heparina sódica**

**Tubos de ensayo de diferentes capacidades**

**Vasos de precipitado de diferentes capacidades**

**Vórtex**



## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Modelo de intoxicación por plomo en ratas Wistar

Para establecer el modelo de intoxicación por Pb fue necesario realizar un estudio piloto para determinar la dosis, (concentración y tiempo) y la vía de administración a utilizar, para lo cual se evaluó la concentración del metal en sangre y tejidos con diferentes esquemas de administración del Pb.

En el estudio piloto se utilizaron ratas Wistar machos que fueron divididas en grupos con 4 ratas cada uno. Los animales se colocaron en cajas y tuvieron libre acceso a alimento y agua. El grupo 1 recibió una solución de acetato de Pb a una concentración de 3000 ppm que fue administrado *ad libitum* en el agua de beber durante 5 semanas. El grupo 2 recibió 3.5 mg de Pb/kg vía i.p. durante 7 días. Los grupos 3 y 4 recibieron 10 mg de Pb/kg mediante sonda orogástrica durante 4 semanas, administrado a las 11:00 a.m. y a las 7:00 p.m., respectivamente (lo anterior, para establecer la influencia del horario en la distribución del Pb hacia hueso). Al finalizar el periodo de intoxicación, los animales fueron anestesiados con una solución de pentobarbital sódico (33 mg/kg) administrado vía i.p. y se tomaron muestras de sangre mediante punción intracardiaca. La sangre fue colectada en tubos con heparina sódica como anticoagulante. Posteriormente, los animales fueron sacrificados y se extrajeron el hígado, riñón, cerebro y fémur para la determinación de la concentración de Pb y la evaluación de la actividad de la enzima d-ALA.



El esquema seleccionado para este estudio fue el de administración de Pb *ad libitum* con el que se obtuvo la mayor concentración de Pb en hueso. Las ratas fueron expuestas a acetato de Pb (3000 ppm) en el agua de beber durante 5 semanas.

### **2.2.2 Administración del DMSA y antioxidantes**

24 horas después de haber terminado el periodo de exposición al Pb las ratas se pesaron, se identificaron y se dividieron al azar en grupos de 5 para recibir el tratamiento con los antioxidantes y el DMSA administrados individualmente o de manera combinada (antioxidante más quelante).

El grupo control negativo (no expuesto al Pb) recibió el solvente (agua) durante todo el experimento. El grupo control positivo (expuesto al Pb) sólo recibió agua como tratamiento. Los antioxidantes fueron evaluados a una dosis baja (100 mg/kg) y dosis media (500 mg/kg) administrados durante 5 días. Como dosis alta se administraron 1000 mg/kg durante 4 semanas. La dosis de DMSA fue de 182 mg/kg durante 5 días. En el caso de la dosis alta de los antioxidantes, primero se evaluó el efecto de su administración como terapia individual sobre los niveles de Pb en sangre y en caso de que tuvieran acción quelante se procedería a administrar la terapia combinada con el DMSA para evaluar su posible efecto sinérgico.

Los antioxidantes y el DMSA se disolvieron en agua y las soluciones fueron preparadas cada día, previo a su administración. Todos los tratamientos se administraron diariamente por la mañana mediante una sonda orogástrica y en el caso de los grupos que recibieron de manera combinada el quelante y el antioxidante la administración se

realizó con una hora de diferencia entre cada tratamiento. El esquema de los diferentes tratamientos utilizados se muestra en la tabla I.

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis baja (mg/kg)</b>	<b>Dosis media (mg/kg)</b>	<b>Dosis alta (mg/kg)</b>
Agua (control negativo)	3 mL	3 mL	3 mL
Agua (control positivo)	3 mL	3 mL	3 mL
DMSA	182	182	-----
Vitamina C	100	500	1000
L-Metionina	100	500	1000
Glicina	100	500	1000
DMSA + Vitamina C	182 + 100	182 + 500	-----
DMSA + L-Metionina	182 + 100	182 + 500	-----
DMSA + Glicina	182 + 100	182 + 500	-----

**Tabla I.** Esquema de los tratamientos evaluados. Las dosis baja y media se administraron durante 5 días y la dosis alta durante 28 días.

### 2.2.3 Obtención de muestras

24 horas después de concluido el tratamiento, las ratas fueron anestesiadas con una solución de pentobarbital sódico (33 mg/kg) administrado vía i.p. y se tomaron muestras de sangre mediante punción intracardiaca. La sangre fue colectada en tubos al vacío y libres de Pb, con heparina sódica como anticoagulante. Todas las muestras de sangre se

agitaron suavemente por inversión para mezclar con el anticoagulante y se mantuvieron a una temperatura de 4 °C para su conservación.

Posteriormente, las ratas fueron sacrificadas y se extrajeron los siguientes órganos: cerebro, hígado, ambos riñones y fémur derecho. El hígado fue perfundido *in situ* con una solución fría de NaCl 0.9% para eliminar los restos de sangre. El cerebro y los riñones fueron enjuagados con la misma solución para eliminar la sangre. Al fémur se le retiraron los restos de tejido. Los órganos fueron pesados, etiquetados y congelados inmediatamente.

Una parte del hígado y del riñón fue homogeneizada con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.01 M y cloruro de sodio 0.9% a pH 7.4 en una proporción 1:4 (p/v). El homogenado fue alicuotado en tubos eppendorf los cuales se mantuvieron almacenados a una temperatura de -20 °C hasta su utilización.

#### **2.2.4 Determinación de proteínas por el método de Lowry**

La concentración de proteínas fue determinada en alícuotas de homogenizados de hígado y riñón de acuerdo al método de Lowry <sup>58</sup>, donde la cantidad de producto formado depende de la concentración de proteína. Por lo tanto, un incremento de absorbancia a 750 nm es proporcional al incremento en la concentración de proteínas.

##### **2.2.4.1 Solución estándar de albúmina**

Se utilizó una solución estándar de albúmina bovina a una concentración de 100 µg/mL. La albúmina bovina se disolvió en agua destilada.

### 2.2.4.2 Curva de calibración

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de albúmina con un contenido de 12.5 a 100  $\mu\text{g}$  de proteínas. Se utilizó un blanco de agua libre de iones el cual fue procesado bajo las mismas condiciones que los estándares. Las cantidades de los reactivos utilizados se describen en la tabla II. Cada estándar fue preparado por triplicado y el promedio de sus lecturas fue utilizado para graficar la curva de calibración.

Curva de calibración	Solución stock de albúmina (mL)	Agua destilada (mL)	Solución C (mL)	Folin (mL)
Blanco	0	1	5	0.5
1	0.125	0.875	5	0.5
2	0.250	0.750	5	0.5
3	0.5	0.5	5	0.5
4	1	0	5	0.5

**Tabla II.** Concentraciones utilizadas en la curva de calibración para la determinación de proteínas

### 2.2.4.3 Procedimiento

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de la muestra diluida (1:1000) más 5 mL de solución C (Apéndice I) y se agitó en vórtex. Esta muestra se dejó reposar durante 15 min y posteriormente se le adicionaron 0.5 mL del reactivo Folin & Ciocalteu y se agitó nuevamente en vórtex. Después de 20 min se midió la absorbancia de las muestras. Cada muestra fue evaluada por triplicado.

#### **2.2.4.4 Cálculos**

La concentración de proteínas de las muestras fue interpolada de la curva de calibración obtenida al graficar el valor de absorbancia contra la concentración de proteínas de los estándares, los valores obtenidos fueron ajustados con el método de mínimos cuadrados (programa estadístico del espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-7500).

#### **2.2.5 Determinación de los niveles de Pb**

La concentración de Pb en sangre y tejidos fue determinada por Espectrofotometría de Absorción Atómica con horno de grafito, automuestreador automático y corrector de fondo<sup>1</sup>. El método se basa en que a partir de muestras y estándares de concentración conocida, se obtienen átomos de Pb en estado elemental, a través de los cuales se hace pasar un haz de luz de 283.3 nm. La cantidad de luz absorbida es proporcional al número de átomos presentes.

##### **2.2.5.1 Tratamiento de la muestra**

**2.2.5.1.1 Sangre.** Las muestras de sangre no requirieron de digestión previa para la determinación del Pb. Se usó sangre completa con anticoagulante.

**2.2.5.1.2 Tejidos.** Para determinar el contenido de Pb en tejidos se realizó una digestión ácida de los mismos en horno de microondas para eliminar las interferencias biológicas. A las muestras de hígado y riñón se les retiró el tejido parenquimatoso, al fémur se le retiró la médula ósea y para la determinación de Pb, se utilizó la porción correspondiente a la diáfisis. Para realizar la digestión se colocaron 0.5 g de la muestra y

5 mL de ácido nítrico concentrado en un vaso de teflón para el microondas. Los vasos fueron puestos dentro de una camisa de seguridad y se cerraron. Cada vez que se realizó una digestión, se utilizó un vaso especial como controlador de la presión, en el cual se colocó la muestra de mayor tamaño o más reactiva. Los vasos fueron puestos en un carrusel y se conectaron a un sistema de seguridad localizado en el mismo carrusel. El proceso de digestión se realizó en 5 etapas con una potencia del 90% y un tiempo de 15 min para cada etapa. Una vez finalizado el proceso de digestión y cuando la presión y temperatura habían descendido, las muestras se recuperaron, se colocaron en un matraz volumétrico clase A y se aforaron a 10 mL con agua libre de iones (agua tipo I  $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ). En cada serie de digestión se corrió un blanco de reactivos, un tejido blanco y una muestra fortificada (tejido blanco adicionado con una concentración conocida del Pb). Las condiciones de operación del horno de microondas para el proceso de digestión de las diferentes muestras fueron optimizadas en el laboratorio.

Todo el material de vidrio utilizado para la preparación y el análisis de muestras para la determinación de Pb, que se usó más de una vez, se sometió a técnicas especiales de limpieza química con el fin de evitar contaminación por Pb y polvo.

#### **2.2.5.2. Estándares de Pb**

A partir de una solución estándar de Pb ( $1000 \mu\text{g/mL}$ ), se preparó una solución intermedia de  $10 \mu\text{g/mL}$ . Se colocó en un matraz volumétrico 1 mL de solución estándar más 5 mL de ácido nítrico concentrado y se aforó a 100 mL con agua tipo I. Los

estándares para realizar la curva de calibración fueron preparados a partir de la solución intermedia como se indica en la tabla III.

Solución Pb 10 $\mu$ g/mL ( $\mu$ L)	HNO <sub>3</sub> ( $\mu$ L)	Aforar con agua tipo I (mL)	Concentración final de Pb ( $\mu$ g/mL)
Blanco	500	10	0
50	500	10	0.05
100	500	10	0.10
200	500	10	0.20
400	500	10	0.40
600	500	10	0.60
250	500	10	0.25

Tabla III. Concentraciones de Pb empleadas para la realización de la curva de calibración y del estándar de optimización de Pb (0.25  $\mu$ g de Pb /mL).

### 2.2.5.3 Procedimiento

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de Pb con un contenido de 5 a 60  $\mu$ g del metal. Se colocaron en copas de muestreo 100  $\mu$ L del estándar o de la muestra más 900 $\mu$ L de una solución modificadora de matriz biológica que contiene: fosfato dibásico de amonio, tritón X-100 y ácido nítrico concentrado ultrapuro. Se preparó también el estándar de optimización a partir de la solución de 25  $\mu$ g/dL así como, los controles de Pb en sangre con certificado de análisis, los cuales contienen un nivel alto ( $46 \pm 5$   $\mu$ g/dL), medio ( $23 \pm 4$   $\mu$ g/dL), y bajo ( $7 \pm 3$   $\mu$ g/dL) de Pb. Las muestras se homogeneizaron con agitación suave, al mezclar mediante bombeo repetido con la pipeta, utilizando la punta como agitador.



#### **2.2.5.4 Curva de calibración**

Antes de iniciar el análisis fue necesario optimizar la señal del equipo, para lo cual se colocó en el automuestreador una copa de muestreo con un blanco para ajustar el cero del instrumento, enseguida se inyectó el estándar de optimización 25 µg/L para obtener una altura de pico  $\geq 0.18$ . Las muestras fueron sometidas a un tratamiento térmico donde se obtuvieron los átomos de plomo en estado elemental. El análisis de los estándares de calibración se realizó midiendo la absorbancia de cada uno de los niveles de concentración para realizar la curva, el criterio de aceptación para determinar la linealidad de la curva fue un coeficiente de correlación  $r^2 \geq 0.995$ .

Una vez preparada la curva de calibración y aceptada la linealidad de respuesta, se procedió a analizar los controles de Pb en sangre con certificado de análisis. La determinación de Pb en las muestras reales procedió únicamente cuando los valores de los controles estaban dentro del intervalo certificado. Cuando una muestra excedió el intervalo lineal definido de la curva, ésta se analizó nuevamente, realizando la dilución adecuada. Después del análisis de un lote de 20 muestras se hizo una determinación alternada del control certificado bajo, medio y alto de Pb, para comprobar la calidad de los resultados. En caso de que la lectura del control de Pb, estuviera fuera del intervalo certificado se recalibró y se repitieron las lecturas del último lote de muestras.

#### **2.2.5.5 Cálculos**

La concentración de Pb de las muestras fue interpolada de la curva de calibración. Los niveles de Pb en sangre se reportan en µg/dL. Para las muestras a las que se les

realizó digestión ácida, los resultados se reportan en  $\mu\text{g/g}$  de tejido y se consideraron tanto las diluciones realizadas como el peso de la muestra.

### **2.2.6 Determinación de hematocrito**

El valor del hematocrito (HCT) se determinó en un analizador hematológico automatizado a partir del volumen corpuscular medio (MCV) y del número de eritrocitos (RBC) de la muestra de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{HCT} = (\text{RBC} \times \text{MCV}) / 10$$

El HCT se reportó como el porcentaje del paquete de eritrocitos y fue determinado el mismo día en que se colectaron las muestras de sangre.

### **2.2.7 Evaluación de la actividad de d-ALA**

La actividad de d-ALA se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Tomokuni<sup>59</sup>, la cual se basa en la medición espectrofotométrica del porfobilinógeno formado en un medio con exceso de ALA. El porfobilinógeno formado reacciona con el reactivo de Ehrlich y se desarrolla un color que se lee contra un blanco a una longitud de onda de 555 nm. La cantidad de porfobilinógeno formado es proporcional a la actividad de la enzima. La técnica se desarrolló el mismo día en que se obtuvieron las muestras de sangre (la enzima mantiene su actividad por un periodo de 24 horas a 4 °C).

### **2.2.7.1 Hemólisis de la muestra**

La hemólisis fue realizada mediante la adición de 3.25 mL de agua destilada a 0.5 mL de sangre. La muestra se agitó y se incubó a 37 °C por 10 minutos para obtener una hemólisis completa.

### **2.2.7.2 Procedimiento**

Se colocaron en un tubo 0.25 mL de solución amortiguadora de fosfatos a pH de 6.8, con 0.25 mL de ALA 0.02 M y se incubaron a 37 °C por 5 min. Posteriormente, se adicionaron 0.75 mL de la sangre hemolisada y se incubaron nuevamente durante una hora a 37 °C. Después del periodo de incubación, la reacción se detuvo mediante la adición de 0.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% que contiene HgCl<sub>2</sub> 0.1 M, posteriormente, los tubos se centrifugaron por 5 min a 3000 rpm. Finalmente, 0.5 mL del sobrenadante fueron mezclados con 1.5 mL del reactivo de Ehrlich y se agitó en vórtex. Las muestras se dejaron reposar durante 10 min a temperatura ambiente y la absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 555 nm. El blanco se preparó con 0.5 mL de agua destilada y 1.5 mL del reactivo de Ehrlich.

### **2.2.7.3 Cálculos**

La actividad de la enzima se calculó a partir del valor de absorbancia dividido entre el valor del HCT y multiplicado por un factor de 109.4. La actividad de la enzima se reportó en nmol/min/mL de eritrocitos.

## **2.2.8 Determinación de los niveles de GSH**

El GSH fue determinado en homogeneizados de hígado y riñón, mediante el método espectrofotométrico descrito por Ellman (1959)<sup>60</sup>, que se basa en la medición de la absorbancia del complejo formado a 412 nm.

### **2.2.8.1 Solución estándar de GSH**

Se preparó una solución de GSH a una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ . El GSH se disolvió en una solución fría de ácido metafosfórico al 3% y se preparó cada vez que se realizaron las determinaciones ya que es inestable.

### **2.2.8.2 Tratamiento de la muestra**

Se colocaron 500  $\mu\text{L}$  del homogeneizado en tubos para centrifuga y se mantuvieron sobre hielo. Se le agregó a cada tubo 1 mL de solución amortiguadora de solubilización y se agitó en vórtex. Las muestras se dejaron reposar 15 min y se agitó cada 5 min. Posteriormente, se les adicionó 1 mL de TCA al 5% y se agitó en vórtex durante 5 min. La muestra se centrifugó a 6000 rpm a 4°C durante 15 min. El sobrenadante fue utilizado para realizar las mediciones.

### **2.2.8.3 Curva de calibración**

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de GSH con un contenido de 0.5 a 25  $\mu\text{g}$  de GSH. Se utilizó un blanco de agua procesado bajo las mismas condiciones que los estándares. Las cantidades de cada reactivo empleadas para la preparación de la curva de calibración se describen en la tabla IV. Cada estándar

fue preparado por triplicado y el promedio de sus lecturas fue utilizado para graficar la curva de calibración.

Curva de calibración GSH	Sol amortig. de PO <sub>4</sub> 0.05M (mL)	EDTA (μL)	Ácido metafosfórico (μL)	Solución stock de GSH (μL)	DTNB (μL)
Blanco	2.5	800	200	0	30
1	2.5	800	195	5	30
2	2.5	800	190	10	30
3	2.5	800	150	50	30
4	2.5	800	100	100	30
5	2.5	800	0	200	30
6	2.5	800	0	250	30

**Tabla IV.** Concentraciones de GSH empleadas para la realización de la curva de calibración.

#### 2.2.8.4 Procedimiento

A 200 μL del sobrenadante se le agregaron 2.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M más 800 μL de EDTA y 30 μL del reactivo de Ellman (DTNB). Las muestras se agitaron en vórtex durante 20 segundos y la absorbancia de los estándares de la curva de calibración y de las muestras fue leída a 412 nm. Cada muestra fue evaluada por triplicado.

#### 2.2.8.5 Cálculos

La concentración de GSH de las muestras fue interpolada de la curva de calibración obtenida al graficar el valor de absorbancia contra la concentración de GSH de los estándares, los valores fueron ajustados con el método de mínimos cuadrados (programa

estadístico del espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-7500). Los valores de GSH se reportaron en  $\mu\text{g}$  de GSH por mg de proteína.

### **2.2.9 Determinación de los niveles de LPO**

El nivel de LPO en homogeneizados de hígado y riñón se determinó mediante la técnica del ácido tiobarbitúrico descrita por Ohkawa (1978)<sup>61</sup>. La técnica se basa en la lectura espectrofotométrica de la absorbancia del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) a 532 nm.

#### **2.2.9.1 Solución estándar de MDA**

Se preparó una solución del 1,1,3,3 tetraetoxipropano a una concentración de 40 nmol de MDA/mL. Esta solución fue empleada para la preparación de los estándares de la curva de calibración.

#### **2.2.9.2 Curva de calibración**

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de MDA a una concentración de 0.8 a 16 nmoles/mL. Cada punto de la curva se midió por triplicado y el promedio de estos valores fue utilizado para graficar la curva de calibración. Las cantidades de los estándares empleadas para la realización de la curva de calibración se describen en la tabla V.

Curva de calibración	MDA ( $\mu\text{L}$ )	SDS 8.1% ( $\mu\text{L}$ )	Acido acético 20% (mL)	TBA 0.8% (mL)	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )
Blanco	0	200	1.5	1.5	800
1	20	200	1.5	1.5	780
2	50	200	1.5	1.5	750
3	100	200	1.5	1.5	700
4	200	200	1.5	1.5	600
5	400	200	1.5	1.5	400

**Tabla V.** Concentraciones de MDA empleadas para la realización de la curva de calibración.

### 2.2.9.3 Procedimiento

100  $\mu\text{L}$  del homogenizado se colocaron en un tubo de ensayo con tapón de rosca y se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de SDS al 8.1%, 1.5 mL de ácido acético al 20%, 1.5 mL de TBA al 0.8% y 700  $\mu\text{L}$  de agua. Las muestras se colocaron en un baño de agua a 95 °C durante 1 hora. Posteriormente se enfriaron en baño de hielo y se les adicionó 1 mL de agua destilada, enseguida se realizó la extracción del complejo formado, mediante la adición de 5 mL de una mezcla de n-butanol y piridina (15:1 v/v) los tubos se agitaron vigorosamente en un vórtex. Por último, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min. La capa orgánica fue utilizada para medir la absorbancia a 532 nm. Los estándares de la curva de calibración y el blanco fueron procesados bajo las mismas condiciones que las muestras.

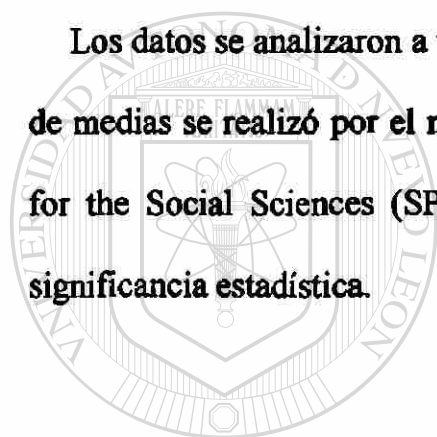


#### 2.2.9.4 Cálculos

La concentración de MDA de las muestras fue interpolada de la curva de calibración obtenida al graficar el valor de absorbancia contra la concentración de MDA de los estándares, los valores fueron ajustados con el método de mínimos cuadrados (programa estadístico del espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-7500). Los valores de LPO se expresaron en nmol de MDA por mg de proteína.

### 2.3 Análisis estadístico

Los datos se analizaron a través de un diseño completamente al azar. La comparación de medias se realizó por el método de *Tukey* mediante el programa: Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Se consideró un valor de  $p < 0.05$  para establecer significancia estadística.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Modelo de intoxicación por Pb en ratas

La administración de Pb *ad libitum* (3000 ppm) en el agua de beber durante 5 semanas produjo un incremento significativo en los niveles de este metal en sangre ( $43.3 \pm 4.5$   $\mu\text{g/dL}$ ) y órganos. El esquema de administración de Pb (3.5 mg/kg) vía intraperitoneal durante 7 días produjo un incremento significativo en su concentración en sangre y órganos. La concentración de Pb en sangre con este esquema fue de  $113 \pm 55.6$   $\mu\text{g/dL}$ . En los esquemas de administración de Pb v.o. en horario matutino y vespertino, no se observó diferencia significativa en los niveles de Pb en sangre y órganos entre los grupos que recibieron el metal en horarios diferentes.

La secuencia de los niveles de Pb en órganos en los tres esquemas evaluados fue: hueso>riñón>hígado>cerebro.

El esquema seleccionado fue el de administración de Pb *ad libitum* con el cual se obtuvo la mayor concentración del metal en hueso. Los niveles de Pb en sangre y órganos de los esquemas evaluados se muestran en la tabla VI.

Grupo	Sangre	Cerebro	Hígado	Riñón	Hueso
control negativo	1.4 ± 0.58	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Pb 3000 ppm ( <i>ad libitum</i> )	43.3 ± 4.5*	1.3 ± 0.1*	2 ± 0.02*	12 ± 1.2*	537 ± 102*
Pb 3.5 mg/kg (i.p.)	113 ± 55.6*	0.5 ± 0.3*	27 ± 7.2*	38 ± 10*	52.9 ± 15*
Pb 10 mg/kg (v.o.) matutino	12.5 ± 3.3*	0.5 ± 0.2*	0.8 ± 0.1*	2.5 ± 0.4*	33 ± 17.7*
Pb 10 mg/kg (v.o.) vespertino	11.3 ± 2.0*	0.4 ± 0.2*	0.9 ± 0.1*	2.8 ± 0.3*	33 ± 8.7*

Tabla VI. Niveles de Pb en sangre ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) y tejidos ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ) en ratas Wistar machos intoxicadas por Pb.  $n = 4$ . \*  $p < 0.05$ .

La actividad de la d-ALA fue inhibida en un 70% en el modelo *ad libitum*, un 75% en el i.p y un 53% en los esquemas de administración v.o. matutino y vespertino. Los valores se muestran en la tabla VII.

Grupo	d-ALA
Control negativo	5.7 ± 0.25
Pb 3000 ppm ( <i>ad libitum</i> )	1.72 ± 0.30*
Pb 3.5 mg/kg (i.p.)	1.45 ± 0.35*
Pb 10 mg/kg (v.o.) matutino	3.1 ± 0.25*
Pb 10 mg/kg (v.o.) vespertino	3.0 ± 0.30*

Tabla VII. Actividad de d-ALA (nmol de PBG/min/ml de eritrocitos). \*  $p < 0.05$ .  $n = 4$

**3.2 Efecto del DMSA y antioxidantes (Vitamina C, metionina y glicina) administrados como terapia individual y combinada sobre los niveles de Pb en sangre.**

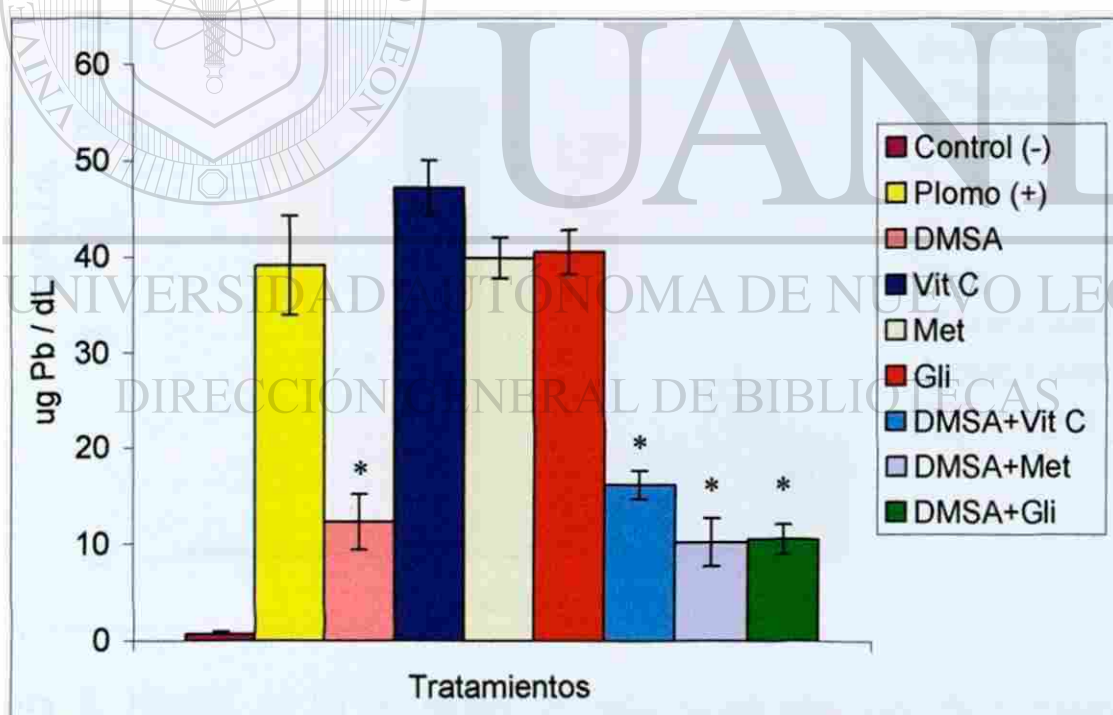
Los niveles de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb durante 5 semanas y tratadas con DMSA y antioxidantes administrados como terapia individual y combinada se muestran en la tabla VIII.

<b>Tratamiento</b>	<b>Pb en sangre Dosis baja <sup>a</sup></b>	<b>Pb en sangre Dosis media <sup>b</sup></b>	<b>Pb en sangre Dosis alta <sup>c</sup></b>
Control (-)	0.65 ± 0.23	0.65 ± 0.23	0.65 ± 0.23
Control Pb (+)	39.2 ± 5.1	39.2 ± 5.1	24.3 ± 3.6
DMSA (182 mg/kg)	12.3 ± 2.9	12.3 ± 2.9	-----
Vitamina C	47.2 ± 2.8	43.4 ± 7.1	22.0 ± 2.9
Metionina	40.0 ± 2.1	42 ± 6.1	19.3 ± 3.0
Glicina	40.5 ± 2.3	39.1 ± 2.1	22.5 ± 1.9
DMSA + Vitamina C	16.2 ± 1.5	10.2 ± 1.6	-----
DMSA + Metionina	10.3 ± 2.5	16.4 ± 3.6	-----
DMSA + Glicina	10.5 ± 1.6	11.3 ± 1.2	-----

**Tabla VIII.** Valores promedio y desviación estándar de la concentración de Pb en sangre ( $\mu\text{g/dL}$ ). a) Dosis baja de antioxidantes (100 mg/kg/5 días). b) Dosis media de antioxidantes (500 mg/kg/5 días). c) Dosis alta de antioxidantes (1000 mg/kg/28 días).

### 3.2.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en sangre.

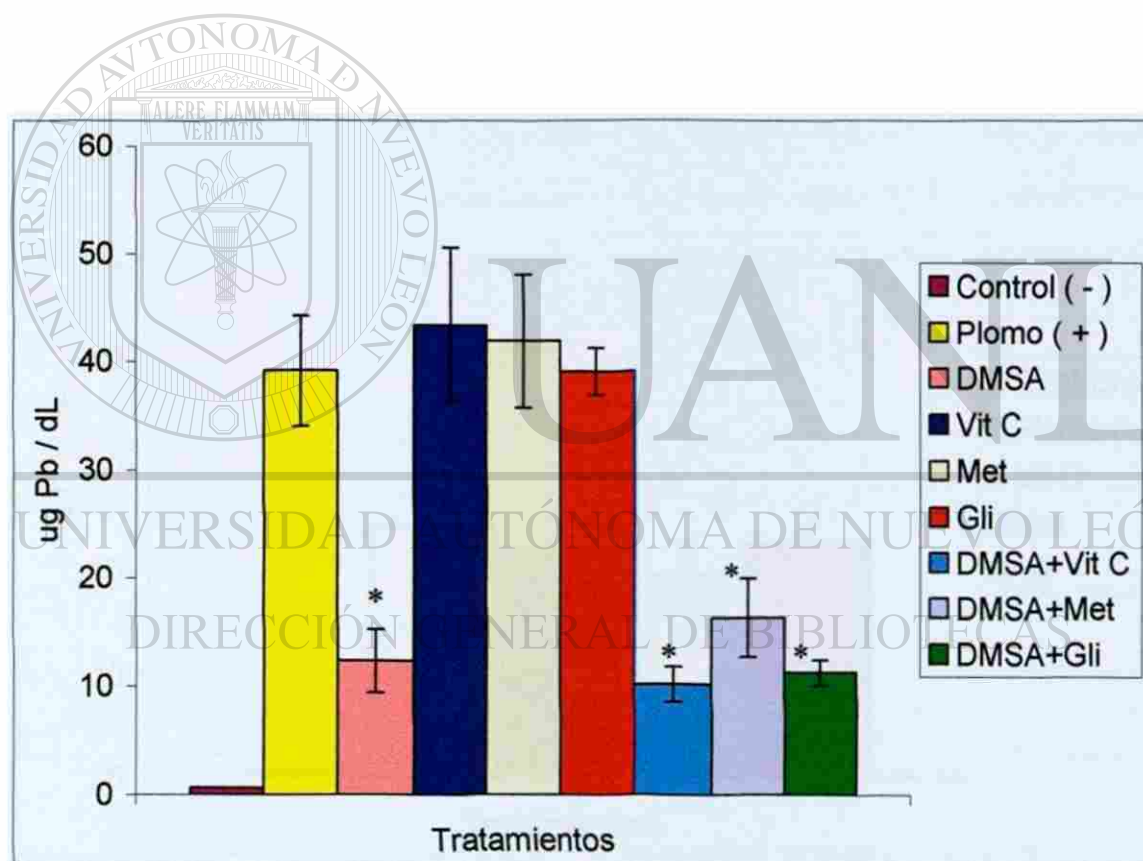
La concentración de Pb en sangre del grupo control positivo el cual fue expuesto a Pb y no recibió tratamiento fue de  $39.2 \pm 5.1 \mu\text{g/dL}$ . La Vitamina C, metionina y glicina administradas como terapia individual a la dosis de 100 mg/kg durante 5 días, no disminuyeron los niveles de Pb en sangre. El DMSA administrado a una dosis de 182 mg/kg durante 5 días produjo una disminución significativa de los niveles de Pb en sangre ( $12.3 \pm 2.9 \mu\text{g/dL}$ ). No se observó diferencia significativa entre los grupos que recibieron terapia combinada de Vitamina C, metionina o glicina con DMSA y el grupo que sólo recibió DMSA. Figura 4.



**Figura 4.** Niveles de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control (+).  $n = 5$

### 3.2.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en sangre.

No se observó diferencia significativa en la concentración de Pb en sangre de los grupos que recibieron el tratamiento con Vitamina C, metionina y glicina administrados como terapia individual a la dosis de 500 mg/kg y el grupo control positivo. Por otro lado, los valores de Pb en sangre de los grupos que recibieron como tratamiento la combinación de cada uno de los antioxidantes con el DMSA no mostraron diferencia significativa con el grupo que sólo recibió DMSA. Figura 5.

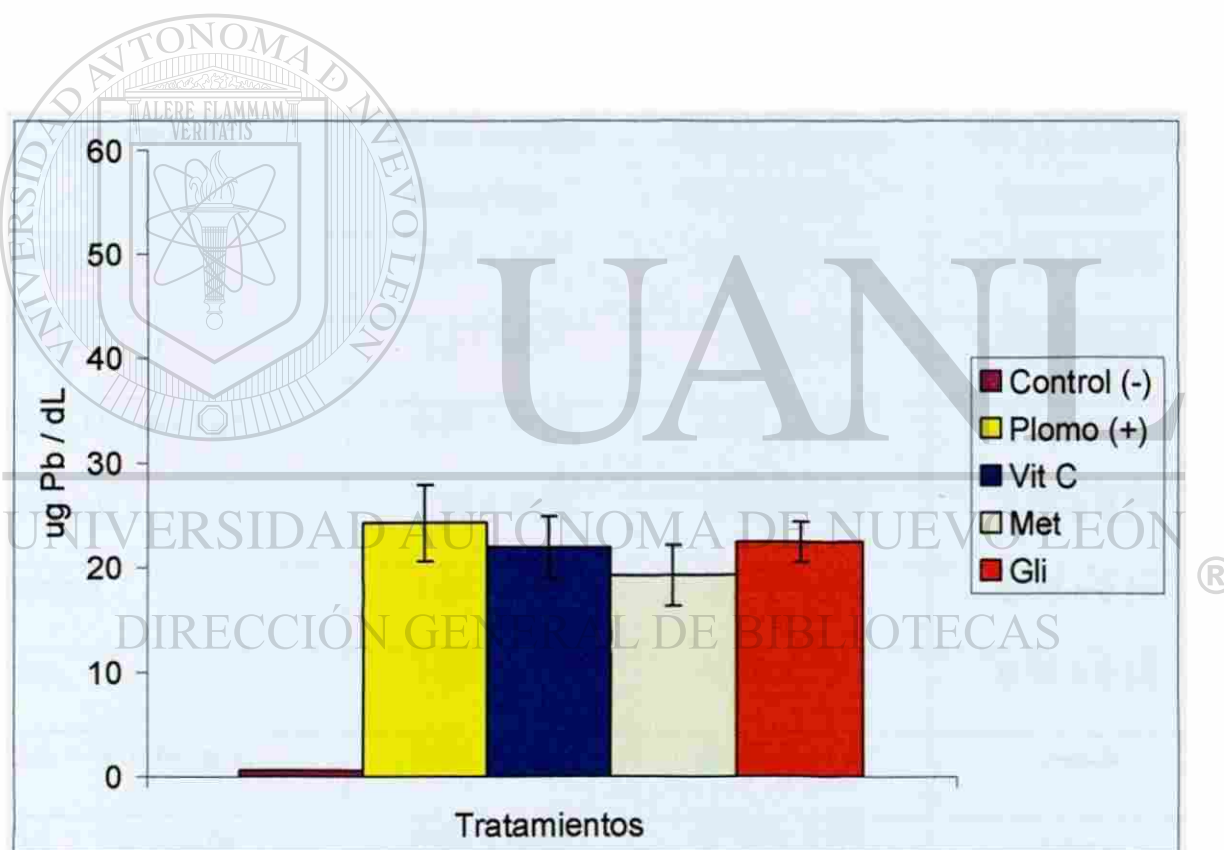


**Figura 5.** Niveles de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control (+).  $n = 5$



### 3.2.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en sangre.

No se observó diferencia significativa entre los valores de Pb en sangre de los grupos que recibieron el tratamiento con Vitamina C, metionina o glicina administrados como terapia individual a la dosis alta (1000 mg/kg) y el grupo control positivo. Figura 6. Por lo anterior no se evaluó la combinación de los antioxidantes a la dosis alta con el DMSA para determinar sinergismo ya que individualmente no produjeron quelación del Pb en sangre.



**Figura 6.** Niveles de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta). n = 5



**3.3 Efecto del DMSA y antioxidantes (Vitamina C, metionina y glicina) administrados como terapia individual y combinada sobre los niveles de Pb en órganos.**

**3.3.1. Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de Pb en cerebro.**

Los niveles de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb durante 5 semanas y tratadas con DMSA y antioxidantes administrados como terapia individual y combinada se muestran en la tabla IX.

<b>Tratamiento</b>	<b>Pb en cerebro Dosis baja <sup>a</sup></b>	<b>Pb en cerebro Dosis media <sup>b</sup></b>	<b>Pb en cerebro Dosis alta <sup>c</sup></b>
Control (-)	0.21 ± 0.05	0.21 ± 0.05	0.21 ± 0.05
Control Pb (+)	1.54 ± 0.3	1.54 ± 0.3	0.90 ± 0.15
DMSA (182 mg/kg)	0.84 ± 0.22	0.84 ± 0.22	-----
Vitamina C	1.77 ± 0.35	1.30 ± 0.33	1.02 ± 0.27
Metionina	1.06 ± 0.25	1.27 ± 0.08	0.90 ± 0.16
Glicina	1.25 ± 0.24	1.41 ± 0.24	0.91 ± 0.18
DMSA + Vitamina C	0.84 ± 0.19	0.84 ± 0.21	-----
DMSA + Metionina	0.62 ± 0.36	0.72 ± 0.19	-----
DMSA + Glicina	0.83 ± 0.14	0.96 ± 0.13	-----

**Tabla IX.** Valores promedio y desviación estándar de la concentración de Pb en cerebro ( $\mu\text{g/g}$  de tejido).  $n = 5$ . a) Dosis baja de antioxidantes (100 mg/kg/5 días). b) Dosis media de antioxidantes (500 mg/kg/5 días). c) Dosis alta de antioxidantes (1000 mg/kg/28 días).

### 3.3.1.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en cerebro.

La concentración de Pb del grupo control positivo fue de  $1.54 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$  de tejido. No se observó diferencia significativa entre los niveles de Pb en cerebro de los grupos que recibieron Vitamina C, metionina o glicina administrados como terapia individual a la dosis de 100 mg/kg (baja) durante 5 días y el grupo control que no recibió tratamiento. El DMSA (182 mg/kg) produjo una disminución significativa de la concentración de Pb en cerebro ( $0.84 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$  de tejido). No se observó diferencia significativa entre el grupo que sólo recibió DMSA y los que fueron tratados con el DMSA combinado con cada uno de los antioxidantes durante 5 días. Figura 7.

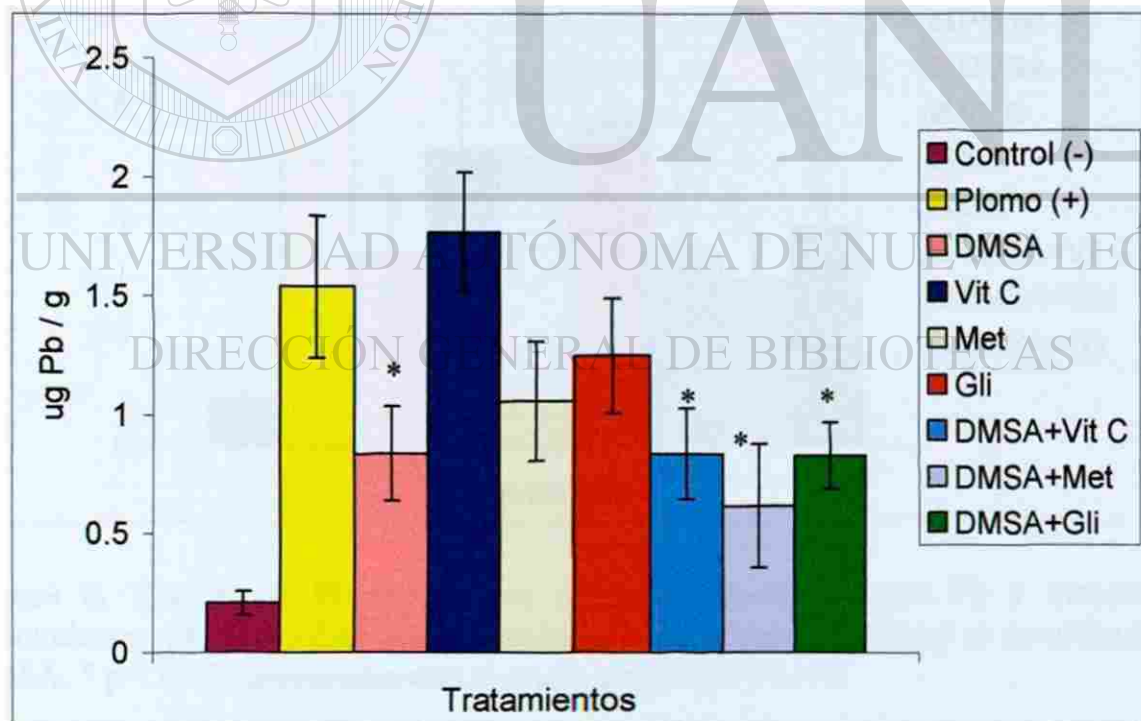
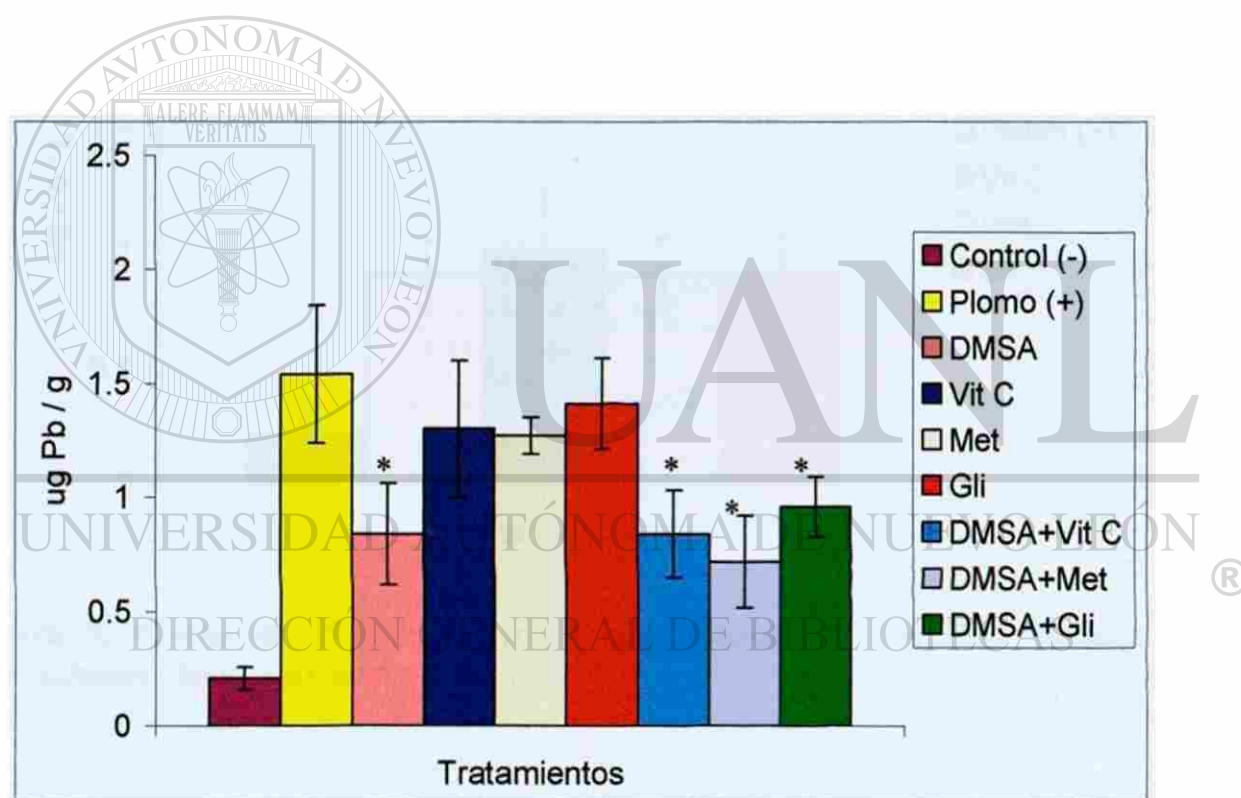


Figura 7. Niveles de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control (+).  $n = 5$

### 3.3.1.2. Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en cerebro.

La Vitamina C, metionina o glicina administradas como terapia individual a la dosis de 500 mg/kg durante 5 días no produjo disminución de los niveles de Pb en cerebro. El DMSA administrado como terapia individual disminuyó significativamente los niveles de Pb en cerebro. No se observó diferencia significativa entre el grupo que recibió DMSA y los que recibieron DMSA combinado con cada uno de los antioxidantes a la dosis media.

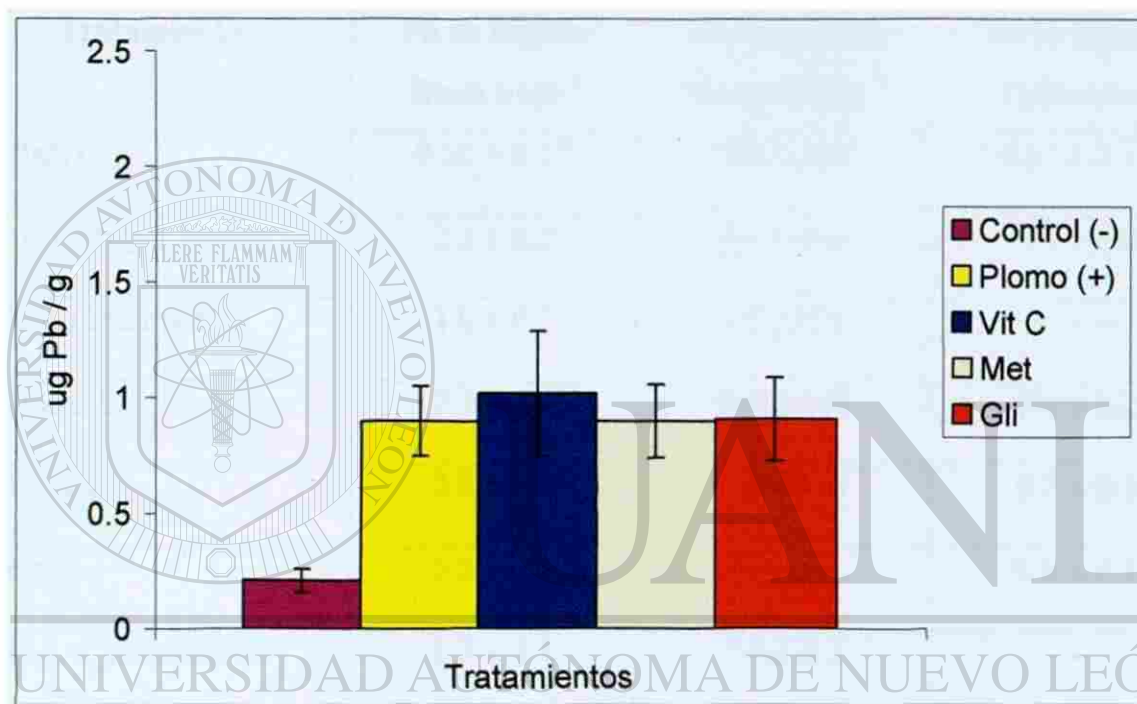
Figura 8.



**Figura 8.** Niveles de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control (+).  $n = 5$

### 3.3.1.3. Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en cerebro.

La administración de Vitamina C, metionina o glicina a la dosis de 1000 mg/kg durante 28 días no produjo disminución de los niveles de Pb en cerebro en relación al grupo control positivo. Figura 9.



**Figura 9.** Niveles de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta). n= 5

### 3.3.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de Pb en hígado.

Los niveles de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb durante 5 semanas y tratadas con DMSA y antioxidantes administrados como terapia individual y combinada se muestran en la tabla X.

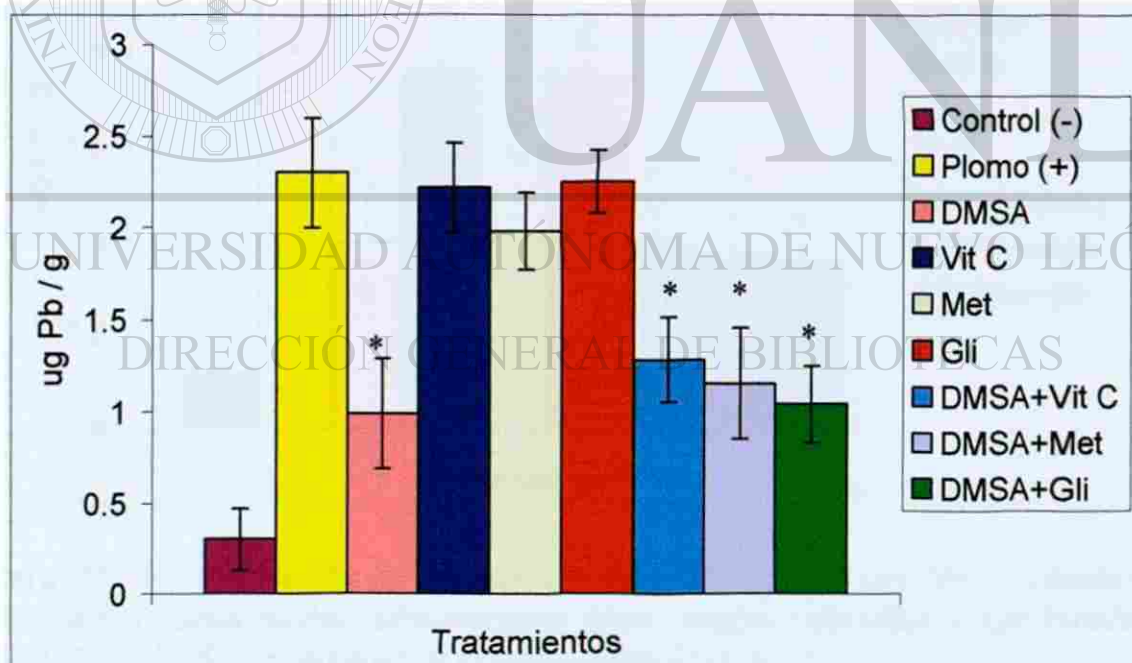
Tratamiento	Pb en hígado Dosis baja <sup>a</sup>	Pb en hígado Dosis media <sup>b</sup>	Pb en hígado Dosis alta <sup>c</sup>
Control (-)	0.50 ± 0.17	0.50 ± 0.17	0.50 ± 0.17
Control Pb (+)	2.3 ± 0.3	2.3 ± 0.3	1.0 ± 0.2
DMSA (182 mg/kg)	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	-----
Vitamina C	2.2 ± 0.2	1.9 ± 0.5	0.9 ± 0.2
Metionina	2.0 ± 0.2	1.7 ± 0.5	0.7 ± 0.1
Glicina	2.2 ± 0.2	1.9 ± 0.3	0.8 ± 0.4
DMSA + Vitamina C	1.3 ± 0.4	1.0 ± 0.2	-----
DMSA + Metionina	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.3	-----
DMSA + Glicina	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	-----

**Tabla X.** Valores promedio y desviación estándar de la concentración de Pb en hígado ( $\mu\text{g/g}$  de tejido). n = 5. a) Dosis baja de antioxidantes (100 mg/kg/5 días). b) Dosis media de antioxidantes (500 mg/kg/5 días). c) Dosis alta de antioxidantes (1000 mg/kg/28 días).



### 3.3.2.1. Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en hígado.

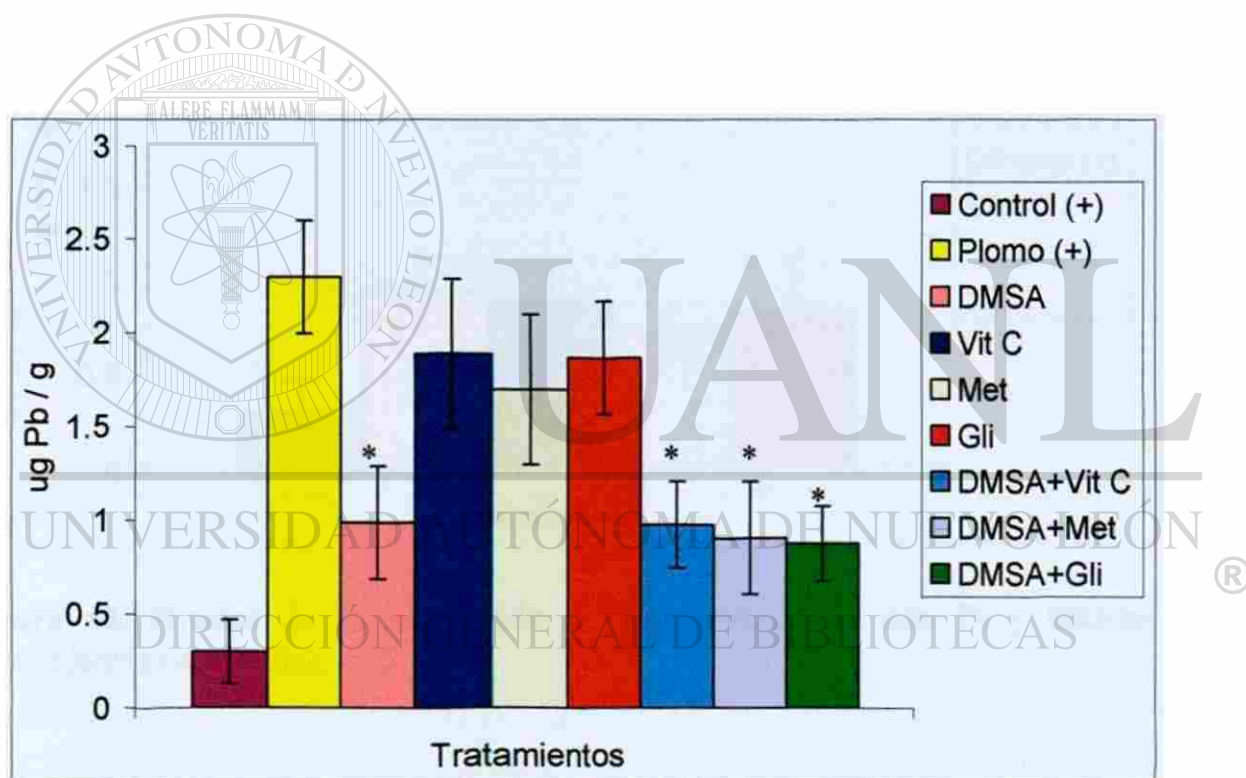
La concentración de Pb en hígado del grupo control positivo fue de  $2.3 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$  de tejido. No se observó diferencia significativa en los niveles de Pb en este órgano entre los grupos que recibieron Vitamina C, metionina o glicina administrados como terapia individual a la dosis de 100 mg/kg (baja) durante 5 días y el grupo control que no recibió tratamiento. El DMSA administrado como terapia individual produjo una disminución significativa de los niveles de Pb en hígado ( $1.0 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$  de tejido). No se observó diferencia significativa entre el grupo que sólo recibió DMSA y los que recibieron DMSA combinado con cada uno de los antioxidantes. Figura 10.



**Figura 10.** Niveles de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control (+).  $n = 5$

### 3.3.2.2. Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en hígado.

La administración de Vitamina C, metionina o glicina como terapia individual a la dosis de 500 mg/kg durante 5 días no produjo disminución en los niveles de Pb en hígado. Por otra parte, en el grupo tratado con DMSA se observó una disminución significativa de los niveles de Pb en este órgano. No se observó diferencia significativa entre los grupos que recibieron terapia individual con DMSA y los que recibieron DMSA combinado con cada uno de los antioxidantes. Figura 11.



**Figura 11.** Niveles de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control (+).  $n = 5$

### 3.3.2.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en hígado.

La administración de Vitamina C, metionina o glicina a la dosis de 1000 mg/kg no produjo disminución de los niveles de Pb en hígado en relación con el grupo control que sólo recibió agua. Figura 12.

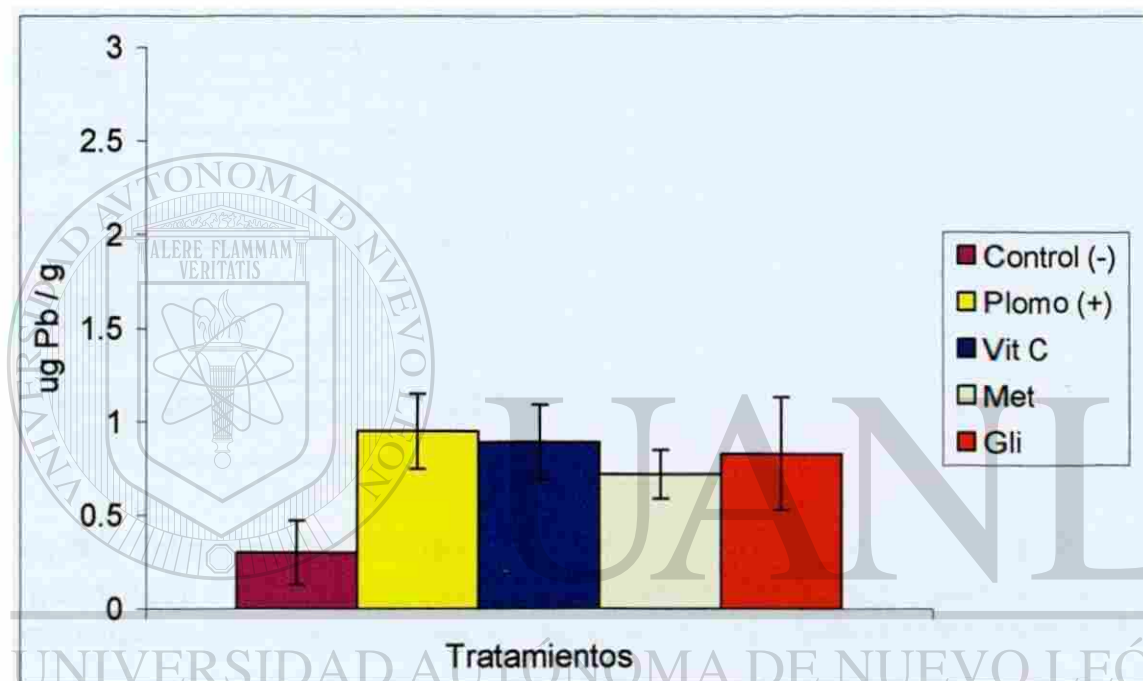


Figura 12. Niveles de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta). n= 5

### 3.3.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de Pb en riñón.

Los niveles de Pb en riñón de ratas intoxicadas por Pb durante 5 semanas y tratadas con DMSA y antioxidantes administrados como terapia individual y combinada se muestran en la tabla XI.



Tratamiento	Pb en riñón Dosis baja <sup>a</sup>	Pb en riñón Dosis media <sup>b</sup>	Pb en riñón Dosis alta <sup>c</sup>
Control (-)	0.20 ± 0.05	0.20 ± 0.05	0.20 ± 0.05
Control Pb (+)	10.9 ± 2.7	10.9 ± 2.7	6.7 ± 1.4
DMSA (182 mg/kg)	2.7 ± 1.4	2.7 ± 1.4	-----
Vitamina C	12.3 ± 1.0	11.4 ± 2.7	7.7 ± 2.5
Metionina	9.6 ± 1.6	9.4 ± 1.0	7.4 ± 1.4
Glicina	10.1 ± 1.3	9.1 ± 1.4	5.9 ± 1.7
DMSA + Vitamina C	2.9 ± 0.5	4.4 ± 0.5	-----
DMSA + Metionina	2.1 ± 0.5	3.9 ± 3.2	-----
DMSA + Glicina	2.2 ± 0.5	3.2 ± 1.0	-----

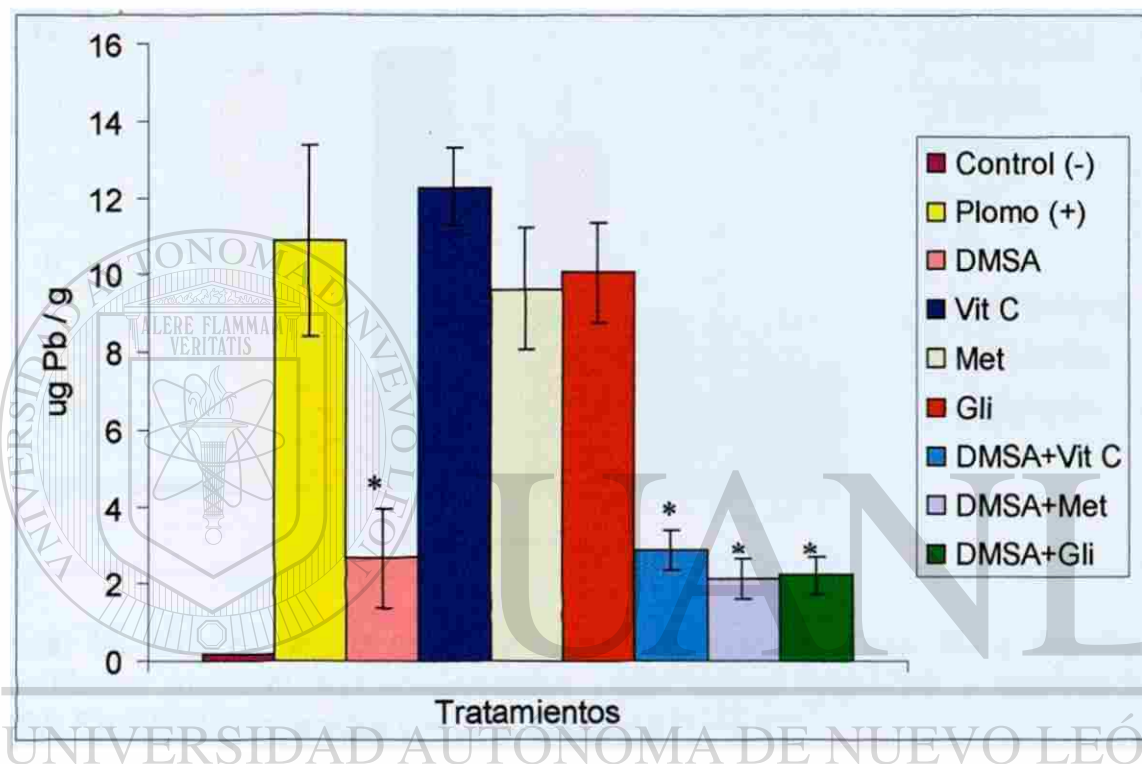
**Tabla XI.** Valores promedio y desviación estándar de la concentración de Pb en riñón ( $\mu\text{g/g}$  de tejido).  $n = 5$ . a) Dosis baja de antioxidantes (100 mg/kg/5 días). b) Dosis media de antioxidantes (500 mg/kg/5 días). c) Dosis alta de antioxidantes (1000 mg/kg/28 días).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 3.3.3.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en riñón.

Los niveles de Pb en el riñón del grupo control positivo fueron de  $10.9 \pm 2.7 \mu\text{g/g}$  de tejido. La Vitamina C, metionina o glicina (100 mg/kg) administrados como terapia individual no produjeron disminución en los niveles de Pb en este órgano. En el grupo

que recibió DMSA como terapia individual se observó una disminución significativa de los niveles de Pb en riñón ( $2.7 \pm 1.4 \mu\text{g/g}$  de tejido). No se observó diferencia significativa entre el grupo que recibió el DMSA como terapia individual y los grupos que recibieron DMSA combinado con cada uno de los antioxidantes. Figura 13.



**Figura 13.** Niveles de Pb en riñón de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control (+).  $n = 5$

### 3.3.3.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en riñón.

El tratamiento con Vitamina C, metionina o glicina administrados individualmente a la dosis de 500 mg/kg durante 5 días no produjo disminución de los niveles de Pb en riñón.

El DMSA disminuyó significativamente los niveles de Pb en riñón. No se observó

diferencia significativa entre el grupo que recibió DMSA y los que recibieron DMSA combinado con cada uno de los antioxidantes a la dosis media. Figura 14.

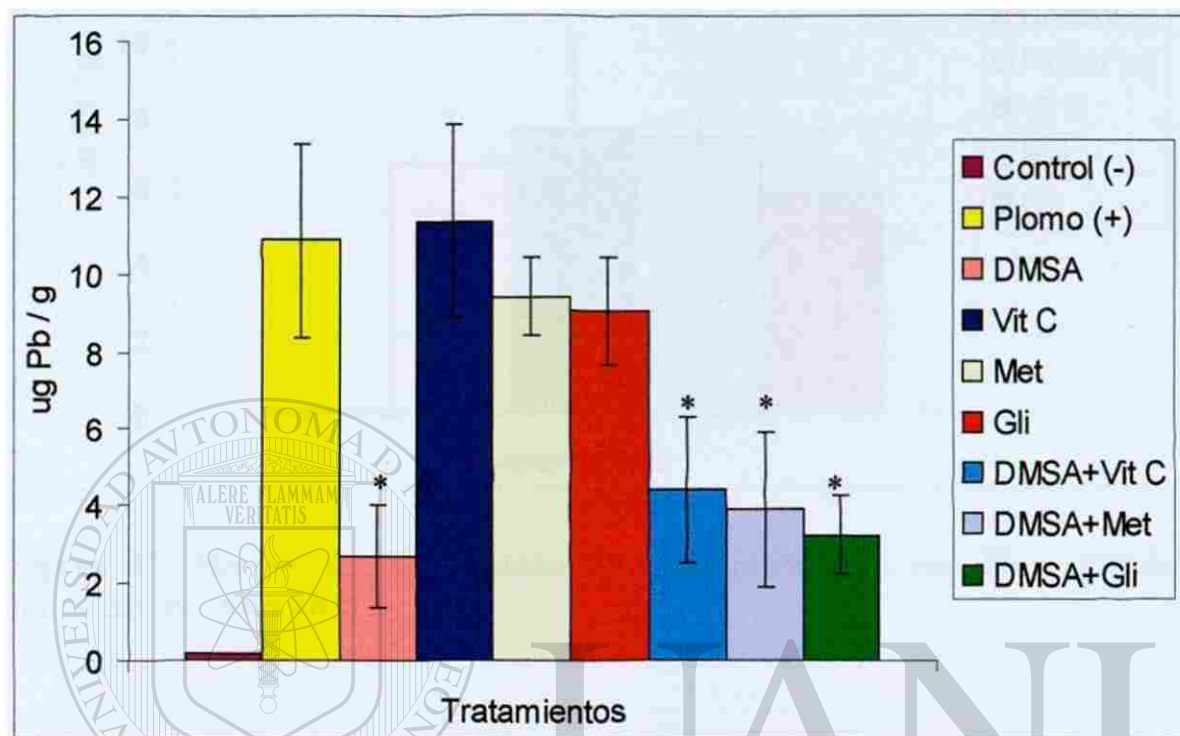
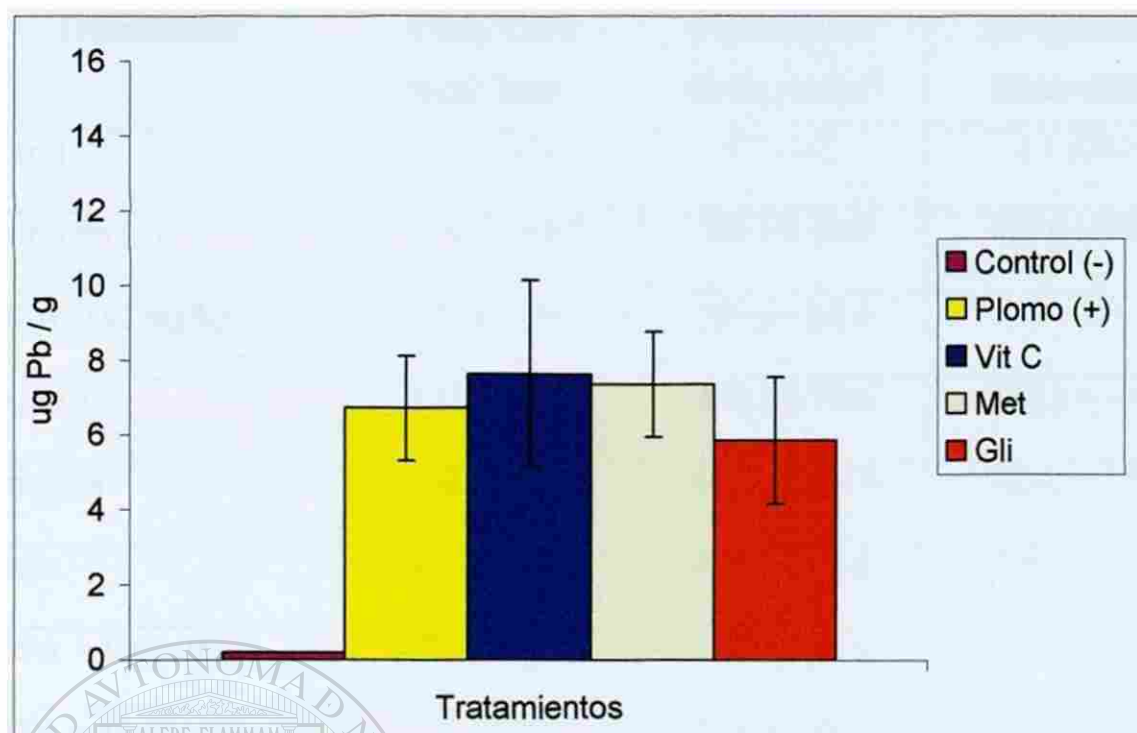


Figura 14. Niveles de Pb en riñón de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control (+)  $n = 5$

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 3.3.3.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en riñón.

La Vitamina C, metionina o glicina administradas a la dosis alta como terapia individual no disminuyeron la concentración de Pb en riñón en relación al grupo control positivo. Figura 15.



**Figura 15.** Niveles de Pb en riñón de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta). n= 5

### 3.3.4 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de Pb en hueso.

Los niveles de Pb en hueso de ratas intoxicadas por Pb durante 5 semanas y tratadas con DMSA y antioxidantes administrados como terapia individual y combinada se muestran en la tabla XII.

Tratamiento	Pb en hueso Dosis baja <sup>a</sup>	Pb en hueso Dosis media <sup>b</sup>	Pb en hueso Dosis alta <sup>c</sup>
Control (-)	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3
Control Pb (+)	514.5 ± 69.0	514.5 ± 69.0	407.4 ± 31.2
DMSA (182 mg/kg)	373.4 ± 54.3	373.4 ± 54.3	-----
Vitamina C	514.0 ± 40.8	498.2 ± 79.4	293.2 ± 30.5
Metionina	506.8 ± 13.1	432.2 ± 100.4	320.3 ± 37.0
Glicina	499.9 ± 16.3	446.9 ± 42.8	306.9 ± 35.5
DMSA + Vitamina C	406.0 ± 33.6	388.4 ± 48.3	-----
DMSA + Metionina	408.8 ± 35.0	357.5 ± 45.1	-----
DMSA + Glicina	399.0 ± 34.2	358.6 ± 28.2	-----

**Tabla XII.** Valores promedio y desviación estándar de la concentración de Pb en hueso ( $\mu\text{g/g}$  de tejido).  $n = 5$ . a) Dosis baja de antioxidantes (100 mg/kg/5 días). b) Dosis media de antioxidantes (500 mg/kg/5 días). c) Dosis alta de antioxidantes (1000 mg/kg/28 días).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

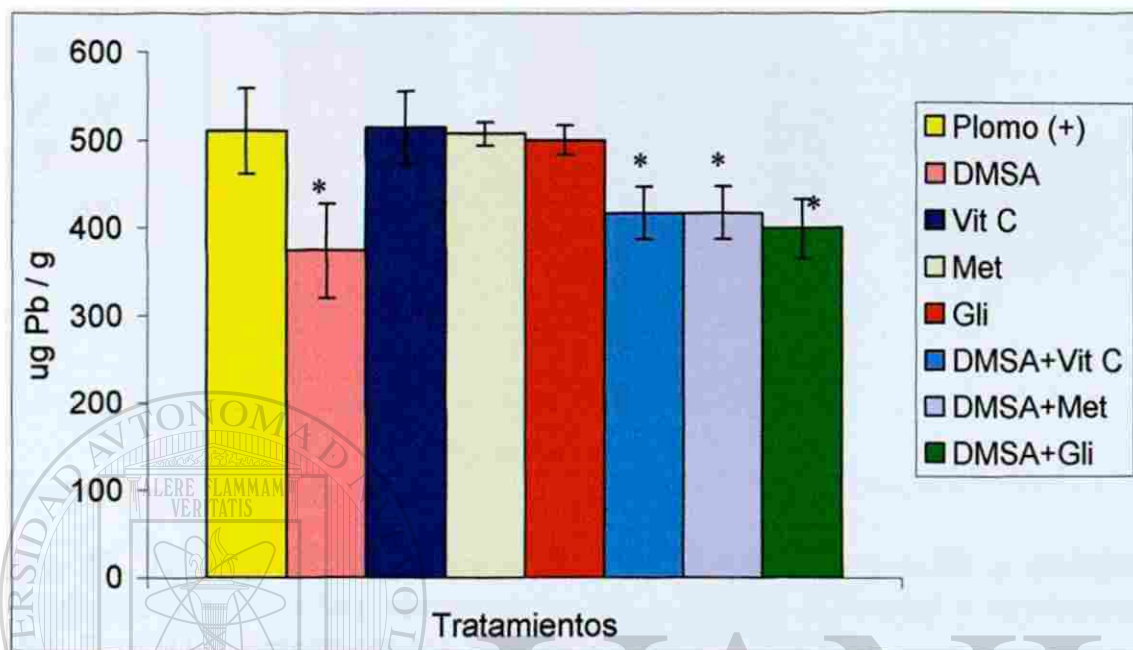
®

### 3.3.4.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en hueso.

El nivel de Pb en hueso del grupo control positivo fue de  $514.5 \pm 69.0 \mu\text{g/g}$  de tejido. La administración de Vitamina C, metionina o glicina a la dosis de 100 mg/kg durante 5 días no produjo disminución de los niveles de Pb en hueso. Sin embargo, esos niveles disminuyeron significativamente en el grupo que recibió el DMSA como terapia individual. No se observó diferencia significativa entre los grupos que recibieron terapia



combinada de DMSA con Vitamina C, metionina o glicina y el grupo que sólo recibió DMSA. Figura 16.



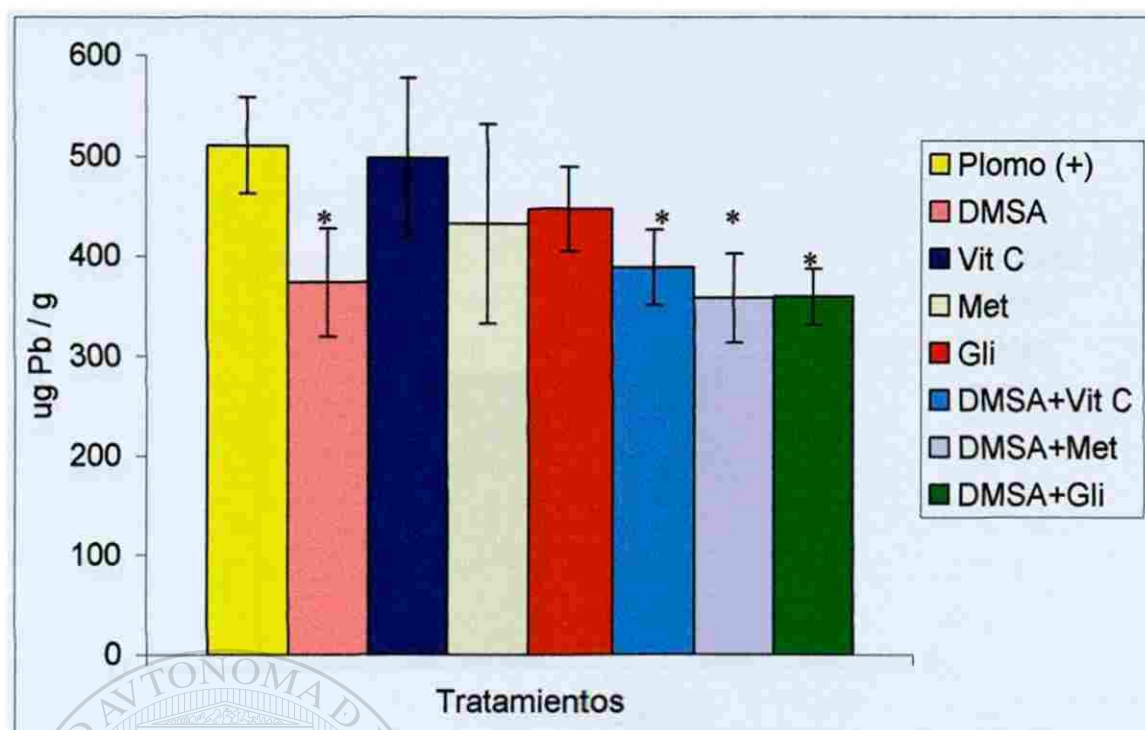
**Figura 16.** Niveles de Pb en hueso de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control (+).  $n = 5$

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

### 3.3.4.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en hueso.

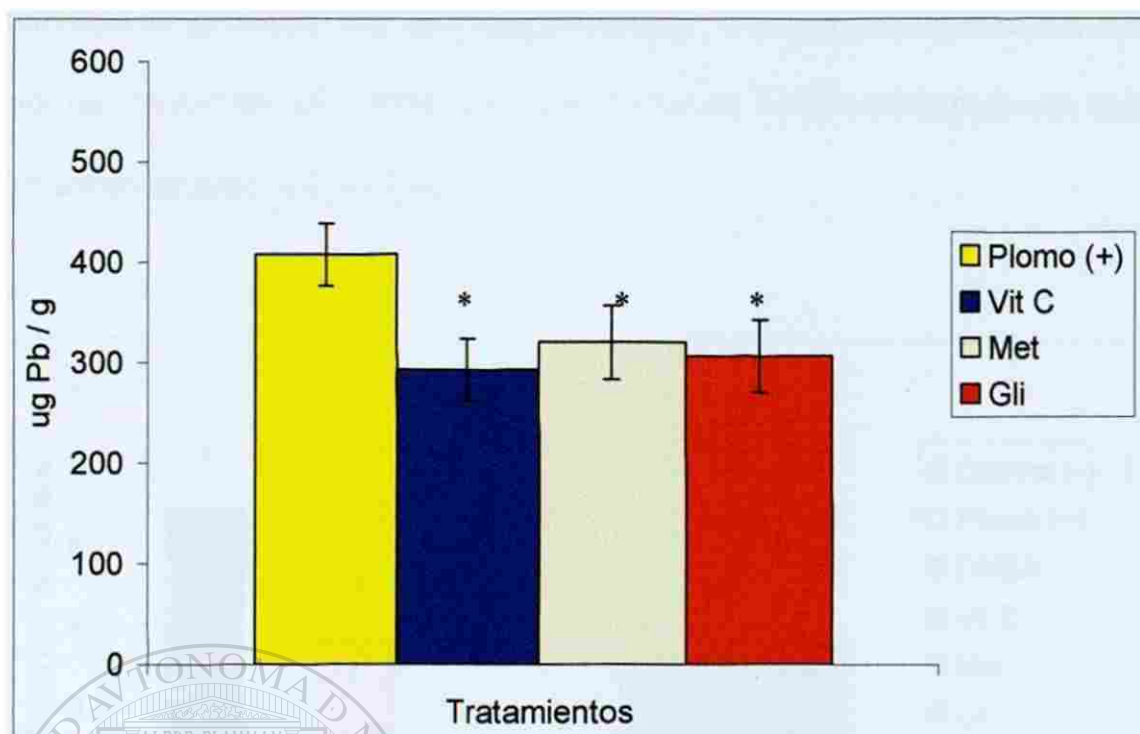
La Vitamina C, metionina o glicina administradas como terapia individual a la dosis de 500 mg/kg no disminuyeron los niveles de Pb en hueso en relación al grupo control. No se observó diferencia significativa entre los valores de Pb en hueso del grupo que recibió DMSA y los grupos que recibieron DMSA combinado con cada uno de los antioxidantes. Figura 17.



**Figura 17.** Niveles de Pb en hueso de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual y combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control (+).  $n = 5$

### 3.3.4.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en hueso.

La administración de Vitamina C, metionina o glicina a la dosis de 1000 mg/kg durante 28 días produjo una disminución significativa de los niveles de Pb en hueso en relación al grupo control que sólo recibió agua. Los niveles de Pb en hueso del grupo control positivo fueron de  $407.4 \pm 31.2 \mu\text{g}$  de Pb/g de tejido contra  $293.2 \pm 30.5 \mu\text{g}$  de Pb/g de tejido del grupo tratado con Vitamina C,  $320.3 \pm 37 \mu\text{g}$  de Pb/g de tejido del grupo tratado con metionina y  $306.9 \pm 35.5 \mu\text{g}$  de Pb/g de tejido del grupo tratado con glicina. Figura 18.



**Figura 18.** Niveles de Pb en hueso de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta). \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control (+).  $n = 5$

### 3.4 Efecto del DMSA y antioxidantes (Vitamina C, metionina y glicina)

administrados como terapia individual y combinada sobre la actividad de la enzima d-ALA en sangre.

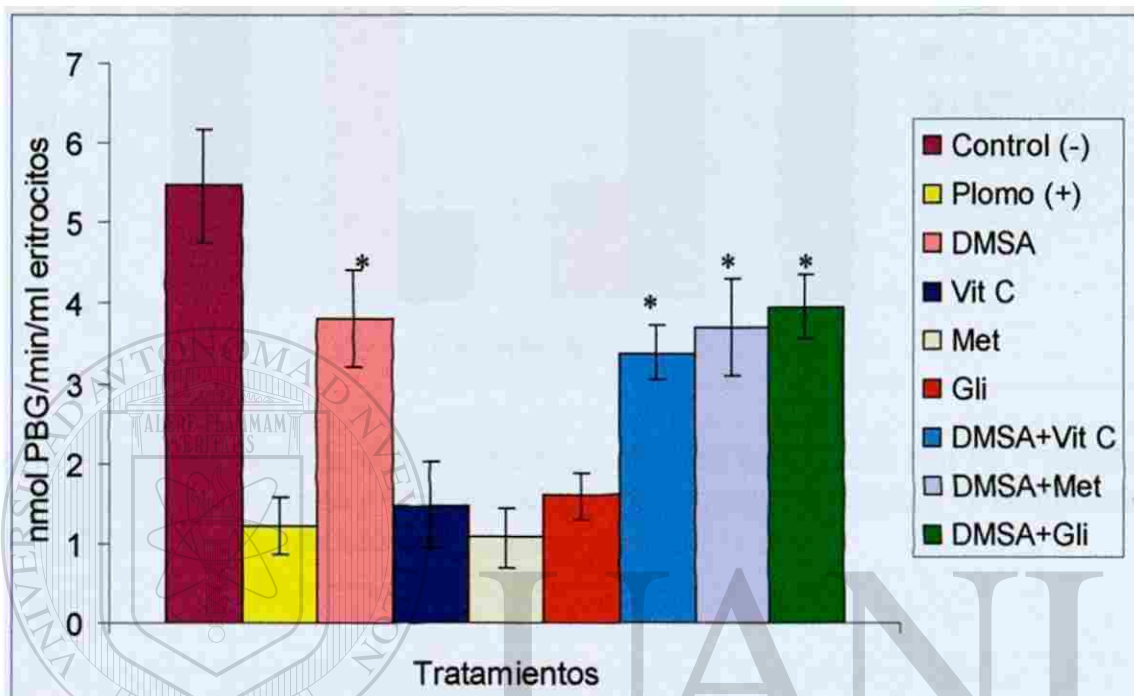
#### 3.4.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja)

sobre la actividad de la enzima d-ALA en sangre.

En la figura 19 se muestra la actividad de d-ALA del grupo control negativo, no expuesto al Pb, el cual tuvo un valor de  $5.47 \pm 0.71$  nmol de PBG/min/ml de eritrocitos. En el grupo expuesto al Pb se observó una inhibición de la actividad enzimática ( $1.22 \pm 0.35$  nmol de PBG/min/ml de eritrocitos). El tratamiento con el DMSA revirtió la inhibición de la enzima en un 85% mientras que en los grupos que recibieron Vitamina C, metionina y glicina a la dosis de 100 mg/kg durante 5 días no se observó reactivación de



la actividad de la enzima. Por otro lado no se observó diferencia significativa entre los grupos que recibieron sólo DMSA y los que recibieron DMSA combinado con cada uno de los antioxidantes a la dosis baja.

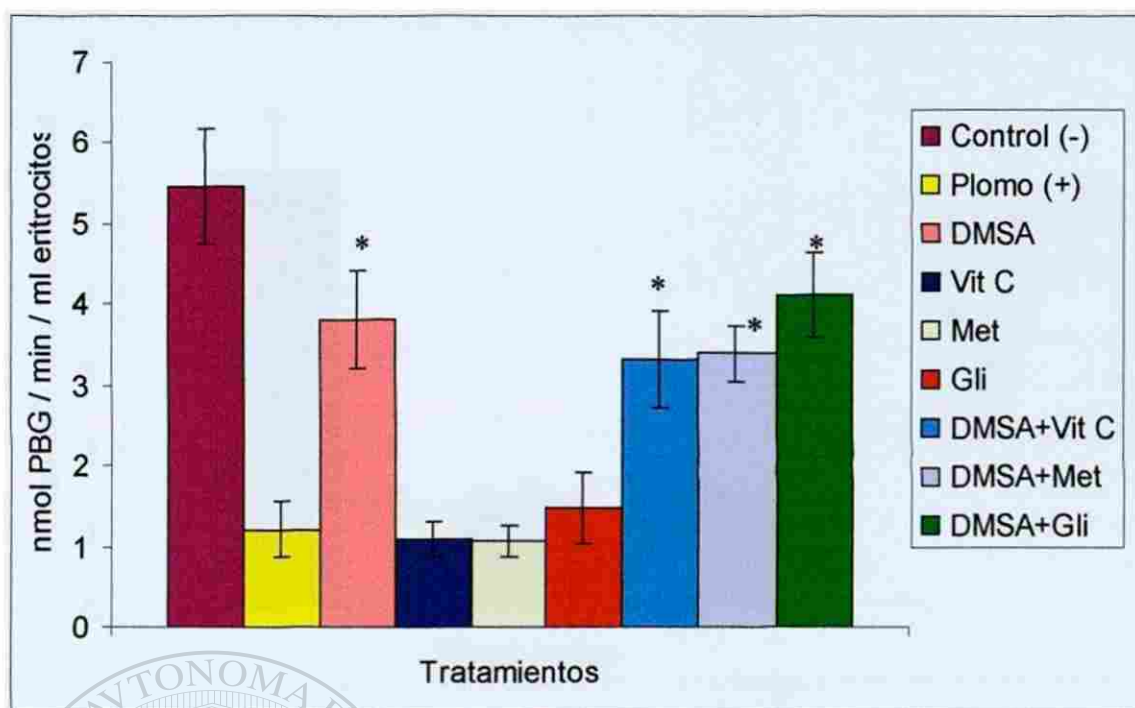


**Figura 19.** Actividad de la d-ALA en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control (+).  $n = 5$

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 3.4.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre la actividad de la enzima d-ALA en sangre.

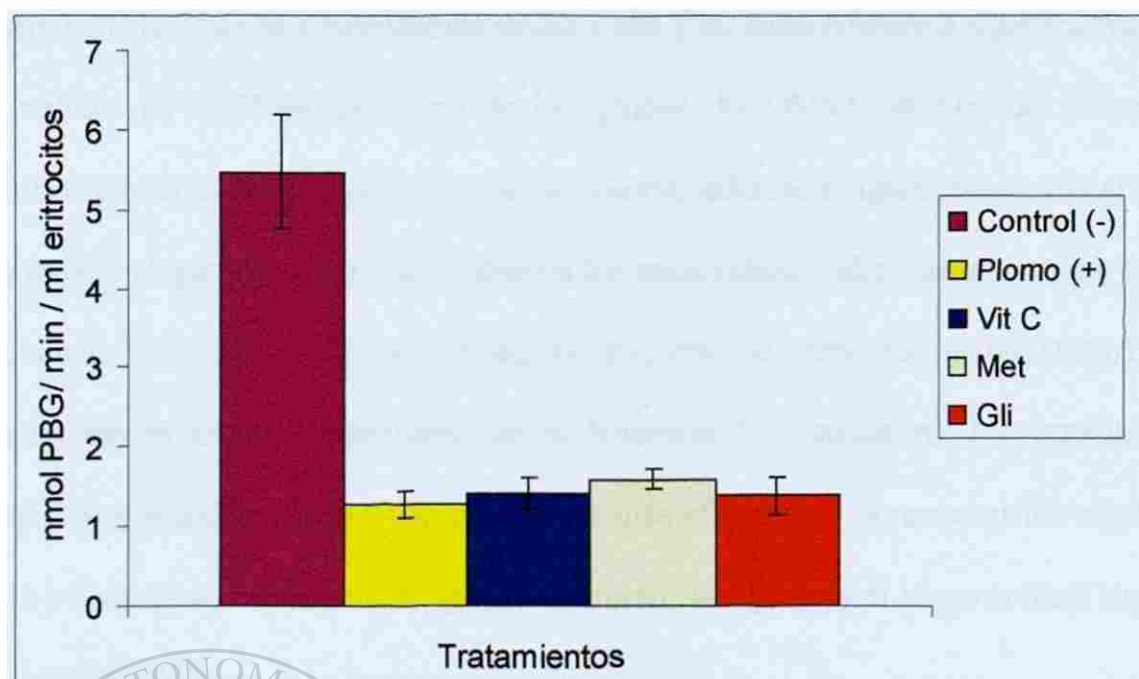
La Vitamina C, metionina o glicina administrados a la dosis de 500 mg/kg durante 5 días no produjeron reactivación de la d-ALA. Por otro lado, no se observó diferencia significativa entre los grupos que recibieron DMSA y los que recibieron DMSA combinado con cada uno de los antioxidantes. Figura 20.



**Figura 20.** Actividad de la d-ALA en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control (+).  $n = 5$

### 3.4.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre la actividad de la enzima d-ALA en sangre.

En la figura 21 se muestra la actividad de d-ALA en los grupos que fueron tratados con antioxidantes a la dosis alta. Ninguno de los antioxidantes produjo reactivación de la enzima. No hubo diferencia significativa entre estos grupos y el grupo intoxicado por plomo y que sólo recibió agua.



**Figura 21.** Actividad de la d-ALA en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta). n = 5

### **3.5 Efecto de los antioxidantes (Vitamina C, metionina y glicina) administrados como terapia individual o combinada sobre los parámetros de estrés oxidativo.**

#### **Niveles de GSH y de LPO hepático y renal.**

El esquema de intoxicación por Pb produjo una disminución significativa en los niveles de GSH en hígado y en riñón y un aumento en los niveles de LPO hepático y renal.

#### **3.5.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de GSH en hígado.**

En la tabla XIII se muestran los niveles de GSH en homogeneizados de hígado de ratas expuestas a Pb. La Vitamina C, metionina y glicina a la dosis de 100 mg/kg restituyeron los niveles de GSH abatidos por la exposición a Pb. El mismo efecto se

observó con la dosis de antioxidantes media y alta y no hubo diferencia significativa entre los valores de GSH en cada uno de los grupos. El DMSA produjo un incremento significativo en los niveles de GSH y no se observó diferencia significativa entre el grupo que recibió el quelante y los que recibieron los antioxidantes administrados como terapia individual. No se observó diferencia significativa entre el grupo que recibió DMSA y los que recibieron DMSA combinado con la Vitamina C o metionina. Por otro lado, la terapia combinada de DMSA con glicina fue más efectiva en incrementar los niveles de GSH y no se observó diferencia significativa entre este grupo y el grupo control negativo no expuesto al Pb.

Tratamientos	GSH (Hígado)
Control (-)	7.91 ± 0.35
Control Pb (+)	1.71 ± 0.30
DMSA (182 mg/kg)	5.54 ± 0.62*
Vit C (100 mg/kg)	5.35 ± 0.54*
Metionina (100 mg/kg)	5.20 ± 0.21*
Glicina (100 mg/kg)	5.04 ± 0.18*
DMSA+Vit C (182+100 mg/kg)	6.25 ± 0.14*
DMSA+Metionina (182+100 mg/kg)	5.89 ± 0.35*
DMSA+Glicina (182+100 mg/kg)	7.2 ± 0.47*

**Tabla XIII.** Niveles de GSH hepático ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína) de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con el control de Pb (+).  $n = 5$

### 3.5.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de GSH en riñón.

En la tabla XIV se muestran los niveles de GSH en homogeneizados de riñón de ratas expuestas a Pb. La administración de Vitamina C, metionina y glicina a la dosis de 100 mg/kg durante 5 días produjo un incremento significativo en los niveles de GSH abatidos por la exposición al Pb. El mismo efecto se observó con las dosis media y alta de los antioxidantes. El DMSA produjo un incremento significativo de los niveles de GSH y no se observó diferencia entre los grupos que recibieron DMSA y los que recibieron los antioxidantes administrados como terapia individual. Se observó una diferencia significativa entre el grupo que recibió DMSA y el que recibió DMSA combinado con glicina siendo esta última terapia más efectiva para incrementar los niveles de GSH.

Tratamientos	GSH (riñón)
Control (-)	4.40 ± 0.38
Control Pb (+)	0.57 ± 0.08
DMSA (182 mg/kg)	1.64 ± 0.16*
Vit C (100 mg/kg)	1.72 ± 0.15*
Metionina (100 mg/kg)	1.83 ± 0.23*
Glicina (100 mg/kg)	1.11 ± 0.18*
DMSA+Vit C (182+100 mg/kg)	1.58 ± 0.11*
DMSA+Metionina (182+100 mg/kg)	1.74 ± 0.19*
DMSA+Glicina (182+100 mg/kg)	1.77 ± 0.17*

**Tabla XIV.** Niveles de GSH renal ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína) de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control Pb (+)  $n = 5$



### 3.5.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de LPO en hígado.

En la tabla XV se muestran los niveles de LPO en homogeneizados de hígado. Los niveles de LPO incrementados por la exposición a Pb fueron disminuidos significativamente en los grupos que recibieron Vitamina C, metionina y glicina administrados como terapia individual a la dosis de 100 mg/kg durante 5 días. No se observó diferencia significativa en los valores de LPO entre los grupos que recibieron las dosis baja, media y alta de los antioxidantes. No se observó diferencia significativa entre los grupos que recibieron DMSA y los que recibieron los antioxidantes, ni entre los grupos que recibieron el DMSA combinado con los antioxidantes.

Tratamientos	LPO (Hígado)
Control (-)	0.50 ± 0.09
Control Pb (+)	2.43 ± 0.46
DMSA (182 mg/kg)	0.58 ± 0.08*
Vit C (100 mg/kg)	0.68 ± 0.07*
Metionina (100 mg/kg)	0.55 ± 0.10*
Glicina (100 mg/kg)	0.76 ± 0.04*
DMSA+Vit C (182+100 mg/kg)	0.69 ± 0.07*
DMSA+Metionina (182+100 mg/kg)	0.56 ± 0.07*
DMSA+Glicina (182+100 mg/kg)	0.66 ± 0.08*

**Tabla XV.** Niveles de LPO hepático (nmol MDA/mg de proteína) de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con el control Pb (+).  $n = 5$

### 3.5.4 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de LPO en riñón.

En la tabla XVI se muestran los niveles de LPO en homogeneizados de riñón de ratas expuestas a Pb. La administración de Vitamina C, metionina y glicina a la dosis de 100 mg/kg durante 5 días produjo una disminución significativa en los niveles de LPO incrementados por la exposición al Pb. El mismo efecto se observó con las dosis media y alta de los antioxidantes y no hubo diferencia significativa en los valores de LPO de los grupos que recibieron las dosis baja, media y alta de los antioxidantes. El DMSA produjo una disminución significativa de los niveles de LPO y no se observó diferencia entre los grupos que recibieron DMSA y los que recibieron los antioxidantes administrados como terapia individual.

Tratamientos	LPO (Riñón)
Control (-)	0.59 ± 0.11
Control Pb (+)	2.18 ± 0.040
DMSA (182 mg/kg)	0.59 ± 0.12*
Vit C (100 mg/kg)	0.74 ± 0.11*
Metionina (100 mg/kg)	0.60 ± 0.10*
Glicina (100 mg/kg)	0.69 ± 0.09*
DMSA+Vit C (182+100 mg/kg)	0.72 ± 0.08*
DMSA+Metionina (182+100 mg/kg)	0.53 ± 0.08*
DMSA+Glicina (182+100 mg/kg)	0.54 ± 0.15*

**Tabla XVI.** Niveles de LPO renal (nmol MDA/mg de proteína) de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. \*  $p < 0.05$  comparados con control Pb (+). n = 5

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

En relación a la evaluación del riesgo de intoxicación por Pb, existen dos tipos de pruebas que informan de la absorción de Pb en el organismo: los indicadores de exposición y los indicadores de efecto. Los primeros revelan el grado de exposición, mientras que, los segundos detectan las alteraciones que ocurren en los órganos blanco después de la absorción.

En este trabajo se evaluó como indicador de exposición, la concentración de Pb en sangre como una prueba que indica el grado de exposición reciente, sin embargo, no informa sobre la carga corporal de Pb acumulado en el organismo, o sobre la intensidad de alteraciones bioquímicas. Por lo anterior, en este estudio como indicador de exposición se evaluó también la carga corporal del Pb, mediante la determinación de la concentración del metal acumulado en cerebro, hígado, riñón y el hueso ya que el depósito en estos tejidos se lleva a cabo de manera gradual con la exposición prolongada al Pb.



Como indicador de efecto se evaluó la actividad de la d-ALA por ser una enzima altamente sensible al Pb y porque su inhibición precede a otras alteraciones bioquímicas generadas como consecuencia a la acumulación de ALA. Los niveles de GSH se evaluaron con la finalidad de establecer el grado de reactivación inducida por la terapia a nivel de compuestos endógenos dependientes de grupos -SH abatidos por el Pb. Además, debido a que el Pb produce sus efectos tóxicos al atacar las moléculas de ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular, se evaluó el nivel de LPO como otro indicador de efecto. Por otro lado, esta prueba es considerada el estándar de oro en la evaluación del grado de estrés oxidativo en el organismo.

#### **4.1 Modelo experimental de intoxicación por Pb**

Para la evaluación experimental de nuevos esquemas terapéuticos en el tratamiento de la intoxicación por Pb en modelos animales, se requiere establecer inicialmente el esquema de intoxicación que considere la dosis y el tiempo de exposición, así como la concentración de Pb en sangre y tejidos. Lo anterior, debido a que los reportes de niveles de Pb en modelos de intoxicación en animales son muy variables.<sup>11, 51</sup> Además, en la evaluación de compuestos con posible acción quelante de Pb resulta necesario determinar el mejor tiempo de administración de los tratamientos. Al considerar que el Pb sigue la misma movilización que el calcio fue necesario establecer si el ciclo circadiano influía en el depósito de Pb en hueso, para lo cual se evaluaron esquemas de administración del Pb en horario matutino y vespertino.

Al respecto, en este estudio se encontró que el esquema de administración de Pb en horarios diferentes no afectó la distribución de Pb a hueso y órganos, por lo que se consideró que el ciclo circadiano no influiría en la efectividad de los tratamientos a evaluar.

El modelo de intoxicación con Pb administrado *ad libitum* a una concentración de 3000 ppm durante 5 semanas, utilizado en este estudio mostró ser eficaz, además de tener ventajas sobre los modelos de intoxicación con Pb por vía intraperitoneal y oral evaluados, ya que con este modelo se observó que además de alcanzar valores de Pb en sangre considerados como tóxicos, hubo una mayor distribución del metal hacia hueso. Debido a esto, este modelo permitió evaluar el efecto de los esquemas terapéuticos no sólo en la disminución del Pb en sangre sino también en la movilización de su principal sitio de depósito (hueso). Con la concentración de Pb alcanzada en sangre se observó además la inhibición de la actividad de la d-ALA lo que permitió evaluar el efecto terapéutico de los diferentes tratamientos sobre la actividad de esta enzima. Por otro lado, la exposición de los diferentes tejidos a este metal durante un tiempo mayor (5 semanas) que los reportados para los modelos de administración i.p. u oral permitió evaluar el daño celular producido por el Pb sobre los parámetros indicativos de estrés oxidativo (inhibición de GSH e incremento de la LPO), lo cual es difícil de lograr con tiempos de exposición cortos, aún con la administración de dosis elevadas.

Cabe destacar, que el incremento de Pb en hueso observado con este esquema de intoxicación confirma lo reportado por varios autores en cuanto a que la exposición

continua a Pb produce su acumulación en el hueso y que éste actúa como su principal reservorio.<sup>62</sup>

Al respecto, aunque desde hace muchos años se ha reconocido que el Pb se acumula en hueso, se tenía la idea de que se trataba de un secuestro de Pb a manera de depósito con una sola vía, en la cual el Pb removido de la circulación y de los tejidos blandos se acumulaba en el hueso. Ahora, se sabe que este concepto es incorrecto, ya que el depósito y la remoción del Pb de hueso sigue la fisiología activa del calcio y está sometida a los efectos de factores generales, tales como la nutrición y el ejercicio por mencionar algunos. Por este motivo, el tejido óseo constituye un elemento importante en el estudio de la exposición crónica a Pb y del efecto que los diversos esquemas terapéuticos pudieran tener en cuanto a su movilización.

#### **4.2 Efecto del DMSA sobre la concentración de Pb.**

El mecanismo de quelación de los metales pesados se alcanza cuando la afinidad del quelante por el metal es mayor que la afinidad del bioligando. El DMSA es un quelante de Pb que tiene en su estructura dos grupos tiol y dos grupos carboxilo lo que le permite remover el Pb de sitios intracelulares. Se ha propuesto que, el complejo del DMSA con el Pb se forma por medio de un enlace con el átomo de azufre y de oxígeno.<sup>63</sup> Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman lo reportado por otros autores en cuanto a que el DMSA es un quelante efectivo del Pb en sangre, hígado, riñón, cerebro y hueso.

### **4.3 Efecto de la Vitamina C, L-Metionina y Glicina sobre la concentración de Pb.**

La acumulación de Pb en el organismo es un importante factor de toxicidad tanto aguda como crónica. Parte de la toxicidad del Pb ha sido atribuida a su unión con los grupos sulfhidrilo de las proteínas. Estudios recientes, han sugerido que la administración de compuestos con efecto antioxidante o con grupos tiol en su estructura pueden tener acción quelante y disminuir la concentración de Pb en el organismo.<sup>42,43</sup> Sin embargo, en este trabajo se observó que ninguno de los antioxidantes administrados en sus dosis baja y media produjo disminución significativa de los niveles de Pb en sangre y órganos.

Este fenómeno puede ser atribuido quizá a que el tiempo durante el cual los animales recibieron el tratamiento fue corto, lo que probablemente no permitió que se alcanzaran concentraciones efectivas de estos compuestos en sangre y tejidos.

Además, la disminución en los niveles de Pb en hueso observada cuando los antioxidantes (Vitamina C, metionina y glicina) se administraron en su dosis alta (1000 mg/kg) durante 28 días, indica que tanto la concentración como la duración del tratamiento son determinantes para que este efecto se manifieste.

Se sabe que el Pb en su distribución sigue un modelo toxicocinético tricompartmental,<sup>64</sup> es decir, tiene una primera localización en sangre de donde se incorpora a tejidos blandos para finalmente llegar al hueso donde se deposita durante décadas. Cuando el Pb es movilizado de este sitio, ocurre rápidamente un fenómeno de

redistribución y la concentración del metal en los otros compartimentos puede incrementarse de manera importante. En este estudio, los tres antioxidantes evaluados produjeron una disminución de los niveles de Pb del hueso sin redistribución hacia tejidos blandos. Lo anterior, indica que probablemente los antioxidantes están movilizándolo el Pb de hueso y a su vez incrementando los mecanismos de eliminación del metal.

La metionina es un aminoácido esencial precursor de cisteína, la cual contribuye en la síntesis del GSH<sup>65, 66</sup> y se ha propuesto que el grupo tiol de su estructura actúa como quelante de Pb en los tejidos.<sup>67</sup> Xie y cols.<sup>68</sup> reportaron que la administración de L-metionina en ratones intoxicados produjo una disminución de la concentración de Pb en órganos. Sin embargo, en este estudio, la metionina no disminuyó la concentración de Pb en sangre y en tejidos, estos resultados concuerdan con lo reportado por Patra y cols.<sup>51</sup>

En relación al restablecimiento de los niveles de GSH producido por la metionina, se sabe que el GSH es un compuesto que se combina con algunos compuestos exógenos y que participa en su transformación o bien en su eliminación del organismo. Esto ha sido atribuido principalmente al carácter nucleofílico del grupo tiol localizado en el residuo de cisteína.

En este sentido, la metionina probablemente pudiera haber movilizó el Pb por dos vías: una por interacción directa del grupo tiol con el Pb y la otra debida al efecto directo del GSH con este metal.

Por otro lado, la Vitamina C es un potente antioxidante que conserva los niveles de GSH al actuar como cofactor del ciclo redox del mismo y por medio de una transferencia de electrones secuestra las ROS y produce una inhibición de la LPO.<sup>69-71</sup> Los resultados obtenidos en este estudio, en donde la Vitamina C restituyó los niveles de GSH abatidos por el Pb y revirtió el incremento de la LPO concuerdan con la actividad previamente reportada para este compuesto.<sup>51</sup> Recientemente, se ha sugerido que existe una relación inversa entre los niveles de Vitamina C y los niveles de Pb en el organismo, así mismo, se ha sugerido que la Vitamina C tiene un papel protector en la intoxicación con este metal.<sup>72</sup> Se ha reportado que la administración de Vitamina C es efectiva tanto en la prevención como en el tratamiento de esta intoxicación al disminuir la absorción del metal o bien al aumentar su eliminación.<sup>46</sup> Sin embargo, también existen reportes que indican que la administración de Vitamina C no produce ningún efecto sobre la carga corporal de Pb, pero sugieren que por su potencial antioxidante pudiera ser de beneficio al atenuar los índices de estrés oxidativo.<sup>51</sup>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

En los resultados obtenidos en este estudio, la movilización del Pb de hueso producida por la Vitamina C sin redistribución hacia los órganos evaluados, sugiere que de alguna manera se pudiera presentar un aumento en la eliminación de Pb del organismo y que, probablemente esto ocurra de manera conjunta a la eliminación de la Vitamina C por orina. Se sabe que este antioxidante puede producir un aumento en la acidificación de la orina lo que llevaría a una mayor solubilización del Pb a pH ácido y produciría una mayor excreción del metal. Hay que señalar, sin embargo, que se requieren de más

estudios que incluyan la medición de la excreción urinaria del Pb en presencia de Vitamina C para poder aclarar este fenómeno.

En relación al efecto antioxidante de la glicina, este compuesto es un aminoácido constituyente del GSH que ha sido utilizado en la terapéutica de enfermedades asociadas al estrés oxidativo.<sup>73</sup> Existen reportes donde se menciona que la concentración de cisteína es un factor limitante en la síntesis del GSH, actualmente, se reconoce que la glicina juega un papel muy importante en este proceso. Nishida y cols.<sup>74</sup> demostraron que la glicina facilita la actividad de la enzima que cataliza la unión entre la glutamil-cisteína y glicina lo que lleva a un incremento en los niveles de GSH intracelular. Es importante mencionar que no existen reportes en la literatura donde se haya evaluado el efecto de este compuesto en el tratamiento de la intoxicación por Pb.

En este estudio, el tratamiento con glicina produjo un aumento en los niveles de GSH e inhibió el proceso de LPO inducido por el Pb. Además, se observó que la administración de glicina en su dosis alta produjo movilización del Pb depositado en hueso sin producir su redistribución hacia los órganos evaluados. Esto sugiere que, de alguna manera el compuesto pudiera incrementar la eliminación de Pb del organismo. En este caso, dada la importancia que la glicina tiene en restaurar los niveles de GSH, es factible suponer que la movilización de Pb pudiera ser debida a la interacción del GSH con este metal.



#### **4.4 Efecto de la Vitamina C, L-Metionina y Glicina sobre la actividad de la enzima d-ALA.**

Se sabe que el Pb ejerce parte de sus efectos tóxicos por interacción con enzimas dependientes de grupos -SH. La d-ALA es una enzima que posee un grupo tiol y su actividad es rápidamente inhibida en presencia de Pb. La determinación de la actividad de esta enzima es un parámetro útil para establecer el grado de exposición a este metal, ya que aún a concentraciones bajas de Pb en sangre (15 µg/dL) puede observarse su inhibición.<sup>75</sup>

A pesar de que algunos autores han reportado que la administración de Vitamina C o metionina produce reactivación de esta enzima,<sup>41,46,53</sup> en este trabajo se observó que ninguno de ellos reestableció su actividad. Por otro lado, a pesar de que la glicina participa en la biosíntesis del grupo hem, el tratamiento con este compuesto tampoco produjo reactivación de la d-ALA.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Es importante señalar, que con ninguna de las tres dosis evaluadas (baja, media y alta) se produjo reactivación de la función de la enzima. Lo anterior, concuerda con el efecto observado en cuanto a los niveles de Pb en sangre donde ninguno de los antioxidantes aún a la dosis alta produjo la disminución de los niveles sanguíneos del metal.



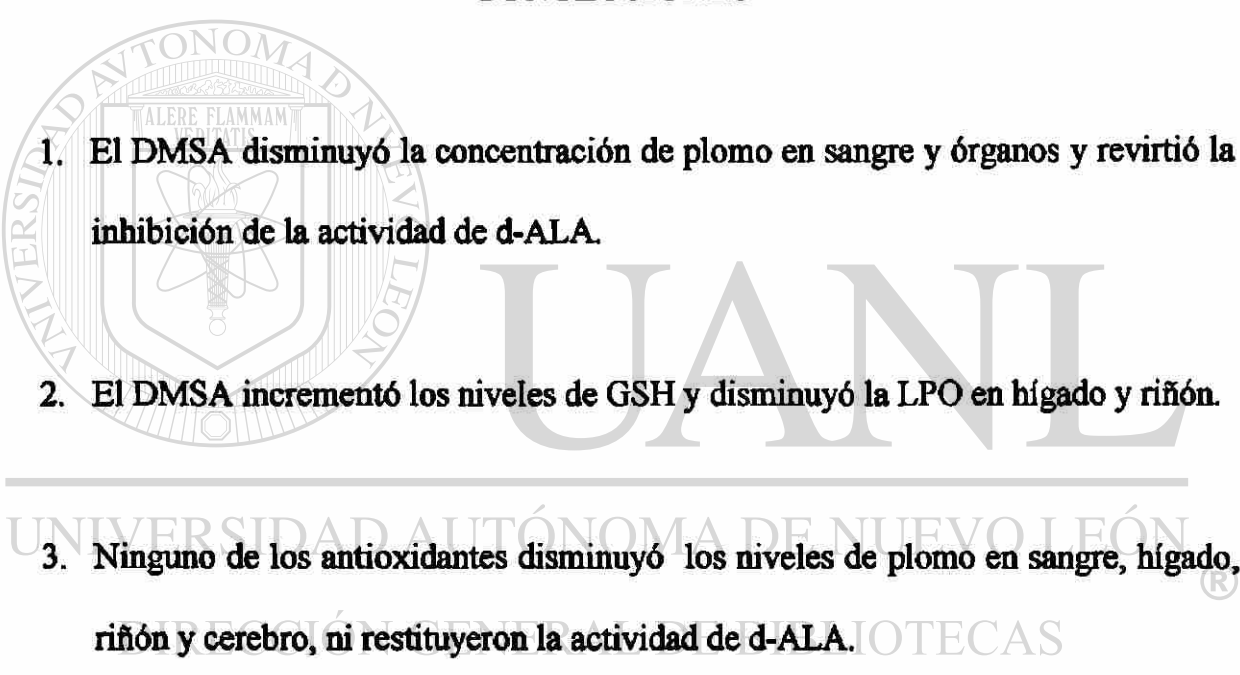
#### 4.5 Efecto del DMSA, Vitamina C, L-Metionina y Glicina sobre los parámetros del estrés oxidativo.

El principal mecanismo de toxicidad de Pb se ha atribuido a la generación de estrés oxidativo caracterizado por un desbalance en el estado prooxidante-antioxidante. En este trabajo se corroboró el efecto benéfico de la Vitamina C, metionina y glicina, sobre el estrés oxidativo producido por el Pb. Sin embargo, cabe destacar que un hallazgo muy importante de este estudio fue el hecho de que el DMSA produjo la restauración de los niveles de GSH e inhibió la LPO de igual manera que lo hicieron los antioxidantes evaluados. Si bien, este efecto pudiera atribuirse a que el DMSA disminuyó la concentración del Pb circulante y por lo tanto hubo una disminución en la generación de radicales libres; también pudiera ser atribuido directamente al agente quelante, el cual pudiera tener actividad antioxidante. En este sentido, se sabe que el DMSA posee dos grupos sulfhidrilo a los que se les pudiera atribuir la acción antioxidante. En base a estos resultados, se evaluó la actividad antioxidante del DMSA *in vitro* mediante la técnica de la 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína<sup>76</sup> (datos no reportados en este trabajo). Al respecto se encontró que el DMSA disminuyó la actividad oxidativa de la xantina oxidasa utilizada como generador de radicales libres. Esto indica que el DMSA además de poseer efecto quelante tiene acción antioxidante protectora contra el estrés oxidativo producido por la exposición al Pb.

Los resultados de este estudio mostraron que la Vitamina C, metionina y glicina no tuvieron efecto quelante sobre el Pb circulante al ser administradas como terapia individual en su dosis baja, media y alta y por lo tanto no mostraron efecto sinérgico al ser administradas en combinación con el DMSA. Ya que el DMSA además de quelar el Pb en sangre y tejidos mostró tener un efecto antioxidante igual al observado con la Vitamina C, metionina o glicina, se sugiere, que la administración de terapia coadyuvante con antioxidantes quizá no produzca un efecto terapéutico adicional en casos de exposición aguda a Pb. Por otro lado, si bien ninguno de los antioxidantes produjo quelación de Pb en sangre, la administración individual de los antioxidantes en su dosis alta disminuyó la concentración del Pb depositado en hueso, por lo que sería importante, dilucidar el mecanismo involucrado en este proceso de movilización de Pb, ya que esto contribuiría a determinar el potencial que estos compuestos pudieran tener como terapia coadyuvante en casos de exposición crónica a Pb.

## **CAPÍTULO 5**

### **CONCLUSIONES**

- 
- 1. El DMSA disminuyó la concentración de plomo en sangre y órganos y revirtió la inhibición de la actividad de d-ALA.**
  - 2. El DMSA incrementó los niveles de GSH y disminuyó la LPO en hígado y riñón.**

---

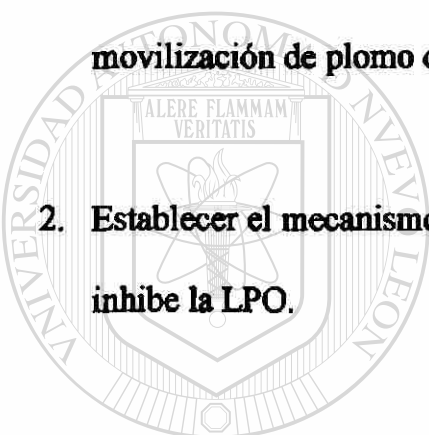
  - 3. Ninguno de los antioxidantes disminuyó los niveles de plomo en sangre, hígado, riñón y cerebro, ni restituyeron la actividad de d-ALA.**
  - 4. Todos los antioxidantes movilizaron plomo de hueso.**

## PERSPECTIVAS

1. Establecer el mecanismo mediante el cual los antioxidantes producen la movilización de plomo de hueso.

2. Establecer el mecanismo mediante el cual DMSA restablece los niveles de GSH e inhibe la LPO.

3. Evaluar si los antioxidantes revierten el daño producido por el plomo mediante estudios histopatológicos en órganos blanco.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## REFERENCIAS

1. Norma Oficial Mexicana NOM-199-SSA1-2000, Salud ambiental. Niveles de plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente.
2. Silbergeld E.K. Lead in bone: Implications for toxicology during pregnancy and lactation. *Environ Health Perspect* 1991;91:63-70.
3. Goldman R.H., White R., Kales S., Hu H. Lead poisoning from mobilization of bone stores during thyrotoxicosis. *Am J Ind Med* 1993;24:1-8.
4. Silbergeld E., Sauk J., Somerman M., et al. Lead in bone: Storage site, exposure source and target organ. *Neurotoxicology* 1993;14(2-3):225-236.

---

5. Aykin-Burns N., Laegeler A., Kellogg G., Ercal N. Oxidative effects of lead in young and adult Fisher 344 rats. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2003;44(3):417-420.
6. Heath L.M., Soole K.L., McLaughlin M.L., McEwan G.T., Edwards J.W. Toxicity of environmental lead and the influence of intestinal absorption in children. *Rev Environ Health* 2003;18(4):231-250.
7. Hashmi N.S., Kachru D.N., Tandon S.K. Interrelationship between iron deficiency and lead intoxication. *Biol Trace Elem Res* 1989;22(3):287-97.
8. Goyer R.A. Nutrition and metal toxicity. *Am J Clin Nutr* 1995;61(3 Suppl):646S-650S.
9. Goldstein G.W. Evidence that lead acts as a calcium substitute in second messenger metabolism. *Neurotoxicology* 1993;14(2-3):97-101.
10. Lead: Environmental Health Criteria 3. World Health Organization. Geneva Switzerland 1977.

11. Neal R., Cooper K., Gurer H., Ercal N. Effects of N-acetylcysteine and 2,3-dimercaptosuccinic acid on lead induced oxidative stress in rat lenses. *Toxicology* 1998; 130(2-3):167-174.
12. Ercal N., Neal R., Treeratphan P., Lutz P.M., Hammond T.C., Dennery P.A., Spitz D.R. A role for oxidative stress in suppressing serum immunoglobulin levels in lead-exposed Fisher 344 rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 2000, 39:251-256.
13. Willis E.D. Mechanisms of lipid peroxide formation in tissues. Role of metals and haematin proteins in the catalysis of the oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Acta* 1965,98:238-251.
14. Quinlan, G.J., Halliwell B., Moorhouse C.P., Gutteridge J.M. Action of lead (II) and aluminium (III) ions on iron-stimulated lipid peroxidation in liposomes, erythrocytes and rat liver microsomal fractions. *Biochim Biophys Acta* 1988;962(2):196-200.
15. Shafiq-ur-Rehman. Lead-induced regional lipid peroxidation in brain *Toxic Lett* 1984;21:333-337.
16. Lawton, L.J.; Donaldson, W.E. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res* 1991;28:83-97.
17. Sandhir, R.; Gill K.D. Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. *Biol Trace Elem Res* 1995;48:91-97.
18. Ercal N., Gurer H., Nukhet A.B. Toxic metals and oxidative stress part I: Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 2001; 1:529-539.
19. Neal R., Yang P., Fiechtl J., Yildiz D., Gurer H., Ercal N. Pro-oxidant effects of delta-aminolevulinic acid (delta-ALA) on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol Lett* 1997;91(3):169-78.
20. Housset B. Biochemical aspects of free radicals metabolism. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1987;23(4):287-290.
21. Farant J.P., Wigfield D.C. Biomonitoring lead exposure with ALAD activity ratios. *Int Arch Occup Environ Health* 1982;51:15-24.
22. Douki T., Onuki J., Medeiros M.H., Bechara E.J., Cadet J., Di Mascio P. DNA alkylation by 4,5-dioxovaleric acid, the final oxidation product of 5-aminolevulinic acid. *Chem Res Toxicol* 1998a;11:150-157.

23. Hermes-Lima M., Pereira B., Bechara J.H. Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica* 1991;21(8):1085-1090.
24. Gelman B.B., Michaelson I.A., Bus J.S. The effect of lead on oxidative hemolysis and erythrocyte defense mechanisms in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978;45:119-129.
25. Howard, J.K. Human erythrocyte glutathione reductase and glucose 6-phosphate dehydrogenase activities in normal subjects and in persons exposed to lead. *Clin Sci Molec Med* 1974;47,515-520.
26. Whanger, P.D. Selenium in the treatment of heavy metals poisoning and chemical carcinogenesis. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1992;6:209-221.
27. Othman A.I., El Missiry M.A. Role of selenium against lead toxicity in male rats. *J. Biochem Mol Toxicol* 1998;12(6):345-349.
28. Christie N. T.; Costa M. In vitro assesment of the toxicity of metal compounds. IV. Disposition of metals in cells: interaction with membranes, glutathione, metallothionein, and DNA. *Biol. Trace Elem. Res* 1984;6:139-158.
29. Sugawara E; Nakamura K; Miyake T; Fukumura A; Seki Y. Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. *Brit J Indust Med* 1991;48:239-242.
30. Cory-Slechta, D.A.; Weiss B., Cox C. Mobilization and redistribution of lead over the course of calcium disodium ethylenediamine tetraacetate chelation therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;243:566-571.
31. Mortensen M.E., Walson P.D. Chelation therapy for childhood lead poisoning. *Clin Pediatr* 1993;32:284-291.
32. Liebelt E.L., Shannon M.W. Oral chelators for childhood lead poisoning. *Pediatr Ann* 1994;23:616-626.
33. Graziano J.H., Leong J.K., Friedheim E. 2,3-Dimercaptosuccinic acid: a new agent for the treatment of lead poisoning. *J Pharmacol Exp Ther* 1978;206(3):696-700.
34. Graziano J.H., Siris E.S., LoIacono N.J., Silverberg S.J., Turgeon L. 2,3-dimercaptosuccinic acid as an antidote for lead intoxication. *Clin Pharmacol Therap* 1985;37:431-438.
35. Graziano J.H. Role of 2,3-dimercaptosuccinic acid in the treatment of heavy metal poisoning. *Med Toxicol* 1986;1:155-162.

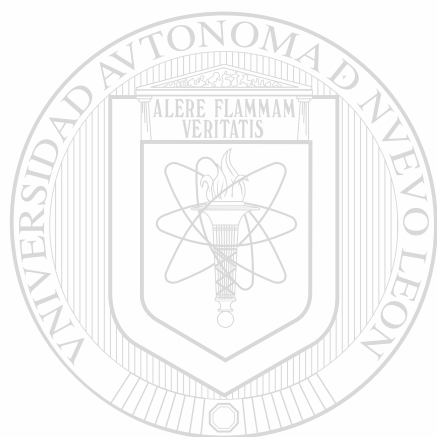


36. Rivera M, Zheng W., Aposhian H, Fernando Q. Determination and metabolism of dithiol-chelating agents: VIII. Metal complexes of meso-dimercaptosuccinic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989, 100:96-106.
37. Chisolm J.J. Jr. Safety and efficacy of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) in children with elevated blood lead concentrations. *Toxicol Clin* 2000;38:365-375.
38. Ping-Chi Hsu, Yueliang Leon Guo. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicol* 2002;180:33-44.
39. Gurer H, Ozgunes H, Neal R, Spitz R, Ercal N. Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats. *Toxicology* 1998; 128:181-189.
40. Pande M, et al. Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001; 9:173-184.
41. Flora JS, Pande M, Mehta A. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. *Chem Biol Inter* 2003;145:267-280.
42. Neal R., Cooper K, Kellogg G, Gurer H, Ercal N. Effects of some sulfur-containing antioxidants on lead-exposed lenses. *Free Radic Biol Med* 1999;26(1-2)239-243.
- 
43. Gurer H, Ozgunes H, Saygin E, Ercal N. Antioxidant effect of taurine against lead-induced oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 2001;41(4):397-402.
44. Goyer R.A., Cherion M.G. Ascorbic acid and EDTA treatment of lead toxicity in rats. *Life Sci* 1979;24:433-438.
45. Flora S.J., Tandon S.K. Preventive and therapeutic effects of thiamine, ascorbic acid and their combination in lead intoxication. *Acta Pharmacol Toxicol* 1986;58:374-378.
46. Dhawan M., Kachru D.N., Tandon S.K. Influence of thiamine and ascorbic acid supplementation on the antidotal efficacy of thiol chelators in experimental lead intoxication. *Arch Toxicol* 1988;62(4):301-304.
47. Lauwerys R., Roels H., Buchet J.P., Bernard A.A., Verhoeven L., Konings J. The influence of orally-administered vitamin C or zinc on the absorption of and the biological response to lead. *J Occup Med* 1983;25:668-678.

48. Simon J.A., Hudes E.S. Relationship of ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA* 1999;281(24):2289-93.
49. Machartova V., Racek J., Kohout J., Senft V., Trefil L. Effect of antioxidant therapy on indicators of free radical activity in workers at risk of lead exposure. *Vnitr Lek* 2000;46(8):444-446.
50. Houston D.K., Johnson M.A. Does vitamin C intake protect against lead toxicity? *Nutr Rev* 2000;58:73-75.
51. Patra R.C., Swarup D., Dwivedi S.K. Antioxidant effects of  $\alpha$  tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology* 2001; 162: 81-88.
52. Kachru D.N., Khandelwal S., Tandon S.K. Influence of methionine supplementation in chelation of lead in rats. *Biomed Environ Sci* 1989;2(3):265-270.
53. Flora S.J., Kumar D., Das Gupta S. Interaction of zinc, methionine or their combination with lead at gastrointestinal or post-absorptive level in rats. *Pharmacol Toxicol* 1991;68(1):3-7.
54. Tandon S.K., Singh S., Flora S.J. Influence of methionine and zinc supplementation during chelation of lead in rats. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1994;8(2):75-77.
55. Mauriz J.L., Matilla B., Culebras J.M., Gonzalez P., Gonzalez-Gallego J. Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagia shock in the rat. *Free Radic Biol Med* 2001 Nov 15; 31(10):1236-44
56. Deters M., Siegers C.P., Strubelt O. Influence of glycine on the damage induced in isolated perfused rat liver by five hepatotoxic agents. *Toxicology* 1998;128(1):63-72.
57. Shaikh Z.A., Tang W. Protection against chronic cadmium toxicity by glycine. *Toxicology* 1999;132(2-3):139-46.
58. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randal R.J., Protein measurement with folin phenol reagent *J Biol Chem* 1952; 193, 265-275.
59. Tomokuni K.  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase test for lead exposure. *Arch Environ Health* 1974; 29:274-28.
60. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82:70-77.

61. Ohkawa H., et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979; 95: 351-358.
62. Wittmers L.E., Wallgren J., Alich A., Aufderheide A.C., Rapp G. Lead in bone IV. Distribution of lead in human skeleton. *Arch Environ Health* 1998;43(6):381-390.
63. Aposhian H.V., Maiorino R.M., Gonzalez-Ramirez D., Zuñiga M., Xu Z., Hurlbut K.M., Junco M.P., Dart R.C., Aposhian M.M. Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents. *Toxicology* 1995;97(1-3)23-38.
64. Marcus A.H. Multicompartment kinetic models for lead. Bone diffusion models for long-term retention. *Environ Res* 1985;36:441-458.
65. Beatty W.P., Reed J.D. Involvement of the cysteine pathway in the biosynthesis of glutathione by isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 1980;204:80-87.
66. Reed D.J., Orrenius S. The role of methionine in glutathione biosynthesis by isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;77:1257-1264.
67. Liu Q.Y., Fan G.J. The research development of the cooperative drugs in the Pb expelling. *Foreign Med Sci* 1997;24:11-19.
68. Xie L., Gao Q., Xu H. Ameliorative effect of L-methionine on Pb-exposed mice. *Biol Trace Elem Res* 2003;93(1-3):227-236.
- 
69. Halliwell B., Wasil M., Grootveld M. Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. *FEBS Lett* 1987, 213:15-17
70. Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* 1994;54:1969S-1975S.
71. Meister A. Glutathione-ascorbic acid and antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 1994;269(13)9397-9400.
72. Dawson E.B., Evans D.R., Harris W.A., Teter M.C., McGanity W.J. The effect of ascorbic acid supplementation on the blood lead levels of smokers. *J Am Coll Nutr* 1999;18(2):166-170.
73. Matilla B., Mauriz J.L., Culebras J.M., González-Gallego J, González P. La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. *Nutr Hosp* 2002;17:2-9.

74. Nishida K., Ohta Y., Ishiguro I. Glycine facilitates gamma-glutamylcysteinylethyl ester-mediated increase in liver glutathione level. *Eur J Pharmacol* 1997;333(2-3):289-92.
75. Farant J.P., Wigfield D.C. Biomonitoring lead exposure with ALAD activity ratios. *Int Arch Occup Environ Health* 1982;51:15-24.
76. Bass D.A., Parce J.W., Dechatelet L.R., Szejda P., Seeds M.C., Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 1983;130:1910-1918.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## **APÉNDICE I**

**Reactivos para la determinación de proteínas**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## APÉNDICE I

### Reactivos para la determinación de proteínas

#### 1. Solución A

Esta solución se prepara con carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 N.

#### 2. Solución B

Se mezclan partes iguales de una solución de tartrato de sodio y potasio al 2% con una solución de sulfato de cobre al 1%.

#### 3. Solución C

Se prepara con 50 ml de la solución A más 1 ml de la solución B.

#### 4. Reactivo de Folin & Ciocalteu's

Se prepara haciendo una dilución 1:1 con agua destilada.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Yolanda Alcaraz Contreras

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con  
Especialidad en Farmacología y Toxicología

**Título de la Tesis:** Evaluación del efecto de la combinación del ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) con antioxidantes en la intoxicación por plomo en ratas

**Área de Estudio:** Farmacología y Toxicología

### Biografía:

**Escolaridad:** Químico Farmacéutico Biólogo por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guanajuato en 1999. Diplomado en Farmacia Comunitaria y Asistencial por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el 2003.

**Experiencia Profesional:** Participación como maestro de Biología de 1988 al 2000 en la Preparatoria Oficial de la Universidad de Guanajuato. Participación como Farmacéutico en el programa de Farmacia Hospitalaria de Agosto de 1999 a Septiembre del 2000 en el Hospital General de Guanajuato. Presentación de trabajos de investigación en Congresos Nacionales:

- Evaluación del efecto del ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), L-metionina y ácido ascórbico sobre los niveles de Pb en ratas intoxicadas por plomo. XXII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Monterrey N.L., Octubre 2004.
- Evaluación del efecto del ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) y L-metionina sobre los niveles de plomo y actividad de la enzima ácido delta aminolevulínico deshidratasa (d-ALA) en ratas intoxicadas por plomo. Congreso Nacional de Farmacología, Villahermosa Tab., Marzo 2004.
- Niveles de plomo en sangre y tejidos y actividad de la enzima ácido delta aminolevulínico deshidratasa (d-ALA) en dos modelos de intoxicación en ratas. Primer lugar en la categoría básicos cartel, XXI Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Monterrey N.L., Octubre 2003.
- Estructura tridimensional de las encefalinas DSLET y DPDPE, su relación con receptores opioides. XVIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Monterrey N.L., Octubre 2000.
- Sinergismo del efecto hipoglucémico de la morfina y de la insulina. XVII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Monterrey N.L., Octubre 1999.

**Distinciones:** Reconocimiento al mejor estudiante del Doctorado en Ciencias con Especialidad en Farmacología y Toxicología por la Facultad de Medicina de la UANL durante los ciclos 2000-2001 y 2002-2003. Reconocimiento al mejor estudiante de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo durante los ciclos 1996-1997 y 1998-1999.





# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



