



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

BIOACUMULACIÓN DE CADMIO Y SU EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE
METALOTIONEÍNAS Y LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LACTATO
DESHIDROGENASA EN EL CEREBRO DE RATAS
(Modalidad: Tesis de Grado)

JESUSMARIT DEL CARMEN INDRIAGO JIMÉNEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA

CUMANÁ, 2011

BIOACUMULACIÓN DE CADMIO Y EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE
METALOTIONEÍNAS Y LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LACTATO
DESHIDROGENASA EN EL CEREBRO DE RATAS

APROBADO POR:



Dra. Sonia Nusetti
Asesora Académica



Msc. Yarima Alfonzo
Coasesora Académica



Msc. Loguard Rojas
Jurado Principal



Msc. Edgar Zapata
Jurado Principal

INDICE

| | |
|---|----|
| DEDICATORIA | i |
| AGRADECIMIENTOS | ii |
| RESUMEN | v |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| METODOLOGÍA | 13 |
| Animales de experimentación..... | 13 |
| Exposición a Cd..... | 13 |
| Obtención de las muestras..... | 13 |
| Equipo de Absorción Atómica..... | 13 |
| Equipo de Emisión Atómica..... | 14 |
| Análisis Químicos | 14 |
| <i>Suspensión asistida por ultrasonido</i> | 14 |
| <i>Digestión ácida.</i> | 15 |
| <i>Comparación de las metodologías</i> | 15 |
| <i>Determinación de las concentraciones de Cd</i> | 15 |
| <i>Determinación de las concentraciones de Zn</i> | 16 |
| Análisis Bioquímicos..... | 16 |
| <i>Análisis enzimático (LDH)</i> | 16 |
| <i>Extracción y cuantificación de MT</i> | 17 |
| Análisis Estadísticos | 18 |
| RESULTADOS..... | 19 |
| Metodologías de pretratamiento de las muestras de cerebro..... | 19 |
| Niveles de Cd, Zn, MT y actividad de la LDH en el cerebro de ratas expuestas a Cd durante 30 días..... | 22 |
| Niveles de Cd, Zn; MT y actividad de la LDH en el cerebro de ratas expuestas a Cd durante de 60 días..... | 25 |
| DISCUSIÓN | 29 |
| CONCLUSIONES | 34 |
| RECOMENDACIONES | 35 |
| BIBLIOGRAFÍA | 36 |
| APÉNDICES | 43 |
| HOJAS DE METADATOS..... | 51 |

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño:

A ti Dios, que me diste la oportunidad de vivir y que a lo largo de todo el camino recorrido me llenaste de amor, alegrías y sobre todo mucha fortaleza para llevar acabo todos los sueños que desde niña tenía y que hoy muchos de ellos forman parte de mi y feliz realidad.

A mis padres, que en este caso son cuatro, porque tuve la dicha de tener dos abuelos que fueron más que eso; a ustedes les dedico el éxito de este trabajo, porque solo ustedes son el reflejo de la constancia, dedicación, perseverancia y sobre todo del esfuerzo que hoy se resumen en estas pocas páginas, pero que significan el resultado de toda una vida de estudio enfocada a un único objetivo, mi título universitario. Mami, papi, abuela y abuelo, yo les debo la vida y todo lo que soy ahora, y por eso les digo, que los amo mucho y que siempre fueron, han sido y serán mi más grande inspiración; y aunque tú, mi abuelo, ya no estas a mi lado, yo se que tu corazón está conmigo y que donde quiera que estés, estarás siempre orgulloso de tu nietica.

A mi familia (hermana, hermanos, tías, tíos, primas y primos), a ellos les doy las gracias por el cariño, el apoyo y la confianza que siempre han tenido en mi; en especial a mi tía Luisa Dolores, por quererme como una madre quiere a su hija, por estar a mi lado y regalarme tan gratos momentos. Tía se que desde el cielo estas guiando mis pasos y que en este momento debes estar brincando de alegría, muchas gracias por ser como fuiste conmigo!

A mis amigos (Miguel, Rafael, Jesli, José, Marylín y Alexis), por la ayuda y la colaboración prestada, por estar a mi lado y tenderme una mano cuando más lo he necesitado y por ser los mejores amigos del mundo, los quiero mucho y nunca voy a olvidar las grandes cosas que hemos vivido juntos, así que nunca olviden que ustedes también forman parte de este gran sueño.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se hubiese podido llevar a cabo sin la participación desinteresada, de instituciones y personas, que brindaron sus conocimientos, equipos y consejos. A todos y sin dejar a nadie en el olvido quiero agradecerles su tiempo, sus palabras y su apoyo, dedicándoles este espacio de manera muy justa y expresándoles mis más sentidos agradecimientos.

Primero y antes que todo, quiero darle gracias a Dios, por haber iluminado mi mente, en este largo camino recorrido.

Agradezco a la Universidad de Oriente por contribuir en este sueño, brindándome la educación necesaria para llevar a un feliz término mis estudios universitarios.

Estaré eternamente agradecida con mi asesora, la Dra. Sonia Nusetti, por su paciencia, apoyo y confianza, y en especial por haberme dado la oportunidad de realizar, junto a ella, este hermoso trabajo, que ha dejando en mí nuevas experiencias y conocimientos que hoy me hacen sentir una mejor profesional.

A mi coasesora, la Msc. Yarima Alfonzo, por haber aceptado emprender este reto junto a nosotras. Profesora, gracias por su tiempo, por todos esos consejos e ideas y sobre todo por esa excelente orientación que me ha brindado y que ha sido de gran ayuda para llevar a cabo este trabajo.

A los profesores Osmar Nusetti, Edgar Zapata y Leida Marcano, todos investigadores del área de Ecotoxicología, a ellos les reitero mis más profundos agradecimientos por abrirme las puertas de sus laboratorios, por tener una respuesta a cada pregunta y en especial por mostrarme la importancia que tiene la bioquímica en el día a día.

Al Sr. Brito, encargado del bioterio de la UDO, por enseñarme a tratar con mis animales de experimentación y por estar siempre pendiente de que ellos se encontraran en perfecto estado.

A todas las personas que trabajan en el Laboratorio de Química Analítica del Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC): la Dra. Zully, Manuelita, Janet, Yorbin, Eunice, Columbo y, en especial, a Fátima por ser una excelente amiga y compañera, te quiero mucho manita y nunca voy a olvidar todas las cosas que hiciste por mí.

Al personal que trabaja en el Laboratorio de Neuroquímica del IVIC, en especial a la Dra. Lucimey Lima y al Lcdo. Francisco Obregón por toda la colaboración prestada.

A mis compañeras de laboratorio, María Virginia, Iliana, Martha, Amanda y Jannelys, por toda su colaboración y en especial por su amistad.

Y, por último, quiero agradecerles a todos los profesores que formaron parte de mi educación en especial a los pertenecientes al Departamento de Química, pues, en mí hay un poquito de cada uno de ellos.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura de la metalotioneína. | 5 |
| Figura 2. Estructura de la enzima lactato deshidrogenasa en 3D. | 7 |
| Figura 3. (a) Sección transversal de un horno de grafito y (b) La plataforma L'vov y su posición en el tubo de grafito. | 8 |
| Figura 4. Fuente de plasma acoplado inductivamente. | 11 |
| Figura 5. Concentraciones de Cd encontradas por las dos metodologías de pretratamiento. | 19 |
| Figura 6. Concentraciones de Cd por adición patrón en muestras sometidas a las dos metodologías de pretratamiento. | 21 |
| Figura 7. Concentraciones de Cd en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 30 días. *p<0,05 con respecto a los controles. | 23 |
| Figura 8. Niveles de Zn en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 30 días. *p<0,05 con respecto a los controles. | 23 |
| Figura 9. Niveles de MT en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 30 días. *p<0,05 con respecto a los controles. | 24 |
| Figura 10. Actividad de la LDH en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 30 días. | 25 |
| Figura 11. Concentraciones de Cd en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 60 días. *p<0,05 con respecto a los controles. | 26 |
| Figura 12. Niveles de Zn en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 60 días. *p<0,05 con respecto a los controles. | 26 |
| Figura 13. Niveles de MT en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 60 días. *p<0,05 con respecto a los controles. | 27 |
| Figura 14. Actividad de la LDH en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 60 días. *p<0,05 con respecto a los controles. | 28 |

RESUMEN

Se determinó el efecto de la bioacumulación de Cd sobre los niveles de Zn, metalotioneínas (MTs) y la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el cerebro de ratas expuestas a distintas concentraciones de CdCl₂ en el agua de beber, durante 30 y 60 días. Las concentraciones de Cd se midieron por la técnica de espectroscopia de absorción atómica (horno de grafito), para ello se optimizaron y compararon dos técnicas de pretratamiento de las muestras: digestión ácida y suspensión asistida por ultrasonido; la cuantificación de Zn se realizó a través del equipo de espectroscopia de plasma acoplado inductivamente (ICP); los niveles de MTs se obtuvieron midiendo las concentraciones de grupos-SH por el método de Ellman y la actividad de la LDH se determinó espectrofotométricamente a 340 nm. La técnica de pretratamiento por suspensión resultó ser el método más confiable. En relación con los niveles de Cd, Zn y MT se evidenciaron aumentos en la dosis de 10 ppm, durante la exposición de 30 días. A los 60 días, los niveles de MT, también, aumentaron en la dosis de 10 ppm; sin embargo, a una dosis de 25 ppm se observaron altos niveles de Cd y Zn, disminución de MTs y aumentos en la actividad de la LDH. Estos resultados indicaron que en la dosis de 10 ppm, se indujo un mecanismo de respuesta celular, a través del aumento de MTs, la cual puede atrapar y disminuir la toxicidad del metal; en contraste la dosis de 25 ppm en un período de 60 días resultó ser tóxica, reflejado por el descenso en los niveles de MTs y el aumento en la actividad de la LDH, la cual refleja los requerimientos energéticos no suplidos por actividad mitocondrial en situaciones de estrés generados por la toxicidad del Cd.

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental por metales pesados tales como Hg, Pb y Cd, es un problema de salud pública, que no ha sido controlado, sobre todo en los países en vía de desarrollo. Esto debido principalmente a la utilización de estos elementos químicos en los procesos industriales, con un tratamiento deficiente de los desechos tóxicos producidos y sin un cumplimiento riguroso de las legislaciones ambientales (Cheung *et al.*, 2008). Entre los metales pesados mas peligrosos se puede nombrar el Cd, su uso se ha extendido rápidamente y su eliminación se ha convertido en un problema para los seres vivos, ya que, él puede incorporarse en la cadena alimenticia y ser concentrados por los organismos, generando fenómenos de bioacumulación y biomagnificación. En dosis muy pequeñas es biopersistente y, una vez absorbido por un organismo reside durante muchos años, generando una gran variedad de enfermedades degenerativas y cáncer, razón por la cual se ha convertido en un metal peligroso para la salud del hombre y de los animales (Marcano *et al.*, 2006; Zapata y Nusetti, 2007).

La acumulación de Cd ocurre con mayor frecuencia en suelos y aguas contaminadas, la cual se incrementa en zonas de desarrollo urbanístico, industrial, incluyendo petróleo y minería, y agropecuario. La vía principal de penetración del Cd para la población es por inhalación del humo del tabaco y por vía oral, representando esta última aproximadamente un 70% del metal incorporado por el organismo (Groten y Van Blanderen, 1994; Zenzes, 1995). La presencia del metal en los tejidos genera una gran variedad de patologías en el hígado, riñón, pulmones, testículos, páncreas, huesos, sistema endocrino y sistema nervioso central, en una diversidad de especies de vertebrados (Metha, 2001).

El cerebro acumula cantidades significativas de Cd, debido a la capacidad del metal de penetrar con gran facilidad la barrera hematoencefálica. Los altos niveles del metal en el cerebro de ratas inducen algunas patologías neurológicas, las cuales incluyen: aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, perturbación de la transmisión sináptica, hemorragia y edema cerebral, así como, malformación funcional y estructural de la retina, el cerebelo y el cerebro (Paterson *et al.*, 1999; Metha, 2001). Además, se ha observado un efecto dosis-respuesta sobre la conducta en ratas de 3 a 12 días de nacidas, como hiperactividad, aumento de la agresividad y una menor capacidad para la formación y el aprendizaje durante la vida neonatal de las mismas. En humanos, el Cd se ha asociado a enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y el síndrome de Down, entre otras (Popieluch *et al.*, 1995; Okuda *et al.*, 1997; Antonio *et al.*, 2003).

La toxicidad del Cd en el cerebro y en otros tejidos se debe principalmente al desarrollo de estrés oxidativo, debido a un aumento en la producción de radicales libres (RL). Los RL son especies químicas que tienen un electrón único, impar, en un nivel externo, y pueden generarse dentro de las células por absorción de radiación o en las reacciones de óxido reducción (redox) que ocurren durante procesos fisiológicos normales, o pueden derivarse del metabolismo enzimático de sustancias químicas exógenas. Al elevarse las concentraciones fisiológicas de los RL se pueden generar importantes alteraciones funcionales. El desbalance entre la producción de estos RL y las defensas antioxidantes provoca un daño orgánico conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales ocasionan, desde oxidación de macromoléculas, hasta el deterioro y muerte celular (Kumar *et al.*, 1996; Bagchi *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2002; Bertin y Averbeck, 2006).

El Cd posee la capacidad de incrementar la generación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), mediante la inhibición parcial de la cadena transportadora de electrones, ya que se puede ligar al sitio de unión de la semiubiquinona, afectando su capacidad de transferir electrones, provocando una acumulación de los mismos, los cuales finalmente transfieren al oxígeno molecular para formar el radical $O_2^{\cdot-}$ (Wang *et al.*, 2004). Eventualmente el $O_2^{\cdot-}$ puede transformarse de forma espontánea o a través de la superóxido dismutasa (SOD) en O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y este último puede, ocasionalmente, catalizar con hierro (Fe^{2+}) mediante reacciones de Fenton, para producir el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), el cual es altamente reactivo, y puede unirse a distintas biomoléculas (Brzóska y Moniuszko, 2001). Esta generación de RL es aun más favorecida por la inhibición de enzimas antioxidantes (catalasa, glutatióna peroxidasa, glutatióna reductasa y superóxido dismutasa), y disminución en los niveles de moléculas antioxidantes no enzimáticas tales como el glutatión inducido por el Cd. La acumulación de las ERO en las células, finalmente, generan daños oxidativos en los lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y muerte celular programada o apoptosis (Kondoh *et al.*, 2001).

El Cd también puede actuar desplazando a otros iones metálicos, principalmente zinc (Zn^{2+}), cobre (Cu^{2+}) y calcio (Ca^{2+}), en metaloenzimas y en estructuras biológicas que contienen grupos-SH, como las proteínas y las enzimas, alterando la estructura y función de las macromoléculas (Brzóska y Moniuszko, 2001). La habilidad del Cd de desplazar a otros metales, en especial al Zn, se debe a que poseen características químicas muy parecidas, tienen una configuración electrónica similar en sus orbitales externos, y ambos elementos poseen carga 2+ en su forma estable. Estos metales por tener configuraciones electrónicas muy similares pueden competir por su captación en el interior celular uniéndose a las macromoléculas, observándose entonces, como el Cd puede tomar el lugar al Zn en varios procesos biológicos importantes, es decir, uno puede influenciar la captación y fijación del otro,

dependiendo de sus concentraciones (Waalkes *et al.*, 1992). En hígado, riñón, huesos y testículos de ratas tratadas con Cd se han evidenciado cambios en los niveles de Zn; esto se ha asociado con daños oxidativos y a la interrupción de los procesos mediados o metabólicos dependientes de Zn (Brzóska y Moniuszko, 2001; López *et al.*, 2006).

El Zn es un elemento importante en los sistemas biológicos, siendo el segundo elemento de transición más abundante en el cerebro y en la retina de mamíferos (Takeda, 2000); es un componente indispensable para la función normal de más de 300 enzimas catalíticas, estructurales y de regulación, siendo el cofactor de muchos de estos sistemas enzimáticos. Participa en la expresión génica y en la unión de algunas hormonas a sus receptores, neuromodulador de la transmisión sináptica en el sistema nervioso central (SNC) y actúa como agente antioxidante (Ugarte y Osborn, 2001; Chen y Liao, 2003; Nusetti *et al.*, 2005). Muchos estudios han dirigido la importancia del Zn como un antioxidante, a través de diferentes mecanismos: (a) como cofactor para la superóxido dismutasa (SOD), parte del sistema antioxidante primario de los vertebrados (Marklund *et al.*, 1982); (b) regulación de la expresión génica de la catalasa a través del estímulo del factor de transcripción SP-1 y otros elementos de respuesta transcripcional (Tate *et al.*, 1997); (c) desplazamiento de metales activos redox de los sitios de unión en las membranas, reduciendo la iniciación de la oxidación de biomoléculas (Maret y Valle, 1998). Además, induce la síntesis de metalotioneína (MT), una proteína rica en cisteína (Cys), que ha sido mostrada como un “limpiador” de radicales hidroxilo (Sato y Bremner, 1993).

Las metalotioneínas (MTs) (Figura 1) tienen un papel importante en los procesos de control de la toxicidad de metales pesados, regulación del metabolismo, transporte y almacenamiento de metales esenciales como Zn y Cu, y protección frente al estrés oxidativo (Zapata y Nusetti, 2007). Existe una gran variedad de evidencias que demuestran aumentos en las concentraciones

de MTs en diferentes tejidos de invertebrados y vertebrados superiores e inferiores, luego de una exposición a Cd (Viarengo *et al.*, 1999). Sin embargo, en cerebro no ha sido sistemáticamente estudiado.

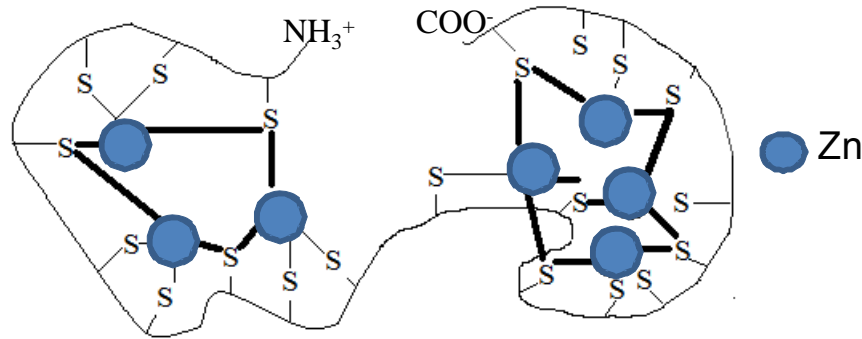


Figura 1. Estructura de la metalotioneína.

Todos los mamíferos expresan por lo menos cuatro tipos de MT, estas isoformas son conocidas como: MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV. Estas proteínas están compuestas de una única cadena polipeptídica de 61 a 68 aminoácidos, 20 de los cuales son residuos de Cys, y, notablemente, carecen de aminoácidos aromáticos o de histidina (His). Las MTs pueden unir 7 metales divalentes (Zn(II), Cd(II)) y hasta 12 monovalentes (Cu(I)) mediante enlaces con los grupos tioles de las Cys (Vasák y Kägi, 1994). El metal más frecuentemente encontrado es el Cd, en ausencia de disulfuro (Nartey y Cherian, 1987). En distintas investigaciones se ha encontrado que las MT-I y II se expresan en casi todos los tejidos de los mamíferos (Vela *et al.*, 1997; Acarin *et al.*, 1999; Carrasco *et al.*, 1999). En el cerebro se encuentran las MT-I, II y III, la que más abunda es la MT-III, la cual es considerada la isoforma específica del cerebro (Van Lookeren Campagne *et al.*, 1999).

Las MT-I y II se inducen cuando hay altos niveles de Cd y de Zn y un estado de estrés oxidativo en el cerebro. Sin embargo, existen evidencias recientes de que la MT-III, también se induce temporalmente en presencia de metales y

estrés oxidativo con el fin de regular la homeostasis del Zn. La MT-III se localiza principalmente en las neuronas Zn sinérgicas, y esta isoforma, al igual que los otros miembros de su familia, se encarga de proteger a las células cuando hay algún tipo de lesión neuronal (Méndez *et al.*, 2003). La mayoría de sus propiedades dependen de su estructura inusual, y en particular de la presencia de 20 residuos de Cys, que son los que les confieren una alta afinidad por los metales. La acumulación de Cd en el cerebro de ratas, induce cambios en los niveles de las MTs; no obstante sus funciones específicas, no han sido claramente establecidas. Bajos niveles de esta proteína se han relacionado con lesión cerebral y a su vez con la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer (Choudhuri *et al.*, 1996; Colangelo *et al.*, 2002).

Alteraciones en el metabolismo celular también han sido investigadas como base para la evaluación de la toxicidad del Cd (Vega y Alvarez, 2001). Este metal afecta la actividad de ciertas enzimas que participan en el metabolismo de los carbohidratos, por su unión a grupos SH y desplazamiento del cofactor Zn, afectando la estructura y función de las mismas (Ghafghazi y Mennear, 1973; Chung y Maines, 1987). Una de estas enzimas es la lactato deshidrogenasa (LDH; EC 1.1.1.27) (figura 2), la cual es una enzima tetramérica clave en la vía glucolítica (Nelson y Cox, 2000). Ella cataliza la reducción del piruvato, procedente de la glucólisis, para luego experimentar oxidación mitocondrial en tejidos tales como el cerebro, retina, riñón, músculo y otros (Acosta y Kalloniatis, 2005; Nelson y Cox, 2000). En el cerebro se localizan 5 isoformas de la enzima, LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5; predominando la LDH-1 y la LDH-5. La LDH-5 cataliza la conversión de piruvato a lactato, mientras que la LDH-1 cataliza la conversión de lactato a piruvato. Este tejido tiene la capacidad de regular la actividad de las dos variantes isozimicas dependientes de la tensión de oxígeno presente en el tejido (Acosta y Kalloniatis, 2005). La LDH-1 favorece la oxidación del lactato durante los períodos de hipoglucemia o hipoxia y, en consecuencia, es responsable de los

resultados inmediatos de la protección metabólica de las neuronas durante los problemas metabólicos transitorios. Esta enzima aumenta en traumatismos cerebrales, afecciones degenerativas, convulsiones, meningoencefalitis y tumores (Schurr *et al.*, 1997; Nelson y Cox, 2000; Karthikeyan y Bavani, 2009). Dado que el Cd puede alterar la estructura y función de esta enzima, es factible que la incorporación del metal en el cerebro afecte los mecanismos de control de la actividad de la LDH, lo cual tendría impactos negativos en el metabolismo energético del cerebro.

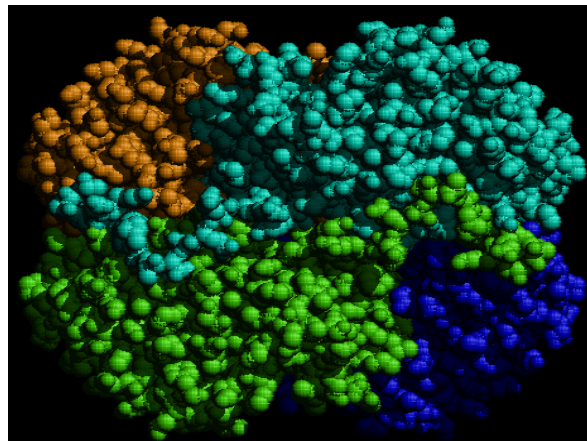


Figura 2. Estructura de la enzima lactato deshidrogenasa en 3D.

El Cd tiene la habilidad de bioacumulación en muchos tejidos, que a concentraciones en el orden de ppb y ppt puede efectivamente alterar las funciones bioquímicas de una gran variedad de enzimas y proteínas dependientes de metales trazas como el Zn. Por tal motivo se hace necesaria la cuantificación de ambos metales a través de técnicas analíticas altamente sensibles, con el fin de determinar los efectos de su interacción en tales sistemas enzimáticos.

Generalmente las técnicas de espectroscopia atómica de llama o plasma, se utilizan para determinar la cantidad de elementos metálicos en distintos tipos de

muestras, basados respectivamente por la absorción o emisión de la radiación visible o ultravioleta de sus átomos en estado gaseoso. La mayoría de los compuestos, a temperaturas suficientemente altas, se descomponen en átomos en fase de vapor. Las muestras se vaporizan entre 2000–6000 K, y la concentración de átomos, se determina midiendo la absorción o la emisión a longitudes de onda características (Harris, 2004).

Cuando las cantidades de muestra son extremadamente pequeñas la absorción atómica por llama no puede ser empleada, en estos casos es necesario utilizar un horno de grafito como atomizador (figura 3). Esta técnica es la espectrofotometría de absorción atómica electrotrémica (ETAAS) en la cual se emplea un atomizador calentado eléctricamente (horno de grafito) en lugar del quemador de llama (Harris, 2004).

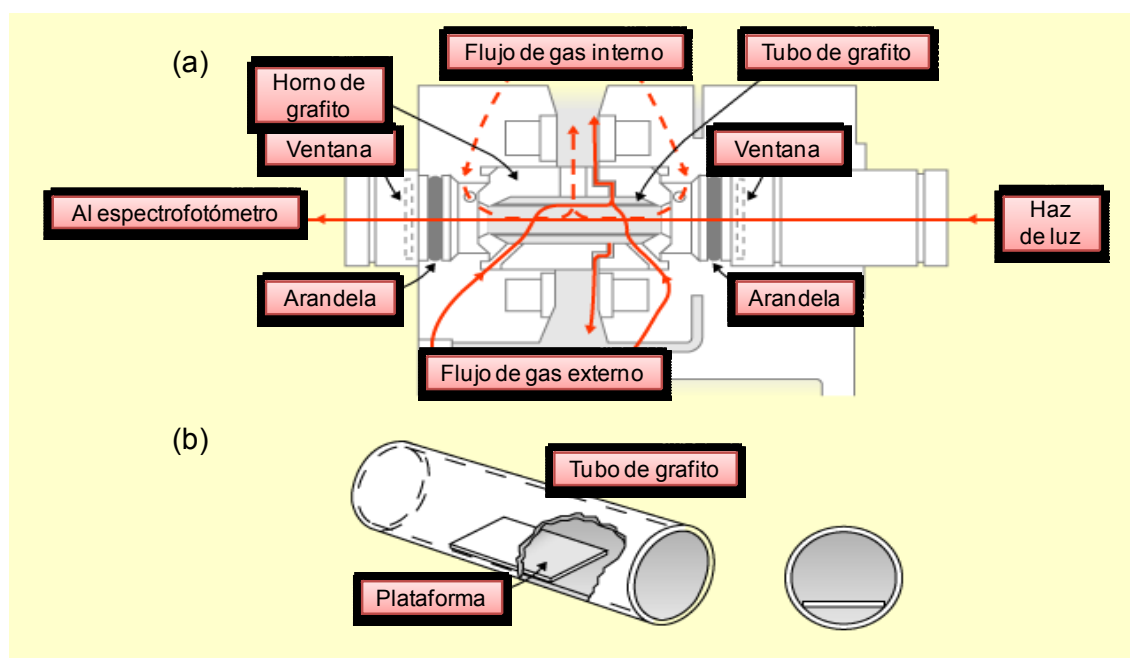


Figura 3. (a) Sección transversal de un horno de grafito y (b) La plataforma L'vov y su posición en el tubo de grafito.

Los atomizadores electrotrémicos aparecieron por primera vez en el mercado a principio de la década de 1970, por lo general son más sensibles que los

atomizadores de llama y requieren de menos muestra. En este caso la muestra completa se atomiza en un corto período y el tiempo de residencia promedio de los átomos en la trayectoria óptica es de un segundo o más (Skoog *et al.*, 2008).

En esta técnica el calentamiento de la muestra se realiza en cuatro etapas, a temperaturas crecientes: secado, calcinación, atomización y limpieza. Estas consisten en evaporar la muestra, primero a una temperatura baja y luego convertirla en cenizas a una temperatura un poco más alta, e inmediatamente la corriente se incrementa con rapidez a varios cientos de amperes, que hacen que la temperatura se eleve de 2000 a 3000°C para que se produzca la atomización del elemento. Para eliminar el material volátil se usa Ar o N₂ como gases de purga durante cada uno de los pasos, excepto el de atomización (Harris, 2004; Skoog *et al.*, 2008).

En el horno se inyectan de 0,5 a 100 µl de muestra a través de un orificio del horno. En el caso de metales trazas volátiles, es necesario colocar en su interior un dispositivo de grafito, denominada plataforma de L'vov, con el fin de agregar la muestra en la misma, en lugar de la superficie interna del horno. La plataforma sólo toca los lados del horno por el borde inferior de éste, de forma que el calor de sus paredes no calienta la muestra directamente, sino que se calienta principalmente por medio de calor radiado, que tiende a producir un calentamiento más uniforme (Harris, 2004; Rubinson y Rubinson, 2004; Skoog *et al.*, 2008).

En la actualidad se han implementado atomizadores metálicos (MFAAS) de tungsteno, molibdeno y platino, en lugar de grafito. Estos ofrecen grandes ventajas en comparación con los atomizadores de grafito, entre las cuales se tienen: la tasa de incremento de temperatura es mayor, la distribución de temperatura en el horno es homogénea, la solución de la muestra no permea en

las paredes del tubo, la vida útil del horno es mayor y presenta mayor reproducibilidad en las medidas (Kaneco *et al.*, 2007; Inui *et al.*, 2010).

La espectroscopia atómica de emisión es fundamentalmente lo mismo que la de absorción, la diferencia es que no necesita una fuente de luz. Los átomos en estados electrónicos excitados emiten su radiación característica al regresar a su estado basal (fundamental), donde la intensidad de la emisión de un elemento a una longitud de onda característica, es proporcional a la concentración del elemento en la muestra (Skoog *et al.*, 2008).

A pesar de que la técnica de ETAAS tiene un límite de detección bastante bajo, en ella están presentes muchas interferencias, las cuales se eliminan utilizando un plasma de argón de acoplamiento inductivo (ICP) como mecanismo de atomización de la muestra. En el plasma, la temperatura es dos veces mayor que en la llama y el tiempo de residencia del analito es aproximadamente el doble, por lo tanto, la atomización es más completa y la sensibilidad mejora. La atomización tiene lugar en un medio inerte desde el punto de vista químico, lo que aumenta también el tiempo de vida del analito al evitar la formación de óxidos (Rouessac y Rouessac, 2003; Harris, 2004; Skoog *et al.*, 2008).

Las fuentes de plasma son relativamente nuevas y se desarrollaron ampliamente a partir de 1970. Espectroscópicamente un plasma es un gas parcialmente ionizado, eléctricamente neutro en su conjunto y confinado en un campo electromagnético. La Figura 4 constituye un esquema de una fuente de plasma acoplado inductivamente denominada antorcha. Consiste en tres tubos concéntricos de cuarzo, a través de los cuales fluye una corriente de argón, los cuales están rodeados en la parte superior por una bobina de inducción, alimentada por un generador de radiofrecuencias (Rouessac y Rouessac, 2003; Rubinson y Rubinson, 2004).

La determinación de elementos trazas en matrices complejas, exigen un amplio y arduo procedimiento de preparación de muestra y/o regímenes de extracción antes del análisis, con el fin de facilitar la inyección de la misma en los equipos y permitir la cuantificación del analito (Rivero-Huguet *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2008). Las técnicas tradicionales de pretratamiento para el análisis de metales en muestras sólidas, requieren de cantidades considerables de muestra y reactivos (ácidos concentrados), las cuales pueden ser realizadas en un microondas o una plancha, generando esta última una gran cantidad de desventajas. Estas técnicas incrementan los costos y el tiempo invertido, generando además, residuos peligrosos y la posibilidad de contaminar la muestra con dichos reactivos (Hoenig *et al.*, 1996; Rivero-Huguet *et al.*, 2006; Bozhanov *et al.*, 2007).

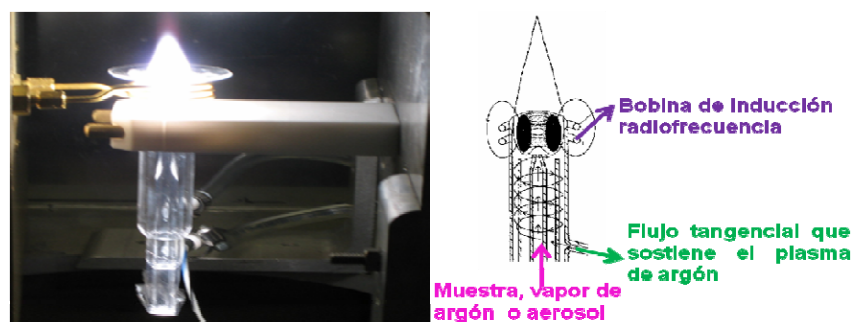


Figura 4. Fuente de plasma acoplado inductivamente.

Por esta razón, en la actualidad se están implementando nuevas técnicas de pretratamiento de muestras, como la suspensión asistida por ultrasonido, que permite disminuir todos los riesgos y desventajas de las técnicas tradicionales. El empleo de esta metodología se apoya en el hecho de que la técnica de espectrofotometría de absorción atómica electrotrémica, no sólo permite la inyección de muestras en forma de solución, sino también, el análisis directo de muestras sólidas y la inyección de muestras suspendidas (sólido-líquido) (Araujo *et al.*, 2008). El ultrasonido en este caso, es un requisito indispensable durante la preparación de las suspensiones, ya que permite obtener una mezcla

homogénea, que se mantiene estable durante el análisis. Convirtiéndose así, en un poderoso método para la determinación de elementos trazas en materiales sólidos (Almela *et al.*, 2006).

En vista del impacto que tiene el Cd en la alteración de una gran variedad de reacciones bioquímicas en el SNC, sobre todo las que dependen del bioelemento Zn, el presente trabajo de investigación está orientado hacia la determinación de la bioacumulación de Cd en el cerebro de ratas Sprague-Dawley, expuestas a diferentes concentraciones de este metal durante 30 y 60 días, y de esta manera evaluar sus efectos sobre los niveles de Zn, los niveles de MT (proteína importante en el control de toxicidad de metales pesados) y modulación de la actividad de la enzima LDH (indicador de cambios en el metabolismo glucolítico del tejido).

METODOLOGÍA

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos, de aproximadamente 180 a 200 g, provenientes del bioterio del Instituto Venezolano de Investigación Científica (IVIC), las cuales fueron trasladadas al Bioterio del Departamento de Biología, Universidad de Oriente. Las ratas tuvieron acceso a ratarina comercial y agua *ad libitum*.

Exposición a Cd

Cuatro grupos de animales, cada uno conformado por ocho ratas, fueron tratados con concentraciones nominales de cloruro de cadmio (CdCl_2), de 10, 25 y 100 ppm, respectivamente, en el agua de beber durante 30 y 60 días. A los grupos controles no se le suministró CdCl_2 . El protocolo experimental estuvo basado en las recomendaciones neurotoxicológicas del Cd indicadas para ratas por Zeevalk (1997).

Obtención de las muestras

Al finalizar los períodos de exposición, las ratas fueron anestesiadas con éter dietílico y luego sacrificadas, para así realizar la extracción y disección de los cerebros; estos se dividieron en dos partes (región izquierda y derecha) y seguidamente fueron pesados y colocados en tubos eppendorf (1,5 ml) a 4°C. Finalmente las muestras fueron preservadas a -70°C hasta el momento de su análisis. La región izquierda se utilizó para llevar a cabo la cuantificación de los metales (Cd y Zn) y la región derecha para los análisis bioquímicos (MT y LDH).

Equipo de Absorción Atómica

Se utilizó un espectrofotómetro marca Varian modelo Techtron AA-875, con corrector de fondo de deuterio. Equipado con un horno de grafito GTA-95

provisto de un automuestreador GTA-95 para la introducción de las muestras. Se emplearon tubos de grafito y plataformas, ambos nuevos y recubiertos de grafito pirolítico. Se usó argón como gas de purga. El tiempo y los perfiles de absorbancia se representaron en una impresora HP 9872A.

Equipo de Emisión Atómica

Se empleó un espectrofotómetro de emisión de plasma acoplado inductivamente (ICP) marca Perkin Ellmer, modelo optimo 3000. Dotado de una antorcha de cuarzo desmontable, un nebulizador y una bomba peristáltica tipo Meinhard. Se usó argón como gas plasmogeno.

Análisis Químicos

Las muestras previamente pesadas fueron homogeneizadas en 500 µl de agua nanopura. Estas fueron trasladadas bajo hielo seco al Laboratorio de Química Analítica del IVIC para la realización de los distintos análisis químicos. Primeramente se optimizaron y compararon dos metodologías de pretratamiento de las muestras: digestión ácida y suspensión asistida por ultrasonido. Seguido de la cuantificación de los metales por absorción y emisión atómica. Para la comparación de los métodos se realizó un *pool* compuesto de ocho muestras de cerebro.

Suspensión asistida por ultrasonido: en balones aforados de 25 ml se agregaron alícuotas de 500 µl del *pool* previamente preparado, seguido de 1 ml de HNO₃ y 500 µl de tritón X-100 al 0,5%, enrasándose con agua desionizada. Los balones se agitaron cuidadosamente y se colocaron en un equipo de ultrasonido durante 1h. Transcurrido el tiempo las soluciones fueron trasvasadas a envases de Nalgene, y con el fin de homogeneizar la mezcla, estos fueron colocados en un agitador mecánico durante 10 min, para luego proceder a la realización de los distintos análisis de metales.

Digestión ácida: en tubos de ensayos se agregaron 500 μl del *pool* y 1 ml de HNO_3 concentrado, especial para el análisis de trazas. Las preparaciones se mantuvieron en frío por 5 min aproximadamente; posteriormente se colocaron en un bloque digestor a una temperatura de 58°C , dejándose aproximadamente por 18 h, al cabo de este tiempo se retiraron las muestras y mantenidas en frío se les agregó 500 μl de H_2O_2 y se dejó en reposo por 5 min, para luego ser regresados al bloque digestor, donde se dejaron 6 h adicionales. Los tubos se retiraron del bloque digestor y se dejaron en reposo durante 1h. Seguidamente las muestras ya digeridas fueron trasvasadas a un balón aforado de 25 ml y aforadas con agua desionizada, agitándose manualmente con el fin de obtener una mezcla homogénea. De igual manera se preparó un blanco y un patrón de 4 ppb de Cd, para verificar la pérdida de este metal durante el proceso de digestión. El proceso de enfriamiento se realizó a fin de evitar una reacción exotérmica asociada a la adición de los reactivos. Una vez preparadas las muestras se procedió a la realización de los distintos análisis químicos.

Comparación de las metodologías: una vez optimizadas las dos metodologías de pretratamiento, se usó el método de adición patrón (Skoog *et al.*, 2008) a fin de determinar cual de los dos procedimientos es más sensible. Para ello se utilizaron 10 μl de soluciones patrón (0, 0,5, 1, 2 y 3 ppb de Cd) y 10 μl de las muestras sometidas a las dos metodologías, a través del empleo del automuestreador del equipo.

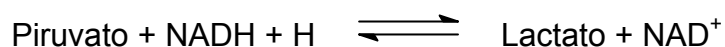
Determinación de las concentraciones de Cd: una vez escogido el método de pretratamiento de las muestras más confiable, se procedió a determinar las concentraciones de Cd. Esta cuantificación se realizó por espectroscopía de absorción atómica por horno de grafito a $\lambda = 228,8 \text{ nm}$ (condiciones de trabajo en Apéndice A).

Determinación de las concentraciones de Zn: los niveles de este metal en las muestras fueron obtenidos por la técnica de espectroscopía de plasma acoplado inductivamente (ICP) a $\lambda = 213,857$ nm.

Análisis Bioquímicos

Primeramente se realizó la determinación de los niveles de MT y posteriormente se midió la actividad de la LDH. Estos análisis fueron realizados en el laboratorio de Ecotoxicología del Departamento de Biología de la UDO.

Análisis enzimático (LDH): los tejidos previamente pesados, se lavaron en un buffer fosfato de potasio (PB) 50 mmol/l en frío (4°C) a pH 7,4. Se realizó un homogeneizado de 10% (m/v) de cada tejido (0,1 g/ml) en PB en frío. El homogenizado fue centrifugado a 12 000 g a 4°C en una centrifuga refrigerada durante 30 min, para remover núcleo, membranas y mitocondrias. La fracción citosólica fue recolectada para así finalmente realizar diluciones con PB para el ensayo de la LDH. La actividad máxima de la LDH en la fracción citosólica fue determinada a 25°C siguiendo la rapidez inicial de oxidación de NADH (coef. Ext.: $6,22 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) por piruvato a 340 nm. La mezcla de la reacción consistió en la adición de 930 μl de PB, 20 μl NADH (0,2 mmol/l), 10 μl del sobrenadante obtenido y la reacción se inició por la adición de una alícuota de 40 μl de piruvato (0,15 mmol/l) (Acosta y Kalloniatis, 2005). Para llevar a cabo este análisis también se empleó un blanco sin piruvato. La concentración de los sustratos de la mezcla de reacción fueron ajustados para obtener una máxima tasa de actividad, expresadas como unidades internacionales (micromoles de sustrato convertidos a producto) por gramos de masa de tejido húmedo (unidades por minutos, por gramos de masa húmeda). En este análisis se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS lambda 2 S, acoplado a un sistema computarizado de análisis cinético (UV KinLab Software Module, versión 2.85.04).



Extracción y cuantificación de MT: el contenido de metalotioneínas se evaluó de acuerdo con el método propuesto por Viarengo *et al.*, (1997). Las muestras se homogeneizaron en frío con 4 ml de buffer de homogenización: tris-HCl (20 mmol/l), sacarosa (0,5 mol/l), leupeptina (0,006 mol/l), fenil-metil-sulfoxido (PMSF) (0,5 mol/l) y dithiothreitol (DTT) al 0,01% a pH 8,6; en una relación de 25% m/v a 4°C. Los homogenizados fueron centrifugados a 14 000 g durante 20 min a 4°C, en una centrifuga refrigerada, y a las fracciones solubles resultantes se les agregaron 1,05 ml de etanol frío (-20°C) y 80 µl de cloroformo (por cada ml de fracción). Las preparaciones se centrifugaron a 6 000 g por 10 min a 4°C. A los sobrenadantes colectados se les añadió 1 mg de RNA, 40 µl de HCl al 37% y 3 ml de etanol frío (87%), se mezclaron muy bien y se mantuvieron a 20°C por 1 hora, luego se centrifugó a 6 000 g por 10 min a 4°C. Cada sedimento fue resuspendido en 1 ml de una solución de homogenización: etanol al 87% y cloroformo al 1% y se centrifugó nuevamente a 6 000 g durante 10 min. El sedimento obtenido fue mezclado con 300 µl de una solución de buffer tris-HCl (5 mmol/l) y EDTA (1 mol/l) a pH 7. Seguidamente se le agregó 1ml de DTNB (0,43 nmol/l) diluido en buffer fosfato sódico (0,2 mol/l) a pH 8 (Ellman, 1959). Las muestras, finalmente, fueron centrifugadas a 3 000 g por 10 min, se leyó la absorbancia del sobrenadante a 412 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS lambda 2 S, acoplado a un sistema computarizado; la concentración de MTs fué estimada utilizando una curva de calibración para glutation reducido (GSH) y un estándar de 0,3 mmol/l. Los niveles de MT se expresaron en pmol de MT/g.m.h, estableciendose la siguiente relación equimolar (asumiendo que la tionina enlazadora de Cd, Zn de cerebro de ratas tiene un contenido de cisteína de 20 Cys/mol MT).

$$1 \mu\text{mol SH} = 1 \mu\text{mol GSH} = 0,050 \mu\text{mol MT}$$

Análisis Estadísticos

Las diferencias probabilísticas entre las distintas condiciones experimentales se obtuvieron a través del análisis estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis (KW) del programa estadístico INSTAT 2 Graphpad, con el propósito de determinar posibles diferencias significativas entre las medianas de los grupos experimentales, según los tratamientos propuestos. En aquellos tratamientos donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$), se aplicó el análisis *a posteriori* de Dunn. Los niveles de todos los parámetros estudiados se expresaron en relación a los gramos de masa húmeda de muestra (gmh).

RESULTADOS

A continuación se expondrán los resultados obtenidos en el presente trabajo. Primeramente, se presentarán los correspondientes a la optimización y comparación de dos metodologías de pretratamiento de las muestras y seguidamente, se mostrarán los niveles de Cd, Zn, MT y la actividad de la LDH de acuerdo a cada período de exposición (30 y 60 días).

Metodologías de pretratamiento de las muestras de cerebro

Se compararon dos metodologías analíticas de pretratamiento de las muestras para la determinación de Cd, por la técnica de espectroscopia de absorción atómica por horno de grafito: digestión ácida y suspensión asistida por ultrasonido. Para ello, se utilizaron muestras provenientes de un *pool* y también una solución patrón de Cd (Figura 5).

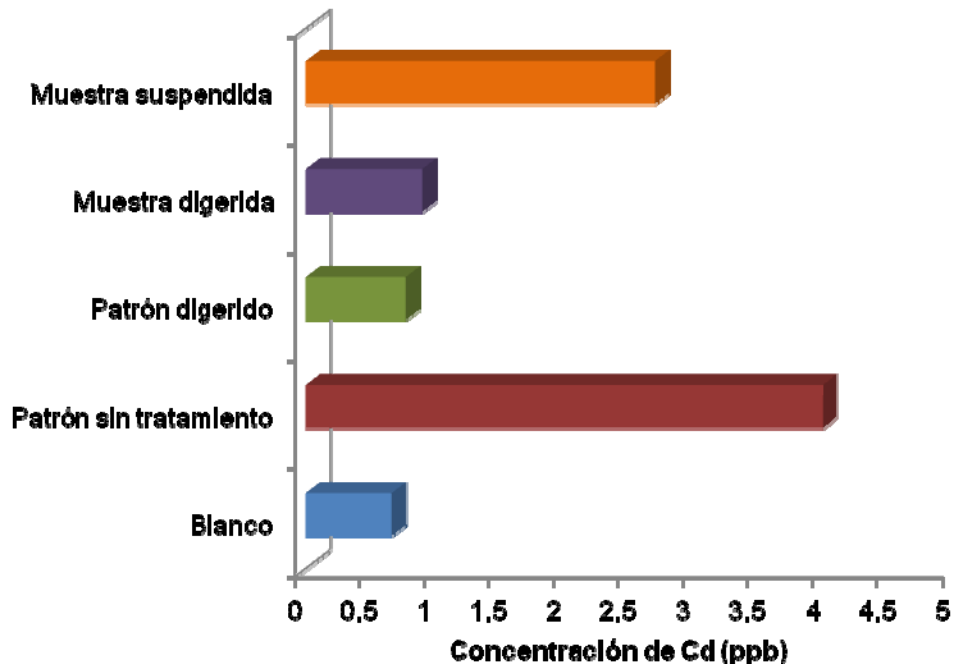


Figura 5. Concentraciones de Cd encontradas por las dos metodologías de pretratamiento.

Entre las técnicas tradicionales de pretratamiento de muestras tenemos, la digestión a presión atmosférica que combina el uso de ácidos concentrados con la aplicación de calor. Esta metodología no es la más conveniente, cuando se determinan elementos metálicos altamente volátiles, ya que acarrea la pérdida del analito, entre estos metales tenemos el Cd, el cual se volatiliza a 60 °C. Por esta razón las digestiones ácidas se realizaron a 58 °C. En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos para las dos metodologías de pretratamiento de las muestras, en la cual se observa que la solución patrón (4 ppb) que fue sometida al proceso de digestión ácida, reporta claras evidencias de la pérdida del analito, en comparación con la solución patrón que no se sometió a las dos metodologías de pretratamiento. De igual manera, la muestra que se le aplicó digestión ácida también evidenció pérdidas de Cd, en comparación con la muestra que recibió el tratamiento de suspensión asistida por ultrasonido. Todos estos resultados ponen de manifiesto la poca confiabilidad del método de digestión ácida para este metal, el cual es sensible a altas temperaturas. Todos estos resultados nos indican, que la metodología de suspensión asistida por ultrasonido es la más adecuada para el análisis de Cd en las muestras de cerebro, para ser analizadas por horno de grafito.

Las metodologías fueron optimizadas, tanto la digestión ácida como la suspensión asistida por ultrasonido. A esta última se le determinó la estabilidad de la emulsión y se estableció el volumen adecuado de HNO₃ para garantizar la confiabilidad de los resultados de la misma. Encontrándose que la suspensión se mantuvo estable por más de 48 horas y el volumen adecuado de ácido fue de 1 ml.

Con el fin de validar el método de suspensión, descartar la posibilidad de alguna contaminación y además determinar cual metodología es más sensible para el análisis de Cd, se utilizó la técnica de adición patrón, con los dos procedimientos ya optimizados. Encontrándose que en la muestra del *pool*,

ambas arrojaron una muy buena similitud en la concentración de Cd, para la digestión ácida el valor fue de 0,56 ppb y para la suspensión asistida por ultrasonido fue de 0,55 ppb.

La evaluación de la sensibilidad de calibración de las metodologías, se realizó por comparación de los valores de las pendientes de las curvas, encontrándose, que estas fueron iguales ($m= 0,06$). Por otro lado, al evaluar la desviación estándar del valor de concentración extrapolado en el eje x, también se encontró que estas fueron muy similares. Evidenciando que ambos métodos presentan igual sensibilidad (Apéndice B, Figura 6).

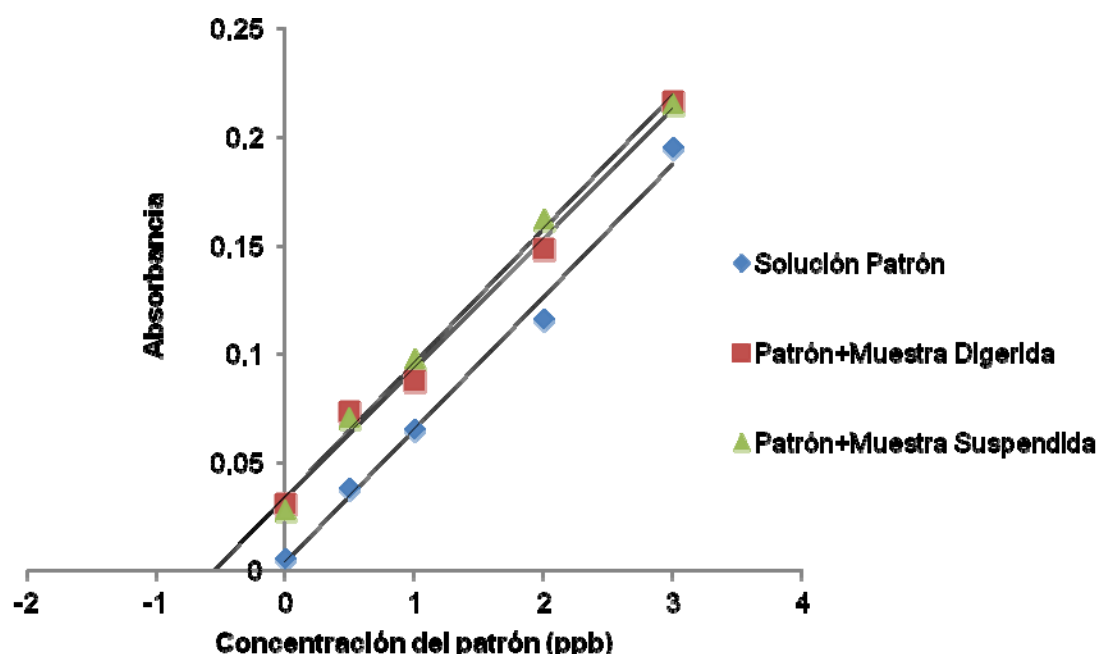


Figura 6. Concentraciones de Cd por adición patrón en muestras sometidas a las dos metodologías de pretratamiento.

En base a los resultados obtenidos, se escogió la metodología de suspensión asistida por ultrasonido como la técnica de pretratamiento de las muestras mas adecuada. Esta presenta múltiples ventajas, entre las cuales se pueden mencionar las siguientes: disminuye el tiempo de preparación de las muestras

por ser un tratamiento menos laborioso, reduce el riesgo de contaminación por los ácidos empleados ya que el volumen utilizado es bajo, genera menos pérdida de analito por volatilización por no necesitar calor, puede ser aplicada tanto en muestras orgánicas como inorgánicas. Por todas las ventajas antes mencionadas esta técnica es ampliamente utilizada en la bibliografía para el análisis de Cd, en materiales biológicos sólidos como: hígado, riñón, retina, cerebro, entre otros (Acar, 2001; Almela *et al.*, 2006; Caballo-López y Luque., 2007)

Niveles de Cd, Zn, MT y actividad de la LDH en el cerebro de ratas expuestas a Cd durante 30 días.

En la exposición de 30 días las ratas expuestas a 10 y 25 ppm de Cd ingirieron en su totalidad el agua servida. A diferencia de las ratas expuestas a 100 ppm de Cd, que consumieron un 75% del volumen total servido durante esta exposición. El peso de las ratas no fue afectado por las dosis administradas de Cd.

Los niveles de Cd (ppb) en el cerebro de ratas tratadas con las distintas dosis aumentaron significativamente con respecto al control ($0,91 \pm 0,09$), presentando las concentraciones mas altas la dosis de 10 ppm ($2,6 \pm 0,9$). A 25 ppm se acumuló ($1,63 \pm 0,27$) y a 100 ppm ($1,92 \pm 0,47$) ($p < 0,05$ por el análisis estadístico no paramétrico KW; Apéndice C, Figura 7).

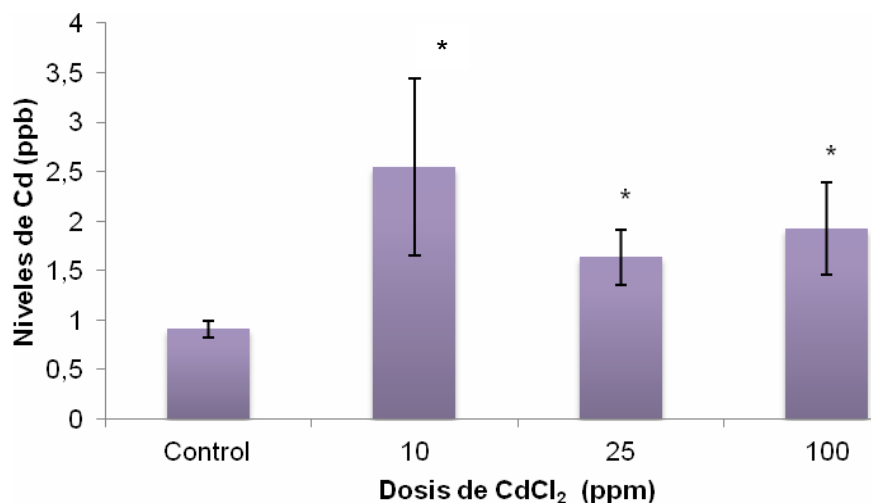


Figura 7. Concentraciones de Cd en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 30 días. * $p < 0,05$ con respecto a los controles.

Las concentraciones de Zn (ppb) en el cerebro de las ratas tratadas con 25 y 100 ppm de Cd, no se diferenciaron de los controles. Sin embargo, a 10 ppm hubo un aumento significativo de los niveles de este metal $(8,07 \pm 0,58) \cdot 10^2$ vs $(1,66 \pm 0,23) \cdot 10^3$ ($p < 0,05$ por el análisis estadístico no paramétrico KW; Apéndice D, Figura 8).

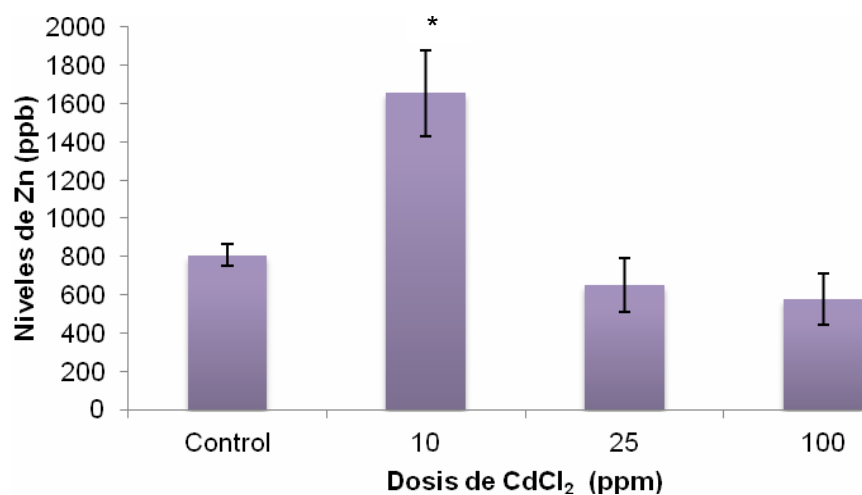


Figura 8. Niveles de Zn en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 30 días. * $p < 0,05$ con respecto a los controles.

Los niveles de MT (pmol) encontrados en el cerebro de las ratas tratadas con 25 y 100 ppm de Cd, no presentaron diferencias con respecto a los controles. Sin embargo, en la condición de 10 ppm se evidenció un aumento significativo ($3,91 \pm 0,57$ vs $4,60 \pm 0,33$)· 10^3 ($p < 0,05$ por el análisis estadístico no paramétrico KW; Apéndice E, Figura 9).

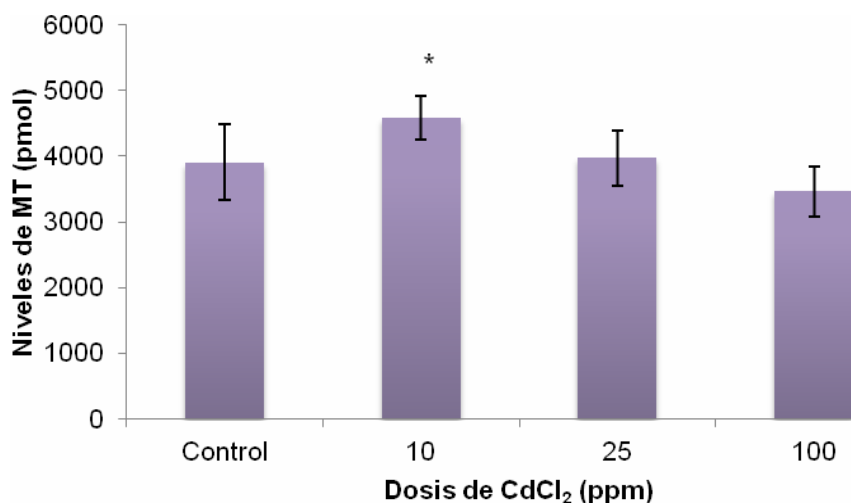


Figura 9. Niveles de MT en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 30 días.
* $p < 0,05$ con respecto a los controles.

En cuanto a la actividad de la LDH (U/g.p.h) se encontró que el tratamiento de las ratas con las dosis de 10, 25 y 100 ppm de Cd, no afectó la actividad de esta enzima en el cerebro (Apéndice F, Figura 10).

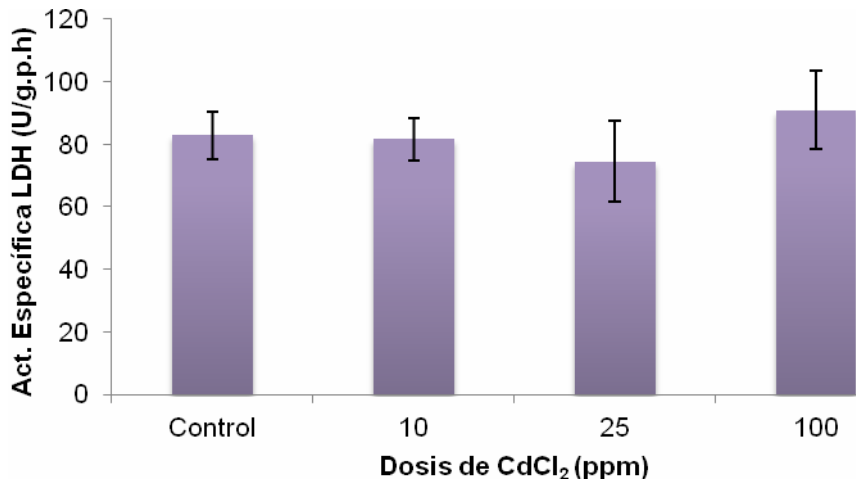


Figura 10. Actividad de la LDH en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 30 días.

Niveles de Cd, Zn; MT y actividad de la LDH en el cerebro de ratas expuestas a Cd durante de 60 días.

En la exposición de 60 días, se encontró que las ratas expuestas a 25 ppm de Cd ingirieron en su totalidad el agua servida. A diferencia de las ratas expuestas a 10 y 100 ppm de Cd, que consumieron un 75 y un 50% del volumen total servido. El peso de las ratas no fue afectado por las dosis administradas de Cd.

Los niveles de Cd (ppb) en el cerebro de ratas tratadas con 10 ppm de Cd no presentaron diferencias con respecto a los controles. A 25 ppm ($0,64 \pm 0,13$ vs $2,64 \pm 0,61$) y 100 ppm ($0,64 \pm 0,13$ vs $1,95 \pm 0,38$) se encontraron aumentos significativos ($p < 0,05$ por el análisis estadístico no paramétrico KW; Apéndice G, Figura 11).

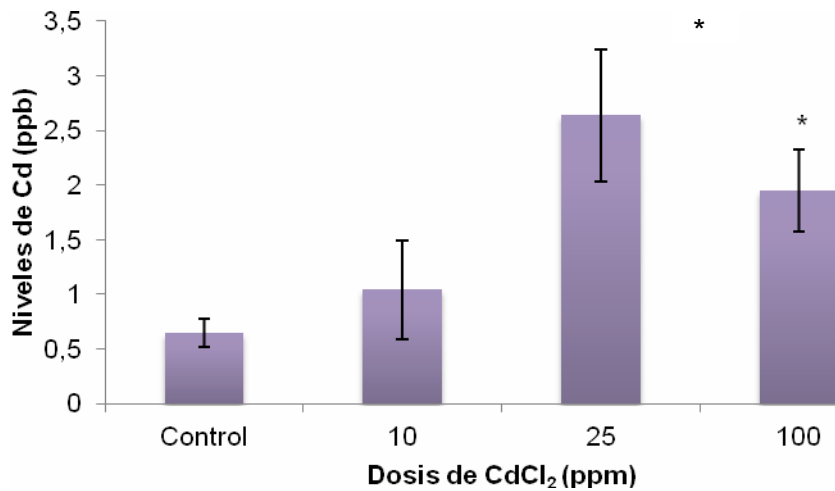


Figura 11. Concentraciones de Cd en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 60 días. * $p < 0,05$ con respecto a los controles.

Los niveles de Zn (ppb) en el cerebro de ratas tratadas con las distintas dosis de Cd fueron para: 10 $(7,57 \pm 1,14) \cdot 10^2$, 25 $(1,29 \pm 0,32) \cdot 10^3$ y 100 ppm $(1,05 \pm 0,20) \cdot 10^3$, los cuales aumentaron significativamente con respecto a los controles $(4,78 \pm 1,14) \cdot 10^2$ ($p < 0,05$ por el análisis estadístico no paramétrico KW; Apéndice H, Figura 12).

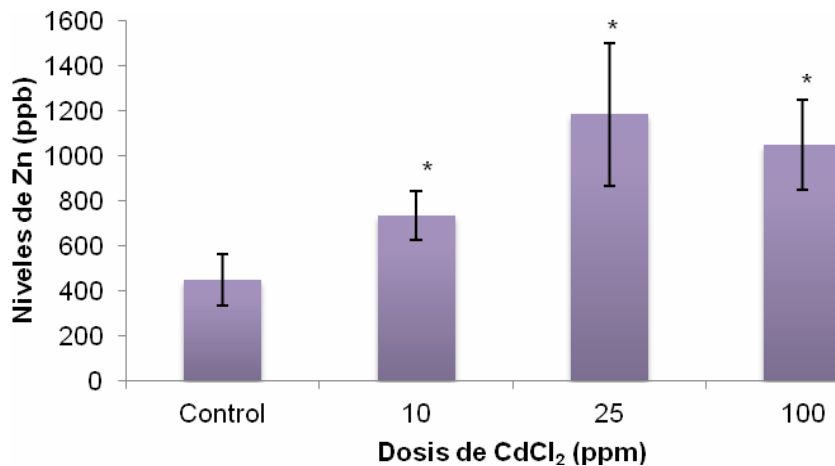


Figura 12. Niveles de Zn en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 60 días. * $p < 0,05$ con respecto a los controles.

En relación a los niveles de MT (pmol) en el cerebro de las ratas tratadas con 10 ppm de Cd, hubo un aumento significativo con respecto a los controles ($4,31 \pm 0,82$ vs $6,95 \pm 0,83$)· 10^3 . Sin embargo a 25 ppm estas disminuyeron significativamente ($4,31 \pm 0,82$ vs $2,88 \pm 0,53$)· 10^3 . A 100 ppm no se observaron cambios representativos ($p < 0,05$ por el análisis estadístico no paramétrico KW; Apéndice I, Figura 13).

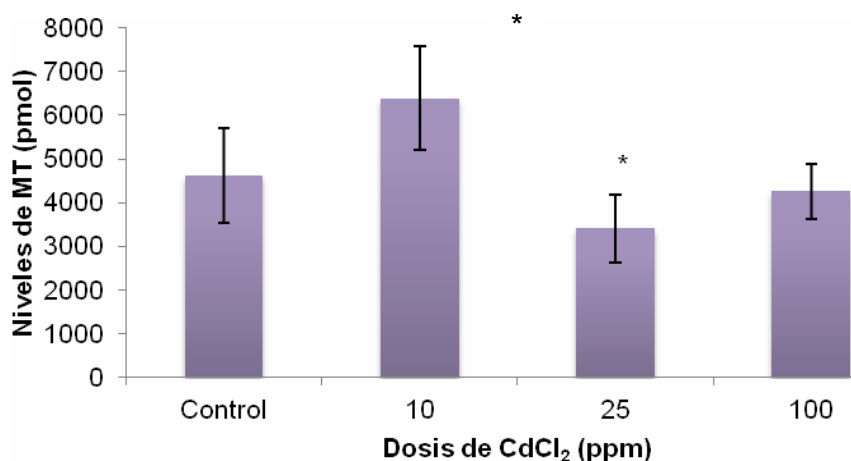


Figura 13. Niveles de MT en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 60 días. * $p < 0,05$ con respecto a los controles.

La actividad de LDH (U/g.p.h) en el cerebro de ratas tratadas con 10 y 100 ppm de Cd no presentó cambios con respecto a los controles. Sin embargo, a una dosis de 25 ppm ($6,72 \pm 0,80$ vs $9,41 \pm 1,44$)· 10^1 si se evidenció un aumento significativo ($p < 0,05$ por el análisis estadístico no paramétrico KW; Apéndice J, Figura 14).

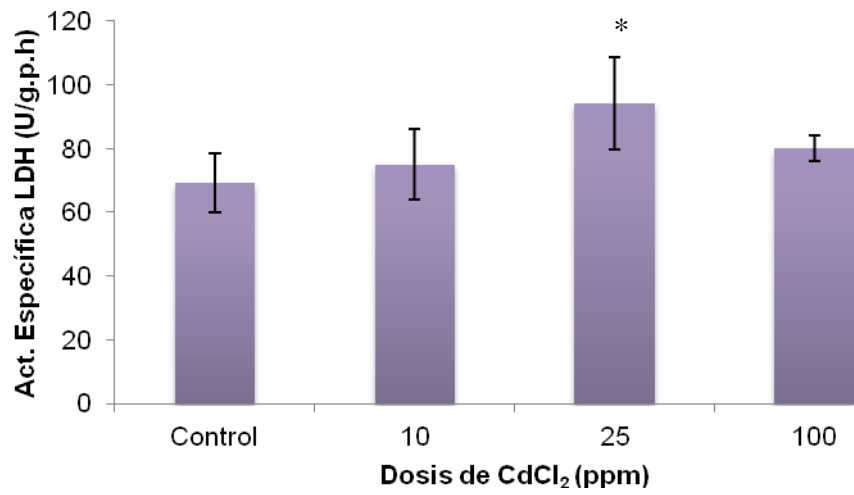


Figura 14. Actividad de la LDH en el cerebro de ratas expuestas a Cd, en un período de 60 días. *p<0,05 con respecto a los controles.

DISCUSIÓN

En este trabajo se muestra que la ingesta periódica de distintas concentraciones de Cd, resulta en la bioacumulación del metal con efectos diferenciales en los niveles del Zn, MT y la actividad de la LDH en el cerebro de ratas. Siendo el Cd un metal pesado muy abundante en el medio ambiente actual, que hace inevitable su acumulación a través de toda la cadena alimenticia y finalmente en el hombre, generando múltiples enfermedades degenerativas incluyendo las del SNC.

En la exposición de 30 días, los valores de Cd acumulados fueron significativamente más altos que los controles en las tres dosis utilizadas; sin embargo, se registró que la dosis más baja (10 ppm de CdCl₂) fue la que tuvo mayor acumulación de este metal (figura 7). En general, los distintos cambios en los niveles de acumulación del metal sugieren la estimulación de la actividad funcional del organismo de mecanismos o funciones fisiológicas o bioquímicas, que minimizan la biodisponibilidad del ión Cd²⁺ para el SNC, especialmente cuando la carga corporal del metal representa un riesgo para la salud del animal, como es el caso de las dosis de 25 y 100 ppm de CdCl₂. Alternativamente, el cerebro podría disponer de una variedad de procesos celulares para inhibir una excesiva acumulación y un efecto irreversible de la toxicidad del metal. Las principales rutas de desintoxicación de metales pesados en los tejidos incluyen la actividad de los ligandos a los metales en ciertas proteínas (MT y algunas proteínas de alta masa molar), secuestros por los lisosomas y vesículas membranosas de metal-tiolatos y complejos metal-imidazólicos de moléculas de baja masa molar (taurina e histidina). Los metales ligados a las moléculas orgánicas pueden ser dirigidos a los lisosomas y a las vesículas intracelulares, resultando en la reducción de la toxicidad de los iones metálicos por vía de exocitosis y excreción del cuerpo (Di Guilio *et al.*, 1995; Marigomez *et al.*, 2002; Mahua *et al.*, 2008). Consecuentemente, la integración y coordinación de los procesos descritos, desempeñan una función importante en la determinación de la tasa homeostática de acumulación vs desintoxicación de los metales

pesados. Esto representa un mecanismo de adaptabilidad que confiere al organismo del animal la capacidad de tolerancia a la exposición de altas concentraciones de sustancias contaminantes, particularmente de metales pesados (Calabrese *et al.*, 2007). Es interesante señalar que durante los bioensayos, a corto y mediano plazo, realizados en este estudio no se observó mortalidad de los organismos. Además no hubo alteraciones de la LDH en estas condiciones, lo que indica que el metabolismo de la glucosa no se vio afectado, principal fuente de energía en el cerebro, en los distintos grupos experimentales (figura 10).

Con relación a la dosis de 10 ppm de CdCl₂, se encontró una mayor acumulación de Cd y Zn, lo cual se asoció con un aumento significativo en los niveles de las MTs, en comparación con los otros tratamientos realizados (figura 7,8 y 9); ambos metales ejercen un efecto modulador sobre la síntesis de esta proteína. Los niveles de MT producen efectos protectores contra la toxicidad de las concentraciones prevalentes de los metales en el tejido. Este aumento de las MTs, se debe a que se dispara un mecanismo de respuesta celular asociado con expresión génica o variaciones en la tasa de recambio de la proteína (Walker *et al.*, 1996; Aschner *et al.*, 1997; Mendez *et al.*, 2003; Nusetti *et al.*, 2010)

Las altas concentraciones de Zn son indicativas de que el organismo estuvo incorporando el metal en el tejido, con el fin de aumentar los niveles de MT y de esta manera poder controlar efectivamente la toxicidad de Cd en el cerebro. La fuente de suministro de Zn se desconoce, sin embargo, se ha propuesto que proviene de la sangre, siendo posiblemente incorporado en el tejido por la actividad del transportador celular del Zn, descrito en el SNC (Nusetti *et al.*, 2005; Bonda *et al.*, 2004;). Probablemente, el aumento de Zn en el cerebro está relacionado con la formación de *novó* de una forma de MT que es capaz de unir Zn, o Cd y Zn en una relación equimolar (Eybl *et al.*, 1998; Oishi *et al.*, 2000). Este proceso podría ser importante, no solo en la retención y eliminación del Cd, sino también en la homeostasis del Zn y control del estado oxidativo celular en el cerebro. Cuando existen altos niveles de Cd en los tejidos, este desplaza al

Zn, debido a su mayor afinidad por las MTs, desde los sitios de unión con la cisteína. El aumento en la concentración de iones libres de Zn^{2+} por este desplazamiento, junto con el influjo del medio extracelular del metal, aumenta la magnitud de la síntesis de *novo* de MT, aumentando la capacidad de la proteína de retener los metales, con una efectiva protección contra sus posibles efectos tóxicos, tales como la estimulación de la producción de RL que generan estrés oxidativo (Langmade, 2000; Andrews, 2001; Jiang, 2003). Además, el Zn participa en las funciones antioxidantes de la SOD (Cu/Zn), en los mecanismos de transcripción del ADN, en la regulación génica de enzimas antioxidantes como la catalasa y actúa como protector de los grupos sulfidrilos. Todo esto con el fin de evitar la formación de los radicales $OH\cdot$ y H_2O_2 , y de esta manera poder retardar los procesos oxidativos a nivel celular (Powell, 2000; Ugarte y Osborne, 2001).

En la exposición de 60 días se encontró que en la dosis de 10 ppm $CdCl_2$, los niveles de Cd disminuyeron a valores similares a los controles, en comparación a la exposición de 30 días. Sin embargo, los valores de zinc y MT permanecieron elevados y la actividad de la LDH no fue alterada (figura 11, 12, 13, 14). En este caso la disminución en la acumulación del Cd podría atribuirse a la participación de los procesos de desintoxicación o depuración mediados por las MT, debido a que hubo un mayor tiempo de exposición, lo que permitió una mayor disponibilidad de la proteína para ejercer su función en el tejido; en contraste a lo observado en la exposición de 30 días, donde posiblemente sólo se reveló aumento de la expresión de la proteína (Sato y Bremner, 1993; Aschner *et al.*, 1997).

Con relación a la dosis de 25 ppm de Cd, se puede decir que esta es una dosis tóxica, promovido por el tiempo de exposición, lo cual se evidenció en las figuras 11, 12, 13 y 14, donde se pueden observar altas concentraciones de Cd y Zn, un descenso brusco de los niveles de MT y aumento significativo en la actividad de la LDH. Estos resultados sugieren que los animales expuestos desarrollaron un estado de estrés, que pudo haber ocasionado la disfunción del metabolismo energético, dado que el Cd altera la función normal de las mitocondrias (Vojtisek *et al.*, 2008). La generación de energía por vía

glucolítica anaerobia aumenta en estas condiciones, lo cual se revela por el incremento de la LDH, siendo esto detrimental para la viabilidad funcional del cerebro. La toxicidad sobre las mitocondrias genera altos niveles de RL, lo cual acentúa un nivel de estrés oxidativo con implicaciones neuropatológicas. Un metabolismo aeróbico limitado puede comprometer el mantenimiento de las funciones de las células basales y la eficacia de los mecanismos de desintoxicación de metales (Nuseti *et al.*, 2010), como se observó en la figura 13, donde los niveles de MT bajaron significativamente en la dosis de 25 ppm a pesar de los altos niveles de Zn (figura 12), dejando de esta manera al tejido expuesto a la toxicidad del metal, reflejado por el incremento de la demanda energética asociada con la vía glucolítica, como lo sugirió el aumento de la actividad de la LDH (figura 14).

El aumento de la LDH se ha relacionado con un incremento en el suministro de ATP, en la vía glucolítica anaerobia, con el propósito de suplir los requerimientos energéticos cuando la actividad mitocondrial esta temporalmente inhibida por la toxicidad del metal. Es ampliamente conocido que los niveles sub-letales de Cd disipan el potencial de la membrana mitocondrial en invertebrados y vertebrados, alterando de esta manera todos los procesos bioquímicos fundamentales que se encargan de producir energía a partir de nutrientes por medio de oxígeno, lo que trae como consecuencia el agotamiento de ATP (Winkler *et al.* 2000; Wang *et al.*, 2004; Nuseti *et al.*, 2010).

Un comportamiento similar con relación a la actividad de la LDH, se observó en la investigación realizada por Karthikeyan y Bavani (2009), quienes encontraron aumentos en la actividad de esta enzima en riñon, durante un tratamiento prolongado con Cd. De manera mas específica ellos encontraron que la actividad de la LDH-1, relacionada con los mecanismos de defensa antioxidantes, y la LDH-2, enzima marcadora de la lesión hepática, aumentaron significativamente, lo que coincidió con los resultados encontrados en el presente estudio. Aunque en este trabajo no se está determinando la actividad de los distintos tipos de LDH, es importante mencionar que la LDH-1 y LDH-5 son las que mas abundan en el cerebro y existen evidencias de que estas aumentan en traumatismos cerebrales e isquemia (anaerobiosis), actuando como marcadores de posibles daños en el tejido, ocasionados en momentos de estrés. En este trabajo se midió

la actividad total de la LDH, por lo que no se sabe cual de las isoformas fueron las afectadas (Schurr *et al.*, 1997; Acosta y Kalloniatis, 2005; Valko *et al.*, 2007; Karthikeyan y Bavani, 2009).

En cuanto a la dosis más alta de Cd (100 ppm) se observaron altos niveles de Cd y Zn, los cuales no generaron alteraciones en los niveles de MT ni en la actividad de la LDH (figura 11,12, 13 y 14). De acuerdo a estos resultados, se puede decir que en esta alta dosis se estableció una condición de tolerancia, que pudo estar relacionada con algún mecanismo de defensa del tejido diferente al de las MT, que se activa cuando hay concentraciones críticas del metal pesado, siendo este comportamiento muy parecido al observado en la exposición de 30 días.

En los resultados mostrados en ambos períodos de exposición, se evidenció que las dosis más bajas fueron las que estimularon las distintas respuestas de defensas en el organismo, como en el caso de las MT, observándose entonces una respuesta en forma de campana para la mayoría de los análisis realizados; lo que se conoce como el fenómeno de "Hormesis". El comportamiento que se encontró a bajas dosis, se puede considerar como una respuesta de adaptación y autoprotección de las células, la cual se encargó de activar y regular los distintos mecanismos de desintoxicación cuando hubieron bajos niveles de estrés y así posteriormente, poder soportar el estrés más severo (Calabrese y Baldwin, 2002; Calabrese *et al.*, 2007).

En consecuencia, se pueden tomar en consideración a los procesos de desintoxicación mediados por las MTs y a la actividad de la LDH, como dos factores importantes para predecir la toxicidad potencial del Cd, sobre la respuesta fisiológica del tejido cerebral de mamíferos, usando las ratas Sprague-Dawley como organismos modelo de experimentación.

CONCLUSIONES

La suspensión asistida por ultrasonido, por no emplear calor, es la metodología más adecuada para el análisis de Cd.

Los dos métodos de pretratamiento ya optimizados presentan igual sensibilidad.

La disminución de los riesgos de contaminación por ácidos y un menor tiempo de preparación, permiten sustituir a la digestión ácida tradicional por el método de suspensión.

En ambos períodos de exposición las concentraciones de Zn se elevaron cuando los niveles de Cd se encontraban más altos.

A 10 ppm de CdCl₂, en ambos períodos de exposición, se disparó un mecanismo de respuesta celular, asociado con los procesos de desintoxicación mediados por las MTs.

La dosis de 25 ppm en la exposición de 60 días se puede considerar tóxica, reflejado por la disminución de MT y el aumento de la actividad de la LDH, indicando un incremento de la demanda energética.

A una dosis de 100 ppm, los niveles de MT y la actividad de la LDH fueron similares a los de los controles, probablemente por el desarrollo de una condición de tolerancia al metal pesado, en ambos períodos de exposición.

Los niveles de MT y la actividad de la LDH, pueden actuar como indicadores del potencial de toxicidad de Cd en el tejido.

RECOMENDACIONES

Es necesario seguir estudiando metodologías alternas de pretratamiento de muestras, en especial cuando se determinan metales trazas en materiales biológicos, con el fin de minimizar al máximo el margen de error al momento de realizar la cuantificación.

Se propone la realización de trabajos posteriores en donde se utilice un suplemento de Zn, después de la exposición a Cd en las concentraciones ya mencionadas en el presente trabajo, para así evaluar el efecto protector de este antioxidante durante el daño oxidativo ocasionado por el metal.

Determinar los niveles de algunos marcadores del daño oxidativo, bajo las mismas condiciones de este trabajo, con el objetivo de establecer relaciones entre estos y los niveles de MT, de la misma manera que se realizó con los niveles de Cd.

Continuar con los estudios que describan el efecto que generan los metales pesados, no solo en el cerebro, sino también en otros tejidos del SNC de ratas o ratones, para comprender los mecanismos bioquímicos afectados que puedan estar relacionados con la aparición de enfermedades degenerativas en individuos expuestos a estos metales, y así poder aportar conocimientos científicos que puedan disminuir o retrasar la evolución de estas patologías.

BIBLIOGRAFÍA

Acar, O. 2001. Determination of cadmium and lead in biological samples by Zeeman ETAAS using various chemical modifiers. *Talanta*, 55(3): 613-622.

Acarin, L.; Carrasco, J.; Gonzalez, B.; Hidalgo, J. y Castellano, B. 1999. Expression of growth inhibitory factor (metallothionein-III) mRNA and protein following excitotoxic immature brain injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 58: 389-97.

Acosta, M. y Kalloniatis, M. 2005. Short and long-term enzymatic regulation secondary to metabolic insult in the rat retina. *J. Neurochem.*, 92: 1350-1362.

Almela, C.; Clemente, M., Velez, D. y Montoro, R. 2006. Total arsenic, inorganic arsenic, lead and cadmium contents in edible seaweed sold in Spain. *Food Chem. Toxicol.*, 44: 1901-1908.

Antonio, M.; Corredor, L. y Leret, M. 2003. Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. *Toxicol. Lett.*, 143(3): 331-340.

Araujo, R.; Oleszczuk, N.; Rampazzo, R.; Costa, P.; Silva, M.; Vale, M.; Welz, B. y Ferreira, S. 2008. Comparison of direct solid sampling and slurry sampling for the determination of cadmium in wheat flour by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 77: 400-406.

Aschner, M.; Cherian, G.; Klaassen, D.; Palmitier, D.; Erickson, C. y Bush, I. 1997. Metallothioneins in brain. The role in physiology and pathology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 142: 229-242.

Bagchi, D.; Vuchetich, P.; Bagchi, M.; Hassoun, E.; Tran, M.; Tang, L. y Stohs, S. 1997. Introduction of oxidative stress by chrome administration of sodium dichromate and cadmium chloride to rats. *Free Radic. Biol. Med.*, 22: 471-478.

Bertin, G. y Averbeck, D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie.*, 88: 1549-1559.

Bonda, E; Wlostowski, T. y Krasowska, A. 2004. Testicular toxicity induced by dietary cadmium is associated with decreased testicular zinc and increased hepatic and renal metallothionein and zinc in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Biometals.*, 17: 615-624.

Bozhanov, S.; Karadjova, I. y Alexandrov, S. 2007. Determination of trace elements in the Lavender inflorescence (*Lavandula angustifolia* Mill.) - Lavender oil system. *Microchem. J.* 86: 119-123.

Brzóška, M. y Moniuszko, J. 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem. Toxicol.*, 39: 967-980.

Caballo-López, A. y Luque de Castro, M. 2007. Determination of cadmium in leaves by ultrasound-assisted extraction prior to hydride generation, pervaporation and atomic absorption detection. *Talanta.*, 71: 2074-2079.

Calabrese, E y Baldwin, L. 2002. Defining hormesis. *Hum. & Exp. Toxicol.*, 21: 91-97.

Calabrese, E.; Bachmann, K.; Bailer, A.; Bolger, P.; Borak, J.; Cai, L.; Cedergreen, N.; Cherian, M.; Chiueh, C.; Clarkson, T.; Cook, R.; Diamond, D.; Doolittle, D.; Dorato, D.; Duke, S.; Feinendegen, L.; Gardner, D.; Hart, R.; Hastings, K.; Hayes, A.; Hoffmann, G.; Ives, J.; Jaworowski, Z.; Johnson, T.; Jonas, W.; Kaminski, N.; Keller, J.; Klaunig, J.; Knudsen, T.; Kozumbo, W.; Lettieri, T.; Liu, S.; Maisseu, A.; Maynard, K.; Masoro, E.; McClellan, R.; Mehendale, H.; Mothersill, C.; Newlin, D.; Nigg, H.; Oehme, F.; Phalen, R.; Philbert, M.; Rattan, S.; Riviere, J.; Rodricks, J.; Sapolsky, R.; Scott, B.; Seymour, C.; Sinclair, D.; Sonneborn, J.; Snow, E.; Spear, L.; Stevenson, D.; Thomas, Y.; Tubiana, M.; Williams, G. y Mattson, M. 2007. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hermetic dose-response framework. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 222: 122-128.

Carrasco, J.; Giralt, M.; Molinero, A.; Penkowa, M.; Moos, T. y Hidalgo, J. 1999. Metallothionein (MT)-III: generation of polyclonal antibodies, comparison with MT-I+II in the freeze lesioned rat brain and in a bioassay with astrocytes, and analysis of Alzheimer's disease brains. *J. Neurot.*, 16: 1115-1129.

Chen, C. y Liao, S. 2003. Neurotrophic and neurotoxin effects of zinc on neonatal cortical neurons. *Neurochem. Internat.*, 42: 471-479.

Cheung, K.; Leung, H. y Wong, M. 2008. Metal concentrations of common freshwater and marine fish from the Pearl River Delta, South China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 54(4): 705-715.

Choudhuri, S.; Li Liu, W.; Berman, N. y Klaassen, C. 1996. Cadmium accumulation and metallothioneins expression in brain of mice at different stages of development. *Toxicol. Lett.*, 84: 127-135.

Chung, A. y Maines, M. 1987. Differential effect of cadmium on GSH-peroxidase activity in the Leydig and Sertoli cells of rat testis: Suppression by selenium and the possible relationship to heme concentration. *Biochem. Pharmacol.*, 36: 1367-1372.

- Colangelo, V.; Schurr, J.; Ball, M.; Pelaez, R.; Bazan, N. y Lukiw, W. 2002. Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor downregulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. *J. Neurosci. Res.*, 70: 462-473.
- Di Guilio, R.; Benson, W.; Sande, B. y Vanveld, P. 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. In: G.M. Rand, Editor. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Second Edition. pp. 223-255.
- Ellman, G. 1959. Tissue sulphhydryl groups. *Arc. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77.
- Eybl, V.; Kotyzova, D.; Koutensky, J.; Mickova, V.; Jones, M. y Singh, P. 1998. Effect of cadmium chelating agents on organ cadmium and trace element levels in mice. *Analysis*, 123: 25-26.
- Ghafghazi, T. y Mennear, J. 1973. Effect of acute and subacute cadmium administration on carbohydrate metabolism in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 26: 231-240.
- Groten, J. y Van Bladeren, P. 1994. Cadmium bioavailability and health risk in food. *Trends Food Sci. Technol.*, 5: 50-55.
- Harris, D. 2004. *Análisis químico cuantitativo*. Segunda edición. Reveté S. A. Barcelona-España.
- Hoening, M. y Kersabiec, A. 1996. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: Present status. *Spectrochim.*, 51: 1297-1307.
- Inui, T.; Fujita, K.; Kitano, M. y Nakamura, T. 2010. Determination of Cr(III) and Cr(VI) at sub-ppb levels in water with solid-phase extraction/metal furnace atomic absorption spectrometry. *Anal. Sc.*, 26: 1093-1098.
- Kaneco, S.; Katsumata, H.; Suzuki, t. y Ohta, K. 2007. Atomic absorption spectrometry using tungsten and molybdenum tubes as metal atomizer. *Bunseki kagaku.*, 56: 535-546.
- Karhikeyan, J. y Bavani, G. 2009. Effect of cadmium on lactate dehydrogenase isoenzyme, succinate dehydrogenase and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in liver tissue of rat. *J. Environ. Biol.*, 30(5): 895-898.
- Kondoh, M.; Ogasawara, S.; Araragi, S.; Higashimoto, M. y Sato, M. 2001. Cytochrome C release from mitochondria induced by cadmium. *J. Health Sci.*, 47: 78-82.
- Kumar, R.; Asic, K.; Agarwal, K. y Seth, P. 1996. Oxidative stress-mediated neurotoxicity of cadmium. *Toxicol. Lett.*, 89: 65-69.

- Liu, J.; Kadiiska, M.; Corton, J.; Qu, W.; Waalkes, M.; Mason, R.; Liu, Y. y Klaassen, C. 2002. Acute cadmium exposure induces stress-related gene expression in wild-type and metallothionein-I/II null mice. *Freed Rad. Biol. Med.*, 32: 525-535.
- López, E.; Arce, C.; Oset-Gasque, M.; Cañadas, S. y González, M. 2006. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Rad. Biol. Medicine.*, 40: 940-951.
- Mahua, S.; Prasenjit, M. y Parames, S. 2008. Cadmium-induced neurological disorders: prophylactic role of taurine. *J. Appl. Toxicol.*, 8: 974-986.
- Marcano, L.; Faría, C.; Carruyo, I y Montiel, X. 2006. Citotoxicidad del cadmio en hepatocitos de ratón albino y sus posibles implicaciones en ambientes tropicales. *Rev. Biol. Trop.*, 54 (2): 257-263.
- Maret, W. y Valle, B. 1998. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 3478-3482.
- Marigomez, I.; Soto, M.; Cajaraville, M.; Angulo, E. y Giamberini, L. 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.*, 56: 358-392.
- Marklund, S.; Westman, N.; Lundgren, E. y Roos, G. 1982. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer. Res.*, 42: 1955-1961.
- Mehta, A. 2001. Possible role of metal redistribution, hepatotoxicity and oxidative stress in chelating agents induced hepatic and renal metallothionein in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 39: 1029-1038.
- Méndez, M.; Villeda, J.; Barroso, R.; Nava, C.; Jiménez, M. y Ríos, C. 2003. Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone. *Toxicol. Lett.*, 144: 151-157.
- Nartey, N. y Cherian, M. 1987. Immunohistochemical localization of metallothionein in human thyroid tumors. *Am. J. Pathol.*, 129: 177-182.
- Nelson, L. y Cox, M. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Tercera edición. Worth Publishers. New York.
- Nuseti, O.; Tovar, M. y Zapata, E. 2010. Pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytochrome c oxidase and catalase activities in cadmium exposed perna viridis subjected to anoxic and aerobic conditions. *J. of Shellfish Res.*, 29 (1): 203-208.

- Nusetti, S.; Obregon, F.; Quintal, M.; Benzo, Z. y Lima, L. 2005. Taurine and zinc modulate outgrowth from goldfish retinal explants. *Neurochem, Res.*, 30: 1483-1492.
- Oishi, S.; Nakagawa, J. y Ando, M. 2000. Effects of cadmium administration on the endogenous metal balance in rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, 76: 257-278.
- Okuda, B.; Iwamoto, Y.; Tachibana, H. y Sugita, M. 1997. Parkinsonism after acute cadmium poisoning. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 99: 263-265.
- Paterson, P.; Grahn, B.; Gottschall-Pass, K.; Gorecki, D. y Semple, H. 1999. Postnatal deficiencies of zinc and taurine alter electroretinograms, oscillatory potentials and morphology of the rat retina. *Nutri Neurosci.*, 2: 175-189.
- Popieluch, I.; Felinska, W.; Szkilnik, R.; Brus, R. y Shani, J. 1995. Protective effect of ethanol, administered to pregnant rats, on learning and memorizing, after cadmium intoxication. *Pharmacol. Commun.*, 5: 91-100.
- Powell, S. 2000. The antioxidant properties of zinc. *J. Nutr.*, 130: 1447s-1454s.
- Rivero-Huguet, M.; Huertas, R.; Francini, L.; Vila, L. y Darré, E. 2006. Concentrations of As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb and Zn in Uruguayan rice determined by atomic absorption spectrometry. *Atom. Spect.*, 27(2): 48-56.
- Rouessac, F. y Rouessac, A. 2003. *Análisis Químico. Métodos y Técnicas Instrumentales*. Primera edición en español. Mc Graw Hill. España.
- Rubinson, K. y Rubinson, J. 2004. *Análisis instrumental*. PRENTICE Hall. Madrid.
- Sato, M. y Bremner, I. 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Rad. Biol. Med.*, 14: 325-337.
- Schurr A.; Payne R. S.; Miller J. y Rigor B. 1997. Glia are the main source of lactate utilized by neurons for recovery of function posthypoxia. *Brain Res.*, 774: 221-224.
- Skoog, D.; Holler, F. y Stanley, R. 2008. *Principios de análisis instrumental*. Sexta edición. CENGAGE Learning. Mexico.
- Takeda, A. 2000. Movement of zinc and it's functional significance in the brain. *Brain. Res. Rev.*, 34: 137-148.
- Takeda, A.; Tamano, H.; Tochigi, M. y Oku, N. 2005. Zinc homeostasis in the hippocampus of zinc deficient young adult rats. *Neurochem. Internat.*, 46: 221-225.
- Tate, D.; Miceli, M. y Newsome, D. 1997. Zinc induces catalase expression in cultured fetal human retinal pigment epithelial cells. *Curr. Eye Res.*, 16: 1017-1023.

- Ugarte, M. y Osborn, N. 2001. Zinc in the retina. *Prog. Neurobiol.*, 64: 219-249.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.; Mazur, M. y Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Bio.*, 39: 44-84.
- Van Lookeren Campagne, M.; Thibodeaux, H.; Van Bruggen, N.; Cairns, B.; Gerlai, R.; Palmer, J.; Williams, S. y Lowe, D. 1999. Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96: 12870-12875.
- Vasák, M. y Kägi, J. 1994. Metallothionein. In King, R.B. (ed.) *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. J. Wiley & Sons Ltd., New York, pp., 2229-2241.
- Vega, R. y Alvaréz, M. 2001. Irritación ocular: Modelos alternativos. *Rev cubana farm.*, 35 (3): 211-218.
- Vela, J.; Hidalgo, J.; González, B. y Castellano, B. 1997. Induction of metallothionein in astrocytes and microglia in the spinal cord from the myelin-deficient jimpy mouse. *Brain Res.*, 767: 345-355.
- Viarengo, A.; Ponzano, E.; Dondero, F. y Fabbri, R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic mollusks. *Mar. Environ. Res.*, 44: 69-84.
- Viarengo, A.; Burlando, B.; Caballete, M.; Marchi, B.; Ponzano, E. y Blasco, J. 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol.*, 227: 1612-1619.
- Vojtíšek, M.; Patková, J.; Knotková, J.; Kasparová, I.; Hornychová, M.; Frantík, E.; Formánek, J. y Svandová, E. 2008. Metals—impact and implications. *interdisc. toxicol.*, 1(2): 198-199.
- Waalkes, M.; Coogan, T. y Barter, R. 1992. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit. Rev. Toxicol.*, 22: 175-201.
- Walker, C.; Hopkin, S.; Sibly, R. y Peakall, D. 1996. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis. USA.
- Wang, Y.; Fang, J.; Leonard, S. y Rao, K. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Rad. Biol. and Med.*, 36: 1434-1443.
- Winkler, B.; Arnold, M.; Brassell, M. y Puro, D. 2000. Energy metabolism in human retinal Muller cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41: 3183-3190.

Zapata, E. y Nusetti, O. 2007. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis*. *J. Shellfish. Res.*, 26: 1-10.

Zeevalk, G. (1997): Fundamentals of the structure and function of the nervous system. In: "Comprehensive Toxicology", Nervous System and Behavioral Toxicology., Oxford. Londres.

Zenzes, M.; Krishnan, S.; Krishnan, B.; Zhang, H. y Casper, R. 1995. Cadmium accumulation in follicular fluid of women *in vitro* fertilization-embryo transfer is higher in smokers. *Fertil. Steril.*, 64 (3): 599-603.

APÉNDICES

APÉNDICE A

Tabla A1. Parámetros instrumentales del horno de grafito para la determinación de Cd en el cerebro de ratas.

| Parámetros | Horno Varian |
|-------------------------------|-----------------|
| Longitud de Onda (nm) | 228,80 |
| Vol. de Inyección (µl) | 20 |
| Ancho de Banda Espectral (nm) | 0,50 |
| Modo de Calibración | Area de pico |
| Corriente de la Lámpara (mA) | 5,00 |
| Temperatura de Secado | 120°C, (10 s) |
| Temperatura de Calcinación | 425°C, (42 s) |
| Temperatura de Atomización | 1500°C, (6,5 s) |
| Temperatura de Limpieza | 2400°C, (3 s) |
| Temperatura de enfriamiento | 40°C, (15 s) |

APÉNDICE B

Tabla B1. Parámetros de la recta obtenidos para la curva y la curva más las muestras tratadas por ambas metodologías a través del método de adición patrón.

| Parámetros | Curva | Curva+Muestra Digerida | Curva+Muestra Suspendida |
|--------------------------|-------|------------------------|--------------------------|
| Pendiente (m) | 0,06 | 0,06 | 0,06 |
| Valor de R ² | 0,99 | 0,99 | 0,99 |
| DS del valor estrapolado | | 1,08 | 1,07 |

APÉNDICE C

Tabla C1. Resumen estadístico del análisis de Kruskal-Wallis para los niveles de Cd (ppb) de las ratas expuestas a Cd, durante 30 días.

| Parámetros estadísticos | Control | 10 ppm de Cd | 25 ppm de Cd | 100 ppm de Cd |
|-------------------------|---------|--------------|--------------|---------------|
| Media | 0,91 | 2,55 | 1,63 | 1,92 |

| | | | | |
|----------------|------|--------|--------|--------|
| DS | 0,09 | 0,90 | 0,27 | 0,47 |
| SEM | 0,04 | 0,37 | 0,14 | 0,19 |
| Mediana | 0,92 | 2,43 | 1,71 | 2,09 |
| Menor IC 95% | 0,77 | 1,60 | 1,20 | 1,43 |
| Mayor IC 95% | 1,05 | 3,49 | 2,07 | 2,40 |
| Valor mínimo | 0,81 | 1,46 | 1,24 | 1,10 |
| Valor máximo | 0,99 | 3,66 | 1,87 | 2,37 |
| KrusKal-Wallis | | *24,00 | *16,00 | *24,00 |

Tabla C2. Resumen estadístico de la prueba a posteriori de los niveles de Cd (ppb) de las ratas expuestas a Cd, durante 30 días.

| Comparación | Tamaño muestral | Diferencia del rango promedio | Valor de p |
|---------------------|-----------------|-------------------------------|------------|
| Control vs. 10 ppm | 8 | -12,83 | * p<0,01 |
| Control vs. 25 ppm | 8 | -5,60 | * p<0,05 |
| Control vs. 100 ppm | 8 | -10,50 | * p<0,05 |
| 10 ppm vs. 25 ppm | 8 | 7,23 | ns p>0,05 |
| 10 ppm vs. 100 ppm | 8 | 2,33 | ns p>0,05 |
| 25 ppm vs. 100 ppm | 8 | -4,90 | ns p>0,05 |

* p<0,05 = significativo. ns p>0,05 = no significativo.

APÉNDICE D

Tabla D1. Resumen estadístico del análisis de KrusKal-Wallis para los niveles de Zn (ppb) de las ratas expuestas a Cd, durante 30 días.

| Parámetros estadísticos | Control | 10 ppm de Cd | 25 ppm de Cd | 100 ppm de Cd |
|-------------------------|---------|--------------|--------------|---------------|
| Media | 806,52 | 1655,94 | 651,23 | 575,05 |
| DS | 57,59 | 225,05 | 139,20 | 134,50 |
| SEM | 23,51 | 91,88 | 52,61 | 54,91 |
| Mediana | 820,69 | 1603,10 | 706,04 | 573,52 |
| Menor IC 95% | 746,07 | 1419,70 | 522,49 | 433,88 |
| Mayor IC 95% | 866,97 | 1892,20 | 779,97 | 716,22 |
| Valor mínimo | 699,94 | 1456,60 | 422,49 | 407,42 |
| Valor máximo | 873,93 | 2081,50 | 798,17 | 760,19 |
| KrusKal-Wallis | | *36,00 | | |

Tabla D2. Resumen estadístico de la prueba a posteriori de los niveles de Zn (ppb) de las ratas expuestas a Cd, durante 30 días.

| Comparación | Tamaño muestral | Diferencia del rango promedio | Valor de p |
|---------------------|-----------------|-------------------------------|------------|
| Control vs. 10 ppm | 8 | -7,30 | * p<0,05 |
| Control vs. 25 ppm | 8 | 7,10 | ns p>0,05 |
| Control vs. 100 ppm | 8 | 9,67 | ns p>0,05 |
| 10 ppm vs. 25 ppm | 8 | 14,43 | * p<0,01 |
| 10 ppm vs. 100 ppm | 8 | 17,00 | * p<0,01 |
| 25 ppm vs. 100 ppm | 8 | 2,57 | ns p>0,05 |

* p<0,05 = significativo. ns p>0,05 = no significativo.

APÉNDICE E

Tabla E1. Resumen estadístico del análisis de Kruskal-Wallis para los niveles de MT (pmol) de las ratas expuestas a Cd, durante 30 días.

| Parámetros estadísticos | Control | 10 ppm de Cd | 25 ppm de Cd | 100 ppm de Cd |
|-------------------------|---------|--------------|--------------|---------------|
| Media | 3905,66 | 4595,96 | 3975,89 | 3466,09 |
| DS | 573,99 | 332,00 | 420,39 | 380,89 |
| SEM | 216,95 | 135,54 | 171,63 | 155,50 |
| Mediana | 4156,70 | 4534,20 | 3988,90 | 3435,70 |
| Menor IC 95% | 3374,80 | 4247,50 | 3534,60 | 3066,30 |
| Mayor IC 95% | 4436,50 | 4944,40 | 4417,10 | 3865,90 |
| Valor mínimo | 3146,30 | 4257,40 | 3316,50 | 2941,10 |
| Valor máximo | 4483,90 | 5146,70 | 4519,80 | 4015,20 |
| Kruskal-Wallis | | *32,00 | | |

Tabla E2. Resumen estadístico de la prueba a posteriori de los niveles de MT (pmol) de las ratas expuestas a Cd, durante 30 días.

| Comparación | Tamaño muestral | Diferencia del rango promedio | Valor de p |
|---------------------|-----------------|-------------------------------|------------|
| Control vs. 10 ppm | 8 | -690,30 | * p<0,05 |
| Control vs. 25 ppm | 8 | -70,23 | ns p>0,05 |
| Control vs. 100 ppm | 8 | 439,57 | ns p>0,05 |
| 10 ppm vs. 25 ppm | 8 | 620,07 | ns p<0,05 |
| 10 ppm vs. 100 ppm | 8 | 1129,90 | * p<0,01 |
| 25 ppm vs. 100 ppm | 8 | 509,80 | ns p>0,05 |

* p<0,05 = significativo. ns p>0,05 = no significativo.

APÉNDICE F

Tabla F1. Resumen estadístico del análisis de Kruskal-Wallis para las actividades de la LDH (U/g.p.h) de las ratas expuestas a Cd, durante 30 días.

| Parámetros estadísticos | Control | 10 ppm de Cd | 25 ppm de Cd | 100 ppm de Cd |
|-------------------------|---------|--------------|--------------|---------------|
| Media | 82,91 | 81,67 | 74,49 | 90,95 |
| DS | 7,60 | 6,80 | 12,87 | 12,54 |
| SEM | 2,87 | 2,41 | 5,26 | 4,74 |
| Mediana | 82,48 | 83,28 | 78,22 | 96,46 |
| Menor IC 95% | 75,89 | 75,99 | 60,98 | 79,36 |
| Mayor IC 95% | 89,94 | 87,36 | 88,00 | 102,54 |
| Valor mínimo | 69,61 | 69,29 | 50,80 | 68,33 |
| Valor máximo | 92,28 | 91,96 | 86,50 | 101,77 |

Tabla F2. Resumen estadístico de la prueba a posteriori para las actividades de la LDH (U/g.p.h) de las ratas expuestas a Cd, durante 30 días.

| Comparación | Tamaño muestral | Diferencia del rango promedio | Valor de p |
|---------------------|-----------------|-------------------------------|------------|
| Control vs. 10 ppm | 8 | 1,71 | ns p>0,05 |
| Control vs. 25 ppm | 8 | 5,21 | ns p>0,05 |
| Control vs. 100 ppm | 8 | -5,57 | ns p>0,05 |
| 10 ppm vs. 25 ppm | 8 | 3,50 | ns p>0,05 |
| 10 ppm vs. 100 ppm | 8 | -7,29 | ns p>0,05 |
| 25 ppm vs. 100 ppm | 8 | -10,79 | ns p>0,05 |

* p<0,05 = significativo. ns p>0,05 = no significativo.

APÉNDICE G

Tabla G1. Resumen estadístico del análisis de Kruskal-Wallis para los niveles de Cd (ppb) de las ratas expuestas a Cd, durante 60 días.

| Parámetros estadísticos | Control | 10 ppm de Cd | 25 ppm de Cd | 100 ppm de Cd |
|-------------------------|---------|--------------|--------------|---------------|
|-------------------------|---------|--------------|--------------|---------------|

| | | | | |
|----------------|------|------|--------|--------|
| Media | 0,64 | 1,04 | 2,64 | 1,95 |
| DS | 0,13 | 0,45 | 0,61 | 0,38 |
| SEM | 0,06 | 0,18 | 0,25 | 0,14 |
| Mediana | 0,63 | 0,94 | 2,38 | 1,76 |
| Menor IC 95% | 0,48 | 0,57 | 2,00 | 1,60 |
| Mayor IC 95% | 0,81 | 1,51 | 3,27 | 2,29 |
| Valor mínimo | 0,45 | 0,55 | 2,14 | 1,52 |
| Valor máximo | 0,81 | 1,85 | 3,57 | 2,46 |
| KrusKal-Wallis | | | *30,00 | *35,00 |

Tabla G2. Resumen estadístico de la prueba a posteriori de los niveles de Cd (ppb) de las ratas expuestas a Cd, durante 60 días.

| Comparación | Tamaño muestral | Diferencia del rango promedio | Valor de p |
|---------------------|-----------------|-------------------------------|------------|
| Control vs. 10 ppm | 8 | -4,33 | ns p>0,05 |
| Control vs. 25 ppm | 8 | -16,50 | * p<0,001 |
| Control vs. 100 ppm | 8 | -11,27 | * p<0,05 |
| 10 ppm vs. 25 ppm | 8 | -12,17 | * p<0,05 |
| 10 ppm vs. 100 ppm | 8 | -6,95 | ns p>0,05 |
| 25 ppm vs. 100 ppm | 8 | -5,21 | ns p>0,05 |

* p<0,05 = significativo. ns p>0,05 = no significativo.

APÉNDICE H

Tabla H1. Resumen estadístico del análisis de KrusKal-Wallis para los niveles de Zn (ppb) de las ratas expuestas a Cd, durante 60 días.

| Parámetros estadísticos | Control | 10 ppm de Cd | 25 ppm de Cd | 100 ppm de Cd |
|-------------------------|---------|--------------|--------------|---------------|
| Media | 477,74 | 757,03 | 1288,63 | 1050,76 |
| DS | 114,43 | 93,01 | 316,84 | 199,02 |
| SEM | 43,25 | 35,15 | 158,42 | 99,51 |
| Mediana | 514,74 | 777,16 | 1228,40 | 980,04 |
| Menor IC 95% | 371,90 | 671,01 | 784,54 | 734,13 |
| Mayor IC 95% | 583,58 | 843,05 | 1792,70 | 1367,40 |
| Valor mínimo | 254,70 | 613,96 | 995,87 | 909,28 |
| Valor máximo | 590,84 | 852,20 | 1701,80 | 1333,70 |
| KrusKal-Wallis | | *49,00 | *18,97 | *18,97 |

Tabla H2. Resumen estadístico de la prueba a posteriori de los niveles de Zn (ppb) de las ratas expuestas a Cd, durante 60 días.

| Comparación | Tamaño muestral | Diferencia del rango promedio | Valor de p |
|---------------------|-----------------|-------------------------------|------------|
| Control vs. 10 ppm | 8 | -7,00 | ns p>0,05 |
| Control vs. 25 ppm | 8 | -15,75 | * p<0,001 |
| Control vs. 100 ppm | 8 | -13,25 | * p<0,01 |
| 10 ppm vs. 25 ppm | 8 | -8,75 | ns p>0,01 |
| 10 ppm vs. 100 ppm | 8 | -6,25 | ns p>0,01 |
| 25 ppm vs. 100 ppm | 8 | 2,50 | ns p>0,05 |

* p<0,05 = significativo. ns p>0,05 = no significativo.

APÉNDICE I

Tabla I1. Resumen estadístico del análisis de Kruskal-Wallis para los niveles de MT (pmol) de las ratas expuestas a Cd, durante 60 días.

| Parámetros estadísticos | Control | 10 ppm de Cd | 25 ppm de Cd | 100 ppm de Cd |
|-------------------------|---------|--------------|--------------|---------------|
| Media | 4313,29 | 6953,69 | 2877,49 | 4252,17 |
| DS | 818,38 | 829,58 | 526,77 | 642,45 |
| SEM | 334,10 | 371,00 | 263,39 | 262,28 |
| Mediana | 4522,80 | 7156,70 | 2932,90 | 4405,40 |
| Menor IC 95% | 3454,30 | 5923,80 | 2039,40 | 3577,80 |
| Mayor IC 95% | 5172,30 | 7983,60 | 3715,60 | 4926,50 |
| Valor mínimo | 2943,70 | 5905,40 | 2207,80 | 3056,40 |
| Valor máximo | 5346,90 | 7935,80 | 3406,30 | 4869,80 |
| Kruskal-Wallis | | *30,00 | *16,00 | |

Tabla I2. Resumen estadístico de la prueba a posteriori de los niveles de MT (pmol) de las ratas expuestas a Cd, durante 60 días.

| Comparación | Tamaño muestral | Diferencia del rango promedio | Valor de p |
|---------------------|-----------------|-------------------------------|------------|
| Control vs. 10 ppm | 8 | -2640,40 | * p<0,001 |
| Control vs. 25 ppm | 8 | 1078,70 | * p<0,05 |
| Control vs. 100 ppm | 8 | 61,13 | ns p>0,05 |
| 10 ppm vs. 25 ppm | 8 | 3719,10 | * p<0,001 |

| | | | |
|--------------------|---|----------|-----------|
| 10 ppm vs. 100 ppm | 8 | 2701,50 | * p<0,001 |
| 25 ppm vs. 100 ppm | 8 | -1017,60 | ns p>0,05 |

* p<0,05 = significativo. ns p>0,05 = no significativo.

APÉNDICE J

Tabla J1. Resumen estadístico del análisis de Kruskal-Wallis para las actividades de la LDH (U/g.p.h) de las ratas expuestas a Cd, durante 60 días.

| Parámetros estadísticos | Control | 10 ppm de Cd | 25 ppm de Cd | 100 ppm de Cd |
|-------------------------|---------|--------------|--------------|---------------|
| Media | 67,20 | 74,98 | 94,12 | 80,13 |
| DS | 8,00 | 11,09 | 14,43 | 3,95 |
| SEM | 3,02 | 3,92 | 5,45 | 1,49 |
| Mediana | 65,11 | 77,49 | 95,34 | 79,58 |
| Menor IC 95% | 59,81 | 65,70 | 80,78 | 76,48 |
| Mayor IC 95% | 74,60 | 84,26 | 107,46 | 83,78 |
| Valor mínimo | 54,82 | 51,93 | 74,76 | 75,72 |
| Valor máximo | 78,94 | 88,42 | 119,13 | 87,78 |
| Kruskal-Wallis | | | *14,40 | |

Tabla J2. Resumen estadístico de la prueba a posteriori para las actividades de la LDH (U/g.p.h) de las ratas expuestas a Cd, durante 60 días.

| Comparación | Tamaño muestral | Diferencia del rango promedio | Valor de p |
|---------------------|-----------------|-------------------------------|------------|
| Control vs. 10 ppm | 8 | -7,46 | ns p>0,05 |
| Control vs. 25 ppm | 8 | -17,71 | * p>0,01 |
| Control vs. 100 ppm | 8 | -9,46 | ns p>0,05 |
| 10 ppm vs. 25 ppm | 8 | -10,26 | ns p>0,05 |
| 10 ppm vs. 100 ppm | 8 | -2,00 | ns p>0,05 |
| 25 ppm vs. 100 ppm | 8 | 8,26 | ns p>0,05 |

* p<0,05 = significativo. ns p>0,05 = no significativo

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

| | |
|------------------|---|
| Título | BIOACUMULACIÓN DE CADMIO Y SU EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE METALOTIONEÍNAS Y LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA EN EL CEREBRO DE RATAS |
| Subtítulo | |

Autor(es)

| Apellidos y Nombres | Código CVLAC / e-mail | |
|---|------------------------------|------------------------|
| Indriago Jiménez, Jesusmarit del Carmen | CVLAC | 17.446.307 |
| | e-mail | jesusmarit@hotmail.com |
| | e-mail | |
| | CVLAC | |
| | e-mail | |
| | e-mail | |
| | CVLAC | |
| | e-mail | |
| | e-mail | |
| | CVLAC | |
| | e-mail | |
| | e-mail | |

Palabras o frases claves:

| |
|------------------------|
| Cadmio |
| Zinc |
| Metalotioneína |
| Lactato Deshidrogenasa |
| Cerebro |
| |
| |
| |

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

| Área | Subárea |
|----------|---------|
| Ciencias | Química |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Resumen (abstract):

Se determinó el efecto de la bioacumulación de Cd sobre los niveles de Zn, metalotioneínas (MTs) y la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el cerebro de ratas expuestas a distintas concentraciones de CdCl₂ en el agua de beber, durante 30 y 60 días. Las concentraciones de Cd se midieron por la técnica de espectroscopia de absorción atómica (horno de grafito), para ello se optimizaron y compararon dos técnicas de pretratamiento de las muestras: digestión ácida y suspensión asistida por ultrasonido; la cuantificación de Zn se realizó a través del equipo de espectroscopia de plasma acoplado inductivamente (ICP); los niveles de MTs se obtuvieron midiendo las concentraciones de grupos-SH por el método de Ellman y la actividad de la LDH se determinó espectrofotométricamente a 340 nm. La técnica de pretratamiento por suspensión resultó ser el método más confiable. En relación con los niveles de Cd, Zn y MT se evidenciaron aumentos en la dosis de 10 ppm, durante la exposición de 30 días. A los 60 días, los niveles de MT, también, aumentaron en la dosis de 10 ppm; sin embargo, a una dosis de 25 ppm se observaron altos niveles de Cd y Zn, disminución de MTs y aumentos en la actividad de la LDH. Estos resultados indicaron que en la dosis de 10 ppm, se indujo un mecanismo de respuesta celular, a través del aumento de MTs, la cual puede atrapar y disminuir la toxicidad del metal; en contraste la dosis de 25 ppm en un período de 60 días resultó ser tóxica, reflejado por el descenso en los niveles de MTs y el aumento en la actividad de la LDH, la cual refleja los requerimientos energéticos no suplidos por actividad mitocondrial en situaciones de estrés generados por la toxicidad del Cd.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

| Apellidos y Nombres | ROL / Código CVLAC / e-mail |
|---------------------------------|--|
| Nusetti Pérez, Sonia Isabel | ROL CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> |
| | CVLAC |
| | e-mail snusetti@yahoo.com |
| | e-mail |
| Alfonzo, Yarima Isabel | ROL CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> |
| | CVLAC |
| | e-mail yarimalfonzo@yahoo.com |
| | e-mail |
| Zapata Vivenes, Edgar Alexander | ROL CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> |
| | CVLAC |
| | e-mail edzapata@yahoo.com |
| | e-mail |
| Rojas Uribe, Loguard Smith | ROL CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> |
| | CVLAC |
| | e-mail loguards@gmail.com |
| | e-mail |

Fecha de discusión y aprobación:

| Año | Mes | Día |
|------|-----|-----|
| 2011 | 05 | 16 |

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

| Nombre de archivo | Tipo MIME |
|-------------------|------------------|
| Tesis-Indriago | Aplication /word |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Alcance:

Espacial: **Nacional** (Opcional)
(Opcional)

Temporal: **Temporal** (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciada en Química

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio:

Química



Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO DE SUCRE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

Yo, Jesusmarit Indriago autorizo a la Universidad de Oriente para que publique la siguiente tesis en su totalidad para fines educativos,


AUTOR
TUTOR
JURADO 1
JURADO 2

POR LA COMISION DE TESIS: