



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**“EFECTOS DE LA *SPIRULINA* SOBRE EL DAÑO
OXIDATIVO EN LA HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR
LA EXPOSICIÓN A PLOMO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JOHNY CÉSAR PONCE CANCHIHUAMÁN

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina; bajo la tutoría del Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza. Para su realización contamos con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) No. IN205410 y una beca de la DGEP, UNAM para mis estudios de doctorado.

Agradezco al Dr. Marco Juárez Oropeza por su confianza, apoyo, sus enseñanzas y consejos que han contribuido para mi formación profesional.

Al Dr. Oscar Pérez Méndez y Dr. Rolando Hernández Muñoz, miembros de mi comité tutorial, por su apoyo desde la primera reunión, por sus comentarios y sugerencias oportunas que me permitieron concluir con el trabajo de investigación y la tesis.

A los doctores David Kershenobich, Victoria Chagoya, Aurora De la Peña y Saúl Villa, miembros del jurado, por compartir sus conocimientos y por los valiosos aportes para la tesis.

A todos mis familiares que de alguna u otra manera me apoyaron a realizar esta nueva etapa de mi formación profesional y personal. Gracias por todo.

A la Dra. Patricia Torres, investigadora asociada, por su apoyo y colaboración en las técnicas bioquímicas del presente trabajo.

Al QFB. Iván Luqueño por su apoyo en el desarrollo de las técnicas bioquímicas del presente trabajo.

A mis amigos del posgrado y laboratorio: Leonel, Rafael, Jesús, José Luis por su apoyo, sugerencias y por todos los momentos compartidos durante estos años.

A la UNAM por su amplia gama de oportunidades de formación académica y extra-académica que me brindó durante el doctorado.

A México y su gente por que hacen posible que existan espacios académicos en donde las fronteras no existen y se hacen realidad los sueños e ideales de igualdad, confraternidad y unidad Latinoamericana.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la oportunidad de ser parte de la historia presente.

A mis padres amados:

Victoria y Carlos, por estar siempre conmigo en todos los momentos, así como por el gran amor, comprensión, cariño y buenos ejemplos que siempre recibo. Gracias por todo el apoyo, consejos y por influir en mi vida.

A mis hermanos tan queridos:

Juana, Mangloria, Agripino, María, Oscar, Roberto y Percy. Gracias por estar siempre al pendiente de mi sendero, por sus rezos y deseos. Por su apoyo en la realización de mis metas y porque siempre están atentos a lo que realizo en mi vida.

A mis cuñadas y muy especialmente a mis ahijados, sobrinos y nietos, quienes siempre son un aliciente para seguir adelante.

A mis tíos y primos, por el apoyo que me brindan.

A mis queridos amigos y compañeros de la UNAM y fuera de ella, por su agradable compañía y apoyo.

A mis grandes amigos y confidentes: quienes siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas, que siempre me estimularon a seguir adelante. Gracias por la oportunidad de tener su amistad.

A todas las personas que me olvidé mencionar.

TABLA DE CONTENIDOS.	Página
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	8
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	10
2.1. Plomo	
2.1.1. Toxicidad	
2.1.2. Vías de exposición y Toxicocinética	
2.1.3. Toxicidad del hígado por exposición a Plomo	
2.2. Hepatotoxicidad	
2.2.1. Metabolismo de lípidos.	
2.3. Estrés oxidativo	
2.3.1. Radicales libres	
2.3.2. Especies de Oxígeno Reactivas	
2.3.3. Daño oxidativo a macromoléculas	
2.3.4. Sistema de defensa contra el estrés oxidativo	
2.4. El género <i>Spirulina</i>	
2.4.1. <i>Spirulina maxima</i>	
2.4.2. Propiedades de la <i>Spirulina</i> y efectos farmacológicos	
CAPITULO III. ANTECEDENTES	26
CAPITULO IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
CAPITULO V. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Diseño experimental	
5.1.1. Aclimatación	
5.1.2. Preparación de la dieta <i>Spirulina</i>	

5.2. Tratamiento de los animales

5.2.1. Evaluación de la hepatotoxicidad por acetato de plomo

5.2.2. Evaluación del efecto profiláctico de la *Spirulina*

5.3. Evaluación de las muestras de estudio

5.3.1. Muestra sanguínea

5.3.2. Muestra de hígado

5.4. Reactivos, químicos y la *Spirulina*

5.5. Análisis de lípidos

5.5.1. Determinación de Colesterol Total

5.5.2. Determinación de Triacilgliceroles

5.5.3. Análisis de Lípidos totales de hígado

5.6. Análisis de aminotransferasas

5.7. Análisis de la actividad antioxidante

5.7.1. Determinación de la Superóxido Dismutasa

5.7.2. Determinación de la Catalasa

5.7.3. Determinación del Glutati6n Total

5.8. Análisis de productos de lipoperoxidaci6n

5.9. Determinaci6n de prote6nas

5.10. Limitaciones

5.11. Aspectos 6ticos

5.12. Análisis estadístico

CAPITULO VI. RESULTADOS

6.1. Peso corporal de las ratas

- 6.2. Determinación del perfil de lípidos plasmáticos y hepáticos
- 6.3. Determinación de la actividad de la alanina aminotransferasa
- 6.4. Evaluación de los indicadores del estado antioxidante en hígado
- 6.5. Evaluación de los productos de lipoperoxidación en hígado
- 6.6. Resultados adicionales publicados
 - 6.6.1. Evaluación de los indicadores del estado antioxidante en el riñón
 - 6.6.2. Evaluación de los productos de lipoperoxidación en el riñón
- 6.7. Resultados adicionales No publicados
 - 6.7.1. Curso temporal de la exposición a plomo en el hígado
 - 6.7.2. Curso temporal de la exposición a plomo en el riñón

CAPITULO VII. DISCUSIÓN	45
CAPITULO VIII. CONCLUSIONES	52
CAPITULO IX. PERSPECTIVAS	53
CAPITULO X. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	54
CAPITULO XI. ANEXOS	65

RESUMEN

Introducción: El uso del plomo ha generado áreas contaminadas, un problema de salud pública a nivel mundial, que afecta particularmente a mujeres embarazadas y niños. La exposición ambiental y ocupacional a plomo, conlleva al daño oxidativo; un mecanismo posible, implicado en la toxicidad del plomo, sobre todo en el hígado. Por otro lado, estudios previos han demostrado el efecto antioxidante de la *Spirulina maxima* (Sm) en varios modelos experimentales de estrés oxidativo. Por lo anterior, el presente estudio evalúa los efectos de la Sm sobre el metabolismo lipídico y el sistema antioxidante en la hepatotoxicidad inducida por el plomo.

Metodología: El estudio se desarrolló con un diseño de tipo experimental. El cual consistió en evaluar la actividad antioxidante de la Sm en la hiperlipidemia y el daño oxidativo inducido por el acetato de plomo (AcPb) en el hígado de ratas macho. En la primera etapa, se validaron los procedimientos y técnicas del estudio. En la segunda etapa, se evaluó la actividad antioxidante de la Sm en la hepatotoxicidad inducida por AcPb.

El grupo Control de los animales fue alimentado con dieta estándar y no recibió AcPb. Los animales de experimentación (grupo AcPb-Spirulina: AcPb-Sp, y grupo AcPb-sinSpirulina: AcPb-sinSp) fueron alimentadas con dieta estándar con y sin Sm al 5% en la dieta y fueron tratados con tres dosis de AcPb (25 mg/semana/ vía intraperitoneal). Los datos se analizaron en el programa SPSS, se utilizó la prueba de ANOVA con Bonferroni con una $p < 0.05$.

Resultados:

Se encontró que los del grupo AcPb-sinSp presentaron hiperlipidemia tanto en plasma como en hígado comparado con el Control ($p < 0.05$); el grupo AcPb-Sp presentó resultados similares al grupo Control. En el grupo AcPb-sinSp el daño oxidativo en el hígado fue 1.5

veces mayor respecto al grupo Control ($p < 0.05$). El grupo AcPb-Sp presentó resultados similares al grupo Control y diferentes al grupo AcPb-sinSp ($p < 0.05$). Los resultados mostraron que la Sm previno los cambios inducidos por el AcPb en los niveles de lípidos tanto en el plasma como en hígado y en el estado antioxidante del hígado.

Conclusiones: El daño oxidativo fue evidente en el grupo expuesto a plomo y que no recibió *Spirulina* en su dieta. El grupo que recibió *Spirulina* en su dieta y se expuso a plomo no mostró daño oxidativo, por lo cual la *Spirulina* tiene efecto protector sobre el daño oxidativo inducido por plomo en nuestro modelo experimental y está asociado al efecto antioxidante de la *Spirulina*.

Palabras claves: cianobacteria, lípidos, sistema antioxidante, metales pesados, células hepáticas, riñón.

ABSTRACT

Introduction: The use of lead has generated contaminated areas, a public health problem at world, particularly affecting to pregnant women and children. Environmental and occupational exposure to lead, leads to the oxidative damage, a possible mechanism involved in lead toxicity, especially in the liver. In addition, previous studies have demonstrated the antioxidant effects of *Spirulina maxima* (Sm) in various experimental models of oxidative stress. Therefore, the study assesses the effects of Sm on lipid metabolism and antioxidant system in the hepatotoxicity induced by lead.

Methodology: The study was conducted with an experimental design. This was to evaluate the antioxidant activity of Sm against hyperlipidemia and oxidative damage induced by lead acetate (LA) in the liver of male rats. In the first phase, were validated the procedures and techniques of the study. In the second phase, was evaluated the antioxidant activity of the Sm in the hepatotoxicity induced by LA.

Control group animals were fed on a standard diet and did not receive LA. Experimental animals (LA-Spirulina: LAS, and LA-withoutSpirulina: LAwS groups) were fed on a standard diet with and without Sm 5% in the standard laboratory diet and were treated with three doses of LA (25 mg each/ weekly, intraperitoneal injection). The data were analyzed in the SPSS Program, was using the ANOVA with Bonferroni test with a $p < 0.05$.

Results:

It was found that the LAwS group presented hyperlipidemia, both in plasma and liver compared with the Control group ($p < 0.05$); the LAS group showed similar results to the Control group. In the LAwS group, the oxidative damage in liver was 1.5 times higher compared to the Control group ($p < 0.05$). The LAS group presented similar results to the

Control group and different to the LAwS group ($p < 0.05$). The results showed that the Sm prevented the LA-induced changes on lipid levels in both plasma and the liver, and on the antioxidant status of the liver.

Conclusions: Oxidative damage was evident in the group exposed to lead and did not receive *Spirulina* in their diet. The group that received *Spirulina* in their diet and were exposed to lead showed no oxidative damage, thus the *Spirulina* has a protective effect on lead-induced oxidative damage in our experimental model, and that the effects are associated with the antioxidant effect of *Spirulina*.

Keywords: cyanobacterium, lipids, antioxidant system, heavy metals, liver cells, kidney.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

En el devenir del desarrollo tecnológico e industrial, el ser humano ha logrado satisfacer muchas necesidades básicas y no básicas para su vida; permitiéndole gozar de una vida más confortable. Sin embargo, muchos aspectos de este desarrollo repercuten negativamente –a largo plazo- en su propia salud y la de las comunidades. Una de las consecuencias negativas del desarrollo en los tiempos modernos la constituye la contaminación ambiental, un problema muy relevante a tener en cuenta porque afecta la calidad de vida de la población en general, especialmente la salud de grupos vulnerables como son las mujeres embarazadas, los niños y adultos mayores (Bruce et al., 2000; Srám, 1999).

La contaminación ambiental se considera actualmente un problema de Salud Pública. Diversos autores (Albalak et al., 1999; Woodruff et al., 1997) reportan la existencia de evidencia consistente entre la contaminación del aire y patologías del aparato respiratorio como son: la obstrucción pulmonar crónica y la infección respiratoria aguda en niños, siendo esta última, una de las más importantes causas de muerte en niños menores de 5 años en países en desarrollo (Bruce et al., 2000).

Por otro lado, muchos estudios señalan que la contaminación ambiental se ha incrementado a través de los años con especial impacto en países en desarrollo cuya población no se encuentra lo suficientemente sensibilizada sobre las consecuencias que esta contaminación puede ocasionar en la salud presente y futura. Varios aspectos del bienestar humano son influenciados por el ambiente, y muchas enfermedades se pueden iniciar, promover,

sostener, o estimular por factores ambientales. Por esta razón, las interacciones de la gente con su ambiente son un componente importante de la Salud Pública (Moeller, 2005).

Estudios epidemiológicos muestran que la contaminación ambiental se asocia con el aumento de la incidencia de abortos espontáneos, nacimientos prematuros, mortalidad infantil, entre otras (Bruce et al., 2000). Entre los contaminantes, los metales pesado como el plomo, un xenobiótico, tóxico persistente (Annabi-Berrahal et al., 2007; Reglero et al., 2009) junto con otras sustancias, conlleva a diferentes riesgos en la salud desde la etapa fetal hasta la senectud. Se han descrito una gama de enfermedades y de órganos afectados relacionados con la dosis y el tiempo de exposición a plomo, lo cual es considerado un problema de salud pública a nivel mundial (Ademuyiwa et al., 2007; Park et al., 2006; Vega et al., 2006).

La presente investigación describirá los efectos de la *Spirulina* en la hepatotoxicidad por la exposición a plomo en el modelo experimental de la rata. Se enfocará a los aspectos de la hiperlipidemia y el daño oxidativo hepático por acción del plomo; así, como el efecto antioxidante de la *Spirulina*.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

Los efectos negativos en la salud como producto de la exposición a un factor ambiental como los metales pesados, pueden expresarse inmediatamente o tardar años en manifestarse. Entre los xenobióticos que producen daño están los metales pesados como el plomo, alterando el metabolismo de los lípidos, inhibiendo la actividad de las enzimas antioxidantes, entre otras.

2.1. Plomo

El plomo (Pb) es un metal de color gris, maleable, dúctil y difícil de corroer; además, por su fácil aislamiento, abundancia en la naturaleza y bajo punto de fusión se encuentra entre los metales más usados (Hemberg, 2000). Este metal puede encontrarse en los estados de oxidación divalente y tetravalente (Flegal y Smith, 1995).

2.1.1. Toxicidad

El Pb, es un metal pesado que no tiene función alguna en el organismo humano. Diferentes estudios han mostrado que la exposición a Pb conlleva muchos problemas de salud, en especial a poblaciones vulnerables como los niños, en quienes el metal se acumula en mayores concentraciones debido a que tienen mayor capacidad de absorción (Romieu et al., 1997; Budd et al., 1998).

El límite máximo permisible de Pb en la sangre es de 10 $\mu\text{g/dl}$ (CDC, 2005; NOM-199-SSA1-2000, 2002); sin embargo, muchos estudios al respecto mencionan que este nivel aun es tóxico (ATSDR, 2006), como se muestra en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Efectos adversos a la salud relacionados al nivel de plomo en sangre.
(Tomado de ATSDR, 2006)

Etapa de vida	Efecto	Plomo en sangre (µg/dl)
Niños	Depresión de la actividad del ácido aminolevulinico dehidratasa (ALAD)	< 5
	Alteración del neurodesarrollo	< 10
	Alteración de la maduración sexual	< 10
	Depresión de la vitamina D	> 15
	Elevación de la porfirina del eritrocito	> 15
	Depresión de la velocidad de conducción nerviosa	> 30
	Depresión de la hemoglobina	> 40
	Cólicos	> 60
Adultos	Depresión de la actividad del ácido aminolevulinico dehidratasa (ALAD)	< 5
	Depresión de la tasa de filtración glomerular (ALAD)	< 10
	Elevación de la presión sanguínea	< 10
	Elevación de la porfirina del eritrocito (mujeres)	> 20
	Enzimuria y proteinuria	> 30
	Neuropatía periférica	> 40
	Alteración del comportamiento	> 40
	Alteración de la hormona tiroidea	> 40
	Disminución de la fertilidad	> 40
	Depresión de la hemoglobina	> 50
Ancianos	Alteración del comportamiento	> 4

2.1.2. Vías de exposición y Toxicocinética

Las principales vías de exposición del plomo son la inhalación y la ingestión; aunque un pequeño porcentaje puede ser vía piel. Lo cual, se muestra en la figura 2.1.

2.1.3. Toxicidad del hígado por exposición a Plomo

Existe mucha evidencia experimental *in vivo* e *in vitro* que muestran claramente la hepatotoxicidad por la exposición a plomo. Estos estudios, van desde las alteraciones bioquímicas y estructurales hasta la caracterización molecular de la hiperplasia hepática o

la proliferación de las células del hígado, los cuales han mostrado cambios patológicos que indican la toxicidad del hígado (Mudipalli, 2007).

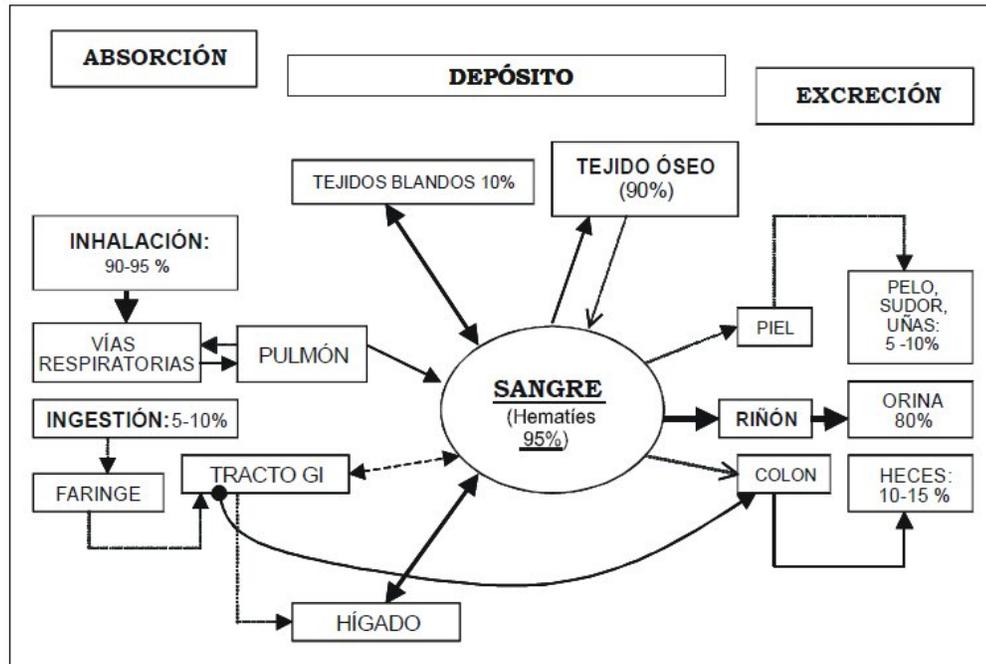


Figura 2.1. Cinética del plomo. (Tomado de Ramírez, 2005)

La complejidad asociada con las perturbaciones en varias vías metabólicas (por ejemplo, síntesis del grupo hemo, metabolismo del colesterol), el transporte de hierro y la inducción de mediadores (por ejemplo, citocinas, radicales de peróxido de lípidos) todos sugieren una interacción de acontecimientos en la mediación de la toxicidad hepática asociados con Pb (Mudipalli, 2007).

Por otro lado, estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la exposición aguda o crónica a plomo alteran el metabolismo de los lípidos (Ademuyiwa et al., 2009); además, el plomo inhibe la actividad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa y

también disminuye los niveles del glutatión, incrementando la lipoperoxidación (Rahman y Sultana, 2006; Farrag et al., 2007).

2.2. Hepatotoxicidad

El hígado es considerado la glándula de mayor tamaño en el organismo; constituye del 1.8% al 3.1% del peso corporal y entre sus principales funciones está la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, así como la eliminación de sustancias tóxicas (Rappaport y Wanless, 1993). Diferentes estímulos pueden alterar el funcionamiento hepático, y estos puede ser genético, metabólico, infeccioso, inmunológico, colestásico, alcohólico o inducido por sustancias tóxicas (Rappaport y Wanless, 1993).

La hepatotoxicidad va desde el simple hígado graso (esteatosis reversible) a la esteatohepatitis (en la que se agrega la inflamación), que si progresa con el tiempo puede destruir células llegando a la fibrosis, perdiendo en forma irreversible su funcionamiento (necrosis celular o cirrosis) (Helling y Gurram, 2006). Todas las etapas tienen en común la acumulación de grasa en el hígado.

El hígado puede almacenar los lípidos sintetizados en el hígado y también los obtenidos por la dieta (Kaplan y Pesce, 1996). Por otro lado, en el hígado se llevan a cabo las vías metabólicas como la glucólisis, glucogenogénesis, gluconeogénesis, lipogénesis, lipólisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, síntesis y degradación de proteínas y ácidos nucleicos. Para fines del presente trabajo, se enfocará solamente en el metabolismo de lípidos.

2.2.1. Metabolismo de lípidos

Los lípidos son moléculas orgánicas de origen celular que abarcan diversos compuestos con la característica común que es la insolubilidad en el agua. La mayor parte de ellos, son compuestos que contienen a los ácidos grasos, los cuales tienen como función: formar parte de los fosfolípidos y glicolípidos (estas moléculas son componentes importantes de las membranas biológicas), muchas proteínas que forman parte de las membranas son dirigidas por la unión covalente de los ácidos grasos, fuente de energía para la célula que se almacenan como triacilgliceroles; a la vez, los ácidos grasos son precursores de hormonas y de segundos mensajeros (Nelson y Cox, 2001; Stryer et al., 2006; Mc Murry, 2001; Voet y Voet, 2006).

Frecuentemente, se ha observado que en el hígado graso se incrementa la liberación a la sangre de las aminotransferasas, en especial la alanina aminotransferasa (ALT), por lo cual se usa como un indicador de hepatotoxicidad (Yang et al., 2009). Además, se ha propuesto que la elevación de las aminotransferasas o el hallazgo de alteraciones ultrasonográficas del hígado son suficientes para considerar la probabilidad del hígado graso, sin tener que realizar la confirmación histológica (Joy et al., 2003).

El hígado graso no alcohólico es la acumulación de grasa macro vesicular en el hígado que excede 5 a 10 % de su peso; esto ocurre por un desequilibrio entre la producción y la eliminación de triacilgliceroles dentro del hepatocito (Helling y Gurrum, 2006). En la esteatosis hepática alcohólica se acumula grasa en el hepatocito por el aumento de la síntesis de triacilgliceroles y por su dificultad para excretarlos (Barisio et al., 2009).

La esteatohepatitis no alcohólica, estaría mediada por el estrés oxidativo debido a la generación de especies de oxígeno reactivas (EORs) y/o a los mecanismos de defensa antioxidante (Sanyal, 2005).

Por otro lado, en el hígado, el sistema de Citocromos P450 se encarga de metabolizar muchos xenobióticos produciendo el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), además de activar numerosos agentes hepatotóxicos y de inhibir el metabolismo de diversos medicamentos, de ahí que es un gran generador de radicales libres (RL) (Knight, 1999).

2.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se refiere al proceso en el cual se pierde el balance entre los agentes pro-oxidantes y antioxidantes, a favor de los pro-oxidantes (Storz y Zheng, 2000).

2.3.1. Radicales libres

Los Radicales libres (RL) son moléculas que se han definido como cualquier especie química que tiene uno o más electrones desapareados en su capa de valencia, esta característica los vuelve inestables y reactivos porque tratan de completar sus electrones tomándolos de moléculas estables (Hernández et al., 2007).

Los RL se generan normalmente por el metabolismo celular para la obtención de energía. Los mecanismos de óxido-reducción y RL desempeñan una función importante en la fisiología de la célula (Kovacic et al., 2006), como en la renovación de membranas, mitosis, sobrevivencia de células en el sistema nervioso durante etapas embrionarias, mecanismos

de segundos mensajeros, migración celular, síntesis y liberación de algunas hormonas (Stone et al., 2006; Chiarugi et al., 2007).

Los radicales libres se clasifican con base al átomo que posee el electrón desapareado (usualmente, un átomo muy electronegativo); así, se tiene radicales de oxígeno, nitrógeno, carbono. Para el presente trabajo trataremos sobre los del oxígeno.

2.3.2. Especies de Oxígeno Reactivas

Las Especies de Oxígeno Reactivas (EORs)

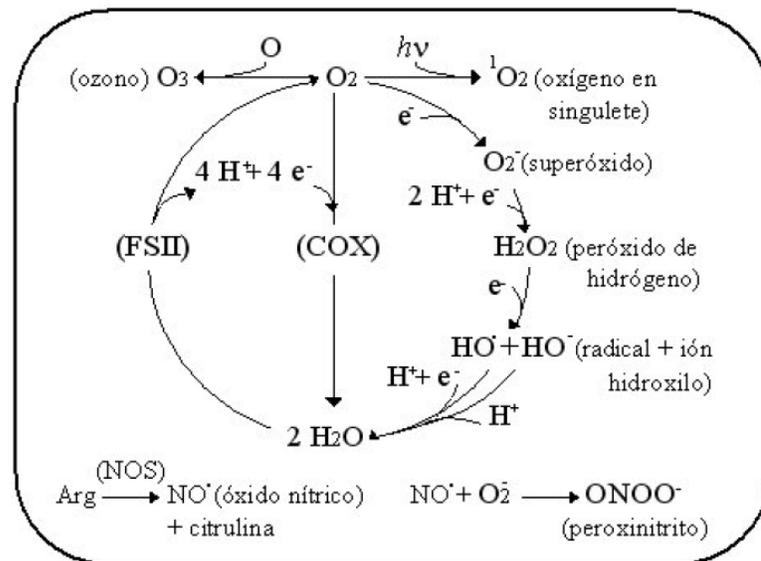


Figura 2.2. Principales Especies de oxígeno reactivas.
(Tomado de Hansberg, 2002)

Las especies de oxígeno reactivas se generan por la ruptura o la excitación del dioxígeno o por la reducción parcial del mismo.

a) Oxígeno molecular

El oxígeno molecular (O_2) corresponde a la forma más conocida de las EORs. También, se hace referencia a esta molécula como dióxígeno; la cual resulta de la unión covalente de 2 átomos de oxígeno. El O_2 posee dos electrones desapareados en su último orbital, por lo que se le denomina que es un dirradical; estos electrones tienen el mismo giro, por lo que sólo pueden interaccionar con los electrones de otros elementos y compuestos que estén libres y que tengan el giro opuesto. Ésta es la razón por la cual el O_2 no es muy reactivo; aunque, es una especie de radical y el oxidante más importante en los organismos aeróbicos (Hansberg, 2002).

b) Anión superóxido

El anión superóxido (O_2^-) es un radical con carga negativa, dado que posee un electrón adicional. El superóxido se forma cuando el O_2 capta un electrón, esto es, se reduce (Hansberg, 2002). Este proceso está mediado enzimáticamente por NADP(H)/Xantinas Oxidasas, y no enzimáticamente por compuestos reactivos al oxígeno como la semi-ubiquinona de la cadena transportadora de electrones (Deby y Goutier, 1990; Ibrahim et al., 2000).

c) Peróxido de hidrógeno

El Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es poco reactivo. La mayoría del peróxido de hidrógeno proviene de la dismutación del superóxido por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Ibrahim et al., 2000). Aunque, el H_2O_2 también se origina por acción de las oxidasas de la xantina, aminoácidos, hexosas y de fenoles (Hansberg, 2002).

d) Radical hidroxilo

El Radical hidroxilo (OH^\cdot) es altamente reactivo. Cuando el peróxido de hidrógeno acepta un electrón, por ejemplo, de un metal de transición como el hierro (Fe^{2+}) y cobre (Cu^{2+}), entonces se fragmenta y forma el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el anión hidroxilo (OH^-) (reacción de Fenton). El OH^- es inocuo y se protona para formar agua; sin embargo, el OH^\cdot es uno de los compuestos más reactivos que existen (Hansberg, 2002; Liu et al., 2007).

2.3.3. Daño oxidativo a macromoléculas

Los RL se generan endógenamente por el metabolismo celular y exógenamente por factores pro-oxidantes como el tabaquismo, alcoholismo, la radiación ultravioleta, contaminación ambiental, exposición a metales pesados como el plomo, alimentación inadecuada, entre otros. Por lo que, si existen altas concentraciones de RL se rompe el equilibrio homeostático produciendo estrés oxidativo, conllevando a que las EORs dañen a la mayoría de constituyentes celulares como lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN (Retana, 2009).

El daño a los lípidos es tema del presente trabajo, por lo que se enfocará a la lipoperoxidación por EORs.

a) Daño de los lípidos por EORs

Los lípidos son susceptibles a sufrir daño por acción de los EORs, las membranas celulares contienen fosfolípidos que pueden ser oxidados fácilmente por un proceso denominado lipoperoxidación, que comprende varias reacciones en cadena comenzando por la sustracción de un átomo de hidrogeno por un RL, originando un radical lipídico (dieno

conjugado) con un átomo de carbono central (C[•]), que en un ambiente aeróbico produce un radical peroxilo (COO[•]); una vez iniciada la reacción este radical peroxilo puede propagar la peroxidación al sustraer un átomo de hidrogeno de un fosfolípido adyacente convirtiéndose así mismo en un hidroperóxido orgánico (COOH[•]), el cual se puede descomponer en otras EORs, incluyendo radicales alcóxilo (CO[•]), aldehídos, epóxidos lipídicos y alcoholes (Niki et al., 2005).

2.3.4. Sistema de defensa contra el estrés oxidativo

Un antioxidante es cualquier sustancia que retrasa, previene o inhibe el daño oxidativo de una molécula blanco (Halliwell, 2007). Además, los antioxidantes pueden eliminar los EORs, removiendo iones metálicos que pueden catalizar reacciones de oxidación (Gutteridge, 1995). Los antioxidantes pueden actuar a diferentes niveles, los cuales previenen la toxicidad de las EORs y se dividen en tres sistemas como se muestran en la figura 2.3.

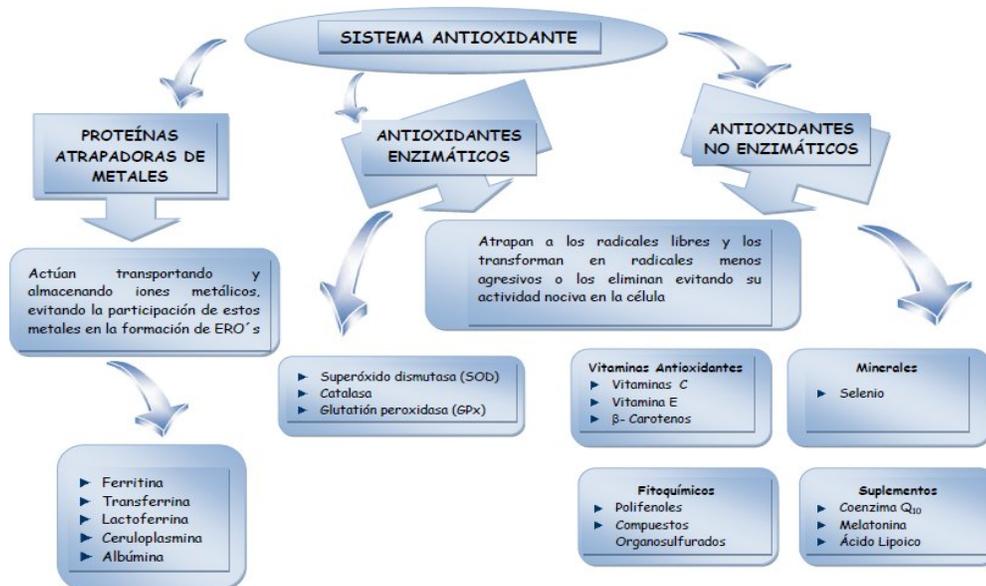


Figura 2.3. Sistema antioxidante. (Tomado de Retana, 2009)

a) Proteínas atrapadoras de metales

Estos antioxidantes actúan transportando y almacenando iones metálicos, de manera que evitan la participación de estos metales en la formación de EORs. Entre este tipo de proteínas, están la ferritina (González et al., 2000), la transferrina (Gutteridge, 1995), albúmina (González et al., 2000). Además, incluyen a la lactoferrina, la ceruloplasmina y la hemopexina y la haptoglobina (Hansberg, 2002).

b) Antioxidantes enzimáticos.

Éstas se encuentran en las células, entre las cuales 3 son las principales enzimas:

Superóxido dismutasa, Catalasa y Glutación peroxidasa (González et al., 2000).

Superóxido dismutasa

La Superóxido dismutasa (SOD), se trata de una familia de isoenzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido (O_2^-) para dar productos como el oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (Hansberg, 2002).

En mamíferos se encuentran 3 formas diferentes: CuZn-SOD (citoplasma), Mn-SOD (mitocondria) y CuZn-SOD de alto peso molecular (fluidos extracelulares). La acción catalítica se lleva a cabo por el cobre y zinc, que no tienen función en el ciclo catalítico, pero estabilizan a la enzima (Fridovich, 1997).

Catalasa

La Catalasa (CAT) es una enzima conformada por 4 subunidades proteicas, cada una con un grupo hemo unido a su sitio activo (González et al., 2000). Se localiza en los eritrocitos

y peroxisomas de las células de la mayoría de los mamíferos. Cataliza la conversión del peróxido de hidrogeno, producida por la SOD, en agua y oxígeno molecular (Hansberg, 2002).

Glutación peroxidasa

La Glutación peroxidasa (GPx) es una enzima conformada por 4 subunidades idénticas que portan un átomo de Selenio, en forma de seleniocisteína; se encuentra en el citoplasma y cataliza la reducción del peróxido de hidrogeno en agua, utilizando para tal efecto electrones del hidrógeno donados a partir del tripéptido glutación (Hansberg, 2002). Además, reduce los peróxidos orgánicos (ROOH) en sus respectivos alcoholes.

En la reacción el glutación es transformado a su forma oxidada (GSSG), pero luego regresa a su estado original por acción de la glutación reductasa. En el humano se han descrito 4 isoenzimas: GPx1, GPx2, GPx3 y GPx4 (Chu et al., 2004).

c) Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos, no son sintetizados por los humanos por lo que se requiere consumirlos de la dieta. Se pueden clasificar en vitaminas antioxidantes, minerales, entre otros.

Vitaminas antioxidantes

Entre los cuales se encuentran:

La vitamina C (ácido ascórbico) es considerada el antioxidante más importante en el líquido extracelular por su efectividad para atrapar iones superóxido y radicales peroxilo antes de que inicie la peroxidación lipídica, protegiendo a las membranas (Padayatty et al., 2002).

La vitamina E, es un término genérico que se utiliza para describir al menos a 8 compuestos que tienen actividad de α -, β -, δ -, γ -tocoferoles. El α -tocoferol es el más abundante, y debido a sus características de liposolubilidad es considerado el antioxidante más efectivo en la fase lipídica (Niki y Noguchi, 2004).

Los carotenoides son pigmentos naturales, que no sintetizan los mamíferos. Actúan como atrapadores de RL, porque cuentan con un sistema de dobles enlaces que permiten desactivarlos por transferencia de electrones (Valko et al., 2004).

Minerales

El Selenio es un no metal considerado como micronutriente y es un componente principal de la enzima glutatión peroxidasa, forma parte de la seleniocisteína, proporcionando su actividad catalítica en asociación con la selenoenzima; además, su escasez está asociada con la disminución de la actividad del glutatión (Navarro et al., 2008).

Fitoquímicos

Entre los cuales se encuentran:

Los Polifenoles, se encuentran en los vegetales. Tienen la capacidad de actuar como antioxidantes por su estructura molecular con anillos fenólicos, y se clasifican en ácidos fenólicos, polímeros fenólicos o taninos y los flavonoides (Sun et al., 2008).

Compuestos organosulfurados, se encuentran presentes en el ajo y la cebolla que contienen compuestos sulfurados por lo que tendrían propiedades antioxidantes, y son capaces de inhibir la lipoperoxidación y la formación del radical hidroxilo (Rahman y Lowe, 2006).

Suplementos

La Coenzima Q₁₀ es una benzoquinona liposoluble, como antioxidante previene la lipoperoxidación (James et al., 2004).

La Melatonina es una hormona producida en la glándula pineal, es lipofílica y como antioxidante previene la lipoperoxidación y actúa como atrapador del radical hidroxilo (Reiter et al., 2007).

2.4. El género *Spirulina*

La *Spirulina* es un cianobacteria, utilizada como alimento tradicional en algunas poblaciones mexicanas y africanas. Es considerada una de las formas de vida más antiguas que existen en las aguas cálidas alcalinas de los lagos volcánicos desde aproximadamente 3.5 billones de años. Este microorganismo presenta una estructura celular en forma de espiral y similar a las estructuras de otras procariontas. Las especies comúnmente usadas

como suplementos nutricionales son la *S. platensis* y *S. maxima*, y en menor frecuencia la *S. fusiformis* (Khan et al., 2005).

La *Spirulina* posee capacidad para crecer en lugares adversos para otros microorganismos, tiene una pared celular suave hecha de azúcares complejos y proteínas, varias especies contienen un perfil nutricional muy rico así como la biodisponibilidad de varios nutrientes es muy alta; además, las especies de la *Spirulina* han mostrado varias propiedades farmacológicas (Khan et al., 2005).

2.4.1. *Spirulina maxima*

La *Spirulina maxima* es una cianobacteria clasificada taxonómicamente en la clase Cyanophyceae, orden nostocales, familia oscillatoriaceae, género *Spirulina*, especie *maxima* o *Geitleri*, la cual actualmente es denominada *Arthrospira maxima*. La célula mide de 5 a 10 μm de diámetro de forma filamentosa y helicoidal con 5 a 6 torciones y se caracteriza por un diámetro de hélice de 50 a 60 μm con un espesor de 80 μm y 200-300 μm de longitud, no ramificada (Chamorro et al., 2002).

2.4.2. Propiedades de la *Spirulina* y efectos farmacológicos

La *Spirulina* presenta varios efectos farmacológicos (Chamorro et al., 2002), como se ilustra en la tabla 2.2. En cuanto a las propiedades antioxidantes de la *Spirulina*, se ha reportado que se debe a que contiene el ácido graso esencial gamma-linolénico (GLA), β -caroteno y la ficocianina que tienen la capacidad de atrapar a los radicales libres, y la ficocianina además inhibe la lipoperoxidación (Gershwin y Belay, 2008).

Tabla 2.2. Efectos farmacológicos de la *Spirulina*. (Tomado de Chamorro et al., 2002)

EFEECTO	MODELO	RESUMEN DE RESULTADOS
1.- Antialérgico	Rata	La inoculación intraperitoneal inhibió varios tipos de reacciones alérgicas. In vitro previno la producción de TNF-alfa por macrófagos peritoneales. Resultados similares se obtuvieron con la proveniente de otra fuente.
2.- Antianémico.	Rata.	Sola o en combinación con gluten de trigo, aumento el contenido de hierro y hemoglobina durante la primera semana de la gestación y en la lactación.
3.- Anticancerígeno.	Células. Ratón.	Siete administraciones intravenosas de 100 µg de Ca-SP cada una, obtenido de la cianobacteria, causaron marcada disminución de tumor pulmonar colonizado con células B16-B6. Redujo el citocromo P450 hepático, inducción de la glutathion-S-transferasa hepática; sin embargo, la actividad de la glutathion-S-transferasa extrahepática, no presentó cambios. Aumento el tiempo de supervivencia de ratones BALB/c inoculados con el linfosarcoma L517BY.
4.- Anticoagulante.	Cofactor heparina. Fibroblastos.	Un polisacárido aislado de la cianobacteria aumentó en más de mil veces la actividad antitrombina del cofactor II de la heparina. El mismo polisacárido incremento la producción de activador del plasminógeno, en una línea celular de fibroblastos humanos.
5.- Antigenotóxico.	Células.	Extractos acuosos y orgánicos inhibieron la frecuencia de micronúcleos en células meióticas de <i>Tradescantia</i> , inducida por la hidrazida maleico.
6.- Antihepatotóxico.	Rata.	La <i>Spirulina</i> , el extracto oleoso y la fracción de la cianobacteria exenta de grasa previnieron el hígado graso inducido por tetracloruro de carbono. La ficocianina proveniente del alga protegió contra la hepatotoxicidad producida por tetracloruro de carbono y pulegona.
7.- Antiinflamatorio.	Ratón. Ratón y rata. Ratón. Rata.	La ficocianina, obtenida de <i>Spirulina</i> redujo la inflamación producida por peróxido. La ficocianina, obtenida de la cianobacteria mostró actividad antiinflamatoria en cinco modelos experimentales. Extractos de ficocianina obtenidos de <i>Spirulina</i> inhibieron el edema en oído y las concentraciones de LTB ₄ inducidos por ácido araquidónico. La ficocianina, obtenida de <i>Spirulina</i> redujo la actividad de la mieloperoxidasa e inhibió la infiltración celular inflamatoria y el daño en colon.
8.- Antiparasitario.	Ratón.	En ratones inoculados con <i>Plasmodium chabaudi</i> no se observó efectos en la parasitemia pero tampoco desarrollaron recrudescencia.
9.- Antitóxico.	Rata.	Redujo la toxicidad del plomo sobre testículos, peso corporal y diámetro tubular.
10.- Antiviral.	Células humanas. Virus.	Un extracto acuoso inhibió en 50% la producción de HIV-1 en líneas de células humanas, células mononucleares y células de Langerhans. El Ca-Spirulan inhibió la replicación de HIV-1 y HSV-1 en líneas de células humanas. El reemplazo del ion Ca por iones de Na y K en la molécula de Ca-SP, conservó su actividad antiviral.
11.- Cardiovascular.	Anillos aórticos.	Administrada durante dos semanas al 5% en la dieta, mostró efectos sobre las respuestas vasomotoras dependientes del endotelio en anillos de aorta. Administrada durante seis semanas al 5% en la dieta, previno los efectos vasomotores de una dieta rica en fructosa(60%) en anillos de aorta de rata. El extracto alcohólico aumento la síntesis de NO por el endotelio y de un prostanóide vasoconstrictor por células no endoteliales.
12.- Hipoglicemiante.	Rata.	El extracto metanólico causó disminución del área bajo la curva de glucosa en animales diabéticos, sugiriendo efecto hipoglicemiante. Sin embargo, el extracto diclorometanólico produjo efecto hiperglicemiante en ratas normales y diabéticas, mostrando la existencia de principios antagónicos en el alga.
13.- Hipolipidémico.	Rata.	Disminución del colesterol hepático incrementado por el tetracloruro de carbono.
14.- Inmunoestimulante.	Ratón. Pollo. Gatos.	La incorporación a la dieta de ratones normales mejoró las respuestas de anticuerpos a eritrocitos de carnero. La administración simultánea oral con un antígeno, incremento la respuesta de IgA en intestino. La administración de un extracto a cultivos de macrófagos peritoneales de pollo aumentó su capacidad fagocítica. La incorporación a la dieta de pollos, mejoro su respuesta secundaria de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero, la respuesta mitogénica a PHA, la actividad fagocítica de macrófagos y la actividad NK. La adición de extracto a cultivos de macrófagos de gato aumentó su capacidad fagocítica.

CAPITULO III. ANTECEDENTES

El hígado tiene una función importante en el metabolismo del plomo, en especial por el daño que ocasiona a nivel de las membranas donde produce lipoperoxidación, ocasionado hepatotoxicidad (Sivaprasad et al., 2004).

Estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que el metabolismo de los lípidos se altera en la exposición aguda y crónica al plomo (Ademuyiwa et al., 2009); además, el plomo inhibe la actividad de las enzimas antioxidantes como la Superóxido Dismutasa, la Catalasa y altera el nivel del Glutati6n incrementando la peroxidaci6n lipídica (Rahman et al., 2006), lo cual daña a las proteínas, membranas celulares y el DNA, entre otros; sin embargo, este daño disminuye cuando se suministra antioxidantes como la linaza (Newairy et al., 2009).

La *Spirulina maxima* es una cianobacteria que tiene efecto hepatoprotector en la rata, y otros modelos experimentales (Karadeniz et al., 2009). Asimismo, se ha descrito un efecto hipolipemiante y antioxidante de la *Spirulina* en humanos (Torres et al., 2007; Park et al., 2008). También, la *Spirulina* es una fuente de β -caroteno, α -tocoferol y ficocianina; por lo que presenta propiedades antioxidantes (Khan et al., 2005; Wang et al., 2007; Huang et al., 2007).

CAPITULO IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La *Spirulina* incrementará la defensa antioxidante en la hepatotoxicidad inducida por plomo.

OBJETIVOS:

Objetivo General

Evaluar los efectos de la *Spirulina maxima* en la hepatotoxicidad inducida por plomo en el modelo experimental de la rata Wistar.

Objetivos Específicos

- Identificar el perfil de lípidos plasmáticos y hepáticos en la hepatotoxicidad inducida con plomo y su posible modificación por la *Spirulina*.
- Evaluar el estado antioxidante en el hígado en la hepatotoxicidad inducida con plomo y su posible modificación por la *Spirulina*.
- Determinar el efecto preventivo de la *Spirulina* en la hepatotoxicidad inducida por plomo.

CAPITULO V. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló con un diseño de tipo experimental, el cual consistió en evaluar los efectos de la *Spirulina* en la hepatotoxicidad inducida con acetato de plomo en ratas macho.

El estudio se realizó en dos etapas, en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales fueron cuidados y mantenidos en buenas condiciones ambientales, con supervisión diaria de su estado de salud y manipuladas adecuadamente (NOM-062-ZOO, 1999).

5.1. Diseño experimental

Previo al estudio, se realizó un experimento piloto con 18 ratas, para establecer los procedimientos y experimentos durante el estudio tanto en el bioterio como en el laboratorio. Además, se evaluó el curso temporal del daño oxidativo por plomo en hígado y riñón con 28 ratas.

En la primera etapa se evaluó la dosis tóxica del plomo en 27 ratas; además, se validaron las técnicas, métodos y logística del estudio. En la segunda etapa se evaluó el efecto profiláctico de la *Spirulina* en la hepatotoxicidad inducida con acetato de plomo en 18 ratas. En total, se evaluaron a 91 ratas macho de la cepa Wistar (180-210 g) obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina - UNAM. La toxicidad por plomo fue de tipo sub-crónica.

5.1.1. Aclimatación

Los animales fueron mantenidos en grupos de 3 en jaulas de plástico. En la primera y segunda etapa, previo a la inducción de la hepatotoxicidad con acetato de plomo, las ratas se aclimataron por una semana con la dieta respectiva y controlada (20 g/rata/día); el agua fue *ad libitum* para todos los grupos; la temperatura de 20°C y períodos de 12 horas de luz-obscuridad.

Los animales fueron pesados interdiariamente para evaluar la ganancia de peso corporal desde el inicio del estudio y hasta el día del sacrificio.

5.1.2. Preparación de la dieta *Spirulina*

Dieta *Spirulina*: Se mezcla la *S. maxima* al 5% con la dieta Purina® y la dieta elaborada se suministró a una dosis de 20 g/rata/día (1 g de *Spirulina*/rata/día).

Dieta Purina®: Alimento para ratas. Se suministra a una dosis de 20 g/rata/día.

5.2. Tratamiento de los animales

5.2.1. Evaluación de la hepatotoxicidad por acetato de plomo

Se evaluó la dosis del plomo que se utilizó en la segunda etapa del estudio; además, se evaluó el tiempo de la hepatotoxicidad post tratamiento con el acetato de plomo. Asimismo, se validaron las técnicas, métodos y logística del estudio para el desarrollo del trabajo en el bioterio y laboratorio. En total, se evaluaron a 27 ratas distribuidas aleatoriamente en tres grupos iguales. El primer grupo fue usado como Control, recibieron dieta Purina® y tres dosis de solución salina isotónica (cloruro de sodio al 0.9 %), usado como vehículo vía intraperitoneal (i.p.) con intervalo de una semana. El segundo grupo (AcPb50) recibió dieta

Purina® y dos dosis de 25 mg de acetato de plomo vía i.p. con intervalo de una semana. El tercer grupo (AcPb75) recibió dieta Purina® y tres dosis de 25 mg de acetato de plomo vía i.p. con intervalo de una semana. Los animales fueron sacrificados a los días de la última dosis de acetato de plomo.

5.2.2. Evaluación del efecto profiláctico de la *Spirulina*

Se evaluó el efecto profiláctico de la *Spirulina* en la hepatotoxicidad inducida por plomo, posterior a los resultados y conclusiones de la primera etapa. Se evaluaron a 18 ratas distribuidas aleatoriamente en tres grupos iguales. El primer grupo fue usado como Control, recibieron dieta Purina® y tres dosis de solución salina isotónica (como vehículo) vía i.p. con intervalo de una semana. El segundo grupo (AcPb-sinSpirulina: AcPb-sinSp) recibió dieta Purina® y tres dosis de 25 mg de acetato de plomo vía i.p. con intervalo de una semana. El tercer grupo (AcPbSpirulina: AcPb-Sp) recibió dieta *Spirulina* y tres dosis de 25 mg de acetato de plomo vía i.p. con intervalo de una semana. Los animales fueron sacrificados dentro de las 24 horas, posterior a la última dosis de acetato de plomo.

5.3. Evaluación de las muestras de estudio

Al final del período del tratamiento, después de 4 semanas aproximadamente; las ratas, previo ayuno de 12 horas, fueron sacrificadas por decapitación. Las muestras sanguíneas se colectaron para obtener el plasma. También, el hígado se disecó, se pesó y se obtuvieron fragmentos de 1 g aproximadamente, del mismo lóbulo, para la extracción de lípidos totales hepáticos según el método de Folch, y para la determinación de la actividad antioxidante.

5.3.1. Muestra sanguínea

Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos Vacutainer con heparina para obtener el plasma; en un volumen de 5 ml. Se asignaron los códigos a cada tubo según la rata evaluada, de acuerdo al proceso de la toma de muestra sanguínea. La muestra de plasma obtenida se utilizó inmediatamente para analizar los niveles de ALT y se guardaron alícuotas de plasma para determinar los lípidos.

5.3.2. Muestra de hígado

Las muestras de hígado fueron colectadas en papel aluminio y se pesaron, luego se obtuvieron fragmentos de 1 g tanto para el análisis de enzimas como de lípidos totales. Se asignaron los códigos a cada muestra de hígado según la rata evaluada, de acuerdo al proceso de disección. La muestra de hígado después de ser homogenizado con solución de fosfatos (0.02 M, pH= 7.2) se utilizó inmediatamente para evaluar el nivel de las enzimas. La muestra restante de hígado se guardó en congelación (- 74 °C).

5.4. Reactivos, químicos y la *Spirulina*

Todos los reactivos y productos químicos utilizados fueron de grado analítico. El acetato de plomo (AcPb) se compró de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). La *Spirulina maxima* en polvo utilizada en la dieta experimental se compró de Alimentos Esenciales para la Humanidad (México) y estuvo libre de plomo. El colesterol total (CT), triacilgliceroles (TAG) y alanina aminotransferasa (ALT) fueron evaluados por kit enzimáticos (Spinreact, México). Los Lípidos totales (LT) del hígado, se extrajeron con 20 volúmenes de cloroformo / metanol (3:1, v / v, Merck, México).

5.5. Análisis de lípidos

Se realizaron las determinaciones de colesterol total (CT) y triacilgliceroles (TAG) tanto en plasma como en hígado por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales (Spinreact, México). Los lípidos totales se determinaron gravimétricamente.

5.5.1. Determinación de Colesterol Total

Se empleó el kit enzimático Spinreact, México. Se valora por colorimetría.

- 1) Ésteres de colesterol + H₂O + **CE** -----> Colesterol + R-COOH
- 2) Colesterol + O₂ + **CO_x** -----> D⁴-colestenona + H₂O₂
- 3) 2H₂O₂ + 4-aminofenezona + fenol + **PO_x** ----> **Quinona** + 4H₂O

5.5.2. Determinación de Triacilgliceroles

Se empleó el kit enzimático Spinreact, México. Se valora por colorimetría.

- 1) Triacilgliceroles + 3H₂O + **LP** -----> Glicerol + 3R-COOH
- 2) Glicerol + ATP + **GK** -----> Glicerol-3-P + ADP
- 3) Glicerol-3-P + O₂ + **GFO_x** -----> Dihidroxiacetona-P + H₂O₂
- 4) H₂O₂+4-aminofen.+ 4-clorofenol+ **PO_x** ----> **Quinona** + 2H₂O+HCl.

5.5.3. Análisis de Lípidos totales de hígado

Primero se realizó la extracción de lípidos por el método modificado de Folch (González et al, 1993), se homogeniza 1 g de hígado en 4 ml de amortiguador de fosfatos, (NaHPO₄) 0.02M a pH = 7.2, en un homogenizador (POLYTRON) a velocidad media durante 3 min. Posteriormente, el homogenizado se coloca en un embudo de separación con 20 ml de la

solución de Folch (CHCl₃/MetOH, 3:1 v/v), se hace 3 extracciones. Las fases se separan por centrifugación a 1,048 x g por 5 min; la fase orgánica, los lípidos, se colecta en viales con tapa. Sin evaporar, la última extracción se lava con 10 ml de agua destilada. La fase clorofórmica se trata con sulfato de sodio anhídrido para eliminar las trazas de humedad y el extracto se seca a 40°C bajo corriente de N₂. La cantidad de lípidos totales se determina gravimétricamente.

5.6. Análisis de aminotransferasas

Se evalúa el nivel de la alanina aminotransferasa (ALT) dentro de las 24 horas posteriores al sacrificio por métodos enzimáticos comerciales. Se empleó el kit enzimático Spinreact, México. Se evalúa la actividad de la enzima observada cada minuto durante 5 min, valorado por espectrofotometría a 340 nm.

1) Alanina + α -cetoglutarato + **ALT** -----> Piruvato + Glutamato

2) Piruvato + NADH + H⁺ + **LDH** -----> Lactato + **NAD⁺**

5.7. Análisis de la actividad antioxidante

Se evaluaron la actividad de la Superóxido Dismutasa (SOD) y la Catalasa (CAT) y el nivel del Glutatió (GSH) total de acuerdo al método de Kono (1978), Aebi (1984) y de Owens (1965), respectivamente.

5.7.1. Determinación de la Superóxido Dismutasa

La Superóxido Dismutasa (SOD), se determinó por el método de Kono (1978) a 560 nm de absorbancia. Se valora la reducción de NBT (nitroazul de tetrazolium); se colocan 25µl de

homogenado, 25µl de Tritón – X100, 0.6%, 25µl de EDTA 0.1M y 25µl de carbonato de sodio 50 mM. Se incuban a 37 °C por 10 min, luego se coloca hidrocloreuro de hidroxilamina 20 mM y se realiza la lectura de las absorbancias cada minuto durante 5 min.

5.7.2. Determinación de la Catalasa

La Catalasa (CAT), se determinó por el método de Aebi (1984) a 240 nm de absorbancia. Se valora la desaparición de H₂O₂; se colocan 10µl del homogenado, 635µl de buffer de fosfatos (Na₂HPO₄), 335µl de H₂O₂ 0.03 M y se realiza la lectura de las absorbancias cada minuto durante 5 min.

5.7.3. Determinación del Glutati6n Total

El Glutati6n (GSH) Total, se determinó por el método de Owens (1965) a 412 nm de absorbancia. Previamente, se realizó una curva estándar. Para preparar la muestra de GSH se coloca 500 µl del homogenado con 50 µl de ácido tricloro acético (TCA) al 28% y se centrifuga a 10000 RPM por 5 min, luego se usa el sobrenadante para la determinaci6n de GSH. Se colocaron 20 µl de homogenado, 610 µl de Na₂HPO₄, (0.3M, pH 7.2) y 50 µl de DTNB (ácido ditio-bis nitro benzoico, 0.4 mg/ml en 1% de citrato de sodio). Se incuban a temperatura ambiente por 5 min y se realiza la lectura.

5.8. Análisis de productos de lipoperoxidaci6n

Por el método de Ohkawa (1979) a 535 nm de absorbancia. Se evaluó el nivel de productos finales de la lipoperoxidaci6n por la técnica de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Se coloca 150 µl del sobrenadante (homogenado con TCA), luego

se agrega 150 μ l de HCl 0.6N y 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.12M en tris (hidroximetil-aminometano) 0.026 M. La mezcla, se lleva a baño María hasta ebullición por 10 min y luego se determina por absorbancia. Previamente, se realiza una curva estándar con 2.2 – 22 μ g de tetraetoxipropano (TEP) que equivalen a 0.72 – 7.2 μ g de malondialdehído (MDA), bajo las mismas condiciones de experimentación. Los resultados de la muestra de estudio fueron expresados con base a la curva de TEP y se reportó en concentración de MDA.

5.9. Determinación de proteínas

Por el método de Bradford a 595 nm de absorbancia. Se evaluó la concentración de proteínas en la muestra del homogenado por el método de Bradford (Kruger, 1994). Previamente, se realizó una curva estándar con albúmina bovina (1mg/ml). Se colocó 10 μ l del homogenado y con agua bidestilada se completó hasta 100 μ l y luego se agrega 2.5 mL de la solución de Bradford, después de mezclarlos se incubó a t° ambiente en oscuridad por 10 min antes de hacer la lectura. Los resultados de la absorbancia de cada muestra fueron interpolados en la curva de albúmina para determinar la concentración de proteína.

Las muestras de hígado fueron procesadas y analizadas, y los parámetros que se determinaron en ellas, se reportaron respecto a la concentración de proteína de cada muestra.

5.10. Limitaciones

No se determinó los niveles de plomo en las ratas.

5.11. Aspectos éticos

Para todas las etapas del presente trabajo, se desarrolló el estudio en el manejo de los animales de experimentación de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO, 1999).

5.12. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados y analizados con el Programa SPSS versión 15.0 para Windows. Inicialmente se hizo el análisis descriptivo con frecuencias, así como medidas de tendencia central y de dispersión de acuerdo al tipo de variable. Las variables incluidas fueron: Grupo de estudio evaluadas (3 categorías); niveles de ALT, CT, TAG, SOD, CAT, MDA y GSH (como variables continuas). Se utilizó la prueba de análisis de varianza con la prueba de Bonferroni, considerando para todas ellas una $p < 0,05$ para ser estadísticamente significativo.

CAPITULO VI. RESULTADOS

La exposición a metales pesados como el plomo, conlleva a diferentes problemas en la salud, y entre los órganos afectados el hígado es uno de los más afectados en la cual se da la hepatotoxicidad por la peroxidación lipídica. Por otro lado, en varios estudios se han reportado diferentes compuestos que pueden prevenir la toxicidad por la exposición a plomo; sin embargo, no se ha estudiado a la *Spirulina maxima* sobre los aspectos preventivos en este tipo de daños, aunque ya se conocía sus principios activos como antioxidante. Por lo que, el estudio evalúa los efectos preventivos de la Sm en el metabolismo lipídico y el sistema antioxidante en la hepatotoxicidad inducida por el plomo. Para lo cual, se basó en un modelo experimental y los resultados se muestran a continuación.

6.1. Peso corporal de las ratas

La ganancia de peso en los animales evaluados se registró interdiariamente durante todo el estudio. Se encontró que el grupo AcPb-sinSp ganó menos peso comparado a los grupos AcPb-Sp y Control. Por lo que, al final del experimento la ganancia de peso corporal en el grupo AcPb-Sp (50.94 ± 5.23 g) fue similar al grupo Control (52.36 ± 4.51 g); sin embargo, en el grupo AcPb-sinSp (47.41 ± 3.83 g) ganaron menos peso respecto al grupo Control ($p < 0,05$).

6.2. Determinación del perfil de lípidos plasmáticos y hepáticos.

En la tabla 6.1, se muestra los niveles de CT y TAG tanto en plasma como en hígado. Se observa que en el grupo AcPb-sinSp los niveles de CT y TAG están elevados comparados al grupo Control ($p < 0.05$). Por otro lado, en el grupo AcPb-Sp se encontró niveles de CT y TAG similares al grupo Control, pero significativamente menores que del grupo AcPb-sinSp ($p < 0.05$).

En el caso de los lípidos totales evaluados en el hígado se encontró niveles similares en los tres grupos de estudio.

6.3. Determinación de la actividad de la alanina aminotransferasa

En plasma se evaluó la actividad de la ALT. Se encontró que en el grupo AcPb-sinSp la actividad de la ALT estuvo incrementada comparada a los grupos Control ($p < 0.05$) y AcPb-Sp ($p < 0.05$). Por otro lado, en el grupo AcPb-Sp la actividad de la ALT fue similar al grupo Control ($p < 0.05$) (Tabla 6.1).

6.4. Evaluación de los indicadores del estado antioxidante en hígado

Se evaluó las actividades enzimáticas de la SOD y la CAT y el nivel del GSH. Se encontró que las actividades de la SOD y la CAT en el hígado de la rata fueron menores en el grupo AcPb-sinSp comparados al grupo Control ($p < 0.05$). Por otro lado, en el grupo AcPb-Sp las actividades de la SOD y la CAT fueron similares al grupo Control, pero significativamente mayores a las encontradas en el grupo AcPb-sinSp ($p < 0.05$) (Fig. 6.1).

En cuanto al nivel del GSH en el hígado de la rata, se encontró que en el grupo AcPb-sinSp el nivel del GSH fue menor comparado a los grupos Control ($p < 0.05$) y AcPb-Sp (p

<0.05). Por otro lado, el grupo AcPb-Sp presentó niveles similares al grupo Control (Fig. 6.1).

Tabla 6.1. Efectos de la *Spirulina maxima* sobre los parámetros bioquímicos en la exposición sub-crónica a plomo en ratas.

Variable	Grupos experimentales		
	Control	AcPb-sinSp	AcPb-Sp
Aminotransferasa			
Alanina aminotransferasa (ALT) (U/L) ^a	28.76±5.84	46.51±4.04 ^b	31.72±4.72 ^c
Lípidos en plasma (mg/dL)			
Colesterol Total (TC) ^a	80.07±2.54	107.83±2.69 ^b	82.99±12.70 ^c
Triacilgliceroles (TAG) ^a	91.13±2.45	125.24±4.43 ^b	94.35±5.09 ^c
Lípidos en Hígado (μg/mgLip)			
Colesterol Total (CT) ^a	133.49±10.73	174.18±13.13 ^b	134.32±10.76 ^c
Triacilgliceroles (TAG) ^a	65.05±6.84	197.93±9.05 ^b	70.25±11.22 ^c
Lípidos Totales (LT) (mgLip/g Hígado)	48.98±2.38	52.47±3.27	49.40±3.28

Los valores están expresados en media±SD (n=6); en cada grupo. AcPb (Acetato de plomo, 75 mg). Control (sin AcPb y sin *Spirulina*), AcPb-sinSp (AcPb sin *Spirulina*); AcPb-Sp (AcPb con *Spirulina*).

^ap < 0.05, significativamente diferente. ANOVA.

^bp < 0.05, Grupo AcPb-sinSp comparado con el grupo Control. Prueba de Bonferroni.

^cp < 0.05, Grupo AcPb-sinSp comparado con el grupo AcPb-Sp. Prueba de Bonferroni.

6.5. Evaluación de los productos de lipoperoxidación en hígado

Se evaluó el nivel de MDA en el hígado de la rata, se encontró que en el grupo AcPb-sinSp el nivel de MDA fue 1.51 y 1.42 veces mayor comparado a los grupos Control (p <0.05) y AcPb-Sp (p <0.05), respectivamente. Por otro lado, el grupo AcPb-Sp presentó niveles de MDA similares al grupo Control (Fig. 6.1).

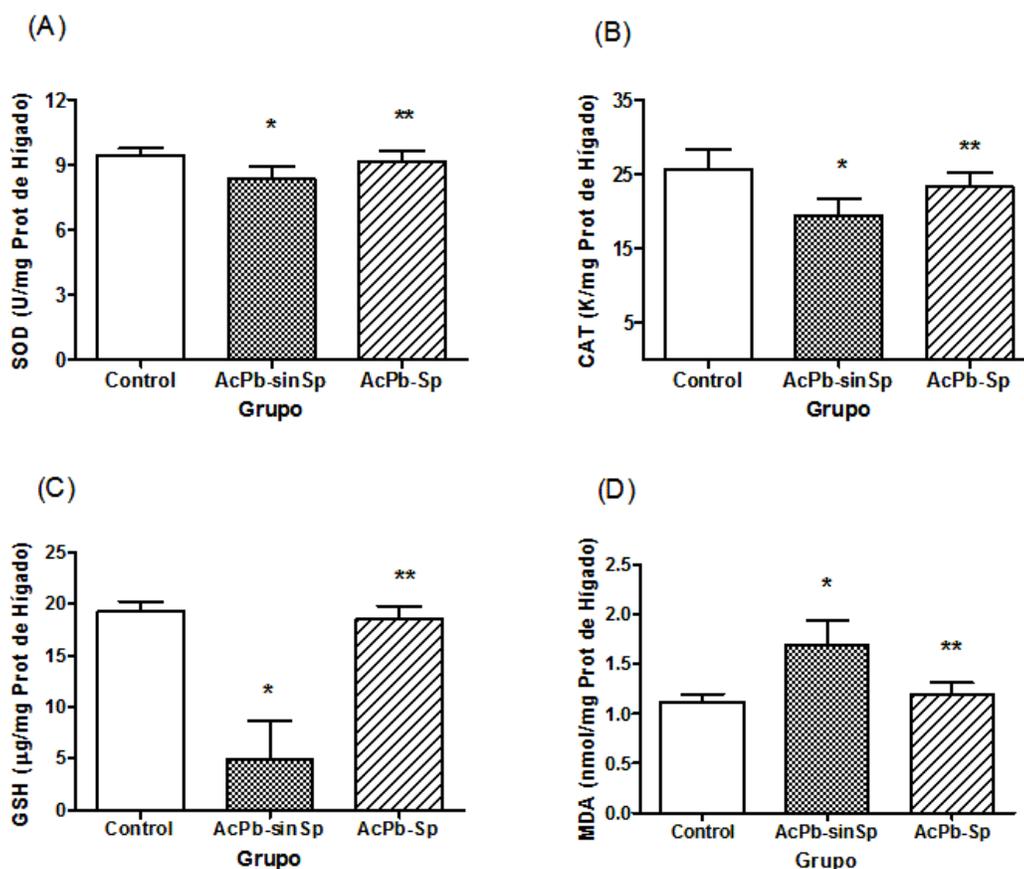


Figura 6.1. Efectos de la *Spirulina maxima* sobre los indicadores del estado oxidativo en el hígado durante la exposición a plomo en ratas.

Los animales fueron tratados con un vehículo o con 75 mg de acetato de plomo (AcPb, 25 mg/0.5 ml de solución salina isotónica cada vez, i.p., por 3 veces en los días 14, 21 y 28, y fueron sacrificados el día 30). Los valores se expresaron en media \pm SD de $n = 6$ ratas.

(A) Actividad total de la Superóxido Dismutasa (SOD). (B) Actividad de la Catalasa (CAT). (C) Nivel del Glutatión (GSH). (D) Nivel de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Control (sin AcPb y sin *Spirulina*), AcPb-sinSp (AcPb sin *Spirulina*), AcPb-Sp (AcPb con *Spirulina*). * $p < 0.05$, Grupo AcPb-sinSp comparado con el grupo Control. ANOVA con prueba de Bonferroni. ** $p < 0.05$, Grupo AcPb-sinSp comparado con el grupo AcPb-Sp. ANOVA con prueba de Bonferroni.

6.6. Resultados adicionales publicados

En la exposición a metales pesados como el plomo, son varios los órganos afectados. El riñón, es otro de los órganos que sufre daño por la peroxidación lipídica. Por otro lado, también varios estudios han reportado diferentes compuestos que pueden prevenir la

toxicidad por la exposición a plomo a nivel renal; sin embargo, no se ha estudiado a la *Spirulina maxima* sobre los aspectos preventivos en este tipo de daños. Por lo que, el estudio adicionalmente evaluó los efectos preventivos de la Sm sobre el sistema antioxidante en la nefrotoxicidad inducida por el plomo en el modelo experimental y los resultados se muestran a continuación.

6.6.1. Evaluación de los indicadores del estado antioxidante en el riñón

Se evaluó las actividades enzimáticas de la SOD y la CAT y el nivel del GSH. Se encontró que las actividades de la SOD y la CAT en el riñón de la rata estuvieron disminuidas en el grupo AcPb-sinSp comparadas al grupo Control ($p < 0.05$). Por otro lado, en el grupo AcPb-Sp las actividades de la SOD y la CAT fueron similares al grupo Control, pero significativamente diferente a las encontradas en el grupo AcPb-sinSp ($p < 0.05$) (Fig. 6.2).

En cuanto al nivel del GSH en el riñón de la rata, se encontró que en el grupo AcPb-sinSp el nivel del GSH fue menor comparado a los grupos Control ($p < 0.05$) y AcPb-Sp ($p < 0.05$). Por otro lado, el grupo AcPb-Sp presentó niveles similares al grupo Control (Fig. 6.2).

6.6.2. Evaluación de los productos de lipoperoxidación en el riñón

Se evaluó el nivel de MDA en el riñón de la rata, se encontró que en el grupo AcPb-sinSp el nivel de MDA fue 1.44 y 1.43 veces mayor comparados a los grupos Control ($p < 0.05$) y AcPb-Sp ($p < 0.05$), respectivamente. Por otro lado, el grupo AcPb-Sp presentó niveles de MDA similares al grupo Control (Fig. 6.2).

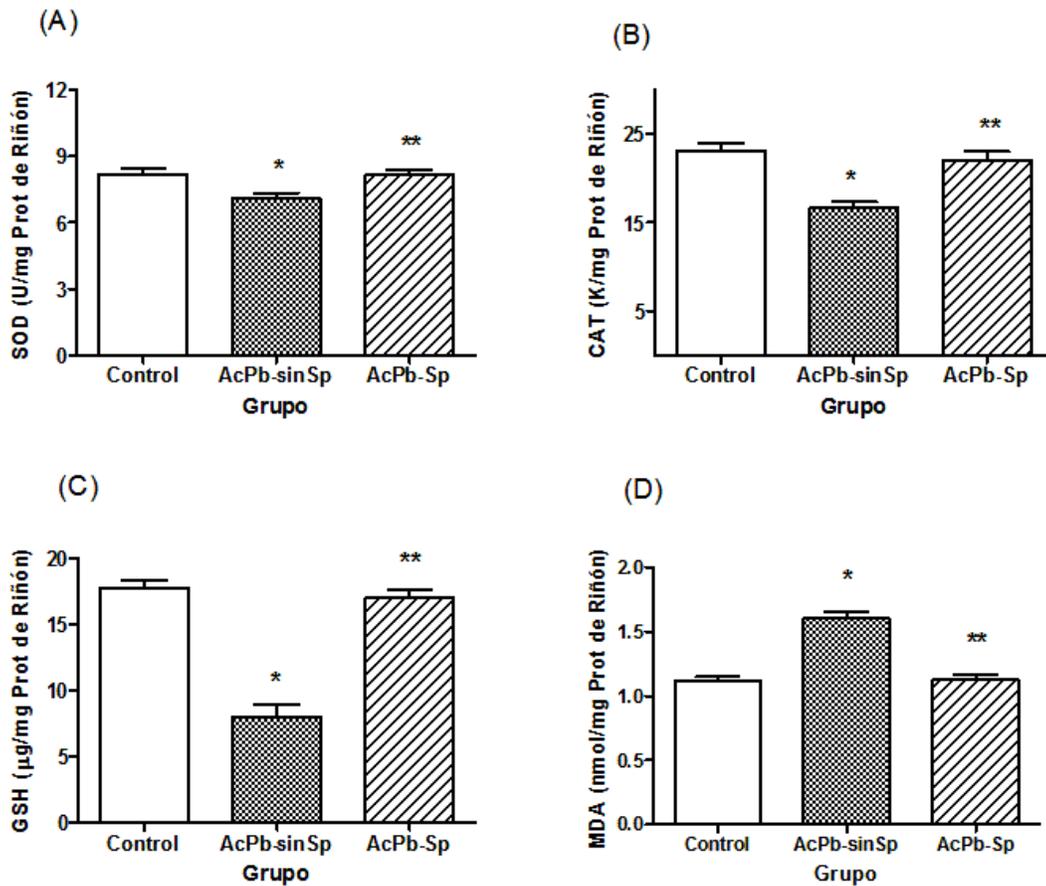


Figura 6.2. Efectos de la *Spirulina maxima* sobre los indicadores del estado oxidativo en el riñón durante la exposición a plomo en ratas.

Los animales fueron tratados con un vehiculo o con 75 mg de acetato de plomo (AcPb, 25 mg/0.5 ml de solución salina isotónica cada vez, i.p., por 3 veces en los días 14, 21 y 28, y fueron sacrificados el día 30). Los valores se expresaron en media \pm SD de n = 6 ratas.

(A) Actividad total de la Superóxido Dismutasa (SOD). (B) Actividad de la Catalasa (CAT). (C) Nivel del Glutatión (GSH). (D) Nivel de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Control (sin AcPb y sin Spirulina), AcPb-sinSp (AcPb sin Spirulina), AcPb-Sp (AcPb con Spirulina). *p < 0.05, Grupo AcPb-sinSp comparado con el grupo Control. ANOVA con prueba de Bonferroni. **p < 0.05, Grupo AcPb-sinSp comparado con el grupo AcPb-Sp. ANOVA con prueba de Bonferroni.

6.7. Resultados adicionales No publicados

Posterior a los resultados obtenidos en el trabajo, surgió otra pregunta a raíz de la investigación. La Sm tendrá algún efecto posterior al daño oxidativo por la exposición a

plomo; es decir, la Sm tendrá un efecto terapéutico, de modo que pueda revertir el daño por exposición a compuestos como el plomo. Por lo anterior, en este estudio se evaluó el curso temporal del daño oxidativo por plomo en hígado y riñón para evaluar el efecto terapéutico de la Sm. Se evaluaron a 28 ratas distribuidas aleatoriamente en 4 grupos (Control: referencia; y 3 de experimentación) para determinar el daño oxidativo por la exposición a plomo durante los 2, 6 y 14 días post tratamiento. Para lo cual, se inyectó vía i.p. una dosis única de 100 mg de acetato de plomo a cada rata en el tiempo cero (inicio del curso temporal) y fueron sacrificadas de acuerdo a los días evaluados. Los resultados se muestran en la figura 6.3.

6.7.1. Curso temporal de la exposición a plomo en el hígado

En la figura 6.3 se muestran los cambios respecto al Control en el tiempo, donde se ve el hígado afectado por la toxicidad del plomo en una exposición aguda vía intraperitoneal. Los niveles del GSH en hígado se muestran disminuidos respecto al Control, hasta 6 días post tratamiento. Por lo anterior, la defensa antioxidante está disminuida y sólo se observa la recuperación hasta el 14^o día. Por otro lado, los niveles de las TBARS están incrementados desde el segundo día y se recuperan hasta las 2 semanas de exposición a plomo.

6.7.2. Curso temporal de la exposición a plomo en el riñón

En la figura 6.3 se muestran los cambios respecto al Control en el tiempo, donde se ve que el riñón está afectado por la toxicidad del plomo en una exposición aguda vía intraperitoneal. Los niveles del GSH en el riñón se muestran disminuidos respecto al

Control hasta 14 días post tratamiento. Por lo anterior, la defensa antioxidante fue menor en función del tiempo y no se observó recuperación hasta el último día de evaluación (14avo día). Por otro lado, los niveles de las TBARS están incrementados respecto al Control y se recuperan ligeramente hasta las 2 semanas de exposición a plomo.

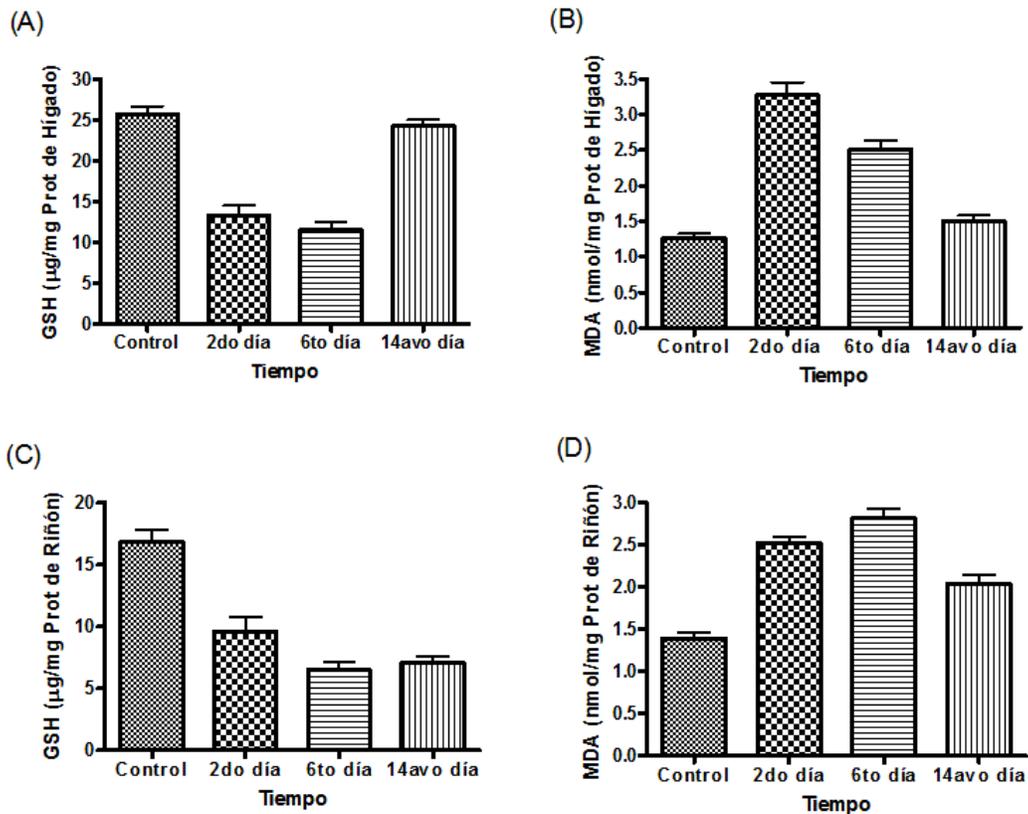


Figura 6.3. Curso Temporal del plomo en el hígado y riñón durante el daño oxidativo en ratas.

Los animales fueron tratados con una solución salina o con una única dosis de 100 mg de acetato de plomo (AcPb, 100 mg/1.5 ml de solución salina isotónica una sola vez, i.p., y fueron sacrificados por grupos a los 2, 6 y 14 días post tratamiento). Los valores se expresaron en media \pm SD n = 7 ratas.

(A) Nivel del Glutatión (GSH) en el hígado. (B) Nivel de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el hígado. (C) Nivel del Glutatión (GSH) en el riñón. (D) Nivel de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el riñón. Control (sin AcPb: tiempo cero).

CAPITULO VII. DISCUSIÓN

El presente trabajo evaluó los efectos preventivos de la Sm en la hiperlipidemia y el daño oxidativo en la hepatotoxicidad inducida por el plomo, y adicionalmente en el daño oxidativo del riñón. Diversos estudios han mostrado que la exposición ambiental y ocupacional a compuestos como el plomo conllevan a un desbalance a favor de los RL, dando como resultado el estrés oxidativo, cuyo desequilibrio bioquímico se vincula a diversas enfermedades como la aterosclerosis, cataratas, cáncer, entre otros; por lo que, el daño oxidativo es el que revierte importancia, dado que los RL generados por los metales pesados como el plomo, ocasionan daño a la mayoría de constituyentes celulares como lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN (Retana, 2009).

Para inducir el daño oxidativo en nuestro modelo experimental, se usó acetato de plomo por sus características químicas de solubilidad, y la dosis empleada fue con base a los reportado en otros estudios (Hsu y Guo, 2002) y a estudios preliminares realizados para el desarrollo del presente estudio. Por otro lado, la exposición que se empleó en el estudio fue de tipo sub-crónica; y, la vía utilizada fue la intraperitoneal porque es el menos estresante para los animales y con la cual la concentración de plomo en sangre podrían alcanzar niveles considerados tóxicos para los humanos (Mobarak y P'an, 1984).

La *Spirulina* es una cianobacteria que tiene varios efectos farmacológicos (Chamorro et al., 2002), entre los cuales se han reportado sus propiedades antioxidantes porque contiene el ácido gamma-linolénico, β -caroteno y la ficocianina que tienen la capacidad de atrapar a los

radicales libres, y porque la ficocianina además inhibe la lipoperoxidación (Gershwin y Belay, 2008). En cuanto a la dosis de la Sm empleada en el estudio, fue con base a estudios previos (Torres et al., 2006).

Los resultados muestran que los animales del grupo AcPb-sinSp ganaron menos peso comparado a los grupos AcPb-Sp y Control; resultados similares fueron reportados por otro estudio (El-Nekeety et al., 2009). A la vez, la media de la ganancia de peso del grupo AcPb-sinSp fue menor respecto al grupo Control ($p < 0,05$).

El hígado es considerado uno de los órganos blancos afectado por la toxicidad del plomo, y a la vez es el órgano principal implicado que almacena, biotransforma y desintoxica ante la exposición a los xenobióticos, por lo que es de mucho interés considerarlo cuando se evalúa la toxicidad por metales pesados como el plomo.

Entre los parámetros bioquímicos considerados para evaluar la hiperlipidemia se determinó los niveles de ALT, CT y TAG en plasma y adicionalmente se evaluó al CT y TAG en el hígado; y para evaluar el daño oxidativo se determinó los niveles de SOD, CAT, GSH y MDA en el hígado (Can et al., 2008; Swarup et al., 2007).

La actividad de la ALT es uno de los indicadores de hepatotoxicidad (Yang et al., 2009); en el presente estudio el grupo AcPb-sinSp mostró un ligero pero significativo incremento de la actividad de la ALT comparada a los otros grupos ($p < 0.05$). Por otro lado, los del grupo AcPb-sinSp presentaron niveles incrementados de CT y TAG tanto en plasma como en

hígado comparados con los otros grupos ($p < 0.05$). El incremento de los niveles de lípidos con el incremento de la ALT pueden indicar disfunción hepática (Kashyap et al., 2009); por lo que, los resultados encontrados muestran que la exposición a plomo afecta el tejido hepático, consistente con lo reportado en otros estudios (Can et al., 2008; Swarup et al., 2007).

El plomo es un metal pesado conocido que produce daño oxidativo en el hígado por incremento de la peroxidación lipídica (LIP) (El-Nekeety et al., 2009). La toxicidad del plomo conlleva al daño de los RL por 2 vías separadas, aunque relacionadas: (a) la generación de EROs, incluyendo los hidroperóxidos, el oxígeno en singulete y peróxidos de hidrógeno, evaluados por los niveles de MDA como productos finales de la LIP, y (2) la depleción directa de las reservas antioxidantes (Newairy y Abdou, 2009).

En la presente investigación, al evaluar el hígado de los grupos de estudio se observó que el grupo AcPb-sinSp resultó con un significativo incremento de la LIP como se muestra por los niveles de MDA elevados y por la disminución significativa del GSH, estos resultados son similares con lo reportado por otros estudios (Newairy y Abdou, 2009; Reglero et al., 2009; Upasani y Balaraman, 2003). Además, la presencia de la LIP observada en el presente trabajo también se debe a la disminución de las actividades de la SOD y la CAT, ambos indicadores de estrés oxidativo (Newairy y Abdou, 2009). La posible explicación podría darse por la función propuesta del GSH en la excreción activa de plomo a través de la bilis, al unirse el plomo al grupo tiol del GSH y luego ser excretado. Por lo anterior, una

disminución de los niveles del GSH podría dar lugar al estrés oxidativo y como consecuencia se incrementaría la LIP (Reglero et al., 2009; El-Nekeety et al., 2009).

Por otro lado, el plomo también afecta otros órganos; entre los cuales está el riñón, donde el plomo también produce daño oxidativo por el incremento de la LIP (El-Nekeety et al., 2009; Farrag et al., 2007). En la presente investigación, al evaluar el riñón de los animales se encontró que los del grupo AcPb-sinSp tenían incrementados significativamente la LIP como se evidencia por los niveles de MDA elevados y por la disminución significativa del GSH, estos resultados fueron similares a lo reportado en otros estudios (Farrag et al., 2007; Upasani y Balaraman, 2003; Jurczuk et al., 2006; Navarro-Moreno et al., 2009).

La LIP observada en el presente estudio, también puede suponerse que se debió a la disrupción del equilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes en la exposición a plomo; aunque, el origen de la formación de pro-oxidantes durante el estrés oxidativo generado por la exposición a plomo aún falta estudiarse ampliamente (Garçon et al., 2007; Gurer-Orhan et al., 2004). Adicionalmente, se ha reportado que la inhibición del ácido δ -aminolevulínico dehidratasa (ALAD) conlleva a la acumulación del ALA (ácido aminolevulínico), y esta acumulación está implicado en el daño oxidativo inducido por plomo por causar la formación de EORs (Jin et al., 2006). Por lo que, es razonable especular que el aumento de la LIP en el presente estudio fue provocada por la acumulación del ALA como resultado de la inhibición del ALAD inducida por la exposición a plomo.

Por lo anterior, la exposición a plomo conlleva al daño oxidativo de las células afectando la estructura de la membranas y la función de las mismas consecuentemente altera los

procesos fisiológicos de los órganos y tejidos (Rendón-Ramírez et al., 2007). Por lo que, sería importante tomar en cuenta el uso de compuestos que puedan prevenir este tipo de daños en los lugares donde existe riesgo de exposición a metales como el plomo.

Los resultados del presente estudio claramente indican que las determinaciones bioquímicas utilizadas (metabolismo de lípidos y sistema antioxidante) (Reglero et al., 2009; El-Nekeety et al., 2009; Kashyap et al., 2009) proporcionan evidencia de la toxicidad del plomo en el hígado y riñón; a la vez, muestra el efecto protector de la Sm en el modelo experimental como se reportaron en otros estudios (Karedeniz et al., 2009; Park et al., 2008).

Por otro lado, la Sm no indujo ningún efecto nocivo en los animales (Karkos et al., 2008; Chamorro et al., 2002); por el contrario, la Sm les produjo una mejora en el peso corporal y los parámetros bioquímicos. Adicionalmente, varios estudios han reportado que la Sm tiene efectos antihiperlipidémico (Karadeniz et al., 2009; Torres et al., 2007; Baños et al., 2008) y antioxidante (Baños et al., 2008; Park et al., 2008; Thaakur y Jyothi, 2007) debido a su elevado contenido de algunos macro y micronutrientes incluyendo proteínas de alta calidad, hierro, ácido graso gamma-linolénico, carotenoides, vitaminas B1 y B2 (Mazo et al., 2004), β -caroteno, α -tocoferol y ficocianina (Khan et al., 2005). La ficocianina es considerado un compuesto predominante en la actividad antioxidante de la *Spirulina* (Huang et al., 2007; Wang et al., 2007).

Durante el desarrollo del estudio, se generó otra pregunta de investigación que surgió a raíz de evaluar los efectos preventivos de la Sm, la cual debería tomarse en cuenta y consiste en

indagar los efectos de la *Spirulina* posterior al daño oxidativo; es decir, debería evaluarse si tiene un efecto terapéutico, de modo que se pueda revertir el daño por exposición a compuestos como el plomo. Por lo que, en este estudio se evaluó el curso temporal del daño oxidativo por la exposición aguda a plomo tanto para el hígado como para el riñón; así, en el caso del hígado se encontró que los niveles del GSH están disminuidos respecto al Control hasta 6 días post tratamiento, y los niveles de TBARS están incrementados respecto al Control, los cuales se recuperan hasta las 2 semanas de exposición a plomo. En el caso del riñón, los niveles del GSH están disminuidos respecto al Control hasta 14 días post tratamiento, y los niveles de TBARS están incrementados respecto al Control, recuperándose ligeramente hasta las 2 semanas de exposición a plomo. Por lo anterior, sería importante determinar si la *Spirulina* tiene alguna propiedad para revertir el daño oxidativo.

También se debe tener en cuenta, que la exposición aguda o crónica a plomo afecta adicionalmente a otros órganos y sistemas, incluyendo al sistema nervioso central. Por lo anterior, es importante evaluar los compuestos que pueden prevenir y/ o revertir los daños inducidos por la exposición a plomo, muchos de los cuales son irreversibles.

Por otro lado, es importante notar que actualmente para poblaciones vulnerables al daño del plomo como lo son los niños, se considera como límite a 10 µg/dl, valor establecido por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, USA) como referente para los niveles altos de plomo en sangre; aunque, la existencia de un valor seguro de las concentraciones de plomo en las cuales no ocurre toxicidad es debatible (Rogan y Ware, 2003).

Los resultados de la presente investigación en nuestro modelo experimental demuestran que la exposición a plomo sin el uso de ningún compuesto considerado como antioxidante, conlleva a daño oxidativo como se observó en el grupo AcPb-sinSp. Por lo que, sería importante considerar que el uso de antioxidantes podrían prevenir el daño oxidativo de compuestos como el plomo.

La presente investigación tiene como limitación no haber determinado los niveles de plomo en el modelo experimental; sin embargo, considera el tiempo de exposición a plomo y la concentración de plomo que se inyectó vía intraperitoneal, el cual se reportó en otros estudios (Hsu y Guo, 2002). Además, se corroboró el daño inducido por los cambios observados en el grupo AcPb-sinSp respecto al Control.

Finalmente, lo encontrado en el grupo AcPb-Sp en los parámetros evaluados (ALT, CT, TAG, SOD, CAT, GSH y MDA) muestran cambios significativos respecto al grupo AcPb-sinSp y con resultados similares al grupo Control. Por lo que, se asume que en nuestro modelo experimental la *Spirulina maxima* tiene una participación trascendental porque previene los efectos de la exposición a plomo, y está actuando como un protector.

CAPITULO VIII. CONCLUSIONES

La hepatotoxicidad inducida con plomo fue evidente para evaluar los cambios bioquímicos en los niveles de CT, TAG, ALT, SOD, CAT, GSH y MDA en los 2 grupos de tratamiento (AcPb-sinSp y AcPb-Sp) respecto al Control.

Por la dosis de plomo utilizada en nuestro modelo experimental se demostró que se incrementa el perfil de lípidos plasmáticos y hepáticos conllevando a una hiperlipidemia e hígado graso. Además, estos cambios bioquímicos inducidos por el plomo son prevenidos por el uso de la *Spirulina*.

En el presente trabajo por la dosis de plomo empleada en nuestro modelo experimental se reportó que el estado antioxidante estuvo disminuida conllevando al daño oxidativo en el hígado y riñón. Además, estos cambios bioquímicos inducidos por el plomo son prevenidos por el uso de la *Spirulina*.

En el Curso temporal evaluado se evidenció que la exposición aguda a la dosis de plomo utilizada ocasiona daño oxidativo tanto en hígado como en riñón hasta por mas de 7 días post tratamiento.

Los efectos protectores de la *Spirulina* podrían explicarse por su contenido macro y micronutriente. En consecuencia, la *Spirulina* podría ser útil en la prevención de la toxicidad por exposición a plomo.

CAPITULO IX. PERSPECTIVAS

Establecer estudios en modelos experimentales para evaluar los compuestos contenidos en la *Spirulina* para prevenir y/o revertir los daños que ocasionan la exposición a los contaminantes ambientales.

Determinar la prevalencia de las alteraciones en el sistema antioxidante por exposición al plomo mediante indicadores bioquímicos en las poblaciones en riesgo por áreas contaminadas.

Diseñar estudios que evalúen el estado nutricional de la población en riesgo, a fin de determinar los problemas en la salud asociados a la deficiencia nutricional.

Realizar estudios de intervención de poblaciones expuestas a xenobióticos como el plomo con un enfoque multidisciplinario (evaluar los efectos biológicos y como remediarlos). Caracterizar los riesgos de exposición ambiental a fin de generar información relevante para el manejo adecuado de programas de prevención de las enfermedades en los pobladores de la zona de estudio.

CAPITULO X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ademuyiwa O, Agarwal R, Chandra R, Behari JR. Lead-induced phospholipidosis and cholesterologenesis in rat tissues. *Chem Biol Interact.* 2009, 179:314-20.
2. Ademuyiwa O, Ugbaja RN, Rotimi SO, Abam E, Okediran BS, Dosumu OA, Onunkwor BO. Erythrocyte acetylcholinesterase activity as a surrogate indicator of lead-induced neurotoxicity in occupational lead exposure in Abeokuta, Nigeria. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2007, 24:183-188.
3. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984, 105:121-6.
4. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Lead. January 2006
5. Albalak R, Keeler GJ, Frisancho AR and Haber H. Assessment of PM₁₀ concentrations from domestic biomass fuel combustion in two rural Bolivian highland villages. *Environ Sci Technol.* 1999, 33:2505-9.
6. Annabi-Berrahal A, Nehdi A, Hajjaji N, Gharbi N, El-Fazâa S. Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *Comp Ren Biol.* 2007, 330:581-8.
7. Baños G, Pérez-Torres I, El Hafidi M. Medicinal agents in the metabolic syndrome. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2008, 6:237-52.
8. Barisio MG, Actis A, Outomuro D. Hígado Graso no Alcohólico: una entidad cada vez más frecuente y de pronóstico incierto. *Rev. Gastroenterol. Perú.* 2009, 29: 44-50.
9. Bruce NB, Perez-Padilla R and Albalak R. Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge. *Bull World Health Organ.* 2000, 78:1078-92.

10. Budd P, Montgomery J, Cox A, Krause P, Barreiro B, Thomas RG. The distribution of lead within ancient and modern human teeth: implications for long-term and historical exposure monitoring. *Sci Total Environ.* 1998, 220:121-36.
11. Can S, Bağcı C, Ozaslan M, Bozkurt A, Cengiz B, Cakmak EA, Kocabaş R, Karadağ E, Tarakçioğlu M. Occupational lead exposure effect on liver functions and biochemical parameters. *Acta Physiol Hung.* 2008, 95:395-403.
12. CDC. Blood Lead Levels---United States, 1999--2002. *MMWR.* 2005, 54:513-516.
13. Chamorro G, Salazar M, Araújo KG, dos Santos CP, Ceballos G, Castillo LF. Update on the pharmacology of *Spirulina (Arthrospira)*, an unconventional food. *Arch Latinoam Nutr.* 2002, 52:232-40.
14. Chiarugi P, Fiaschi T. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal.* 2007, 19:672-682.
15. Chu FF, Esworthy RS, Doroshov JH. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med.* 2004, 36:1481-95.
16. Deby C, Goutier R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol.* 1990, 39:399-405.
17. El-Nekeety AA, El-Kady AA, Soliman MS, Hassan NS, Abdel-Wahhab MA. Protective effect of *Aquilegia vulgaris* (L.) against lead acetate-induced oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol.* 2009, 47:2209-15.
18. Farrag AR, Mahdy KA, Abdel Rahman GH, Osfor MM. Protective effect of *Nigella sativa* seeds against lead-induced hepatorenal damage in male rats. *Pak J Biol Sci.* 2007, 10:2809-16.

19. Flegal AR, Smith DR. Measurements of environmental lead contamination and human exposure. *Rev Environ Contam Toxicol*. 1995, 143:1-45.
20. Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*. 1997, 272:18515-7.
21. Garçon G, Leleu B, Marez T, Zerimech F, Haguenoer JM, Furon D, Shirali P. Biomonitoring of the adverse effects induced by the chronic exposure to lead and cadmium on kidney function: usefulness of alpha-glutathione S-transferase. *Sci Total Environ*. 2007, 377:165-72.
22. Gershwin ME, Belay A. *Spirulina* in Human Nutrition and Health. New York: CRC Press. 2008, p. 101-152.
23. González de Rivera C, Miranda-Zamora R, Díaz-Zagoya JC, Juárez-Oropeza MA. Preventive effect of *Spirulina maxima* on the fatty liver induced by a fructose-rich diet in the rat, a preliminary report. *Life Sci*. 1993, 53:57-61.
24. González Torres MC, Betancourt Rule M, Ortiz Muñiz R. Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica* 2000, 25:3-9.
25. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995, 41:1819-28.
26. Gurer-Orhan H, Sabir HU, Ozgüneş H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*. 2004, 195:147-54.
27. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007, 35:1147-50.

28. Hansberg W. Mensaje bioquímico. Departamento de bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Vol. XXVI. 2002, p. 19-50.
29. Helling TS, Gurram K. Nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and bariatric surgery: a review. *Surg Obes Relat Dis*. 2006, 2:213-20.
30. Hemberg S. Lead poisoning in a historical perspective. *Am J Ind Med*. 2000, 38:244-254.
31. Hernández-Saavedra D, McCord JM. Evolution and free radicals. Importance of oxidative stress in human pathology. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2007, 45:477-84.
32. Huang Y, Guo BJ, Wong RNS, Jiang Y. Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. *Food Chem*. 2007, 100:1137–1143.
33. Hsu P and L Guo. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*. 2002, 180:33–44.
34. Ibrahim W, Lee US, Yen HC, St Clair DK, Chow CK. Antioxidant and oxidative status in tissues of manganese superoxide dismutase transgenic mice. *Free Radic Biol Med*. 2000, 28:397-402.
35. James AM, Smith RA, Murphy MP. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch Biochem Biophys*. 2004, 423:47-56.
36. Jin Y, Liao Y, Lu C, Li G, Yu F, Zhi X, Xu J, Liu S, Liu M, Yang J. Health effects in children aged 3-6 years induced by environmental lead exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2006, 63:313-7.

37. Joy D, Thava VR, Scott BB. Diagnosis of fatty liver disease: is biopsy necessary? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003, 15:539-43.
38. Jurczuk M, Moniuszko-Jakoniuk J, Brzóska MM. Involvement of some low-molecular thiols in the peroxidative mechanisms of lead and ethanol action on rat liver and kidney. *Toxicology*. 2006, 219:11-21.
39. Kaplan A, Pesce A. *Clinical Chemistry*. Ed. Mosby, USA. 1996, p. 9-28.
40. Karadeniz A, Cemek M, Simsek N. The effects of *Panax ginseng* and *Spirulina platensis* on hepatotoxicity induced by cadmium in rats. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2009, 72:231-5.
41. Karkos PD, Leong SC, Karkos CD, Sivaji N, Assimakopoulos DA. *Spirulina* in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008, Sep 14.
42. Kashyap SR, Diab DL, Baker AR, Yerian L, Bajaj H, Gray-McGuire C, Schauer PR, Gupta M, Feldstein AE, Hazen SL, Stein CM. Triglyceride levels and not adipokine concentrations are closely related to severity of nonalcoholic fatty liver disease in an obesity surgery cohort. *Obesity*. 2009, 17:1696-701.
43. Khan Z, Bhadouria P, Bisen PS. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. *Curr Pharm Biotechnol*. 2005, 6:373-9.
44. Knight AJ. Free radicals and the environment. In Knight AJ, editor. *Free radicals, antioxidants, aging and disease*. Washington: Am Assoc for Clin Chem. 1999, p. 333-354.
45. Kono Y. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*. 1978, 186:189-95.

46. Kovacic P, Pozos RS. Cell signaling (mechanism and reproductive toxicity): redox chains, radicals, electrons, relays, conduit, electrochemistry, and other medical implications. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2006, 78:333-44.
47. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1994, 32:9-15.
48. Liu H, Wang C, Li X, Xuan X, Jiang C, Cui H. A novel electro-fenton process for water treatment: reaction-controlled pH adjustment and performance assessment. *Environ Sci Technol*. 2007, 41:2937-42.
49. Mazo VK, Gmshinskiĭ IV, Zilova IS. Microalgae *Spirulina* in human nutrition. *Vopr Pitan*. 2004, 73:45-53.
50. Mc Murry J. Química Orgánica. Ed. International Thompson, México. 2001.
51. Mobarak N, P'an AY. Lead distribution in the saliva and blood fractions of rats after intraperitoneal injections. *Toxicology* 1984, 32:67-74.
52. Moeller D. Environmental health. Harvard University Press. 2005. Third edition.
53. Mudipalli A. Lead hepatotoxicity & potential health effects. *Indian J Med Res*. 2007, 126:518-527
54. Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ*. 2008, 400:115-41.
55. Navarro-Moreno LG, Quintanar-Escorza MA, González S, Mondragón R, Cerbón-Solorzáno J, Valdés J, Calderón-Salinas JV. Effects of lead intoxication on intercellular junctions and biochemical alterations of the renal proximal tubule cells. *Toxicol In Vitro*. 2009, 23:1298-304.
56. Nelson D, Cox M. Lehninger Principios de Bioquímica. Ed. Omega, España. 2001.

57. Newairy AS, Abdou HM. Protective role of flax lignans against lead acetate induced oxidative damage and hyperlipidemia in rats. *Food Chem Toxicol.* 2009, 47:813-8.
58. Niki E, Noguchi N. Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Acc Chem Res.* 2004, 37:45-51.
59. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 338:668-76.
60. NORMA Oficial Mexicana NOM-199-SSA1-2000, Salud ambiental. Niveles de plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente. Publicada en el Diario Oficial el 18 de octubre de 2002. México, D.F.
61. NORMA Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. NOM-062-ZOO-1999.
62. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979, 95:351-8.
63. Owens CW, Belcher RV. A Colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochem J.* 1965, 94:705-11.
64. Padayatty JS, Daruwala R, Wang Y, Eck KP, Song J, Koh SW, Levine M. Vitamin C: From Molecular Actions to Optimum Intake. *Handbook of antioxidants.* 2nd Ed. New York: Marcel Dekker 2002, p. 117-145.

65. Park HJ, Lee YJ, Ryu HK, Kim MH, Chung HW, Kim WY. A randomized double-blind, placebo-controlled study to establish the effects of *Spirulina* in elderly Koreans. *Ann Nutr Metab.* 2008, 52:322-8.
66. Park SK, Schwartz J, Weisskopf M, Sparrow D, Vokonas PS, Wright RO, Coull B, Nie H, Hu H. Low-level lead exposure, metabolic syndrome, and heart rate variability: the VA Normative Aging Study. *Environ Health Perspect.* 2006, 114:1718-24.
67. Rahman K, Lowe GM. Garlic and cardiovascular disease: a critical review. *J Nutr.* 2006; 136:736S-740S.
68. Rahman S, Sultana S. Chemopreventive activity of glycyrrhizin on lead acetate mediated hepatic oxidative stress and its hyperproliferative activity in Wistar rats. *Chem Biol Interact.* 2006, 160:61-9.
69. Ramírez A. El cuadro clínico de la intoxicación ocupacional por plomo. *An Fac Med Lima.* 2005, 66:55-70.
70. Rappaport AM and Wanless IR. Physioanatomic considerations. In: Schiff L, Schiff ER. *Diseases of Liver.* Seventh Ed. Lippincott Company, Philadelphia, 1993.
71. Reglero MM, Taggart MA, Monsalve-González L, Mateo R. Heavy metal exposure in large game from a lead mining area: effects on oxidative stress and fatty acid composition in liver. *Environ Pollut.* 2009, 157:1388–95.
72. Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol.* 2007, 54:1-9.

73. Rendón-Ramírez A, Cerbón-Solórzano J, Maldonado-Vega M, Quintanar-Escorza MA, Calderón-Salinas JV. Vitamin-E reduces the oxidative damage on delta-aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *Toxicol In Vitro* 2007, 21:1121-6.
74. Retana Ugalde R. Efectividad de la administración del alfa-tocoferol y el ácido ascórbico sobre el estrés oxidativo y daño al ADN en adultos mayores sanos del área rural y urbana. Tesis de Doctor en Ciencias. UNAM, 2009.
75. Rogan WJ, Ware JH. Exposure to lead in children- How low is low enough? *N Engl J Med.* 2003, 348:1515-16.
76. Romieu I, Lacasana M, McConnell R, Lead Research Group of the Pan-American Health Organization. Lead exposure in Latin America and the Caribbean. *Environ Health Perspect.* 1997, 105:398-405.
77. Sanyal AJ. Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2005, 2:46-53.
78. Sivaprasad R, Nagaraj M, Varalakshmi P. Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *J Nutr Biochem.* 2004, 15:18–23.
79. Srám RJ. Impact of air pollution on reproductive health. *Environ Health Perspect.* 1999, 107:A542-43.
80. Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal.* 2006, 8:243-70.
81. Storz G y Zheng M. Oxidative Stress. En: *Bacterial Stress Responses.* (Eds Storz G. y Hengge-Aronis R.) ASM Press, Washington, D.C. 2000.

82. Stryer L, Berg J, Tymoczko J. Biochemistry. 6th ed. 2006.
83. Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY. Botanical phenolics and brain health. *Neuromolecular Med.* 2008, 10:259-74.
84. Swarup D, Naresh R, Varshney VP, Balagangatharathilagar M, Kumar P, Nandi D, Patra RC. Changes in plasma hormones profile and liver function in cows naturally exposed to lead and cadmium around different industrial areas. *Res Vet Sci.* 2007, 82:16-21.
85. Thaakur SR, Jyothi B. Effect of *Spirulina maxima* on the haloperidol induced tardive dyskinesia and oxidative stress in rats. *J Neural Transm.* 2007, 114:1217-25.
86. Torres-Durán P, Paredes-Carbajal, Mascher D, Zamora-González J, Díaz-Zagoya C, Juárez-Oropeza M. Protective effect of *Arthrospira maxima* on fatty acid composition in fatty liver. *Arch Med Res.* 2006, 37:479-83.
87. Torres-Durán PV, Ferreira-Hermosillo A, Juárez-Oropeza MA. Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of Mexican population: a preliminary report. *Lipids Health Dis.* 2007, 6:33.
88. Upasani CD, Balaraman R. Protective effect of *Spirulina* on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats. *Phytother Res.* 2003, 17:330-4.
89. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004, 266:37-56.
90. Vega J, Salinas J, Gutierrez M, Mandamiento R, Yara M, Ponce-Canchihuamán J, Castro J. Lead levels and cognitive abilities in Peruvian children. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006, 28: 33–9.

91. Voet D, Voet J. Bioquímica. 3a Ed. Medica Panamericana. 2006.
92. Wang L, Pan B, Sheng J, Xu J, Hu Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. Food Chem. 2007, 105:36–41.
93. Woodruff TJ, Grillo J and Schoendorf KJ. The relationship between selected causes of postneonatal infant mortality and particulate air pollution in the United States. Environ Health Perspect. 1997, 105: 608-612.
94. Yang RZ, Park S, Reagan WJ, Goldstein R, Zhong S, Lawton M, Rajamohan F, Qian K, Liu L, Gong DW. Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. Hepatology. 2009, 49:598-607.

CAPITULO XI. ANEXOS

Artículo publicado:

Ponce-Canchihuamán y col. Protective effects of *Spirulina maxima* on hyperlipidemia and oxidative-stress induced by lead acetate in the liver and kidney. *Lipids Health Dis.* 2010, **9**:35 (31 March 2010).

RESEARCH

Open Access

Protective effects of *Spirulina maxima* on hyperlipidemia and oxidative-stress induced by lead acetate in the liver and kidney

Johny C Ponce-Canchihuamán¹, Oscar Pérez-Méndez², Rolando Hernández-Muñoz³, Patricia V Torres-Durán¹, Marco A Juárez-Oropeza^{1*}

Abstract

Background: Oxidative damage has been proposed as a possible mechanism involved in lead toxicity, specially affecting the liver and kidney. Previous studies have shown the antioxidant effect of *Spirulina maxima* in several experimental models of oxidative stress. The current study was carried out to evaluate the antioxidant activity of *Spirulina maxima* against lead acetate-induced hyperlipidemia and oxidative damage in the liver and kidney of male rats. Control animals were fed on a standard diet and did not receive lead acetate (Control group). Experimental animals were fed on a standard laboratory diet with or without *Spirulina maxima* 5% in the standard laboratory diet and treated with three doses of lead acetate (25 mg each/weekly, intraperitoneal injection) (lead acetate with *Spirulina*, and lead acetate without *Spirulina* groups).

Results: The results showed that *Spirulina maxima* prevented the lead acetate-induced significant changes on plasma and liver lipid levels and on the antioxidant status of the liver and kidney. On the other hand, *Spirulina maxima* succeeded to improve the biochemical parameters of the liver and kidney towards the normal values of the Control group.

Conclusions: It was concluded that *Spirulina maxima* has protective effects on lead acetate-induced damage, and that the effects are associated with the antioxidant effect of *Spirulina*.

Background

The lead is a xenobiotic, persistent toxic [1,2], as other xenobiotics induces to different health risks since the fetal stage until senescence. On the other hand, although lead is one of the most useful metals, it is also one of the most toxic ones [3]. Also, both occupational and environmental exposures remain a serious problem in many developing and industrializing countries [4].

Several reports have indicated that lead can cause neurological, hematological, gastrointestinal, reproductive, circulatory, and immunological pathologies, all of them related to the dose and the amount of time of lead exposure [5-8]. Also, the health risks occasioned by exposure to lead are considered public health problems at a world level.

The liver plays a major role in lead's metabolism, and it is in special risk due to the oxidative action of this xenobiotic; given the unquestionable evidence that lead-induced lipid peroxidation of cellular membranes, plays a crucial role in the mechanisms of hepatotoxic action of these xenobiotics [9]. On the other hand, lead is known to also affect the kidney, which is another important target [10]. Lead produces oxidative damage in the kidney as evidenced by enhancing lipid peroxidation (LIP) [11,12].

In vivo and *in vitro* studies suggest that lipid metabolism is altered both in acute and chronic exposure to lead [13]. Lead inhibits antioxidant enzyme activity, such as superoxide dismutase and catalase, and also decreases the level of glutathione, increasing lipid peroxidation [14,15], which harms proteins, cell membranes and DNA, among others. However, this damage could decline when antioxidants such as flaxseed are supplied [16].

The cyanobacterium *Spirulina maxima* or *Arthrospira maxima* has shown hepatoprotective effects in rats, and

* Correspondence: majo_ya@yahoo.com.mx

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. A.P. 70-159, México, D.F. 04510, México

other experimental models [17]. Also, it has been demonstrated hypolipemiant and antioxidant effects of the *Spirulina* in humans [18,19]. In addition, *Spirulina* is a source of β -carotene, α -tocopherol, and phycocyanin, molecules with antioxidant properties [20-22].

Heavy metal poisoning like lead cause adverse effects to hepatic cells because after lead exposure, liver is one of the major organs involved in the storage, biotransformation and detoxification. Lead also, affects the kidney, which is another important organ that participates in the detoxification. The aim of the current study was to evaluate the effects of *Spirulina maxima* on lipid metabolism and the antioxidant system in the hepato and nephrotoxicity induced by lead.

Materials and methods

Reagents, chemicals and *Spirulina*

All reagents and chemicals used were of analytical grade. Lead acetate (LA) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Powdered *Spirulina maxima* used in the experimental diet was purchased from Alimentos Esenciales para la Humanidad (Mexico) and was free of lead. Total cholesterol (TC), triacylglycerols (TAG) and alanine aminotransferase (ALT) were assessed by enzymatic kits (Spinreact, Mexico). Total lipids (TL) of the liver were extracted with 20 volumes of chloroform/methanol (3:1, v/v; Merck, Mexico).

Experimental animals

Two-month old Wistar male rats (180-200 g) were maintained and housed in a room with a controlled temperature (12-15°C), artificially illuminated with dark-light cycles (07:00 to 19:00 h as light). After an acclimatization period of one week, the animals were divided at random into three groups (6 rats/group) and housed in filter-top polycarbonate cages. All the animals received humane care in compliance with the guidelines of Animal Care [23].

After lead exposure, the animals were observed inter-daily for signs of toxicity. Body weight was recorded inter-daily during the experimental period. The standard laboratory food for rodents (Purina, Mexico) with or without *Spirulina* 5% was used to feed all the animals (diets *Spirulina* and without-*Spirulina*, respectively). The amount of diet provided was 20 g/day/rat, water was supplied *ad libitum*. Lead acetate treatment was given to the experimental groups, three times (25 mg/rat, weekly). Isotonic saline was used as a vehicle (0.5 mL, i.p.), and given to the Control group as for the experimental groups.

Experimental design

Animals within different treatment groups were maintained on their respective diets, followed for 30 days and

received the dose of LA the days 14, 21, and 28 as follows: Group 1 (untreated, Control) fed on Purina diet and three doses of isotonic saline, i.p. Group 2 (LA treated, LA without *Spirulina*: LAwS) fed on Purina diet and three doses of 25 mg of lead acetate, i.p. Group 3 (LA treated, LA *Spirulina*: LAS) fed on *Spirulina* diet and three doses of 25 mg of lead acetate, i.p.

At the end of the experimental period of 30 days, the rats were deprived of food overnight by 12 hours and all the animals were killed by cervical dislocation at 24 h post-treatment, after being anaesthetized in a gas ether atmosphere. Blood was collected by exsanguination in heparinized test tubes. Plasma was separated by centrifugation and stored at -78°C until lipid analyses were performed. The ALT analyses were performed using fresh plasma. The liver and the kidney were finely excised and weighed. A segment of 1 g fresh liver was removed for total lipids analyses. The enzyme activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), as well as the reduced glutathione (GSH) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) levels were assessed with fresh liver homogenate and fresh kidney homogenate. The TBARS levels were reported in concentrations of malondialdehyde (MDA).

Lipid analyses

Determinations of TC and TAG were made using commercial colorimetric enzymatic methods, following the recommendations by the providers.

For the liver and the kidney samples, 1 g of tissue was homogenized in phosphate buffer; and the total lipids were extracted with chloroform/methanol mixture by a modified Folch's method [24], and were determined gravimetrically.

Alanine aminotransferase analysis

The level of ALT was assessed using commercial method at 340 nm.

Antioxidant status indicators

The enzyme activity of SOD [25], and CAT [26], as well as the GSH levels [27] were assessed in the liver and kidney homogenates. Lipid peroxides from the liver and kidney homogenates were measured by the determining of TBARS formation [28].

The activity of SOD was determined by the Kono's method [25], through the capability of inhibition of NBT (nitroblue of tetrazolium) reduction. The changes in the absorbance were recorder at 560 nm during five minutes.

The activity of CAT was determined by the Aebi's method [26], through the disappearance of H₂O₂. The changes in the absorbance were determined at 240 nm during five minutes.

The level of GSH was evaluated by the method of Owens [27]; previously, the sample homogenates were mixed with 28% trichloroacetic acid (TCA, w/v) in order to discard the protein fraction. The supernatant content of GSH was performed using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) at 412 nm.

Products of lipid peroxidation were determined by the Ohkawa's method [28]; briefly, the free protein supernatant fraction was used to evaluate the TBARS production [1]. The absorbance of the resulting chromophore was determined at 535 nm, and expressed as MDA production, using 1,1,3,3-tetraethoxypropane as standard.

Total protein content was assessed using Bradford's method [29], using albumin as standard at 595 nm.

The above-mentioned endogenous antioxidant indicators were evaluated using a Genesis UV10 spectrophotometer (Thermo Electron Co, USA), and their values were expressed by protein content.

Statistical analysis

Results were evaluated statistically using one-way analyses of variance (ANOVA) with Bonferroni test of the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, v. 16). The significance of the differences among treatment groups, to all statements of significance were based on the probability of $p < 0.05$.

Results

Body weight of rats

The effect of *Spirulina maxima* (Sm) and lead acetate on animal body weight gain in the different treatments revealed that lead acetate (LAWs) alone significantly decreased the body weight ($p < 0.05$). Then, at the end of the experiment, body weight gain in the LAS group (50.94 ± 5.23 g) was similar to the Control group (52.36 ± 4.51 g), but the LAWs group (47.41 ± 3.83 g) gained less weight than the Control group ($p < 0.05$).

Determination of lipids in plasma and liver

As shown in Table 1, in both plasma and liver, TC and TAG levels were higher in the LAWs group compared to the Control group ($p < 0.05$). The LAS group showed similar results to the Control group but significantly lower TC and TAG levels than the LAWs group ($p < 0.05$). The total lipids in liver were similar levels among the three groups.

Evaluation of ALT activity

The LAWs group showed higher ALT activity than the Control ($p < 0.05$) and LAS ($p < 0.05$) groups. On the other hand, the LAS group presented similar activity to the Control group (Table 1).

Evaluation of the antioxidant status indicators

In the liver:

It was found that the enzyme activities of SOD and CAT in rat liver were lower in LAWs group compared to the Control ($p < 0.05$). The LAS group showed similar activities compared to the Control group but significantly higher activities than the LAWs group ($p < 0.05$) (Fig. 1).

The level of GSH in the liver was lower in the LAWs group compared to the Control ($p < 0.05$) and the LAS ($p < 0.05$) groups. The LAS group presented similar GSH levels compared to the Control group (Fig. 1).

The level of MDA in rat liver was 1.51 and 1.42 times higher in the LAWs group than the Control ($p < 0.05$) and LAS ($p < 0.05$) groups, respectively. The LAS group presented a similar MDA level compared to the Control group (Fig. 1).

In the kidney:

It was found that the enzyme activities of SOD and CAT in rat kidney were decreased in LAWs group compared to the Control group ($p < 0.05$). The LAS group showed similar activity of SOD and CAT compared to

Table 1 Effects of *Spirulina maxima* on biochemical parameters during sub-chronic lead exposure in rats.

Variable	Experimental Groups		
	Control	LAWs	LAS
Aminotransferase			
Alanine aminotransferase (ALT) (U/L) ^a	28.76 ± 5.84	46.51 ± 4.04 ^b	31.72 ± 4.72 ^c
Plasma Lipids (mg/dL)			
Total Cholesterol (TC) ^a	80.07 ± 2.54	107.83 ± 2.69 ^b	82.99 ± 12.70 ^c
Triacylglycerols (TAG) ^a	91.13 ± 2.45	125.24 ± 4.43 ^b	94.35 ± 5.09 ^c
Liver Lipids (µg/mg Lip)			
Total Cholesterol (CT) ^a	133.49 ± 10.73	174.18 ± 13.13 ^b	134.32 ± 10.76 ^c
Triacylglycerols (TAG) ^a	65.05 ± 6.84	197.93 ± 9.05 ^b	70.25 ± 11.22 ^c
Total Lipids (TL) (mgLip/g Liver)	48.98 ± 2.38	52.47 ± 3.27	49.40 ± 3.28

Values are mean ± SD (n = 6); in each group. LA (Lead acetate, 75 mg). Control (no LA and without *Spirulina*), LAWs (LA without *Spirulina*); LAS (LA with *Spirulina*)

^a $p < 0.05$, Significantly different. ANOVA.

^b $p < 0.05$, LAWs group compared with the Control group. Bonferroni test.

^c $p < 0.05$, LAWs group compared with the LAS group. Bonferroni test.

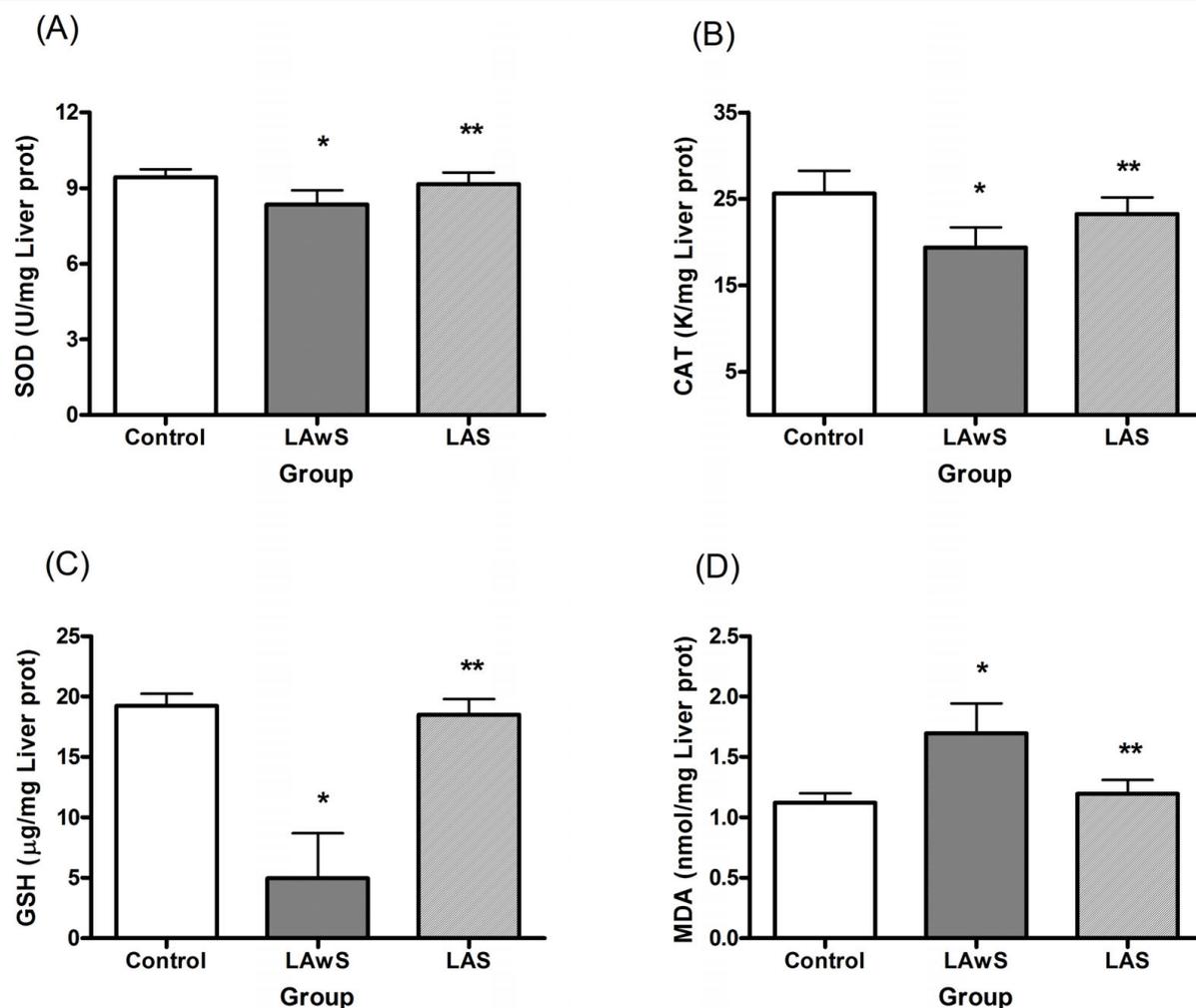


Figure 1 Effects of *Spirulina maxima* on liver oxidative status indicators during lead exposure in rats. The animals were treated with a vehicle or with 75 mg of lead acetate (LA, 25 mg/0.5 ml isotonic saline each, i.p., and three times on days 14, 21 and 28, and sacrificed on day 30). Values are expressed in mean \pm SD of n = 6 rats. (A). The total Superoxide Dismutase (SOD) activity. (B). The Catalase (CAT) activity. (C). The Glutathione (GSH) levels. (D). The Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS) levels. Control (no LA and without *Spirulina*), LAwS (LA without *Spirulina*), LAS (LA with *Spirulina*). * $p < 0.05$, LAwS group compared with the Control group. ANOVA with Bonferroni test. ** $p < 0.05$, LAwS group compared with the LAS group. ANOVA with Bonferroni test.

the Control group, and was significantly different compared to the LAwS group ($p < 0.05$) (Fig. 2).

The level of GSH in kidney was lower in LAwS group compared to the Control ($p < 0.05$) and LAS ($p < 0.05$) groups. The LAS group presented a similar GSH level compared to the Control group (Fig. 2).

The level of MDA in the rat kidney was 1.44 and 1.43 folds higher in the LAwS group compared to the Control ($p < 0.05$) and LAS ($p < 0.05$) groups, respectively. The LAS group presented a similar MDA level compared to the Control group (Fig. 2).

Discussion

In the present study, the role of Sm on hyperlipidemia and oxidative damage in LA toxicity of liver and kidney

was investigated in male Wistar rats. The dose of LA was based on literature reports [30] and on preliminary studies. The lead exposure was of the sub chronic type. The i.p. route was chosen because it is less stressful to rats, and also because the concentration of lead in the blood could reach levels considered toxic to humans [31]. The dose of Sm was based on previous work [32]. The results indicated that the animals treated with LA (LAwS) showed a decrease in body weight gain; similar observations were reported by El-Nekeety et al [11]. Also, it was found that the mean body weight of the animals treated with LA (LAwS) was lower compared to the Control and LAS groups.

The liver is considered one of the target organs affected by lead toxicity owing to its storage in the liver

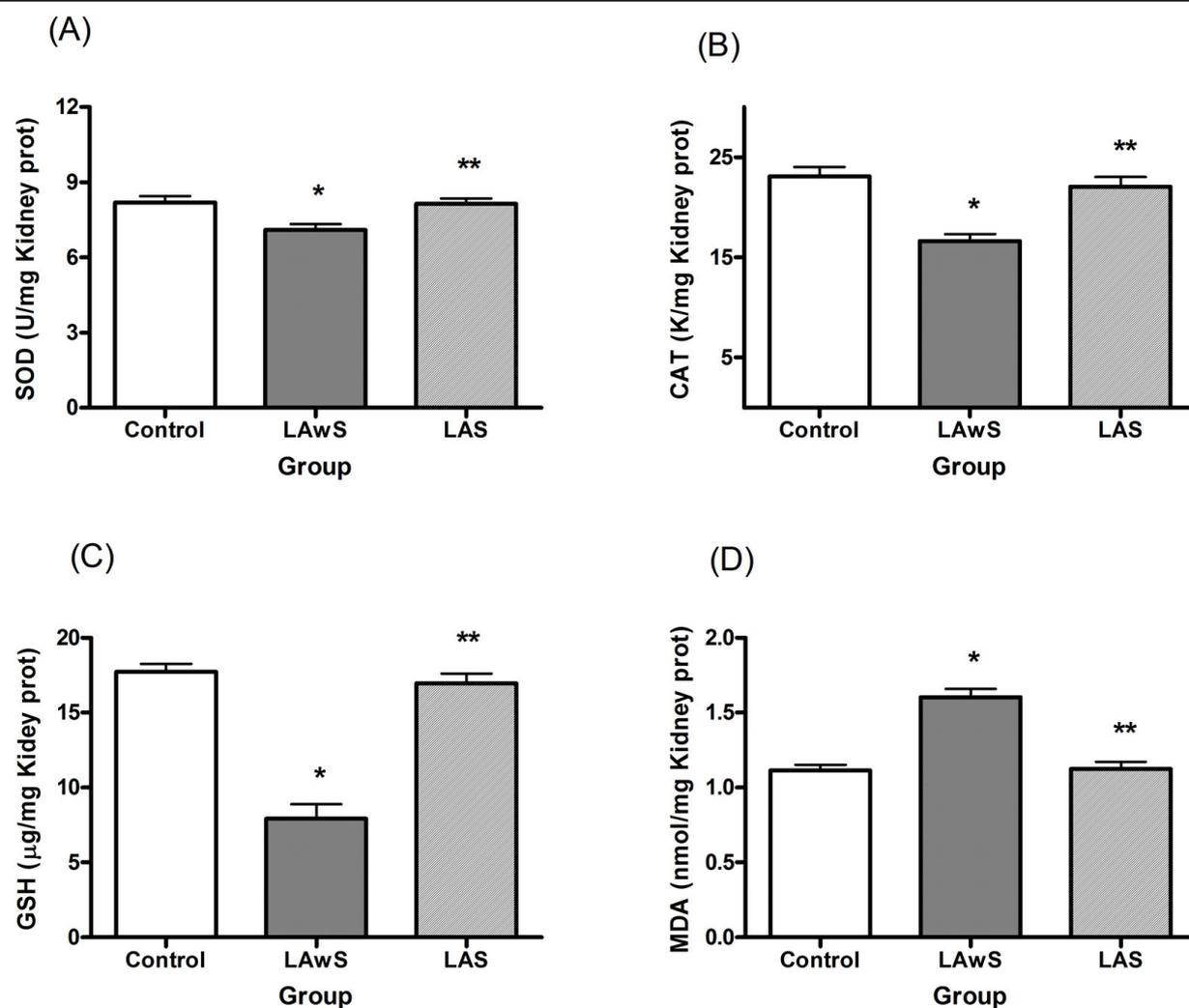


Figure 2 Effects of *Spirulina maxima* on kidney oxidative status indicators during lead exposure in rats. The animals were treated with a vehicle or with 75 mg of lead acetate (LA, 25 mg/0.5 ml isotonic saline each, i.p., and three times on days 14, 21 and 28, and sacrificed on day 30). Values are expressed in mean \pm SD of n = 6 rats. (A). The total Superoxide Dismutase (SOD) activity. (B). The Catalase (CAT) activity. (C). The Glutathione (GSH) levels. (D). The Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS) levels. Control (no LA and without *Spirulina*), LAwS (LA without *Spirulina*), LAS (LA with *Spirulina*). *p < 0.05, LAwS group compared with the Control group. ANOVA with Bonferroni test. **p < 0.05, LAwS group compared with the LAS group. ANOVA with Bonferroni test.

after lead exposure. Also, the liver being one of the major organs involved in the storage, biotransformation and detoxification of toxic substances, is of interest in heavy metal poisoning [33]. The activity of ALT is one of the indicators of hepatotoxicity [34]; in the present study, treatment with LA (LAwS) induced a slight but significant increase of ALT compared to the other groups. On the other hand, the results also showed that the LA significantly increased plasma levels of CT and TAG in the LAwS group compared with the other groups. The increased levels of lipids with increased levels of ALT may indicate liver dysfunction [35]. These results showed that the exposure to lead affects hepatic tissue, which is consistent with other reports [36,37].

Lead is a heavy metal that produces oxidative damage in the liver by enhancing lipid peroxidation (LIP) [11]. Lead toxicity leads to free radical damage by two separate, although related, pathways: (1) the generation of reactive oxygen species (ROS), including hydroperoxides, singlet oxygen, and hydrogen peroxides, evaluated by MDA levels as the final products of LIP, and (2) the direct depletion of antioxidant reserves [16]. In the present study, treatment with LA (LAwS) resulted in a significant increase of LIP as indicated by the significant increase of MDA levels and the significant decrease of GSH levels. Our results are in agreement with other previous studies [16,2,38]. The presence of LIP observed in the current study was also due to decreased SOD and

CAT activities, both indicators of oxidative stress [16]. The possible explanation could be related to the proposed role of GSH in the active excretion of lead through bile by binding to the thiol group of GSH and then being excreted. A decrease in GSH levels could lead to oxidative stress and a consequent increase in LIP [2,11].

Lead is known to adversely affect many organs, where the kidney is another of the important targets [10]. Lead produces oxidative damage in the kidney, by enhancing LIP [11,12]. In the present study, treatment with LA (LAWs) resulted in a significant increase of LIP as indicated by the significant increase of MDA levels and the significant decrease of GSH levels. Similar results have been reported [12,38-40]. The observed LIP in the current study may also assume that there was a disruption of prooxidant/antioxidant balance in lead exposure. However, the source of prooxidant formation during lead-induced oxidative stress has not been extensively studied [10,41]. In addition, it has been reported that the δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) inhibition may result in the accumulation of ALA (aminolevulinic acid), and accumulated ALA has been involved in lead-induced oxidative damage by causing formation of reactive oxygen species [42]. It is reasonable to speculate that the increased LIP found in the present study was triggered by ALA accumulation resulting from lead-induced ALAD inhibition.

Lead also induces oxidative damage to the membranes by the accumulation of oxidant metabolites (such as ALA, free protoporphyrins, heme and iron ions) and by direct or indirect inhibition of antioxidant enzymes, reducing the total antioxidant protection of the cell, affecting membrane structure and function and altering physiological processes of organs and tissues [43]. These damages are reflected in cellular structural changes and explain the close relationship between the morphological changes found in the kidneys of lead exposed animals with the molecular and physiological changes with respect to the TBARS levels showed by Navarro-Moreno et al [40].

The present results clearly indicate that the informed biochemical determinations (metabolism of lipids and antioxidant system) [2,11,35] provide evidence of lead toxicity in liver and kidney, and also, the protective effects of Sm as reported in other studies [17,19]. On the other hand, the Sm does not induce any harmful effects on the animals [44,45]. Rather, Sm succeeded to induce an improvement in body weight and the biochemical parameters. Several reports have indicated that Sm has antihyperlipemic [17,18,46] and antioxidant [19,46,47] effects due to its higher content of some macro- and micronutrients including high quality protein, iron, gamma-linolenic fatty acid, carotenoids, vitamins B1 and B2 [48] β -carotene, α -tocopherol and phycocyanin [20]. The phycocyanin has been considered

the predominant compound in the antioxidant activity of the *Spirulina* [21,22].

In this study, co-treatment of LA and Sm (LAS) resulted in a significant improvement of all biochemical parameters tested of the plasma, liver, and kidney. Therefore, this cyanobacterium may play a protective role against LA-mediated liver and kidney injury in sub-chronic exposure. These results demonstrated that Sm has antihyperlipemic and antioxidant properties.

Conclusions

This study has demonstrated that exposure to lead could have generated oxidative stress which resulted in the elevation of lipids both in plasma and liver, as well as lipid peroxidation in the liver and kidney associated with the reduction in the antioxidant status. *Spirulina maxima* co-treatment resulted in the prevention of the lead-induced damages. The protective effects of *Spirulina maxima* may be due to the radical scavenging activity of its components. Consequently, *Spirulina maxima* could be useful in the preventive treatment of lead toxicity.

Acknowledgements

This work was supported in part by a grant from PAPIIT-UNAM # IN205410. We also thank QFB Ivan Luqueño for their technical assistance. In addition, thanks to the Doctorate Program in Biomedical Sciences, School of Medicine, and the National Autonomous University of Mexico. JCPC was recipient of a DGEP Scholarship, UNAM.

Author details

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. A.P. 70-159, México, D.F. 04510, México.

²Departamento de Biología Molecular, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, México. ³Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Authors' contributions

JCPC contributed to the design, experimental work, analysis and discussion of the results, and the writing of the manuscript. OPM participated in the interpretation and review of the data. RHM participated in the interpretation and review of the data. PVD participated in the interpretation and review of the data. MAJO participated in the design of the study, review of the manuscript and discussion of the results and providing funding for the study. All authors have read and approved this manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 3 February 2010 Accepted: 31 March 2010

Published: 31 March 2010

References

1. Annabi Berrahal A, Nehdi A, Hajjaji N, Gharbi N, El-Fazâa S: **Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead.** *Comp Ren Biol* 2007, **330**:581-8.
2. Reglero MM, Taggart MA, Monsalve-González L, Mateo R: **Heavy metal exposure in large game from a lead mining area: effects on oxidative stress and fatty acid composition in liver.** *Environ Pollut* 2009, **157**:1388-95.
3. Shotyk W, Le Roux G: **Biogeochemistry and cycling of lead.** *Met Ions Biol Syst* 2005, **43**:239-275.
4. Yücebilgiç G, Bilgin R, Tamer L, Tükel S: **Effects of lead on Na(+)-K(+) ATPase and Ca(+2) ATPase activities and lipid peroxidation in blood of workers.** *Int J Toxicol* 2003, **22**:95-97.

5. Ademuyiwa O, Ugbaja RN, Rotimi SO, Abam E, Okediran BS, Dosumu OA, Onunkwor BO: **Erythrocyte acetylcholinesterase activity as a surrogate indicator of lead-induced neurotoxicity in occupational lead exposure in Abeokuta, Nigeria.** *Environ Toxicol Pharmacol* 2007, **24**:183-188.
6. Park SK, Schwartz J, Weisskopf M, Sparrow D, Vokonas PS, Wright RO, Coull B, Nie H, Hu H: **Low-level lead exposure, metabolic syndrome, and heart rate variability: the VA Normative Aging Study.** *Environ Health Perspect* 2006, **114**:1718-24.
7. Vega-Dienstmaier JM, Salinas-Piélago JE, Gutiérrez-Campos Mdel R, Mandamiento-Ayquipa RD, Yara-Hokama Mdel C, Ponce-Canchihuamán J, Castro-Morales J: **Lead levels and cognitive abilities in Peruvian children.** *Rev Bras Psiquiatr* 2006, **28**:33-9.
8. Patrick L: **Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of 432 antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity.** *Altern Med Rev* 2006, **433**:114-127.
9. Sivaprasad R, Nagaraj M, Varalakshmi P: **Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver.** *J Nutr Biochem* 2004, **15**:18-23.
10. Garçon G, Leleu B, Marez T, Zerimech F, Haguenoer JM, Furon D, Shirali P: **Biomonitoring of the adverse effects induced by the chronic exposure to lead and cadmium on kidney function: usefulness of alpha-glutathione S-transferase.** *Sci Total Environ* 2007, **377**:165-72.
11. El-Nekeety AA, El-Kady AA, Soliman MS, Hassan NS, Abdel-Wahhab MA: **Protective effect of Aquegia vulgaris (L.) against lead acetate-induced oxidative stress in rats.** *Food Chem Toxicol* 2009, **47**:2209-15.
12. Farrag AR, Mahdy KA, Abdel Rahman GH, Osfor MM: **Protective effect of Nigella sativa seeds against lead-induced hepatorenal damage in male rats.** *Pak J Biol Sci* 2007, **10**:2809-16.
13. Ademuyiwa O, Agarwal R, Chandra R, Behari JR: **Lead-induced phospholipidosis and cholesterogenesis in rat tissues.** *Chem Biol Interact* 2009, **179**:314-20.
14. Rahman S, Sultana S: **Chemopreventive activity of glycyrrhizin on lead acetate mediated hepatic oxidative stress and its hyperproliferative activity in Wistar rats.** *Chem Biol Interact* 2006, **160**:61-9.
15. Bolin CM, Basha R, Cox D, Zawia NH, Maloney B, Lahiri DK, Cardozo-Pelaez F: **Exposure to lead and the developmental origin of oxidative DNA damage in the aging brain.** *FASEB J* 2006, **20**:788-790.
16. Newairy AS, Abdou HM: **Protective role of flax lignans against lead acetate induced oxidative damage and hyperlipidemia in rats.** *Food Chem Toxicol* 2009, **47**:813-8.
17. Karadeniz A, Cemek M, Simsek N: **The effects of Panax ginseng and Spirulina platensis on hepatotoxicity induced by cadmium in rats.** *Ecotoxicol Environ Saf* 2009, **72**:231-5.
18. Torres-Duran PV, Ferreira-Hermosillo A, Juarez-Oropeza MA: **Antihyperlipemic and antihypertensive effects of Spirulina maxima in an open sample of Mexican population: a preliminary report.** *Lipids Health Dis* 2007, **6**:33, doi: 10.1186/1476-511X-6-33.
19. Park HJ, Lee YJ, Ryu HK, Kim MH, Chung HW, Kim WY: **A randomized double-blind, placebo-controlled study to establish the effects of spirulina in elderly Koreans.** *Ann Nutr Metab* 2008, **52**:322-8.
20. Khan Z, Bhadouria P, Bisen PS: **Nutritional and therapeutic potential of Spirulina.** *Curr Phram Biotechnol* 2005, **6**:373-9.
21. Wang L, Pan B, Sheng J, Xu J, Hu Q: **Antioxidant activity of Spirulina platensis extracts by supercritical carbon dioxide extraction.** *Food Chem* 2007, **105**:36-41.
22. Huang Y, Guo BJ, Wong RNS, Jiang Y: **Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from Spirulina platensis.** *Food Chem* 2007, **100**:1137-1143.
23. NORMA Oficial Mexicana: **Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.**, NOM-062-ZOO-1999.
24. González de Rivera C, Miranda-Zamora R, Díaz-Zagoya JC, Juárez-Oropeza MA: **Preventive effect of Spirulina maxima on the fatty liver induced by a fructose-rich diet in the rat, a preliminary report.** *Life Sci* 1993, **53**:57-61.
25. Kono Y: **Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase.** *Arch Biochem Biophys* 1978, **186**:189-95.
26. Aebi H: **Catalase in vitro.** *Methods Enzymol* 1984, **105**:121-6.
27. Owens CW, Belcher RV: **A Colorimetric micro-method for the determination of glutathione.** *Biochem J* 1965, **94**:705-11.
28. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** *Anal Biochem* 1979, **95**:351-8.
29. Kruger NJ: **The Bradford method for protein quantitation.** *Methods Mol Biol* 1994, **32**:9-15.
30. Hsu P, Guo L: **Antioxidant nutrients and lead toxicity.** *Toxicology* 2002, **180**:33-44.
31. Mobarak N, P'an AY: **Lead distribution in the saliva and blood fractions of rats after intraperitoneal injections.** *Toxicology* 1984, **32**:67-74.
32. Torres-Durán PV, Miranda-Zamora R, Paredes-Carbajal MC, Mascher D, Blé-Castillo J, Díaz-Zagoya JC, Juárez-Oropeza MA: **Studies on the preventive effect of Spirulina maxima on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat.** *J Ethnopharmacol* 1999, **64**:141-7.
33. Herman DS, Geraldine MTV: **Influence of minerals on lead-induced alterations in liver function in rats exposed to long-term lead exposure.** *J Hazard Mater* 2009, **166**:1410-4.
34. Yang RZ, Park S, Reagan WJ, Goldstein R, Zhong S, Lawton M, Rajamohan F, Qian K, Liu L, Gong DW: **Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity.** *Hepatology* 2009, **49**:598-607.
35. Kashyap SR, Diab DL, Baker AR, Yerian L, Bajaj H, Gray-McGuire C, Schauer PR, Gupta M, Feldstein AE, Hazen SL, Stein CM: **Triglyceride levels and not adipokine concentrations are closely related to severity of nonalcoholic fatty liver disease in an obesity surgery cohort.** *Obesity* 2009, **17**:1696-701.
36. Can S, Bağcı C, Ozaslan M, Bozkurt A, Cengiz B, Cakmak EA, Kocabaş R, Karadağ E, Tarakçıoğlu M: **Occupational lead exposure effect on liver functions and biochemical parameters.** *Acta Physiol Hung* 2008, **95**:395-403.
37. Swarup D, Naresh R, Varshney VP, Balagangatharathilagar M, Kumar P, Nandi D, Patra RC: **Changes in plasma hormones profile and liver function in cows naturally exposed to lead and cadmium around different industrial areas.** *Res Vet Sci* 2007, **82**:16-21.
38. Upasani CD, Balaraman R: **Protective effect of Spirulina on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats.** *Phytother Res* 2003, **17**:330-4.
39. Jurczuk M, Moniuszko-Jakoniuk J, Brzóska MM: **Involvement of some low-molecular thiols in the peroxidative mechanisms of lead and ethanol action on rat liver and kidney.** *Toxicology* 2006, **219**:11-21.
40. Navarro-Moreno LG, Quintanar-Escorza MA, González S, Mondragón R, Cerbón-Solorzáno J, Valdés J, Calderón-Salinas JV: **Effects of lead intoxication on intercellular junctions and biochemical alterations of the renal proximal tubule cells.** *Toxicol In Vitro* 2009, **23**:1298-304.
41. Gurer-Orhan H, Sabir HU, Ozgüneş H: **Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers.** *Toxicology* 2004, **195**:147-54.
42. Jin Y, Liao Y, Lu C, Li G, Yu F, Zhi X, Xu J, Liu S, Liu M, Yang J: **Health effects in children aged 3-6 years induced by environmental lead exposure.** *Ecotoxicol Environ Saf* 2006, **63**:313-7.
43. Rendón-Ramírez A, Cerbón-Solórzano J, Maldonado-Vega M, Quintanar-Escorza MA, Calderón-Salinas JV: **Vitamin-E reduces the oxidative damage on delta-aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes.** *Toxicol In Vitro* 2007, **21**:1121-6.
44. Karkos PD, Leong SC, Karkos CD, Sivaji N, Assimakopoulos DA: **Spirulina in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications.** *Evid Based Complement Alternat Med* 2008.
45. Chamorro G, Salazar M, Araújo KG, dos Santos CP, Ceballos G, Castillo LF: **Update on the pharmacology of Spirulina (Arthrospira), an unconventional food.** *Arch Latinoam Nutr* 2002, **52**:232-40.
46. Baños G, Pérez-Torres I, El Hafidi M: **Medicinal agents in the metabolic syndrome.** *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008, **6**:237-52.
47. Thakur SR, Jyothi B: **Effect of Spirulina maxima on the haloperidol induced tardive dyskinesia and oxidative stress in rats.** *J Neural Transm* 2007, **114**:1217-25.
48. Mazo VK, Gmoshinskiĭ IV, Zilova IS: **Microalgae Spirulina in human nutrition.** *Vopr Pittan* 2004, **73**:45-53.

doi:10.1186/1476-511X-9-35

Cite this article as: Ponce-Canchihuamán *et al.*: **Protective effects of Spirulina maxima on hyperlipidemia and oxidative-stress induced by lead acetate in the liver and kidney.** *Lipids in Health and Disease* 2010 **9**:35.