

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Hidrolizado de proteínas de huevo para el control de las complicaciones asociadas al estrés oxidativo inducido por la exposición a mercurio**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Francisca Fernández Suárez**

DIRECTORAS

**Marta Miguel Castro**  
**María Amaya Aleixandre de Artiñano**  
**Gema Vera Pasamontes**

Madrid, 2019



# HIDROLIZADO DE PROTEÍNAS DE HUEVO PARA EL CONTROL DE LAS COMPLICACIONES ASOCIADAS AL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR LA EXPOSICIÓN A MERCURIO

## TESIS DOCTORAL

Francisca Fernández Suárez

Madrid, 2018



# HIDROLIZADO DE PROTEÍNAS DE HUEVO PARA EL CONTROL DE LAS COMPLICACIONES ASOCIADAS AL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR LA EXPOSICIÓN A MERCURIO

Memoria presentada por

**Francisca Fernández Suárez**

Para optar al grado de Doctor

Directoras:

**Dra. Marta Miguel Castro**

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

Consejo Superior de Investigaciones Científicas- Universidad Autónoma de Madrid

**Dra. M<sup>a</sup> Amaya Aleixandre de Artiñano**

Dpto. de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid

**Dra. Gema Vera Pasamontes**

Dpto. de Ciencias Básicas de la Salud, Facultad de Ciencias de la Salud,

Universidad Rey Juan Carlos

Universidad COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología

**MARTA MIGUEL CASTRO, CIENTÍFICA TITULAR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, M<sup>ª</sup> AMAYA ALEIXANDRE DE ARTIÑANO, CATEDRÁTICA DE FARMACOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE MEDICINA, DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, Y GEMA VERA PASAMONTES, PROFESORA CONTRATADA DOCTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD, DE LA UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS**


**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo titulado "Hidrolizado de proteínas de huevo para el control de las complicaciones asociadas al estrés oxidativo inducido por la exposición a mercurio ", que constituye la Memoria que presenta la Ingeniera Francisca Suárez Fernández para optar al grado de Doctor, se ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Farmacología, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 3 de Septiembre de 2018



Fdo. Marta Miguel



Fdo. Amaya Aleixandre



Fdo. Gema Vera

*A mi hija*

## **Agradecimientos**

*Hace unos años que la vida me sorprendió con un proyecto nuevo que no esperaba llegar a vivir, y no hubiera sido posible realizarlo sin la ayuda de muchas personas a las que hoy les quiero agradecer su confianza y apoyo.*

*En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directoras de tesis. A la Dra. María Amaya Aleixandre por admitirme en su laboratorio y permitir inscribirme en el Programa de Doctorado del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense. Gracias también por tus sabios consejos, el tiempo que me has dedicado, y por esas charlas informales alrededor de la mesa del despacho cuando no teníamos tiempo ni para bajar a comer al comedor. A la Dra. Gema Vera por compartir conmigo su experiencia y tantas horas de animalario siempre con una sonrisa y mucha paciencia. Me alegro de todo lo bueno que te pase y de poder seguir compartiéndolo contigo. A la Dra. Marta Miguel que un día me abrió los ojos a una aventura que yo creía imposible, llevándome de la mano en todo el proceso y compartiendo muchas cosas conmigo, tanto profesionales como personales. Eres una excelente profesional, con muchísima capacidad de trabajo, pero sobretodo, eres una fantástica persona, nunca podré agradecerte suficiente todo lo que me has ayudado.*

*Quiero agradecer también a todas las personas de la Universidad Rey Juan Carlos con las que he compartido gran parte de este trabajo, a la Dra. Maribel Martín, al Dr. Carlos Goicochea, a la Dra. Ráquel Ábalo y a la Dra. Visitación López-Miranda, a todos ellos les agradezco que me hayan permitido formar parte del laboratorio de Farmacología y del equipo de la Unidad Asociada creada con el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación. A Cristina González, por todo lo que me enseñó en mis inicios, a Nancy, Lupe, Maica y Miguel, por recibirme siempre de buen grado y compartir conmigo esos cafés inolvidables. Especialmente quiero agradecer su tiempo y dedicación al Dr. José Antonio Uranga, eres un ejemplo de profesor, gracias por todo lo que me has enseñado.*

*Gracias al Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, por permitirme trabajar en sus instalaciones y poder utilizar sus recursos, y especialmente a sus Directoras, las Dras. M<sup>a</sup> Victoria Moreno y Tiziana Fornani, por ayudarme siempre que lo he necesitado. Gracias también a todos los miembros del grupo biopep por su apoyo durante estos años.*

*No me puedo olvidar de mis compañeras del grupo Bioactive Gastronomy, por todo lo que me habéis ayudado y apoyado, sé que os debo mucho. Gracias a Sara por tu disponibilidad, a Marta G. por abrirnos el camino, a Natalia por tantos ratos juntas, a Estefanía por su vitalidad y a Silvia, por todo lo que haces por mí, me ha encantado que compartamos esta fase final.*

*Muchas gracias al equipo de investigación de Brasil por su trabajo en este proyecto, antes y durante, y me gustaría agradecer especialmente a su jefa la Dra. Giulia Wiggers su amabilidad y su rápida respuesta a todas las dudas y preguntas.*

*Quisiera dar las gracias también a la dirección del Colegio Villaeuropa, por la flexibilidad de horarios y los permisos concedidos para poder llevar a cabo este trabajo. Gracias también a mis compañeros y compañeras que en más de una ocasión me han tenido que hacer las guardias para poder acercarme al laboratorio a iniciar o terminar algún experimento. Gracias a Sandra por hacer de niñera muchas veces y a Billy por tu ayuda con el inglés.*

*No puedo dejar de agradecer a mi familia lo que soy, a mis padres y en especial a mi hermana por creer siempre que puedo. A mi compañero por superar juntos esos momentos difíciles, que no han sido pocos, y a Mari por estar siempre dispuesta a cuidar de mi hija Teresa. Sobre todo, quiero agradecer a esta última, a mi hija Teresa, quien siempre me perdona todas las horas que no le dedico, su madurez con tan solo nueve años para comprender y respetar mis necesidades, pero, sobre todo, su admiración incondicional y su amor, te quiero muchísimo.*

*Este camino no llega a su meta, si no a una puerta que se abre y permite continuar viviendo una experiencia que espero nunca termine.*

**RESUMEN**  
**ABSTRACT**

## RESUMEN

El mercurio es un elemento químico presente de forma natural en la tierra, que se clasifica como metal pesado porque presenta una densidad relativamente alta y porque generalmente resulta tóxico para algunos organismos vivos, como los humanos. El mercurio es líquido a temperatura ambiente y puede encontrarse en la naturaleza en diferentes formas químicas: mercurio elemental, mercurio inorgánico y mercurio orgánico. La exposición a este metal puede producirse en cualquiera de sus formas químicas. Del estado o forma química en la que se encuentra el mercurio, dependen factores como el grado de toxicidad, las vías de exposición, e incluso los posibles tratamientos que se puedan administrar. La principal fuente de exposición a mercurio elemental para los humanos es la exposición laboral, (especialmente las exposiciones producidas en las explotaciones artesanales de oro, en la fabricación, manipulación y el desecho de las lámparas de bajo consumo, o en la manipulación de amalgamas dentales). El mercurio, en su forma de mercurio inorgánico, es un ingrediente común en los productos elaborados para aclarar la piel y estos jabones y cremas blanqueantes son la fuente de exposición más común a mercurio inorgánico. El mercurio orgánico, se encuentra principalmente, en forma de metilmercurio, y esta es la forma de mercurio a la que nos encontramos expuestos los humanos a través del consumo de alimentos de origen marino. El mercurio orgánico también puede encontrarse en forma de etilmercurio en algunas vacunas, y como fenilmercurio en antisépticos y colirios.

Los efectos tóxicos del mercurio se conocen desde hace bastante tiempo, y sus efectos varían según su forma química, su concentración y el tiempo de exposición. Se sabe que este metal afecta especialmente al sistema nervioso central y puede ocasionar graves desórdenes neurológicos, y también es sobradamente conocido su efecto tóxico a nivel renal. También se ha observado que existe una asociación entre la exposición a mercurio y el desarrollo de diversas patologías cardiovasculares. Así mismo, la exposición a mercurio, incluso a bajas concentraciones, puede ocasionar también alteraciones en el sistema reproductor. Para tratar las intoxicaciones por

mercurio se han utilizado desde hace tiempo sustancias antioxidantes sintéticas o agentes quelantes. Estas sustancias forman complejos con los iones de metales pesados, que se eliminan fácilmente por el organismo. Sin embargo, el uso de algunas sustancias o agentes quelantes se ha asociado con la aparición de algunos efectos secundarios como hipersensibilidad, hepatitis y problemas de autoinmunidad. Por este motivo, es obvia la importancia que tiene la búsqueda de nuevas estrategias para el tratamiento de las intoxicaciones producidas por mercurio.

En estudios anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en colaboración con un equipo de investigación internacional se había observado que la exposición crónica a bajas dosis de mercurio durante 30 días producía un importante daño vascular, con modificación de la función endotelial, y también alteraciones en la contracción de las arterias de los animales, pero no se observaron incrementos de la presión arterial en las ratas. Tampoco se investigaron posibles modificaciones en el comportamiento de los animales que pudieran implicar alteraciones neurológicas con la exposición durante 30 días. Por ello, se desarrolló un modelo experimental durante 60 días de tratamiento con mercurio con el propósito de mimetizar la posible exposición a este metal en la población por motivos laborales, sociales o alimentarios.

En los últimos años, el desarrollo de nuevos alimentos o componentes alimentarios (alimentos o ingredientes funcionales) específicamente diseñados para mejorar una o varias funciones del organismo ha suscitado gran interés, ya que pueden utilizarse para mejorar la salud. En este contexto, la búsqueda de nuevos antioxidantes de origen natural derivados de alimentos representa una novedosa alternativa en la prevención y/o tratamiento de las intoxicaciones ocasionadas por metales pesados como el mercurio. En los últimos años, las proteínas se han considerado como uno de los componentes alimentarios con actividad biológica más prometedores ya que pueden ejercer efectos beneficiosos para la salud humana cuando se ingieren con la dieta, especialmente a través de la formación de péptidos bioactivos. Estos péptidos bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivas dentro de la

proteína original que se vuelven activas cuando se liberan *in vivo* por acción de las enzimas gastrointestinales. También pueden obtenerse *in vitro* mediante su tratamiento con enzimas específicas o durante el procesado de los alimentos.

En estudios previos nuestro grupo de investigación obtuvo un hidrolizado de clara de huevo, mediante el tratamiento de este subproducto con pepsina, que presentaba, entre otras actividades, actividad antioxidante *in vitro*. Posteriormente se demostró su efecto antihipertensivo en ratas espontáneamente hipertensas tras su administración aguda y crónica, por vía oral, y su capacidad para reducir el estrés oxidativo y la inflamación en ratas Zucker obesas, un modelo de obesidad genética, así como la esteatosis hepática característica de estas ratas. Teniendo en cuenta que los efectos tóxicos que ocasiona la exposición a mercurio en el organismo se han relacionado con un aumento del estrés oxidativo, y conociendo la potente actividad antioxidante que presenta el hidrolizado de clara de huevo, en esta Tesis Doctoral nos propusimos como objetivo evaluar el efecto del hidrolizado de clara de huevo anteriormente mencionado en un modelo animal de ratas Wistar expuestas durante 60 días a bajas concentraciones de mercurio. Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron 40 ratas Wistar macho de 8-9 semanas de vida. Los animales se dividieron en 4 grupos y se alimentaron *ad libitum* durante todo el estudio con dieta sólida, y bebieron agua corriente filtrada que se renovaba periódicamente. Los animales recibieron diariamente los siguientes tratamientos: grupo Control (C), 1 ml de agua destilada mediante sonda orogástrica y 1 ml de una solución de suero salino al 0,9 % por vía intramuscular; grupo Hidrolizado (H), 1 ml de una solución de hidrolizado de clara de huevo (1 g/kg/día) diluida en agua mediante sonda orogástrica y 1 ml de una solución de suero salino al 0,9 % por vía intramuscular; grupo Mercurio (Hg), 1 ml de agua destilada por vía orogástrica y cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) diluido en 1 ml de solución salina por vía intramuscular. La primera dosis de HgCl<sub>2</sub> fue de 4,6 µg/kg y las siguientes de 0,07 µg/kg hasta finalizar el tratamiento; grupo Mercurio + Hidrolizado (Hg+H), 1 ml de una solución de hidrolizado de clara de huevo (1 g/kg/día) diluida en agua mediante sonda orogástrica y HgCl<sub>2</sub> diluido en 1 ml de solución salina por vía intramuscular.

La primera dosis de HgCl<sub>2</sub> fue de 4,6 µg/kg y las siguientes de 0,07 µg/kg hasta finalizar el tratamiento.

Durante todo el periodo experimental se controlaron semanalmente, y también al final del tratamiento, el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida de los animales. Además, al inicio del tratamiento, después de 30 días de tratamiento y al final del mismo se llevaron a cabo en los animales de los diferentes grupos los siguientes estudios de comportamiento, el test de filamentos de Von Frey, el test de estimulación plantar, y se evaluaron la catalepsia y la medida de la actividad locomotora espontánea. Se realizaron también medidas de la presión arterial indirecta semanalmente y también al final del tratamiento. Al final del tratamiento, los animales se sometieron a un procedimiento invasivo para medir la presión arterial de forma directa, se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron muestras de sangre. Una muestra de sangre total se utilizó para llevar a cabo la determinación de los niveles de mercurio, y del resto de la muestra de sangre se obtuvo el plasma que se utilizó para realizar distintas determinaciones bioquímicas, tales como: malonildialdehído, capacidad antioxidante, triglicéridos, colesterol, glucosa, factor de necrosis tumoral y la actividad de la enzima convertidora de la angiotensina. Posteriormente, se extrajeron y pesaron diferentes órganos y tejidos. La muestra de la aorta se utilizó para llevar a cabo experimentos de reactividad vascular, la determinación de los niveles de mercurio y de anión superóxido en este tejido. Después, se extrajeron muestras de cerebro, corazón, hígado, riñón, páncreas, tejido adiposo epididimal (grasa blanca), tejido adiposo interescapular (grasa parda), y colon, que se utilizaron para determinar la concentración de mercurio en estos tejidos, así como para la realización de estudios histológicos.

Los animales tratados con dosis bajas de mercurio durante 60 días presentaron alteraciones en el sistema nervioso periférico (neuropatía sensorial e hiperalgesia) y en el sistema nervioso central (catalepsia). El desarrollo de estas alteraciones se relacionó con el aumento de la concentración de mercurio en el tejido cerebral y con un aumento del estrés oxidativo (aumento de ROS y peroxidación lipídica) ocasionado por la

exposición a mercurio, y con alteraciones en el metabolismo de la glucosa y de la insulina que también se observan en los animales expuestos a este metal. Estos animales también mostraron daños sobre el sistema cardiovascular. La exposición a este metal produjo un aumento de presión arterial y disfunción vascular en la aorta de estos animales, principalmente mediado por un aumento del estrés oxidativo a nivel vascular, en el que intervienen distintas vías de señalización. De hecho, la producción de anión superóxido fue mayor en la aorta de los animales tratados con mercurio, y también fue mayor la concentración de mercurio en la aorta de estos animales. Los animales tratados con bajas dosis de mercurio durante 60 días presentaron además un aumento del estrés oxidativo a nivel sistémico, con un incremento de la peroxidación lipídica y una disminución de la capacidad antioxidante del plasma. El tratamiento con mercurio aumentó también de forma significativa los niveles de mercurio en sangre. En estos animales se produjo también un aumento de los niveles de glutatión reducido en el hígado, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de respuesta antioxidante a nivel tisular para aumentar la defensa antioxidante a nivel local y contrarrestar los efectos tóxicos que ocasiona el mercurio. Los animales tratados con bajas dosis de mercurio durante 60 días presentaron también alteraciones en el metabolismo lipídico. Las ratas de este grupo mostraron una disminución significativa en el peso del tejido adiposo blanco. El análisis histológico de este tejido reveló una clara disminución del tamaño de los adipocitos, y es posible que la disfunción del tejido adiposo blanco no permita un adecuado almacenamiento de las grasas, haciendo que estas se acumulen en el plasma de los animales, lo que ocasiona el aumento en los niveles de triglicéridos, como se pudo observar en este grupo experimental.

Los animales tratados, conjuntamente, con mercurio y con el hidrolizado de clara de huevo no manifestaron alteraciones a nivel neurológico y estas ratas tampoco presentaron un aumento del estrés oxidativo, ni cambios en el metabolismo de la glucosa y de la insulina. Este grupo de animales tampoco presentó un aumento de la presión arterial y no manifestó las alteraciones vasculares que se observaron en los animales tratados únicamente con mercurio. En ellos tampoco se observó un aumento en la producción de anión

superóxido en la aorta, ni un aumento de los niveles de mercurio en este tejido. Este grupo de animales tampoco mostró un aumento de la peroxidación lipídica, ni presentaron disminuida la defensa antioxidante del plasma, y tampoco aumentaron los niveles de mercurio en la sangre de estos animales. En este caso, sin embargo, si se observó un llamativo aumento de los niveles de glutatión reducido en el hígado, que es superior incluso al de los animales que recibieron únicamente tratamiento con mercurio. Los animales tratados, conjuntamente, con mercurio y con el hidrolizado de clara de huevo, no mostraron cambios ni en el peso ni en el análisis histológico del tejido adiposo blanco, y tampoco se observaron modificaciones de los niveles plasmáticos de triglicéridos, lo que indica que la administración del hidrolizado de clara de huevo es capaz de evitar el efecto lipotóxico ocasionado por la exposición a mercurio.

Aunque no está del todo claro el mecanismo de acción por el que el hidrolizado de clara de huevo produce sus efectos sobre este modelo experimental de exposición a bajas dosis de mercurio durante 60 días, los resultados parecen indicar que las propiedades antioxidantes del hidrolizado de clara de huevo producen, a través de un mecanismo de quelación del mercurio, una disminución del estrés oxidativo que ocasiona la exposición a este metal. Los quelatos que se forman cuando se administran de forma conjunta a los animales, el mercurio y las proteínas o los péptidos derivados del hidrolizado de clara de huevo, podrían impedir en buena medida la absorción de este metal en el organismo, y mejorar sus vías de excreción naturales, y en consecuencia reducir el efecto tóxico que produce el mercurio en el organismo.

## **ABSTRACT**

Mercury is a chemical element that exists naturally on earth, classified like a heavy metal because of its relatively high density and also because generally it becomes toxic to some living organisms, like humans. Mercury is a liquid metal at room temperature and can be found in nature in different chemical forms: elemental mercury, inorganic mercury and organic mercury. Exposure to this metal can occur in all of its chemical forms. From the chemical form in which mercury exists, it depends on factors like the degree of toxicity, the route of exposure, and also the administration of possible treatments. Human exposure to elemental mercury usually takes place via occupational exposure (especially through exposure that take place in artisanal gold mines, during manufacturing, manipulation and waste of energy saving lamps, or using amalgams in endodontics). Inorganic mercury is a common ingredient in skin lightening products. Lightening cosmetics and soaps are the principal source of human exposure to this chemical form. Organic mercury exists mainly in its methylmercury form. This chemical form of exposure is produced in humans when they consume seafood and fish. Organic mercury also can appear in vaccinations in form of ethylmercury and in form of phenylmercury in antiseptic and eye drops.

Toxic effects of mercury have been known long time ago, and its toxic effects depend on its chemical form, its concentration and the time of exposition. It is known that this metal especially promotes damage to the central nervous system causing important neurological disorders. It is well known its harmful effect on the kidneys, and a relation has been also observed between mercury exposure and the development of several cardiovascular disorders. As well as the aforementioned, low concentration mercury exposure can induce reproductive dysfunction. Chelation therapy has been used for a long time to combat mercury poisoning. These substances bind to ions of heavy metals making them easily eliminated by the human organism. Nevertheless, the use of those chelator therapies can produce undesirable adverse effects like hypersensitivity, hepatitis and autoimmunity problems. That is the reason why it is very important to research new strategies for the

treatment of mercury poisoning.

Previous studies carried out by our research group in collaboration with an international research group, showed that after a 30 days mercury exposure an important cardiovascular harm was observed, with a modification of the endothelial function, and alteration in artery contraction, but no increase of blood pressure of the animals was observed. Behavioral disorders that implicated neurological alterations were not observed after a 30 days mercury exposure. To answer to that question an experimental mercury exposure model was developed in order to simulate occupational, social or dietary human mercury exposure.

In recent years, novel food designed specifically to improve one or more functions of the organism has aroused big interest because of its healthy properties. In this context, searching for new natural antioxidant compounds derived from foods represent a new alternative to prevent and to treat heavy metals poisoning like mercury. Lately, proteins have been considered one of the food components with biological activity more promising because they can have beneficial effects for human health. Bioactive peptides, defined like amino acid sequences with no activity when they are inside the protein, but they are turned on actives when they are released *in vivo* by the action of gastrointestinal enzymes or *in vitro* through specific enzymatic treatment or during the processing of foods have been extensively studied.

In previous investigations our research group had developed an egg white hydrolysate after pepsin treatment with *in vitro* antioxidant activity, among other activities. Later, it was demonstrated its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats after its acute and chronic oral administration, as well as its capacity to reduce oxidative stress and inflammation in obese Zucker rats, a genetic obese model, as well as hepatic steatosis typical of these rat model. Given that the toxic effects in the body of mercury exposure has been related with an oxidative stress increase and knowing the high antioxidant capacity of the egg white hydrolysate, in this Doctoral Thesis we propose to evaluate effects of the pepsin egg white

hydrolysate effects in a Wistar rats model which were exposed to low concentrations of mercury during 60 days. To carry out this study, we used forty 8-9 weeks-old male Wistar rats. The animals were divided into four groups of ten rats each group and were fed *ad libitum* with solid diet and tap water renewed periodically. The animals were daily treated as follow: Untreated group (C), 1 ml of distilled water by gavage and an intramuscular injection of saline solution 0.9 %; Hydrolysate group (H), 1 ml of a solution of egg white hydrolysate (1 g/kg/day) diluted in distilled water by gavage, and an intramuscular injection of saline solution 0.9 %; Mercury group (Hg), 1 ml of distilled water by gavage and an intramuscular injection of HgCl<sub>2</sub> diluted in distilled water. The initial dose of HgCl<sub>2</sub> was 4.6 µg/kg and subsequent doses of 0.07 µg/kg, until the end of treatment and Mercury + hydrolysate group (Hg+H), 1 ml of a solution of egg white hydrolysate (1 g/kg/day) diluted in distilled water by gavage and an intramuscular injection of HgCl<sub>2</sub> diluted in distilled water. The initial dose of HgCl<sub>2</sub> was 4.6 µg/kg and subsequent doses of 0.07 µg/kg, until the end of treatment.

During the experiment, daily basal food and water intake, and the rate of body weight of the animals were controlled once a week. Also, at the beginning, after 30 days and at the end of treatment, different behavioral studies were conducted, Von Frey filaments test, plantar stimulation test, catalepsy and spontaneous motor activity were evaluated. Indirect blood pressure measurements were also taken weekly and at the end of the experimental period, direct blood pressure measurement was also realized at the end of the experimental period. Next, the animals were euthanized by decapitation and blood samples and different tissues were collected (brain, heart, liver, kidney, pancreas, epididymal adipose tissue (white fat), interscapular adipose tissue (brown fat), and colon). The blood samples were used to perform mercury level determinations and for different biochemical test (malondialdehyde, antioxidant capacity, triglycerides, cholesterol, glucose, tumor necrosis factor and angiotensin converting enzyme activity). Tissues samples were weighed. An aortic sample was used in vascular reactivity experiments, in mercury level measures and superoxide anion determinations. Tissues were also used for mercury determination and for histological analysis.

The animals treated with low doses mercury during 60 days show peripheral nervous system alterations (sensory neuropathy and hyperalgesia) and central nervous system disorders (catalepsy). The development of these alterations was related with the mercury level concentration in brain tissue and with an oxidative stress increase caused by mercury exposure, and with glucose and insulin metabolism alterations observed in animal mercury exposed. These animals also presented cardiovascular disorders. The mercury exposure caused an increase in blood pressure and vascular dysfunction in the aorta of the animals, mainly mediated by oxidative stress at vascular level, in which different signaling pathways participated. In fact, superoxide anion production was higher in the aorta of the animals exposed to mercury, and also was the mercury levels. Animals treated with low levels of mercury during 60 days also showed an increase in oxidative stress at a systemic level, with an increase of lipid peroxidation and a decrease in plasma antioxidant capacity. Mercury treatment also increased significantly mercury blood levels. Animals also presented an increase in liver reduced glutathione, suggesting the existence of an antioxidant response mechanism at the tissue level to increase antioxidant defense locally and to rest toxic mercury effects. Animals treated with low levels of mercury during 60 days also showed alterations on lipid metabolism. These animals also showed a significant reduction of white adipose tissue. Histological analysis showed a clear decrease of adipocyte size, and possibly this alteration made impossible the correct lipid storage, this can promote a lipid accumulation in plasma, causing an increase in triglycerides levels, as we observed in the mercury experimental group.

Animals which were treated with mercury and egg white hydrolysate simultaneously did not presented neurological disorders neither increase oxidative stress was observed, without changes in glucose and insulin metabolisms. This group of animals did not present increased blood pressure and vascular disorders that we observed in mercury exposed animals. Animals with both treatments did not present superoxide anion high production in the aorta, nor higher mercury levels in this tissue. This group of animals did not show lipid peroxidation, change on antioxidant defense or blood mercury

levels. Conversely, there was a clear increase in the reduced glutathione levels in the liver, even higher than mercury treated animal levels. Animals treated with mercury and egg white hydrolysate did not show body weight increases, histological changes in white lipid tissue and nor plasma triglyceride levels were not modified. These results suggest egg white hydrolysate administration is capable in avoiding the lipotoxic effect of mercury exposure.

Although egg white hydrolysate mechanism of action in this 60-days-experimental model is not entirely clear, results seem to indicate that antioxidant properties of egg white hydrolysate produce, through a mercury chelation mechanism, a decrease of the oxidative stress caused by mercury. Chelators formed when mercury and white egg hydrolysate were administered together in animals could prevent to a large extent mercury absorption by the organism, improving excretion natural pathways, and consequently reducing mercury toxicity in the body.

## ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AESAN: Agencia española de seguridad alimentaria y nutrición

AMAP: Programa de seguimiento y asesoramiento del Ártico

ANOVA: Análisis de la varianza

ARA: Antagonistas de los receptores de angiotensina

ATSDR: Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades

CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>: Metilmercurio

CHOP: Proteína homóloga a C/EBP

COX: Ciclooxygenasa

DHE: Dihidroetidina

DM: Diabetes mellitus

DMSA: Ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico

DMSP: Ácido 2,3-dimercapto-propano sulfónico

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

EFSA: Autoridad europea de seguridad alimentaria

EEM: Error estándar de la media

Hg<sup>2+</sup>: Cation mercurico

Hg: Mercurio metálico

Hg<sub>0</sub>: Mercurio elemental

Hg<sub>2+</sub>: Sal de mercurio

HgCl<sub>2</sub>: Cloruro de mercurio

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

KH: Krebs- Henseleit

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

L-NAME: L-NG-nitroarginina metil éster

MDA: Malonildialdehído

NADPH: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Anión superóxido

OIT: Organización internacional del trabajo

OMS: Organización mundial de la salud

ORAC: Oxigen Radical Absorvance Capacity

PAD: Presión arterial diastólica

PAS: Presión arterial sistólica

PBS: Tampón fosfato salino

PNUMA: Programa de la Naciones Unidas para el medio ambiente

PPAR: Receptores activados por proliferadores de peroxisomas

RE: Retículo endoplasmático

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SHR: Ratas espontáneamente hipertensas

SOD: Superóxido dismutasa

SPN: Nitroprusiato sódico

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TG: Triglicéridos

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral

UCH-L1: Anticuerpo carboxil-terminal hidrolasa-1

## ÍNDICE

RESUMEN Y ABSTRACT	
ABREVIATURAS	
ÍNDICE	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. El mercurio	6
1.1.1. Propiedades físico-químicas y ciclo biogeoquímico del mercurio	6
1.1.2. Fuentes de exposición a mercurio	11
1.1.3. Efectos tóxicos del mercurio en el organismo	16
1.1.4. Prevención y tratamiento de la intoxicación por mercurio	19
1.2. Hidrolizados y péptidos bioactivos derivados de proteínas de huevo	25
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	30
2.1. Hipótesis	31
2.2. Objetivos	31
3. MATERIAL Y MÉTODOS	32
3.1. Obtención del hidrolizado de clara de huevo	33
3.2. Protocolo experimental	33
3.3. Determinaciones y técnicas utilizadas	38
3.3.1. Medida de la sensibilidad mecánica. Método de Von frey	38
3.3.2. Medida de la sensibilidad térmica. Test de estimulación plantar	39
3.3.3. Medida de la catalepsia. Test del anillo	40
3.3.4. Medida de la actividad locomotora espontánea. Actímetro	41
3.3.5. Medida de la presión arterial	41
3.3.6. Estudios de la reactividad vascular en aorta	43
3.3.7. Medida de la producción de anión superóxido en aorta	46
3.3.8. Determinación del malonildialdehído en plasma y en tejido cerebral	47
3.3.9. Medida de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina en plasma	48
3.3.10. Determinación de la capacidad antioxidante del plasma	49
3.3.11. Determinación del glutatión reducido en tejido hepático	50
3.3.12. Determinación de los niveles del factor de necrosis	50

tumoral en plasma	
3.3.13. Determinación de triglicéridos, colesterol y glucosa en plasma	51
3.3.14. Determinación de los niveles de mercurio en sangre y tejidos	51
3.3.15. Estudios histológicos	52
3.3.16. Estudios de inmunohistoquímica	53
3.4 Análisis estadístico	54
4. RESULTADOS	55
4.1. Resultados de ingesta y de peso corporal	56
4.2. Resultados de los tests comportamentales	57
4.2.1. Test de los filamentos de Von Frey. Sensibilidad térmica	57
4.2.2. Test de estimulación plantar. Sensibilidad térmica	58
4.2.3. Test del anillo. Catalepsia	59
4.2.4. Actímetro. Actividad locomotora espontánea	61
4.3. Resultados de la presión arterial	61
4.3.1. Presión arterial indirecta	61
4.3.2. Presión arterial directa	62
4.4. Resultados de la reactividad vascular en aorta	63
4.4.1. Respuesta contráctil a KCl	63
4.4.2. Respuesta contráctil a fenilefrina	64
4.4.3. Respuesta vasodilatadora a Acetilcolina	65
4.4.4. Respuesta vasodilatadora a nitroprusiato sódico	67
4.4.5. Respuesta contráctil a fenilefrina en arterias desprovistas de endotelio	68
4.4.6. Respuesta contráctil a fenilefrina en presencia de L-NAME	70
4.4.7. Respuesta contráctil a fenilefrina en presencia de apocinina	72
4.4.8. Respuesta contráctil a fenilefrina en presencia de la enzima superóxido dismutasa	74
4.4.9. Respuesta contráctil a fenilefrina en presencia de indometacina	76
4.4.10. Respuesta contráctil a fenilefrina en presencia de NS-398	78
4.4.11. Respuesta contráctil a fenilefrina en presencia de	80

---

Losartán	
4.4.12. Producción de anión superóxido en la aorta	82
4.5. Resultados de las determinaciones bioquímicas en plasma y tejidos	84
4.5.1. Marcadores se estrés oxidativo	84
4.5.2. Perfil lipídico y glucemia	85
4.5.3. Factor de necrosis tumoral-alfa	86
4.5.4. Actividad de la enzima convertidora de angiotensina	87
4.5.5. Cuantificación de mercurio en sangre y tejidos	88
4.6. Resultados de los estudios histológicos	90
4.7. Resultados de los estudios de inmunohistoquímica	97
4.7.1. Inmunohistoquímica de la piel	97
4.7.2. Inmunohistoquímica del tejido adiposo blanco	99
5. DISCUSIÓN	101
6. CONCLUSIONES	139
7. BIBLIOGRAFÍA	143

## **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El mercurio

El mercurio es un elemento químico presente de forma natural en la tierra, que se conoce desde la antigüedad y que se ha utilizado en casi todas las culturas. Hace más de 25.000 años, en la prehistoria, los humanos ya utilizaban el mercurio en forma de mineral (el cinabrio) para pintarse la cara y decorar las cavernas de color rojo oscuro. Los romanos lo denominaban *hydragyrum*, palabra que en latín significa “plata líquida”. Fue precisamente este estado líquido y la fluidez característica de este metal lo que permitió que su nombre fuera un homenaje al dios romano Mercurio, considerado el mensajero de los dioses, siendo el primer metal con nombre mitológico. (Baena, 2017). El emperador chino Qín Shi Huáng Di (221 a.C. – 206 a.C.) tomaba brebajes de mercurio porque pensaba que le otorgarían la inmortalidad. En la India se creyó que el mercurio era un afrodisíaco muy eficaz y en el mundo árabe se utilizaba para tratar enfermedades de la piel. También en farmacología su historia es muy extensa, y se ha utilizado durante amplios periodos históricos como medicamento para el tratamiento de diferentes enfermedades. Entre sus usos farmacológicos destaca su aplicación como antidiurético y como medicamento contra la sífilis (Leithner *et al.*, 2007). Fue en la Edad Media cuando comenzaron a identificarse algunos efectos adversos del mercurio, y, concretamente, en el año 1557, el francés Jean Fernel fue el primero en describir los signos y síntomas que producía el envenenamiento por mercurio.

#### 1.1.1. Propiedades físico-químicas y ciclo biogeológico del mercurio

El mercurio se clasifica como metal pesado porque presenta una densidad relativamente alta (seis veces mayor que la densidad del agua), y porque generalmente resulta tóxico para algunos organismos vivos, como los humanos. Se conoce también por ser el único metal que se presenta en estado líquido a temperatura ambiente. El mercurio (Hg) pertenece al grupo 12 de la tabla periódica y comparte con el cinc (Zn) y el cadmio (Cd) su estado

de oxidación +2 ( $\text{Hg}^{2+}$ ), que le permite formar óxidos y sales. Pero el mercurio también puede encontrarse con estado de oxidación +1 ( $\text{Hg}^{1+}$ ), y este ion es capaz de reducirse fácilmente a mercurio metálico (Hg).

El mercurio se puede encontrar en las diferentes formas químicas que se mencionan a continuación:

- Mercurio elemental ( $\text{Hg}_0$ ). Es un metal de color brillante y líquido a temperatura ambiente. Sin embargo, es extraño encontrarlo en estado líquido en la naturaleza, ya que es muy volátil y se evapora lentamente formando vapor de mercurio. La cantidad de vapor de mercurio dependerá de la temperatura a la que se encuentra el metal en el medio ambiente. Esta forma química proviene de fuentes naturales y antropogénicas (González-Raymat *et al.*, 2017).

- Mercurio inorgánico, o mercurio que está formando sales de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ). El mercurio puede oxidarse en presencia de diferentes compuestos (cloro, oxígeno y azufre) y forma las sales  $\text{Hg}_2^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  (González-Raymat *et al.*, 2017). Estas formas químicas de mercurio son las más comunes en el medio ambiente. Son además más solubles en agua que el mercurio elemental, y también más reactivas. Algunas, como el sulfuro de mercurio, liberan también vapor de mercurio, pero este vapor se mantiene en el aire menos tiempo que el vapor generado a partir de la forma elemental.

- Mercurio orgánico. Esta forma química se genera cuando el mercurio se une mediante enlaces covalentes con el carbono y con otros elementos. El mercurio orgánico se produce principalmente en el medio acuático por la acción de determinadas bacterias, las microbacterias, y la forma orgánica más común es el metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ). Esta forma química es también la más perjudicial, ya que entra directamente en la cadena trófica marina, vía por la que llega al ser humano, principalmente a través del consumo de pescado (Gworek *et al.*, 2016).

Entre las propiedades físicas del mercurio, hay que destacar su elevada volatilidad cuando está en estado líquido y su solubilidad relativamente alta en todo tipo de disolventes, incluido el agua. El mercurio es también un elemento químico liposoluble, propiedad importante para justificar su capacidad de atravesar las membranas celulares. Ambas características, la volatilidad y la solubilidad, son claves para comprender el ciclo global del mercurio en la naturaleza.

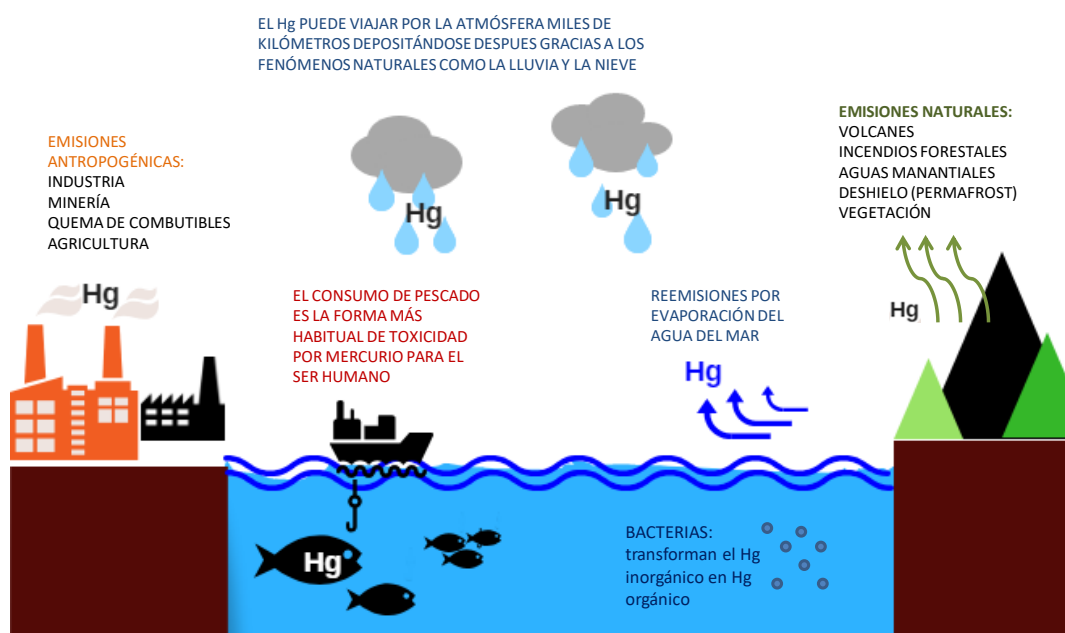


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del mercurio (Hg).

El ciclo biogeoquímico del mercurio (Figura 1) es un ciclo complejo en el que están involucrados sistemas atmosféricos, acuáticos y terrestres (Bisinoti y Jardim, 2004). El mercurio se encuentra de forma natural en la corteza terrestre, principalmente en forma de mineral cinabrio. Sin embargo, son las emisiones de mercurio a la atmósfera las que representan un papel clave en este ciclo. Estas emisiones pueden ser de origen natural o antropogénico. Las emisiones naturales de mercurio en forma de gas se producen por distintos fenómenos que ocurren en la naturaleza: erupciones volcánicas, desgaste de la corteza terrestre, incendios forestales y manantiales de aguas profundas, entre otros. Existen zonas en la corteza

terrestre donde el mercurio se produce en mayor cantidad de forma natural. También hay que tener en cuenta que los niveles de emisión de mercurio dependen en gran medida de los fenómenos naturales, y esto hace que sus niveles ambientales hayan variado mucho a lo largo de la historia. De hecho, el cambio climático, que produce el aumento de la temperatura terrestre, puede resultar un nuevo agente de contaminación por mercurio en algunas zonas terrestres. Este es el caso del “permafrost”, capa de tierra congelada permanentemente que se encuentra en zonas frías como el Ártico, que acumula cantidades variables de mercurio y otros posibles contaminantes y que al derretirse por efecto del calentamiento global se liberarían al medio (Outridge y Sanei, 2010; Rydberg *et al.*, 2010).

La cantidad de mercurio que se libera a la atmósfera depende también de la actividad humana, pues el hombre lleva explotando este elemento desde la antigüedad. Entre las actividades humanas que aumentan las emisiones de mercurio tienen especial relevancia la quema de combustibles fósiles, la producción de cemento, la producción de metales no ferrosos y la incineración de residuos (Londoño *et al.*, 2016). Dentro de la quema de combustibles fósiles, la combustión del carbón es la fuente más importante de emisiones atmosféricas de mercurio derivadas de la actividad humana. La extracción de oro y plata artesanal, en la que se utiliza todavía el proceso de amalgamación, es una fuente de contaminación del aire y el agua por mercurio y, aunque esta práctica tiene lugar en todo el mundo, se concentra especialmente en zonas de América del Sur, África y Asia, según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017). En la actualidad, la obtención industrial de mercurio se centra esencialmente en China, y esta actividad se considera una de las mayores fuentes de mercurio atmosférico. Aunque la cantidad de mercurio utilizada en las actividades humanas con otros minerales es pequeña, los procesos que conllevan estas actividades se desarrollan usualmente a muy altas temperaturas, y ello hace que la emisión de mercurio a la atmósfera sí sea relevante. Otra fuente de mercurio antropogénica es la que deriva de su uso en la vida cotidiana, y en este apartado podemos incluir las emisiones generadas durante la fabricación o desecho de objetos y productos como lámparas de bajo consumo, pinturas, cosméticos, material eléctrico y algunos

pesticidas y fungicidas.

El mercurio liberado a la atmósfera puede depositarse directamente sobre diversos tipos de superficies terrestres (suelo, rocas, nieve, hielo, superficie acuática, incluyendo la oceánica), y en la vegetación. El mercurio atmosférico puede desplazarse durante miles de kilómetros antes de volver a depositarse. Es por ello que podemos encontrarlo en lugares como el hielo ártico. Hay que tener en cuenta además que cuando el mercurio se deposita en el suelo las plantas lo absorben y acumulan de forma diferente según el momento del ciclo vegetativo en el que se encuentren (Spisso *et al.*, 2018). Los depósitos de mercurio en el suelo y los océanos forman parte, en realidad, de otro eslabón más en el ciclo biológico de este elemento. La reemisión del mercurio depositado, una vez que se ha emitido por fuentes naturales y antropogénicas, contribuye también a aumentar el cómputo global del mercurio atmosférico (AMAP 2013). La principal fuente de reemisión de mercurio a la atmósfera son en realidad los océanos, que representan un 36 % de la reemisión total (Sundseth *et al.*, 2017).

El papel del agua en el ciclo del mercurio tiene también especial relevancia. En primer lugar, el agua conduce el mercurio a los océanos. El mercurio acumulado en el suelo, bien por deposiciones atmosféricas o como subproducto contaminante de algunas actividades humanas, sigue de la mano de la escorrentía del agua hasta el mar. En suelos desertizados y con poca vegetación, es más fácil que se produzca este movimiento del mercurio hacia aguas subterráneas o cauces de ríos. El destino final de estas aguas, que contienen niveles variables de mercurio, son las aguas marinas, pero, casi siempre, los niveles de mercurio en las zonas donde desembocan estas aguas curiosamente no resultan peligrosos para el consumo debido a las corrientes características de estas zonas que no permiten su acumulación. Es en los océanos donde se concentran las cantidades de mercurio que provienen de otras aguas, y también el mercurio que proviene de deposiciones atmosféricas y de desechos contaminantes de la industria. Sin embargo, la cantidad de mercurio que proviene de fuentes naturales sigue siendo muy superior que la que proviene de la actividad humana (Gworek *et al.*, 2016).

Si bien el mercurio, al volatilizarse, lo hace mayoritariamente en su forma elemental, distintos procesos ambientales, entre los que se encuentran las reacciones fotoquímicas, otras reacciones de oxidación y reducción, y las transformaciones microbianas, pueden convertirlo en otras formas de mercurio. La reducción del mercurio en el medio marino sucede rápidamente, y acontece por reacciones abióticas (fotoquímicas) y por la biota. La reducción fotoquímica es más común en las aguas abiertas de los océanos mientras que los mecanismos biológicos se dan más en las zonas costeras. Todo ello, permite que el mercurio metálico y los compuestos de mercurio de los sedimentos oceánicos puedan sufrir una conversión a formas orgánicas. Especialmente, el mercurio metálico puede sufrir una biometilación gracias a las bacterias que se encuentran en el medio marino (Boening 2000; Raposo *et al.*, 2008). Distintos factores condicionan la cantidad de mercurio metilado que se forma allí. Entre ellos, la bioacumulación, la remineralización de materia orgánica, la deposición atmosférica y la advención horizontal. De todos estos factores, es fundamental la cantidad de materia orgánica, que puede estar en forma de depósitos, y que parece que condiciona prioritariamente el proceso de metilación (Schartup *et al.*, 2013). Estos factores son los que definen los perfiles de contaminación por mercurio orgánico en función de la profundidad, y en cada lugar, el perfil contaminante del mercurio va a depender de la relación entre estos factores (Mason *et al.*, 2012). En todo caso, el mecanismo microbiano de metilación del mercurio es aún desconocido.

### **1.1.2. Fuentes de exposición a mercurio**

En los años cincuenta, apareció una extraña enfermedad neurológica que afectó a cientos de personas en una ciudad costera de Japón llamada Minamata. Las personas afectadas sufrían movimientos involuntarios, debilidad muscular, problemas auditivos y alteraciones del lenguaje. En 1968, se señaló que la causa de estas alteraciones había sido la intoxicación por mercurio provocada por el vertido de una planta petroquímica. Este hecho desencadenó de nuevo un gran interés por el estudio de este elemento no sólo desde el ámbito científico y académico, sino también desde las

instituciones (Chen y Driscoll, 2018; Selin *et al.*, 2018).

La exposición a mercurio puede producirse en sus diferentes estados (elemental, inorgánico y orgánico). De este estado o forma de mercurio a la que se expone el ser humano, dependen factores como el grado de toxicidad, las vías de exposición, e incluso los posibles tratamientos que se puedan administrar (Yip *et al.*, 2010).

La principal fuente de exposición a mercurio elemental es la laboral. Esta exposición se produce habitualmente como resultado del trabajo en explotaciones artesanales de oro, así como durante la fabricación, manipulación y deshecho de las lámparas de bajo consumo (tubos fluorescentes y bombillas) y durante la manipulación de las amalgamas dentales. Por lo tanto, las poblaciones con mayor riesgo de exposición a mercurio elemental las podemos encontrar en zonas con explotaciones mineras artesanales, así como en los profesionales sanitarios que trabajan con amalgamas dentales.

Dentro de la exposición laboral a mercurio elemental debemos destacar la que sucede en las explotaciones artesanales de oro. La inhalación del vapor de mercurio que se libera al calentar la amalgama de oro es la forma más directa y grave de exposición a mercurio elemental. Esta exposición concierne a las personas que realizan la actividad minera pero también afecta a aquellas que viven cerca de las instalaciones (Gibb y O'Leary, 2014). La actividad minera a pequeña escala se da en más de setenta países. Su demografía varía considerablemente, y todos los grupos de edad pueden estar representados. En cuanto al género, los hombres suelen estar más involucrados en el proceso de extracción, aunque este porcentaje puede ser muy variable según las distintas zonas del mundo, y la participación femenina en este tipo de actividad puede representar porcentajes iguales o superiores al de los hombres en algunas zonas. Según la Organización Internacional del Trabajo (OIT), la mayor proporción de mujeres mineras se encuentra en África, donde las mujeres representan el 50% de las personas que se dedican a esta actividad (OIT, 2007). La OIT también estima que aproximadamente un

millón de niños entre 5 y 7 años se dedican a la minería de pequeña escala, y que estos niños pueden participar prácticamente en todas las etapas de la minería aurífera.

El personal odontológico que trabaja con las amalgamas dentales que se utilizan en los empastes para impedir el progreso de las caries, también está expuesto a las emisiones de vapor de mercurio. Las amalgamas son el material de relleno dental de uso más común. Están constituidas por una mezcla de mercurio y una mezcla de metales (plata, cobre, estaño o zinc), en la que el mercurio se encuentra en una proporción del 45-55%. En los centros de salud, el personal sanitario también está expuesto a las inhalaciones de mercurio por las roturas de termómetros y otros materiales sanitarios que contienen este metal, tales como vacunas y esfigmomanómetros y en este caso, la exposición más común surge por la inhalación de los vapores procedentes del mercurio líquido (OMS, 2017).

Las lámparas de mercurio poseen entre 5 y 10 mg de mercurio, una cantidad que comparada con la que posee un termómetro de mercurio (1200 mg) es muy pequeña. A pesar de ello, las lámparas de mercurio suponen un riesgo para la salud si se rompen y se inhala el mercurio que contienen en forma de vapor. Los protocolos para recoger las lámparas cuando suceden estos accidentes domésticos están muy desarrollados, aunque tal vez sean desconocidos para la población en general. Otro de los problemas que plantean estas lámparas se da en la gestión de residuos, en España, los ayuntamientos son los encargados de manejar estos residuos que suponen una dificultad por su toxicidad. Existen unos 33.300 puntos de recogida de lámparas fluorescentes que se tratan en cinco centros especializados de reciclaje. Estos residuos junto con otros desechos de mercurio se estabilizan y se almacenan en vertederos especializados (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente: PNUMA, 2017).

El mercurio, en su forma de mercurio inorgánico, es un ingrediente común en los productos elaborados para aclarar la piel. Son precisamente estos jabones y cremas blanqueantes la fuente de exposición más común a

mercurio inorgánico, y cuyo uso puede suponer un riesgo para la salud humana. Estos productos se utilizan principalmente en algunos países de África y Asia. Según los informes del PNUMA, (2008) el 77% de las mujeres en Mali usan blanqueantes para la piel. El 59% de las mujeres en Togo, el 35% de las mujeres de Sudáfrica y el 27% de las mujeres de Senegal también los utilizan. Más aún, en la India, el 61% del mercado dedicado a productos dermatológicos lo constituyen productos que se utilizan para aclarar la piel (Ladizinski *et al.*, 2011). Las cifras de uso de productos blanqueantes dentro de la población femenina de estos países son, por lo tanto, alarmantes. En la actualidad, algunas personas de piel oscura, o con manchas en la piel, de países de Europa y Norteamérica también los utilizan, pero hay que puntualizar que en la Unión Europea está prohibido el uso de mercurio en productos cosméticos, a excepción de su utilización en productos relacionados con el maquillaje de ojos, en los que se limitan las cantidades de este metal a menos del 0,007 % del peso del producto. Algunas formas de mercurio orgánico (el etilmercurio y las sales de fenilmercurio) también pueden utilizarse como conservantes en productos cosméticos, tales como productos para limpieza y maquillaje de ojos, y máscaras de pestañas (PNUMA, 2008). Por lo tanto, en todos estos productos cosméticos podríamos encontrar mezclas de mercurio orgánico e inorgánico.

Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2012), el mercurio inorgánico en la alimentación no supone ningún problema para el consumidor, debido a que su absorción es muy limitada (González-Estecha *et al.*, 2014).

El mercurio orgánico lo encontramos también en forma de metilmercurio en los mariscos y el pescado, en forma de etilmercurio en algunas vacunas, y como fenilmercurio en antisépticos y colirios (Gonzalez-Estecha *et al.*, 2014).

El metilmercurio es la forma de mercurio a la que nos podemos encontrar expuestos los humanos por el consumo de alimentos de origen marino (Clarkson y Strain, 2003; McKelvey *et al.*, 2007). Esta forma de

mercurio tiene la capacidad de acumularse (bioacumulación) y de magnificarse (biomagnificación) en los organismos. La liposolubilidad del mercurio facilita su bioacumulación, ya que hace más fácil el transporte de este compuesto a través de las membranas celulares, lo que aumenta su capacidad de unión a componentes intracelulares (OMS, 1996). La biomagnificación hace referencia a un proceso de acumulación de una sustancia tóxica que aparece en bajas concentraciones en los organismos situados al principio de la cadena trófica, y que aparece en mayor cantidad a medida que se asciende en dicha cadena. Todo organismo contaminado con mercurio que ocupa un nivel inferior en la cadena alimentaria sumará por lo tanto para contaminar en mayor grado a su depredador, y hay que tener en cuenta que el hombre se encuentra en lo más alto de la cadena alimentaria (Henriques *et al.*, 2015; Rumbold *et al.*, 2018). Los procesos de bioacumulación y biomagnificación de mercurio orgánico en los océanos hacen que la ingesta de metilmercurio a través de la dieta constituya un importante factor de riesgo para la salud humana. (Olivero *et al.*, 1997; Boening, 2000).

Todas las personas pueden estar expuestas a metilmercurio cuando ingieren pescado y/o marisco, pero las poblaciones pesqueras asentadas en diferentes costas del mundo son las más afectadas por esta forma de exposición a mercurio, puesto que su dieta depende más de los productos del mar. La concentración de mercurio en sangre en la población que vive en áreas costeras es relativamente alta, pero hay que tener en cuenta que los niveles de toxicidad dependen de las especies marinas que se consumen y del origen de las mismas. Los niveles de mercurio son superiores en aquellas especies que alcanzan mayor tamaño, y los niveles de mercurio en las especies que proceden de explotaciones acuícolas (piscifactorías) son mucho menores que los niveles de las especies que se pescan en el mar (Sundseth *et al.*, 2017). Curiosamente, en las poblaciones costeras, también se han encontrado mayores concentraciones plasmáticas de mercurio en las personas que consumen alcohol de forma habitual (Kim *et al.*, 2016)

Los niveles tolerables de ingesta semanal para metilmercurio son 1,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , y para mercurio orgánico total son de 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Teniendo en cuenta que

el 90% del mercurio encontrado en el marisco y el pescado es metilmercurio, podemos decir que el consumo de esta forma de mercurio representa un gran reto en términos de seguridad alimentaria. La EFSA destaca a España, Italia, Francia y Grecia entre los países de Europa en los que se encuentran los niveles más altos de exposición a mercurio a través de la dieta, y señala que la exposición está más relacionada con el tipo de pescado que se consume, que con las cantidades de pescado consumidas (EFSA, 2012). En un estudio realizado por Moreno-Ortega *et al.*, (2017) se pone de manifiesto que la ingesta de mercurio debida al consumo de pescado en España depende de diferentes factores relacionados con la edad y con el sexo, pero no de variables geográficas o estacionales. En cuanto a las diferencias por sexo estas son mínimas, siendo más importantes las que se producen en función de la edad, ya que esta incrementa el riesgo.

### **1.1.3. Efectos tóxicos del mercurio en el organismo.**

Como ya se ha dicho anteriormente, el mercurio es un metal pesado potencialmente tóxico para el organismo humano, y sus efectos varían según su forma química, su concentración y el tiempo de exposición (Syrvesen y Kaur, 2012).

Los efectos tóxicos del mercurio en cualquiera de sus formas químicas se conocen desde hace bastante tiempo, y se sabe que este metal afecta especialmente al sistema nervioso central (Poulin y Gibb, 2008; Calabrese *et al.*, 2018). Es importante señalar que en la exposición a mercurio existe un periodo de latencia que puede durar unos meses o años antes del inicio de la aparición de los síntomas tóxicos asociados y del desarrollo de las lesiones en el sistema nervioso central (Rice, 1996; Bragança *et al.*, 2018). Otros estudios han demostrado la relación entre la exposición a mercurio y el aumento del riesgo de mortalidad por daño renal (Hodgson *et al.*, 2007). También se ha observado que existe una asociación entre la exposición a mercurio y el desarrollo de diversas patologías cardiovasculares (Virtanen *et al.*, 2004; Houston 2007). Así mismo, la exposición a mercurio, incluso a bajas concentraciones, ocasiona también problemas en el sistema reproductor. La

exposición a mercurio puede provocar en las hembras abortos espontáneos, malformaciones congénitas del feto, problemas en la ovulación e infertilidad (Rzymiski *et al.*, 2015). En el caso de los machos, la exposición a mercurio está asociada con una disminución de la libido, problemas en la producción de espermatozoides y baja fertilidad (Mendiola *et al.*, 2011, Rizzetti *et al.*, 2016a).

A continuación, se explican brevemente los efectos tóxicos que producen las diferentes formas químicas del mercurio.

La intoxicación por inhalación de mercurio en su forma elemental se manifiesta con un deterioro neurológico, renal y autoinmune. La inhalación intensa de vapor de mercurio puede afectar directamente a los pulmones y causar irritación de las vías respiratorias, neumonitis química y edema pulmonar (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, ASTRE, 2012). El vapor de mercurio inhalado se absorbe rápidamente en los pulmones en un porcentaje del 80% y difunde rápidamente a la sangre, distribuyéndose al resto de los órganos del cuerpo. Los principales órganos donde se deposita son el cerebro y el riñón (Park y Zheng, 2012). El mercurio elemental puede traspasar además la placenta, ya que pasa fácilmente las membranas celulares. Su toxicidad en niños puede manifestarse con hipertensión y con acrodinia, un estado que cursa con aparición de edema, dolor y descamación en los dedos de las manos y los pies (Böse-O'Reilly *et al.*, 2010).

El mercurio inorgánico, presente en los jabones y cremas para aclarar la piel, puede causar principalmente daño renal. En realidad, cuando se produce una intoxicación por esta forma química de mercurio, la mayor concentración de mercurio inorgánico se localiza en el riñón, especialmente en el túbulo proximal (Bridges y Zalups, 2010), y el daño renal es mucho más importante en edades avanzadas (Bridges *et al.*, 2014). El mercurio inorgánico de los jabones y cremas blanqueantes se ha comprobado que puede causar además erupciones cutáneas y deformación cicatricial, además de disminuir la resistencia de la piel a infecciones bacterianas y micóticas. Dentro de las formas inorgánicas de mercurio destacan sus sales. En este contexto cabe

señalar que el cloruro de mercurio ( $\text{ClHg}_2$ ) tiene especial interés en esta Tesis Doctoral, ya que es la forma de mercurio que se ha utilizado en su parte experimental. En estudios previos, se ha demostrado que la exposición crónica a este compuesto produce daños cardiovasculares, tales como aumento de la presión arterial, disfunción endotelial e incremento de la contractilidad vascular en distintas arterias, tales como aorta, mesentérica, coronaria y cerebrales (Wiggers *et al.*, 2008; Peçanta *et al.*, 2010; Furieri *et al.*, 2011a; Wiggers *et al.*, 2016). Se ha observado también que existe una relación directa entre la concentración de cloruro de mercurio que aparece en el pelo y el riesgo de sufrir un infarto de miocardio (Furieri *et al.*, 2011a).

Por su parte, el mercurio orgánico en forma de metilmercurio puede ocasionar múltiples efectos tóxicos que difieren si la intoxicación es aguda o crónica. La intoxicación aguda provoca cansancio, fatiga, pérdida de peso, confusión mental, desórdenes psiquiátricos, problemas de concentración, amnesia, taquicardia, parestesia, ataxia, coma e incluso la muerte (Farah *et al.*, 2017). En cuanto a la intoxicación crónica, esta se caracteriza por una pérdida sensorial en las extremidades, irritabilidad, disminución de la atención y la memoria, ansiedad, depresión, problemas de coordinación y aumento del riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Chuu *et al.*, 2007; Wiggers *et al.*, 2008).

Durante el siglo XIX, en Inglaterra, se habían descrito algunos casos de muerte que se habían relacionado con el envenenamiento producido por metilmercurio. Varias décadas después la intoxicación ocurrida en la bahía de Minamata se relacionó también con la exposición a metilmercurio. Las autopsias de los individuos estudiados revelaron altas concentraciones de mercurio en el cerebro, y las regiones del encéfalo más afectadas eran las áreas sensitivas y motoras, el córtex temporal y el cerebelo. Las alteraciones estructurales que más se observaron en este tejido fueron las dilataciones de los espacios perivasculares, la muerte neuronal, la activación de la microglia y la desmielinización. Alteraciones similares se encontraron en cerebros de niños que habían estado expuestos a grandes concentraciones de metilmercurio durante la vida intrauterina (Harada, 1995; Apostoli *et al.*, 2007).

El metilmercurio es además especialmente tóxico durante la infancia y puede afectar de forma importante al crecimiento. Si la intoxicación se produce en grandes cantidades, el metilmercurio actúa como un potente agente neurotóxico que produce retraso mental, parálisis cerebral, retraso de la movilidad y disfunción motora. Si la intoxicación es leve, ocasiona escaso desarrollo neuronal en algunas zonas del cerebro (Newland *et al.*, 2013). Los efectos tóxicos del metilmercurio también se manifiestan en el embarazo, debido a la capacidad que tiene el mercurio orgánico para atravesar la placenta. Durante el periodo prenatal el sistema nervioso central es muy sensible al efecto tóxico del metilmercurio y se ha visto una asociación entre la exposición a este tóxico durante la gestación y la toxicidad que aparece después en los niños, que se manifiesta por un déficit en el movimiento de los dedos y en el tiempo de reacción para la realización de una tarea (Jaim, 2017).

Los efectos tóxicos del mercurio orgánico se han estudiado también en otras especies distintas del hombre. Así, por ejemplo, en los peces, la toxicidad producida por mercurio orgánico ocasiona un descenso de la capacidad de resistencia y velocidad de nado. Este efecto se acentúa si en el ambiente marino se encuentran además otros contaminantes asociados como los microplásticos (Antão *et al.*, 2018).

Aunque no se conoce con exactitud cual o cuales son los mecanismos de acción por los que el mercurio en sus diferentes formas químicas produce diferentes efectos tóxicos en el organismo, se ha sugerido que el estrés oxidativo es el responsable de sus efectos deletéreos (Gutierrez *et al.*, 2006; Farina *et al.*, 2007; Wiggers *et al.*, 2008).

#### **1.1.4. Prevención y tratamiento de la intoxicación por mercurio.**

Para evitar que el mercurio siga siendo un problema de salud, habría en primer lugar que conseguir un compromiso a nivel mundial de los distintos países para proponer normas, limitar las emisiones de este metal y regular sus residuos y el tratamiento de los mismos. En este sentido, el Convenio de Minamata, en el que participan numerosos países, representa ya un intento

claro de proteger la salud humana y el medio ambiente de los efectos adversos del mercurio. Prácticamente todos los países de la Unión Europea han ratificado este convenio, excepto Portugal y Estonia, que se han comprometido a hacerlo en un futuro próximo. Este convenio pretende prohibir a partir del año 2020 el uso de mercurio en baterías, lámparas, relés y cosméticos. Se ha propuesto además que a partir de esa fecha se controlen las emisiones de mercurio de las plantas térmicas, cementeras y químicas.

Para prevenir las intoxicaciones por mercurio, es necesario también que se abandonen algunas prácticas de la vida cotidiana relacionadas con el uso de utensilios o productos que contienen mercurio. La Unión Europea ha presentado recientemente un plan para reducir la utilización de mercurio en amalgamas dentales, muy extendidas entre los estados miembros. En este plan se contempla la eliminación definitiva de las amalgamas dentales en el año 2030 (Reglamento 2017/852 del 17 de mayo del 2017). Algunos países también han llevado a cabo diferentes actuaciones para retirar los termómetros y esfigmomanómetros que contienen mercurio. En el 2008, el gobierno filipino, a través del Ministerio de Salud, ordenó la eliminación de los dispositivos médicos de mercurio en un plazo de dos años. Poco tiempo después, en el año 2010, fue la Unión Europea, quien limitó el uso de estos dispositivos. Ese mismo año, Argentina prohibió la producción, importación, venta o libre transferencia de estos dispositivos en todo su territorio. Un año más tarde, Chile estableció una serie de normas para promover el uso de termómetros y esfigmomanómetros digitales (OMS, 2017).

Por otra parte, la mejor manera de disminuir el riesgo de toxicidad por metilmercurio (la forma más tóxica de este metal) es reducir el consumo de alimentos procedentes del mar, que pueden contener altas concentraciones de este compuesto, y ello es sobre todo importante en aquellas poblaciones o grupos de población más expuestos. De hecho, muchos países han propuesto recomendaciones sobre el consumo de pescado en la población que están especialmente dirigidas a grupos vulnerables. En España, la Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria y Nutrición (ACOESAN) considera poblaciones sensibles a metilmercurio las constituidas por mujeres

embarazadas y en período de lactancia, y también la población infantil. Las recomendaciones para mujeres embarazadas o en periodo de lactancia, y niños menores de 3 años, consisten en evitar el consumo de las especies marinas más contaminadas: pez espada, tiburón, atún rojo y lucio. En los niños menores de 12 años se recomienda limitar el consumo de estos peces a 50 g/semana (González-Estecha *et al.*, 2015).

A pesar del esfuerzo que han hecho los diferentes países para establecer normas de uso y recomendaciones de consumo que eviten las intoxicaciones por mercurio, lamentablemente estas se siguen produciendo. Por lo tanto, sigue siendo importante la investigación sobre la prevención y/o el tratamiento de los efectos deletéreos del mercurio.

Se han utilizado desde hace tiempo sustancias antioxidantes sintéticas o agentes quelantes para tratar las intoxicaciones por mercurio por su capacidad para formar complejos con iones de metales pesados (Sears, 2013). Estos complejos, denominados quelatos, son solubles en agua, y se eliminan fácilmente del organismo. Entre los agentes quelantes que más se han utilizado figuran el ácido 2,3-dimercapto-propano sulfónico (DMSP) y el ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), conocido como Penicilamida (Bernhoft, 2011; Rafati-Rahimzadeh *et al.*, 2014; Bjørklund *et al.*, 2017). Se ha demostrado que ambos son eficaces para eliminar el mercurio en el hígado y el cerebro, y el DMSP ha mostrado tener más capacidad para disminuir los niveles de mercurio en estos órganos (Aaseth *et al.*, 1995; Bridges *et al.*, 2019). El uso de algunas de estas sustancias o agentes quelantes se ha asociado sin embargo con la aparición de algunos efectos secundarios como hipersensibilidad, hepatitis y problemas de autoinmunidad (Aaseth *et al.*, 2018). Por este motivo, es importante buscar otras estrategias para el tratamiento de las intoxicaciones producidas por mercurio.

En los últimos años, el desarrollo de nuevos alimentos o componentes alimentarios específicamente diseñados para mejorar una o varias funciones del organismo ha suscitado gran interés, ya que estos componentes, o los alimentos que los contienen, denominados respectivamente ingredientes o

alimentos funcionales, pueden utilizarse para mejorar la salud. En este contexto, la búsqueda de nuevos antioxidantes de origen natural, que podrían formar parte de la dieta, se considera una de las líneas prioritarias en la investigación sobre alimentos funcionales. No hay que olvidar que los efectos pro-oxidantes del mercurio se han relacionado con sus efectos deletéreos, y cabe por ello pensar que los compuestos antioxidantes derivados de alimentos puedan ser importantes como estrategia en la prevención y/o tratamiento de las intoxicaciones ocasionadas por metales pesados como el mercurio.

Desde hace años, se conoce el papel neuroprotector que tienen los elementos traza, tales como el zinc o el selenio (Cordero-Herrera *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016) que pueden estar presentes en los alimentos. El zinc y el selenio se ha visto que pueden resultar beneficiosos en la toxicidad ocasionada por el mercurio, y su mecanismo de acción se ha relacionado con la formación de complejos con este metal, lo que reduciría su biodisponibilidad (Newland *et al.*, 2013; González-Estecha *et al.*, 2015).

Hay que señalar también que existen algunos componentes con actividad biológica en los vegetales, denominados fitoquímicos, que han mostrado efectos positivos para la salud. Muchas de estas sustancias ayudan a la planta a sobrevivir y actúan como hormonas o enzimas. Otras, simplemente proporcionan color, olor y/o sabor a la planta. La función básica de los fitoquímicos es, en realidad, ayudar a la planta a protegerse de los radicales libres, insectos, parásitos y virus, y también ayudarla a protegerse del daño general que pueda sufrir a lo largo de su vida. En los últimos años, los fitoquímicos están recibiendo especial atención por sus efectos antioxidantes debido a los beneficios que aportan en patologías tales como el cáncer, la enfermedad cardiovascular o las enfermedades neurodegenerativas, (Gupta *et al.*, 2015). Muchos vegetales, posiblemente por los fitoquímicos que contienen, podrían representar en realidad una alternativa en las intoxicaciones por mercurio. En este contexto, los radicales libres y la generación excesiva de las especies reactivas de oxígeno disminuyeron gracias a los polifenoles del té y de schisandria (*Scisandria chinesis*) en ratas

tratadas con HgCl<sub>2</sub> (Liu *et al.*, 2011). También ha sido demostrado el efecto hepatoprotector del licopeno y las proantocianidinas, polímeros del flavonoide antocianidina, en estas intoxicaciones con HgCl<sub>2</sub> gracias a su capacidad de reducir el estrés oxidativo en los (Deng *et al.*, 2012). El propóleo, una sustancia que fabrican las abejas al mezclar en su boca cera y secreciones salivares, se ha investigado también como una posible alternativa natural en el tratamiento de la intoxicación por metales pesados gracias a su efecto antioxidante (Frozan *et al.*, 2013). Más aún, el tratamiento con la raíz de *Aralia elata*, planta conocida como “árbol de la vida”, se ha visto que disminuye los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) en ratas tratadas con cloruro de mercurio (Zang *et al.*, 2013). También se sabe que el alga *Chorella* y el *Coriandrum sativum*, conocido como cilantro, pueden depurar el mercurio del organismo (Rafati-Rahimzadeh *et al.*, 2014), y un extracto de la planta *Dendropanax morbifera* mejoró asimismo el estrés oxidativo que aparecía en el hipocampo de ratas expuestas a metilmercurio (Kim *et al.*, 2015). Más recientemente, se ha comprobado que la cúrcuma tiene un papel protector del tejido hepático en las intoxicaciones con mercurio. Agarwal *et al.*, (2018) demostraron que la administración de esta planta a ratas tratadas con mercurio era capaz de normalizar los marcadores del daño renal alterados en esta intoxicación. La cúrcuma mostraba en realidad una acción quelante que ayudaba a eliminar el mercurio.

También existen algunos compuestos de origen proteico que pueden ser útiles en las intoxicaciones por mercurio. Las proteínas son moléculas de gran valor nutricional que resultan imprescindibles para una alimentación adecuada. Además del valor nutricional que poseen, determinado por su composición y la adecuada digestibilidad de los aminoácidos constituyentes, las proteínas alimentarias pueden ejercer directamente ciertas actividades biológicas cuando se ingieren con la dieta. Hasta el momento, se han descrito numerosas proteínas, tanto de origen animal como de origen vegetal, que poseen actividad biológica, y en la actualidad se continúa la investigación de nuevas fuentes proteicas con potenciales propiedades beneficiosas para la salud (Nakamura *et al.*, 2013; Aspri *et al.*, 2018). Por ejemplo, se sabe que la leche contiene una serie de proteínas con actividad biológica, como las

inmunoglobulinas con efecto inmunomodulador, o la lactoferrina y la lactoperoxidasa, que tienen propiedades antimicrobianas (Nongonierma y FitzGerald, 2015; Ulfman *et al.*, 2018). La ovotransferrina y la lisozima del huevo también poseen actividad antimicrobiana (Kinoshita *et al.*, 2016), y las proteínas de soja ejercen efectos beneficiosos sobre la disminución de colesterol (Azadbakht, *et al.*, 2007; Richter *et al.*, 2017) Las proteínas de los alimentos se estudian también hoy día como materia prima para la obtención de péptidos bioactivos (Korhonen 2002). Estos péptidos bioactivos forman parte de la proteína completa, pero resultan inactivos dentro de la proteína original de la que proceden. Se definen como fragmentos, en la mayoría de las ocasiones de pequeño tamaño, de unos 2 a 20 aminoácidos, que se liberan usualmente *in vivo* por acción de las enzimas gastrointestinales cuando estas actúan sobre determinadas proteínas que pueden o no ser activas en sí mismas. Estos péptidos bioactivos pueden también obtenerse *in vitro* mediante el tratamiento con enzimas específicas, o producirse durante la elaboración de determinados alimentos gracias a algunos procesos que se requieren para producirlos, tales como la fermentación.

Uno de los métodos más extendidos para la obtención de péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias es la hidrólisis enzimática. Este método tiene especial relevancia pues es el método que se utiliza para la obtención del producto que se evaluará en esta Tesis Doctoral. El grado de hidrólisis proteica viene determinado por las condiciones utilizadas en la hidrólisis (relación enzima/sustrato, tiempo de incubación, pH y temperatura), y va a definir las características del hidrolizado y su posible bioactividad. El tipo de enzima, y la naturaleza de la misma, caracterizada por su especificidad, juegan también un papel esencial en la formación y el tipo de péptidos bioactivos producidos (Mullally *et al.*, 1997; Vermeirssen *et al.*, 2003). Las primeras enzimas utilizadas para la obtención de péptidos bioactivos a partir de proteínas de origen alimentario fueron proteasas pancreáticas de origen animal, si bien cada vez están adquiriendo mayor importancia las proteasas de otros orígenes (vegetal, bacteriano o fúngico). Una vez liberados los péptidos activos, estos pueden ejercer distintas actividades biológicas en el organismo y tener efecto sobre la salud humana. Representan además una

ventaja frente a proteínas de mayor tamaño, pues pueden tener mayor biodisponibilidad (Zhong, 2007; Chalamaiah *et al.*, 2012; García *et al.*, 2013; Bhat *et al.*, 2015; He *et al.*, 2015).

Desde su descubrimiento, en 1979, se han descrito péptidos derivados de proteínas alimentarias con diferentes actividades biológicas, entre las que destacan las siguientes actividades: antihipertensiva, antioxidante, hipocolesterolemica y antimicrobiana, entre otras (Möller *et al.*, 2008). Estos péptidos bioactivos se han encontrado en diferentes fuentes proteicas alimentarias como pescado, marisco, soja, girasol, leche, huevo, etc. (Li-Chan y Eunice, 2015). Recientemente, se ha descrito que las proteínas alimentarias y algunos componentes derivados de ellas son capaces de reducir la absorción de algunos metales pesados, gracias a su acción quelante, y podrían favorecer de este modo la excreción de mercurio del organismo (Sears, 2013; Ding *et al.*, 2015).

## **1.2. Hidrolizados y péptidos bioactivos derivados de proteínas de huevo**

Dentro de los alimentos ricos en proteínas ocupa un papel especial el huevo. Las proteínas del huevo se consideran de alto valor biológico. Este alimento tiene una composición en aminoácidos esenciales óptima y equilibrada, y se considera una fuente muy importante de nitrógeno en la dieta. El huevo juega por lo tanto un papel fundamental en la nutrición humana. Sus proteínas se encuentran distribuidas en todas las partes del huevo, en la cáscara, en la clara, y también en la yema, pero se concentran principalmente en la clara del huevo. La estructura y funcionalidad de las proteínas del huevo se ha estudiado ampliamente, probablemente por las características de este alimento y por la diversidad de proteínas que contiene, con muy diferentes propiedades físicoquímicas (masas moleculares y puntos isoelectrónicos) (Guérin-Dubiard *et al.*, 2006). Lo cierto es que el huevo y sus proteínas resultan especialmente atractivos e interesantes para la búsqueda de nuevas moléculas biológicamente activas. Pese a ello, relativamente pocos estudios han abordado la producción de péptidos bioactivos a partir de proteínas de

huevo, y no existe evidencia clínica de su utilización en la literatura reciente. En el momento actual, se han descrito péptidos derivados de hidrolizados de proteínas de huevo con diferentes actividades biológicas a partir de todos sus componentes proteicos (membranas de la cáscara, clara y yema), aunque la mayoría de los estudios se centran en hidrolizados y péptidos derivados de las proteínas de la clara de huevo.

La membrana de la cáscara del huevo se encuentra adherida a la cara interna de dicha cáscara y se caracteriza por su alto contenido en proteínas, especialmente colágeno (Huang *et al.*, 2010). Se han desarrollado distintos métodos para extraer esta membrana y su extracción ha permitido algunas aplicaciones farmacéuticas y cosméticas gracias a las propiedades químicas y mecánicas que la misma presenta y a su bajo coste (Park *et al.*, 2001). Más aún, a pesar de su limitada solubilidad, lo que dificulta su utilización para la producción de péptidos bioactivos, se han descrito algunos hidrolizados con actividad biológica a partir la membrana de la cáscara de huevo, siendo la actividad antioxidante de estos hidrolizados una de las más investigadas (Mendis *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2010; Santana *et al.*, 2016; Jain y Anal, 2017).

Entre las proteínas que contiene la yema de huevo se encuentra la fosvitina, que se caracterizan por su elevada actividad antioxidante y quelante de metales (Lu y Baker, 1987). Por este motivo, la mayoría de los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de este subproducto se han desarrollado buscando esta actividad antioxidante (Park *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2010; Zambrowicz *et al.*, 2015). Sin embargo, hasta la fecha no se ha llevado a cabo ningún estudio experimental con ellos *in vivo*.

La clara de huevo es la parte más importante de este alimento de cara a la obtención de hidrolizados proteicos y péptidos bioactivos. Existen algunos estudios que utilizan proteínas aisladas de la clara de huevo, como ovoalbúmina (Grootaert *et al.*, 2017), lisozima (Carrillo *et al.*, 2016; Plat *et al.*, 2017) u ovotransferrina (Shen *et al.*, 2010), para la obtención de péptidos bioactivos. Sin embargo, lo más frecuente es realizar la hidrólisis a partir de la

clara de huevo completa (Yu *et al.*, 2011; Nimalaratne *et al.*, 2015; Garcés-Rimón *et al.*, 2016b). Se han descrito de hecho péptidos con actividad antihipertensiva derivados de clara de huevo, cuyo efecto se ha demostrado además en animales de experimentación. El efecto antihipertensivo de estos péptidos se ha asociado principalmente con un mecanismo vasodilatador (Fujita *et al.*, 1995a; Fujita *et al.*, 1995b; Matoba *et al.*, 1999; Miguel *et al.*, 2007a), y con su capacidad para inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Miguel *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2014). También se han descrito péptidos derivados de clara de huevo con propiedades antioxidantes que pueden neutralizar radicales libres (Tsuge *et al.*, 1991; Jung *et al.*, 2001; Dávalos *et al.*, 2004), inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDLs) (Dávalos *et al.*, 2004), y producir por ello efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico (Manso *et al.*, 2008), o disminuir el estrés oxidativo asociado a la inflamación (Huang *et al.*, 2010). Recientemente, también se han descrito péptidos derivados de la clara de huevo con actividad antidiabética capaces de inhibir la enzima  $\beta$ -glucosidasa (Yu *et al.*, 2012). En estas investigaciones, algunos autores han optado por el uso de varias enzimas de forma consecutiva, con diferentes tiempos de incubación, para aumentar el grado de hidrólisis de la proteína de la clara de huevo y facilitar la liberación de secuencias bioactivas (You y Wu, 2011; Rao *et al.*, 2012a; Jahandideh *et al.*, 2016; Jahandideh *et al.*, 2017).

Nuestro grupo de investigación obtuvo un hidrolizado de clara de huevo, mediante el tratamiento de este subproducto con pepsina durante 3 horas, que presentaba actividad inhibidora de la ECA (IECA) y actividad antioxidante *in vitro*. De este hidrolizado, se aislaron e identificaron varios péptidos que presentaron actividad IECA (Miguel *et al.*, 2004) y/o una potente actividad antioxidante (Dávalos *et al.*, 2004). Estudios posteriores demostraron que este hidrolizado y algunos de sus péptidos derivados también ejercían actividad vasodilatadora (Miguel *et al.*, 2006; Miguel *et al.*, 2007b). También se comprobó la eficacia antihipertensiva de este hidrolizado de clara de huevo en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) tras su administración aguda y crónica, por vía oral (Miguel *et al.*, 2005; Miguel *et al.*, 2006; Miguel *et al.*, 2007). Estos estudios en animales hipertensos permitieron también relacionar

el efecto antihipertensivo con la inhibición de la ECA (Miguel *et al.*, 2007), con una reducción del estrés oxidativo y una reducción en los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos (TG) (Manso *et al.*, 2008).

Recientemente, Garcés-Rimón *et al.* (2013), llevaron a cabo un estudio para obtener un hidrolizado derivado de la clara de huevo que presentase varias actividades biológicas de forma simultánea de forma que pudiera ser útil para controlar las complicaciones asociadas al síndrome metabólico. En este estudio se concluyó que el hidrolizado más prometedor era el que se obtenía tratando con pepsina la clara de huevo durante 8 horas. Las pruebas *in vitro* demostraron que este hidrolizado podía presentar simultáneamente actividad antioxidante, inhibidora de la ECA e hipocolesterolemica (Garcés-Rimón *et al.* 2016a), y se demostró también que contenía las mismas secuencias de péptidos que previamente se habían encontrado en el hidrolizado obtenido tratando la clara de huevo con pepsina durante 3 horas (Miguel *et al.*, 2004; Dávalos *et al.*, 2004). El hidrolizado obtenido por Garcés-Rimón *et al.* fue además capaz de reducir el estrés oxidativo y la inflamación en ratas Zucker obesas, un modelo de obesidad genética, así como la esteatosis característica de estas ratas (Garcés-Rimón *et al.*, 2016b). Este hidrolizado también mostró actividad moduladora de la microbiota intestinal en estos animales revirtiendo la disbiosis que aparece en su intestino (Requena *et al.*, 2017). El hidrolizado de clara de huevo tratado con pepsina durante 8 horas será el que se evaluará en esta Tesis Doctoral.

Teniendo en cuenta los siguientes hechos 1) que en los efectos tóxicos que ocasiona la exposición a mercurio en el organismo hay subyacente un aumento del estrés oxidativo, 2) que uno de los mecanismos de acción antioxidante se produce a través de la quelación de iones metálicos y 3) que existen numerosos estudios realizados a partir de la hidrólisis de proteínas de la clara de huevo que contienen péptidos bioactivos con actividad antioxidante, en esta Tesis Doctoral se plantea que la obtención de péptidos antioxidantes derivados de la hidrólisis de las proteínas de clara de huevo podrían presentar actividad quelante de metales pesados y ello podría constituir una alternativa prometedora para la prevención y/o el tratamiento de

los efectos ocasionados por la exposición a mercurio o a otros metales, y una alternativa más segura a la utilización de quelantes sintéticos al carecer de efectos secundarios.

**HIPÓTESIS Y  
OBJETIVOS**

## **2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis**

En base a la información reseñada, la hipótesis para este trabajo es la siguiente: “el consumo del hidrolizado que se obtiene tratando la clara de huevo con pepsina durante 8 horas, puede atenuar las complicaciones asociadas al estrés oxidativo inducido por la exposición a mercurio”.

### **2.2. Objetivos**

Para demostrar la hipótesis anterior, este trabajo tuvo el siguiente objetivo: Evaluar el efecto del hidrolizado de clara de huevo anteriormente mencionado en un modelo animal de ratas Wistar expuestas durante 60 días a bajas concentraciones de mercurio. Este objetivo general se desglosó en distintos objetivos más concretos, reflejados en el protocolo general descrito en el apartado “Material y Métodos”, que permitieron investigar el efecto de este hidrolizado sobre algunas de las posibles alteraciones neurológicas y cardiovasculares que puede ocasionar la exposición a mercurio en estos animales.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Obtención del hidrolizado de clara de huevo**

Para la obtención del hidrolizado de clara de huevo, se utilizó clara de huevo pasteurizada comercial (Huevos Pitas Pitas, Madrid). La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en un baño termostático con agitación según se describe en Garcés-Rimón *et al.*, (2015b). Para ello, en primer lugar, se rebajó el pH de la clara de huevo a 2 añadiendo HCl concentrado de grado alimentario. Posteriormente, se añadió la enzima pepsina (BC pepsin, Biocatalyst, Reino Unido), previamente diluida en un poco de agua destilada, (E/S = 2/100; p/p). La hidrólisis tuvo lugar durante 8 horas, a 37 °C. Una vez pasado este tiempo, se procedió a la inactivación de la enzima. Para ello, se elevó el pH del hidrolizado hasta 7 añadiendo NaOH 10 M de grado alimentario. Por último, el hidrolizado inactivado se centrifugó a 4 °C y 2.500 g durante 15 minutos. Una vez centrifugado, se recogió el sobrenadante resultante y se liofilizó. Este liofilizado se mantuvo congelado a -20 °C hasta su utilización.

#### **3.2. Protocolo experimental.**

Los experimentos con animales de esta Tesis Doctoral se diseñaron intentando minimizar en lo posible el número de animales utilizados y su sufrimiento, de acuerdo con la Regulación de la Comisión Europea para el cuidado y empleo de animales de experimentación (86/609/CEE) y el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Todos los protocolos experimentales fueron además aprobados por el Comité Ético de la Universidad Rey Juan Carlos (CEI 39/2012).

Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron 40 ratas Wistar macho de 8-9 semanas de vida con un peso comprendido entre 200-250 g (Harlan Laboratories, Barcelona, España). Los animales llegaron al animalario de la Universidad Rey Juan Carlos y, después de un período de adaptación, se

dividieron en 4 grupos de 10 ratas cada uno. Se dispusieron en jaulas transparentes (40 cm x 28 cm x 25 cm) con un lecho de viruta que se reemplazaba cada semana, y se mantuvieron en condiciones controladas con una temperatura ambiental estable de 23 °C, humedad del 60% y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales se alimentaron *ad libitum* durante todo el estudio con dieta sólida estándar (A04, SAFE, Francia), y bebieron agua corriente filtrada que se renovaba periódicamente.

El tratamiento de cada grupo se describe a continuación:

Al primer grupo, el grupo Control (C), se le administró diariamente, mediante sonda orogástrica, 1 ml de agua destilada, y se le inyectó, también diariamente, 1 ml de una solución de suero salino al 0,9 % por vía intramuscular. Por lo demás, este grupo se sometió al mismo protocolo que el resto de los grupos.

Al segundo grupo, el grupo Hidrolizado (H), se le administró diariamente, mediante sonda orogástrica, 1 ml de una solución de hidrolizado de clara de huevo diluida en agua en una concentración que permitía administrar en ese volumen 1 g/kg/día del producto. Esta solución se ajustaba semanalmente en función del peso de los animales según el protocolo descrito por Miguel *et al.* (2007b). A los animales de este grupo también se les administraba diariamente, por vía intramuscular, 1 ml de una solución de suero salino al 0,9 %. Este grupo se sometió al mismo protocolo que los grupos anteriores.

Al tercer grupo, el grupo Mercurio (Hg), se le administró diariamente, mediante sonda orogástrica, 1 ml de agua destilada, y se le inyectó, también diariamente, por vía intramuscular, cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) diluido en 1 ml de solución salina. La primera dosis de HgCl<sub>2</sub> fue de 4,6 µg/ y las siguientes de 0,07 µg/kg hasta finalizar el tratamiento.

Por último, al cuarto grupo, el grupo Mercurio + Hidrolizado (Hg+H), se le administró diariamente, mediante sonda orogástrica, 1 ml de una solución

de hidrolizado de clara de huevo diluida en agua en una concentración que permitía administrar en ese volumen 1 g/kg/día del producto. Esta solución se ajustaba semanalmente en función del peso de los animales según el protocolo descrito por Miguel *et al.*, (2007b). A este grupo se le inyectó, también diariamente, por vía intramuscular, cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) diluido en 1 ml de solución salina. La primera dosis de HgCl<sub>2</sub> fue de 4,6 µg/kg y las siguientes de 0,07 µg/kg hasta finalizar el tratamiento.

Durante todo el periodo experimental, que duró 60 días, se controlaron semanalmente, y también al final del tratamiento, el peso corporal, la ingesta sólida, la ingesta líquida y la presión arterial de los animales. Además, al inicio del tratamiento, después de 30 días de tratamiento y, al final del mismo, se llevaron a cabo en los animales de los diferentes grupos los siguientes estudios de comportamiento: el test de filamentos de Von Frey, el test de estimulación plantar, el test del anillo y la medida de la actividad locomotora espontánea. Se realizaron también medidas de la presión arterial indirecta semanalmente y también al final del tratamiento.

El último día del periodo experimental, las ratas se mantuvieron en ayuno durante 16 horas en jaulas metabólicas. Tras este periodo en la jaula metabólica los animales se anestesiaron administrándoles por vía *i.p.* una combinación de ketamina y xilazina (87 mg/kg y 13 mg/kg, respectivamente), y se sometieron a un procedimiento invasivo para medir la presión arterial de forma directa. Seguidamente, los animales se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron muestras de sangre. Una muestra de sangre total se utilizó para llevar a cabo la determinación de los niveles de mercurio, y el resto se centrifugó a 4 °C y 4.500 g, durante 10 minutos, y el plasma obtenido se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta su uso para distintas determinaciones bioquímicas, tales como: malonildialdehído (MDA), capacidad antioxidante (ORAC), triglicéridos, colesterol, glucosa, factor de necrosis tumoral (TNF-α) y la actividad de la ECA. Posteriormente, se extrajeron y pesaron diferentes órganos y tejidos. En primer lugar, se extrajo una muestra de la aorta para poder realizar los experimentos de reactividad vascular en baños y los experimentos de determinación de anión superóxido

(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en este tejido. Después, se extrajeron muestras de cerebro, corazón, hígado, riñón, páncreas, tejido adiposo epididimal (grasa blanca), tejido adiposo interescapular (grasa parda) y colon, que se utilizaron para determinar la concentración de mercurio en estos tejidos, así como para realizar algunos estudios histológicos. Se recogió asimismo una muestra del ciego con las heces que estaban allí almacenadas para posibles estudios futuros de la microbiota que no se incluyen esta Tesis Doctoral. Las muestras de los distintos tejidos se congelaron hasta su posterior análisis excepto aquellas que se iban a utilizar para estudios histológicos que se almacenaban en formaldehído al 10%.

Todas las medidas y determinaciones realizadas para obtener los resultados que se presentan en esta Tesis Doctoral figuran en la Tabla 1. En esta tabla también se mencionan las correspondientes técnicas y métodos utilizados, así como los apartados donde se describe cada uno de ellos en el apartado de Metodología.

**Tabla 1.** Medidas y determinaciones realizadas en los grupos de animales del estudio

	Método	Apartado
Sensibilidad mecánica	Test de los filamentos de Von Frey	5.3.1.
Sensibilidad térmica	Test de estimulación plantar	5.3.2.
Catalepsia	Test del anillo	
Actividad locomotora espontánea	Actímetro	5.3.4.
Presión arterial indirecta y directa	Manguito en la cola Técnica invasiva (Ábalo <i>et al.</i> 2011)	5.3.3.
Reactividad vascular en aorta	Baños de órganos tradicionales	5.3.6.
Producción de anión superóxido en aorta	Fluorescencia tras la oxidación de la dihidroetidina (Martín <i>et al.</i> ,2012)	5.3.7.
MDA	Ensayo modificado del ácido tiobarbitúrico (Rodríguez-Martínez y Ruíz Torres, 1992)	5.3.8.
ECA	Método fluorimétrico (Silverstein <i>et al.</i> ,2007)	5.3.9.
ORAC	Método fluorimétrico (Manso <i>et al.</i> , 2008)	5.3.10.
Glutatión reducido	Método fluorimétrico monoclorobimane (Kamencic <i>et al.</i> ,2000)	5.3.11.
TNF- $\alpha$	Test de Elisa (kit comercial)	5.3.12.
Colesterol total, triglicéridos y glucosa	Métodos enzimático-colorimétricos (kits comerciales)	5.3.13
Determinación de mercurio en sangre y tejidos	Espectrometría de absorción atómica (Técnica de vapor en frío)	5.3.14.
Estudios histológicos	Tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica	5.3.15

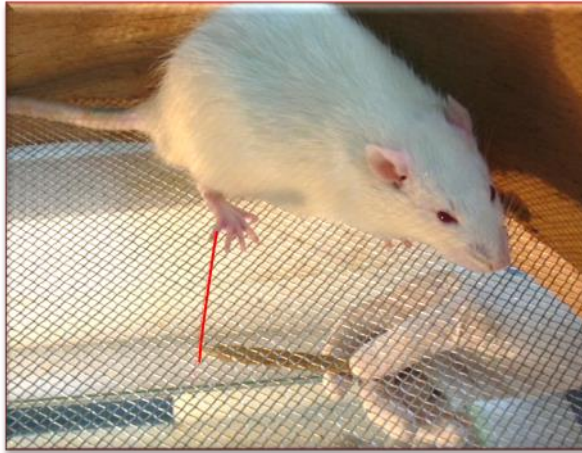
MDA= Malonildialdehído, ECA= Enzima convertidora de angiotensina, ORAC= Capacidad de absorción de radicales de oxígeno, TNf- $\alpha$ = Factor de necrosis tumoral alfa

### 3.3. Determinaciones y técnicas utilizadas

#### 3.3.1. Medida de la sensibilidad mecánica. Método de Von Frey.

La sensibilidad mecánica se evaluó mediante el umbral de retirada a los filamentos de Von Frey (Fox *et al.*, 2001; Vera *et al.*, 2007). Se usaron filamentos de nylon de distinto grosor y longitud, capaces por lo tanto de generar una presión de intensidad variable (4, 8, 10, 15, 26, y 60 gramos; Bioseb Instruments, Estados Unidos), y se aplicaron directamente sobre la superficie plantar de cada una de las patas traseras de los animales. No se utilizaron presiones superiores a 60 gramos, puesto que esta presión era suficiente para elevar (*per se*) la pata del animal.

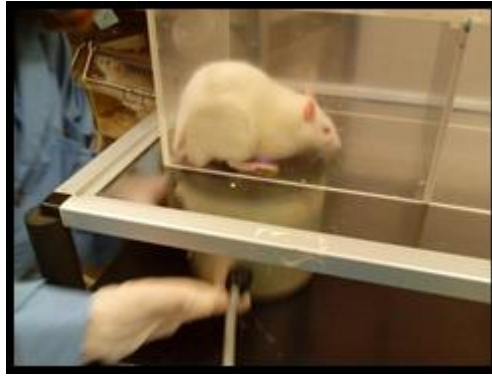
Para su acostumbramiento, los animales se situaron en un cedazo metálico durante 10 minutos cada día durante 2 días antes de realizar el test. El día de la prueba se colocaron en el mismo cedazo metálico, y para su realización se situó cada filamento (comenzando por el de menor presión) de forma perpendicular a la superficie de las patas, aplicando siempre una fuerza suficiente para curvar ligeramente el filamento, como se muestra en la Figura 2. Con cada filamento esta operación se realizó 5 veces en cada pata trasera durante aproximadamente 1 segundo, dejando al menos 3 segundos entre cada aplicación. Se consideró una respuesta positiva cuando el animal retiraba la pata brusca e inmediatamente, al menos en tres de las cinco ocasiones (60%). Este valor se aceptó como el umbral táctil (Cabezos *et al.*, 2010). Los resultados se expresaron como medidas de presión en gramos (g).



**Figura 2:** Imagen representativa de la realización del test de los filamentos de Von Frey. El filamento debe colocarse perpendicular a la superficie plantar de las patas traseras hasta que se curve ligeramente para ejercer la presión máxima.

### 3.3.2. Medida de la sensibilidad térmica. Test de estimulación plantar

Después de evaluar la sensibilidad mecánica se evaluó la sensibilidad térmica mediante el test plantar (Ugo Basile, Comerio VA, Italia) (Bennett & Xie, 1988; Vera *et al.*, 2007). Para este test, los animales se situaron en un compartimento plástico sobre una superficie de cristal y se colocaba un foco de calor en la superficie de sus patas traseras (Figura 3). Se evaluó el tiempo que tardaban las ratas en retirar la pata, momento en que se interrumpía el haz luminoso y se paraba el temporizador del test. Se evaluó el tiempo de retirada tres veces y la media de estos datos se utilizó para el análisis. El dispositivo tiene un tiempo de corte de 30 segundos, para evitar así que el animal sufra lesiones.



**Figura 3:** Realización del test plantar. El foco de calor se aplica en la superficie plantar de los animales. Cuando el animal retira la pata, el foco se interrumpe y el dispositivo registra de manera automática el tiempo de retirada de la pata.

### 3.3.3. Medida de la catalepsia. Test del anillo

La catalepsia se midió utilizando una modificación del “test del anillo” (Fox *et al.*, 2001). Las ratas se pusieron en una posición forzada, apoyadas sobre sus patas delanteras en un vaso de precipitado que estaba rodeado de goma para proteger al animal de eventuales lesiones, de manera que las ratas sólo podían tocar el borde del dispositivo (Figura 4). Se midió el tiempo que las ratas tardaban en moverse, cada animal repetía el test 5 veces con un tiempo entre ensayos de, al menos, 5 minutos. El tiempo de corte se estableció en 30 segundos.



**Figura 4:** Posición forzada en la que se sitúa a los animales para realizar el “test del anillo”. En ella se evalúa el tiempo que tarda el animal en cambiar de posición (retirar las patas traseras o soltar las delanteras).

### 3.3.4. Medida de la actividad locomotora espontánea. Actímetro

Para medir la actividad locomotora espontánea se utilizó un actímetro con células fotoeléctricas (Cibertec S.A., Madrid, Spain) (Vera *et al.*, 2007; Rizzetti *et al.*, 2016b) (Figura 5). Los animales se situaron en las jaulas y se registró el número de veces que cortaban el haz de luz de las células fotoeléctricas durante un periodo de 30 minutos. Se registró la actividad total (número de cortes) durante los primeros 10 minutos y durante los 30 minutos que duró todo el experimento.



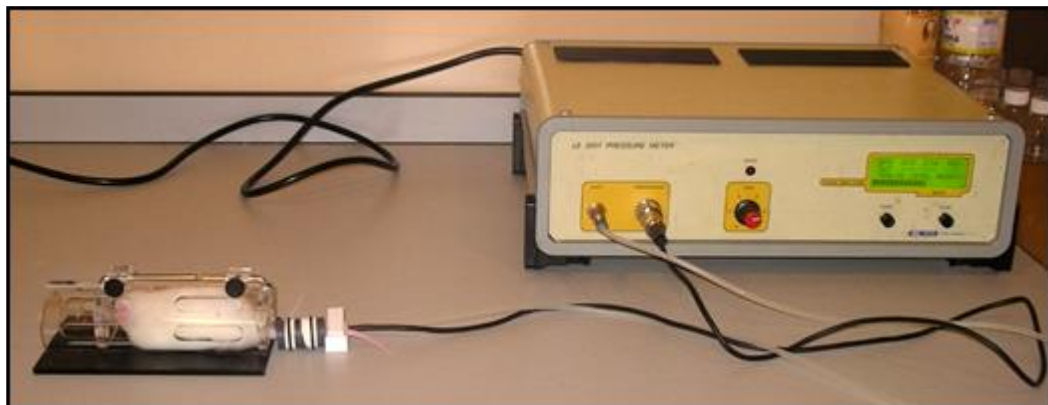
**Figura 5:** Evaluación de la actividad locomotora en el actímetro. Se observa la jaula y el dispositivo de células fotoeléctricas que se sitúa alrededor y que mide el movimiento del animal. Este dispositivo mide el número de veces que el animal corta los haces fotoeléctricos durante 30 minutos.

### 3.3.5. Medida de la presión arterial

#### *Presión arterial indirecta*

La medida indirecta de la presión arterial sistólica (PAS) se obtuvo con un equipo NIPREM 645 (Cibertec, Madrid, España) mediante una modificación de la técnica del manguito en la cola (*tail cuff*), originalmente descrita por Buñag (Buñag, 1973) (Figura 6). El método que se utiliza para obtener la medida indirecta de la presión arterial en las ratas con esta técnica

es similar al método que se utiliza para medir esta variable con un esfigomanómetro en humanos, pero en el caso de las ratas, estos animales deben exponerse a una fuente de calor próxima a 37 °C antes de obtener la medida para facilitar la dilatación de su arteria caudal. Una vez que se consigue una buena señal de pulso, la obtención de valores fiables de presión arterial sistólica (PAS) solo depende de la sensibilidad del microprocesador para detectar los cambios en el nivel de la onda de pulso. Los valores de la PAS derivan del análisis de la amplitud de la onda de pulso. La PAS se alcanza cuando se detecta nuevamente la onda de pulso tras colapsar la arteria caudal. Para obtener el valor de la PAS se realizaron 10 medidas, y se obtuvo la media de todas ellas. Además, para asegurar la fiabilidad de la medida, los animales se acostumbraron al procedimiento al menos una semana antes de llevar a cabo el ensayo en cuestión.



**Figura 6.** Técnica del manguito en la cola para la medida indirecta de la presión arterial en ratas (Buñag, 1973).

### *Presión arterial directa*

La medida directa de la presión arterial se obtuvo mediante una técnica invasiva que permite obtener estas medidas tras implantar un catéter en la arteria carótida del animal (Ábalo *et al*, 2011). Para ello, en primer lugar, los animales se anestesiaron administrando por vía *i.p.* una mezcla de ketamina y xilacina (87 mg/kg y 13 mg/kg, respectivamente). Una vez anestesiado el animal, se colocó en posición decúbito supino sobre la cama de operación, se realizó una incisión en la zona ventromedial del cuello y se procedió a separar

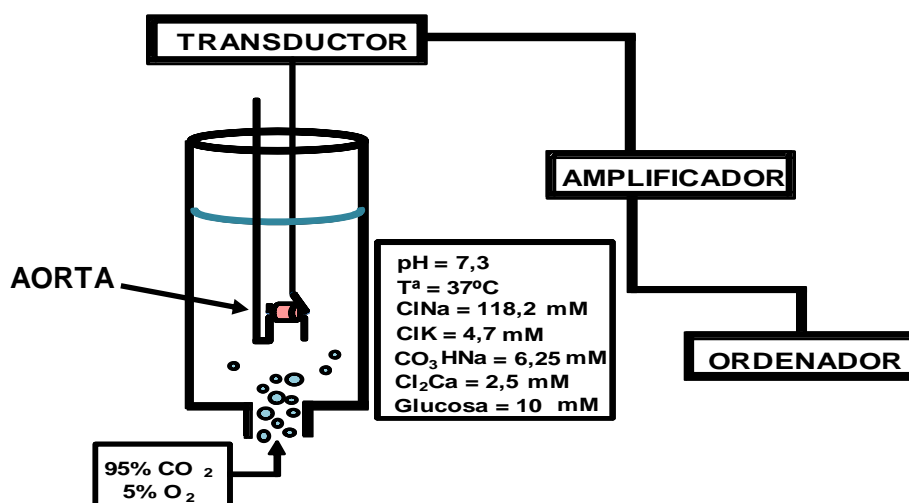
y cortar la piel, dejando un campo quirúrgico en forma de ojal lo suficientemente amplio para las manipulaciones posteriores. A través del ojal, se separaron los paquetes musculares hasta lograr acceder al paquete vásculo-nervioso formado por la arteria carótida y el nervio vago. Se separó dicho nervio y, una vez aislada la arteria, se pasaron por debajo de ésta dos hilos, ligando uno de ellos en la parte distal, y dejando iniciado otro nudo con el otro hilo en la parte proximal. Una vez preparada así la carótida, se colocó una pinza de arteria cerca del nudo que se había iniciado en la parte proximal. Esta pinza tenía como misión interrumpir la circulación para permitir realizar una pequeña incisión en la arteria, a través de la cual se introdujo una cánula de cloruro de polivinilo que se sujetó a la arteria mediante un doble nudo realizado con el hilo de sutura que se había colocado en la parte proximal. Cuando la cánula estuvo bien sujeta, se soltó la pinza para reestablecer de nuevo la circulación. Esta cánula se encontraba a su vez acoplada a una jeringuilla que contenía heparina sódica (50 U/mL), y este compuesto se inyectó lentamente en un volumen de suero fisiológico de 0,4 ml con el fin de evitar la coagulación sanguínea durante el ensayo. Asimismo, la cánula estaba conectada a un transductor de presión, conectado a su vez a un sistema amplificador (PowerLab/4e system, PanLab S.L., Barcelona, España) que nos permitía registrar los valores de la presión arterial. Se registraron de manera continuada durante 10 minutos los siguientes parámetros: presión arterial media, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica y frecuencia cardíaca.

### **3.3.6 Estudios de la reactividad vascular en aorta**

Una vez extraída la aorta torácica, se depositó en una solución de Krebs-Henseleit (KH) que contenía (mM): 118 NaCl, 4,75 KCl, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 1,19 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,54 CaCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub> y 11 glucosa (pH = 7,4). Esta solución se encontraba a 4° C y estaba oxigenada con una mezcla de gas carbógeno (una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>).

La aorta se limpió inicialmente de tejido adiposo y se dividió en anillos o segmentos de 3-4 mm de longitud aproximadamente. A continuación, los

anillos o segmentos vasculares se montaron en baños de órganos que contenían 5 ml de KH a 37 °C, burbujeado continuamente con gas carbógeno, según el procedimiento que describimos a continuación. Por un extremo del anillo, se introducía un gancho de acero inoxidable inmóvil de 0,6 mm de diámetro, que servía para fijar la preparación en el baño de órganos. Por el otro extremo, se introducía otro gancho de acero inoxidable de 0,6 mm de diámetro que estaba unido a un hilo acoplado a un transductor de fuerza (TSD125 BX8, Biopac Systems, Inc. Santa Bárbara, Estados Unidos), a su vez conectado a un amplificador (PowerLab/4e Program; PanLab S.L., Barcelona, España). Este sistema permitía obtener medidas digitales de la contracción o relajación arterial, así como la visualización de las mismas a través de la pantalla de un ordenador (Figura 7).



**Figura 7:** Esquema del ensayo con anillos de aorta de ratas Zucker en baños de órganos.

Los anillos se sometieron a una tensión inicial de 2 g, que se reajustó periódicamente hasta que el tejido se estabilizó. Las preparaciones se estabilizaron aproximadamente 45 minutos después de llevar a cabo lavados periódicos cada 15 minutos con solución KH. Una vez estabilizado el tejido arterial, se provocó su contracción exponiéndolo a una concentración 75 mM de KCl, lo que permitió comprobar la funcionalidad arterial. Cuando se alcanzó la altura máxima de esta contracción (aproximadamente 30 minutos después de la administración de KCl), las preparaciones se lavaron con solución KH

hasta que recuperaron la tensión basal inicial que tenían antes de administrar KCl.

La presencia de endotelio funcional se determinó por la capacidad de las preparaciones de arteria, previamente contraídas con fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ), para relajarse en respuesta a la administración de acetilcolina (10  $\mu\text{M}$ ). Se consideraron preparaciones con endotelio funcional aquellas que se relajaban con esta dosis de acetilcolina más de un 80 % del tono previo conseguido con fenilefrina. Las preparaciones que alcanzaron una relajación inferior al 80% no se utilizaron en este estudio. Una vez comprobada la presencia de endotelio en las preparaciones, estas se lavaban varias veces con KH para retirar todos los fármacos del baño de órganos. Con el objetivo de evaluar la disfunción endotelial de las preparaciones de aorta, estas se contraían con fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ), y después se administraban dosis acumulativas de acetilcolina que proporcionaban concentraciones de este agente en el baño de órganos comprendidas entre 0,001  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ .

La respuesta contráctil de fenilefrina se evaluó en preparaciones de aorta con endotelio mediante la realización de curvas de contracción a fenilefrina (0,1 nM – 3,5 mM) en cada grupo experimental.

Para evaluar la relajación independiente del endotelio, se realizaron curvas de relajación a nitroprusiato sódico (SPN) (0,1 nM – 3,5 mM) en las arterias que habían sido previamente contraídas con fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) de los animales de los distintos grupos experimentales.

La respuesta contráctil de fenilefrina en aortas desprovistas de endotelio se realizó una vez se eliminó físicamente el endotelio de las aortas a estudiar. Para eliminar el endotelio se frotó la luz del vaso con una aguja metálica. La ausencia de endotelio se confirmó en aquellas preparaciones en las que no había relajaciones de acetilcolina (10  $\mu\text{M}$ ) mayores al 10% después de sufrir contracciones previas con fenilefrina. Para evaluar la contracción independiente del endotelio se realizaron las curvas de contracción a fenilefrina (0,1 nM – 3,5 mM) en cada grupo experimental y se compararon

con las curvas de contracción a fenilefrina (0,1 nM – 3,5 mM) realizadas en aortas con endotelio.

Por otra parte, en algunas preparaciones que habían mostrado funcionalidad endotelial, se administraron dosis acumulativas de fenilefrina que proporcionaban concentraciones de este agente en el baño de órganos comprendidas entre 0,001  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. El protocolo para conseguir las curvas dosis respuesta de contracción con fenilefrina se llevó a cabo en ausencia (curva control) o presencia de distintos fármacos. Los fármacos se administraban en el baño de órganos 30 minutos antes de comenzar la administración de fenilefrina.

Los fármacos que se añadían al baño de órganos en las preparaciones tratadas fueron los siguientes: el inhibidor no específico de la óxido nítrico sintasa (NOS) N( $\omega$ )-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (100  $\mu$ M), el inhibidor de la NADPH oxidasa, apocinina (0,3 mM), la enzima superóxido dismutasa (SOD) (150 U/mL), el inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa (COX) indometacina (1  $\mu$ M), el inhibidor selectivo de la COX-2 NS398 (1  $\mu$ M) y el bloqueante de los receptores AT1 de angiotensina II, losartán (10 mM).

Para comparar el efecto de los distintos fármacos en las respuestas a Phe en las preparaciones de los diferentes grupos de animales, se calculó la diferencia del área bajo la curva (dABC), y los resultados se expresaron como el porcentaje de dABC.

### **3.3.7 Medida de la producción de anión superóxido en aorta.**

La producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ) en aorta se determinó mediante la técnica de fluorescencia emitida tras la oxidación de la dihidroetidina (DHE) tal como se ha descrito previamente (Martín *et al*, 2012) y como se señala brevemente a continuación.

La dihidroetidina se oxida en presencia de  $O_2^-$  a bromuro de etidio, que se intercala entre el ácido desoxirribonucleico (ADN) de las células, emitiendo

una fluorescencia roja, lo que permite analizar la producción del referido anión *in situ*. El bromuro de etidio se excita a 546 nm y emite fluorescencia en el espectro entre 600-700 nm.

Los segmentos o anillos congelados de aorta se cortaron en secciones transversales de 14  $\mu\text{m}$  de espesor y se colocaron en una lámina de vidrio. Las secciones de aorta se equilibraron en un tampón de ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etano-sulfónico (HEPES)-Krebs con la siguiente composición (nM): 130 NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 0,24 MgCl<sub>2</sub>, 8,3 HEPES y 11 de glucosa a pH 7,4. Se aplicó tópicamente una solución tampón que contenía DHE (2 $\mu\text{M}$ , 30 min, 37 °C) en cada sección de tejido, en una cámara húmeda protegida por la luz a 37 °C, y se observaron mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axioskop 2, Jena, Alemania, 40 aumentos, excitación 546  $\mu\text{m}$  y emisión 600-700  $\mu\text{m}$ ). Para cuantificar la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio se visualizó con un microscopio confocal Leica TCS SP2, usando un objetivo de inmersión de 40 X. Se calculó el valor medio de fluorescencia en la pared vascular usando el software de análisis de imagen Metamorph para PC (Molecular Devices Corporation). El análisis se llevó a cabo asignando el valor 1 a la intensidad de fluorescencia obtenida en el grupo de las ratas tratadas con mercurio.

### 3.3.8. Determinación de malondialdehído en plasma y tejido cerebral

Para determinar el malondialdehído (MDA) en el plasma de las ratas se utilizó el ensayo modificado del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Rodríguez-Martínez y Ruíz Torres, 1992). Para ello, el plasma se mezcló con ácido tricloroacético al 20 % en 0,6 M HCl (1:1 v/v), y las muestras se mantuvieron en hielo 20 minutos para precipitar los componentes del plasma, evitando así posibles interferencias. Las muestras se centrifugaron a 1.500 g durante 15 minutos. A continuación, se añadió el TBA (Sigma) (120 nM en Tris 260 mM y pH 7) al sobrenadante en una proporción de 1:5 (v/v) y la mezcla se calentó a 95 °C durante 60 minutos. La reacción entre MDA y TBA produce un pigmento estable de color rojo-rosáceo, con un coeficiente de absorción molar de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  en el espectro visible (532 nm). En este aducto, la

proporción MDA:TBA es de 1:2. Para la medida de la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy, Estados Unidos), controlado por el software Gen 5 1.06. Las concentraciones de MDA en plasma se expresaron como nmol de MDA/ml de plasma.

Para realizar las medidas de MDA en el tejido cerebral las muestras se homogeneizaron en tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,4 (Sigma) y 4 °C, utilizando un homogeneizador de vidrio (Figura 8). Posteriormente, los homogeneizados se centrifugaron a 5.000 g y 4 °C durante 15 minutos, y se recogieron alícuotas de los sobrenadantes, que se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. Con los homogeneizados de tejido cerebral se procedió como con el plasma para la determinación de MDA, y los resultados de la concentración de este metabolito en el cerebro se expresaron como nmol de MDA/mg proteína.



**Figura 8.** Homogeneización del tejido cerebral con un homogeneizador de vidrio.

### **3.3.9. Medida de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina en plasma**

La actividad de la ECA en plasma se midió con un método fluorimétrico desarrollado por Silverstein *et al*, 1976 y modificado posteriormente por Miguel *et al*, 2007, según se explica a continuación. Una muestra de 3  $\mu$ l de plasma se incubó durante 15 minutos a 37°C por triplicado con 40  $\mu$ l de tampón borato, que contenía una concentración 5 mM del sustrato sintético de la ECA

hipuril-histidil-leucina (Hip-His-Leu) (Sigma). La reacción se paró añadiendo 190  $\mu$ l de NaOH 0,35 N. El producto generado (His-Leu), se midió fluorimétricamente después de 10 minutos de incubación con 100  $\mu$ l de una solución de o-ftaldialdehído al 2 % en metanol. Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo a 37 °C en un lector de placas Fluostar Optima (BMG Labtech, Offenburg, Alemania), a una longitud de onda de 350 nm de excitación y de 520 nm de emisión. Se usaron placas multipocillo de poliestireno negras (Biogen Científica, España). La curva de calibrado se hizo usando ECA de pulmón de conejo (Sigma). Los resultados se expresaron como mU de ECA/ml de plasma.

### 3.3.10. Determinación de la capacidad antioxidante del plasma

La capacidad antioxidante del plasma se evaluó mediante un ensayo que determina la actividad neutralizadora de radicales peroxilo (Oxygen radical absorbance capacity = Capacidad para absorber radicales libres de oxígeno, ORAC). Se llevó a cabo según el método descrito por Ou *et al.* en 2001 y posteriormente modificado por Manso *et al.* en 2008.

Para el ensayo se realizó una mezcla de 200  $\mu$ l que contenía, en el caso de la curva patrón, 20  $\mu$ l de Trolox (6-dihidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) a diferentes concentraciones (1-8  $\mu$ M), en el caso del blanco 20  $\mu$ l de solución PBS (pH 7,4), y en el caso de las muestras 20  $\mu$ l de plasma. Se añadieron a cada una de las muestras anteriores 120  $\mu$ l de fluoresceína disódica (70 nM) (Sigma Aldrich, Madrid, España) y 60  $\mu$ l de 2,2-azobis-(2-metilpropionamidina) (12 mM) (Sigma Aldrich, Milwaukee, Estados Unidos). Todas las muestras, tanto la curva patrón, como el blanco y las diferentes muestras de plasma, se realizaron por triplicado. Las muestras y los patrones se disolvieron siempre en PBS. La fluoresceína disódica, que actuó como sustrato oxidable, se preparó en el mismo tampón y se almacenó en condiciones de oscuridad a 4 °C durante un máximo de 4 semanas. La 2,2-azobis-(2-metilpropionamidina), productora de radicales de oxígeno, se preparó en PBS antes del análisis. El análisis se realizó en microplacas negras de 96 pocillos (BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Alemania), y la

lectura se realizó en un lector de placas (BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Alemania) con un filtro de excitación de 490 nm y un filtro de emisión de 520 nm, a una temperatura de 37 °C durante 97 minutos. Para el registro de los datos obtenidos se utilizó el programa Fluorstar Control. Los valores de ORAC se expresaron como  $\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{l plasma}$ .

### **3.3.11. Determinación del glutatión reducido en tejido hepático**

Los niveles de glutatión reducido en el hígado se determinaron por el método fluorimétrico monoclorobimane (Kamencic *et al.*, 2000). El volumen final de las muestras para las determinaciones del ensayo eran siempre de 100  $\mu\text{l}$ , que contenía 90  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de tejido hepático o 90  $\mu\text{l}$  de la curva patrón de glutatión reducido (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Alemania), en una solución de PBS (pH 7,4) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a diferentes concentraciones (0,001-10 nM) y 10  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía glutatión S-transferasa (1 U/ml), obtenida de hígado de caballo (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), y monoclorobimane (Fluka Biochemical, Suiza) (1 mM). Todas las muestras, tanto el patrón como las demás muestras de sobrenadante de tejido, se realizaron por duplicado. El análisis se realizó en microplacas negras de 96 pocillos (BMG Lab Technologies GmbH, Offenburg, Alemania), la placa se incubó a temperatura ambiente protegida de la luz durante 30 minutos. Durante este tiempo tiene lugar una reacción en la que el glutatión se une al monoclorobimane, generando un complejo fluorescente. Esta reacción está catalizada por la glutatión S-transferasa. Transcurrido dicho tiempo, se procedió a cuantificar la concentración del complejo, y por lo tanto de glutatión, mediante un fluorímetro (Multiskan Ascent, Labsystems, España). Los valores de glutatión reducido en hígado se expresaron como  $\mu\text{mol glutatión}/\mu\text{g}$  de proteína.

### **3.3.12. Determinación de los niveles del factor de necrosis tumoral en plasma**

La determinación plasmática de las concentraciones del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) se realizó mediante el test TNF- $\alpha$  Elisa, un

inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de este factor. Para ello se utilizó un kit de Elisa directo específico para rata (Invitrogen, Gran Bretaña) y se siguieron las indicaciones del fabricante. Se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy). Los valores de TNF- $\alpha$  se expresaron como pg/ml plasma.

### **3.3.13. Determinación de triglicéridos, colesterol y glucosa en plasma**

El estudio de los valores de triglicéridos, colesterol total y glucosa en plasma se realizó mediante kits comerciales basados en métodos enzimático-colorimétricos (Spinreact S.A/S.A.U, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy). Los valores de colesterol total y triglicéridos se expresaron como mg/dl plasma y los valores de glucosa se expresaron también como mg/dl plasma.

### **3.3.14. Determinación de los niveles de mercurio en sangre y tejidos**

Se determinaron los niveles de mercurio en sangre total y en los diferentes órganos y tejidos (sangre, aorta, corazón, cerebro, hígado, riñón, tejido adiposo blanco y tibia). Debido a la baja sensibilidad del mercurio para su determinación por el método tradicional de absorción atómica a la llama, se ha utilizado un método de análisis por absorción atómica por la técnica de vapor en frío para conocer la concentración de mercurio en las muestras de tejido. Este método es el más utilizado para la determinación de mercurio (Panichev y Panicheva, 2015). Estas determinaciones se realizaron en el servicio de espectrometría atómica de la universidad de Málaga mediante un analizador SMS 100, Perkin Elmer (Inc. Shelton) mediante los principios de descomposición térmica, amalgamación y absorción atómica descritos en el método EPA 7473 (DT- CVAAS). Para la determinación del mercurio total, se desarrolló una línea de calibrado en un rango entre 8 y 10 puntos de un modelo de mercurio de 100 ppm. Los resultados se expresaron como mercurio total, ng/ml de sangre o ng/g de tejido.

### 3.3.15. Estudios histológicos

Para llevar a cabo los diferentes estudios histológicos de los tejidos extraídos de los animales del estudio, dichos tejidos se fijaron en solución de formaldehído al 10% en PBS durante un mínimo de 48 horas, y se procesaron para su inclusión en parafina en un procesador automático Thermo Shandom (Thermo Fisher Scientist, Estados Unidos). Los tejidos fijados, una vez embebidos en parafina, se cortaron con un micrótomo Microm (MICROM International GmbH, Alemania) en secciones de 5  $\mu\text{m}$ . A continuación, las preparaciones de tejido se tiñeron con hematoxilina-eosina (H & E) para su estudio general.

La observación se realizó con un microscopio Zeiss Axioskop 2 (Zeiss MicroImaging GmbH, Alemania) equipado con el programa de análisis de imagen AxioVision 4,6 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemania). Este programa se empleó para evaluar en el tejido hepático, el número de células con “abalonamiento”, que adquieren una forma redondeada, que les confiere un aspecto vacío, y que determinan el daño hepático. Los resultados de la histología hepática se expresaron en unidades arbitrarias. También se evaluó mediante este programa, el número de glomérulos congestionados o malformados en tejido renal. Los resultados de la histología del riñón se expresaron en unidades arbitrarias. El programa se empleó para determinar el tamaño medio de los islotes de Langerhans en el tejido pancreático, y los resultados se expresaron en  $\mu\text{m}^2$ . En el tejido adiposo se contabilizaron, por medio de este programa, el número medio de células adiposas presentes por unidad de área. Los resultados se expresaron como el número de células por sección observada mediante un objetivo de 40 aumentos por  $\mu\text{m}^2$ . El daño histológico en el colon se evaluó utilizando una escala semicuantitativa de 0 a 3 que se asignaba a cada sección de tejido considerando la pérdida de la arquitectura de la mucosa (evaluado de 0 a 3, de ausente a grave) la extensión del infiltrado de células inflamatorias (de 0 a 3, de ausente a transmural) (Vera *et al.*, 2017). Los resultados de la histología del colon se expresaron en unidades arbitrarias.

### 3.3.16. Estudio de inmunohistoquímica

Para el estudio inmunohistoquímico se utilizaron secciones de la piel de la pata (derecha trasera) y de tejido adiposo blanco de 5  $\mu\text{m}$  de espesor se lavaron con PBS-Tween (PBS con 0,05 % de Tween 20) (Calbiochem, Darmstadt, Alemania). Después las muestras se incubaron durante 10 minutos con peróxido de hidrógeno 3 % (vol/vol) para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena, y a continuación las muestras se bloquearon con suero bovino fetal al 3 % (vol/vol) durante 30 minutos, para minimizar las uniones no específicas del anticuerpo primario. Posteriormente las secciones de piel se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos: monoclonal para rata contra la enzima hidrolasa-1 carboxil-terminal ubiquinona (UCH-L1) (1:50, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, Estados Unidos) con el objetivo de localizar los mecanorreceptores de adaptación lenta de tipo 1 que se encuentran en el complejo celular de Merkel; monoclonal para rata contra C/EBR-proteína homóloga (CHOP)(1:50, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, Estados Unidos) y anticuerpo monoclonal para rata contra PPAR- $\gamma$  (1:50, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, Estados Unidos) para el tejido adiposo. Tras la incubación, las muestras se volvieron a lavar con PBS-Tween. Para la detección se utilizó un anticuerpo secundario unido a peroxidasa (Masvision, Master Diagnóstica, Granada, España). La cuantificación positiva de los complejos celulares de Merkel se realizó mediante la visualización de 10 campos por muestra en un microscopio Zeiss Axioskop 2 (Zeiss MicroImaging GmbH). Las muestras se contratiñeron con hematoxilina y se montaron en un portaobjetos mediante un sistema Eukitt (O.Kindler GmbH &Co., Alemania). Para determinar el nivel de tinción no específica, las muestras se incubaron sin el anticuerpo primario como control negativo.

### 3.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los animales se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) para un mínimo de 8 animales. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías, seguido del test *post hoc* de Bonferroni. Se consideró siempre significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . Para llevar a cabo el análisis estadístico se empleó el programa estadístico Graph-Pad Prism versión 7.00 para Windows (Graph-Pad Software, San Diego, California, Estados Unidos).

## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral. Su presentación seguirá el siguiente orden. En primer lugar, se presentarán los resultados de peso e ingesta obtenidos en los animales de los distintos grupos durante el periodo de experimentación. Después, se expondrán los resultados de los estudios de comportamiento y los de presión arterial. A continuación, expondremos los resultados de reactividad vascular obtenidos en las aortas de las ratas y, finalmente, se presentarán los resultados de los diferentes análisis bioquímicos e histológicos que se han realizado en el plasma y en los tejidos de los animales de los distintos grupos del estudio.

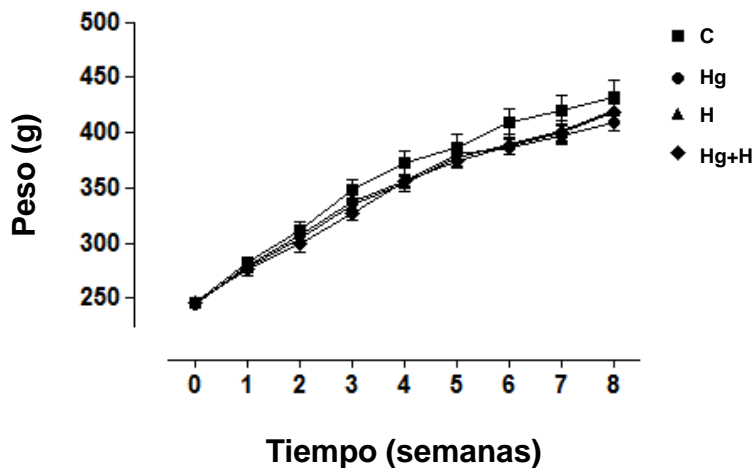
### 4.1 Resultados de ingesta y peso corporal

La ingesta de agua y comida no presentó diferencias significativas a lo largo del período experimental en los animales de los distintos grupos; por eso no se representan los valores semanales correspondientes a estas variables. La tabla x muestra la ingesta media diaria de agua y comida registrada en las ratas.

**Tabla 3.** Ingesta media de agua y comida de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó ANOVA de una vía para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

	C	H	Hg	Hg+H
Ingesta agua (ml/día)	42,91 $\pm$ 1,37	39,93 $\pm$ 1,00	42,59 $\pm$ 1,35	42,65 $\pm$ 1,67
Ingesta sólida (g/día)	22,23 $\pm$ 1,14	21,07 $\pm$ 1,05	21,11 $\pm$ 1,06	21,40 $\pm$ 1,09

La Figura 9 muestra el peso corporal de los animales de los distintos grupos durante los 60 días de tratamiento. Todos animales ganaron peso a lo largo del período experimental, y no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales.



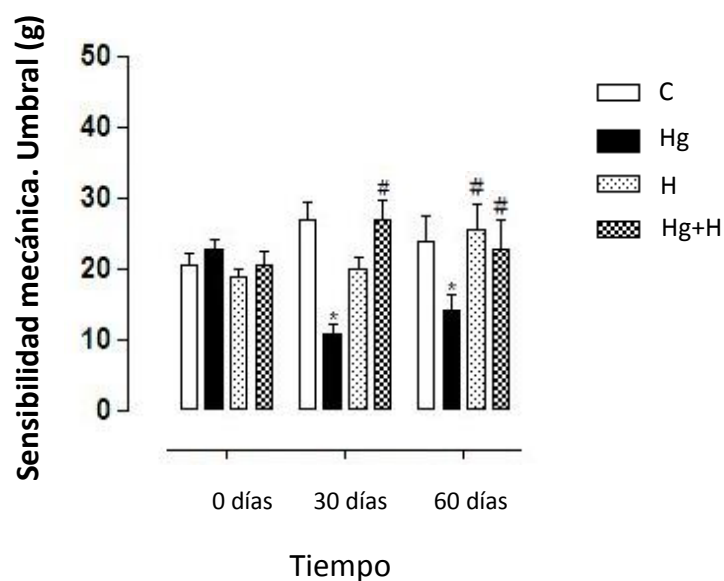
**Figura 9.** Evolución del peso corporal de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó ANOVA de dos vías para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

## 4.2. Resultados de los test comportamentales

### 4.2.1. Test de los filamentos de Von Frey. Sensibilidad mecánica

Los animales del grupo control no mostraron cambios significativos en el umbral de sensibilidad mecánica a lo largo del periodo experimental. Tampoco se observaron cambios en la sensibilidad mecánica en los animales del grupo tratado con el hidrolizado de clara de huevo. Los animales tratados con mercurio de forma crónica presentaron, sin embargo, una disminución significativa del umbral de sensibilidad mecánica y se observaron diferencias significativas respecto a los animales del grupo control, tanto a los 30 como a los 60 días de tratamiento (Figura 10). La administración del hidrolizado de clara huevo aumentó el umbral de sensibilidad mecánica de los animales

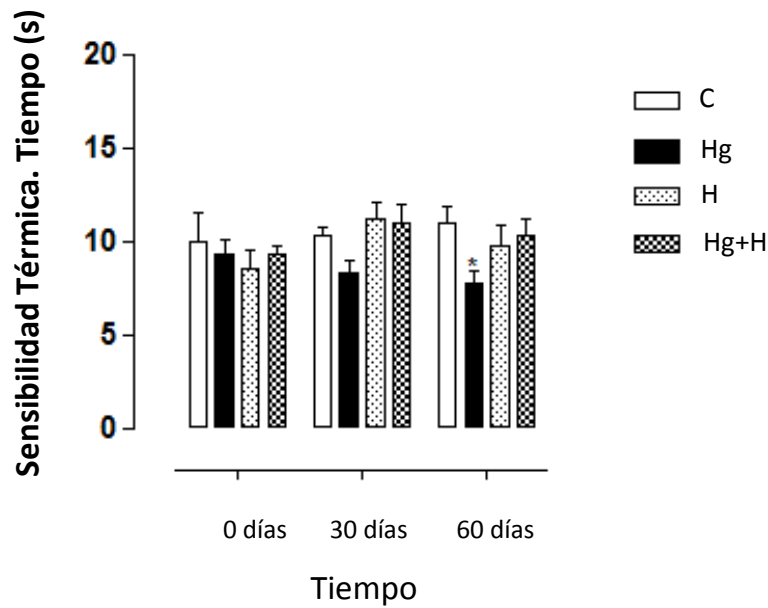
tratados con mercurio y este grupo de animales presentó valores similares a los obtenidos en los animales del grupo control.



**Figura 10.** Umbral de sensibilidad mecánica obtenido al inicio, a los 30 días y a los 60 días de tratamiento de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó ANOVA de dos vías para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs ratas control (C); # $P < 0,05$  vs ratas tratadas con mercurio (Hg).

#### 4.2.2. Test de estimulación plantar. Sensibilidad térmica

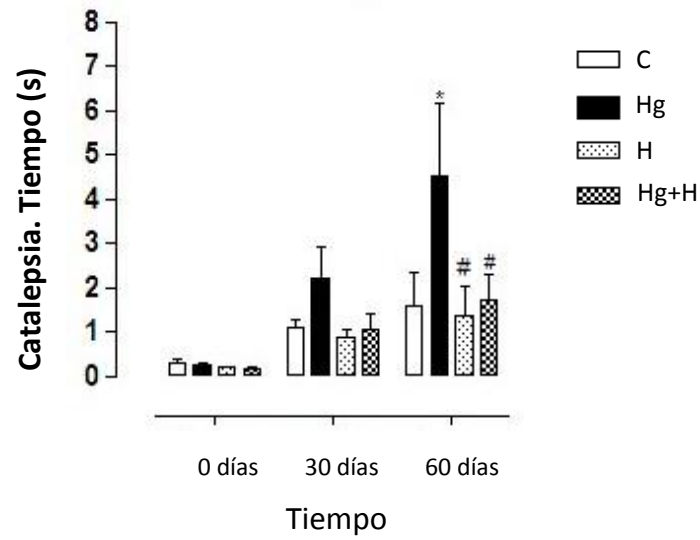
Los animales de los grupos control e hidrolizado de clara de huevo no mostraron alteraciones en los valores de sensibilidad térmica a lo largo del periodo de estudio. El grupo de animales tratado con mercurio mostró sin embargo una disminución progresiva de la sensibilidad térmica a lo largo del tratamiento, y esta disminución fue significativa después de 60 días de tratamiento respecto a la sensibilidad térmica observada en los animales del grupo control. No se observaron cambios significativos en la sensibilidad térmica de los animales del grupo tratado conjuntamente con mercurio e hidrolizado de clara de huevo a lo largo del período experimental, los valores de esta variable en los animales de ese grupo fueron siempre semejantes a los valores obtenidos en los animales del grupo control. (Figura 11).



**Figura 11.** Sensibilidad térmica obtenida al inicio, a los 30 días y a los 60 días de tratamiento de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó ANOVA de dos vías para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs ratas control (C).

#### 4.2.3. Test del anillo. Catalepsia

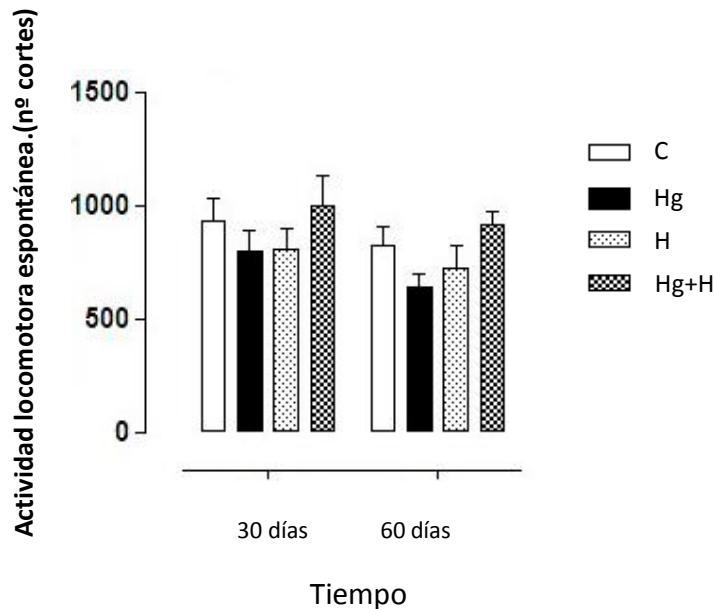
Cuando se realizó el test para evaluar la catalepsia, los animales del grupo control y los animales del grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo no mostraron cambios a lo largo del periodo experimental, y no se observaron modificaciones significativas en los tiempos que permanecieron erguidos (tiempo de permanencia) durante la realización del ensayo (Figura12). Los tiempos de permanencia de los animales del grupo tratado con mercurio fueron, sin embargo, mayores que los del grupo control, y se observaron diferencias significativas después de 60 días de tratamiento. El hidrolizado de clara de huevo disminuyó significativamente el tiempo de permanencia en las ratas tratadas con mercurio, llegando incluso a normalizar este parámetro en los animales, de forma que los animales que recibieron ambos tratamientos mostraron tiempos de permanencia similares a los de los animales del grupo control.



**Figura 12.** Catalepsia obtenida al inicio, a los 30 días y a los 60 días de tratamiento de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó ANOVA de dos vías para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs ratas control (C); # $P < 0,05$  vs mercurio (Hg).

#### 4.2.4. Actímetro. Actividad locomotora espontánea

No se observaron diferencias significativas en la actividad locomotora espontánea entre los animales de los distintos grupos (Figura 13).



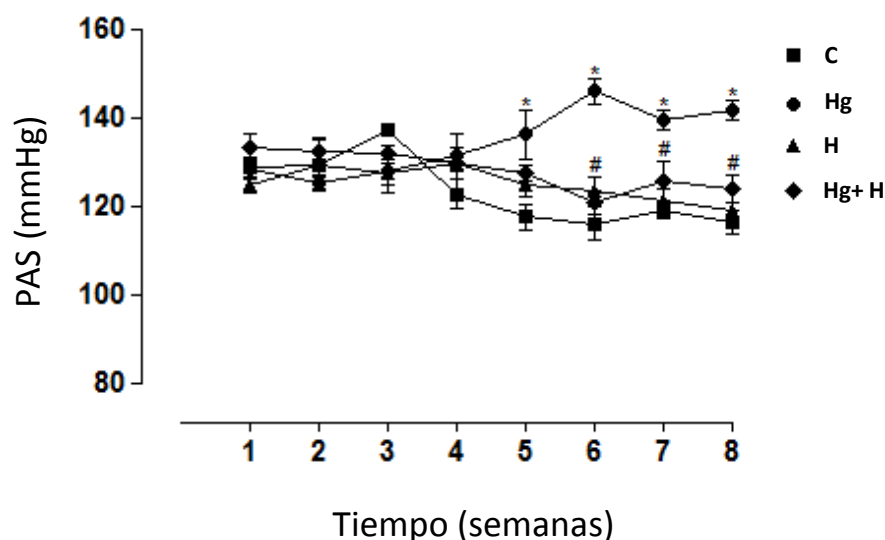
**Figura 13.** Actividad locomotora espontánea obtenida a los 30 días y a los 60 días de tratamiento de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó ANOVA de dos vías para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

### 4.3. Resultados de presión arterial

#### 4.3.1. Presión arterial indirecta

En la Figura 14 se representan los valores semanales de la PAS obtenidos de forma indirecta a lo largo del periodo experimental. Las ratas del grupo control no mostraron cambios significativos en los valores de la PAS a lo largo de todo el período experimental. Los valores de PAS de las ratas tratadas con el hidrolizado de clara de huevo fueron estables a lo largo del período experimental, y muy semejantes a los de las ratas del grupo control. Las ratas tratadas con mercurio mostraron sin embargo un incremento de los

valores de PAS que resultó significativo a partir de la quinta semana de tratamiento (Figura 14). La administración del hidrolizado de clara de huevo impidió el incremento de presión arterial que ocasionaba el tratamiento con mercurio en las ratas, de forma que los animales que recibieron ambos tratamientos mostraron valores de PAS similares a los de los animales del grupo control.

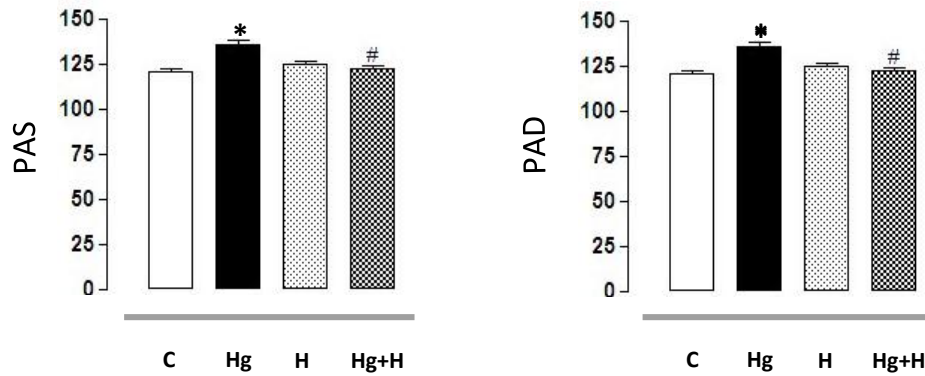


**Figura 14.** Medida indirecta de la PAS, en mmHg, obtenida de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó ANOVA de dos vías para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs. ratas control (C); # $P < 0,05$  vs. ratas tratadas con mercurio (Hg).

#### 4.3.2. Presión arterial directa

En la Figura 15 se presentan los valores de presión arterial directa. En este estudio las ratas del grupo control mostraron valores de PAS de  $120,1 \pm 1,9$  mm Hg y valores de PAD de  $122,0 \pm 2,2$  mm Hg. El grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo mostró valores similares en la PAS y en la PAD a los observados en los animales del grupo control. Sin embargo, los animales tratados con mercurio mostraron valores de PAS y PAD significativamente mayores que los de las ratas control. Este aumento en los valores de PAS y de PAD disminuyó de forma significativa en el grupo de ratas tratadas con

mercurio y que consumieron además hidrolizado de clara de huevo, y estos valores fueron similares al grupo control.



**Figura 15:** Presión arterial basal (en mm Hg) obtenida 10 minutos después de la canulación de la carótida de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 5 animales. Se utilizó una ANOVA de una vía para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs. ratas control (C); # $P < 0,05$  vs. ratas mercurio (Hg).

#### 4.4. Resultados de la reactividad vascular en aorta

##### 4.4.1. Respuesta contráctil a KCl

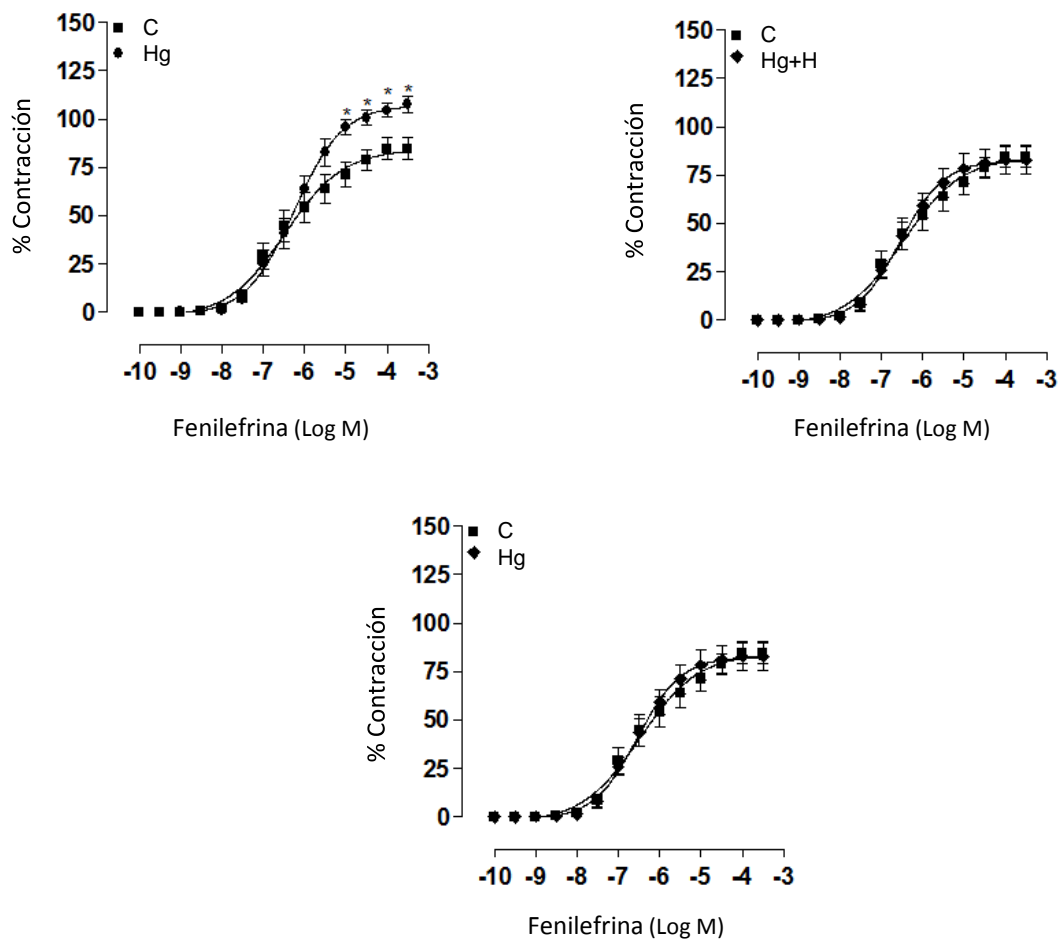
En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos tras evaluar la respuesta a KCl en los anillos de aorta de las ratas de los diferentes grupos experimentales. No se observaron diferencias significativas en la contracción a KCl en ninguno de los grupos del estudio.

**Tabla 4.** Respuesta contráctil a KCl (75 mM) expresada en gramos en los anillos de aorta de las ratas de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó una ANOVA de una vía para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

<b>Grupo</b>	<b>Media<math>\pm</math> EEM</b>
<b>C</b>	1,88 $\pm$ 0,14
<b>Hg</b>	1,92 $\pm$ 0,17
<b>H</b>	1,87 $\pm$ 0,17
<b>Hg+H</b>	1,85 $\pm$ 0,28

#### 4.4.2. Respuesta contráctil a fenilefrina

La respuesta vasoconstrictora inducida por fenilefrina en la aorta de los animales del grupo control fue dosis dependiente. No se apreciaron diferencias significativas entre las curvas de contracción con fenilefrina producidas en los anillos de aorta del grupo control y las producidas en los anillos de aorta de las ratas tratadas con el hidrolizado de clara de huevo (Figura 16). Por el contrario, la contracción dosis dependiente que ocasionó la fenilefrina en las aortas de los animales tratados con mercurio fue mayor que la correspondiente contracción a este agonista en las aortas del grupo control. El grupo de las ratas tratadas con mercurio al que se suministró, además, hidrolizado de clara de huevo, no presentó sin embargo el aumento en la respuesta contráctil a fenilefrina que se había observado en el grupo tratado únicamente con mercurio, y los valores de la contracción a este agonista no mostraron diferencias cuando se comparaban las aortas de los animales tratados con mercurio y con el hidrolizado de clara de huevo y las aortas de los animales control.

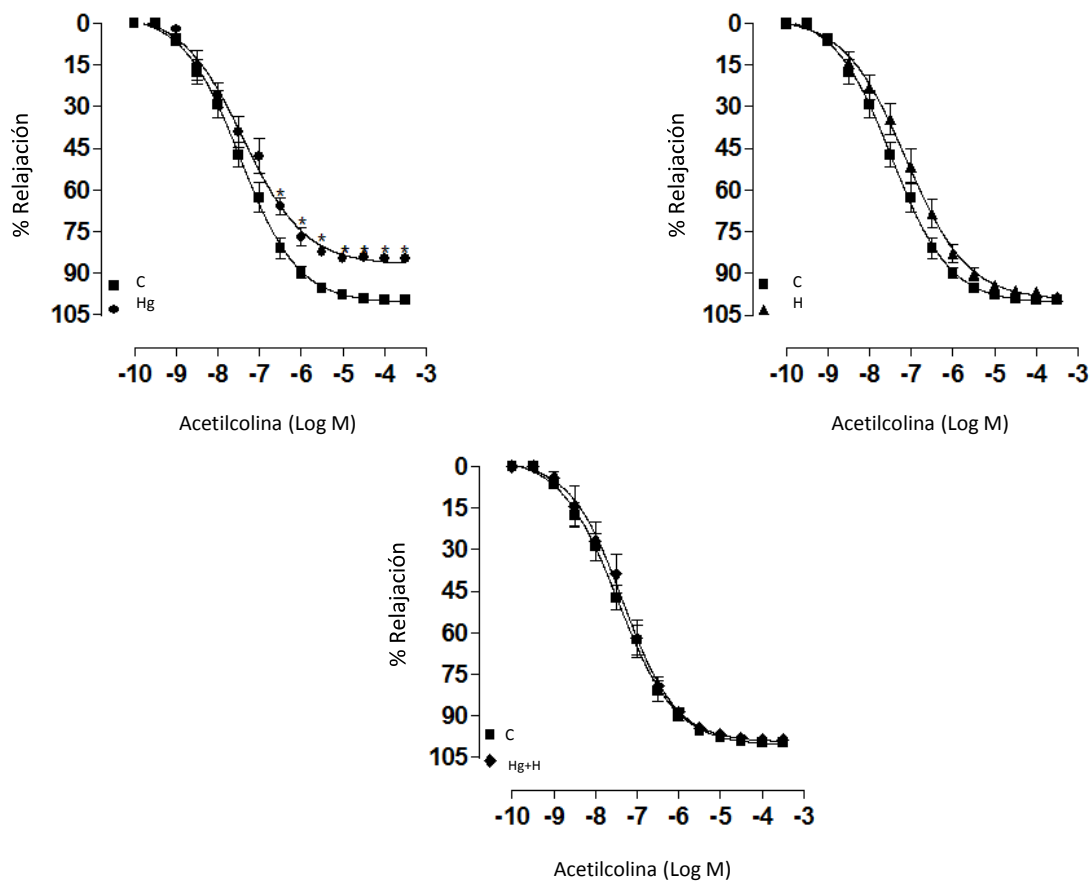


**Figura 16.** Contracción inducida por distintas concentraciones de fenilefrina en preparaciones de anillos de aorta de las ratas de los diferentes grupos experimentales, expresada como porcentaje de contracción producida por 75 mM KCl: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H) y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de dos vías para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs. ratas control (C);

#### 4.4.3. Respuesta vasodilatadora a Acetilcolina

La administración de acetilcolina en los anillos de aorta precontraídos con fenilefrina de los animales del grupo control originó una respuesta vasodilatadora concentración-dependiente. No se observaron diferencias significativas en la respuesta vasodilatadora cuando se compararon las aortas de los animales tratados con el hidrolizado de clara huevo y las aortas del grupo control. Por el contrario, la respuesta vasodilatadora de acetilcolina en

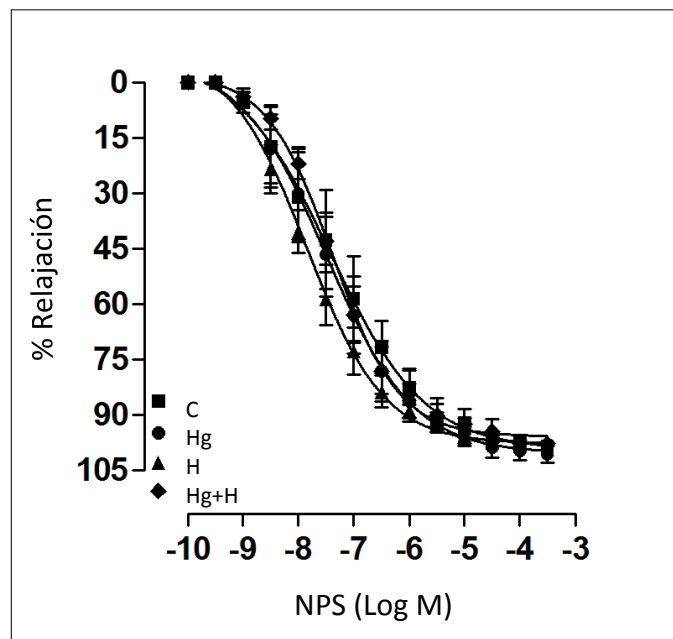
las arterias de los animales del grupo tratado con mercurio fue significativamente menor que la correspondiente respuesta vasodilatadora observada en las arterias de las ratas del grupo control. El grupo de animales tratado con mercurio y con hidrolizado de clara de huevo no mostró, sin embargo, diferencias significativas en la respuesta vasodilatadora de sus arterias al administrar acetilcolina, cuando se comparó esta respuesta con la correspondiente respuesta vasodilatadora obtenida en el grupo control (Figura 17).



**Figura 17:** Porcentaje de relajación producido por distintas concentraciones de acetilcolina en preparaciones de anillos de aorta precontraídos con fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ) de las ratas de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H) y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de dos vías para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs. ratas control (C);

#### 4.4.4. Respuesta vasodilatadora a nitroprusiato sódico

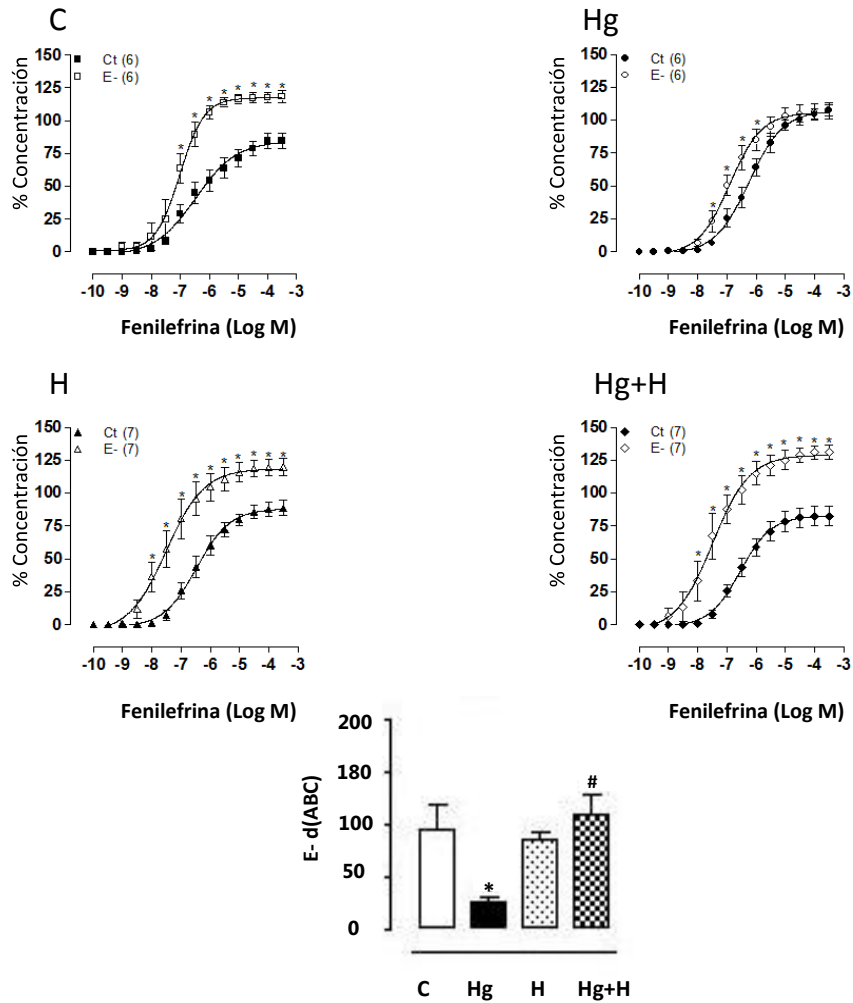
La administración de dosis crecientes de nitroprusiato sódico en los anillos de aorta de los animales de los diferentes grupos ocasionó una relajación concentración-dependiente. No se observaron diferencias significativas en la respuesta vasodilatadora a nitroprusiato sódico al comparar las aortas de los distintos grupos experimentales, como puede observarse en la Figura 18.



**Figura 18.** Porcentaje de relajación producido por distintas concentraciones de nitroprusiato sódico (NPS) en preparaciones de anillos de aorta precontraídas con fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ) de las ratas de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H) y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de dos vías para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales.

#### **4.4.5. Respuesta contráctil a fenilefrina en arterias desprovistas de endotelio**

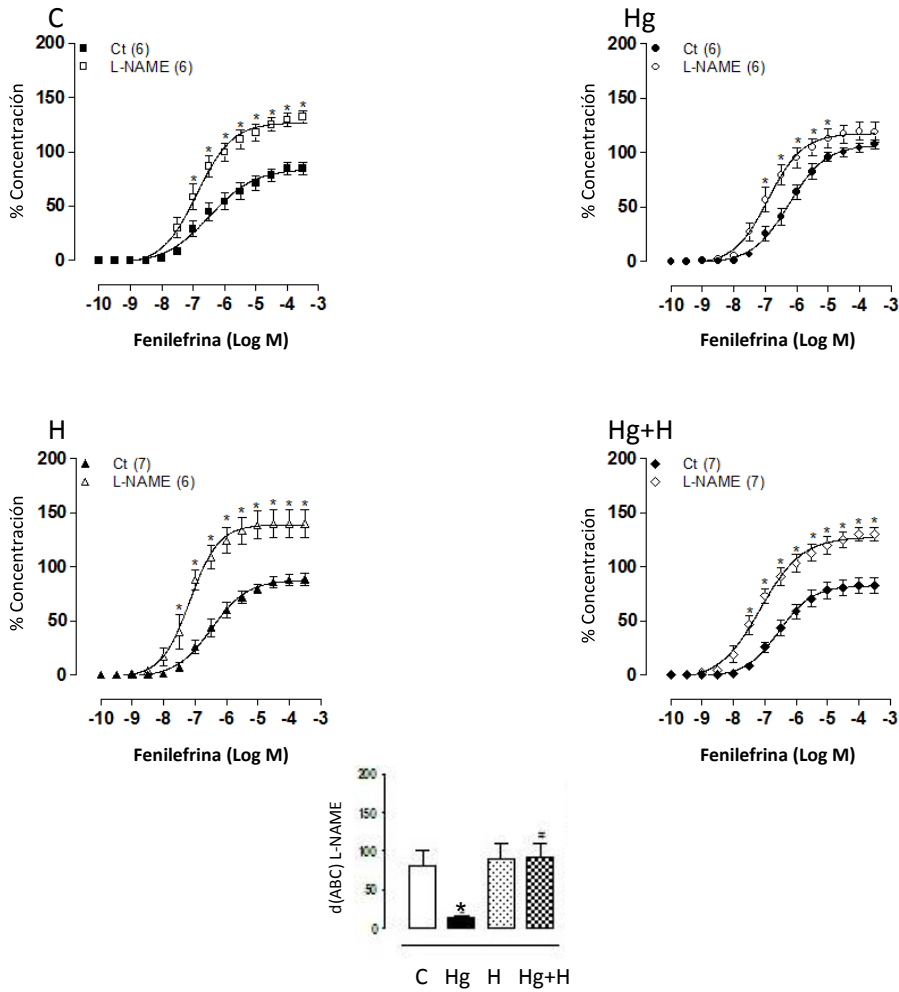
La respuesta contráctil a fenilefrina fue mayor en las preparaciones sin endotelio que en las preparaciones intactas, y pudieron observarse diferencias significativas entre ambos tipos de preparaciones en los animales del grupo control. Esta diferencia en la contracción de fenilefrina también pudo observarse en los restantes grupos experimentales cuando se compararon las respuestas de la contracción producida por este fármaco en preparaciones intactas y en preparaciones sin endotelio. Sin embargo, hay que resaltar que la diferencia de la contracción de fenilefrina producida en las preparaciones con y sin endotelio fue mucho menor en el grupo tratado únicamente con mercurio, que en los restantes grupos. En la Figura 19 se muestra la diferencia que existe cuando se calcula el área bajo la curva dosis respuesta de fenilefrina en preparaciones con y sin endotelio en los distintos grupos experimentales.



**Figura 19.** Contracción inducida por distintas concentraciones de fenilefrina en preparaciones de anillos de aorta, intactas (símbolo negro) y sin endotelio (símbolo blanco), de las ratas de los diferentes grupos experimentales, expresada como porcentaje de la contracción producida por 75 mM KCl: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H) y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó un ANOVA de dos vías para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia con las preparaciones intactas (\*) para valores de  $P < 0,05$ . Se representa también la diferencia entre las áreas bajo las curvas (dABC) de contracción dosis dependientes de fenilefrina obtenidas en preparaciones con y sin endotelio de los animales de los distintos grupos. Estos datos también se representan como los valores medios  $\pm$  EEM. Los resultados se analizaron con un ANOVA de una vía, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs. ratas control (C); # $P < 0,05$  vs. ratas mercurio (Hg).

#### **4.4.6. Respuesta contráctil a fenilefrina en presencia de L-NAME**

La contracción inducida por fenilefrina en las arterias de las ratas del grupo control incubadas con una concentración 100  $\mu$ M del inhibidor de la síntesis de óxido nítrico L-NAME fue significativamente mayor que la contracción inducida por este fármaco en las arterias de estas ratas a las que no se administraba el citado inhibidor. Esta diferencia en la contracción de fenilefrina también pudo observarse cuando se comparaban las arterias incubadas y no incubadas con L-NAME de las ratas de los restantes grupos experimentales (Figura 20). Sin embargo, hay que resaltar que la diferencia entre la contracción de fenilefrina en las preparaciones incubadas y no incubadas con L-NAME fue mucho menor en el grupo tratado únicamente con mercurio, que en los restantes grupos. En la Figura 20 se muestra también la diferencia del área bajo la curva dosis respuesta de fenilefrina en preparaciones incubadas y no incubadas con L-NAME en los distintos grupos experimentales.



**Figura 20.** Contracción inducida por distintas concentraciones de fenilefrina en preparaciones de anillos de aorta, incubadas con L-NAME 100 μM (símbolo blanco) y no incubadas con este fármaco (símbolo negro), de las ratas de los diferentes grupos experimentales, expresada como porcentaje de la contracción producida por 75 mM KCl: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H) y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios ± EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó un ANOVA de dos vías para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia con las preparaciones no incubadas con L-NAME (\*) para valores de  $P < 0.05$ . Se representa también la diferencia entre las áreas bajo las curvas (dABC) de contracción dosis dependientes de fenilefrina obtenidas en preparaciones incubadas y no incubadas con L-NAME de los animales de los distintos grupos. Estos datos también se representan como los valores medios ± EEM. Los resultados se analizaron con un ANOVA de una vía, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0.05$ . \* $P < 0.05$  vs. ratas control (C); # $P < 0.05$  vs. ratas mercurio (Hg).

#### **4.4.7. Respuesta contráctil a fenilefrina en presencia de apocinina**

La contracción inducida por fenilefrina en las arterias de las ratas del grupo control incubadas con una concentración 0,3 mM del inhibidor de la NADPH oxidasa, apocinina, fue significativamente menor que la contracción inducida por este fármaco en las arterias de estas ratas a las que no se administraba el citado inhibidor (Figura 20C). Esta diferencia en la contracción de fenilefrina también pudo observarse cuando se comparaban las arterias incubadas y no incubadas con apocinina de las ratas de los restantes grupos experimentales (Figura 20Hg, H y Hg+H). Hay además que resaltar que la diferencia entre la contracción de fenilefrina en las preparaciones incubadas y no incubadas con apocinina fue mucho mayor en el grupo tratado únicamente con mercurio, que en los restantes grupos. En la figura 20 también se muestra la diferencia que existe en el área bajo la curva dosis respuesta de fenilefrina en preparaciones incubadas y no incubadas con apocinina en los distintos grupos experimentales.

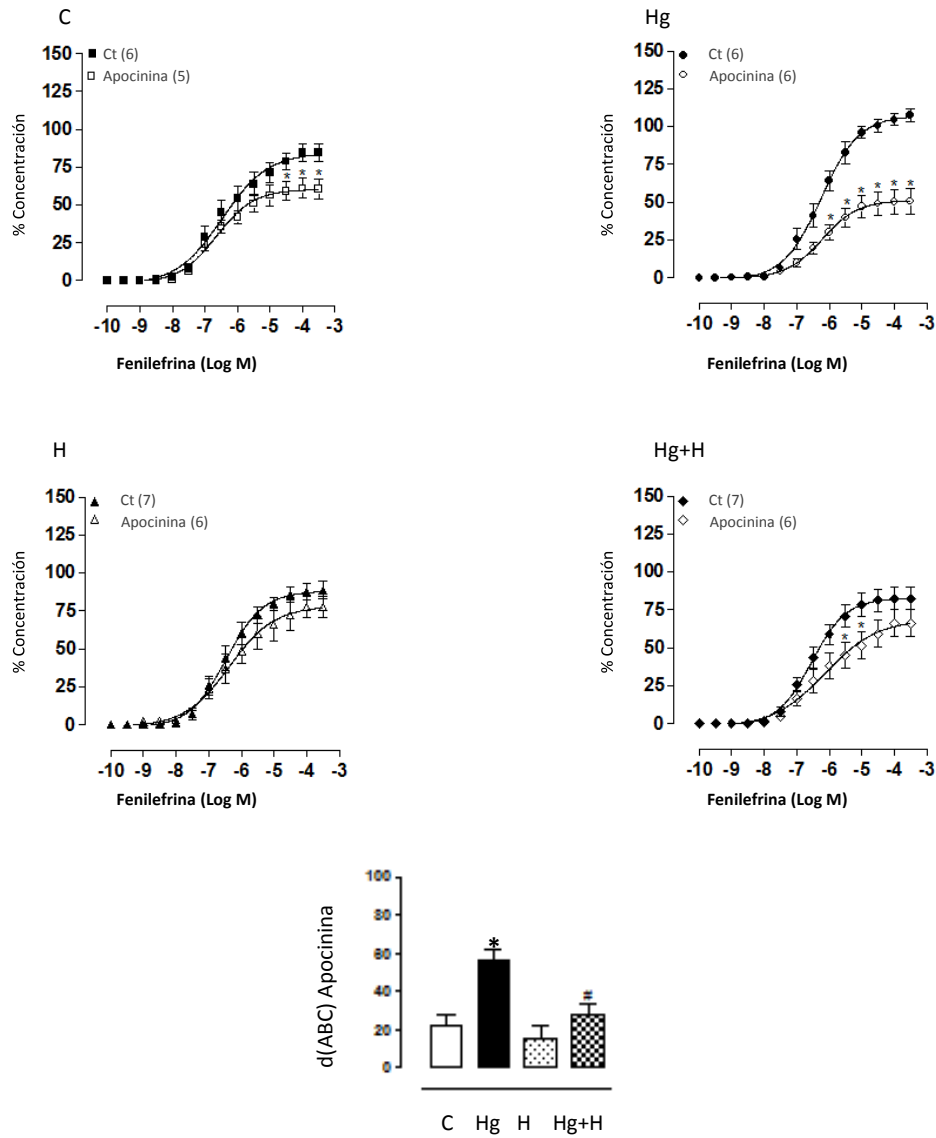
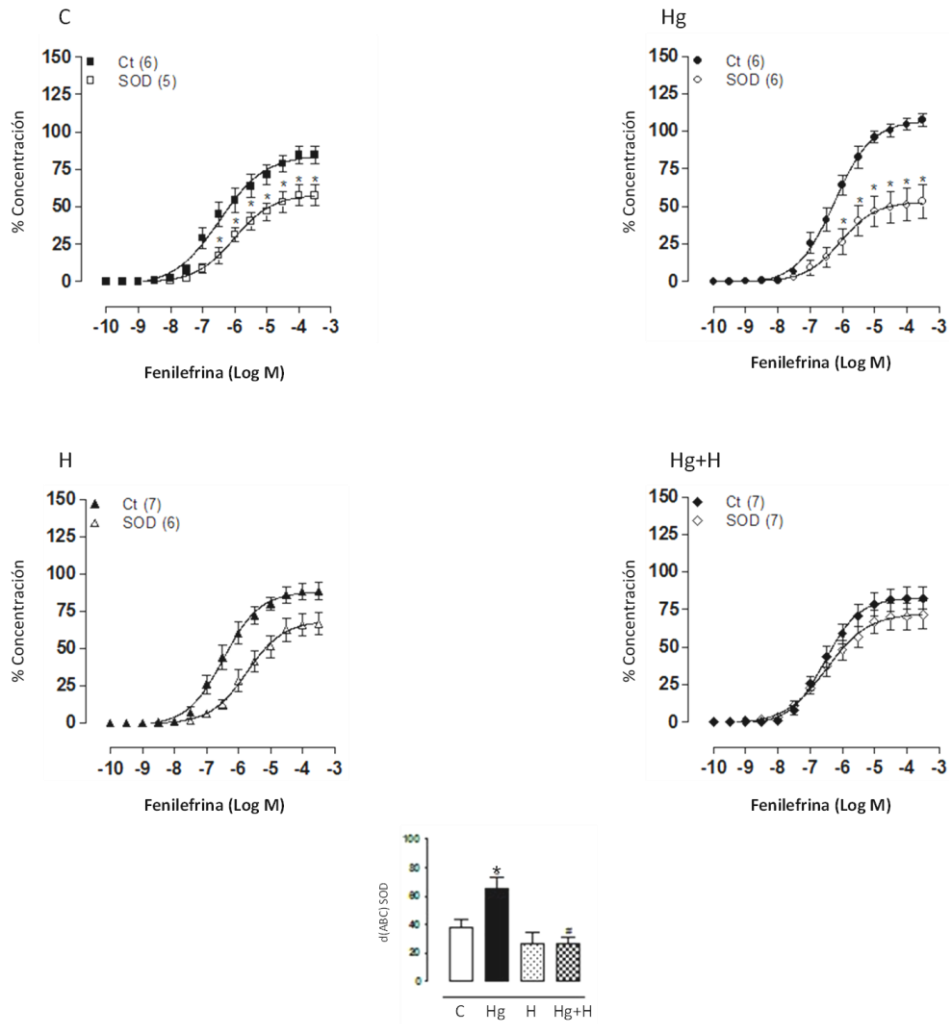


Figura 20. Contracción inducida por distintas concentraciones de fenilefrina en preparaciones de anillos de aorta, incubadas con apocinina 0,3 mM (símbolo blanco) y no incubadas con este fármaco (símbolo negro), de las ratas de los diferentes grupos experimentales, expresada como porcentaje de la contracción producida por 75 mM KCl: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H) y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de dos vías para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia con las preparaciones no incubadas con apocinina (\*) para valores de  $P < 0,05$ . Se representa también la diferencia entre las áreas bajo las curvas (dABC) de contracción dosis dependientes de fenilefrina obtenidas en preparaciones incubadas y no incubadas con apocinina de los animales de los distintos grupos. Estos datos también se representan como los valores medios  $\pm$  EEM. Los resultados se analizaron con un ANOVA de una vía, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs. ratas control (C); # $P < 0,05$  vs. ratas mercurio (Hg).

#### **4.4.8. Respuesta contráctil a fenilefrina en presencia de la enzima superóxido dismutasa**

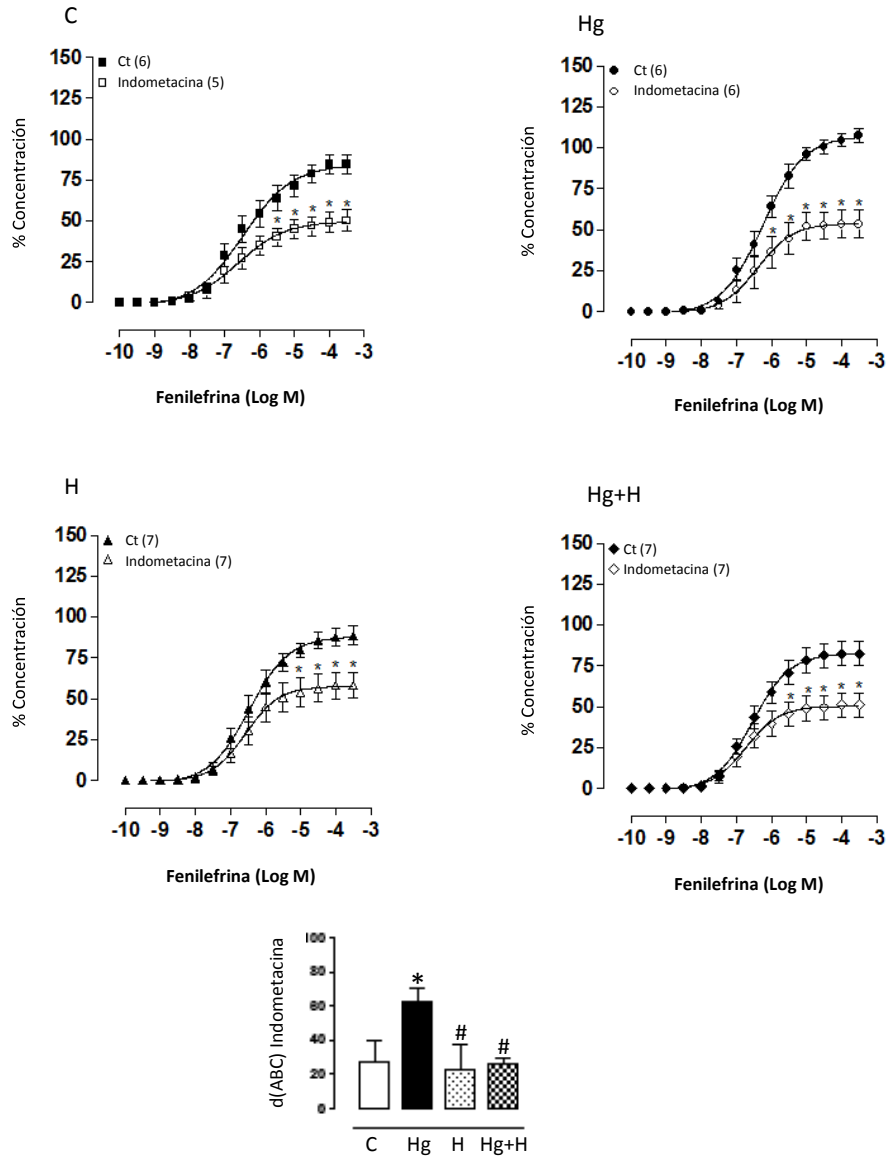
La contracción inducida por fenilefrina en las arterias de las ratas del grupo control incubadas con una concentración de 150 U/ml de la enzima superóxido dismutasa fue significativamente menor que la contracción inducida por este fármaco en las arterias de estas ratas a las que no se administraba la citada enzima (Figura 21C). Esta diferencia en la contracción de fenilefrina también pudo observarse cuando se comparaban las arterias incubadas y no incubadas con 150 U/ml de superóxido dismutasa de las ratas de los restantes grupos experimentales (Figuras 21 C, Hg, H y Hg+H). Hay además que resaltar que la diferencia entre la contracción de fenilefrina en las preparaciones incubadas y no incubadas con 150 U/ml de superóxido dismutasa fue mucho mayor en el grupo tratado únicamente con mercurio, que en los restantes grupos. En la figura 21 también se muestra la diferencia que existe en el área bajo la curva dosis respuesta de fenilefrina en preparaciones incubadas y no incubadas con 150 U/ml de superóxido dismutasa en los distintos grupos experimentales.



**Figura 21.** Contracción inducida por distintas concentraciones de fenilefrina en preparaciones de anillos de aorta, incubadas con 150 U/ml de superóxido dismutasa (SOD) (símbolo blanco) y no incubadas con este fármaco (símbolo negro), de las ratas de los diferentes grupos experimentales, expresada como porcentaje de la contracción producida por 75 mM KCl: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H) y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de dos vías para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia con las preparaciones no incubadas con 150 U/ml de superóxido dismutasa (\*) para valores de  $P < 0,05$ . Se representa también la diferencia entre las áreas bajo las curvas (dABC) de contracción dosis dependientes de fenilefrina obtenidas en preparaciones incubadas y no incubadas con 150 U/ml de superóxido dismutasa de los animales de los distintos grupos. Estos datos también se representan como los valores medios  $\pm$  EEM. Los resultados se analizaron con un ANOVA de una vía, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs. ratas control (C); # $P < 0,05$  vs. ratas mercurio (Hg).

#### **4.4.9. Respuesta contráctil a fenilefrina en presencia de indometacina**

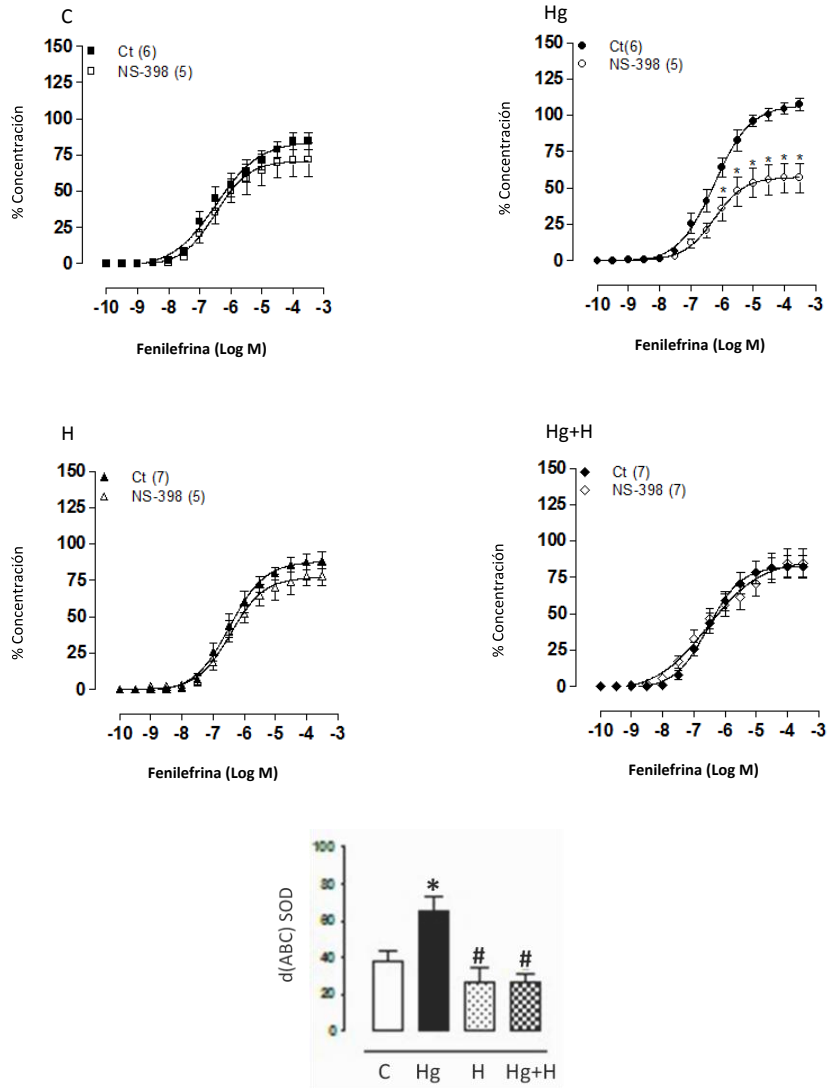
La contracción inducida por fenilefrina en las arterias de las ratas del grupo control incubadas con una concentración 1  $\mu$ M del inhibidor inespecífico de la ciclooxigenasa, indometacina, fue significativamente menor que la contracción inducida por este fármaco en las arterias de estas ratas a las que no se administraba el citado inhibidor (Figura 22C). Esta diferencia en la contracción de fenilefrina también se observó cuando se comparaban las arterias incubadas y no incubadas con indometacina de las ratas de los restantes grupos experimentales (Figuras 22 C, Hg, H y Hg+H). Hay además que resaltar que la diferencia entre la contracción de fenilefrina en las preparaciones incubadas y no incubadas con indometacina fue mucho mayor en el grupo tratado únicamente con mercurio, que en los restantes grupos. En la Figura 22 también se muestra la diferencia que existe en el área bajo la curva dosis respuesta de fenilefrina en preparaciones incubadas y no incubadas con indometacina en los distintos grupos experimentales.



**Figura 22.** Contracción inducida por distintas concentraciones de fenilefrina en preparaciones de anillos de aorta, incubadas con indometacina 1  $\mu\text{M}$  (símbolo blanco) y no incubadas con este fármaco (símbolo negro), de las ratas de los diferentes grupos experimentales, expresada como porcentaje de la contracción producida por 75 mM KCl: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H) y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de dos vías para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia con las preparaciones no incubadas con indometacina (\*) para valores de  $P < 0,05$ . Se representa también la diferencia entre las áreas bajo las curvas (dABC) de contracción dosis dependientes de fenilefrina obtenidas en preparaciones incubadas y no incubadas con indometacina de los animales de los distintos grupos. Estos datos también se representan como los valores medios  $\pm$  EEM. Los resultados se analizaron con un ANOVA de una vía, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs. ratas control (C); # $P < 0,05$  vs. ratas mercurio (Hg).

#### **4.4.10. Respuesta contráctil a fenilefrina en presencia de NS-398**

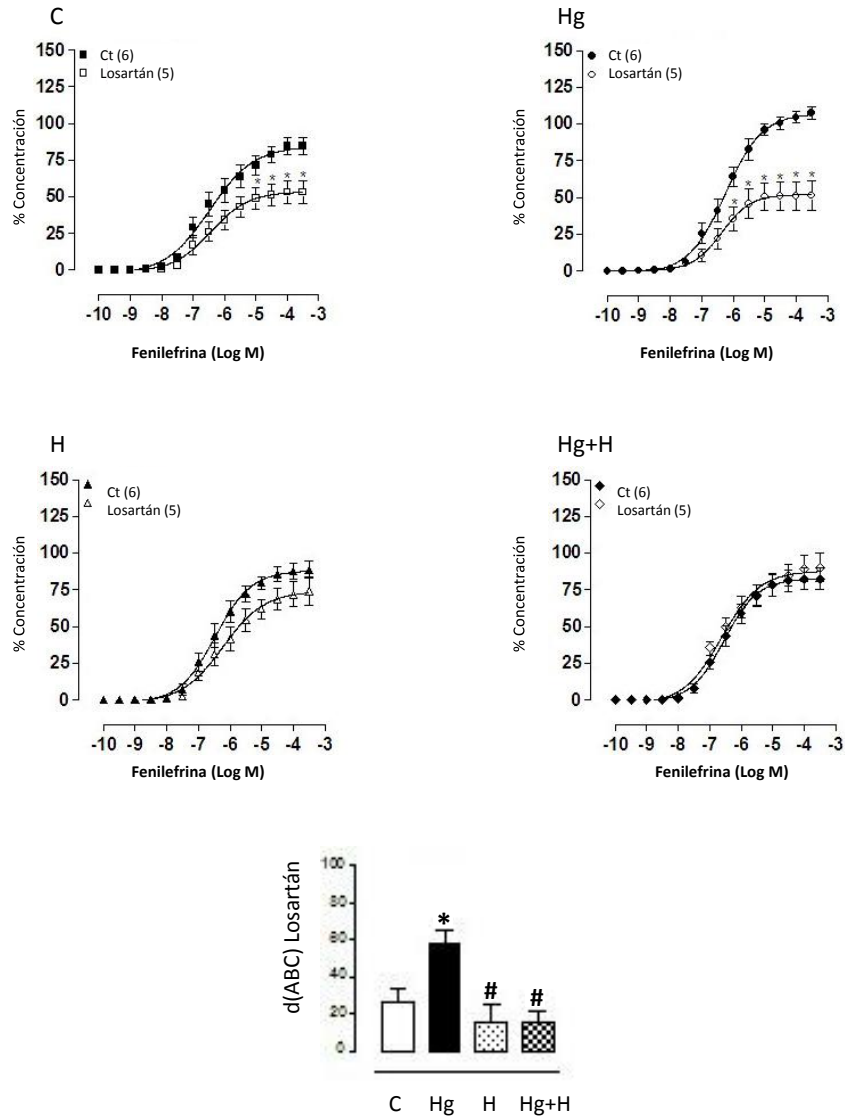
La contracción inducida por fenilefrina en las arterias de las ratas del grupo control incubadas con una concentración 1  $\mu$ M del inhibidor específico de la ciclooxygenasa II, NS-398, fue significativamente menor que la contracción inducida por este fármaco en las arterias de estas ratas a las que no se administraba el citado inhibidor (Figura 23C). Esta diferencia en la contracción de fenilefrina también se observó cuando se comparaban las arterias incubadas y no incubadas con NS-398 de las ratas de los restantes grupos experimentales (Figuras 23 C, Hg, H y Hg+H). Hay además que resaltar que la diferencia entre la contracción de fenilefrina en las preparaciones incubadas y no incubadas con NS-398 fue mucho mayor en el grupo tratado únicamente con mercurio, que en los restantes grupos. En la Figura 23 también se muestra la diferencia que existe en el área bajo la curva dosis respuesta de fenilefrina en preparaciones incubadas y no incubadas con NS-398 en los distintos grupos experimentales.



**Figura 23.** Contracción inducida por distintas concentraciones de fenilefrina en preparaciones de anillos de aorta, incubadas con NS-398 1  $\mu$ M (símbolo blanco) y no incubadas con este fármaco (símbolo negro), de las ratas de los diferentes grupos experimentales, expresada como porcentaje de la contracción producida por 75 mM KCl: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H) y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de dos vías para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia con las preparaciones no incubadas con NS-398 1  $\mu$ M (\*) para valores de  $P < 0,05$ . Se representa también la diferencia entre las áreas bajo las curvas (dABC) de contracción dosis dependientes de fenilefrina obtenidas en preparaciones incubadas y no incubadas con NS-398 1  $\mu$ M de los animales de los distintos grupos. Estos datos también se representan como los valores medios  $\pm$  EEM. Los resultados se analizaron con un ANOVA de una vía, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs. ratas control (C); # $P < 0,05$  vs. ratas mercurio (Hg).

#### **4.4.11. Respuesta contráctil a fenilefrina en presencia de Losartán**

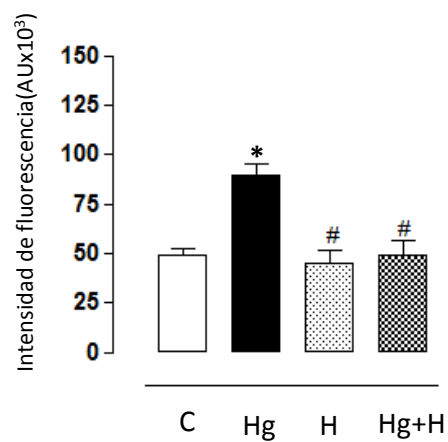
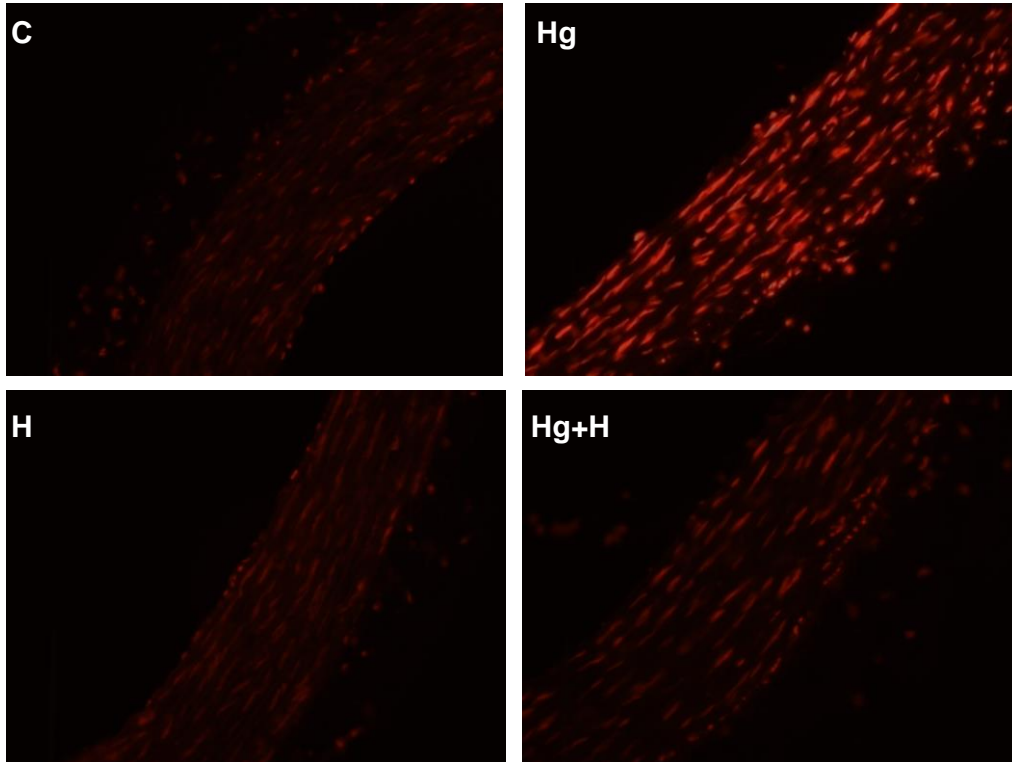
La contracción inducida por fenilefrina en las arterias de las ratas del grupo control incubadas con una concentración 10 mM del antagonista de receptores AT-1 de angiotensina II, Losartán, fue significativamente menor que la contracción inducida por este fármaco en las arterias de estas ratas a las que no se administraba el citado antagonista (Figura 24C). Esta diferencia en la contracción de fenilefrina también pudo observarse cuando se comparaban las arterias incubadas y no incubadas con Losartán de las ratas de los restantes grupos experimentales (Figuras 24 C, Hg, H y Hg+H). Hay además que resaltar que la diferencia entre la contracción de fenilefrina en las preparaciones incubadas y no incubadas con Losartán fue mucho mayor en el grupo tratado únicamente con mercurio, que en los restantes grupos. En la Figura 24 también se muestra la diferencia que existe en el área bajo la curva dosis respuesta de fenilefrina en preparaciones incubadas y no incubadas con Losartán 10 mM en los distintos grupos experimentales.



**Figura 24.** Contracción inducida por distintas concentraciones de fenilefrina en preparaciones de anillos de aorta, incubadas con Losartán 10 mM (símbolo blanco) y no incubadas con este fármaco (símbolo negro), de las ratas de los diferentes grupos experimentales, expresada como porcentaje de la contracción producida por 75 mM KCl: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H) y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de dos vías para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia con las preparaciones no incubadas con Losartán (\*) para valores de  $P < 0,05$ . Se representa también la diferencia entre las áreas bajo las curvas (dABC) de contracción dosis dependientes de fenilefrina obtenidas en preparaciones incubadas y no incubadas con Losartán de los animales de los distintos grupos. Estos datos también se representan como los valores medios  $\pm$  EEM. Los resultados se analizaron con un ANOVA de una vía, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs. ratas control (C); # $P < 0,05$  vs. ratas mercurio (Hg).

#### **4.4.12. Producción a anión superóxido en la aorta**

La aorta de los animales del grupo tratado con mercurio mostró una producción de anión superóxido significativamente mayor que la aorta de los animales del grupo control (Figura 25). No existieron sin embargo diferencias significativas entre la producción de anión superóxido en la aorta de las ratas del grupo tratado con el hidrolizado de clara de huevo y la producción de este anión en la aorta de las ratas del grupo control (Figura 25). Tampoco se apreciaron diferencias en la producción de este anión cuando se comparó la aorta de los animales tratados conjuntamente, con mercurio y el hidrolizado de clara de huevo, y la aorta de los animales del grupo control.



**Figura 25.** Producción de anión superóxido en la aorta de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los histogramas representan los valores medios de la intensidad de fluorescencia  $\pm$  EEM. Los resultados se analizaron con un ANOVA de una vía, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs. ratas control (C); # $P < 0,05$  vs. ratas mercurio (Hg).

## 4.5. Resultados de las determinaciones bioquímicas en plasma y tejidos

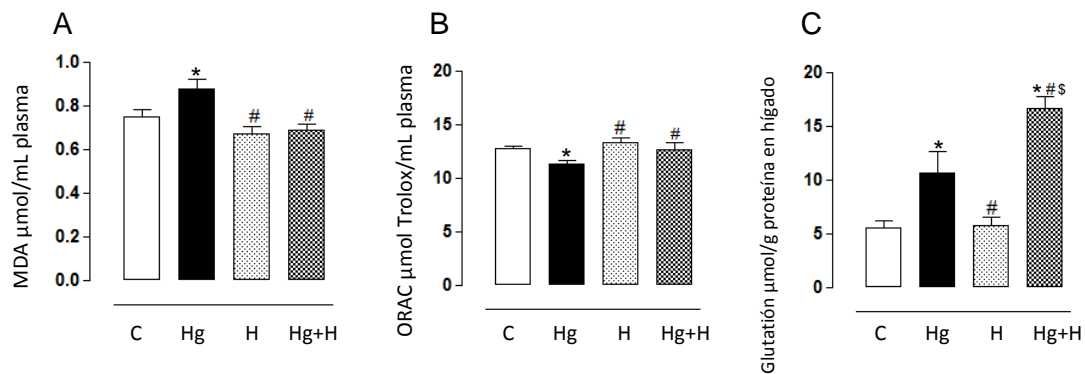
### 4.5.1. Marcadores de estrés oxidativo

El tratamiento crónico con mercurio ocasionó un aumento de la concentración de MDA en el plasma, de forma que los animales tratados con este metal presentaron niveles de este metabolito en plasma significativamente mayores que los correspondientes valores en el grupo control. No se observaron diferencias significativas entre los niveles de este metabolito en plasma de los restantes grupos y los niveles correspondientes del grupo control. El grupo de animales tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo mostró valores de MDA significativamente menores a los observados en el grupo de animales tratado únicamente con mercurio (Figura 26A).

En la Figura 26B se puede observar que los valores del ORAC en el plasma de los animales tratados con mercurio fueron significativamente más bajos que los correspondientes valores en el grupo control. No se observaron sin embargo diferencias significativas cuando se compararon los valores de ORAC de los dos grupos de animales que recibieron hidrolizado de clara de huevo con los valores de ORAC de los animales del grupo control. Sin embargo, el grupo tratado con hidrolizado y mercurio mostró valores de ORAC significativamente mayores que los del grupo tratado únicamente con mercurio.

Los datos reflejados en la figura 26C muestran un aumento significativo de los valores de glutatión reducido en el hígado de las ratas tratadas con mercurio respecto a los correspondientes valores observados en las ratas del grupo control. Las ratas tratadas con mercurio e hidrolizado de clara de huevo mostraron también un aumento significativo de glutatión reducido en el hígado respecto al grupo control, y este aumento fue además significativamente mayor que el observado en el grupo tratado únicamente con mercurio. No se observaron sin embargo diferencias significativas en este marcador hepático entre el grupo de animales que solo recibió como tratamiento hidrolizado de

clara de huevo y el grupo control.



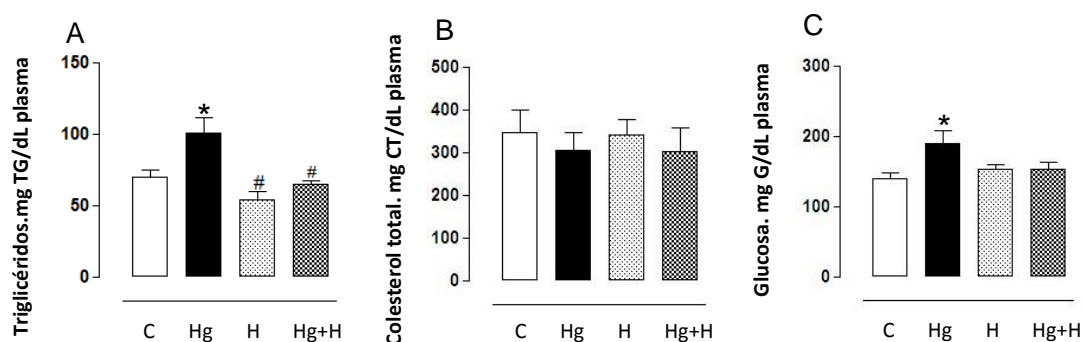
**Figura 26.** Concentración de MDA en plasma (A), ORAC en plasma (B) y glutatión reducido en el tejido hepático de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de una vía para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs ratas control (C); # $P < 0,05$  vs ratas tratadas con mercurio (Hg); § $P < 0,05$  vs. ratas con hidrolizado (H).

#### 4.5.2. Perfil lipídico y glucemia

Los niveles de triglicéridos en plasma aumentaron de forma significativa en el grupo de animales que recibió el tratamiento de mercurio (Figura 27A). Las ratas que además de este metal recibieron tratamiento con hidrolizado de clara de huevo no presentaron sin embargo este aumento de los valores de triglicéridos en el plasma que habían presentado las ratas que únicamente se habían tratado con mercurio, y no se observaron diferencias entre los animales que recibían el tratamiento conjunto y los animales del grupo control. El grupo de animales que recibió únicamente hidrolizado de clara de huevo no mostró modificaciones plasmáticas de triglicéridos en plasma respecto al grupo control.

No se encontraron diferencias significativas en los valores de colesterol total en plasma entre los animales de los distintos grupos experimentales (Figura 27B).

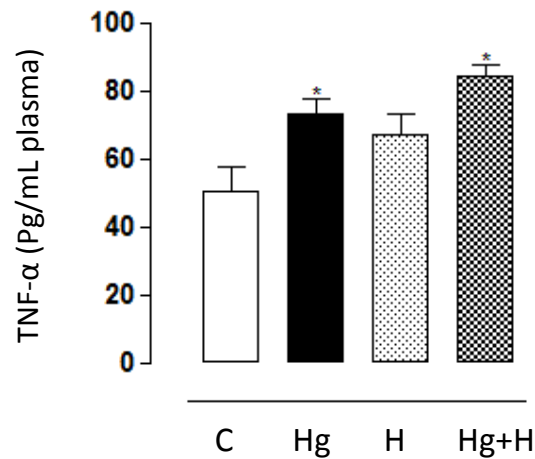
Los niveles de glucosa en plasma aumentaron en el grupo de animales tratado con mercurio, y este grupo mostró valores de glucosa en plasma significativamente mayores que los animales del grupo control. Los animales de los restantes grupos no mostraron diferencias significativas en los valores de glucosa en plasma respecto a los animales del grupo control. (Figura 27C).



**Figura 27.** Concentración en el plasma de triglicéridos (A), colesterol total (B) y glucosa (C) de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de una vía para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs ratas control (C); # $P < 0,05$  vs ratas tratadas con mercurio (Hg).

#### 4.5.3. Factor de necrosis tumoral-alfa

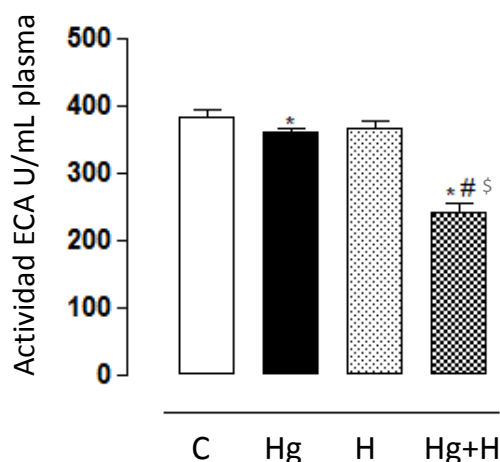
El tratamiento con mercurio ocasionó un aumento en los niveles del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) en el plasma de todos los animales que recibieron tratamiento con este metal, tanto los que lo recibían de forma aislada, como los que recibían de forma conjunta con el hidrolizado de clara de huevo (Figura 28). De hecho, ambos grupos mostraron un incremento significativo de TNF- $\alpha$  en plasma respecto a los correspondientes valores de esta citoquina en los animales del grupo control. No se observaron sin embargo diferencias significativas en los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  cuando se compararon los valores de esta variable en los animales tratados únicamente con hidrolizado de clara de huevo y los animales del grupo control.



**Figura 28.** Concentración de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) en el plasma de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de una vía para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ ; \* $P < 0,05$  vs ratas control (C).

#### 4.5.4. Actividad de la enzima convertidora de angiotensina

Los datos que aparecen en la Figura 29 reflejan una disminución significativa en la actividad de la ECA en el plasma de los grupos de animales tratados con mercurio, respecto a los valores de actividad de esta enzima en el plasma de los animales del grupo control. Esta disminución fue significativamente más acusada en el grupo de ratas tratadas conjuntamente con mercurio e hidrolizado de clara de huevo que el grupo de ratas tratado únicamente con mercurio. No se observaron diferencias significativas entre los valores de la actividad plasmática de la ECA entre el grupo que se trataba únicamente con el hidrolizado de clara de huevo y el grupo control.



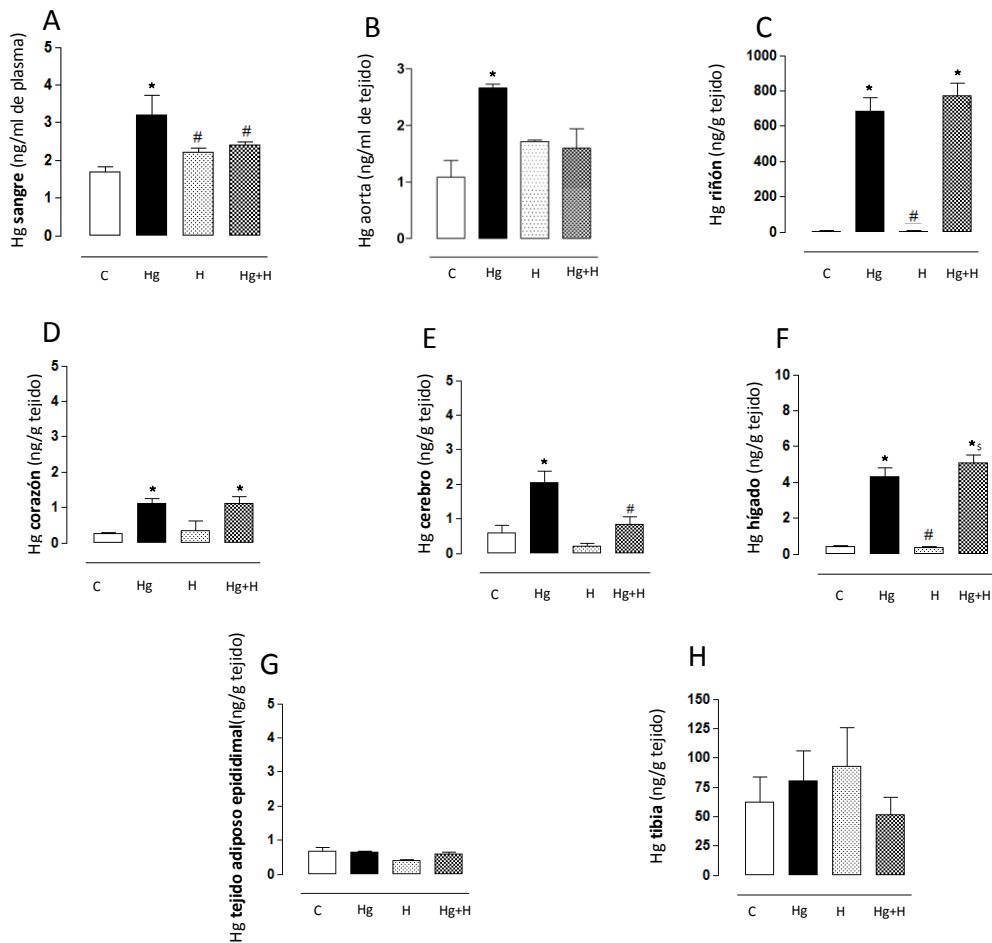
**Figura 29.** Actividad de la Enzima Convertidora de la Angiotensina (ECA) en el plasma de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de una vía para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ ; \* $P < 0,05$  vs ratas control (C); # $P < 0,05$  vs ratas tratadas con mercurio (Hg); § $P < 0,05$  vs. ratas con hidrolizado (H).

#### 4.5.5. Cuantificación de mercurio en sangre y tejidos

Los animales tratados con mercurio mostraron un incremento significativo de las concentraciones sanguíneas de este metal ( $3,2 \pm 1,3$  ng/ml) respecto a los animales del grupo control ( $1,9 \pm 0,5$  ng/ml). No obstante, los niveles sanguíneos de mercurio mostraron una tendencia clara a disminuir en los animales que se trataban conjuntamente con hidrolizado de clara de huevo y mercurio ( $2,53 \pm 0,5$  ng/ml). No se observaron diferencias significativas en el grupo de animales que recibió únicamente hidrolizado de clara de huevo ( $2,2 \pm 0,2$  ng/ml).

Los animales tratados con mercurio también mostraron un incremento significativo de mercurio en algunos tejidos como el corazón, el cerebro, el riñón y el hígado (Figuras 30A, B, C y E, respectivamente). Sin embargo, este aumento de mercurio no se observó y en el tejido adiposo epididimal (Figura 30D) de los animales tratados con mercurio. El tratamiento realizado únicamente con hidrolizado de clara de huevo no ocasionó efecto alguno y los

animales que se trataban con este hidrolizado no mostraron diferencias en las concentraciones de mercurio respecto a los animales del grupo control. Sin embargo, el tratamiento conjunto mercurio e hidrolizado de clara de huevo atenuó de forma significativa el incremento de los niveles de mercurio que se habían observado en el cerebro de los animales tratados con este metal (Figura 30B).

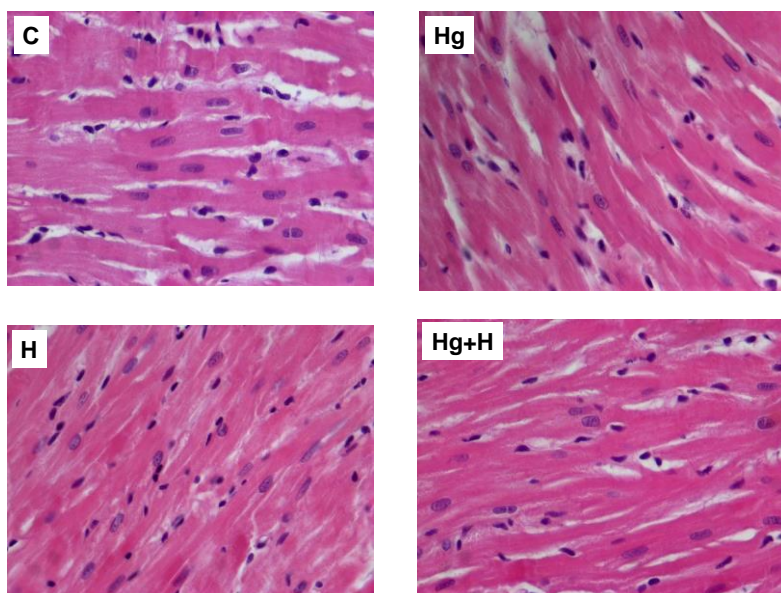


**Figura 30.** Concentración de mercurio en diferentes tejidos obtenida de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Corazón (A), cerebro (B), riñón (C), tejido adiposo epididimal (D) y hígado. Los datos representan los valores medios ± EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de una vía para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs ratas control (C); # $P < 0,05$  vs ratas tratadas con mercurio (Hg); \$ $P < 0,05$  vs. ratas tratadas con hidrolizado (H).

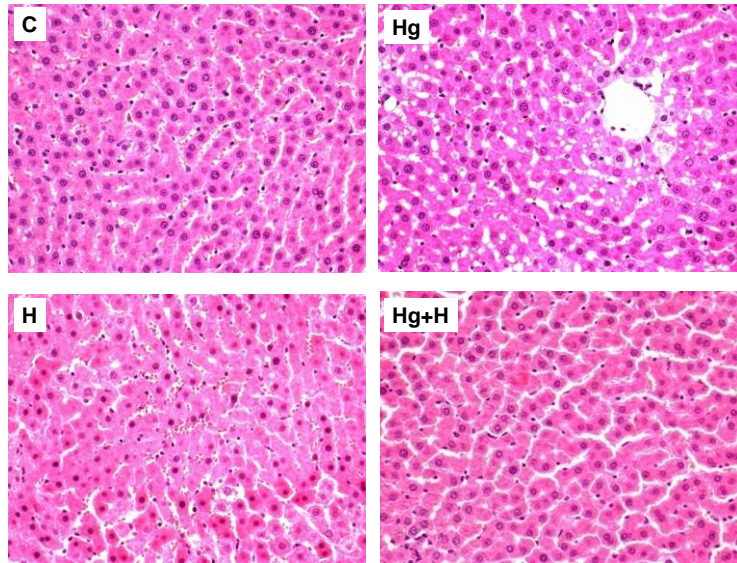
No se observaron diferencias en las concentraciones de mercurio de los restantes tejidos entre las ratas tratadas únicamente con este metal y las tratadas conjuntamente con este metal e hidrolizado de clara de huevo.

#### 4.6. Resultados de los estudios histológicos

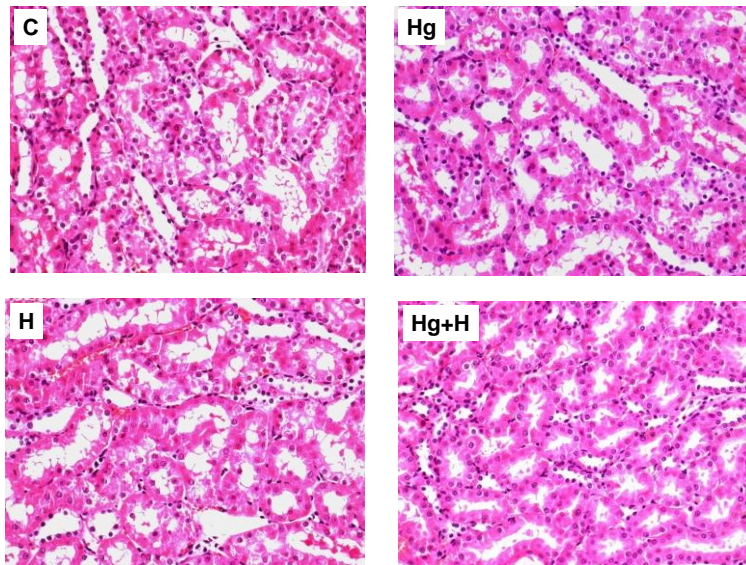
Los estudios histológicos que se han realizado en esta Tesis Doctoral en el corazón (Figura 31), el hígado (Figura 32), el riñón (Figura 33), el páncreas (Figura 34) y la grasa parda (Figura 35) no muestran diferencias significativas entre los animales de los distintos grupos experimentales.



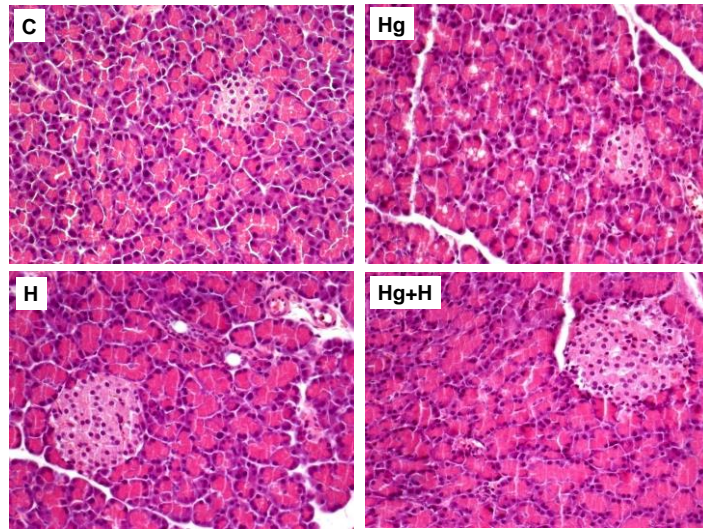
**Figura 31.** Cortes histológicos del corazón obtenidos de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). No se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales.



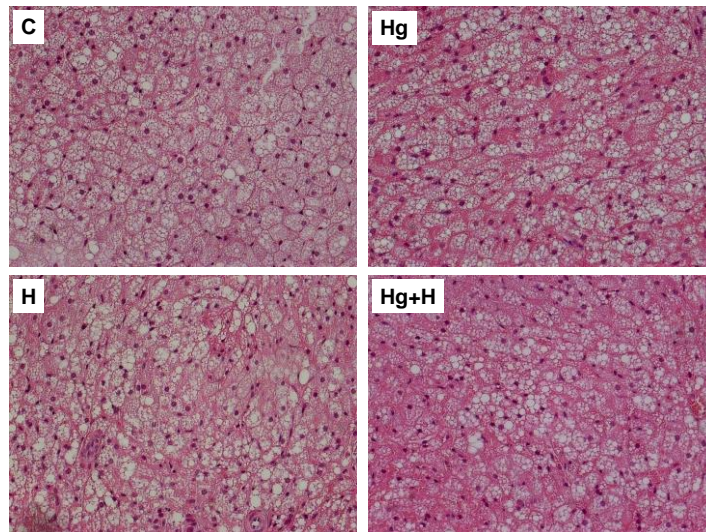
**Figura 32.** Cortes histológicos del hígado obtenidos de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). No se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales.



**Figura 33.** Cortes histológicos del riñón obtenidos de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). No se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales.

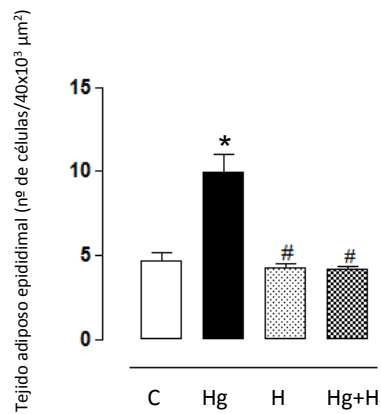
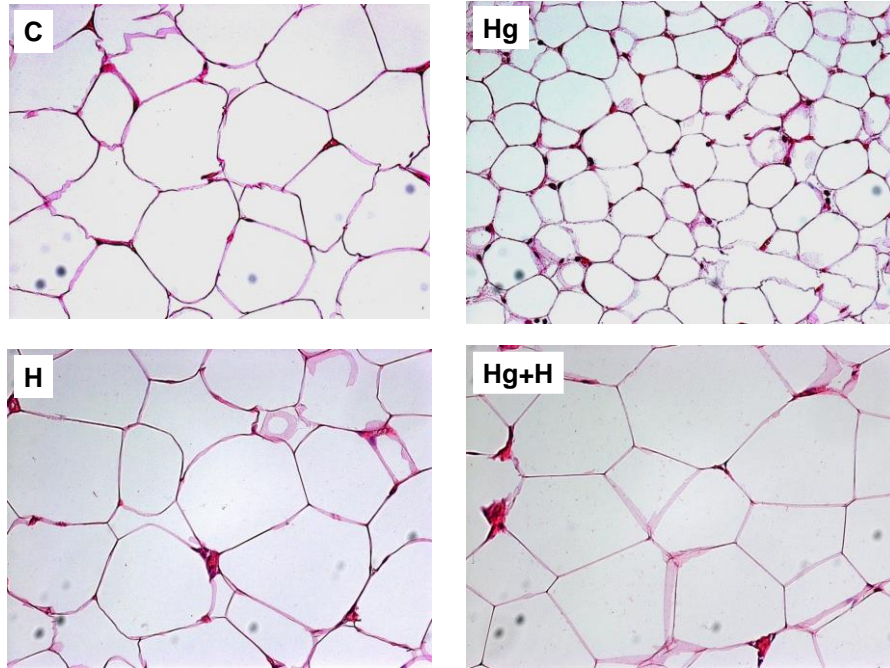


**Figura 34.** Cortes histológicos, del páncreas, obtenidos de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). No se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales.



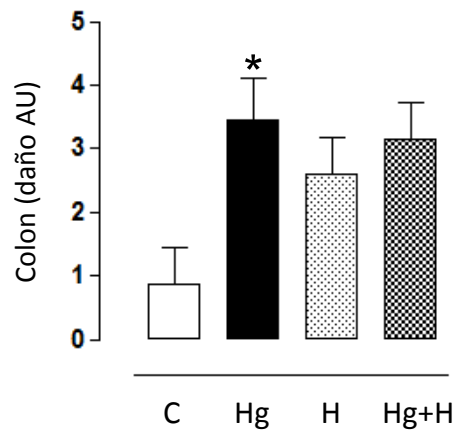
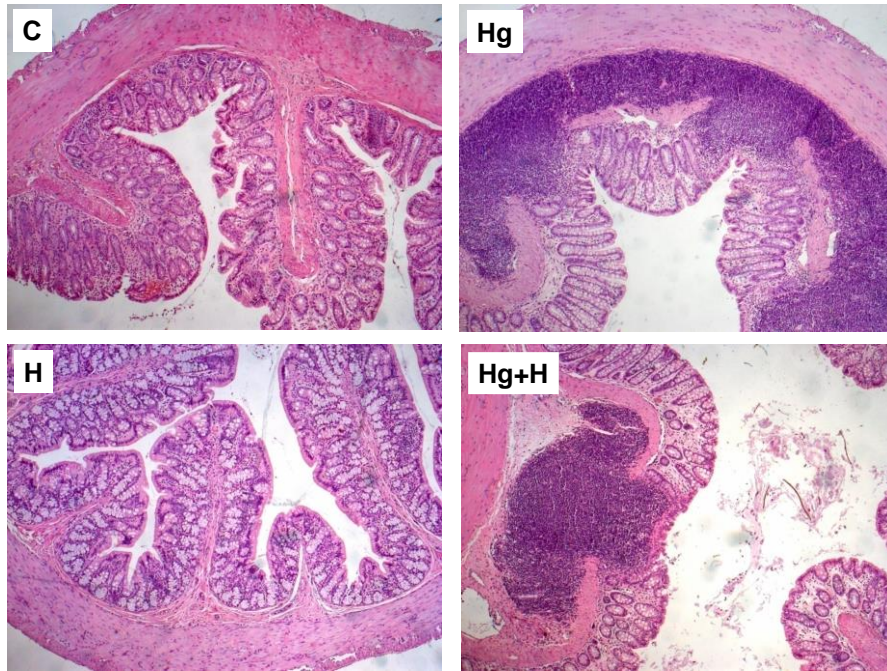
**Figura 35.** Cortes histológicos de la grasa parda obtenidos de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). No se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales.

En la Figura 36 se muestran los resultados obtenidos al analizar los cortes histológicos de tejido adiposo epididimal. El número de células observadas por campo en el tejido adiposo epididimal fue significativamente más bajo en los animales tratados con mercurio que en los animales control. Sin embargo, el número de células observadas por campo en el tejido adiposo epididimal de los animales tratados únicamente con hidrolizado de clara de huevo y el correspondiente valor en los animales tratados conjuntamente con mercurio e hidrolizado de clara de huevo fue muy similar, y no se observaron diferencias con el grupo control en ninguno de estos dos casos. Por otro lado, el número de células observadas por campo en el tejido adiposo epididimal de los animales tratados conjuntamente con hidrolizado de clara de huevo y mercurio fue significativamente mayor que el correspondiente valor en los animales tratados únicamente con este metal.



**Figura 36.** Cortes histológicos y número de células del tejido adiposo epididimal obtenidos de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 5 animales. Se utilizó un ANOVA de una vía para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs ratas control (C); # $P < 0,05$  vs ratas tratadas con mercurio (Hg).

Los datos histológicos representados en la Figura 37 muestran un daño significativo en el colon de las ratas que recibieron el tratamiento con mercurio. Sin embargo, los datos histológicos del colon de los dos grupos de animales que recibieron el hidrolizado de clara de huevo no permiten establecer daños significativos en el colon de los animales tratados con este producto, tampoco acusaron estos dos grupos de animales diferencias histológicas significativas en este tejido cuando se compararon con el grupo tratado únicamente con mercurio.

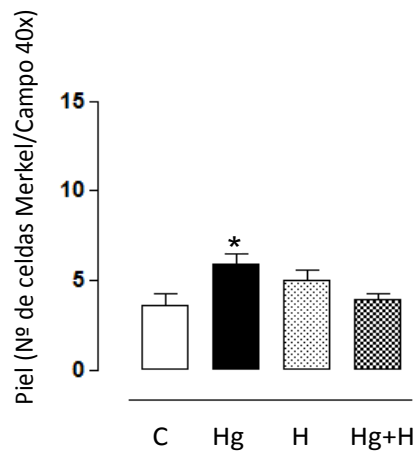
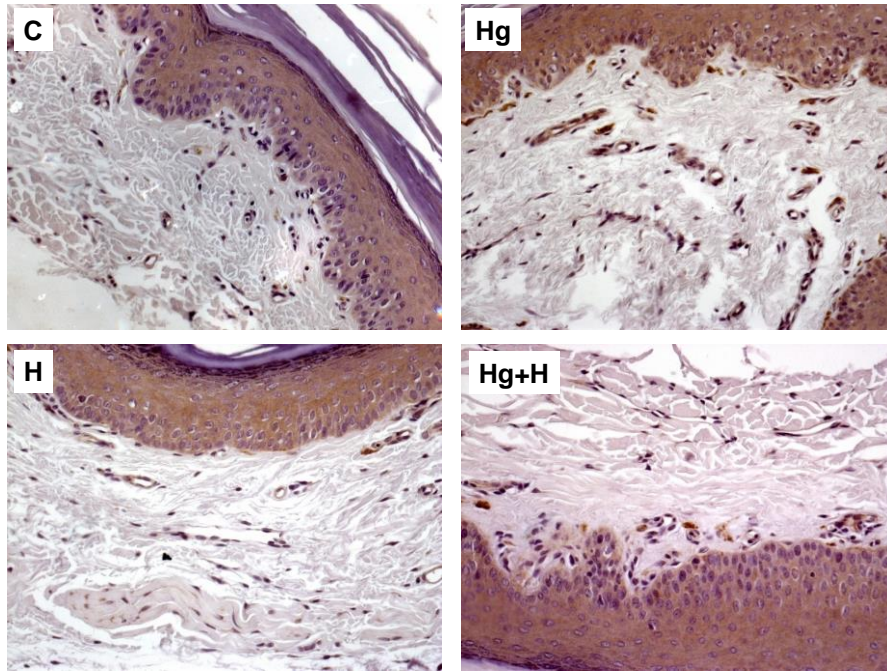


**Figura 37.** Cortes histológicos y daño medido del tejido del colon obtenidos de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 5 animales. Se utilizó ANOVA de una vía para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs ratas control (C).

## **4.7. Resultados de los estudios de inmunohistoquímica**

### **4.7.1. Inmunohistoquímica de la piel**

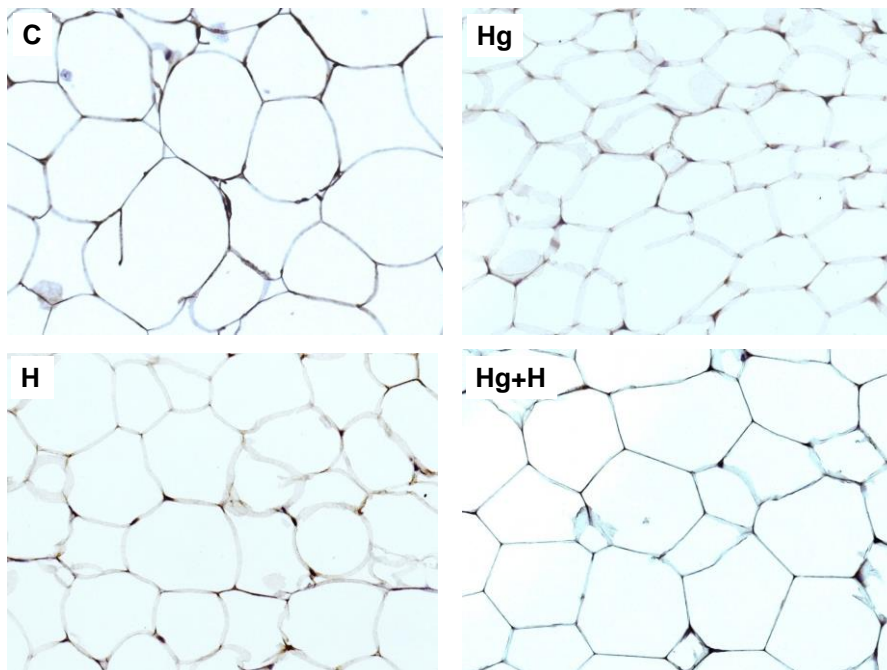
Tras el tratamiento de las muestras de piel con el anticuerpo carboxil-terminal hidrolasa-1 (UCH-L1), se observó un aumento en el número de células de Merkel de este tejido en el grupo de animales tratado únicamente con mercurio. Los grupos de animales que habían ingerido hidrolizado de clara de huevo durante el estudio mostraron valores en el número de células de Merkel en la piel similares al grupo control tras el tratamiento con este anticuerpo, pero no existieron tampoco diferencias significativas entre estos grupos y el grupo de animales tratado únicamente con mercurio cuando se contabilizaban estas células en la piel tras el tratamiento con el anticuerpo (Figura 38).



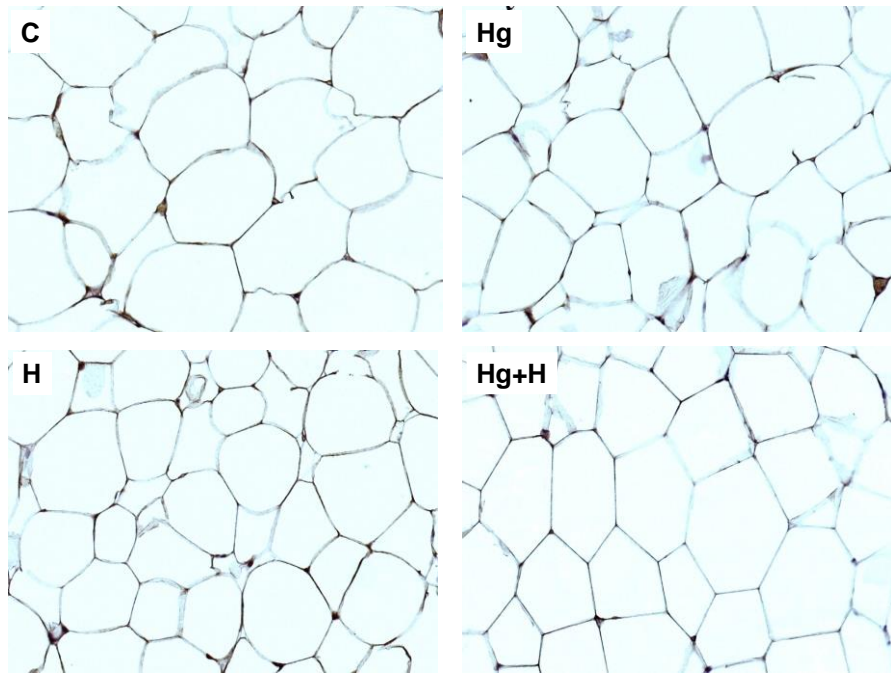
**Figura 38.** Cortes histológicos y número de células de Merkel de la piel de la pata marcados con el anticuerpo UCH-L1 obtenidos de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 5 animales. Se utilizó ANOVA de una vía para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$  vs ratas control (C). UCH-L1= anticuerpo carboxil-terminal hidrolasa-1.

#### 4.7.2. Inmunohistoquímica del tejido adiposo blanco

Las Figura 39 y la Figura 40 muestran los resultados de los estudios de inmunohistoquímica realizados en el tejido adiposo epididimal con los anticuerpos CHOP (del inglés C/EBP homologous protein) y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas alfa, PPAR- $\gamma$ , respectivamente. No se observaron diferencias en los cortes histológicos en ninguno de los grupos estudiados.



**Figura 39.** Cortes histológicos del tejido graso epididimal marcados con el anticuerpo CHOP marcados con el anticuerpo CHOP obtenidos de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). No se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales. CHOP= del inglés C/EBP homologous protein.



**Figura 40.** Cortes histológicos del tejido graso epididimal marcados con el anticuerpo de PPAR- $\gamma$  obtenidos de los animales de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C), grupo tratado con mercurio (Hg), grupo tratado con hidrolizado de clara de huevo (H), y grupo tratado con mercurio e hidrolizado de clara de huevo (Hg+H). No se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales. PPAR- $\gamma$ =receptores activados por proliferadores de peroxisomas alfa.

## **DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

En los estudios realizados en esta Tesis Doctoral, se ha utilizado un modelo experimental de ratas Wistar que se exponen de forma crónica a mercurio durante 60 días. Este modelo experimental fue desarrollado anteriormente por Rizzetti *et al.*, (2017) con el objetivo de mimetizar la posible exposición a este metal en la población por motivos laborales, sociales o alimentarios (Rizzetti *et al.*, 2017). En estudios anteriores en los que el mercurio se administró durante 30 días, se producía un importante daño vascular, con modificación de la función endotelial, y alteraciones en la contracción de las arterias de los animales (Wiggers *et al.*, 2008; Peçanha *et al.*, 2010, Furieri *et al.*, 2011a), pero con la administración de mercurio hasta los 30 días no se observaron los incrementos de la presión arterial en las ratas que pudieron observarse en el estudio de Rizzetti *et al.* en 2014. Con la exposición a mercurio durante 30 días tampoco se investigaron posibles modificaciones en el comportamiento de los animales que pudieran implicar alteraciones neurológicas, si bien ya se apreciaron alteraciones en la memoria, que se agravaban con la administración de este metal después de 60 días de tratamiento (Mello-Carpes *et al.*, 2013).

Como ya se mencionó en la Introducción de esta Tesis Doctoral, una de las alternativas terapéuticas propuesta para mejorar los daños ocasionados en las intoxicaciones por mercurio es la utilización de agentes antioxidantes. En este contexto, el uso de antioxidantes procedentes de la dieta, podrían representar una alternativa más natural a los antioxidantes de origen sintético, que probablemente resultaría además más segura (Yu y Paetau-Robinson, 2006; Beyrouy y Chan, 2006). Se ha descrito que algunos componentes de los alimentos tienen un efecto protector sobre la toxicidad causada por las exposiciones a mercurio, entre ellos los ácidos omega-3, los flavonoides, y algunas vitaminas y minerales como el selenio, el zinc y la vitamina E (Jan *et al.*, 2015). Más aún, existen estudios en los que se ha demostrado que las proteínas de los alimentos pueden actuar como quelantes de metales pesados, entre ellos del mercurio (Klaassen *et al.*, 2009; Sears 2013). Nuestro grupo de investigación ha desarrollado un hidrolizado de clara

de huevo con actividad antioxidante, antiinflamatoria y antihipertensiva, cuyos efectos se han demostrado en diversos modelos experimentales de enfermedad cardiovascular y obesidad (Miguel *et al.*, 2005; Miguel *et al.*, 2006; Garcés-Rimón *et al.*, 2016a; Moreno-Fernández *et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta la información anteriormente reseñada, nos planteamos la posibilidad de utilizar, en esta Tesis Doctoral, el modelo animal de exposición a mercurio propuesto en el estudio de Rizzeti *et al.* 2017, en el que las ratas se trataban durante 60 días con este metal, para poder así, por una parte, ampliar y completar la investigación sobre la toxicidad que produce la exposición crónica a mercurio y, por otra parte, evaluar si la co-administración del hidrolizado de clara de huevo desarrollado por nuestro grupo era capaz de atenuar las alteraciones ocasionadas por la exposición crónica a cloruro de mercurio.

Para justificar las dosis de mercurio que se administraba a las ratas, lo primero que hay que señalar es que nuestro objetivo fue conseguir mantener una concentración sanguínea aproximada de 20 nM de este metal durante todo el estudio. El estudio previo de Wiggers *et al.*, de 2008 propuso un cálculo teórico para obtener esta concentración de mercurio en la sangre de las ratas, en el que se consideraba que el mercurio se distribuía de forma homogénea en su organismo con un volumen de distribución igual a la cantidad total del agua corporal de estos animales. Así, se calculó que una dosis inicial de mercurio de 4,6 µg/kg proporcionaba la concentración sanguínea deseada de 20 nM de mercurio. En base a la vida media del cloruro de mercurio en los animales, que es de 37 días (Azevedo, 2003), se calculó también que, para mantener esta concentración sanguínea diaria de 20 nM de mercurio a lo largo de todo el estudio, se requería administrar a las ratas diariamente 0,07 µg/kg/día de mercurio, después de una dosis inicial de 4,6 µg/kg a las ratas.

En esta Tesis Doctoral, los animales tratados con mercurio aumentaron de forma significativa los niveles de mercurio en sangre y al finalizar el estudio presentaron niveles de este metal de aproximadamente 3 ng/ml (11 nM). Estas concentraciones de mercurio son ligeramente inferiores a las esperadas

basándonos en los estudios de Wiggers *et al.*, de 2008 en los que observaron concentraciones de este metal en sangre de 8 ng/ml (30 nM). No hay que olvidar que en el estudio de Wiggers *et al.*, el cloruro de mercurio se administró durante 30 días, y es posible que el aumento en la duración del tratamiento hasta los 60 días ponga en marcha distintos mecanismos en el organismo que permitan una mayor eliminación de este metal a nivel sistémico. Los valores de concentración de mercurio en sangre de nuestro estudio fueron incluso algo menores que los obtenidos en esos estudios anteriores y, sin embargo, nosotros pudimos observar alteraciones a diferentes niveles en las ratas, lo que demuestra el peligro de la exposición a este metal, incluso cuando se trata de dosis bajas del mismo. Aunque la determinación exacta de la acumulación de metales pesados en el cuerpo humano es muy complicada, la medida de la concentración en sangre de esos metales se utiliza de forma general como indicador de la exposición a estas sustancias (Gallagher y Meliker, 2010; Park y Lee, 2013). De hecho, la determinación de mercurio en la sangre se ha utilizado de forma habitual en los estudios epidemiológicos como marcador de la exposición a mercurio en la población general (Rothenberg *et al.*, 2015; Mortensen *et al.*, 2014). Los animales tratados con hidrolizado de clara de huevo, además de mercurio, mostraron niveles menores de este metal en sangre (~ 2,5 ng/ml) que los animales tratados únicamente con mercurio. Estos resultados sugieren que algunos péptidos derivados del hidrolizado de clara de huevo podrían tener afinidad por este metal y formar quelatos que impidieran en buena medida la absorción de este metal en el organismo, mejorando lógicamente su excreción. Se sabe en realidad que el mercurio, una vez absorbido en el organismo, se une a los grupos tiol (-SH) que contienen algunas biomoléculas, interfiriendo de este modo el metabolismo celular (De Flora *et al.*, 1994; Zalups 2000; Ralston y Raymond, 2010), y es además sobradamente conocido que algunas proteínas de la clara del huevo son especialmente ricas en grupos -SH (Miguel M, 2005). Cabe por ello suponer que puedan formarse quelatos entre el mercurio que administramos a las ratas y las proteínas o los péptidos derivados del hidrolizado de clara de huevo que evaluamos en esta Tesis Doctoral, cuando ambos se administran conjuntamente, y esta interacción impediría la absorción y en consecuencia el efecto tóxico del citado metal.

En esta Tesis Doctoral, se administró 1 g/kg/día del hidrolizado de clara de huevo diluido en agua, por vía orogástrica, tanto al grupo de ratas que recibió solo el hidrolizado de clara de huevo, como al grupo de ratas que recibió conjuntamente mercurio e hidrolizado de clara de huevo. La solución del hidrolizado se ajustó semanalmente en función del peso corporal registrado en las ratas, para que los animales recibiesen siempre esta dosis diaria del hidrolizado de clara de huevo. Para calcular la dosis de hidrolizado que debíamos administrar se tuvo además en cuenta un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación en el que se demostró el efecto antihipertensivo de un hidrolizado de clara de huevo similar al evaluado en esta Tesis Doctoral, en ratas hipertensas (Miguel *et al.*, 2006). La dosis utilizada en nuestro estudio es, además, similar a la utilizada por otros investigadores que evaluaban también el efecto biológico de otros péptidos derivados de proteínas alimentarias en otros modelos experimentales (Wu y Ding, 2001; Kimet *et al.*, 2004; Otani *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Morato *et al.*, 2013).

En el estudio experimental realizado en esta Tesis Doctoral, se llevó a cabo un registro semanal del peso corporal, de la ingesta sólida y de la ingesta líquida de los animales. No se observaron diferencias significativas en ninguna de estas variables entre los diferentes grupos de animales. En otros estudios, en los que se administraba el hidrolizado de clara de huevo disuelto en el agua de bebida, habían aparecido sin embargo diferencias entre la ingesta líquida *ad libitum* de los animales que recibían este hidrolizado en la bebida y los que no lo recibían. (Miguel *et al.* 2006; Garcés-Rimón *et al.*, 2016ab). En los últimos años, se ha descrito que la ingesta de proteínas de huevo produce un efecto saciante mayor, y consecuentemente una ingesta calórica menor, que las proteínas de otros alimentos como la leche y la soja (Vander Wall *et al.* 2005; Ratliff *et al.*, 2010) por lo que era esperable que el consumo del hidrolizado de clara de huevo pudiera haber modificado estos parámetros en los grupos de animales que lo consumían. Además, en su estado químico natural, las proteínas no contribuyen al sabor de los alimentos, pero los productos procedentes de su hidrólisis, es decir, los péptidos y los aminoácidos, tienen con frecuencia sabor amargo (Raksakulthai y Haard, 2003; Temussi, 2012) y

pueden, además, reaccionar con otros ingredientes de los alimentos, como azúcares y grasas, creando sabores específicos. La administración mediante sonda orogástrica del hidrolizado evitó que las propiedades organolépticas del hidrolizado utilizado, y su sabor amargo y ligeramente salado, pudieran condicionar la ingesta líquida de los animales, algo que ya se observó en estudios previos en los que se administraba el hidrolizado de clara de huevo en el agua de bebida (Miguel *et al.*, 2006)

Desde hace tiempo, la exposición a mercurio se ha relacionado de forma directa con problemas neuronales y déficits cognitivos, y se sabe que los diferentes efectos neurotóxicos dependen de la forma química, la concentración y el tiempo de exposición a este metal (Montgomery *et al.*, 2008). En esta Tesis Doctoral, se decidió por ello investigar el efecto que producía la exposición a bajas dosis de mercurio durante 60 días sobre el sistema nervioso central y periférico de las ratas.

La neuropatía periférica se considera un trastorno multifactorial cuya etiología no es del todo conocida. Algunos autores la describen como una enfermedad vascular que ocasiona una isquemia en los nervios, alterando en consecuencia la función de los mismos (Cameron *et al.*, 1991; Cameron *et al.*, 1994). Su aparición se ha relacionado también con la activación de cascadas inflamatorias en el sistema nervioso central y periférico (Uceyler *et al.*, 2007; Iannitti *et al.*, 2012). Otros investigadores han propuesto que esta enfermedad está causada por un aumento en el flujo de la glucosa formada a través de la vía de la aldosa reductasa, lo que provoca un defecto en la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que altera la señal de transducción en las fibras nerviosas periféricas (Obrosova *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2011). La neuropatía periférica se ha relacionado con el aumento del estrés oxidativo que se produce en numerosas patologías como la diabetes y la obesidad (Lupachyk *et al.*, 2012), ya que este incremento del estrés oxidativo podría producir un daño microvascular y ocasionar una disfunción a este nivel (Coppey *et al.*, 2000; Coppey *et al.*, 2001a; Coppey *et al.*, 2001b; Oltman *et al.*, 2008). Se ha relacionado también la presencia de neuropatía con una activación de rutas pro-inflamatorias (Iannitti *et al.*, 2012; Galloway y Chattopadhyay, 2013;

Uceyler *et al.*, 2007). En la actualidad, el tratamiento farmacológico para tratar la neuropatía tiene limitada efectividad, además de bastantes complicaciones, efectos secundarios y dependencia (Vorobeychik *et al.*, 2011; Tesfaye *et al.*, 2011).

La posible presencia de neuropatía periférica ocasionada por la exposición a mercurio se evaluó utilizando el test de los filamentos de Von Frey y el test de sensibilidad térmica al inicio, a los 30 y a los 60 días del estudio. En este estudio, se ha observado tras la realización del test de Von Frey un desarrollo de neuropatía sensorial periférica en las ratas tratadas con mercurio durante 60 días. En cuanto a la hiperalgesia, esta fue evidente en las ratas tratadas con mercurio durante los 60 días, puesto que se observó una disminución significativa en la sensibilidad térmica cuando se compararon los resultados obtenidos en el grupo tratado con mercurio y los obtenidos en el grupo control. La neuropatía en los animales tratados con mercurio se evidenció por una disminución en ellos de los umbrales de sensibilidad mecánica y térmica, y en consecuencia por la presencia en ellos de alodinia mecánica y de hiperalgesia térmica. Los animales que recibieron el hidrolizado de clara de huevo además del mercurio presentaron un aumento significativo del umbral de sensibilidad mecánica y térmica en comparación con las ratas tratadas únicamente con mercurio, y esto demuestra que el consumo del hidrolizado de clara de huevo previene la alteración de los desórdenes anteriormente señalados.

La presencia de neuropatía se ha relacionado con la presencia de hiperglucemia y estados de prediabetes (Lupachyk *et al.*, 2012). El aumento de los niveles de glucosa en sangre en el grupo de animales tratado con mercurio podría ser también, en parte, responsable de esta alteración neurológica. Se ha descrito que los metales tóxicos pueden alterar la captación de glucosa y, en consecuencia, los mecanismos moleculares implicados en la regulación de este azúcar en el organismo (Kazi *et al.*, 2009; Serdar *et al.*, 2009). Algunos investigadores han relacionado la alteración del metabolismo de la glucosa producida por la intoxicación ocasionada por cadmio, con la producción de radicales libres y con el aumento de los niveles

de peroxidación lipídica en el hígado (Moustafa *et al.*, 2003). El aumento del daño oxidativo observado en el grupo de animales tratado con mercurio, que se comentará más adelante a lo largo de esta Discusión, podría estar también implicado en el desarrollo de algunas alteraciones en el metabolismo de la glucosa en estos animales, pues, en todo caso, su glucemia fue más alta que la glucemia del grupo control. El grupo de animales tratado conjuntamente con mercurio y también con hidrolizado de clara de huevo mostró sin embargo valores de glucosa plasmática similares a los del grupo control. Es decir, este grupo no presentó alteraciones en esta variable, lo que concuerda con un posible metabolismo normal de este azúcar y la falta de afectación neurológica en este grupo experimental. Las propiedades antioxidantes del hidrolizado de clara de huevo podrían haber evitado el desarrollo de las alteraciones en el metabolismo de la glucosa tras la exposición a mercurio. Algunos trabajos han asociado también el efecto tóxico producido por metales pesados, con una disminución en la actividad secretora del páncreas, y esos investigadores proponen que la alteración en la síntesis de insulina en esos animales puede estar también implicada en las alteraciones del metabolismo de la glucosa que aparecen en ellos. En nuestro estudio también se observó una alteración en la síntesis de insulina en el grupo de animales tratado con mercurio, cuyos niveles en plasma fueron significativamente inferiores a los del grupo control, y podría por lo tanto estar también afectada la actividad secretora del páncreas, aunque no se observaron diferencias en el análisis histológico de este tejido en ninguno de los grupos experimentales. También se ha descrito la capacidad que tienen los metales pesados, debido a su capacidad para asociarse a grupos tiol, para inactivar numerosas enzimas implicadas en la regulación de distintas vías de señalización (Moustafa *et al.*, 2003). Por lo tanto, el mercurio podría también estar inactivando enzimas dependientes de grupos tiol que podrían estar implicadas en la regulación del metabolismo de los carbohidratos.

En concordancia con los descubrimientos funcionales, los resultados obtenidos en los estudios de inmunohistoquímica mostraron un incremento en el número de células de Merkel en la piel de la pata de las ratas que recibieron el tratamiento crónico con mercurio. Este hallazgo sugiere una posible

implicación de fibras nerviosas cortas mielinizadas y no mielinizadas (tipos A $\delta$  y C), más sensibles a las sensaciones térmicas, o una implicación de fibras nerviosas largas mielinizadas (tipos A $\beta$  y A $\gamma$ ) responsables de las sensaciones de tacto y presión (Xu *et al.*, 2014) en la neuropatía ocasionada por mercurio. Los cambios observados en los receptores mecánicos confirman la alteración sensorial que ocasiona la exposición a mercurio, y que ésta puede estar causada por un daño en las fibras nerviosas largas de mielina (tipo A $\beta$ ) (Alsunousi y Marrif, 2014). También existen estudios en humanos que, aunque escasos, han documentado un descenso en la velocidad de conducción del nervio, degeneración axonal y cambios desmielinizantes asociados a la neuropatía periférica (Kingman *et al.*, 2005). Algunos autores han postulado que estos efectos están causados, en parte, por las uniones que el metal establece con los grupos tiol y el estrés oxidativo que ello provoca (Clarkson y Strain, 2003). En cualquier caso, los mecanismos exactos que están implicados en la toxicidad de los axones propia de la neuropatía permanecen sin esclarecer. El estrés oxidativo se ha asociado con daños en la conducción de los nervios periféricos y con degeneración axonal en la neuropatía periférica inducida por la diabetes (Kennedy *et al.*, 1998; Shun *et al.*, 2004). Por lo tanto, en el estudio realizado en esta Tesis Doctoral, el estrés oxidativo ocasionado por la exposición crónica a mercurio durante 60 días podría promover un aumento en el número de terminaciones nerviosas de Merkel como mecanismo compensatorio del daño producido en las terminaciones nerviosas por este metal, situación que no se produciría posiblemente cuando se co-administra el hidrolizado de clara de huevo. Este incremento en el número de terminaciones nerviosas sería además el responsable del desarrollo de neuropatía periférica, y en consecuencia de la disminución del umbral a la sensibilidad mecánica y a la estimulación térmica.

Como hemos mencionado con anterioridad, los efectos tóxicos que ocasiona la exposición a mercurio pueden también afectar al sistema nervioso central y, en consecuencia, producir cambios en el comportamiento de los animales. La catalepsia se define como la incapacidad para corregir una postura impuesta artificialmente. Esta alteración se asocia normalmente con síntomas de esquizofrenia, depresión y enfermedad de Parkinson en

humanos (Klem 1989; Kulikova *et al.*, 2017). En esta Tesis Doctoral se observó la presencia de catalepsia en los animales tratados únicamente con mercurio. Nuestros resultados concuerdan con los de otros estudios en los que también se describe que la exposición crónica a timerosal (etilmercurio) produce catalepsia, como consecuencia de la acumulación del mercurio en el cerebro (Olczak *et al.*, 2011). Aunque no se conocen con claridad los mecanismos de acción que ocasiona esta patología, existen investigadores que inducen catalepsia en los animales mediante la administración en el cerebro medio de haloperidol. Estos autores observaron una mejora de la catalepsia tras la administración de un antagonista del receptor cannabinoide CB-1, AM251 (Medeiros *et al.*, 2016). En nuestro estudio, la administración del hidrolizado de clara de huevo consiguió prevenir la aparición de catalepsia ocasionada por la exposición a mercurio en los animales. El mecanismo de este efecto no se conoce, pero, por lo que se comentará más adelante en esta Discusión, es incluso probable que el hidrolizado de clara de huevo pueda acceder al sistema nervioso central, y podría además impedir el acceso del mercurio a este tejido por sus efectos quelantes.

En estudios previos, con administraciones de mercurio a las ratas similares a las realizadas en esta Tesis Doctoral, pero con una exposición únicamente de 30 días a este metal, se sugirió que las alteraciones centrales de los animales estaban asociadas al estrés oxidativo que este metal promueve. De hecho, algunas de las alteraciones neuronales que aparecen en el sistema nervioso central tras la exposición a mercurio se han relacionado con un aumento del estrés oxidativo en el hipocampo, a su vez ocasionado por un desequilibrio entre las enzimas pro- y anti-oxidantes en esta zona del cerebro (Zahn *et al.*, 2016). Algunos estudios han observado también un aumento de la peroxidación lipídica y de la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el cerebro y en las mitocondrias de los animales que se exponen crónicamente a mercurio (Kim *et al.*, 2015). La peroxidación lipídica también se ha propuesto como una de las consecuencias de la neurotoxicidad inducida por cloruro de mercurio (Mahboob *et al.*, 2001), y existen evidencias de la implicación de las ROS en los daños ocasionados por el mercurio sobre el sistema nervioso periférico y el sistema nervioso

central en varios modelos animales de toxicidad inducida por cloruro de mercurio (Sener *et al.*, 2007).

Los depósitos de mercurio acumulados en el cerebro se han relacionado, de hecho, con alteraciones en la memoria y el comportamiento. Los niveles de mercurio encontrados en el cerebro de los animales tratados con mercurio de esta Tesis Doctoral ( $2,1 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$ ) fueron significativamente superiores a los de los animales del grupo control ( $0,6 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ ). Estos niveles de mercurio disminuyeron de forma significativa en el grupo de animales tratados conjuntamente con el hidrolizado de clara de huevo y con el metal ( $0,8 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ ), resultados que concuerdan con los resultados de funcionalidad neuronal observados en los diferentes grupos experimentales. Existen trabajos anteriores en los que también se cuantificó la concentración de mercurio en el cerebro de ratas, encontrándose variaciones de esta concentración desde los  $0,04 \mu\text{g/g}$  de tejido (Teixeira *et al.*, 2014) hasta los  $0,4 \mu\text{g/g}$  de tejido (Moraes-Silva *et al.*, 2014). En nuestro trabajo, se observó que la cantidad de mercurio acumulada en el tejido cerebral fue aproximadamente de  $2 \mu\text{g/g}$  de tejido, concentraciones mucho menores de este metal que las que encontraron otros investigadores en los animales expuestos a este metal, lo que sugiere que incluso concentraciones muy bajas de mercurio en el cerebro son capaces de producir efectos no deseados en los animales, que se traducen en alteraciones del comportamiento y la memoria.

A pesar del daño evidente causado por la exposición crónica a mercurio durante 60 días sobre el sistema nervioso central y periférico, con desarrollo de neuropatía periférica y desórdenes en el comportamiento, la administración del hidrolizado de clara de huevo tratado con pepsina fue capaz de prevenir estas alteraciones en las ratas. En estudios previos, se ha descrito la capacidad antioxidante de este hidrolizado *in vitro* (Garcés-Rimón *et al.*, 2016b), y también su capacidad para disminuir el estrés oxidativo en modelos animales de hipertensión (Manso *et al.*, 2008) y en modelos animales de obesidad genética y obesidad inducida por la dieta (Garcés-Rimón *et al.*, 2016a; Moreno-Fernández *et al.*, 2018). Esto sugiere que la actividad antioxidante que tiene el hidrolizado de clara de huevo podría ser responsable

de la mejora de los daños en el sistema nervioso que aparecen en los animales expuestos a mercurio.

En esta Tesis Doctoral, no se han podido dilucidar los mecanismos responsables del efecto neuroprotector que presenta el hidrolizado de clara de huevo, pero hemos podido establecer una relación entre la estructura de las secuencias peptídicas que forman el hidrolizado de clara de huevo y la posibilidad de efectos centrales de este hidrolizado tras la administración del mismo. Se sabe que la presencia de péptidos con residuos tirosina en la región N-terminal se relaciona con una mayor capacidad de esas secuencias para atravesar la barrera hematoencefálica (Teschmacher, 2003). En estudios previos, se identificaron algunas secuencias peptídicas del hidrolizado de clara de huevo que se ha utilizado en este estudio, que podrían ser responsables de sus efectos bioactivos. Algunas de ellas (YAEERYPIL, YQIL, YRGGLEPINF, YPI, YP) (Miguel *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2006; Miguel *et al.*, 2007ab) presentan, de hecho, residuos de tirosina en la región N-terminal, y esto puede relacionarse con la capacidad de del hidrolizado para atravesar la barrera hematoencefálica y producir su efecto antioxidante a nivel central. Se ha descrito además que los componentes de los alimentos, entre los que se incluyen las proteínas alimentarias, pueden actuar como potentes quelantes de metales pesados, incluido el mercurio, reduciendo de este modo la concentración de este metal en cerebro y la sangre (Klaasen *et al.*, 2009). También se ha descrito la producción de hidrolizados derivados de proteínas alimentarias que contienen péptidos con residuos de tirosina y fenilalanina que tienen capacidad quelante (Torres-Fuentes *et al.*, 2014). Todo ello, podría justificar que el mercurio no pudiera siquiera acceder al sistema nervioso central cuando se administra conjuntamente con el hidrolizado de clara de huevo que hemos utilizado. Por otra parte, algunos autores han sugerido que los compuestos ricos en azufre, como es el caso algunas las proteínas y péptidos, podrían reducir la absorción o reabsorción de los metales tóxicos, y mejorar las vías de desintoxicación naturales, pues la eficiencia de un compuesto quelante se relaciona con su composición en azufre, molécula que tiene gran afinidad por los metales pesados (Sears, 2013). De hecho, ya hemos mencionado con anterioridad que la clara de huevo es una matriz

alimentaria compuesta en una gran mayoría por proteínas que contienen azufre (Miguel M., 2005; Abdou *et al.*, 2013). Por lo tanto, cabe pensar que los péptidos antioxidantes que contiene el hidrolizado de clara de huevo usado en esta Tesis Doctoral pudieran actuar como quelantes de mercurio, reduciendo así la absorción de dicho metal y mejorando sus vías de excreción naturales.

La exposición a mercurio también produce daños sobre el sistema cardiovascular a diferentes niveles. Los vasos sanguíneos representan, de hecho, el primer y principal órgano que se encuentra expuesto a los efectos tóxicos del mercurio a través de la circulación sistémica (Omanwar y Fahim, 2015). En los últimos años, los efectos tóxicos de este metal se han relacionado con el desarrollo de enfermedad coronaria, infarto de miocardio, arritmias aterosclerosis y accidentes cerebrovasculares, tanto en roedores como en humanos (Rissanen *et al.*, 2000; Rajaei *et al.*, 2015; Kamynsky *et al.*, 2016). La hipertensión arterial se considera uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (Maraj *et al.*, 2013), y se ha demostrado que la exposición a mercurio ocasionada por la ingesta frecuente de pescado y marisco presenta una correlación positiva con el riesgo de desarrollar hipertensión arterial (Fillion *et al.*, 2006).

Estudios previos en animales de experimentación han demostrado que la exposición a mercurio causa un aumento de la presión arterial, del ritmo cardíaco y de la reactividad vascular en arterias de resistencia (mesentéricas) y arterias de conductancia (aorta), y también aumentó la producción sistémica de angiotensina II (Machado *et al.*, 2007; Blanco-Rivero *et al.*, 2011; Lemos *et al.*, 2012). La exposición crónica a bajas dosis de mercurio durante 30 días en el modelo desarrollado por Wiggers *et al.*, (2008), ocasionó también un incremento en la reactividad vascular de diferentes lechos vasculares (aorta, mesentérica, coronaria y cerebrales) en las ratas, y dicho aumento de reactividad se asoció con un aumento del estrés oxidativo y, en consecuencia, con una disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico y un aumento de los prostanoídes contráctiles y de los niveles de angiotensina II en estos

animales. A pesar del importante daño vascular observado por estos investigadores tras 30 días de tratamiento con mercurio, no se observaron sin embargo, cambios en los valores de presión arterial en estos animales (Wiggers *et al.*, 2008; Peçanha *et al.*, 2010; Furieri *et al.*, 2011a; Wiggers *et al.*, 2016). Sin embargo, cuando el tratamiento con esa dosis se alargó hasta los 60 días, con el objetivo de simular una exposición en las ratas similar a la exposición ocupacional del ser humano, se observó un incremento en los valores de presión arterial de los animales, que se pudieron relacionar con los daños vasculares producidos por dicho tratamiento (Rizetti *et al.*, 2017). Para investigar el efecto que produce sobre el sistema cardiovascular la administración del hidrolizado de clara de huevo en ratas tratadas con mercurio de forma crónica, en la presente Tesis Doctoral, medimos la presión arterial de las ratas de todos los grupos experimentales, y estudiamos además la funcionalidad vascular en todos ellos. Las alteraciones cardiovasculares que se observaron en las ratas tras la exposición a mercurio, que comentaremos en detalle más adelante, corroboran en parte y amplían los hallazgos encontrados por Rizzetti *et al.* (2017).

En esta Tesis Doctoral, las ratas tratadas con mercurio presentaron niveles mayores de presión arterial que las ratas del grupo control, tal y como demostraron Rizzetti *et al.*, (2017). Nuestros resultados demostraron que la administración del hidrolizado de clara de huevo fue capaz de prevenir el aumento de la presión arterial ocasionado en las ratas por la exposición crónica, durante 60 días, a bajas concentraciones de mercurio, y también que este hidrolizado prevenía el daño vascular producido por dicha exposición. La actividad antihipertensiva del hidrolizado de clara de huevo administrado en este estudio, ya se había demostrado en otros modelos experimentales de hipertensión (Miguel *et al.*, 2005 y 2006). Más aún, alguno de los péptidos identificados en este hidrolizado, se caracterizaron también como antihipertensivos, antioxidantes y vasodilatadores (Miguel *et al.*, 2007a y 2007b). La reducción de la presión arterial observada en aquellos estudios se pudo relacionar además con una reducción del estrés oxidativo y una disminución de la actividad de la ECA (Miguel *et al.*, 2007a; Manso *et al.*, 2008). De hecho, existen otros hidrolizados de proteínas (leche, arroz o soja)

que han demostrado también capacidad para disminuir la presión arterial de los animales hipertensos y mejorar las alteraciones vasculares asociadas a través de mecanismos similares (Hirota *et al.*, 2011; Boonla *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017).

Existen varios factores que controlan los niveles de presión arterial en el organismo. Los cambios en la reactividad del músculo liso vascular se consideran una de las principales causas de hipertensión. El endotelio vascular juega asimismo un papel esencial en la regulación del flujo sanguíneo y en el mantenimiento del tono vascular, mediante la liberación de factores vasodilatadores y vasoconstrictores. Hoy día se sabe también que el estrés oxidativo, ocasionado por el desequilibrio entre la producción y neutralización de radicales libres, puede facilitar un aumento en los niveles de presión arterial. Desde hace muchos años se reconoce también la importancia del sistema renina-angiotensina en el control de la presión arterial. En los estudios previos, llevados a cabo para establecer el modelo experimental de exposición a bajas dosis de mercurio que hemos utilizado en esta Tesis Doctoral, se pudieron ya relacionar las modificaciones de estos mecanismos con las alteraciones cardiovasculares que producía la exposición a este metal, tanto durante 30, como durante 60 días, y se investigó además si alguno de estos mecanismos estaba implicado en el efecto que producía la administración del hidrolizado de clara de huevo en las ratas tratadas con mercurio.

En esta Tesis Doctoral, se evaluó la respuesta contráctil a KCl 75 mM de una arteria de conductancia, la aorta, de los distintos grupos de ratas. Los resultados obtenidos tras administrar KCl en las preparaciones de aorta no mostraron diferencias en la respuesta contráctil de los distintos grupos experimentales, lo que indica que este tejido tiene una capacidad de despolarización máxima similar en los diferentes grupos. Al evaluar la respuesta contráctil a fenilefrina, se observó un aumento de esta respuesta en los anillos de aorta de las ratas tratadas con mercurio, y también se observó en las aortas de este grupo de animales una menor respuesta vasodilatadora a acetilcolina. Todo ello apunta a que las ratas tratadas con mercurio acusan

una disfunción endotelial, que sin lugar a dudas condiciona la respuesta contráctil de la arteria cuando se estimulan receptores alfa-1. Esta disfunción endotelial posiblemente no se manifiesta cuando se administra el hidrolizado de clara de huevo además del mercurio, dado que las aortas de las ratas tratadas con ambos compuestos no acusaron diferencias en las respuestas mencionadas cuando las mismas se compararon con las respuestas de las aortas de las ratas control. Las respuestas vasodilatadoras a nitroprusiato sódico fueron similares en todos los grupos, posiblemente porque este agente ocasiona una vasodilatación independiente de endotelio y el mercurio no alteraría la capacidad de este músculo para relajarse. El hidrolizado de clara de huevo posiblemente tampoco alteraría esta capacidad del músculo vascular para relajarse, pero podría mejorar la respuesta vasodilatadora del mismo dependiente de endotelio.

La disfunción endotelial se puede caracterizar por una respuesta vasodilatadora a acetilcolina reducida, como consecuencia principalmente de una menor liberación de NO por este agente. Varios autores han relacionado la aparición de disfunción endotelial con un aumento del estrés oxidativo, y se ha demostrado en distintos modelos experimentales que en esta situación existe un aumento de ROS en diferentes lechos vasculares, tales como las arterias coronarias (Katakam *et al.*, 2005), las arterias cerebrales (Phillips *et al.*, 2005) o la arteria femoral (Frisbee *et al.*, 2002). También se ha descrito que el aumento en la producción de anión superóxido produce un daño significativo en la vasodilatación mediada por NO, tanto en arterias mesentéricas de resistencia (Moral-Sanz *et al.*, 2011), como en arterias de conductancia (Wang *et al.*, 1998), y se ha propuesto que el tratamiento con algunos fármacos (IECAs y estatinas) puede mejorar esta vasodilatación a través de una reducción del estrés oxidativo en el tejido vascular (Erdös *et al.*, 2006; Shinozaki *et al.*, 2007).

Está ampliamente descrito que el endotelio modula las respuestas a diferentes vasoconstrictores en distintos lechos vasculares. Así, la eliminación del endotelio potencia las respuestas contráctiles inducidas por fenilefrina en aorta de rata (Rossoni *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 2008). Esto también ocurrió

en nuestro estudio cuando se retiró el endotelio en las preparaciones de la aorta de estos animales, y pudimos corroborar así la modulación de dichas respuestas por factores endoteliales. Sin embargo, la eliminación del endotelio en el grupo de ratas tratadas con mercurio potenció mucho menos esta respuesta, lo que sugiere la existencia de mediadores de naturaleza contráctil no dependientes de endotelio implicados en dicha respuesta. En el caso de los animales tratados conjuntamente con mercurio y también con el hidrolizado de clara de huevo, se observó sin embargo una respuesta similar a las de las ratas del grupo control.

Para averiguar el mecanismo implicado en modulación de la respuesta contráctil a fenilefrina que ocasionaba el hidrolizado de la clara de huevo en las ratas tratadas con mercurio, se realizaron diferentes ensayos en las aortas de los animales de los diferentes grupos experimentales en ausencia y presencia de distintos fármacos.

Para investigar la participación de NO en la respuesta contráctil se llevaron a cabo experimentos en ausencia y presencia de L-NAME. Se sabe que, en arterias de conductancia, la inhibición de la NOS potencia las respuestas vasoconstrictoras a fenilefrina (Dowell *et al.*, 1999; Rossoni *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2008). La inhibición de esta enzima con L-NAME potenció de hecho las respuestas de fenilefrina en las aortas de todos nuestros grupos experimentales. Este potenciamiento fue menos llamativo en las aortas de animales tratados con mercurio, pero volvió a ser manifiesto en las aortas de los animales tratados con mercurio e hidrolizado de clara de huevo, lo que sugiere que el hidrolizado de clara de huevo es capaz de aumentar la biodisponibilidad del NO en este lecho vascular, pudiendo evitar así la disfunción endotelial y el aumento de la presión arterial causados por el mercurio. Estudios previos en ratas Zucker demostraron también una mayor participación del NO en las respuestas vasodilatadoras y en la modulación de las respuestas contráctiles de las arterias de los animales que recibían este mismo hidrolizado de clara de huevo que se utiliza en esta Tesis Doctoral (Garcés-Rimón, 2013).

Las ROS juegan un importante papel en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, incluyendo la hipertensión. En estas enfermedades se ha descrito un exceso en la producción de oxidantes, una disminución de la biodisponibilidad de NO y una disminución de la capacidad antioxidante vascular (Paravicini y Touyz, 2008). El anión superóxido, uno de los radicales libres con mayor poder oxidante, produce efectos vasoconstrictores directos en muchos lechos vasculares (Shen *et al.*, 2000; Hernanz *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2008), y participa además en las respuestas vasoconstrictoras de otros agonistas (Yang *et al.*, 2008; Alvarez *et al.*, 2008). Así, la angiotensina II aumenta la producción de anión superóxido por activación de la NADPH oxidasa en distintos tipos de células (Lyle y Griendling, 2006; Metha y Griendling., 2007; Paravicini y Touyz, 2008); y este anión superóxido puede combinarse con el NO y disminuir así su biodisponibilidad.

El consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina había ocasionado una disminución del estrés oxidativo en estudios anteriores (Manso *et al.*, 2008; Garcés-Rimón *et al.*, 2016a), y cabe suponer que esa disminución del estrés oxidativo pueda justificar también los resultados obtenidos en los que se observa una disminución de la presión arterial y una mejora de la función endotelial tras el tratamiento con el hidrolizado de clara de huevo. En esta Tesis Doctoral investigamos también si el anión superóxido participaba en la respuesta contráctil de fenilefrina, y para ello incubamos las preparaciones de aorta en presencia o ausencia de apocinina, un compuesto inhibidor de la NADPH oxidasa. Los resultados demostraron que el anión superóxido condicionaba esta respuesta, ya que la misma se redujo en presencia de este inhibidor, y la reducción fue mayor en las arterias de los animales tratados con mercurio que probablemente acusaban un incremento de estas especies reactivas. Heumuller *et al.*, (2008) y Riganti *et al.*, (2008) demostraron que la apocinina podría reducir además la biodisponibilidad de las ROS por sus efectos antioxidantes, independientemente de su capacidad para inhibir la NADPH oxidasa. Los resultados obtenidos tras la incubación con apocinina en las aortas de los animales expuestos a mercurio y que consumían además el hidrolizado de huevo, sugieren que el consumo de este

hidrolizado podría atenuar el exceso de producción de ROS, y concretamente el exceso de producción de anión superóxido, que probablemente está vinculado a la exposición a este metal.

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que transforma el anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, y la reacción en la que participa puede identificarse como un mecanismo antioxidante, ya que el peróxido de hidrógeno es más estable que el anión superóxido y difunde con mayor facilidad a través de las membranas celulares, por lo que se considera incluso un importante segundo mensajero en la señalización del músculo liso. No obstante, su papel sobre el tono muscular continúa siendo motivo de controversia (Ardanaz y Pagano, 2006). En esta Tesis Doctoral, se analizó también cómo condicionaba el anión superóxido la respuesta a fenilefrina en las aortas de los distintos grupos experimentales y, para ello, las correspondientes preparaciones de esta arteria se ensayaron en presencia y ausencia de SOD. Los resultados en las arterias de los animales tratados con mercurio sugirieron también en este caso que estos animales tienen mayor cantidad de anión superóxido, y los resultados en las arterias de animales expuestos a mercurio y tratados con el hidrolizado de clara de huevo también sugirieron que este hidrolizado podría normalizar el exceso de este anión que podría ocasionar la exposición a mercurio.

Los resultados obtenidos en los baños de órganos con las preparaciones de aorta se complementaron con las medidas de la producción basal de anión superóxido en este tejido en los diferentes grupos experimentales. La mayor producción de anión superóxido se obtuvo en las arterias de las ratas tratadas con mercurio, pero esta producción del anión superóxido se atenuaba en las arterias de los animales expuestos a este metal a los que además se les suministraba el hidrolizado de clara de huevo. Todo ello confirmó que el hidrolizado de clara de huevo era capaz de reducir los niveles de anión superóxido en la aorta, y mejorar así la disfunción vascular ocasionada por este metal. Estos datos concuerdan además con los niveles de mercurio medidos en la aorta (grupo control  $1,08 \pm 0,29$  ng/g) que aumentaron de forma significativa en el grupo de animales tratado con

mercurio ( $2,66 \pm 0,07$  ng/g) y disminuyó claramente en los animales que además de mercurio recibieron tratamiento con clara de huevo ( $1.60 \pm 0.34$  ng/g). También se determinó la concentración de mercurio en el corazón y se observó un aumento de los niveles de este metal en los dos grupos de animales que recibieron tratamiento con mercurio respecto a los animales del grupo control. Estos elevados niveles no se vieron modificados tras el consumo de hidrolizado de clara de huevo en las ratas que además estaban expuestas a mercurio. A pesar de estos niveles aumentados de mercurio encontrados, no se observaron sin embargo alteraciones en la histología del tejido cardíaco entre los animales de los diferentes grupos experimentales.

Los prostanoïdes producidos por la COX a partir del ácido araquidónico, también participan en la modulación del tono vascular, y condicionan, tanto el tono basal, como la respuesta vascular tras la estimulación con diferentes agonistas (Dellipizzi *et al.*, 1997; Hernanz *et al.*, 2003; Bolla *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Quisimos estudiar el papel que jugaban los prostanoïdes derivados de la COX en la respuesta contráctil de fenilefrina, y se realizaron para ello experimentos en las aortas de los diferentes grupos experimentales en presencia y ausencia de indometacina, fármaco que inhibe tanto la isoforma constitutiva de la COX (COX-1) como la isoforma inducible de este enzima (COX-2). También se realizaron experimentos en las aortas de los diferentes grupos experimentales en presencia y ausencia de NS-398, fármaco que inhibe específicamente la isoforma inducible de la COX (COX-2). La incubación con Indometacina o con NS-398 redujo la repuesta a fenilefrina en los anillos de aorta de todos los grupos estudiados. Con ambos fármacos, la disminución fue mayor en las aortas de las ratas tratadas con mercurio, lo que indica un aumento de la actividad de la COX, y más específicamente de la COX-2 en las aortas de las ratas tratadas con mercurio, con la correspondiente modificación de la respuesta a fenilefrina. La administración del hidrolizado de clara de huevo atenuó las diferencias, probablemente porque este hidrolizado fue capaz de evitar el incremento en la actividad de la COX que pudiera manifestarse en las arterias de las ratas expuestas a mercurio. Es importante señalar que, en estudios previos, algunos de los péptidos que contiene el hidrolizado de clara

de huevo han demostrado que pueden inhibir la expresión de la COX-2 en los fibroblastos que se localizan en la adventicia, tras la estimulación de los mismos por angiotensina II (Garcés *et al.*, 2018). Recientemente, también se ha demostrado la capacidad de otros componentes alimentarios, y también la de otros hidrolizados y péptidos derivados de proteínas alimentarias para inhibir la COX-2 (Ahn *et al.*, 2015; Zielińska *et al.*, 2017).

El sistema renina-angiotensina está directamente implicado en el control de la presión arterial y la actividad de este sistema es fundamental para la regulación del tono arterial. El sistema renina-angiotensina ejerce su acción a través de diferentes mecanismos que dependen de la producción de aldosterona y angiotensina II. La excesiva producción de angiotensina II favorece la vasoconstricción, la secreción de aldosterona y la retención de agua y sodio (Wolf *et al.*, 2003). La angiotensina II es además una de las principales fuentes de anión superóxido a nivel vascular (Van Thiel *et al.*, 2015). Estudios anteriores realizados con hidrolizados de proteínas alimentarias en ratas espontáneamente hipertensas ya sugirieron una relación entre la inhibición del sistema renina angiotensina, el aumento de los sistemas antioxidantes y la reducción de los niveles de ROS (Manso *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011, Boolna 2015).

Las acciones fisiopatológicas de la angiotensina II son consecuencia de su interacción con receptores específicos localizados en la superficie de la membrana de las células diana (Tamargo *et al.*, 2006). Hoy en día se sabe que existen, al menos, 2 tipos de receptores denominados AT1 y AT2. Los receptores AT1 se distribuyen por todos los tejidos del adulto, y aparecen en particular en el corazón, los vasos, el riñón, el endotelio y el sistema nervioso central. Los receptores AT2 predominan en los tejidos fetales y disminuyen tras el nacimiento. En el adulto sano se encuentran en pequeñas cantidades en el riñón, las glándulas adrenales, el corazón, el cerebro, el útero y el testículo (De Gasparo *et al.*, 2000). El hallazgo de que las principales acciones fisiopatológicas de la angiotensina II están mediadas por la estimulación de los receptores AT1, fue la base para el desarrollo de fármacos capaces de bloquear específicamente estos receptores, denominados antagonistas de los

receptores de la angiotensina II o ARA-II (Timmermans *et al.*, 1993; Griendling *et al.*, 1996; Tamargo 2000; Burnier 2001). Los ARA-II producen un bloqueo competitivo y selectivo de los receptores AT1, inhibiendo las acciones de la angiotensina II mediadas por ellos. Su afinidad por los receptores AT1 es entre 10.000 y 30.000 veces mayor que por los receptores AT2, por lo que a concentraciones fisiológicas no bloquean a los AT2 (Goa *et al.*, 1996). En los últimos años, ensayos clínicos controlados han demostrado que los ARA-II son los fármacos de elección en el tratamiento de la hipertensión arterial, la insuficiencia cardiaca y la nefropatía en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Tamargo *et al.*, 2006).

Uno de los mecanismos más estudiados y que está involucrado en el efecto antihipertensivo de los péptidos de origen alimentario, es la inhibición de la ECA. La actividad de esta enzima resulta decisiva para la eficacia de un sistema, el sistema renina-angiotensina, que juega un papel crucial en el mantenimiento de la tensión arterial, y en el daño orgánico secundario a la elevación de esta variable. En esta Tesis Doctoral, para analizar si el sistema renina angiotensina local estaba involucrado en los efectos ocasionados por el hidrolizado de clara de huevo sobre las alteraciones vasculares ocasionadas por el tratamiento con mercurio, se llevaron a cabo experimentos en los que los anillos de aorta de los diferentes grupos se contraían con fenilefrina en presencia y ausencia de losartán, un fármaco ARA II.

El tratamiento con losartán redujo la respuesta a fenilefrina en las arterias de todos los grupos experimentales del estudio, pero esta reducción fue mayor en el grupo de animales tratado con mercurio, lo que indica que el sistema renina angiotensina está involucrado en el daño vascular causado por la exposición a este metal. Las modificaciones de la angiotensina II y de los receptores AT1 que se producen cuando tiene lugar una exposición a mercurio permanecen por esclarecer, en algunos estudios, la exposición a mercurio se ha relacionado con un aumento de los niveles de angiotensina II y una disminución de la expresión de receptores AT1 en aorta (Lemos *et al.*, 2012). En los estudios en los que tenía lugar una expresión de receptores, en una exposición crónica a bajas concentraciones de mercurio durante 30 días,

mencionados anteriormente, se observó, contrariamente, un aumento de los niveles del mRNA de los receptores AT1 (Peçanha *et al.*, 2010). La llamativa reducción de la contracción observada en las aortas de las ratas tratadas con mercurio, no fue tan evidente en el grupo de ratas que además de mercurio recibieron hidrolizado de clara de huevo, por lo que cabe suponer que el hidrolizado de clara de huevo sea el responsable de las modificaciones sobre la angiotensina o sus receptores que pudiera ocasionar la exposición a mercurio.

La ECA es una enzima multifactorial que está localizada en diferentes tejidos, y que, como hemos mencionado anteriormente, está implicada en la regulación de varios sistemas importantes para el control de la presión arterial. La ECA cataliza la formación de angiotensina I en angiotensina II, un octapéptido con una potente acción vasoconstrictora y, además, inactiva la bradiquinina, que produce vasodilatación. La actividad de esta enzima puede aumentar en patologías como la hipertensión arterial, la obesidad y la DM2. La inhibición de la ECA impide la transformación de la angiotensina I en angiotensina II, bloqueando así la cascada de reacciones propia del sistema renina-angiotensina. Sin embargo, cuando se inhibe la ECA, no se bloquea totalmente la producción de angiotensina II. Esto se debe en parte a que la transformación de la angiotensina I en angiotensina II también se produce por acción de determinadas enzimas denominadas quinasas (Husain, 1993). La inhibición de la ECA puede, por lo tanto, facilitar el control de la hipertensión y otras patologías, y los inhibidores de la ECA son un tratamiento de primera elección en pacientes hipertensos. La participación de la ECA en las modificaciones del sistema renina-angiotensina que ocasiona el mercurio también se ha investigado. De hecho, en algunos estudios, la exposición a mercurio se ha relacionado con un aumento del sistema renina angiotensina local a través de un aumento en la actividad de la ECA (Lemos *et al.*, 2012). En los animales con exposición crónica a bajas concentraciones de mercurio durante 30 días se observó también un incremento de la actividad de esta enzima en el plasma. Este hecho se relacionó con el aumento de la reactividad vascular y del estrés oxidativo que se observaba en la aorta de las ratas tratadas con este metal (Peçanha *et al.*, 2010). La mayoría de los péptidos

antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias inhiben la ECA *in vitro* y su efecto sobre la presión arterial se ha relacionado con la inhibición de esta enzima. Sin embargo, son muy pocos los estudios llevados a cabo para investigar la modificación de la actividad de esta enzima en el organismo con estos péptidos. Nuestro grupo de investigación demostró que tras la administración de un hidrolizado de proteínas de huevo similar al administrado en este estudio se inhibía la actividad de la ECA en aorta y riñones, y se sugirió que este mecanismo podría ser el responsable del efecto antihipertensivo observado tras la administración oral del hidrolizado en ratas SHR (Miguel *et al.*, 2007b). En la presente Tesis Doctoral, nos propusimos también evaluar la posibilidad de que la administración del hidrolizado de clara de huevo pudiese prevenir los cambios sobre la actividad de la ECA que ocasiona la exposición a mercurio.

En esta Tesis Doctoral, hemos observado un descenso en la actividad de la ECA en el plasma en los grupos de ratas tratadas con mercurio, y este descenso fue mucho mayor en el grupo que recibió el tratamiento con el hidrolizado de clara de huevo. Estos resultados sugieren, que el tratamiento con mercurio durante 60 días podría producir una activación de los sistemas de inhibición de la ECA como mecanismo compensatorio para contrarrestar la elevación de la angiotensina II y el estrés oxidativo ocasionados por la exposición a este metal. La menor actividad observada en el grupo que además de mercurio recibió el hidrolizado de clara de huevo, podría explicarse como el resultado de sumar este efecto ocasionado por la exposición a mercurio con la inhibición de la enzima que caracteriza a este tipo de péptidos. La inhibición de la actividad de la ECA podría estar relacionada con la mejora de los niveles de presión arterial, y podría también estar implicada en la mejora observada sobre la función arterial y el estrés oxidativo en los animales que consumían el hidrolizado de clara de huevo.

Por otra parte, se ha descrito también una relación entre las vías de angiotensina II y la COX-2 en diversos modelos animales de hipertensión (Martínez-Revelles *et al.*, 2013). Sin embargo, esta relación en modelos experimentales de exposición a metales pesados no está del todo clara

(Mohammadi-Bardbori y Rannug, 2014). En nuestro estudio parece que el hidrolizado de clara de huevo produce sus efectos sobre el sistema vascular a través de estas dos vías, aunque serían necesarios más experimentos para establecer el nivel de implicación de cada una de ellas, no solo en el efecto tóxico que ocasiona el mercurio, sino también en los mecanismos de regulación que presenta el hidrolizado de clara de huevo. En algunos estudios se ha demostrado que la exposición a mercurio produce un aumento de la liberación local de angiotensina II, como consecuencia del aumento de la actividad de la ECA, probablemente ocasionado por un aumento de la actividad de COX-2, NADPH oxidasa y el consecuente aumento de formación de ROS a nivel vascular (Lemos *et al.*, 2012; Aguado *et al.*, 2013). Curiosamente, esta relación entre las ROS y los prostanoïdes derivados de la COX2 a nivel vascular fue también observada en nuestro estudio, en la que se ha demostrado la participación de estos dos mecanismos en las alteraciones vasculares ocasionadas por la exposición a mercurio. En otros estudios se ha demostrado que algunos de los péptidos que están presentes en el hidrolizado de clara de huevo, pueden inhibir la expresión de COX-2 en fibroblastos adventiciales estimulados con angiotensina II (Garcés-Rimón *et al.*, 2018). Recientemente también se ha demostrado la capacidad de otros componentes alimentarios (Niu *et al.*, 2014; Hanáková *et al.*, 2017) y también otros hidrolizados y péptidos derivados de proteínas alimentarias capaces de inhibir esta enzima (Millán-Linares *et al.*, 2014; Zielińska *et al.*, 2017; Jahandideh *et al.*, 2017).

En resumen, los resultados obtenidos en los experimentos de reactividad vascular muestran que el consumo de hidrolizado de clara de huevo es capaz de prevenir el daño vascular ocasionado por la exposición a mercurio, principalmente a través de una mejora del estrés oxidativo a nivel vascular, en el que intervienen distintas vías de señalización.

Ya se ha mencionado que uno de los mecanismos que está implicado en las alteraciones observadas tras la exposición a metales pesados, y concretamente tras la exposición a mercurio, es el aumento del estrés oxidativo (Jan *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta

ahora en esta Tesis Doctoral, en los que se confirma un aumento de estrés oxidativo en los animales tratados con mercurio, y con los resultados obtenidos cuando se administra de forma conjunta el mercurio y el hidrolizado de clara de huevo sobre el daño oxidativo, se decidió evaluar en los animales algunos marcadores relacionados con el estrés oxidativo. Se evaluaron concretamente las concentraciones plasmáticas de malonildialdehído (MDA), la capacidad antioxidante del plasma (ORAC) y los niveles de glutatión reducido en el hígado de los animales, con el objetivo de conocer su estado redox y su grado de protección antioxidante, y finalmente interpretar mejor los mecanismos implicados en las acciones del hidrolizado de clara de huevo estudiado.

La determinación de los niveles de MDA permite medir el grado de peroxidación lipídica. Los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y de las lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, y estos ácidos grasos peroxidados sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando MDA. Así pues, la concentración sérica de MDA es proporcional a la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados oxidados. El aumento significativo de los niveles de MDA y por lo tanto del grado de peroxidación lipídica en el grupo de animales tratado con mercurio, no se observó sin embargo en las ratas que además de mercurio se habían tratado con hidrolizado de clara huevo. Los lípidos son las moléculas más sensibles a las ROS. En los organismos aerobios, los fosfolípidos de las membranas celulares están continuamente expuestos a la oxidación por fuentes endógenas o exógenas, y la peroxidación lipídica se considera por ello el principal mecanismo responsable en el desarrollo de patologías tales como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades neurodegenerativas, debido a las alteraciones que se producen en la integridad, fluidez y permeabilidad de las membranas de las células (Nikki 2009). Los productos de la peroxidación lipídica, entre los que se encuentra el MDA, son muy reactivos y potencialmente tóxicos. De hecho, el mecanismo de peroxidación lipídica se ha propuesto como uno de los mecanismos asociado con los efectos tóxicos producidos por los metales pesados (Jan *et al.*, 2015), y ya se había observado un aumento de los niveles

de peroxidación lipídica en estudios previos en ratas con exposición a mercurio durante 30 y 60 días (Wiggers *et al.*, 2008; Rizzetti *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que el aumento de los niveles de MDA producido en los animales tratados con mercurio podría reducirse con el consumo del hidrolizado de clara de huevo. También se observó una reducción en los niveles de MDA, en otro estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, tras la administración de un hidrolizado de clara de huevo similar al utilizado en esta Tesis Doctoral a las ratas SHR, un modelo animal de hipertensión que también presenta estrés oxidativo (Manso *et al.*, 2008). El consumo de otros hidrolizados proteicos ha ocasionado también una disminución en los niveles de peroxidación lipídica en otros modelos experimentales (Zhu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Xue *et al.*, 2012).

Como bien se sabe, las ROS se generan en la mitocondria como parte del metabolismo celular, y provienen también de distintos contaminantes ambientales. Las ROS son altamente reactivas y, si no se neutralizan, dañan o destruyen distintos componentes celulares tales como la membrana celular, los ácidos nucleicos y las proteínas. En el organismo existen distintos sistemas antioxidantes que ayudan a mantener un estado de equilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes. La capacidad antioxidante total del plasma puede medirse con distintas técnicas. Una de ellas, muy utilizada por diversos investigadores, y también por nuestro grupo de investigación, es el ensayo fluorimétrico que determina la capacidad del plasma para neutralizar radicales peroxilo (ORAC). Para saber si existían diferencias en la capacidad antioxidante de las diversas muestras de plasma de los diferentes grupos experimentales de esta Tesis Doctoral, se determinó su actividad antioxidante por el método ORAC. Existen diferentes métodos para evaluar la capacidad antioxidante de un compuesto, y esta actividad antioxidante puede ejercerse a través de diferentes mecanismos. En el método utilizado en esta Tesis Doctoral las muestras actúan como donantes de electrones para neutralizar los radicales peroxilo. Este método (ORAC) destaca entre todos los ensayos disponibles por su alta sensibilidad, precisión y reproducibilidad. Además, los radicales peroxilo son especies reactivas comparables a las ROS biológicamente generadas en el organismo.

El grupo de animales tratado con mercurio mostró una disminución de la capacidad antioxidante en el plasma. Es importante señalar que los sistemas de defensa antioxidantes de origen enzimático constituyen una de las primeras líneas de defensa ante el aumento del estrés oxidativo en el organismo, y la exposición a metales pesados como el mercurio se ha relacionado con la inhibición de algunos de estos sistemas de defensa antioxidantes de origen enzimático, principalmente por la afinidad que tiene el mercurio por los grupos tiol que contienen algunas de las enzimas antioxidantes (Jan *et al.*, 2015). En nuestro estudio, las ratas tratadas con mercurio mostraron un aumento de la peroxidación lipídica en el plasma y esto podría afectar los sistemas de defensa antioxidante y encontrarse por ello disminuidos en este grupo de animales. Sin embargo, las ratas que además de mercurio recibieron el hidrolizado de clara de huevo no mostraron esa disminución en la defensa antioxidante del plasma, pero hay que recordar que tampoco mostraron niveles aumentados de MDA, y este puede ser el motivo por el que la defensa antioxidante del plasma no se vea afectada en este grupo experimental. En otros estudios, el consumo de otros hidrolizados de proteínas ocasionó sin embargo un aumento de los sistemas de defensa antioxidante produciendo un aumento de la capacidad antioxidante total tanto en humanos como en animales de experimentación (Zhu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011).

El glutatión es una pequeña molécula compuesta por tres aminoácidos (ácido glutámico, glicina y cisteína), que funciona como un agente reductor no enzimático. Esta proteína está controlada homeostáticamente tanto fuera como dentro de la célula, de forma que se utiliza y regenera para mantener niveles adecuados disponibles en todo momento. Puede considerarse el principal antioxidante intracelular, y su déficit puede implicar la muerte celular. Existe en dos formas: la activa o reducida, y la forma oxidada que es inactiva. La forma oxidada raramente sobrepasa el 10% de la concentración total de glutatión, y la vulnerabilidad celular aumenta cuando los niveles de glutatión reducido representan menos del 90% de la concentración total de glutatión. La relación glutatión reducido/glutatión oxidado puede ser, en realidad, un

indicador claro del estrés oxidativo, ya que el glutatión reducido es capaz de eliminar especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres. La producción de glutatión es sobre todo importante en el hígado. Allí, esta molécula se utiliza para conjugar los compuestos tóxicos y permite así que se expulsen del organismo. Desde el hígado esta molécula puede exportarse a otras partes, siempre y cuando sus niveles sean los adecuados. La determinación de las concentraciones hepáticas de glutatión, en los distintos grupos experimentales, nos pareció que podía resultar útil, y que podía ayudar a conocer e interpretar los mecanismos implicados en el efecto tóxico del mercurio y en el efecto protector del hidrolizado cuando existe exposición a mercurio. A la vista de los resultados obtenidos en este tejido, se observa que existe un mecanismo compensador a nivel local en el hígado y en los animales tratados con mercurio se produce un aumento de los niveles de glutatión reducido, aumento que es incluso significativamente más alto en los animales que además de mercurio recibieron el tratamiento con hidrolizado de clara de huevo. Esto puede indicar que este último grupo de animales, además de la respuesta fisiológica realizada para neutralizar el mercurio, es capaz de aumentar mucho más la defensa antioxidante no enzimática del organismo lo que podría resultar beneficioso en multitud de patologías asociadas al estrés oxidativo. Sin embargo, los estudios histológicos no revelaron diferencias significativas en el hígado entre los diferentes grupos experimentales, y por lo tanto a las dosis administradas y durante el periodo de duración del tratamiento no se desarrollaron alteraciones en este órgano.

Ya se ha comentado que, en general, los niveles elevados de metales pesados inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), y que, como respuesta a ese estrés, la célula presenta mecanismos antioxidantes de origen enzimático, y sistemas no enzimáticos como el glutatión reducido (Xu *et al.*, 2010). Uno de los mecanismos que mejor se han definido sobre el proceso de detoxificación de metales pesados mediante quelación es a través del glutatión reducido (Pantoja *et al.*, 2016). Esta molécula tiene la capacidad de formar complejos con diferentes metales. Se ha demostrado que los metales pueden formar complejos estables cuando se combinan con los grupos sulfidrilos de la molécula de glutatión reducido en una

ratio 1:2 (ion metálico: glutatión reducido (Clarkson *et al.*, 2009). Es posible que el aumento observado en los niveles de esta molécula en el grupo de animales tratado con mercurio se haya producido como consecuencia de este mecanismo de quelación.

Se ha descrito también la existencia de un desequilibrio en el sistema inmunológico inducido por la exposición a metales pesados, que puede llevar a una producción inadecuada o excesiva de citoquinas inflamatorias, y desencadenar así procesos inflamatorios y patologías autoinmunes (Boujbiha *et al.*, 2009; Boujbiha *et al.*, 2011). Los daños oxidativos ocasionados por la exposición a mercurio también se han relacionado con la pérdida de actividad enzimática y la pérdida de la integridad estructural de las enzimas, con la consiguiente activación de procesos inflamatorios (Ansar, 2016). El TNF- $\alpha$  es una citoquina proinflamatoria descrita por primera vez en el año 1975. Es producida principalmente por los macrófagos activados, que tiene importantes funciones en los sistemas de defensa del cuerpo humano y que es capaz de regular procesos de inmunidad, inflamación, hemostasia y angiogénesis. Sin embargo, un exceso de producción a nivel local o sistémico de este factor puede ocasionar graves daños y ser, en parte, responsable de algunos de los efectos patológicos que acontecen en una gran variedad de enfermedades inflamatorias, como la aterosclerosis, colitis ulcerativa, enfermedad de Cohn, entre otras (Rodríguez-Maldonado *et al.*, 2001). Otro de los efectos del TNF- $\alpha$  consiste en inhibir la actividad de la lipoproteína lipasa, lo que podría desfavorecer la utilización de ácidos grasos e inducir la síntesis de proteínas de fase aguda (Morin *et al.*, 1995; Permuter *et al.*, 1986). En estudios anteriores ya se había demostrado la implicación del TNF- $\alpha$  en los efectos tóxicos ocasionados por metales pesados (Kayama *et al.*, 1995; Iwai-Shimada *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han demostrado que el tratamiento con mercurio ocasionó un aumento de los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  en los animales que recibieron tratamiento con mercurio. Entre las alteraciones que provoca, se ha demostrado que esta citoquina proinflamatoria provoca disfunción en las células endoteliales mediante la inducción de cambios tanto a nivel morfológico como funcional (Cavender *et al.*, 1989; Becker *et al.*, 2000), y esto se considera clave en la

regulación del proceso aterogénico (Rodríguez-Maldonado *et al.*, 2001). Estas observaciones se corresponden con las alteraciones observadas en la función vascular de los animales tratados con mercurio. Un estudio reciente también sugiere que el TNF- $\alpha$  podría estar implicado en el daño selectivo que ocasiona la exposición a metilmercurio sobre el sistema nervioso central (Iwai-Shimada *et al.*, 2016).

En los animales que recibieron el hidrolizado de clara de huevo además del tratamiento con mercurio se observó sin embargo el mismo aumento en los niveles de esta citoquina proinflamatoria que en aquellos que solo recibían el mercurio. Esto resultó sorprendente, ya que estudios previos habían demostrado la actividad anintinflamatoria *in vitro* del hidrolizado de clara de huevo, y también se había observado que la administración de este mismo hidrolizado de clara de huevo en ratas Zucker obesas mejoraba significativamente el estado proinflamatorio de estos animales, disminuyendo los niveles plasmáticos del TNF- $\alpha$  (Garcés-Rimón *et al.*, 2015). Es importante destacar además que la administración de este hidrolizado de clara de huevo en las ratas expuestas a mercurio ocasionó una importante reducción de la participación de COX-2 en la toxicidad producida por este metal, y ello parece indicar que existiría a pesar de todo una mejora de la inflamación a nivel vascular. Debido a los resultados mencionados anteriormente, es posible que la mejora observada en la funcionalidad de la aorta de los animales que además de mercurio recibieron el hidrolizado de clara de huevo, no se relacione principalmente con un mecanismo antiinflamatorio, si no con un mecanismo antioxidante que reduce el estado oxidativo de los animales a diferentes niveles.

Recientemente, se han llevado a cabo estudios para investigar los efectos metabólicos que ocasiona la exposición a mercurio. Los resultados publicados no son concluyentes y, aunque la mayoría de los estudios de los últimos años sugirieron que la exposición a mercurio jugaba un papel esencial en la inducción y en el aumento de enfermedades metabólicas crónicas como la diabetes mellitus, el síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares (He *et al.*, 2013; Sargis *et al.*, 2014; Hom *et al.*, 2014; Kim *et*

*al.*, 2014; Park *et al.*, 2017), existen sin embargo otros estudios que aportan resultados controvertidos (Futatsuka *et al.*, 1996; Yoshizawa *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2013; Rhee *et al.*, 2013; Moon, 2014). En esta Tesis Doctoral, se analizaron los niveles de triglicéridos y colesterol total en plasma para conocer la situación del metabolismo lipídico en cada uno de los grupos experimentales del estudio.

Los niveles de triglicéridos en plasma aumentaron de forma significativa en el grupo de animales que recibió el tratamiento de mercurio y no se observaron diferencias significativas entre los valores de colesterol total en el plasma de los animales de los distintos grupos experimentales. Estas observaciones no se correlacionan sin embargo plenamente con lo observado en otros estudios que describen modificaciones en los niveles de triglicéridos y colesterol total en los animales sometidos a tratamiento con cloruro de mercurio (1 mg/kg/día) durante 10 días (Kawakami *et al.*, 2012). En nuestro estudio, aunque las dosis de cloruro de mercurio administrada a los animales fueron mucho más bajas que la dosis utilizada por Kawakami *et al.*, los animales estuvieron expuestos durante un periodo de tiempo más prolongado y posiblemente, debido a ello, no se activen, o estén agotados, los mecanismos de retroalimentación. Ello permitiría que aumentasen los niveles de triglicéridos en sangre. Los animales que además de mercurio recibieron hidrolizado de clara de huevo, no mostraron sin embargo niveles plasmáticos de triglicéridos elevados y sus valores fueron similares a los del grupo control.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo que subyace a este aumento de triglicéridos tras la exposición a mercurio, analizamos histológicamente el tejido adiposo epididimal de los diferentes grupos. Desde hace algunos años el tejido adiposo se considera no solo como un órgano de almacenamiento de energía, sino que se piensa que juega un papel esencial en la homeostasis de los vertebrados (Trayhurn, 2005). El tejido adiposo produce múltiples sustancias bioactivas denominadas adipocitoquinas que pueden relacionarse con efectos sobre la sensibilidad a la insulina, inflamación, la respuesta inmune y el metabolismo lipídico (Zhou y Shao, 2008). La desregulación en la secreción de las adipocitoquinas es

consecuencia de un aumento del tamaño de los adipocitos y de la infiltración de los macrófagos en el tejido adiposo, lo que ocasiona resistencia a la insulina, DM2 e hiperlipemia (Cinti *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2003). Estas observaciones sugieren la importancia del tamaño de los adipocitos y su relación con la secreción de adipocitoquinas.

El peso del tejido adiposo blanco de las ratas tratadas con mercurio fue mucho menor que el de las ratas del grupo control. Tras analizar los cortes histológicos de tejido adiposo blanco del grupo de ratas tratadas con mercurio se observó una disminución del tamaño de los adipocitos cuando se comparaban con los correspondientes cortes en las ratas control, pero no se encontraron diferencias significativas en los niveles de mercurio en el tejido adiposo entre los diferentes grupos experimentales. El tamaño de los adipocitos del tejido adiposo blanco de los animales tratados con mercurio fue significativamente menor que el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo del grupo control, siendo el número de adipocitos por unidad de área el doble en el tejido adiposo de las ratas tratadas con mercurio que en el tejido adiposo de las ratas controles. No se observaron diferencias con las ratas control, en cuanto al tamaño y número de adipocitos del tejido adiposo, ni el grupo de ratas que recibió hidrolizado de clara de huevo, ni en el grupo que recibió conjuntamente mercurio e hidrolizado de clara de huevo. No se observaron sin embargo cambios en la histología del tejido adiposo pardo. Los resultados obtenidos concuerdan con los datos descritos en la literatura en los que la exposición a cadmio y también la exposición a mercurio inducen una reducción del tamaño de los adipocitos y una reducción del tamaño del tejido adiposo blanco. Además, la reducción ocasionada tras el tratamiento con mercurio es mucho mayor que la producida por la exposición a cadmio (Kawakami *et al.*, 2010; Kawakami *et al.*, 2012). Estos autores relacionan este hecho con los efectos tóxicos que ocasiona la exposición a los metales pesados, especialmente el mercurio. De la misma forma que se observó en nuestro estudio, estos investigadores tampoco encontraron cambios en el peso del hígado en los animales tratados con mercurio, y sugieren que los cambios producidos en el tejido adiposo son consecuencia directa del efecto tóxico ocasionado por el mercurio. Esta disfunción del tejido adiposo puede

relacionarse con el incremento de los niveles de triglicéridos encontrados en nuestro estudio, ya que posiblemente la disfunción de los adipocitos no permita un adecuado almacenamiento de las grasas, y estas se acumulen en el plasma de los animales. También se ha descrito que el cadmio y el mercurio inorgánico son capaces de alterar la expresión del transportador de glucosa en cultivos de adipocitos 3T3-L1 (Barnes and Kircher, 2005). Es posible por lo tanto también suponer, que la disfunción del tejido adiposo blanco esté implicada también en las alteraciones observadas sobre el metabolismo de la glucosa.

Existen diferentes explicaciones para la posible asociación entre la exposición a metales pesados y las alteraciones del tejido adiposo (Chang *et al.*, 2011; Kawakami *et al.*, 2012). Una de ellas se relaciona con la tendencia que tienen los metales pesados a acumularse en el tejido adiposo, pero esta explicación no se corresponde con lo observado en nuestro estudio, ya que no se observaron diferencias en las concentraciones de mercurio en el tejido adiposo de los distintos grupos de animales. Se sabe que el mercurio se elimina principalmente por las heces por un proceso de excreción biliar (Skalnaya *et al.*, 2014). La alteración sobre el metabolismo lipídico observada en los animales tratados con mercurio podría ir acompañada también de una alteración en la secreción de ácidos biliares, lo que haría que eliminase el mercurio de una forma más lenta. Esta hipótesis podría justificar el daño lipotóxico observado en las preparaciones de tejido adiposo de los animales tratados únicamente con mercurio, pero sigue sin explicar porque no observamos acumulación de mercurio en este tejido en el grupo de animales expuestos a este metal.

Como se ha señalado con anterioridad, las múltiples funciones que realiza el tejido adiposo están moduladas por cambios en el tamaño de los adipocitos. Hay varias posibilidades que podrían explicar el mecanismo de acción responsable de la disminución del tamaño de los adipocitos tras la exposición a mercurio. Uno de esos mecanismos podría ser el que implica a los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs). Los PPARs están constituidos por 3 isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ). Cada una de esas

isoformas se expresa de forma constitutiva en diferentes tejidos entre los que se incluyen el hígado, el músculo y el tejido adiposo. Los PPARs juegan un importante papel en la regulación del metabolismo lipídico, la sensibilidad a la insulina, la inflamación y la diferenciación celular (Chinetti *et al.*, 2000; Yessoufou *et al.*, 2009). Sin embargo, la regulación de la expresión/activación de los PPARs por los metales pesados permanece sin esclarecer. Decidimos por ello analizar la expresión de PPARs mediante inmunohistoquímica en las preparaciones histológicas de tejido adiposo, pero no se observaron cambios significativos en ninguno de los grupos experimentales. Sin embargo, en otros estudios se ha descrito que el tratamiento con cloruro de mercurio disminuye la expresión del ARNm de los PPAR $\gamma$  en adipocitos en cultivo (Barner *et al.*, 2003).

El retículo endoplásmico (RE) es un orgánulo celular que tiene un papel esencial en múltiples procesos celulares que se requieren para el buen funcionamiento celular. Cuando el equilibrio de la célula se rompe, se acumulan en el lumen del RE, proteínas desplegadas y, como respuesta, se activa la respuesta de estrés del RE (Ron y Walter, 2007). En un primer momento esta respuesta intenta restaurar la actividad normal del RE y la homeostasis celular, pero si el estrés del RE es grave o prolongado cambia hacia un proceso de apoptosis o muerte celular programada. Esta respuesta se relaciona con varias alteraciones como isquemia, hipoxia, daño oxidativo e infecciones virales (Ron y Walter, 2007), y también con el desarrollo de varias enfermedades entre ellas, las enfermedades neurodegenerativas (Niwa *et al.*, 1999), el cáncer (Bi *et al.*, 2005), la aterosclerosis (Gao *et al.*, 2011) y el deterioro de las células  $\beta$ -pancreáticas (Ishihara *et al.*, 2004; Oyadomari *et al.*, 2002). El factor de transcripción CHOP (del inglés C/EBP homologous protein) es un componente regulador de la respuesta de estrés del RE que media la apoptosis celular y que juega también un importante papel en la respuesta pro-inflamatoria contribuyendo al desarrollo de resistencia a la insulina (Oyadomari y Mori 2004). Recientemente se ha descrito, además, que la dieta alta en grasas estimula la liberación de CHOP en los adipocitos del tejido adiposo blanco, situación que se relaciona con las alteraciones en el metabolismo de la glucosa que ocurren durante el desarrollo de obesidad

(Toru *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta la alteración observada en los adipocitos de las ratas tratadas con mercurio, y también las alteraciones observadas en estos animales sobre el metabolismo de la glucosa, decidimos evaluar la expresión de CHOP en el tejido adiposo blanco. Los resultados obtenidos tras analizar inmunohistoquímicamente los cortes de tejido adiposo blanco de los distintos grupos experimentales no revelaron diferencias significativas en la expresión de CHOP, y por lo tanto no parece que este elemento esté involucrado en los efectos que el mercurio ocasiona sobre el tejido adiposo blanco.

Otro posible mecanismo de acción que puede estar implicado, o ser responsable de la disminución del tamaño de los adipocitos, se ha relacionado con la disminución de los niveles de insulina en plasma debido al daño en la función pancreática ocasionado por el cloruro de mercurio. Estos autores sugieren que la disminución de la insulina plasmática puede ser responsable del desequilibrio que aparece entre la permeabilidad del glicerol y el nivel de expresión del transportador de ácidos grasos en el tejido adiposo (Kawakami *et al.*, 2012). Por otra parte, la muerte del adipocito puede ser uno de los factores que directamente disminuye la cantidad y el tamaño del adipocito (Cinti *et al.*, 2005), y el mercurio inorgánico causa muerte celular por necrosis o mediante apoptosis inducida por estrés oxidativo (Chen *et al.*, 2010). Un aumento de las ROS podría ser un mecanismo importante de toxicidad para el adipocito, que podría resultar en muerte celular, secreción anormal de adipocitoquinas y alteración del metabolismo de lípidos (Kamigaki *et al.*, 2005; Kojima *et al.*, 2010).

Es sobradamente conocido que el mercurio es un metal tóxico que se acumula en el organismo y especialmente en algunos tejidos. Por este motivo, decidimos evaluar los niveles de mercurio en los órganos de los distintos grupos experimentales con un doble objetivo. Por una parte, para conocer las concentraciones de mercurio acumuladas en cada tejido en los animales tratados con mercurio de nuestro estudio, y, por otra, para averiguar si la administración del hidrolizado de huevo era capaz de disminuir las concentraciones de metal en cada uno de los órganos analizados. También

quisimos ver si podíamos establecer alguna relación entre el mercurio depositado en los tejidos y las alteraciones que pudieran observarse en cada uno de los órganos o tejidos evaluados, y averiguar si el consumo del hidrolizado de clara de huevo producía algún efecto a este nivel. Algunos de los resultados de la concentración de mercurio y de los análisis histológicos obtenidos en los diferentes tejidos se han ido incluyendo a lo largo de la discusión. A continuación, se explican y discuten los resultados más relevantes observados en otros tejidos analizados como el riñón y el colon.

Las patologías renales están estrechamente relacionadas con el desarrollo de enfermedad cardiovascular, en concreto con el desarrollo de hipertensión arterial. Sin embargo, y a pesar de estas afirmaciones, y del aumento significativo de las concentraciones de mercurio observadas en los riñones de los dos grupos de animales que recibieron tratamiento con mercurio, y de que este órgano es donde se acumulan mayores cantidades de este metal, los resultados de histología no revelaron alteraciones significativas en el tejido renal de los distintos grupos, y la histología de este tejido mostró una apariencia normal en los animales de todos los grupos experimentales. Estos resultados sugieren que con las dosis de mercurio utilizadas en este estudio no se producen daños morfológicos relevantes a nivel renal. Por otro lado, se sabe que una vez formado en los hepatocitos el complejo ion metálico-glutatión reducido este complejo entra en la circulación sistémica y, una vez en el plasma, es transportado hasta los riñones (Zalups *et al.*, 1994). Dentro de los riñones, el glutatión reducido actúa como un antioxidante y protege a las células renales de daño ocasionado por el mercurio, y además también mejora la acumulación de mercurio renal al conjugarse el mercurio libre con el glutatión extracelular (Zalups *et al.*, 2000; Valko *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que observamos un aumento significativo en los niveles de glutatión reducido en los grupos tratados con mercurio, era esperable no encontrar cambios histológicos sobre este tejido, puesto que se encuentran activados los mecanismos de defensa antioxidante, aunque nos quedaría pendiente analizar si existen cambios a nivel funcional.

El tracto gastrointestinal al igual que el riñón es un órgano diana del mercurio inorgánico (Zahir *et al.*, 2005; Bridges and Zalups, 2010; Bottino 2015). La exposición, tanto aguda como crónica a mercurio causa alteraciones en el mismo, acumulación masiva de fluido intestinal y diarrea tanto en humanos como en animales (Arena, 1971; Oehme, 1972; Sasser *et al.*, 1978; Böhme *et al.*, 1992; Banerjee y Bhattacharya, 1995; McGinnis, 2001; NTP, 1993; Kamijo *et al.*, 2004; Bottino, 2015). Por ello pensamos encontrar alteraciones de la arquitectura de la pared del colon, como se han descrito en tratamientos con derivados de metales como el antitumoral cisplatino (Uranga 2017). Es más, en otros estudios, la exposición a altas dosis de cloruro de mercurio causó edema masivo intestinal de forma muy rápida en ratas y es considerada la causa de la hipovolemia fatal que se produce tras una ingesta masiva de mercurio cuando se administraba a dosis elevadas (Arena, 1971; Oehme, 1972; Kamijo *et al.*, 2004). En nuestro estudio las dosis empleadas han sido más bajas, lo que podría explicar que no hayamos encontrado un daño histológico tan evidente, aunque si se encontraron diferencias significativas en la histología del colon entre el grupo tratado únicamente con mercurio y el grupo control. Hay pocos estudios relativos a la intoxicación mercurio in vivo, pero parece que dicho metal, gracias a su capacidad de ligarse a residuos de cisteína, reduce la permeabilidad de las células gastrointestinales y puede ser, al menos en parte, la causa de los efectos observados en el tracto intestinal en este tipo de intoxicaciones (Bottino, 2015).

A la vista de todo lo anterior, creemos haber cumplido los Objetivos de esta Tesis Doctoral y, en último término, los resultados obtenidos en ella nos permiten sugerir que el hidrolizado de clara de huevo con pepsina estudiado podría utilizarse como ingrediente de un alimento funcional, para la prevención y/o tratamiento de los efectos tóxicos y las alteraciones que ocasiona la exposición a mercurio, alteraciones que están principalmente relacionadas con el aumento del estrés oxidativo que ocasiona este metal a diferentes niveles y en diferentes sistemas del cuerpo humano

## **CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados de esta Tesis Doctoral nos han llevado a las siguientes conclusiones:

1.- Los animales tratados con dosis bajas de mercurio durante 60 días presentan alteraciones en el sistema nervioso periférico (neuropatía sensorial e hiperalgesia) y en el sistema nervioso central (catalepsia). El desarrollo de estas alteraciones se relaciona con el aumento de la concentración de mercurio en el tejido cerebral y con un aumento del estrés oxidativo (aumento de ROS y peroxidación lipídica) ocasionado por la exposición a mercurio, y con alteraciones en el metabolismo de la glucosa y de la insulina que también se observan en los animales expuestos a este metal.

2. Los animales tratados conjuntamente con mercurio y con el hidrolizado de clara de huevo no manifiestan dichas alteraciones a nivel neurológico y estas ratas tampoco presentan un aumento del estrés oxidativo, ni cambios en el metabolismo de la glucosa y de la insulina.

3. Los animales tratados con bajas dosis de mercurio durante 60 días muestran también daños sobre el sistema cardiovascular. La exposición a este metal produce un aumento de presión arterial y disfunción vascular en la aorta de estos animales, principalmente mediado por un aumento del estrés oxidativo a nivel vascular, en el que intervienen distintas vías de señalización. De hecho, la producción de anión superóxido es mayor en la aorta de los animales tratados con mercurio, y también es mayor la concentración de mercurio en la aorta de estos animales.

4. Los animales tratados conjuntamente con mercurio y con el hidrolizado de clara de huevo no presentan un aumento de la presión arterial y no manifiestan las alteraciones vasculares que se observaron en los animales tratados únicamente con mercurio. Los animales que recibieron ambos tratamientos tampoco muestran un aumento en la producción de anión superóxido en la aorta, ni un aumento de los niveles de mercurio en este tejido.

5.- Los animales tratados con bajas dosis de mercurio durante 60 días presentan un aumento del estrés oxidativo a nivel sistémico, con un incremento de la peroxidación lipídica y una disminución de la capacidad antioxidante del plasma. El tratamiento con mercurio también aumenta de forma significativa los niveles de mercurio en sangre. En estos animales se produce también un aumento de los niveles de glutatión reducido en el hígado, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de respuesta antioxidante a nivel tisular para aumentar la defensa antioxidante a nivel local y contrarrestar los efectos tóxicos que ocasiona el mercurio.

6. Los animales tratados conjuntamente con mercurio y con el hidrolizado de clara de huevo no muestran aumento de la peroxidación lipídica, ni presentan disminuida la defensa antioxidante del plasma, y tampoco aumentan los niveles de mercurio en la sangre de estos animales. En este caso, sin embargo, también se observa un llamativo aumento, que es superior incluso al de los animales que reciben únicamente tratamiento con mercurio, de los niveles de glutatión reducido en el hígado. Por lo tanto, además de ponerse en marcha un mecanismo de respuesta antioxidante a nivel tisular para contrarrestar los efectos tóxicos del mercurio, el consumo del hidrolizado de huevo es capaz de aumentar mucho más la defensa antioxidante no enzimática del organismo, y esto podría resultar beneficioso en multitud de patologías asociadas al estrés oxidativo.

7.- Los animales tratados con bajas dosis de mercurio durante 60 días presentan también alteraciones en el metabolismo lipídico. Las ratas de este grupo presentan una disminución significativa en el peso del tejido adiposo blanco. El análisis histológico de este tejido revela una clara disminución del tamaño de los adipocitos, y es posible que la disfunción del tejido adiposo blanco no permita un adecuado almacenamiento de las grasas, y estas se acumulen en el plasma de los animales, lo que ocasiona el aumento en los niveles de triglicéridos, como se observa en este grupo experimental. Ni PPAR, ni las proteínas de estrés del RE parecen estar implicadas en los cambios observados en el tejido adiposo, y tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de mercurio en el tejido adiposo entre

este grupo y el resto de los grupos experimentales.

8. Los animales tratados conjuntamente con mercurio y con el hidrolizado de clara de huevo, no muestran cambios ni en el peso ni en el análisis histológico del tejido adiposo blanco, y tampoco se produce modificaciones de los niveles plasmáticos de triglicéridos, lo que indica que la administración del hidrolizado evita el efecto lipotóxico ocasionado por la exposición a mercurio.

9.- La histología del tejido renal mostró una apariencia normal en los animales de todos los grupos experimentales, aunque los niveles de mercurio son especialmente altos en los grupos que recibieron tratamiento con mercurio, lo que indica que con las dosis de mercurio utilizadas en este estudio no se producen daños morfológicos relevantes a nivel renal. Por el contrario, si se observan daños en el colon, aunque en un primer estadio, que confirman que el tracto digestivo es un órgano diana de las intoxicaciones por mercurio. En todo caso las anomalías aparecidas en el grupo tratado con hidrolizado no son significativas por lo que el daño producido es menor.

**Aunque no está del todo claro el mecanismo de acción por el que el hidrolizado de clara de huevo produce sus efectos sobre este modelo experimental de exposición a bajas dosis de mercurio durante 60 días, los resultados parecen indicar que las propiedades antioxidantes del hidrolizado de clara de huevo producen, a través de un mecanismo de quelación del mercurio, una disminución del estrés oxidativo que ocasiona la exposición a este metal. Los quelatos que se forman cuando se administran de forma conjunta a los animales, el mercurio y las proteínas o los péptidos derivados del hidrolizado de clara de huevo, podrían impedir en buena medida la absorción de este metal en el organismo, y mejorar sus vías de excreción naturales, y en consecuencia reducir el efecto tóxico que produce el mercurio en el organismo.**

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

### A

Aaseth J, Ajsuvakova OP, Skalny AV, Skalnaya MG, Tinkov AA (2018). Chelator combination as a therapeutic strategy in mercury and lead poisonings. *Coordination Chemistry Reviews*, 358:1-12.

Aaseth J, Jacobsen D, Andersen O, Wickstrom E (1995). Treatment of mercury and lead poisonings with dimercaptosuccinic acid and sodium dimercaptopropanesulfonate: A review. *Analyst*, 120:853-854.

Ábalo R, Cabezos PA, Vera G, López-Miranda V, Herradón E, Martín-Fontelles MI (2011). Cannabinoid-induced delayed gastric emptying is selectively increased upon intermittent administration in the rat: role of CB1 receptors. *Neurogastroenterol Motil*, 23:457-67, e177.

Abboud K, Bassila JC, Ghali-Ghoul R, Sabra R (2009). Temporal changes in vascular reactivity in early diabetes mellitus in rats: role of changes in endothelial factors and in phosphodiesterase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 297(2):H836-45, Abdou AM, Kim M, Sato K (2013). Functional proteins and peptides of hen's egg origin. [http://cdn.intechopen.com/pdfs/42431/InTech-Functional\\_proteins\\_and\\_peptides\\_of\\_hen\\_s\\_egg\\_origin.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/42431/InTech-Functional_proteins_and_peptides_of_hen_s_egg_origin.pdf).

Agarwal A y Saxena PN (2018). Curcumin administration attenuates accumulation of mercuric chloride in vital organs of experimental rats and leads to prevent hepatic and renal toxicity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 9:1176-1182

Agarwal S, Zaman, T, Tuzcu EM, Kapadia, SR (2011). Heavy metals and cardiovascular disease: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2006. *Angiology*, 62:422–429.

ASTRE, Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (2012). Toxicological profile for carbón monoxide. ([Http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp201](http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp201))

- Aguado A, Galán M, Zhenyukh O, Wiggers AG, Roque FR, Redondo S, Peçanha F, Martín A, Fortuño A, Cachafeiro V, Tejerina T, Salaices M, Briones AM (2013). Mercury induces proliferation and reduces cell size in vascular smooth muscle cells through MAPK, oxidative stress and cyclooxygenase-2 pathways. *J. Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2):188-200.
- Ahn CB, Cho YS, Je JY (2015). Purification and anti-inflammatory action of tripeptide from salmon pectoral fin by product protein hydrolysate. *Food Chem.* 168:151-6.
- Ahn C-B, Cho Y-S, Je J-Y (2012). Purification and anti-inflammatory action of tripeptide from salmon pectoral fin byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Research International*, 49:92-98.
- Ahmad A, Leyla H, Jamashidkhan H, Mohamad AA, Zahra M, Milad L (2014). Potential angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from gluten hydrolysate: biochemical characterization and molecular docking study. *Journal of Cereal Science*, 6.
- Alsunousi S, Marrif HI (2004). Diabetic neuropathy and the sensory apparatus "Meissner corpuscle and Merkel cells". *Front.Neuronat.*8, 79.
- Alvarez De Sotomayor M, Vega S, Mingorance C, Marhuenda E, Herrera MD (2008). Effects of HMG-CoA reductase inhibition by simvastatin on vascular dysfunction induced by lipopolysaccharide in rats. *Pharmacology*, 82: 89-96
- Álvarez Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ Salaices M (2005). Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hipertens*, 23:767-777
- AMAP (2013). Thechnical Programme/Artic Monitoring and Assesment 2013. Artic Monitoring and Assesment Programme, Oslo, Norway/UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland.Vi + 263 pp.
- Amina T, Schartup, Robert P, Mason, Prentiss H, Balcom, Terill A. Hollweg, and Celia Y. Chen. Methylmercury production in estuarine sediments: role of organic matter. *Environ Sci Technol.* 47(2): 695–700, 2013.

Antão LG, Russo L, Guilhermino L (2018). Single and combined effects of microplastics and mercury on juveniles of the European seabass (*Dicentrarchus labrax*): Changes in behavioural responses and reduction of swimming velocity and resistance time. *Environmental Pollution*, 30:1-6.

Ansar S, Iqbal M (2016). Protective effect of diallylsulphide against mercuric chloride-induced hepatic injury in rats. *Hum Exp Toxicol*, doi:10.1177/0960327116629723.

Apostoli P, Telišman S, Sager PR (2007). Handbook on the toxicology of metals. Capítulo 12: Reproductive and Developmental toxicity of metals, 213-249.

Ardanaz N, Pagano PJ (2006). Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: Regulation and signaling leading to dysfunction. *Experimental Biology and Medicine*, 231:237-251.

Arena JM (1971). Treatment of mercury poisoning. *Mod Treat*, 8:619-625.

Aspri M, Leni G, Galaverna G, Papademas P (2018). Bioactive properties of fermented donkey milk, before and after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 268:476-484.

Azadbakht L, Mimiagar M, Mehrabi Y, Esmailzadeh A, Padyab M, Hu FB, Willett WC (2007). Soy inclusión in the diet improves features of the metabolic syndrome: a randomized crossover study in postmenopausal women. *Am J Clin Nut.*, 85:735-41.

Azevedo FA (2003). Toxicologia do mercúrio. São Carlos: RiMa, 1ª ed.

## **B**

---

Baena J (2017). Nombres de elementos químicos y mitología: Mercurio. Revista digital del I.E.S. La Fuensanta, número 9. [www.gesdocieslafuensanta.com](http://www.gesdocieslafuensanta.com)

Banerjee S, Bhattacharya S. 1995. Histopathological changes induced by chronic nonlethal levels of elsan, mercury, and ammonia in the small intestine of *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31: 62–68.

- Barner DM, Kircher EA (2005). Effects of mercuric chloride on glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Toxicology in Vitro*, 19:207-214.
- Barner DM, Hanlon PR, Kircher EA (2003). Effects of inorganic HgCl<sub>2</sub> on adipogenesis. *Toxicol Scie*, 75:368-377.
- Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S (2000): Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol*, 89: 160-167.
- Bennett GJ, Xie YK (1998). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33:87-107.
- Bernhoft RA (2011). Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012:460508.
- Beyrouthy P, Chan HM (2006). Co-consumption of selenium and vitamin E altered the reproductive and developmental toxicity of methylmercury in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 28:49-58.
- Bhat ZF, Kumar S, Bhat HF (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52:5377-5392.
- Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., Harding, H., Novoa, I., Varia, M., Raleigh, J., et al. (2005). ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J.* 24, 3470–3481
- Bisinoti M C, Jardim W F (2004). O comportamento do metilmercúrio (METILHg) no ambiente. *Quim. Nova*, 24: 593-600.
- Bjøklund G, Mutter J, Aaseth J (2017). Metal Chelators and neurotoxicity: lead, mercury, and arsenic. *Arch Toxicol*, 91:3787-3797.
- Blanco-Rivero J, Furieri LB, Vassallo DV, Salaices M, Balfagon G (2011). Chronic HgCl<sub>2</sub> treatment increases vasoconstriction induced by electrical field stimulation: role of adrenergic and nitrenergic innervation. *Clin Sci (Lond)*, 121:331-334
- Boening D W (2000). Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general

- review. *Chemosphere* 40:1335-1351.
- Böhme M, Diener M, Mestres P, Rummel W. (1992). Direct and indirect actions of HgCl<sub>2</sub> and methyl mercury chloride on permeability and chloride secretion across the rat colonic mucosa. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114:285–294.
- Bolla M, You D, Loufrani L, Levy BL, Levy-Toledano S, Habib A, Henrion D (2004). Cycliclooxygenase involvement in thromboxane-dependent contraction in rat mesenteric resistance arteries. View ResearcherID and ORCID, *43:1264-1269*.
- Boonla O, Kukongviriyapan U, Pakdeechote P, Kukongviriyapan V, Pannangpetch P, Thawornchinsombut S (2015). Peptides-Derived from Thai Rice Bran Improves Endothelial Function in 2K-1C Renovascular Hypertensive Rats *Nutrients*, 15;7(7):5783-99.
- Böse-O’reilly S, McCarty K M, Steckling N, Lettmeier B (2010). Mercury exposure and children’s health. *Curr Probl Pediatric Adolesc Health Care*, 40(8):186-215.
- Botino C, Vázquez M, Devesa V, Laforenza U (2015). Impaired aquaporins expression in the gastrointestinal tract of rat after mercury exposure. *Journal of Applied Toxicology*. (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jat.3151.
- Boujbiha MA, Hamden K, Guermazi, F, Bouslama A, Omezzine A, El FA (2011). Impairment of spermatogenesis in rats by mercuric chloride: involvement of low 17beta-estradiol level in induction of acute oxidative stress. *Biol Trace Elem Res*, 142(3):598-610.
- Boujbiha MA, Hamden K, Guermazi F, Bouslama A, Omezzine A, Kammoun A, El FA (2009). Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: association with oxidative stress. *Reprod Toxicol*, 28(1):81-9.
- Bragança WA, Teixeira FB, Fernandes NC, Monteiro R, Pereira LM, Freitas MC, Lund L, Espírito F, Correa EH, Crespo ME, Ferraz CS (2018). Hippocampal Dysfunction Provoked by Mercury Chloride Exposure: Evaluation of Cognitive Impairment, Oxidative Stress, Tissue Injury and Nature of Cell Death. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018, Article ID 7878050, 11 pages

Bridges CC, Joshee L, Zalups RK (2014). Aging and the disposition and toxicity in rats. *Experimental Gerontology*, 53:31-39.

Bridges CC, Joshee L, Zalups RK (2019). Effect of DMPS and DMSA on the placental and fetal disposition of methylmercury. *Placenta*, 30:800-805.

Bridges CC, Zalups RK (2010). Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. *Journal Toxicol Environ Health*, 13:385-410.

Buñag RD (1973). Validation in awake rats a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *Journal of Applied Physiology*, 34:279-282.

Burnier M (2001). Angiotensin II type 1 receptor blockers. *Circulation*, 103:904-12.

## C

---

Cabazos PA, Vera G, Martín-Fontelles MI, Fernández-Pujol R, Abalo R (2010). Cisplatin-induced gastrointestinal dysmotility is aggravated after chronic administration in the rat. Comparison with pica. *Neurogastroenterol Motil*, 22:797-805.

Calabrese EJ, Iavicoli I, Calabrese V, Cory-Slechta DA, Giordano J (2018). Elemental mercury neurotoxicity and clinical recovery of function: A review of findings, and implications for occupational health. *Environmental Research*, 163:134-148.

Cameron NE, Cotter MA, Archibald V, Dines KC, Maxfield EK (1994). Anti-oxidant and pro-oxidant effects on nerve conduction velocity, endoneurial blood flow and oxygen tension in non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. *Diabetología*, 37: 449-459.

Cameron NE, Cotter MA, Low PA (1991). Nerve blood flow in early experimental diabetes in rats: relation to conduction defects. *American Journal of Physiology* 261: E1-E8.

Carillo WI, Tubón J, Vilacundo RD (2016). Isolation of hen egg White lysozyme by

- cation Exchange chromatography, analysis of its digestibility and evaluation of the inhibition of lipid peroxidation in the zebrafish model. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9:345-349.
- Cavender DE, Edelbaum D, Ziff M (1989). Endothelial-cell activation induced by tumor necrosis factor and lymphotoxin. *American Journal of Pathology*, 134:551-560.
- Chakrabarti S, Jahandideh F, Wu J (2014). Food-Derived Bioactive Peptides on Inflammation and Oxidative Stress. *Biomed Res Int*. 2014:608979.
- Chalamaiah M, Dinesh B, Hemalatha R, Jyothirmayi T (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry*, 135:3020-3038.
- Chalamaiah M, Hemalatha R, Jyothirmayi T, Dirwan PV, Bhaskarachary K, Vajreswari A (2015). Chemical composition and immunomodulatory effects of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) egg. *Nutrition*, 31:388-398.
- Chalamaiah M, Jyothirmayi T, Dirwan PV, Kumar BD (2015). Antiproliferative, ACE-inhibitory and functional properties of protein hydrolysates from rohu (*Labeo rohita*) roe (egg) prepared by gastrointestinal proteases. *Journal of Food Science and Technology*, 52:8300-8307.
- Chang JW, Chen HL, Su HJ, Liao PC, Guo HR, Lee CC (2011). Simultaneous exposure of non-diabetics to high levels of dioxins and mercury increases their risk of insulin resistance. *J Hazard Mater*, 185:749-55.
- Chen CY, Driscoll CT (2018). Integrating mercury research and policy in a changing world. *Ambio*, 47:111-115.
- Chen YW, Huang CF, Yang CY, Yen CC, Tsai KS, Liu SH (2010). Inorganic mercury causes pancreatic beta-cell death via oxidative stress-induced apoptotic and necrosis pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*, 243:323-331.
- Cheng HT, Dauch JR, Smith GA, Singleton RJ, Yanik BM, Feldman EL (2011). Characterization of intraepidermal nerve fiber morphology in pain associated with

- diabetic neuropathy and impaired glucose tolerance. *Annals of Neurology*, 70: S60-S61.
- Chinetti G, Fruchart JC, Staels B (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res*, 49:497-505.
- Chung, J.H.; Yum, K.S (2012). Correlation of hair mineral concentrations with insulin resistance in Korean males. *Biol. Trace Elem. Res*, 150, 26–30.
- Chuu YY, Liu SH, Lin-shiau S (2007). Differential neurotoxic effects of methylmercury and mercuric sulfide in rats. *Toxicology Letters*, 169:129-20.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research*, 46:2347-2355.
- Clarkson T.W.; Magos L.; Myers G.J (2003). Toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations. *N. Engl. J. Med*, 349:1731–1737.
- Clarkson TW, Strain JJ (2009). Nutritional factors may modify the toxic action of methyl mercury in fish-eating populations. *J. Nutr.*, 133:1539-1543.
- Coppey LJ, Davidson EP, Dunlap JA, Lund DD, Yorek MA (2000). Slowing of motor nerve conduction velocity in streptozotocin-induced diabetic rats is preceded by impaired vasodilation in arterioles that provide circulation to the sciatic nerve. *International Journal of Experimental Diabetes Research*, 1: 131-143.
- Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP, Dunlap JA, Lund DD, Yorek MA (2001a). Effect of antioxidant treatment of streptozotocin-induced diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity, and vascular reactivity of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *Diabetes*, 50: 1927-1937.
- Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP, Dunlap JA, Lunnd DD, Salvemini D, Yorek MA (2001b). Effect of M40403 treatment of diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity, and vascular function of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *British Journal of Pharmacology*, 134: 121-129.

Cordero-Herrera I, Cuello S, Goya L, Madrid Y, Bravo L, Cámara C (2013). Molecular mechanisms involved in the protective effect of selenocystine against methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 59:554-63.

## D

---

Dávalos A, Miguel M, Bartolome B, Lopez-Fandiño R (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67:1939-1944.

De Flora S, Bennicelli C, Bagnasco M (1994). Genotoxicity of mercury compounds. A review. *Mutat Res* ,317:57-79.

De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T (2000). International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, 52:415-72.

Deng Y, Zhaofa X, Liu W, Yang H, Xu B, Wei Y (2012). Effects of lycopene and proanthocyanidins on hepatotoxicity induced by mercuric chloride in rats. *Biol Trace Elem Res*, 146:213-223.

Depillizzi A, Pucci ML, Monsy AY, Deseyn K, Nasjleti, A (1997). Contribution of constrictor prostanoids to the calcium-dependent basal tone in the aorta from rats with aortic coarctation-induced hypertension: Relationship to nitric oxide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 283:75-81.

Ding X, Hua Y, Chen Y Zhang C, Kong X (2015). Heavy metal complexation of thiol-containing peptides from soy glycinin hydrolysates. *Int. J. Mol. Sci.* 14:8040-8058.

Dowell FJ, Martin W, Dominiczak AF, Hamilton CA (1999). Decreased basal despite enhanced agonist-simulated effects of nitric oxide in 12-week-old stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *European Journal of Pharmacology*, 379:175-182.

**E**

---

EFSA (2012). Scientific opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal*, 10:2985.

Eom SY, Choi SH, Ahn SJ, Kim DK, Kim DW, Lim JA, Choi BS, Shin HJ, Yun SW, Yoon HJ, Kim YM, Hong YS, Yun YW, Sohn SJ, Kim H, Park KS, Pyo HS, Kim H, Oh SY, Kim J, Lee SA, Ha M, Kwon HJ, Park JD (2014). Reference levels of blood mercury and association with metabolic syndrome in Korean adults. *Int Arch Occup Environ Health*, ;87:501-13.

Erdös B, Snipes JA, Tulbert CD, Katakam P, Miller AW, Busija DW (2006). Rosuvastatin improves cerebrovascular function in Zucker obese rats by inhibiting NAD(P)H oxidase-dependent superoxide production. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 290: 1264-1270.

**F**

---

Farah JM, da Silva AA, Rodrigues D, Torres ED, da Silva G, de Lima LC, Nascimento MC (2017). Emotional and motor symptoms in Riverside dwellers exposed to mercury in the Amazon. *Revista Bras epidemiologia*, 20:212-224.

Farina M, Avila DS, da Rocha JB, Aschner M (2007). Metals, oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *Biometals*, 20:73-81.

Fillion M, Mergler D, Sousa Passos CJ, Larribe F, Lemire M, Guimaraes JR (2006). A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon. *Environ Health*,5:29

Forte, G.; Bocca, B.; Peruzzu, A.; Tolu, F.; Asara, Y.; Farace, C.; Oggiano, R.; Madeddu, R (2013). Blood metals concentration in type 1 and type 2 diabetics. *Biol. Trace Elem. Res.* 156, 79–90.

Fox A, Kesingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L, James I (2001). The role

of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain*, 92(1-2):91-100.

Frisbee JC, Maier KG, Stepp DW (2002). Oxidant stress-induced increase in myogenic activation of skeletal muscle resistance arteries in obese Zucker rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 283: 2160-H168.

Frozan C, García C, Gambato G (2013). Chemical characterization antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol*, 52:137-142.

Fujita H, Yamagami T, Ohshima K (2001). Effects of an ace-inhibitory agent. Katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and middy hypertensive subjects. *Nutr. Res.* 21:1149-58.

Fujita H, Sasaki R, Yoshikawa M (1995a). Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered Ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidyl-choline. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59: 2344-2345.

Fujita H, Kurahashi K, Yoshikawa M (1995b). Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide from ovoalbumin. *Peptides*, 16:785-790.

Furieri LB, Fioresi M, Junior RF, Bartolomé MV, Fernandes AA, et al. (2011a). Exposure to low mercury concentration in vivo impairs myocardial contractile function. *Toxicol Appl Pharmacol.* 255:193-199.

Furieri LB, Galan M, Avendano MS, Garcia-Redondo AB, Aguado A, Martinez S, Cachofeiro V, Bartolome MV, Alonso MJ, Vassallo DV, Salaices M (2011b). Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. *Br. J. Pharmacol.* 162:1819-1831. 2011b

Futatsuka M, Kitano T, Wakamiya J (1996). An epidemiological study on diabetes mellitus in the population living in a methyl mercury polluted area. *J Epidemiol*, 6:204-8.

**G**

- Gallagher CM, Meliker JR (2010). Blood and urine cadmium, blood pressure, and hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*, 118:1676-84.
- Gallegos S, Torres C, Martinez A, Solorza J, Alaiz M, Giron J, Vioque J (2011). Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L. protein hydrolyzates. *Journal Science Food Agric*. 91:1618-1624.
- Galloway C, Chattopadhyay M (2013). Increases in inflammatory mediators in DRG implicate in the pathogenesis of painful neuropathy in Type 2 Diabetes. *Cytokine*, 63: 1-5.
- Gao, J., Ishigaki, Y., Yamada, T., Kondo, K., Yamaguchi, S., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Sawada, S., Ishihara, H., et al. (2011). Involvement of endoplasmic stress protein C/EBP homologous protein in arteriosclerosis acceleration with augmented biological stress responses. *Circulation* 124, 830–839
- Garcés-Rimón M, González C, Uranga JA, López-Miranda V, López-Fandiño R, Miguel M (2016a). Pepsin Egg White Hydrolyzate Ameliorates Obesity-Related Oxidative Stress, Inflammation and Steatosis in Zucker Fatty Rats. *Plos One*, 11(3): e0151193.
- Garcés-Rimón M, López-Expósito I, López-Fandiño R, Miguel M (2016b). Egg White hydrolyzates with in vitro biological multiactivities to control complications associated with the metabolic syndrome. *Eur Food Res Technol*, 242:61-69.
- Garcés-Rimón M, Quiñones M, Galán M, Salaices M, Miguel M (2018). Food derived peptides reduce COX-2 expression in angiotensin II-stimulated adventitial fibroblasts. *PloS One* Enviado para su publicación.
- Garcés-Rimón M (2013). Hidrolizados de proteínas de huevo como nuevos ingredientes funcionales frente al síndrome metabólico y sus complicaciones. Tesis Doctoral.

- García MC, Puchalska P, Esteve C, Marina ML (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106:328-349.
- Gibb H y O'leary KG (2014). Mercury exposure and health impacts among individuals in the artisanal and small-scale gold mining community: a comprehensive review. *Environ Health Perspect*, 122(7):667-672.
- Goa KL, Wagstaaff AJ (1996). Losartan. A review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the treatment of hypertension. *Drugs*, 51:820-45.
- González-Estecha M, Bodas-Pinedo A, Guillén-Pérez JJ, Rubio-Herrera MA, Ordóñez-Iriarte JM, Trasobares-Iglesias EM, Martell-Claros N, Martínez-Alvarez JR, Farré-Rovira R, Herráiz-Martínez MA, Martínez-Astorquiza T, Calvo-Manuel E, Sáinz-Martín M, Bretón-Lesmes I, Prieto-Menchero S, Llorente-Ballesteros MT, Martínez-García MJ, Salas-Salvado J, Bermejo-Barrera P, García-Donaire JA, Cuadrado-Cenzual MA, Gallardo-Pino C, Moreno-Rojas R, Arroyo-Fernández M, Calle-Pascual A (2014). Exposición al metilmercurio en la población general; toxicocinética; diferencias según sexo, factores nutricionales y genéticos. *Revista Nutrición Hospitalaria*, 30:969-988.
- Gonzalez-Raymat H, Liu G, Liriano C, Li Y, Yin Y, Shi J, Jian G, Cai Y (2017). Elemental mercury: Its unique properties affect its behavior and fate in the environment. *Environmental Pollution*, 229:69-86.
- Griendling K, Lassègue B, Alexander R (1996). Angiotensin receptors and their therapeutic applications. *Annu Rev Pharmacol*, 36:281-306.
- Grootaert C, Jacobs G, Matthijs B, Pitart J, Baggerman G, Possemiers S, Van der Saag H, Smagghe G, Van Camp J, Voorspoels S (2017). Quantification of egg ovalbumin hydrolysate-derived anti-hypertensive peptides in a *in vitro* model combining luminal with intestinal Caco-2 cell transport. *Food research International*, 99:531-541.
- Grotto D, Castro MM, Barcelos GR, García SC, Barbosa JF (2009). Low level and sub-chronic exposure to methylmercury induces hypertension in rats: nitric oxide depletion and oxidative damage as possible mechanisms. *Arch Toxicol* 83(7):653–

662.

Guérin-Dubiard C, Pasco M, Mollé D, Désert C, Croguennec T, Nau F (2006). Proteomic analysis of hen egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3901-3910.

Guo TL, Mudzinski SP, Lawrence D (1996). The heavy metal lead modulates the expression of both TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  receptor in lipopolysaccharide-activated human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukocyte Biol*, 59, 932-939.

Gupta VK, Singh S, Agrawal A, Siddiqi NJ, Sharma B (2015). *Phytochemicals Mediated Remedation of Neurotoxicity Induced by Heavy Metals*. Hindawi Volume: 2015.

Gutierrez LLP, Mazzotti NG, Araújo ASR, Klipel RB, Fernandes TRG, Lleduy SF, Bello-Klein A (2006). Peripheral markers of oxidative stress in chronic mercuric chloride intoxication. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39:767-772 (Comunicación).

Gworek B, Bemowska-Kalabun O, Kijeńska M, Wrzosek-Jakubowska J (2016). Mercury in Marine and Oceanic Waters-a Review. *Water Air Soli Pollut*, 227:371.

## H

---

Hanáková Z, Hošek J, Kutil Z, Temml V, Landa P, Vaněk T, Schuster D, Dall'Acqua S, Cvačka J, Polanský O, Šmejkal K (2017). Anti-inflammatory flavonoids: cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitory properties and proteomic analysis. *J Nat Prod*, 80:999-1006.

Harada M (1995). Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit. Rev. Toxicol*, 25:1-24.

He K, Xun P, Liu K, Morris S, Reis J, Guallar E (2013). Mercury exposure in young adulthood and incidence of diabetes later in life: the CARDIA Trace Element Study. *Diabetes Care*, 36: 1584-9.

- He XQ, Cao WH, Pan GK, Yang L, Zhang CH (2015). Enzymatic hydrolysis optimization of *Paphia undulata* and lymphocyte proliferation activity of the isolated peptide fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95:1544-1553.
- Henriques B, Rocha LS, Lopes CB, Figueira P, Monteiro RJR, Duarte AC, Pardal MA, Pereira E (2015). Study on bioaccumulation and biosorption of mercury by living marine macroalgae: Prospecting for a new remediation biotechnology applied to saline waters. *Chemical Engineering Journal*, 281:759-770.
- Hernanz R, Alonso MJ, Briones AM, Vila E, Simonsen U, Salaices M (2003). Mechanisms involved in the early increase of serotonin contraction evoked by endotoxin in rat middle cerebral arteries. *British Journal of Pharmacology*, 140:671-680.
- Heumuller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HHHW, Busse R, Schroder K, Brandes RP (2008). Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension*, 51:211-217.
- Hirota T, Nonaka A, Matsushita A, Uchida N, Ohki K, Asakura M, Kitakaze M (2011). Milk casein-derived tripeptides, VPP and IPP induced NO production in cultured endothelial cells and endothelium-dependent relaxation of isolated aortic rings. *Heart Vessels*, 26(5):549-56.
- Hodgson S, Nieuwenhuijsen MJ, Colvile R, Jarup L (2007). Assessment of exposure to mercury from industrial emissions: comparing “distance as a proxy” and dispersion modelling approaches. *Occup. Environ. Med.*, 64:380-388.
- Hom SY, Choi SH, Ahn SJ, Kim DK, Kim DW, Lim JA, Choi BS, Shin HJ, Yun SW, Yoon HJ, Kim YM, Hong YS, Yun YW, Sohn SJ, Kim H, Park KS, Pyo HS, Kim H, Oh SY, Kim J, Lee SA, Ha M, Kwon HJ, Park JD (2014). Reference levels of blood mercury and association with metabolic syndrome in Korean adults. *Int Arch Occup Environ Health*, 87:501-513.
- Horiguchi N, Horiguchi H, Suzuki Y (2005). Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69:2445-2449.

Houston MC (2007). The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 13:128-133.

Hua Y, Yu-hua L, Li-zhen MA, Bao-hua K (2009). Hydrolyzing condition and immunocompetence of sheep bone protein enzymatic lysates. *Agricultural Sciences in China*, 8: 1332-1338, 2009.

Huang D, Yang C, Ma S, Ciu L, Huang S, Xu M (2014). Immunostimulatory activity of protein hydrolysate from *Oviductus ranae* on macrophage *in vitro*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11.

Huang D, Yang C, Yu D, Wang J, Li R, Ding G (2012). Sepia oligopeptide induces apoptosis in prostate cancer cell lines via caspase-3 activation and elevation of Bax/Bcl-2 ratio. *Marine Drugs*, 10:2153-2165.

Huang W, Chakrabarti S, Majumder K, Jiang Y, Davidge ST, Wu J (2010). Egg-derived peptide IRW inhibits TNF-alpha-induced inflammatory response and oxidative stress in endothelial cells. *J Agric Food Chem*, 58:10840-6.

Husain A (1993). The chymase angiotensin system in humans. *Journal of Hypertension*, 11:1155-1159.

## I

---

Iannitti T, Graham A, Dolan S (2012). Increased central and peripheral inflammation and inflammatory hyperalgesia in Zucker rat model of leptin receptor deficiency and genetic obesity. *Experimental Physiology*, 97: 1236-1245.

Ishihara H., Takeda S., Tamura A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Yamada, T., Inoue, H., Soga, H., Katagiri, H., et al. (2004). Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1159–1170

Ishihara Y, Sekine M, Hatano A, Shimamoto N (2008). Sustained contraction and

endothelial dysfunction induced by reactive oxygen species in porcine coronary artery. *Biol Pharm Bull*, 31:1667-1672.

Iwai-Shimada M, Takahashi T, Kim MS, Fujimura M, Ito H, Toyama1, Akira Naganuma T, Hwang GW (2016). Methylmercury induces the expression of TNF- $\alpha$  selectively in the brain of mice. *Scientific Reports*, 6:38294. DOI: 10.1038/srep38294

## J

---

Jahandideh F, Chakrabarti S, Davidge ST, Wu J (2017). Egg white hydrolysate shows insulin mimetic and sensitizing effects in 3T3-F442 pre-adipocytes. *PLoS One* 12(10):e0185653. doi: 10.1371/journal.pone.0185653.

Jahandideh F, Chakrabarti S, Majumder K, Li Q, Panahi S, Morton J, Davidge ST, Wu J (2016). Egg white hydrolysate reduces blood pressure, improves vascular relaxation and modifies aortic angiotensin II receptors expression in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 27:667-673.

Jaim RB (2007). Trends in factors affecting the observed levels of urinary inorganic and total blood mercury among US children, adolescents, adult, and senior citizens over 2005-2012. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 56:268-281.

Jain S, Anal AK (2017). Production and characterization of functional properties of protein hydrolysates from egg membranes by lactic acid bacteria fermentation. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 54:1062-1072.

Jan AT, Azam M, Siddiqui K, Ali a, Choi I, Mohd G, Hap R (2015). Heavy metals and human health: mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *International Journal of Molecular Science*, 16:29592-29630.

Julio Landero, Pablo Pacheco. The metabolic effects of mercury during the biological cycle of vines (*Vitis vinifera*). Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018.

Jung WK, Nam KS, Shaidi F, Kim S (2001). Purification and characterization of

antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg. *JAOCS*, 78:651-6.

---

**K**

---

Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BHJ (2000). Monochlorobimane Fluorimetric Method to Measure Tissue Glutathione. *Analytical Biochemistry*, 286: 35-37.

Kamigaki M, Sakaue S, Tsujino I, Ohira H, Ikeda D, Itoh N, Ishimaru S, Ohtsuka Y, Nishimura M (2005). Oxidative stress provokes atherogenic changes in adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 339:624-632.

Kamijo Y, Hayashi I, Yoshimura K, Soma K. (2004). Effect of milk on intestinal fluid accumulation and renal injury following mercuric chloride ingestion in rats. *J. Appl. Toxicol.* 24: 129–134.

Kamynsky R, Primachenko V, Sokurenko L, Chaikovsky Y (2016). A study of impact of mercury chloride on myocardium in experiment. *Georgian Med News*, 251:64-70.

Katakam PVG, Tulbert CD, Snipes JA, Erdös B, Miller AW, Busija DW (2005). Impaired insulin-induced vasodilation in small coronary arteries of Zucker obese rats is mediated by reactive oxygen species. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 288: 854-860.

Kawakami T, Hanao N, Nishiyama K, Kadota Y, Inoue M, Sato M, Suzuki S (2012). Differential effects of cobalt and mercury on lipid metabolism in the white adipose tissue of high-fat diet-induced obesity mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 258:32-42.

Kawakami T, Sugimoto H, Furuichi R, Kadota Y, Inoue M, Setsu K, Susuki S, Sato M (2010). Cadmium reduces adipocyte size and expression levels of adiponectin and Pparg1/Mest in adipose tissue. *Toxicology*, 267:20-26.

Kayama F, Yoshida T, Elwell MR, Luster MI (1995). Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 131, 224-234.

- Kazi TG, Jalbani N, Kazi N, Arain MB, Jamali MK, Afridi HI, Kandhro GA, Sarfraz RA, Shah AQ, Ansari R (2009). Estimation of toxic metals in scalp hair samples of chronic kidney patients. *Biol Trace Elem Res*, 127(1):16–27.
- Kennedy AJ, Wellmer A, Facer P, Saldanha G, Kopelman P, Lindsay RM (1998). Neurotrophin-3 is increased in skin in human diabetic neuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr*, 65: 393-395.
- Khan AR, Awan FR (2014). Metals in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 13:16
- Kim K, Kabir E, Jahan SA (2016). A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts. *Journal of Hazardous Materials*, 306:376-385.
- Kim KM, Chang DH, Kim JM, Choi YM, Suh HJ (2004). Yeast hydrolysate reduces body fat of dietary obese rats. *Short communication in Phytotherapy Research*, 11:950-953.
- Kim KN, Park SJ, Choi B, Joo NS (2015). Blood mercury and insulin resistance in nondiabetic Koreans (KNHANES 2008-2010). *Yonsei Med J*, 56:944-50.
- Kim S, Kwon YM, Kim S, Joung H. Assessment of Dietary Mercury Intake and Blood Mercury Levels in the Korean Population: Results from the Korean National Environmental Health Survey 2012-2014. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2016.
- Kim W, Kim DW, Yoo DY, Jung HY, Kim JW, Kim DW, Choi JH, Moon SM, Yoon YS, Hwang IK (2015). Antioxidant effects of *Dendropanax morbifera* Leveille extract in the hippocampus of mercury-exposed rats. *BMC Complement Altern Med*, 14:247.
- Kim YN, Kim YA, Yang AR, Lee BH (2014). Relationship between blood mercury level and risk of cardiovascular diseases: results from the Fourth Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES IV) 2008-2009. *Prev Nutr Food Sci*, 19:333-42.
- Kingman A, Albers JW, Arezzo JC, Garabrant DH, Michalek JE (2005). Amalgam

exposure and neurological function. *Neurotoxicology*, 26:241-255.

Kinoshita K, Myint SL, Shimoguri T, Ibrahim HR, Kawabe K, Okamoto S, Lee Y, Matsuda Y, Maeda Y (2016). Chicken Ovotransferrin Variants OTF and OTF Harboring Substitution of GAT (Asp) to AAT (Asn) in the Codon 500 and their Antimicrobial Activity. *Japan Poultry Science Association*, 53 (4).

Kiran GS, Ramasamy P, Sekar S, Ramu M, Hassan S, Ninawe AS, Selvin J (2018). Synthetic biology approach: Towards sustainable bioactive molecules. *International Journal of Biological Macromolecules*. 112:1278-1288.

Klaassen CD, Liu J, Diwan BA (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 223:215-220.

Klem WR (1989). Drug effects on active immobility responses: what they tell us about neurotransmitter systems and motor functions. *Prog. Neurobiol*, 32:403-422.

Kojima T, Norose T, Sakamoto K (2010). Mouse 3T3-L1 cells acquire resistance against oxidative stress as the adipocytes via the transcription factor FoxO. *Apoptosis*, 15:83-93.

Korhonen H (2002). Milk-derived bioactive peptides: From Science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1:177-187.

Kulikova EA, Bazovkina DV, Antonov YV, Akulikov AV, Kondaurova EM (2017). Alteration of the brain morphology and the response to the acute stress in the recombinant mouse lines with different predisposition to catalepsy. *Neuroscience Research*, 117:14-21.

## L

---

Ladizinski B, Mistry N, Kundu RV (2011). Widespread use of toxic skin lightening compounds: medical and psychosocial aspects. *Dermatologic Clinics*, 29:111-123.

Lee BK, Kim Y (2013). Blood cadmium, mercury, and lead and metabolic syndrome

- in South Korea: 2005-2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Ind Med*, 56:682-92.
- Leithner RMC, Körte C, Edo, D Braga ME (2007). Historia del tratamiento de la sífilis. *Revista Argentina de Dermatología*. 88:6-19.
- Lemos NB, Angeli JK, Faria TO et al (2012). Low mercury concentration produces vasoconstriction, decreases nitric oxide bioavailability and increases oxidative stress in rat conductance artery. *PLoS One*, 7(11):e49005
- Li H, Prairie N, Udenigwe CC (2011). Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans. *J Agric Food Chem*, 59(18):9854-60.
- Li P, Yufeng L, Feng X (2016). Mercury and selenium interactions in human blood in the Wanshan mercury mining area, China. *Science of the Total Environment*, 573:376-381.
- Li-Chan, Eunice CY (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 1:28-37.
- Liu J, Yu Z, Zhao W, Lin S, Wang E, Zhang Y, Hao H, Wang Z, Chen F (2010). Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 122:1159-1163.
- Liu Q, Kong BH, Li GX, Liu N, Xia XF (2011). Hepatoprotective and antioxidant effects of porcine plasma protein hydrolysates on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1316-1321.
- Londoño LF, Londoño PT, Muñoz FG (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14: 145-153.
- López-Fandiño R, Otte J, van Camp J (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *Int. Dairy Journal*, 16:1277-1293.

Lu CL, Baker RC (1987). Effect of PH and food ingredients on the stability of egg-yolk phospholipids and the metal-chelator antioxidant activity of phosvitin. *Journal of Food Science*, 52:613-616.

Lupachyk S, Watcho P, Hasanova N, Julius U, Obrosova IG (2012). Triglyceride, nonesterified fatty acids, and prediabetic neuropathy: role for oxidative-nitrosative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 52: 1255-1263.

Lyle AN, Griendling KK (2006). Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology*, 21:269-280.

## **M**

---

Ma J, Mao X, Wang Q, Yang S, Zhang D, Chen S, Li Y (2014). Effect of spray drying and freeze drying on the immunomodulatory activity, bitter taste and hygroscopicity of hydrolysate derived from whey protein concentrate. *LWT- Food Science and Technology*. 56:296-302.

Machado AC, Padilha AS, Wiggers GA, Siman FD, Stefanon I, Vassallo DV (2007). Small doses of mercury increase arterial pressure reactivity to phenylephrine in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*, 24:92-7.

Mahboob M, Shireen KF, Atkinson A, Khan AT (2001). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. *J Environ Sci Health B*, 36:687-697.

Manso MA, Miguel M, Even J, Hernandez R, Aleixandre A, Lopez-Fandiño R (2008). Effects of the long-term intake of an egg White hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.*, 109:361-367.

Maraj I, Makaryus JN, Ashkar A, McFarlane SI, Makaryus AN (2013). Hypertension management in the high cardiovascular risk population. *International Journal of Hypertension*, volume 2013, ID: 382802, 7 pages.

- Martín E, Dahan D, Cardouat G, Gillibert-Duplantier J, Marthan R, Savineau JP, *et al* (2012). Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch*, 464:261-272.
- Martínez-Rivelles S, Avendano MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Perez-Giron JV, Garcia-Redondo L, Esteban V, Redondo JM, Alonso MJ, Briones AM, Salaices M (2013). Reciprocal Relationship between oxygen species and ciclooxigenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, 18:51-65.
- Mason R P, Choi A L, Fitzgerald W F, Hammerschmidt C R, Lamborg C H, Soerensen A L, Sunderland E M (2012). Mercury biogeochemical cycling in the ocean and policy implications. *Environmental Research*, 119:101-117.
- Masotti AI, Buckley N, Champagne CP, Green-Johnson J (2011). Immunomodulatory bioactivity of soy and milk ferments on monocyte and macrophage models, *Food Research International*, 44:2475-2481.
- Matoba N, Usui H, Fujita H, Yoshikawa M (1999). A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Letters*, 452:181-184.
- McGinnis WR. 2001. Mercury and autistic gut disease. *Environ. Health Perspect.* 109: A303–A304
- McKelvey W, Gwynn RC, Jeffery N, Kass D, Thorpe LE, Garg RK, Palmer CD, Parsons P (2016). A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York City adults. *Environmental Health Perspective*, 115:1435-1441.
- Medeiros P, Freitas RL, Silva MO, Coimbra NC, Melo-Thomas L (2016). CB1 cannaboid receptor-mediated anandamide signaling mechanism of the inferior colliculus modulate the haloperidol-induced catalepsy. *Neuroscience*, 337:17-26, 2016
- Mello-Carpes PB, Barros W, Borges S, Alves N, Rizzetti D, Peçanta FM, Vasallo DV, Wiggers GA, Izquierdo I (2013). Chronic exposure to low mercury chloride concentration induces object recognition and aversive memories deficits in rats.

- International Journal of Developmental Neuroscience, 31:468-472.
- Mendiola J, Moreno JM, Roca M, Vergara N, Martínez MJ, García A, Elvira B, Moreno S, López JJ, Ten J, Bernabeu R, Torres AM (2011). Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a pilot study. *Environ. Health*, 10:6.
- Mendis E, Rajapakse N, Kim SK (2005) Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J Agr Food Chem*, 53:581-587.
- Metha PK, Griendling KK (2006). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol*, 292:82-97.
- Miguel M, López-Fandino R, Ramos M, Aleixandre A (2005). Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *Br J. Nutr.* 94: 731-7.
- Miguel M, López-Fandiño R, Ramos M, Alexandre A (2006). Long-term intake of egg White hydrolysate attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 78: 2960-2966.
- Miguel M, Manso MA, Martín-Alvarez PJ, Aleixandre A, López-Fandiño R (2007b). Angiotensin-converting enzyme activity in plasma and tissues of spontaneously hypertensive rats after the short- and long-term intake of hydrolysed egg white. *Mol Nutr Food Res*, 51:555-563.
- Miguel M, Recio I, Gómez-Ruiz JA, Alonso M, Salices M, López-Fandino R (2007a). Vascular effects, angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, and antihypertensive properties of peptides derived from egg White. *J Agric. Food Chem.* 55:10615-21.
- Miguel M, Recio I, Gómez-Ruiz JA, Ramos M, López-Fandiño R (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67: 1914-1920.

- Miguel M (2005). Actividad antihipertensiva y antioxidante de péptidos derivados de proteínas de huevo. Tesis Doctoral.
- Millán-Linares MC, Yust MM, Alcaide-Hidalgo JM, Millán F, Pedroche J (2014). Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway. *Food Chem.*, 151:141-147.
- Mohammadi-Bardbori A, Rannug A (2014). Arsenic, cadmium, mercury and nickel stimulate cell growth via NADPH oxidase activation. *Chem Biol Interact*, 224:183-8.
- Möller NP, Scholz-Ahrens KE, Roos N, Schrezenmeir J (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47: 171-182.
- Montgomery KS, Mackey J, Thuett K, Ginestra S, Bizon JL, Abbott LC (2008). Chronic, low-dose prenatal exposure to methylmercury impairs motor and mnemonic function in adult C57/B6 mice. *Behav Brain Res*, 191:55-61.
- Moon SS (2014). Additive effect of heavy metals on metabolic syndrome in the Korean population: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2009-2010. *Endocrine*, 46:263-71.
- Moraes-Silva L, Siqueira LF, Oliveira VA, Oliveira CS, Ineu RP, Pedroso TF, Fonseca MM y Pereira ME (2014). Preventive effect of CuCl<sub>2</sub> on behavioural alterations and mercury accumulation in central nervous system induced by HgCl<sub>2</sub> newborn rats. *J Biochem Mol Toxicol* 28(7): 328-335.
- Moral-Sanz J, Menendez C, Moreno L, Moreno E, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F (2011). Pulmonary arterial dysfunction in insulin resistant obese Zucker rats. *Respiratory Research* 12: 51.
- Morato PN, Barboza PC, Soares C, Martins B, Ludemann R, Magalhães, Amaya-Farfan J (2013). Whey protein hydrolysate increase translocation of GLUT-4 to the plasma membrane independent of insulin in Wistar rats. *PLoS ONE*, 8(8):e71134.

Moreno-Fernández S, Garcés-Rimón M, Gonzalez C, Uranga JA, López-Miranda V, Vera G, Miguel M (2018). Pepsin egg White hydrolysate ameliorates metabolic syndrome in high-fat/high-dextrose fed rats. *FOOD and FUNTION*, 9:78-86.

Moreno-Ortega A, Moreno-Rojas R, Martínez-Álvarez JR, Gonzalez M, Castro NP (2017). Probabilistic risk analysis of mercury intake via food consumption in Spain. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 43:135-141.

Morin CL, Schlaepfer IR, Eckel RH (1995). Tumour necrosis factor- $\alpha$  eliminates binding of NF- $\kappa$ B and an octamer-binding protein to the lipoprotein lipase promoter in 3T3-L 1 adipocytes. *J Clin Invest* 95: 1684-1689.

Mortensen ME, Caudill SP, Caldwell KL, Ward CD, Jones RL (2014). Total and methyl mercury in whole blood measured for the first time in the U.S. population: NHANES 2011-2012. *Environ Res*, 134:257-64.

Moustafa SA (2003). Glucose intolerance due to heavy metals intoxication in the rat. *The Egyptian J of Hospital Med*, 10: 27-33.

Mudgil P, Kamal H, Yuen GC, Maqsood S (2018). Characterization and identification of novel antidiabetic and anti-obesity peptides from camel milk protein hydrolysates. 259:46-54.

Mueller M, Hobiger S, Jungbauer A (2010). Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chem*. 122:987-996.

Mullally MM, Meisel H, FitzGerald RJ (1997). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide  $\alpha$ -lactoglobulin corresponding to a tryptic fragment of bovine. *FEBS Lett*, 402:99-101.

---

## **N**

Nakamura T, Aiwaza T, Kariya R, Okada S, Demura M, Kawano K, Makabe K, Kuwajima K (2013). Molecular Mechanisms of the Cytotoxicity of Human  $\alpha$ -Lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells (HAMLET) and Other Protein-Oleic

Complexes. The Journal of Biological Chemistry, 288:14408-14416

Newland MC, Hoffman DJ, Heath JC y Donlin WC (2013). Response inhibition is impaired by developmental methylmercury exposure: Acquisition of low-rate lever-pressing. Behavioral Brain Research, 253:196-205.

Nikki E (2009). Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. Free Rad. Biol Med, 47, 469-484.

Nimalaratne C, Bandara N, Wu J (2015). Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. Food Chemistry, 188:467-472.

Niu X, Mu Q, Li W, Yao H, Li H, Huang H (2014). Esculentin acid, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory effects *in vivo* and *in vitro*. Eur. J. Pharmacol, 740:532-538.

Niwa, M., Sidrauski, C., Kaufman, R.J., and Walter, P. (1999). A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded protein response. Cell 99, 691–702)

NTP (National Toxicology Program). 1993. Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride (CAS No. 7487-94-7) in F344 rats and B3C3F1 mice (gavage studies). Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Technical Report Series No. 408

Nongonierma AB y FitzGerald RJ (2015). The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A review. Journal of Food, 17:640-656.

## O

---

Obrosova IG, Van Huysen C, Fathallah L, Cao XC, Greene DA, Stevens MJ (2002). An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral

- nerve function, metabolism, and antioxidative defence. *FASEB Journal*, 16: 123-125.
- Olczak M, Duszczyk M, Mierzejewski P, Meyza K, Majaewska, MD (2011). Persistent behavioural impairments and alterations of brain dopamine system after early postnatal administration of thimerosal in rats. *Behav. Brain Res.*, 223:107-118.
- Oheme FW (1972). Mechanisms of heavy metal toxicities. *Clin Toxicol*, 5:151-167.
- Olivero J, Navas V, Perez B, Solano I, Acosta, E, Salas R (1997). Mercury Levels in Muscle of Some Fish Species from the Dique Chanel, Colombia. *Bull. Environ. Toxicol*, 58:865-870.
- Oltman CL, Davidson EP, Coppey LJ, Kleinschmidt TL, Lund DD, Yorek MA (2008). Attenuation of vascular/neural dysfunction in Zucker rats treated with enalapril or rosuvastatin. *Obesity*, 16: 82-89.
- Omanwar S, Fahim M (2015). Mercury exposure and endothelial dysfunctions: an interplay between nitric oxide and oxidative stress. *Int J Toxicol*, 34:300-307.
- OIT, Organización Internacional del Trabajo (2007). Girls in mining: research findings from Ghana, Niger, Peru and the United Republic of Tanzania. Ginebra: Organización Internacional del Trabajo. [www.ilo.org](http://www.ilo.org)
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2017). Desarrollo de estrategias nacionales para la eliminación progresiva de termómetros y de los esfigmomanómetros que contienen mercurio de la asistencia sanitaria, incluso en el Convenio de Minamata sobre el mercurio: consideraciones clave y guía paso a paso. Ginebra 2017.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2017). La minería artesanal o de pequeña escala y la salud. Ginebra. <http://apps.who.int/iris>.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (1996). Mercury in drinking-water. WHO/SDE/WSH/05.08/10
- Otani L, Ninomiya T, Murakami M, Osajima K, Kato H, Mjurakami T (2009). Sardine peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity improves glucose

tolerance in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 73:2203-2209.

Othman MS, Satwat G, Aboulkhair M, Moneim AEA (2014). The potential effect of berberine in mercury-induced hepatorenal toxicity in albino rats. *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 69:175-181

Ou BX, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4619-4626.

Outridge PM y Sanei H (2010). Does organic matter degradation affect the reconstruction of pre-industrial atmospheric mercury deposition rates from peat cores? - A test of the hypothesis using a permafrost peat deposit in northern Canada. *International Journal of Coal Geology*, 83:73-81.

Oyadomari, S., and Mori, M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 11, 381–389;

Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., and Mori, M. (2002). Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J. Clin. Invest.* 109, 525–532

## **P**

---

Panichev NA, Panicheva SE (2015). Determination of total mercury in fish and sea products by direct thermal decomposition atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 166:432-441.

Pantoja Munoz, L., Purchase, D., Jones, H., Raab, A., Urgast, D., Feldmann, J. & Garelick, H. (2016). The mechanisms of detoxification of As(III), dimethylarsenic acid (DMA) and As(V) in the microalga *Chlorella vulgaris*. *Aquat.Toxicol.*,175, 56–72

Paravicini TM, Touyz RM (2008). Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase by mechanical stretch occurs through c-SCR-independent pathways

- in vascular cells from normotensive and hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 26:S21-S21.
- Park J, Zheng W (2012). Human Exposure and Health Effects of Inorganic and Elemental Mercury. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 45:344–352.
- Park JS, Ha KH, Kim DJ (2017). Association between blood mercury level and visceral adiposity in adults. *Diabetes Metab J*, 41; 113-120.
- Park PJ, Jung WK, Nam KS, Shahidi F, Kim SK (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lectin-free egg yolk. *JAOCS*, 78:651-656.
- Park S, Lee BK (2013). Body fat percentage and hemoglobin levels are related to blood lead, cadmium, and mercury concentrations in a Korean adult population (KNHANES 2008-2010). *Biol Trace Elem Res*, 151:315-23.
- Peçanta FM, Wiggers GA, Briones AM, Pérez Girón JV, Miguel M, García-Redonde AB, Vassallo DV, Alonso MJ, Salaíces M (2010). The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived postanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration. *J Physiol Pharmacol*, 61:29-36.
- Permuter DH, Dinarello CA, Punsel PI, Colten HR (1986): Cachectin/tumour necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. *J Clin Invest*, 78: 1348 1354.
- Phillips SA, Sylvester FA, Frisbee JC (2005). Oxidant stress and constrictor reactivity impair cerebral artery dilation in obese zucker rats. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 288: 522-530.
- Plat J, Severins N, Morrison S, Mensink RP (2017). Effects of NWT-03, an egg-protein hydrolysate, on blood pressure in normotensive, high-normotensive and mild-hypertensive men and women: a dose-finding study. *British Journal of Nutrition*, 117:942-950.
- PNUMA (2008). Mercury in products and wastes. Ginebra, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, División de Tecnología, Industria y Economía. Productos Químicos,

[http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/English/UNEP\\_Modl\\_UK\\_Web.pdf](http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/English/UNEP_Modl_UK_Web.pdf)).

PNUMA (2017). Evaluación mundial de los desechos de mercurio. Nairobi 2017

Poulin J y Gibb H (2008) Mercurio: Evaluación de la carga de morbilidad ambiental a nivel nacional y local. Serie carga de morbilidad ambiental, nº 16. Organización Mundial de la Salud.

Ppova V, Petkova Z, Ivanova T, Stoyanova M, Lazarov L, Stoyanova A, Hristeva T, Docheva M, Nikolova V, Nikolov N, Zheljazkov VD (2018). Biologically active components in seeds of three *Nicotania* species. 117:375-381.

## R

---

Rafati-Rahimzadeh M, Rafati-Rahimzadeh M, Kazemi S, Moghadamnia AA (2014). Current approaches of the management of mercury poisoning: need of the hour. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 22:46.

Rajae M, Sanchez BN, Renne EP, Basu N (2015). An Investigation of Organic and Inorganic Mercury Exposure and Blood Pressure in a Small-Scale Gold Mining Community in Ghana. Int J Environ Res Public Health, 12:10020-10038

Raksakulthai R, Haard NF (2003). Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43:401-405.

Ralston V, Raymond LI (2010). Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity. Toxicology, 278:112-123.

Rao S, Sun J, Liu Y, Zeng H, Su Y, Yang Y (2012). ACE inhibitory peptides and antioxidant peptides derived from in vitro digestion hydrolysate of hen egg white lysozyme. Food Chem, 135:1245-52.

- Raposo JC, Ozamiz G, Etxebarria N, Tueros I, Muñoz C, Muela A, Arana I, Barcina I (2008). Mercury biomethylation assessment in the estuary of bilbao (North of Spain). *Environmental Pollution* 156:482-488.
- Ratliff J, Leite JO, de Ogburn R, Puglisi MJ, VanHeest J, Fernandez ML (2010). Consuming eggs for breakfast influences plasma glucose and ghrelin, while reducing energy intake during the next 24 hours in adult men. *Nutrition Research*, 30: 96-103.
- Requena T, Miguel M, Garcés-Rimón M, Martínez-Cuesta MC, López-Fandiño R, Peláez C (2017). Pepsin egg White hydrolysate modulates gut microbiota in Zucker obese rats. *Food Funct*, 25:437-443.
- Rhee SY, Hwang YC, Woo JT, Sinn DH, Chin SO, Chon S, Kim YS (2013). Blood lead is significantly associated with metabolic syndrome in Korean adults: an analysis based on the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES). *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:9.
- Rice DC (1996). Evidence for delayed neurotoxicity produced by methylmercury. *Neurotoxicology*, 17:583-596.
- Richter CK, Skulas-Ray AC, Fleming JA, Link CJ, Mukherjee R, Krul ES, Kris-Etherton PM (2017). Effects of isoflavone-containing soya protein on ex vivo cholesterol efflux, vascular function and blood markers of CVD risk in adults with moderately elevated blood pressure: a doses-response randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition*, 117:1403-1413.
- Riganti C, Costamagna C, Doublier S, Miraglia E, Polimeni M, Bosia A, Ghigo D (2008). The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 228:277-285.
- Rissanen T, Voutilainen S, Nyysönen K, Lakka TA, Salonen JT (2000). Fish oil-derived fatty acids, docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *Circulation*, 102:2677-9.
- Rizetti DA, Colletta CD, Silveira C, Peçanta FM, Vasallo DV, Uranga-Ocio JA, Miguel M, Wiggers GA, Billing P (2016b). Ameliorative effects of egg White hydrolysate on

recognition memory impairments associated with chronic exposure to low mercury concentration. *Journal of Neurochemistry International*, 101:30-37.

Rizetti DA, Silveira C, Escobar AG, da Silva TM, Uranga-Ocio JA, Peçanta FM, Vasallo DV, Miguel M, Wiggers GA (2016a). Egg White-derived peptides prevent male reproductive dysfunction induced by mercury in rats. *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 100:253-264.

Rizzetti DA, Martín A, Corrales P, Fernández F, Simões MR, Peçanta FM, Vasallo DV, Miguel M, Wiggers GA (2017). Egg White-derived peptides prevent cardiovascular disorders induced by mercury in rats: Role of angiotensin-converting enzyme (ACE) and NADPH oxidase. *Journal of Toxicology Letters*, 281:158-174.

Rodríguez-Maldonado E, Hernández-Rebollar AE, López-Marure R, Massó F, Montañón LF (2001). Participación del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  en la aterosclerosis. *Arch. Cardiol. Méx.* 2001, 71, 3 México jul./sep.

Rodríguez-Martínez MA, Ruiz-Torres A (1992). Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 66: 213-222.

Ron D., Walter P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529

Rossoni LV, Salaiques M, Marín J, Vassallo DV, Alonso MJ (2002). Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in ouabain-induced hypertension. *British Journal of Pharmacology*, 135: 771-781

Rothenberg SE, Korrick SA, Fayad R (2015). The influence of obesity on blood mercury levels for U.S. non-pregnant adults and children: NHANES 2007-2010. *Environ Res*, 138:173-80.

Rumbold DG, Lienhardt CT, Parsons ML. (2018). Mercury biomagnification through a coral reef ecosystem. *Environmental Contamination and Toxicology*, 75:121-133.

Rydberg J, Klaminder J, Rosén P y Blinder R (2010). Climate driven release of carbon and mercury from permafrost mires increases mercury loading to sub-artic lakes. *Science of the Total Environment*, 408:4778-4783.

Rzymiski P, Tomczyk K, Rzymisky P, Poniedziałek B, Opala T, Wilczak M (2015). Impact of heavy metals on the female reproductive system. *Ann. Agric. Environ Med*, 22:259-264.

---

## S

---

Santana A, Melo A, Tavares T, Ferreira IM (2016). Biological activities of peptide concentrates obtained from hydrolyzed eggshell membrane by product by optimization with response surface methodology. *Food Func*, 7:4597-4604.

Sargis RM (2014). The hijacking of cellular signaling and the diabetes epidemic: mechanisms of environmental disruption of insulin action and glucose homeostasis. *Diabetes Metab J*, 38:13-24.

Sasser LB, Jarboe GE, Walter BK, Kelman BJ (1978). Absorption of mercury from ligated segments of the rat gastrointestinal tract. *Proc Soc Exp Biol*, 157:57-60

Schartup AT, Mason RP, Balcom PH, Hollweg TA Chen C Y (2013). Methylmercury Productions in Estuarine Sediments: Role of Organic Matter. *Environmental Science and Technology*, 47:695-700.

Scruggs P, Filipeanu CM, Yang J, Dun NJ (2004). Interaction of ovokinin (2-7) with vascular bradykinin 2 receptor. *Regulatory peptides*. 120:85-91.

Sears ME. (2013) Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification- a review. *The Scientific World Journal*, 2013:219840, 13 pages.

Selin H, Keane SE, Wang S, Selin NE, Davis K, Bally D. (2018) Linking science and policy to support the implementation of the Minamata Convention on Mercury. *Ambio*, 47:198-215.

- Sener G, Sehirli O, Tozan A, Velioglu-Ovunc A, Gedik N, Omutag GZ (2007). Gkingo Biloba extract protects against mercury (II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 45:543-350.
- Serdar MA, Bakir F, Hasimi A, Celik T, Akin O, Kenar L, Aykut O, Yildirimkaya M (2009). Trace and toxic element patterns in nonsmoker patients with noninsulindependent diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, and fasting glucose. *Int J Diabetes Dev Ctries*, 29(1):35–40.
- Shen S, Chahal B, Majumder K, You S, Wu J (2010). Identification of novel antioxidative peptides derived from a thermolytic hydrolysate of ovotransferrin by LC-MS/MS. *Agricultural and Food Chemistry* 58:7664-7672.
- Shen Y, Buie PS, Lynch JJ, Krause SM, Ma X (2000). Chronic Therapy with an ET<sub>A/B</sub> receptor antagonist in concisius dogs during progression of congestive heart failure intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation and nitric oxide mediated coronary relaxation. *Cardiovascular Research*, 48:332-345.
- Shinozaki K, Nishio Y, Ayajiki K, Yoshida Y, Masada M, Kashiwagi A, Okamura T (2007). Pitavastatin restores vascular dysfunction in insulin-resistant state by inhibiting NAD(P)H oxidase activity and uncoupled endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide production. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 49: 122-130.
- Shun CT, Chang YC, Wu HP, Hsieh SC, Lin WM, Lin YH, et al (2004). Skin denervation in type 2 diabetic duration and functional impairments. *Brain* 127: 1593-1605.
- Silverstein E, Friedland J, Lyons HA, Gourin A (1976). Elevation of angiotensin-converting enzyme in granulomatous lymph nodes and serum in sarcoidosis: clinical and possible pathogenic significance. *Ann N Y Acad Sci*, 278:498-513.
- Skalnaya MG, Tinkov AA, Demidov VA, Serebryansky EP, Nikonorov AA, Skalny AV (2014). Hair toxic element content in adult men and women in relation to body mass index. *Biol Trace Elem Res* 161:13-9.

Spisso A, Verni E, Nahan K, Martinez L, Landero J, Pacheco P (2018). The metabolic effects of mercury during the biological cycle of vines (*Vitis vinifera*). *Biometals*, 31:243-254.

Sun S, Niu H, Yang T, Lin Q, Luo F, Ma M (2014). Antioxidant and anti-fatigue activities of egg white peptides prepared by pepsin digestion. *J. Sci. Food Agric.* 94:3195-200, 2014.

Sundseth K, Pacyna JM, Pacyna EG, Pirrone N, Thorne RJ (2017). Global sources and Pathways of Mercury in the Context of Human Health. *Int J Environ Res Public Health*, 14 (1).pii: E105, 2017 ( [www.mdpi.com/journal/ijerph](http://www.mdpi.com/journal/ijerph)).

Syrvesen T, Kaur P (2012). The toxicology of mercury and its compounds. *J. Trac. Elem. Biol.*, 26:215-226.

## T

---

Tamargo *et al.*, (2006) Características farmacológicas de los ARA-II. ¿Son todos iguales? *Rev Esp Cardiol Supl*, ;6:10C-24C

Tamargo J (2000). Antagonistas de los receptores de la angiotensina II. *Med Clin (Barc)*. 114:S6-12; 4.

Teixeira FB., Fernandes RM., Farias-Junior PM, Costa NM, Fernandes LM, Santana LN, Silva-Junior, AF, Silva MC, Maia CS, Lima RR. (2014) Evaluation of the effects of chronic intoxication with inorganic mercury on memory and motor control in rats. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 11:9171-9185.

Temussi PA (2012). The good taste of peptides. *Journal of Peptide Science*, 18:73-82.

Teschemacher H (2003). Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Curr Pharm Des*, 9:1331-1344.

Tesfaye S, Vileikyte L, Rayman G, Sindrup SH, Perkins BA, Baconja M, Vinik AI, Boulton AJM (2011). Painful diabetic peripheral neuropathy: consensus

recommendations on diagnosis, assessment and management. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews*, 27: 629-638.,

Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, et al. (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*, 45:206-51.

Torres-Fuentes C, Alaiz M, Vioque J (2014). Chickpea chelating peptides inhibit copper-mediated lipid peroxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94:3181-3188.

Toru Suzuki T, Gao J, Ishigaki Rasao A, Ishii N, Imai J, Yamada T, Oyadomari S, Katagiri H. *ER* (2017). Stress Protein CHOP Mediates Insulin Resistance by Modulating Adipose Tissue Macrophage Polarity. *Cell Reports* 18:2045–2057

Trayhurn P (2005). White adipose tissue grafts-keeping in contact. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289:297-298.

Tsuge N, Eikawa Y, Nomura Y, Yamamoto M, Sugisawa K (1991). Antioxidative activity peptides prepared by enzymatic-hydrolysis of egg-white albumin. *Nippon Nogeikagaku Kaishi-Journal of the Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry*, 65:1625-1641.

## U

---

Uceyler N, Rogausch JP, Toyka KV, Sommer C (2007). Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies. *Neurology*, 69: 42-49.

Ulfman LH, Leusen JHW, Savelkoul HFJ, Warner JO, van Neerven RJJ (2018). Effects of bovine immunoglobulins on immune function, allergy, and infection. *Frontiers in Nutrition*, 5:52.

Unión Europea (2017). Reglamento (UE) 2017/852 del 17 de mayo de 2017 sobre el mercurio y por el que se deroga el Reglamento (CE) n.o 1102/2008

---

Uranga JA, Garcia-Martinez JM, Garcia-Jimenez C, Vera G, Martin-Fontelles MI, Abalo R (2017). Alterations in the small intestinal Wall and motor function after repeated cisplatin in rat. *NEUROGASTROENTEROLOGY and Motility*, 29:e13047

## V

---

Valko, M.; Rhodes, C.; Monco, J.; Izakovic, M.; Mazur, M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact*, 160, 1–40

van Thiel BS, van der Pluijm I, te Riet L, Essers J, Danser AH (2015). The renin-angiotensin system and its involvement in vascular disease. *Eur J Pharmacol*, 763: 3-14

Vander Wall JS, Marth JM, Khosla P, Jen KC, Dhurandhar NV (2005). Short-term effect of eggs on satiety in overweight and obese subjects. *Journal of the American College of Nutrition*, 24:510-515

Vera G, Chiarlone A, Cabezos PA, Pascual D, Martín MI, Abalo R (2007). WIN 55,212-2 prevents mechanical allodynia but not alterations in feeding behavior induced by chronic cisplatin in the rat. *Life Sci*, 81:468-79.

Vermeirssen V, van Camp J, Decroos K, van Wijmelbeke L, Verstraete W (2003). The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein. *J Dairy Sci*, 86:429-438.

Vernaza MG, Dia VP, Mejia EG, Chang YK (2012). Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chemistry*, 134:2217-2225.

Virtanen JK, Voutilainen S, Rissanen TH, Mursu J, Toumainen T, Korhonen MT, Valkonen V, Seppänen K, Laukkanen JA, Salonen JT (2004). Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25:228:233.

Vorobeychik Y, Gordin V, Mao JR, Chen L (2011). Combination therapy for neuropathic pain. A review of current evidence. *CNS Drugs*, 25: 1023-1034.

---

**W**

---

Wang HD, Pagano PJ, Du Y, Cayatte AJ, Quinn MT, Brecher P, Cohen RA (1998). Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. *82(7):810-8)*

Wang W, González De Mejia E (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4: 63-78.

Wang Y, Landheer S, van Gilst WH, van Amerongen A, Hammes H, Henning RH, Deelman LE, Buikema H (2012). Attenuation of renovascular damage in Zucker diabetic fatty rat by MWT-03, an egg protein hydrolysate with ACE-and DPP4-inhibitory activity. *PLoS ONE* 7: e46781.

Wang Z, Cui Y, Liu P, Zhao Y, Wang L, Liu Y, Xie J (2017). Small Peptides Isolated from Enzymatic Hydrolysate of Fermented Soybean Meal Promote Endothelium-Independent Vasorelaxation and ACE Inhibition. *J Agric Food Chem*, 65(50):10844-10850.

Wiggers GA, Furieri LB, Briones AM, Avendano MS, Peçanta FM, Vasallo DV, Salaices M, Alonso MJ (2016) Cerebrovascular endothelial dysfunction induced by mercury exposure at low concentrations. *Neurotoxicology*, 53:282-289.

Wiggers GA, Peçanta FM, Briones AM, Pérez-Giron JV, Miguel M, Vasallo DV, Cachafeiro V, Alonso MJ, Salaices M (2008). Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *American Journal Physiology. Heart Circ. Physiology*, 295(3):1033-1043.

Wolf G, Byztman U, Wnzel UO (2003). The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol*, 93:3-13.

Wu J, Ding X (2001). Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from protein spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem.*, 49:501-506.

---

**X**

---

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 112:1821-1830.

Xu L, Tang D, Guam M, Xie C, Xue Y (2014). Effects of high-fat diet on peripheral neuropathy in C57bl/6 mice. *Int. J. Endocrinol.* 350205.

Xu, J., Tian, Y.-S., Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Zhu, B., Hou, X.-L. & Yao, Q.-H. (2010). Cyanobacteria MT gene SmtA enhance zinc tolerance in Arabidopsis. *Mol. Biol. Rep.*, 37(2), 1105–1110.

Xue ZH, Gao J, Zhang ZJ, Yu WC, Wang H, Kou XH (2012). Antihyperlipidemic and Antitumor Effects of Chickpea Albumin Hydrolysate. *Plant Foods for Human Nutrition* 67: 393-400.

Xuehui C (2007). Accumulation of heavy metals and organochlorine pesticides in human milk and adipose tissues, and its health concerns [master's thesis]. Hong Kong: Hong Kong Baptist University.

---

**Y**

---

Yang HY, Yang SC, Chen ST, Chen JR (2008). Soy protein hydrolysate ameliorates cardiovascular remodeling in rats with L-NAME-induced hypertension. *J Nutr Biochem.* 19(12):833-9.

Yessoufou A, Ategbo JM, Attakpa E, Hichami A, Moutairou K, Dramane KL, Khan NA (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha modulates insulin gene transcription factors and inflammation in adipose tissues in mice. *Mol Cell Biochem*,

323:101-111.

Yip L, Dart RC, Sullivan JB (2010). Mercury. Clinical environmental and toxic exposures, 867-79.

Yoshizawa K, Rimm EB, Morris JS, Spate VL, Hsieh CC, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC (2002). Mercury and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med*, ;347:1755-60.

You S, Wu J (2011). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of egg protein hydrolysates produced with gastrointestinal and nongastorintestinal enzymes. *Journal of Food Science*, 76:801-807.

Young D, Fan MZ, Mine Y (2010). Egg yolk peptides up-regulate glutathione synthesis and antioxidant enzyme activities in a porcine model of intestinal oxidative stress. *J Agric Food Chem*. 58:7624-7633

Yu S, Paetau-Robinson I (2006). Dietary supplements of vitamins E and C and  $\beta$ -carotene reduce oxidative stress in cats with renal insufficiency. *Veterinary Research Communications*, 30:403-413.

Yu Z, Yin Y, Zhao W, Yu Y, Liu B, Liu J, Chen F (2011). Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. *Food Chemistry*, 129: 1376-1382.

Yu Z, Yin Y, Zhao W, Liu B, Liu J, Chen F (2012). Anti-diabetic activity peptides from albumin against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase. *Food Chemistry*.135;2078-2085.

## **Z**

---

Zahir F, Rizwi SJ, Haq SK, Khan RH (2005). Low dose mercury toxicity and human health. *Environ Toxicol Pharmacol*, 20:351-360

Zalups, R.K (2000). Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev*, 52, 113–143.

- Zalups, R.K.; Lash, L.H (1994). Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. *J. Toxicol. Environ. Health* 42, 1–44
- Zambrowic A, Pokora M, Setner B, Dąbrowska A, Szoltysik M, Babij K, Szewczuk Z, Trziszka T, Lubec G, Chrzawska J (2015). Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate: isolation and characterization. *Amino Acids*, 47:369-380.
- Zhang J, Lu S, Wang H, Zheng Q (2013). Protective role of *Aralia elata* polysaccharide on mercury (II) induced cardiovascular oxidative injury in rats. *Int J Biol Macromol*, 59:301-304.
- Zhang, Y., Duan, X., Li, J., Zhao, S., Li, W., Zhao, L., Li, W., Nie, H., Sun, G., and Li, B. (2016). Inorganic Arsenic Induces NRF2-Regulated Antioxidant Defenses in Both Cerebral Cortex and Hippocampus in Vivo. *Neurochemical Research*, 41:2119-2128.
- Zhong F, Zhang X, Ma J, Shoemaker CF (2007). Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein alcalase hydrolysates. *Food Research International*, 40: 756-762.
- Zhou C, Shao J (2008). Role of adipocytokines in obesity-associated insulin resistance. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19:277-286.
- Zhu C, Li G, Peng H, Zhang F, Chen Y, Li Y (2010). Treatment with marine collagen peptides modulates glucose and lipid metabolism in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 35: 797-804
- Zielińska E, Baraniak B, Karaś M (2017). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Hydrolysates and Peptide Fractions Obtained by Enzymatic Hydrolysis of Selected Heat-Treated Edible Insects. , 9(9). pii: E970. doi: 10.3390/nu9090970