

**Impacto de las variantes genéticas de las enzimas del metabolismo del glutatión sobre el efecto nefrotóxico en una población con exposición ocupacional al mercurio**

**Olga Marcela Medina Pérez**

**Trabajo de Grado para optar el título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Director**

**Luz Helena Sánchez Rodríguez**

**M.Sc. en Toxicología**

**Codirector**

**Oscar Roberto Flórez Vargas**

**Ph.D. en Biología Computacional y Bioinformática**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Salud**

**Escuela de Ciencias Básicas**

**Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Bucaramanga**

**2020**

### **Dedicatoria**

El presente trabajo lo dedico primero a Dios por darme la fortaleza y sabiduría para culminar una meta más en mi vida.

A mi tía y a mi hermana, quienes han sido parte fundamental durante este proceso; gracias por su amor, entrega, apoyo y comprensión en todo momento. Ustedes son mi inspiración para cada día crecer profesional y personalmente.

### Agradecimientos

Agradezco a Dios por las bendiciones recibidas, por ponerme en el camino personas maravillosas que me enseñaron, que me apoyaron y con quienes compartí durante este proceso.

Agradezco profundamente a mis tutores: Luz Helena Sánchez Rodríguez y Oscar R. Flórez Vargas por su dedicación, por compartirme sus conocimientos y experiencias, por el voto de confianza depositado y por permitirme hacer parte de su equipo de trabajo.

Agradezco especialmente a María de los Ángeles Vera Vega y Silvia Patricia Villamizar Cárdenas por el apoyo incondicional y desinteresado, por estar siempre ahí.

Agradezco a COLCIENCIAS por el financiamiento del estudio investigativo y el apoyo económico para mi formación como Magister, a la Universidad Industrial de Santander, a la Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas y a todos los que fueron mis profesores, por sus enseñanzas.

Finalmente agradezco a los profesores Giovanna Rincón Cruz, Linda Patricia Rocha y Fernando Rondón por el apoyo en mi proceso de formación, por la disposición, por el aporte de conocimiento y por el tiempo dedicado.

## Contenido

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	14
1. Objetivos .....	19
1.1 Objetivo general.....	19
1.2 Objetivos específicos .....	19
2. Marco teórico .....	20
2.1 Mercurio.....	20
2.1.1 Fuentes de exposición al Hg. ....	21
2.1.2 Mercurio en la minería. ....	21
2.1.3 Toxicocinética y toxicodinamia del Hg.....	26
2.1.4 Metabolismo del glutatión. ....	27
2.1.5 Nefrotoxicidad e interacción del glutatión con el Hg. ....	33
2.1.6 Excreción urinaria de Hg. ....	42
2.1.7 Toxicogenética del Hg. ....	44
2.2. Materiales y Métodos.....	49
2.2.1 Tipo de estudio.....	49
2.2.2 Población de estudio. ....	50
2.2.3 Tamaño de la muestra. ....	52
2.2.4 Recolección de muestras biológicas. ....	52

---

2.2.5 Biomarcadores .....	53
2.2.6 Genotipificación.....	55
2.2.7 Análisis estadístico.....	58
2.2.8 Las razones de posibilidades (OR) .....	58
2.2.9 Las interacciones entre los SNP.....	59
2.3 Resultados .....	59
2.4 Discusión.....	72
3. Conclusiones .....	81
Referencias Bibliográficas .....	82
Apéndices.....	93

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Polimorfismos en genes candidatos implicados en la toxicocinética del Hg .....	47
Tabla 2. Características sociodemográficas de la población de estudio y biomarcadores.....	60
Tabla 3. Distribución de las variantes genéticas en genes relacionados con el metabolismo del glutatión en un grupo de personas expuestas ocupacionalmente al Hg y un grupo de personas no expuestas a este metal. ....	61
Tabla 4. Asociación de las variantes genéticas en genes relacionados con el metabolismo del glutatión con los niveles de Hg en sangre y orina. ....	63
Tabla 5. Asociación de las variantes genéticas en genes relacionados con el metabolismo del glutatión con los biomarcadores de función renal. ....	65
Tabla 6. Asociación de las variantes genéticas en genes relacionados con el metabolismo del glutatión con los biomarcadores de función renal por grupo de exposición.....	66

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
<i>Figura 1.</i> Método de amalgamación en la MAPE. ....	23
<i>Figura 2.</i> Estimado del uso anual de Hg en la MAPE. ....	24
<i>Figura 3.</i> Estructuras del glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG). ....	28
<i>Figura 4.</i> Esquema de la síntesis de glutatión. ....	30
<i>Figura 5.</i> Ciclo $\gamma$ -glutamil. ....	31
<i>Figura 6.</i> Conjugación con GSH y detoxificación de xenobióticos. ....	32
<i>Figura 7.</i> Mecanismos de captación de conjugados de Hg por la membrana luminal. ....	35
<i>Figura 8.</i> Representación de la molécula cistina y dicisteinilmercurio. ....	36
<i>Figura 9.</i> Sistemas de transporte en la captación basolateral de mercurio inorgánico. ....	37
<i>Figura 10.</i> Toxicidad del Hg en las células tubulares proximales. ....	40
<i>Figura 11.</i> Mecanismos involucrados en la captación y exportación de $\text{Hg}^{2+}$ . ....	44
<i>Figura 12.</i> Clasificación de los SNPs de acuerdo con su localización en el genoma. ....	45
<i>Figura 13.</i> Interacción gen-ambiente. ....	46
<i>Figura 14.</i> Ensayo de genotipificación TaqMan® SNP. ....	57
<i>Figura 15.</i> Ejemplo de discriminación alélica por TaqMan para <i>GSS</i> C>G .....	58
<i>Figura 16.</i> Efecto de <i>GCLM</i> rs41303970 sobre Hg en orina (A) y Hg en sangre (B). ....	64
<i>Figura 17.</i> Efecto de <i>GCLC</i> rs1555903 sobre eTFG .....	67
<i>Figura 18.</i> Efecto de <i>GCLC</i> rs1555903 en $\beta$ -2MCG. ....	67

---

<i>Figura 19.</i> Efecto de <i>GCLM</i> rs41303970 sobre eTFG .....	68
<i>Figura 20.</i> Interacción entre los SNPs sobre los niveles de Hg en orina.....	69
<i>Figura 21.</i> Efecto de los alelos <i>GSTAI</i> rs3957356-C y <i>GSS</i> rs3761144-G sobre los niveles de Hg en orina.....	70
<i>Figura 22.</i> Interacción entre los SNPs sobre los niveles de eTFG .....	71
<i>Figura 23.</i> Interacción entre los SNPs sobre los niveles de albúmina urinaria. ....	71
<i>Figura 24.</i> Interacción entre los SNPs sobre los niveles de $\beta$ -2MCG .....	72

**Lista de Apéndices**

	<b>Pág.</b>
Apendice A: Consentimiento Informado.....	93
Apéndice B: Interacciones SNP-SNP con biomarcadores de exposición al Hg en población total.....	95
Apéndice C: Interacciones SNP-SNP con biomarcadores de función renal en población total ...	96
Apendice D: Interacciones SNP-SNP con biomarcadores de exposición al Hg por grupo de exposición.....	97
Apendice E: Interacciones SNP-SNP con biomarcadores de función renal en grupo expuesto...	98
Apendice F: Interacciones SNP-SNP con biomarcadores de función renal en grupo no expuesto.....	99
Apendice G: Resultado análisis de la expresión del loci de rasgos cuantitativos (eQTL) .....	100

## Resumen

**Título:** Impacto de las variantes genéticas de las enzimas del metabolismo del glutatión sobre el efecto nefrotóxico en una población con exposición ocupacional al mercurio\*

**Autor:** Olga Marcela Medina Pérez\*\*

**Palabras claves:** mercurio, minería, glutatión, polimorfismo genético, riñón.

### Descripción:

La exposición a vapores de mercurio elemental (Hg) durante la amalgamación en la minería aurífera artesanal y en pequeña escala (MAPE) presenta efectos tóxicos en varios órganos, incluidos los riñones. Sin embargo, en un grupo expuesto ocupacionalmente al Hg en Santander, Colombia, hemos reportado aumentos significativos en los niveles de Hg en sangre y orina, pero sin alteración de biomarcadores de función renal al compararlos con un grupo control. Nosotros hipotetizamos que variantes genéticas germinales en genes involucrados en el metabolismo del Hg podrían mitigar el impacto negativo de este metal en los riñones. Por lo tanto, en el presente estudio determinamos la asociación de SNPs (del inglés, *single nucleotide polymorphism*) ubicados en genes del metabolismo del glutatión con los niveles de Hg y biomarcadores de función renal en una población con exposición ocupacional al Hg por MAPE y en una población no expuesta. La genotipificación se realizó mediante ensayos TaqMan en muestras de ADN genómico de 281 participantes: 160 expuestos y 121 no expuestos. Se usaron modelos de regresión lineal multivariados para estimar el efecto de los SNPs sobre caracteres cuantitativos.

Encontramos asociaciones estadísticamente significativas para el alelo *GCLM* rs41303970-T con aumento en los niveles urinarios de Hg ( $\beta = 0.062$ ,  $P = 0.047$ ), mientras para el alelo *GCLC* rs1555903-C con disminución de la tasa de filtración glomerular estimada (eTFG,  $\beta = -0.01$ ,  $P = 0.011$ ) y beta-2-microglobulina ( $\beta$ -2MCG,  $\beta = -11.88$ ,  $P = 0.030$ ). Un análisis de interacción SNP-SNP mostró una epistasis significativa entre los alelos *GSTAI* rs3957356-C y *GSS* rs3761144-G con niveles urinarios altos de Hg en el grupo expuesto ( $\beta = 0.13$ ,  $P = 0.04$ ) pero no en el grupo no expuesto. Finalmente, observamos una sobrerrepresentación significativa de los alelos *GCLM* rs41303970-T ( $P = 0.0004$ ) y *GSTPI* rs4147581-C ( $P = 0.005$ ) en el grupo expuesto en comparación con el grupo no expuesto. Nuestros resultados sugieren que los SNPs estudiados en los genes *GCLM*, *GCLC*, *GSS*, *GSTAI* y *GSTPI* podrían modular la patogénesis de la nefrotoxicidad inducida por Hg en nuestra población mediante el control en la biosíntesis del glutatión.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Salud. Escuela de Ciencias Básicas. Directora: Luz Helena Sánchez Rodríguez. Codirector: Oscar R. Flórez Vargas

## Abstract

**Title:** Impact of genetic variants of glutathione metabolism enzymes on the nephrotoxic effect in a population with occupational exposure to mercury\*

**Author:** Olga Marcela Medina Pérez\*\*

**Key Words:** mercury, mining, glutathione, genetic polymorphism, kidney.

### Description:

In artisanal and small-scale gold mining (ASGM), the occupational exposure to elemental (Hg) mercury vapor emitted from the amalgamation process is related to harmful effects on several organs, including the kidneys. We previously reported significantly increased levels of Hg in blood and urine despite normal kidney function in individuals from Santander, Colombia, occupationally exposed to Hg compared to those non-exposed. We hypothesize that germline gene variants in genes involved in Hg metabolism might mitigate the negative impact of this metal on the kidneys. Therefore, in this study we performed association analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes related to glutathione metabolism with levels of Hg and renal function biomarkers between a group occupationally exposed to Hg due to ASGM and a group non-exposed. The SNPs were genotyped by TaqMan assays in genomic DNA samples from 281 individuals: 160 exposed and 121 non-exposed. Regression analysis was performed to estimate SNP effects on quantitative traits.

We found statistically significant associations for the *GCLM* allele rs41303970-T with higher urinary clearance rate of Hg ( $\beta = 0.062$ ,  $P = 0.047$ ), whereas for the *GCLC* allele rs1555903-C with lower levels of estimated glomerular filtration rate (eGFR,  $\beta = -0.01$ ,  $P = 0.011$ ) and beta-2-microglobulin ( $\beta$ -2MCG,  $\beta = -11.88$ ,  $P = 0.030$ ). A SNP-SNP interaction analysis showed significant epistasis between *GSTA1* rs3957356-C and *GSS* rs3761144-G alleles with higher urinary levels of Hg in the exposure group ( $\beta = 0.13$ ,  $P = 0.04$ ) but not in the non-exposure group. Finally, we observed significant overrepresentation of the alleles *GCLM* rs41303970-T ( $P = 0.0004$ ) and *GSTP1* rs4147581-C ( $P = 0.005$ ) in the exposure group compared with the non-exposure group. Our results suggest that *GCLM*, *GCLC*, *GSS*, *GSTA1*, and *GSTP1* might modulate the pathogenesis of Hg nephrotoxicity in our study population by controlling the glutathione biosynthesis.

---

\* Master's Thesis

\*\* Facultad de Salud. Departamento de Ciencias Básicas. Directora: Luz Helena Sánchez Rodríguez. Codirector: Oscar R. Flórez Vargas

## Introducción

La minería aurífera artesanal y en pequeña escala (MAPE) es la mayor fuente antropogénica de contaminación por mercurio (Hg). Este metal tóxico constituye el principal elemento para la extracción de oro debido a su capacidad de formar amalgamas con este y otros metales. Una vez se tiene la amalgama de oro, se calienta a 360°C, temperatura a la que se evapora el mercurio (pero no el oro, que se funde a 1000°C), quedando así el oro puro (UNEP, 2013). La amalgamación es un método ampliamente utilizado en la MAPE, no sólo debido a su bajo costo en comparación con otros métodos alternativos, sino también porque su implementación es eficiente y rápida.

Debido al aumento del precio del oro en los últimos diez años, el número de personas involucradas en esta actividad ha aumentado; aproximadamente 19 millones de personas, de las cuales cinco millones corresponden a mujeres y niños (Esdaile & Chalker, 2018; Kippenberg et al., 2015), practican la MAPE como actividad económica en 70 países, principalmente de América del Sur, África y Asia (UNEP, 2013).

La MAPE libera aproximadamente 1400 toneladas de Hg al año, lo que representa el 37% de las emisiones mundiales de Hg al medio ambiente (Seccatore et al., 2014). En 2004, la producción de oro por MAPE se estimó en un 20 - 30% (500 - 800 toneladas) de la producción global total (Swain et al, 2007).

Colombia, por su parte, se posiciona como el mayor contaminante de Hg per cápita (Cordy et al., 2011). La producción de oro en el país está concentrada en un 99,5% en trece departamentos,

en los cuales la producción de oro se constituye como una alternativa económica de los habitantes de las áreas rurales, paradójicamente, para sobrevivir. De acuerdo con las estadísticas históricas del Sistema de Información Minero Colombiano (SIMCO, 2015), los departamentos con mayor producción de oro han sido en su orden Antioquia, Chocó, Bolívar, Caldas, Cauca, Valle del Cauca, Tolima, Nariño, Córdoba, Santander, Risaralda, Putumayo y Huila.

Según el Censo Minero Departamental de 2010-2011 (Ministerio de Minas y Energía, 2012), de las 4133 minas de oro incluidas en 16 departamentos del país, solo 549 (13.3%) tenían título minero y 899 (21,8%) pagaban regalías, lo que demuestra que un importante número de minas de oro no tenían formalización minera. Además, el 72,3% de las minas censadas tenían menos de seis trabajadores y sólo el 0,7% tenían más de 100, lo que sugiere que la mayor parte de la minería de oro corresponde a la MAPE. Estas cifras nos dan una idea de la magnitud del problema de salud pública y ambiental que genera esta actividad económica.

Los problemas asociados a la MAPE surgen de la exposición y emisión de residuos de Hg; durante la amalgamación se libera Hg en su forma metálica a cuerpos de agua y sedimentos, donde por acción de las bacterias se transforman en metilmercurio (MeHg, forma orgánica del Hg) y se biomagnifica en la cadena trófica; por otra parte, durante la combustión de la amalgama, se emiten vapores de Hg a la atmósfera, lo que en su conjunto representan riesgos para el medio ambiente y la salud, tanto de los mineros como de las comunidades aledañas (UNEP, 2012).

Sin embargo, la absorción del Hg va a depender de la forma del metal y de la vía de absorción. Por ejemplo, el Hg metálico, producto de la emisión del vapor de Hg, se absorbe mejor por la vía respiratoria (~ 80%), alcanzando rápidamente el torrente sanguíneo donde se va a oxidar a Hg mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ). Los iones de Hg tienen gran afinidad por sitios nucleofílicos,

particularmente grupos sulfhidrilos (-SH), por lo que se encuentran ligados a moléculas que contienen tiol como glutatión, cisteína y albúmina, lo que le permite el transporte hasta sus órganos diana (Hughes 1957).

En humanos y otros animales, los riñones son los principales órganos blancos en los que se acumula el Hg en sus diferentes formas, ocasionando por lo tanto daño renal. Dentro del riñón, los túbulos proximales son los segmentos de la nefrona más vulnerables a los efectos tóxicos por este metal. Se ha demostrado que la captación de  $\text{Hg}^{2+}$  utiliza mecanismos presentes en la membrana plasmática luminal y basolateral de la célula tubular proximal (Clarkson y Magos, 2006) y se ha formulado la hipótesis que el Hg ingresa a la célula mediante un mecanismo de mimetismo molecular a través de transportadores de aminoácidos (Cannon et al., 2000).

Una vez en el compartimento intracelular, los iones de Hg estimulan la producción de metalotioneínas y/o glutatión, uniéndose a estas moléculas, de lo contrario, el Hg interrumpe la homeostasis intracelular al inducir estrés oxidativo generando especies reactivas de oxígeno (ERO) que van a provocar daños en el ADN, modificación de proteínas, peroxidación lipídica, entre otros; lo cual puede ocasionar desde disfunción tubular renal hasta necrosis tubular renal (Zalups, 2000).

En el departamento de Santander, Colombia, nuestro grupo de investigación adelantó un estudio epidemiológico para determinar la prevalencia de la disfunción renal debida a la exposición al Hg (Sánchez et al., 2016). En este estudio encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ) en los niveles de Hg en sangre y orina cuando se comparó un grupo de personas expuestas ocupacionalmente al Hg con un grupo de personas no expuestas. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las mediciones de varios biomarcadores de función renal: depuración de creatinina en muestras de

orina de 24 horas, corregida por la superficie de área corporal ( $P = 0.772$ ), beta-2-microglobulina ( $P = 0.942$ ), albúmina ( $P = 0.457$ ).

Esta evidencia epidemiológica sugiere que existen otros factores que pueden influir en el efecto tóxico del Hg sobre el riñón; entre ellos se destacan el componente genético y ambiental, los cuales influenciarían los procesos de distribución, acumulación y eliminación de este metal. Determinar la relación entre estos factores es fundamental para entender los procesos fisiopatológicos complejos (Head JA, 2012, Olden K, 2000). No obstante, los factores genéticos, por su característica heredable, son los mayores determinantes de estos procesos fisiopatológicos (Marian AJ, 2012, Barabasi AL, 2011). El trasfondo genético del metabolismo del Hg podría explicar las diferencias interindividuales observadas debido a que algunos genes candidatos estarían relacionados con la desintoxicación de este metal.

A nivel renal, el Hg se elimina después de la conjugación con glutatión por la enzima glutatión-S-transferasa (GST). La producción de glutatión depende de la actividad de la glutamato-cisteína-ligasa (GCL), la enzima limitante de la síntesis de glutatión, y glutatión sintetasa (GSS). Todas estas enzimas son altamente polimórficas y las variaciones genéticas en ellas pueden influir en la actividad enzimática final, modulando así el mecanismo de detoxificación del Hg. A este respecto, se plantea como pregunta de investigación sí: ¿Podrían los polimorfismos *GCLC* rs1555903, *GCLM* rs41303970, *GSS* rs3761144, *GSTA1* rs3957356 y *GSTP1* rs4147581 influenciar la nefrotoxicidad inducida por Hg en una muestra de individuos ocupacionalmente expuesta a este metal?

Existe evidencia epidemiológica relacionada con la exposición al metil-Hg (Custodio et al., 2004; Engström et al., 2008; Gundacker et al., 2007) y Hg elemental (Custodio et al., 2005; Gundacker et al., 2009). Un ejemplo de esto es la enzima GCL; un heterodímero formado por

dos subunidades: una subunidad catalítica (GCLC, 73 kDa) y una subunidad modificadora (GCLM, 31 kDa) (Wu et al., 2004). El gen que codifica para la subunidad modificadora, *GCLM*, presenta variante genética en el promotor (rs41303970, C → T) que afecta la producción de glutatión (Nakamura et al., 2002). Estudios previos han reportado que los portadores del alelo T de *GCLM* muestran niveles de Hg más altos que aquellos con el genotipo CC (Engström et al., 2008, Custodio et al., 2005).

Considerando todo lo anteriormente descrito, el presente trabajo tiene como propósito determinar si las variantes genéticas germinales de tipo SNP (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) ubicadas en genes involucrados en el metabolismo del glutatión están asociadas con los niveles de Hg y biomarcadores de función renal en un contexto de MAPE.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo general

Determinar la asociación de variantes genéticas germinales ubicadas en genes del metabolismo del glutatión con los niveles de Hg en muestras biológicas y biomarcadores de función renal en un grupo de personas con exposición ocupacional al Hg por minería artesanal de oro comparada con un grupo de personas no expuestas a este metal.

### 1.2 Objetivos específicos

- Determinar la asociación de los polimorfismos *GCLC* rs1555903, *GCLM* rs41303970, *GSS* rs3761144, *GSTA1* rs3957356 y *GSTP1* rs4147581 con los niveles de Hg en sangre y orina en un grupo de personas con exposición ocupacional al Hg y un grupo de personas no expuestas a este metal.

- Determinar la asociación de los polimorfismos *GCLC* rs1555903, *GCLM* rs41303970, *GSS* rs3761144, *GSTA1* rs3957356 y *GSTP1* rs4147581 con la depuración de creatinina en muestras de orina de 24 horas, beta-2-microglobulina y albúmina en un grupo de personas con exposición ocupacional al Hg y un grupo de personas no expuestas a este metal.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Mercurio

El mercurio (Hg, hydrargyrium del latín “plata líquida”) es el metal más tóxico entre los metales pesados. Sus propiedades fisicoquímicas son: número atómico 80, peso atómico 200.59, densidad 13.58 g/m<sup>3</sup>, punto de fusión -39°C, punto de ebullición 359°C. El Hg tiene tres estados de valencia y existe en varias formas químicas: Hg elemental (metálico), Hg inorgánico y Hg orgánico (Bjørklund et al., 2017).

El mercurio elemental (Hg<sup>0</sup>) existe en forma líquida a temperatura ambiente, debido a su alta tensión superficial emite vapores a 20°C. La alta volatilidad de Hg<sup>0</sup> prolonga los efectos de la liberación antropogénica y puede permanecer suspendido en la atmósfera hasta por un año, constituyendo la forma predominante de la fase gaseosa, facilitando su transporte a escala global. Se encuentra en termostatos, termómetros, amalgamas dentales, baterías y desempeña un papel fundamental en los graves problemas de salud ocupacional, así como en el ciclo global del Hg. El Hg<sup>0</sup> puede cruzar la barrera hematoencefálica y se oxida intracelularmente a Hg<sup>2+</sup> (Clarkson y Magos, 2006).

El mercurio inorgánico existe como mercúrico (Hg<sup>2+</sup>) o mercurio (Hg<sup>+</sup>) que generalmente se unen a cloro, azufre u oxígeno para formar sales mercúricas o mercúreas. Se ha encontrado Hg inorgánico o sales en laxantes, diuréticos, antisépticos y cosméticos (Bjørklund et al., 2017).

También se puede inducir a partir del metabolismo del vapor de Hg<sup>0</sup> o metilmercurio (metil-Hg) (Ozuah, 2000).

El mercurio orgánico se considera la forma más frecuente de exposición y a la vez la más peligrosa debido a sus efectos neurotóxicos (Crowe et al., 2017). Dentro de las fuentes de mercurio orgánico, particularmente el metil-Hg se encuentra en los peces, mientras que el etilmercurio (etil-Hg) es el producto del metabolismo del timerosal, un conservante de vacunas. Tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica al igual que el Hg<sup>0</sup>.

**2.1.1 Fuentes de exposición al Hg.** El Hg existe en la naturaleza principalmente como Hg<sup>0</sup> o como sulfuro y se encuentra en la corteza terrestre a una concentración de aproximadamente 0.5 ppm. Las principales fuentes de exposición al Hg incluyen medios naturales como la desgasificación de las rocas, actividad volcánica, erosión de suelos y actividades antropogénicas como la agricultura, las descargas de aguas residuales industriales, la minería (especialmente la extracción de oro) y la incineración de carbón.

El Hg<sup>0</sup> se deposita en el agua y por reacciones de metilación de las bacterias allí presentes, lo convierten en metil-Hg, biomagnificándose en la cadena alimentaria, por lo que en los peces más grandes (por ejemplo, el atún, pez espada o tiburón) pueden encontrarse mayores cantidades de Hg en sus tejidos (Bjørklund et al., 2017), por lo tanto, la exposición humana al metal puede surgir de la exposición ocupacional, ambiental o dietética.

**2.1.2 Mercurio en la minería.** La MAPE es la mayor fuente antropogénica de contaminación por Hg (UNEP, 2013). Este metal tóxico constituye el principal elemento para la extracción de oro, debido a su capacidad de formar amalgamas con otros metales; en este caso,

una mezcla compuesta por Hg y oro. La amalgamación es una técnica ampliamente utilizada en la MAPE debido a su bajo costo en comparación con otros métodos alternativos; además, una persona puede utilizarla de manera independiente, rápida y fácil.

En la amalgamación, primero se trituran en pequeños trozos las rocas que contienen el mineral (oro), luego se adicionan a molinos motorizados (los molinos se construyen cerca de vías fluviales, como ríos) con agua; para extraer el mineral triturado, se agrega Hg metálico y se mezcla durante varias horas (Figura 1A). En cada molino, es común agregar entre 0.3 y 1 Kg de Hg por cada 20 Kg de mineral triturado (Figura 1B). Las amalgamas de Hg y oro, se separa manualmente de las rocas y arenas finamente trituradas y el exceso de Hg se recupera para ser reutilizado (Figura 1C), este proceso puede repetirse hasta 4 veces para maximizar la extracción (Esdaile & Chalker, 2018).

Luego, las amalgamas se filtran a través de una tela con el fin de eliminar el exceso de Hg metálico (Figura 1D). El producto del filtrado está constituido en un 40% de Hg en masa, por lo que la amalgama se calienta, ya sea con una antorcha o estufa (Figura 1E), evaporando el Hg de la mezcla y purificando el oro (Figura 1F) (AMAP/UNEP, 2013).



*Figura 1.* Método de amalgamación en la MAPE. A). Los molinos se usan para triturar las rocas que contienen el mineral. B). Se agrega entre 0.3 y 1 Kg de Hg por cada 20 Kg de mineral triturado. C). Las amalgamas de Hg y oro se separan manualmente de las rocas y arenas finamente trituradas. D). Las amalgamas se filtran con el fin de eliminar el exceso de Hg°. E). La amalgama Hg-oro se calienta para evaporar el Hg. F). Se obtiene el oro puro. Adaptado de Esdaile & Chalker (2018).

Debido al aumento del precio de oro en los últimos diez años (aproximadamente \$40.000 USD/Kg durante la mayor parte del 2017) (<https://www.gold.org/data/gold-price>), el número de personas involucradas en esta actividad ha aumentado; se estima que entre 10 a 19 millones de personas, de las cuales cinco millones corresponden a mujeres y niños (Kippenberg et al., 2015), realizan MAPE en más de 70 países en el mundo, especialmente en América del Sur, África y Asia (Figura 2), liberando aproximadamente 1400 toneladas de Hg al año, lo que representa el 37% de las emisiones mundiales de Hg (Seccatore et al., 2014).

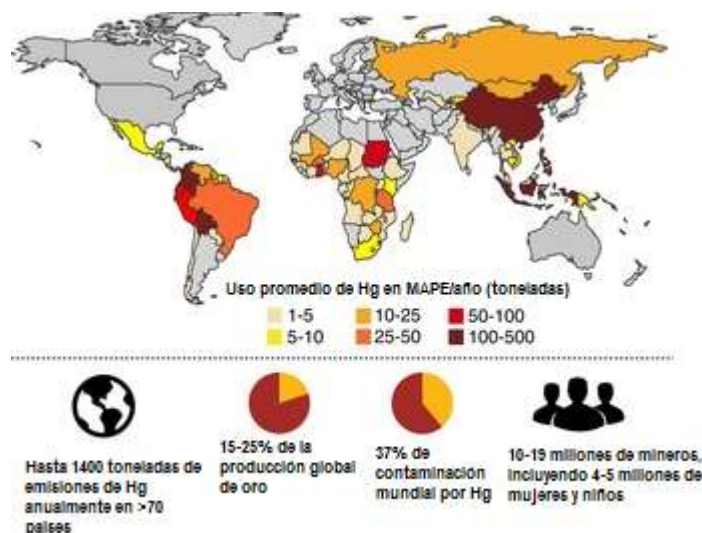


Figura 2. Estimado del uso anual de Hg en la MAPE. Adaptado de Esdaile & Chalker (2018)

Las regiones mineras suelen ser zonas empobrecidas y en la mayoría de los casos, existen pocas oportunidades de empleo; las personas que participan de estas actividades, utilizan la extracción de oro como una fuente de ingresos, por lo que la MAPE se convierte en una forma crítica de mantener un sustento (Veiga et al., 2009). La MAPE en su mayoría no está regulada (Hentschel et al., 2002; Harari et al., 2012) y se lleva a cabo en la denominada economía “informal”, donde los participantes operan sin licencia o sin autorización legal, por lo que la regulación de las emisiones de Hg resulta difícil (Van Bockstael, 2014).

Los problemas asociados a la MAPE surgen de la exposición y emisión de residuos de Hg, que afectan tanto a los mineros como a la población general. Las principales fuentes de emisiones son las descargas de relaves al suelo y agua y las emisiones de vapor de Hg a la atmósfera durante la combustión de la amalgama (Esdaile & Chalker, 2018).

En el proceso de amalgamación, se puede perder gran cantidad de Hg en los relaves, particularmente, en la molienda del mineral en los molinos; debido a que se forman finas gotas de Hg, las cuales se distribuyen en los relaves y fácilmente se lavan con el agua, transportándose

lejos de los sitios de extracción (Vieira, 2006). Estos relaves pueden contener entre 50 y 5000 mg de Hg por Kg de mineral y 14% de oro en masa, lo que representa una pérdida sustancial tanto de Hg como de oro (Veiga et al., 2009).

La liberación de Hg metálico de los relaves al suelo y agua es un riesgo para la salud humana, debido a que las bacterias allí presentes, metilan el Hg convirtiéndolo en metil-Hg, el cual se biomagnifica en la cadena trófica, comprometiendo la seguridad alimentaria (Reichelt-Brushett et al., 2017).

Por otra parte, durante la combustión de la amalgama para la purificación del oro, se emiten vapores de Hg a la atmósfera. Cuando los mineros queman las amalgamas, lo realizan con frecuencia en áreas sin ventilación y en muchas ocasiones en estufas de cocinas residenciales exponiéndose a altas concentraciones de vapores de Hg perjudiciales para los pulmones, riñones, hígado y sistema nervioso (Park & Zheng, 2012).

Colombia se posiciona como el mayor contaminante de Hg per cápita (Cordy et al., 2011). La liberación de Hg al medio ambiente a partir de la extracción de oro representa un problema de salud pública. En nuestro país, no cabe duda que la extracción de este metal precioso es un gran factor de riesgo de destrucción del medio ambiente (Palacios-Torres et al., 2017). Entre 2005 y 2010 las emisiones de Hg se duplicaron (UNEP, 2013) y la producción de oro aumentó más del 300% entre 2006 y 2010 (BGS, 2012).

La producción de oro está concentrada en un 99,5% en trece departamentos, constituyéndose como una alternativa de los habitantes de las áreas rurales, paradójicamente, para sobrevivir. De acuerdo con las estadísticas históricas del Sistema de Información Minero Colombiano (SIMCO, 2015), los departamentos con mayor producción de oro han sido en su orden Antioquia, Chocó,

Bolívar, Caldas, Cauca, Valle del Cauca, Tolima, Nariño, Córdoba, Santander, Risaralda, Putumayo y Huila.

Es importante tener en cuenta que un gran porcentaje de la extracción de oro es informal y generalmente el territorio donde se desarrolla la minería corresponde a áreas ricas en biodiversidad, lo que conlleva a una amenaza para los bosques, masas de agua y los organismos vivos (Palacios-Torres et al., 2017). Colombia alberga variedad de ecosistemas, áreas con gran biodiversidad, contando el departamento de Santander con una de las reservas naturales más importante del país, como lo es el Páramo de Santurbán, el cual representa la fuente hídrica que abastece nuestro departamento y ha sufrido por años el impacto de la explotación minera, particularmente minería aurífera (Grimaldos, 2016).

### **2.1.3 Toxicocinética y toxicodinamia del Hg**

**2.1.3.1 Absorción y distribución.** El Hg<sup>0</sup> se absorbe en mayor proporción a través del tracto respiratorio (~ 80%) y en menor proporción a través del tracto gastrointestinal (GI, ~0.1%). Por su propiedad lipofílica pasa fácilmente a través de la barrera de células alveolares, y una vez en los eritrocitos se oxida a Hg mercúrico (Hg<sup>2+</sup>) por acción de la catalasa. El sistema nervioso central absorbe parte en la forma de Hg metálico debido a su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y la placenta, termina acumulándose en el cerebro fetal (Berlin et al., 2007)

El mercurio inorgánico por su parte se absorbe principalmente a través del tracto respiratorio y en menor medida a través de la piel (3-4%) o tracto gastrointestinal (GI 2-10%). Los iones mercúricos tienen alta afinidad por los grupos nucleofílicos, particularmente grupos (tiol; -SH). La forma mercúrica (Hg<sup>2+</sup>) en el torrente sanguíneo se une a grupos sulfhidrilo (-SH) de la

albúmina, glutatión, cisteína, lo que facilita su transporte hasta los órganos blancos (Bridges y Zalups, 2017).

A diferencia de las formas elementales e inorgánicas del Hg, la forma orgánica como por ejemplo el metil-Hg, se absorbe fácilmente en el tracto GI ( $\geq 95\%$ ). La concentración de metil-Hg ocurre principalmente en el cerebro y en otros órganos como el hígado, los riñones, la placenta y el feto, especialmente en el cerebro fetal, así como en los nervios periféricos y la médula ósea (Berlin et al., 2007). Una vez depositado en dichos órganos, se somete lentamente a la desmetilación en  $\text{Hg}^{2+}$ .

**2.1.3.2 Eliminación.** La excreción de  $\text{Hg}^0$  se produce a través de la exhalación, eliminando del 10 – 20% del total del  $\text{Hg}^0$  inhalado (Rothstein y Hayes, 1964). La excreción de mercurio mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) se produce principalmente a través de la orina y las heces, con una vida media de alrededor de dos meses, aunque se liberan cantidades significativas a través del sudor, las lágrimas, la leche materna y la saliva (Berlin et al., 2007).

La vida media del metil-Hg en el hombre es de aproximadamente 70 días, y aproximadamente el 90% se excreta en las heces. Quizás el 20% del metil-Hg se excreta en la leche materna, variando la cantidad de acuerdo con la exposición. El mercurio capilar refleja el metil-Hg en sangre en el momento de la incorporación, pero no el  $\text{Hg}^0$  (Berglund et al., 2005), y por lo tanto no se puede considerar un buen índice de la carga corporal total, dada la corta vida media del metil-Hg en la sangre (Berlin et al., 2007).

**2.1.4 Metabolismo del glutatión.** El Hg se une a numerosas estructuras biológicas bloqueando su actividad debido a la gran afinidad por los grupos sulfhidrilos (-SH),

principalmente se une a los toiles de los aminoácidos contenidos en proteínas y péptidos antioxidantes como el glutatión (γ-L-glutamil-L-cisteinil-glicina). Este antioxidante no enzimático intracelular multifuncional es un tripéptido conformado por los aminoácidos glutamato, glicina y cisteína y el principal tampón redox tiol-disulfuro de la célula (Masella et al., 2005).

El grupo -SH de la cisteína está involucrado en las reacciones de conjugación y reducción dentro de las funciones más importantes del glutatión. Se considera que el glutatión reducido (GSH) es uno de los secuestradores más importantes de las ERO de la célula, y su relación con el glutatión oxidado (GSSG) puede usarse como un marcador de estrés oxidativo (Figura 3). El GSH es muy abundante en el citosol (1-11 mM), en los núcleos (3-15 mM) y en las mitocondrias (5-11 mM), siendo el principal antioxidante soluble en estos compartimentos celulares (Masella et al., 2005).

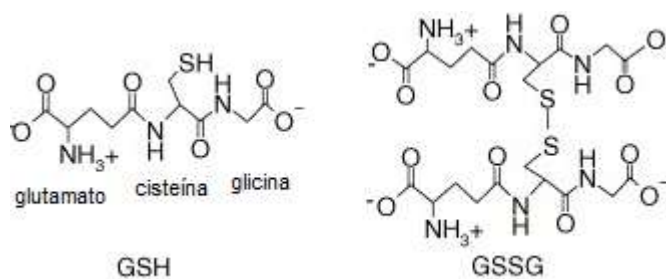


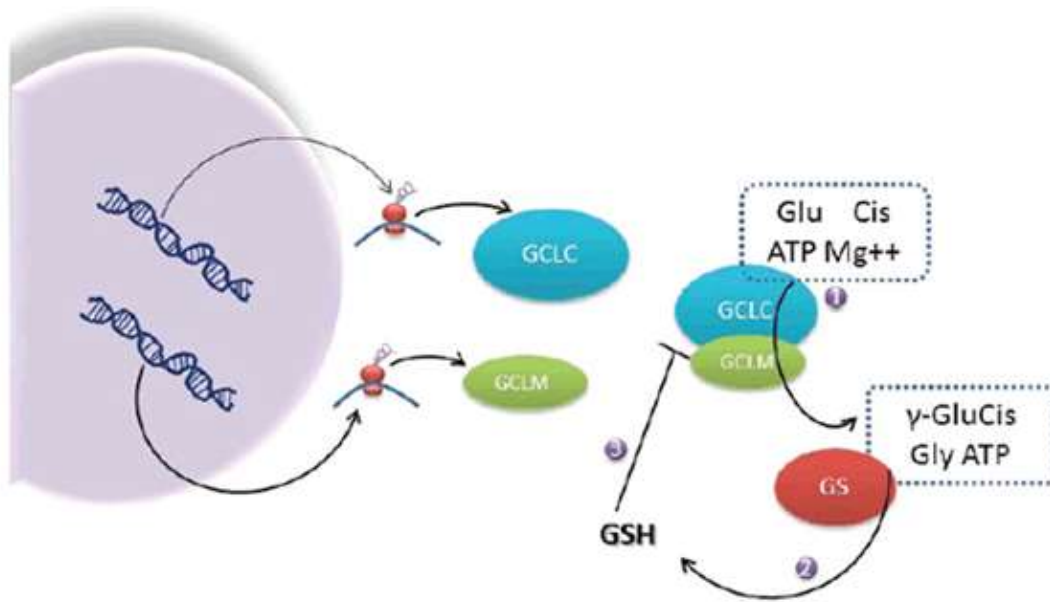
Figura 3. Estructuras del glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG). Adaptado de Valko et al. (2006)

La síntesis del glutatión está catalizada por dos enzimas citosólicas: glutamato cisteína ligasa (GCL, EC 6.3.2.2) y glutatión sintetasa (GSS, EC 6.3.2.3). Aunque estas reacciones ocurren prácticamente en todos los órganos y tejidos, el hígado es considerado el principal productor de glutatión. Inicialmente, el grupo γ-carboxilo (-COOH) del glutamato reacciona con el grupo

amino ( $-NH_2$ ) de la cisteína para formar el dipéptido  $\gamma$ -L-glutamilcisteína catalizado por la GCL. Finalmente, este dipéptido es combinado con la glicina por acción catalítica de la enzima GSS.

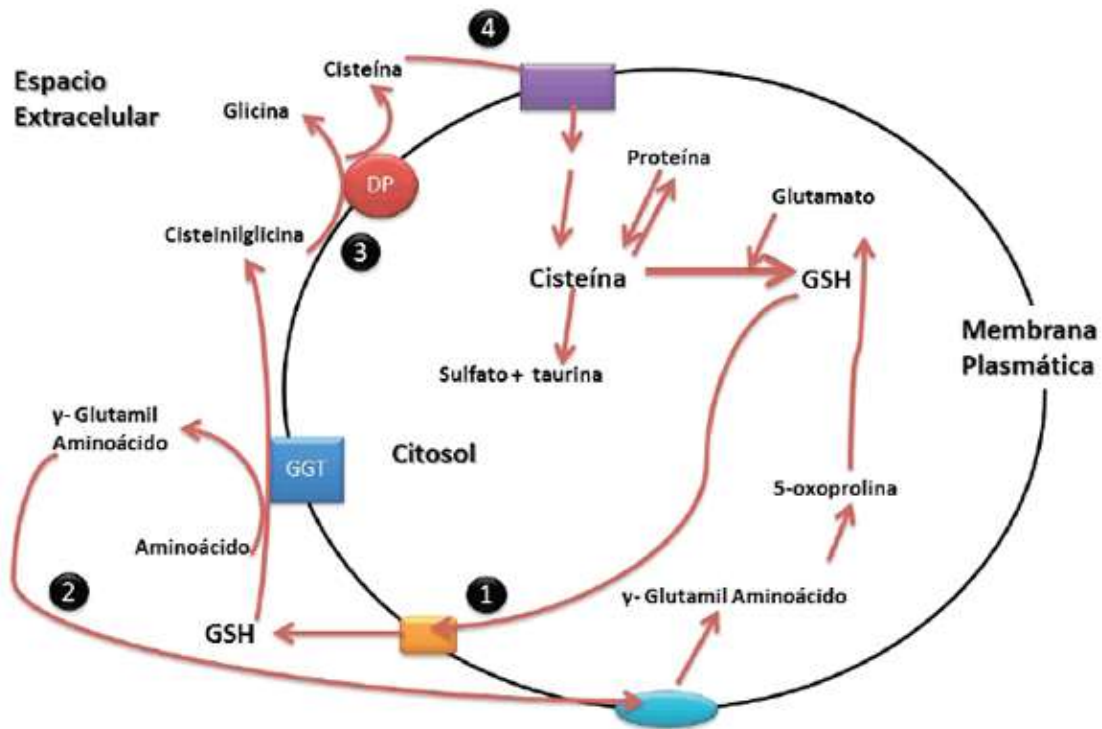
En condiciones fisiológicas normales, la síntesis de glutatión está determinada por dos factores principales: uno es la actividad de la GCL y otro la disponibilidad de aminoácidos, especialmente cisteína. Por lo tanto, los niveles intracelulares de glutatión son regulados por el efecto de retroalimentación negativo que ejerce el glutatión sobre la GCL (Denzoin et al., 2013).

La GCL es la enzima que controla la velocidad en la síntesis de novo de glutatión. Esta enzima es un heterodímero que consiste en una subunidad pesada con actividad catalítica (GCLC, 73 kDa) y una subunidad ligera con actividad moduladora (GCLM, 31 kDa) (Wu et al., 2004). La subunidad pesada tiene los sitios de unión al sustrato, mientras que la subunidad ligera modula la eficiencia catalítica de la GCL. La enzima GSS es un homodímero (54 kDa/unidad) con unión cooperativa para específicamente cataliza la unión de la glicina al dipéptido  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteína (Njalsson et al., 2001) (Figura 4). La síntesis enzimática de glutatión está controlada a través de la inducción de los genes *GCLC* y *GCLM* que conducen a la síntesis de las subunidades de la enzima GCL.



*Figura 4.* Esquema de la síntesis de glutatión. El primer paso es llevado a cabo por la enzima GCL, compuesta por una subunidad catalítica (*GCLC*) y una subunidad moduladora (*GCLM*). 1. GCL liga cisteína y glutamato para formar el dipéptido  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteína. 2. El segundo paso es llevado a cabo por la GS que une glicina a  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteína. Ambos pasos son dependientes de ATP. 3. Efecto de retroalimentación del glutatión (GSH) sobre la actividad GCL. Adaptado de Denzoin et al. (2013).

Luego de su síntesis, el glutatión es transportado a los compartimentos intracelulares, mitocondria y retículo endoplasmático, sin embargo, la mayor parte se libera a través de los transportadores hacia el espacio extracelular, donde se degrada rápidamente por la enzima  $\gamma$ -glutamyltransferasa (GGT) y las dipeptidasas presentes en la membrana citoplasmática externa.



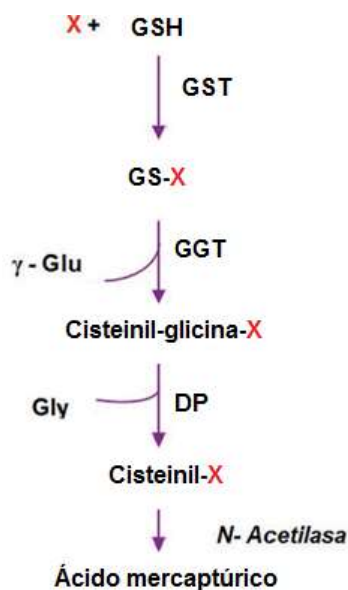
*Figura 5.* Ciclo Y-glutamil. El glutatión es sintetizado a nivel intracelular y es transportado hacia el espacio extracelular donde ocurre su degradación. 1. GGT transfiere la fracción Y-glutamil a un aminoácido formando Y-glutamilaminoácido, el cual es transportado dentro de la célula como precursor de glutamato para ingresar nuevamente a la síntesis de glutatión (2). La fracción cisteinil-glicina es desdoblada por dipeptidasas (DP) extracelulares en los aminoácidos cisteína y glicina. 3. La cisteína ingresa a la célula donde puede ser utilizada en la síntesis de glutatión (4). Adaptado de Denzoin et al. (2013).

La GGT es la única enzima que puede iniciar el catabolismo del glutatión, esta enzima actúa sobre el glutatión formando dos fracciones: la fracción Y-glutamil y la fracción cisteinil-glicina, donde la fracción Y-glutamil se transfiere a un aminoácido aceptor, formando Y-glutamilaminoácido, el cual vuelve a ingresar a la célula y puede ser metabolizado para liberar el aminoácido y 5 oxoprolina, precursor de glutamato para ser utilizado nuevamente en la síntesis de glutatión. Por otra parte, la fracción cisteinil-glicina es desdoblada por la enzima dipeptidasa generando cisteína y glicina; la mayor parte de la cisteína que ingresa a la célula es incorporada a la síntesis de glutatión. El ciclo Y-glutamil permite que el glutatión pueda ser usado como una

fuente continua de cisteína (Denzoin et al., 2013) (Figura 5). El hígado y los riñones son los principales órganos involucrados en la síntesis y degradación del glutatión (Pastore et al., 2003).

Dentro de las funciones antioxidantes, el glutatión reacciona con diversos electrófilos, metabolitos fisiológicos (por ejemplo, estrógenos, melaninas, prostaglandinas y leucotrienos) y xenobióticos (por ejemplo, metales pesados, medicamentos, metabolitos secundarios), conjugándose con éstos para luego ser excretados por orina o heces bajo la forma de compuestos mercaptúricos. Estas reacciones son iniciadas por el grupo de enzimas glutatión-*S*-transferasa (GST) (Pastore et al., 2003).

Los conjugados formados son excretados fuera de la célula y en el espacio extracelular actúa sobre ellos la GGT liberando la fracción cisteinil-glicina-conjugado sobre la que actúa la enzima DP, el cisteinil conjugado resultante es acetilado y liberado como ácido mercaptúrico (Figura 6)



*Figura 6.* Conjugación con GSH y detoxificación de xenobióticos. X es un compuesto electrofílico que se conjuga con GSH en una reacción catalizada por la enzima GST. La fracción  $\gamma$  glutamil luego es desdoblada por la enzima GGT, liberando el conjugado cisteinilglicina, el cual es hidrolizado por DP, resultando en la formación del cisteinil conjugado. Luego se continúa con la N-acetilación formando ácido mercaptúrico. Adaptado de Denzoin et al. (2013)

Las GST son esenciales en las reacciones de desintoxicación de fase II en humanos, catalizando la conjugación de xenobióticos con glutatión o uniéndose pasivamente a varias moléculas tóxicas exógenas/endógenas, incluyendo xenobióticos ambientales, medicamentos o productos de estrés oxidativo (Xie et al., 2015), lo que disminuye su actividad tóxica contra las macromoléculas celulares (protegen a los organismos del daño del ADN o protegen a los cromosomas del daño oxidativo).

La GST citosólica humana consiste en GST- $\alpha$  (alfa), GST- $\mu$  (mu), GST- $\pi$  (pi), GST- $\sigma$  (sigma), GST- $\omega$  (omega), GST- $\theta$  (theta) y GST- $\zeta$  (zeta) en base a sus similitudes de secuencia, especificidad de sustrato y reactividad inmune. Entre estas clases, GST- $\mu$ , GST- $\pi$ , GST- $\alpha$  y GST- $\theta$  son las más abundantes y la variación en los alelos GST es muy común en la población. Esta variación contribuye significativamente a las diferencias interindividuales en el metabolismo de los xenobióticos (Strange et al., 2000)

**2.1.5 Nefrotoxicidad e interacción del glutatión con el Hg.** Las formas inorgánicas y orgánicas de Hg se acumulan fácilmente en los riñones, constituyéndose como los sitios primarios de toxicidad, particularmente por Hg inorgánico ( $\text{Hg}^{2+}$ ). La acumulación de  $\text{Hg}^{2+}$  ocurre principalmente en las células del túbulo proximal; se estima que aproximadamente el 50% de una dosis no tóxica se acumula rápidamente después de algunas horas de exposición. Aunque los mecanismos por los cuales los iones de Hg son absorbidos por la célula tubular proximal no están bien definidos, la evidencia sugiere que la captación se da a nivel de las membranas luminal y basolateral (Clarkson y Magos, 2006).

Es importante tener en cuenta que dentro de los sistemas biológicos los iones de Hg, mercúricos y metil-Hg no se encuentran como sales inorgánicas o en un estado iónico libre, por

el contrario, se encuentran unidos a una o más biomoléculas que contienen tiol, como el glutatión. Estudios *in vitro* en modelos celulares de células tubulares proximales sugieren que el conjugado de cisteína con Hg (Cys-Hg-Cys) es la principal forma de transporte a través de la membrana luminal (Zalups, 2000).

La captación de estos conjugados depende de la actividad enzimática de la GGT y la DP que se encuentran localizadas en el borde en cepillo de la membrana plasmática luminal (Zalups, 2000) donde la GGT rompe el enlace  $\gamma$ -glutamilcisteína de las moléculas de glutatión unidas a Hg (GSH-Hg-GSH), obteniendo un S-conjugado de cisteinilglicina de Hg (Gly-Cys-Hg-Cys-Gly) que por acción de la DP es convertido en un S-conjugado de cisteína de Hg (Cys-Hg-Cys), el cual puede ser absorbido por las células tubulares proximales probablemente mediante un transportador de aminoácidos (Chung et al., 2014). (Figura 7).

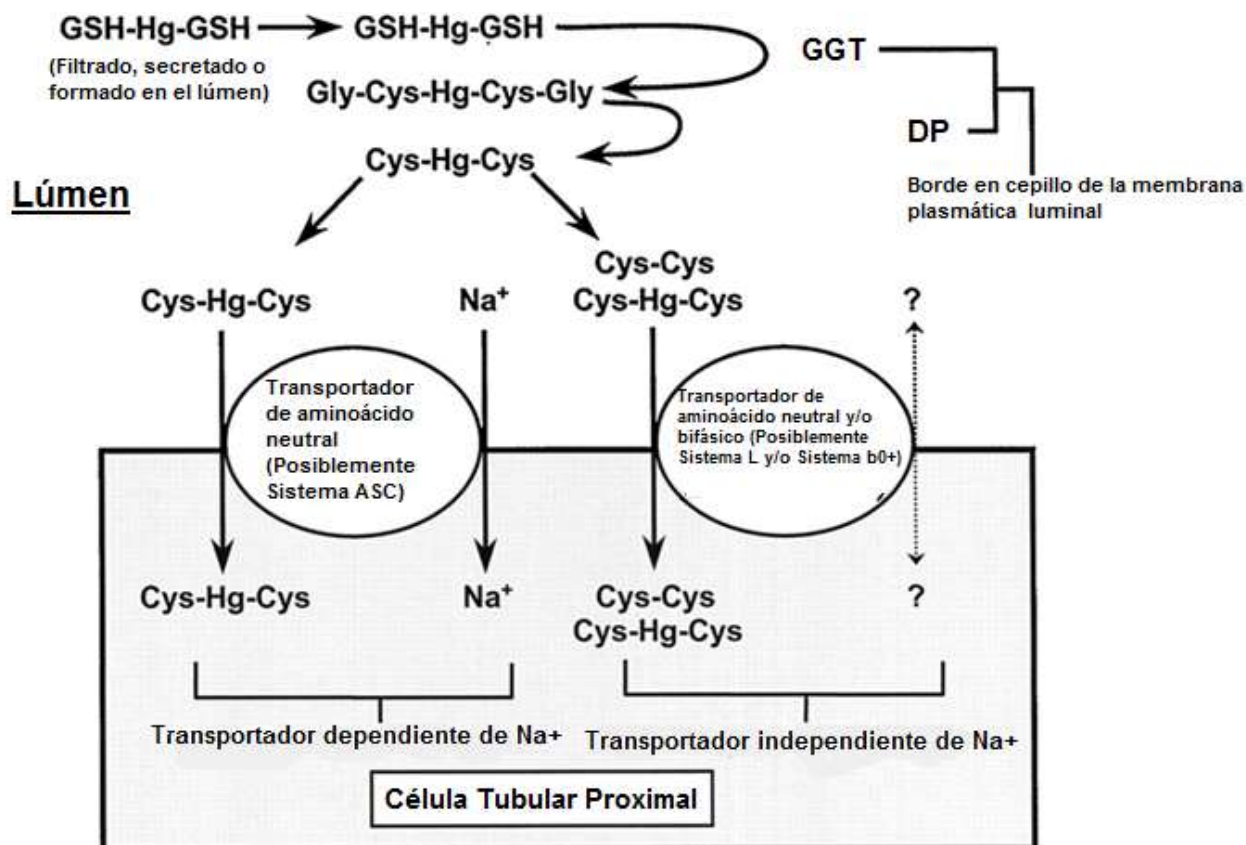


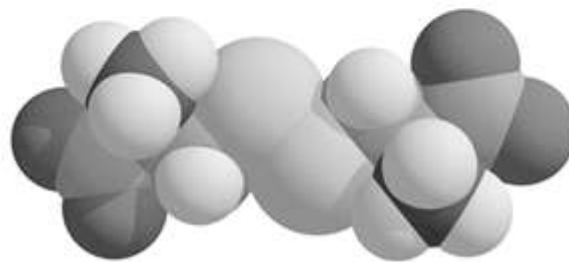
Figura 7. Mecanismos de captación de conjugados de Hg por la membrana luminal. La figura proporciona algunos detalles sobre los posibles mecanismos involucrados en la captación luminal del conjugado dicisteinilmercurio (Cys-Hg-Cys) en la célula tubular proximal. Al menos dos transportadores de aminoácidos parecen estar involucrados. Uno de ellos es un transportador dependiente de sodio mientras que el otro es independiente de sodio. El sistema ASC es un candidato probable del transportador dependiente de sodio involucrado en la absorción de dicisteinilmercurio. Entre los posibles candidatos de transportadores que son independientes de sodio, se encuentra el sistema L o b0. Una de las hipótesis con respecto al mecanismo por el cual parte del dicisteinilmercurio ingresa a las células tubulares proximales es por un mecanismo de homología molecular, denominada “mimetismo”. La hipótesis establece que el complejo dicisteinilmercurio es funcionalmente homólogo al aminoácido cistina y entra a través de uno de los sistemas de transporte involucrados en la absorción de cistina. Adaptado de Zalups R, K. (2000)

La estructura molecular y el tamaño del conjugado Cys-Hg-Cys es muy similar a la del aminoácido cistina (Cys-Cys) (Figura 8), por lo cual se ha formulado la hipótesis de que el S-conjugado de cisteína de Hg actúa como un imitador molecular u homólogo del aminoácido

cistina, y por lo tanto se sugiere que puede ser absorbido por el transportador de aminoácido de cistina en la membrana plasmática luminal (Zalups, 2000). Uno de los transportadores de aminoácidos más opcionado en cumplir esta función es el sistema  $b^{0,+}$ , el cual es un transportador independiente de Na que participa en la absorción de cistina y lisina (Palacín et al., 2001). Utilizando células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) transfectadas con el sistema  $b^{0,+}$  se observó que éste es capaz de transportar iones de Hg en la forma Cys-Hg-Cys (Bridges y Zalups, 2017).



**Dicisteinilmercurio**



**Cistina**

*Figura 8.* Representación de la molécula cistina y dicisteinilmercurio. El complejo formado por dos moléculas de cisteína unidas a un ión mercúrico explica la homología entre dicisteinilmercurio y cistina. Adaptado de Zalups R, K. (2000)

Adicionalmente, en las células tubulares proximales se estima que aproximadamente del 40 al 60% del Hg que se acumula en ellas, es absorbido a nivel de la membrana basolateral. Utilizando

células MDCK transfectadas con transportadores de la membrana basolateral de las células tubulares proximales, como los transportadores de aniones orgánicos OAT1 (*SLC22A6*) y OAT3 (*SLC22A8*), se evidenció que los S-conjugados de Hg y el metil-Hg son captados por estos transportadores (Zalups, 2000). La captación de estos S-conjugados de Hg por los transportadores de aniones orgánicos depende de la generación intracelular de  $\alpha$ -cetoglutarato proveniente de procesos metabólicos, creando un gradiente químico que facilita su salida a través de los transportadores de aniones orgánicos, lo que a su vez permite la entrada de los S-conjugados de Hg (Zalups, 2000) (Figura 9)

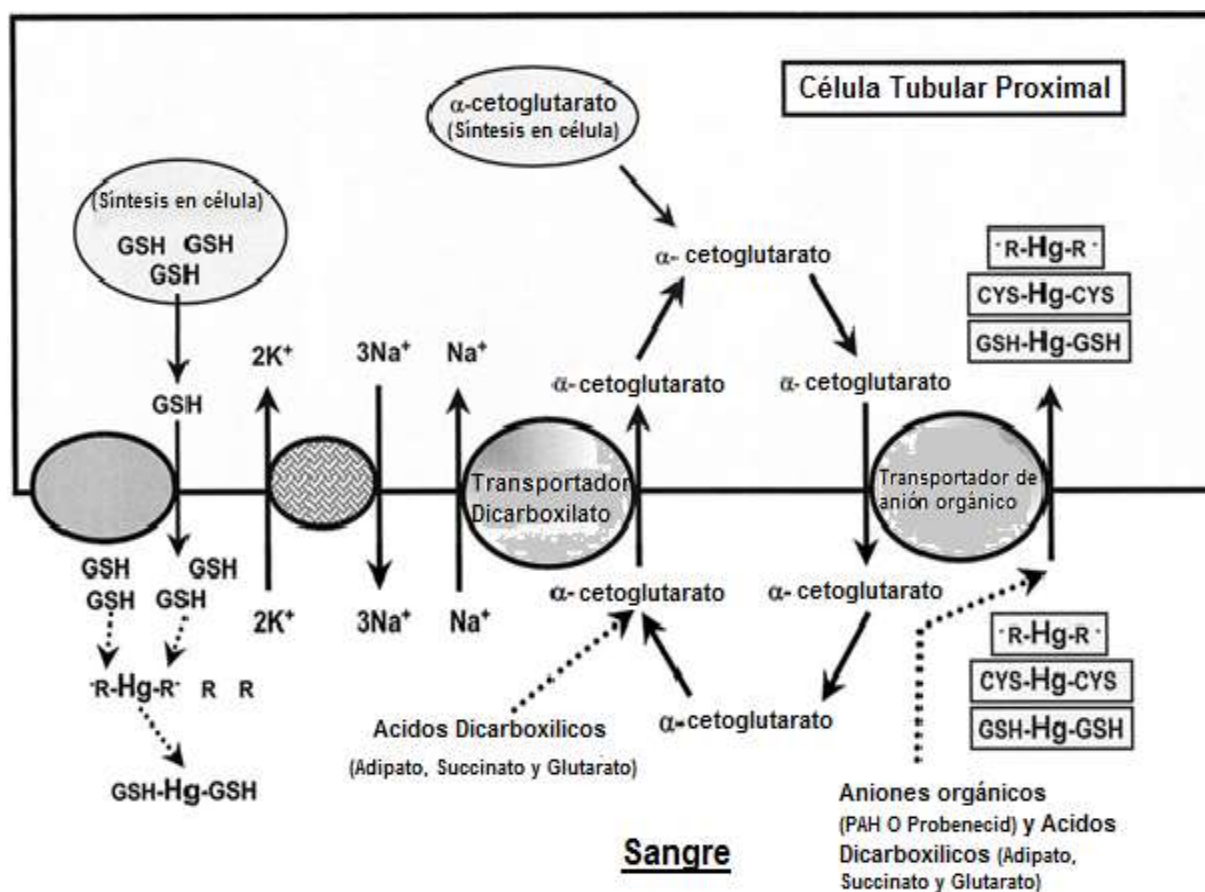


Figura 9. Sistemas de transporte en la captación basolateral de mercurio inorgánico.

El diagrama describe los posibles roles de los sistemas de transporte de aniones orgánicos y ácido dicarboxílico en la absorción basolateral de mercurio inorgánico a lo largo del túbulo proximal. El Hg inorgánico ingresa a las células tubulares proximales a través del sistema de transporte de aniones orgánicos por el intercambio de la salida de  $\alpha$ -cetoglutarato. La generación intracelular de  $\alpha$ -cetoglutarato (como resultado de procesos metabólicos) crea un gradiente químico que facilita su salida de las células tubulares proximales en la membrana basolateral. Después de ser transportado fuera de la célula tubular proximal, el  $\alpha$ -cetoglutarato vuelve a ingresar a la célula a través de un transportador de dicarboxilato que involucra el cotransporte de sodio. El gradiente de sodio es generado por la ATPasa  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  localizado en la membrana basolateral. El Hg inorgánico ingresa a las células tubulares proximales (posiblemente como un conjugado con GSH (GSH-Hg-GSH), cisteína (CYS-Hg-CYS) y otras moléculas pequeñas que poseen carga negativa R-Hg-R como N-acetilcisteína, a través del transportador de aniones orgánicos a cambio de  $\alpha$ -cetoglutarato intracelular. La absorción a través de este transportador puede ser inhibida por el para-aminohipurato (HAP) y probenecid. El esquema muestra que el succinato, el glutarato y el adipato, compiten con el  $\alpha$ -cetoglutarato en el sitio de transportador de ácido dicarboxílico. También muestra el transporte del GSH recién sintetizado desde dentro de las células tubulares proximales hacia el compartimento basal que rodea el túbulo donde podría interactuar con otras moléculas unidas a iones mercúricos, lo que da como resultado la formación de conjugados GSH-Hg, que luego podrían transportarse a las células tubulares proximales. Adaptado de Zalups R, K. (2000)

**2.1.5.1 Efectos renales de la exposición a Hg.** Una vez los iones de Hg acceden al compartimento intracelular, forman enlaces con proteínas y moléculas no proteicas que

contienen tiol tales como el glutatión y las metalotioneínas (MT). En el caso de las MT, se sugiere que, el Hg con ellas produce una forma no transportable de este metal pesado, contribuyendo así la retención de iones mercúricos dentro de la célula. Se ha demostrado que la exposición a  $\text{Hg}^{2+}$  aumenta la expresión de ARNm de MT, lo que conduce a una mayor formación de complejos Hg-MT que son retenidos en las células tubulares proximales (Zalups y Koropatnick 2000).

Debido a que el contenido celular del glutatión se encuentra bajo control de retroalimentación, se ha observado que, a dosis bajas y moderadas de Hg inorgánico, se induce la expresión de glutamato cisteína ligasa (GCL), la enzima limitante de la velocidad de síntesis de glutatión. (Bridges et al., 2013). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado incrementos en el contenido intracelular de glutatión en células tubulares proximales luego de la administración de bajas dosis de Hg, a altas dosis del metal, se observaron disminuciones en la concentración de glutatión, lo que sugiere que el contenido renal del mismo, depende de la dosis de Hg inorgánico (Zalups et al., 1993).

La acumulación de iones mercúricos en las células tubulares proximales puede provocar cambios en la metilación y reparación del ADN, inflamación, lesión mitocondrial y estrés oxidativo (Figura 10) con efectos significativos sobre las enzimas responsables de controlar la detoxificación celular (Joshi et al., 2014). Al Bakheet et al., 2013, descubrieron que la exposición crónica a Hg disminuye la expresión renal de algunas proteínas involucradas en la desintoxicación y reducción del estrés oxidativo como NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), hemo-oxigenasa-1 (HO-1), alfa-glutatión-S-transferasa (GSTA1) y MT-1.

De manera similar, otros estudios demostraron que cuando las ratas se expusieron a  $\text{HgCl}_2$ , se evidenció reducción en los niveles de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), GSH y

GSSG, lo que sugiere que estas enzimas se agotaron en el proceso de contrarrestar los efectos oxidativos (Agrawal et al., 2014).

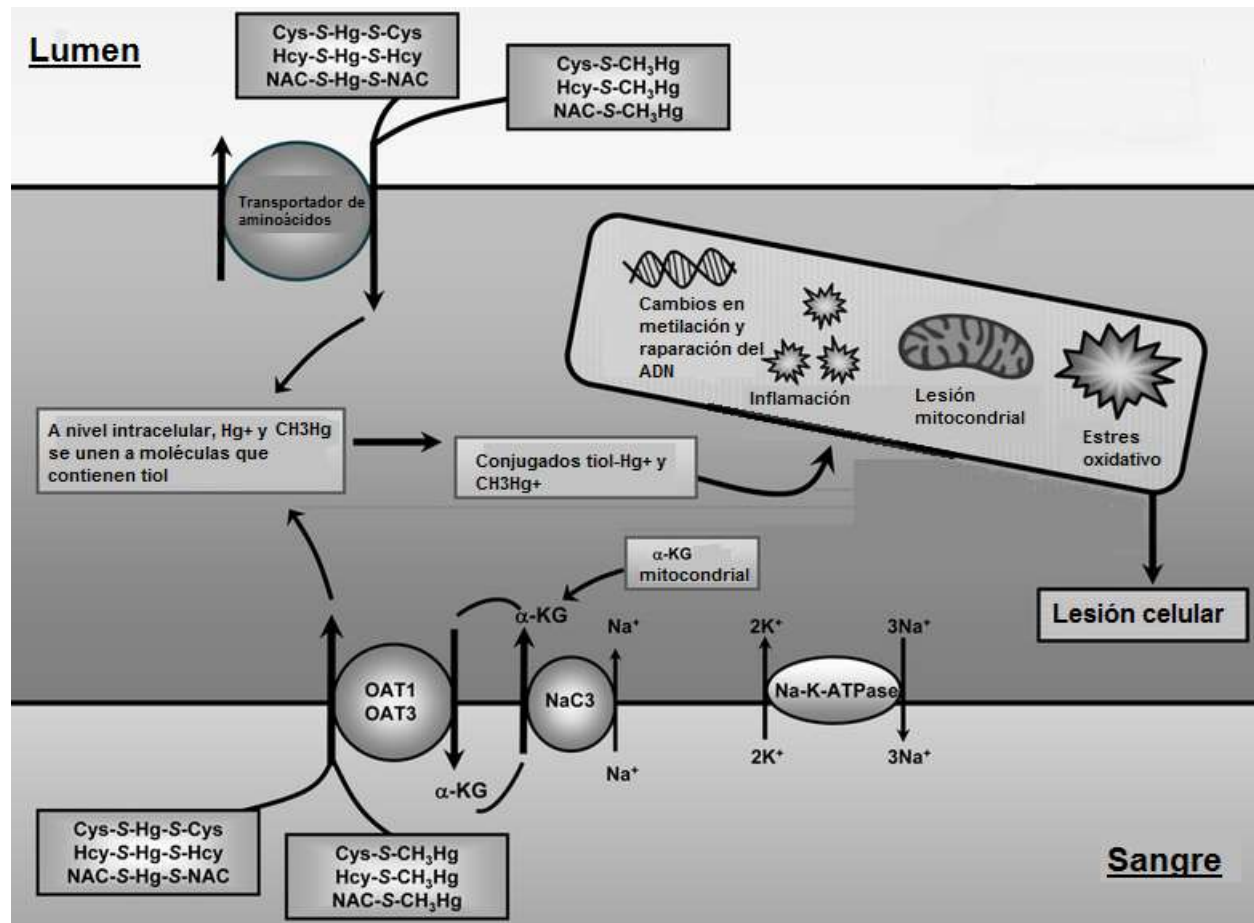


Figura 10. Toxicidad del Hg en las células tubulares proximales. Las formas inorgánicas ( $\text{Hg}^{2+}$ ) y orgánicas ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) de Hg ingresan a las células tubulares proximales como conjugados con tioles (Cisteína, Cys; homocisteína, Hcy; N-acetilcisteína, NAC) en la membrana luminal a través de transportadores de aminoácidos y en la membrana basolateral a través de transportadores de aniones orgánicos (OAT) 1 y 3. OAT 1 y 3 son impulsados por el movimiento circular  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG), que ingresa a la célula a través del  $\text{Na}^+$ -transportador de dicarboxilato (NaC3). Una vez dentro de la célula, los conjugados mercurícos pueden provocar cambios en la metilación y reparación del ADN, inflamación, lesión mitocondrial y estrés oxidativo. Adaptado de Bridges y Zalups, (2017)

La exposición de las células renales a todas las formas de Hg y la inducción de estrés oxidativo intracelular puede ocasionar disfunción mitocondrial y, por lo tanto, reducción de la viabilidad celular (Carocci et al., 2013). Los segmentos rectos del túbulo proximal, especialmente la parte de unión entre la corteza y la médula externa, son los sitios más sensibles a los efectos tóxicos del Hg, suelen ser los primeros afectados por la exposición a este metal, a diferencia de las porciones convolucionadas y segmentos distales de la nefrona, que a bajas dosis de Hg no se afectan, pero que a altas dosis de Hg puede afectarse con producción de lesiones e incluso necrosis (Zalups y Ahmad, 2005).

Los efectos nefrotóxicos producidos por Hg se pueden presentar aproximadamente en un periodo de 24 horas de exposición así: a las 6 horas de exposición al Hg las células en los segmentos rectos comienzan a perder microvellosidades, aumenta el hinchamiento mitocondrial y se dilata el retículo endoplásmico (Zalups y Ahmad, 2005); a las 12 horas de exposición se presenta la ruptura de la membrana plasmática, pérdida de microvellosidades, disminución de contacto con la membrana basal y posiblemente destrucción celular; a las 24 horas de exposición se pueden identificar fragmentos celulares en la luz tubular, los complejos de unión entre las células están ausentes y la estructura nuclear se encuentra comprometida (Zalups y Koropatnick, 2000).

Adicionalmente, se ha observado que la exposición a compuestos de Hg puede tener efectos perjudiciales sobre los glomérulos (Bahn, 2002) ocasionando alteraciones como fibrosis y glomerulonefritis, lo que conlleva a una reducción de la tasa de filtración glomerular (Zalups y Ahmad, 2005).

**2.1.5.2 Marcadores de lesión renal inducida por Hg.** Existen varios métodos para detectar lesiones tubulares renales inducidas por Hg, algunos métodos no son invasivos, consisten en medir la excreción urinaria de enzimas celulares.

Durante las primeras etapas de la nefropatía inducida por Hg, las células sufren una serie de cambios degenerativos y comienzan a perder parte de su membrana luminal. Varios estudios evidencian que la excreción urinaria de las enzimas de la membrana luminal como fosfatasa alcalina y GGT aumenta durante la nefropatía inducida por Hg. Cuando la lesión se vuelve grave e inicia la necrosis, aumenta la excreción urinaria de varias enzimas intracelulares como LDH, AST, ALT y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (NAG) (Zalups R, K. 2000)

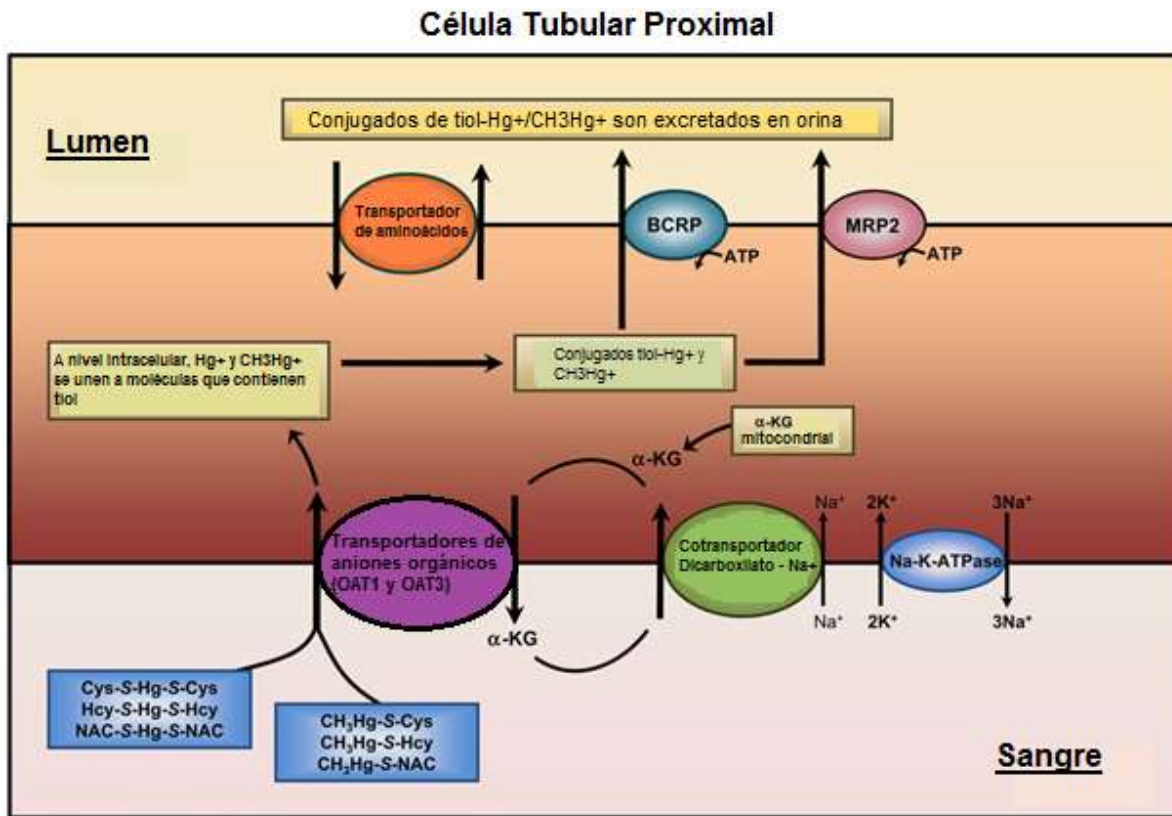
Después de que gran parte de los túbulos proximales se encuentren funcionalmente comprometidos por los efectos tóxicos del Hg, se disminuye la capacidad de absorción de solutos plasmáticos filtrados y agua, lo que produce un aumento en la excreción urinaria de agua, glucosa, aminoácidos, albúmina y otras proteínas plasmáticas tales como  $\beta$ -galactosidasa, NAG y  $\beta$ -2-microglobulina (2MCG). Estas proteínas plasmáticas han sido utilizadas como biomarcadores tempranos de insuficiencia renal.

La concentración plasmática de creatinina y nitrógeno ureico en sangre (NUS) pueden utilizarse como marcadores de función renal. Cuando la nefropatía inducida por Hg es severa, la concentración de creatinina en sangre al igual que el NUS aumentan debido a la disminución en la tasa de filtración glomerular (TFR). Los mecanismos por los cuales se disminuye la TFG aún no se conocen, aunque parecen ser complejos y multifactoriales (Zalups y Ahmad, 2004).

**2.1.6 Excreción urinaria de Hg.** A pesar de la retención intracelular de iones mercúricos, una parte se puede secretar en ausencia de tratamiento farmacológico a través de mecanismos

presentes en la membrana luminal de la célula tubular proximal, permitiendo la excreción urinaria de iones mercúrico (Bridges et al., 2011). El medio más frecuente de extracción de estos iones a nivel intracelular consiste en el tratamiento con un agente quelante como el ácido 2,3-bis(sulfanil) propano-1-sulfónico (formalmente conocido como 2,3-dimercaptopropano-1 - ácido sulfónico; DMPS) o ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA).

Parece que DMPS y DMSA obtienen acceso a las células tubulares proximales en la membrana basolateral mediante los transportadores de aniones orgánicos: OAT1 y OAT3, así como también el transportador de dicarboxilato dependiente de sodio (NaC1; *SCL13A2*)(Kojima et al., 2002). Una vez dentro de la célula, se hipotetiza que DMPS y DMSA forman complejos con  $Hg^{2+}$  y se exportan a través de la proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) o proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) en la membrana luminal (Zalups y Ahmad, 2005) (Figura 11)



*Figura 11.* Mecanismos involucrados en la captación y exportación de Hg<sup>2+</sup>. En la membrana plasmática luminal de las células tubulares proximales, parece que los transportadores de aminoácidos son los mecanismos principales por los cuales los iones mercúricos son absorbidos por las células. En la membrana basolateral, los transportadores de aniones orgánicos (OAT) parecen estar involucrados principalmente en esta absorción. Las especies mercúricas pueden ser secretadas desde las células tubulares proximales hacia la luz tubular a través de las acciones de la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) o la proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP2) ubicada en la membrana plasmática luminal. Adaptado de Bridges y Zalups, (2017)

**2.1.7 Toxicogenética del Hg.** El genoma humano contiene millones de variantes genéticas o polimorfismos que se presentan en la población con una frecuencia  $\geq 1\%$ . Un polimorfismo se caracteriza porque diferentes individuos presentan distintos nucleótidos o variantes en una posición concreta del genoma denominada locus.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) son el tipo más común de variación genética, se encuentran en promedio cada 100 a 300 pares de

bases (pb) en el genoma. Cada posible variante se denomina alelo y en el caso de un SNP, normalmente serán dos (2) los posibles alelos en un *locus*: por ejemplo, el cambio de T por C (T>C), la pareja de alelos observada en un individuo se denomina genotipo (Iniesta et al., 2005).

Según la localización en el genoma, los SNPs se clasifican en: iSNP, si están localizados en regiones intrónicas; cSNP, en regiones codificantes (exones); rSNP, en regiones reguladoras; y gSNP, localizados en regiones intergenómicas (Figura 12) (Checa, 2007).

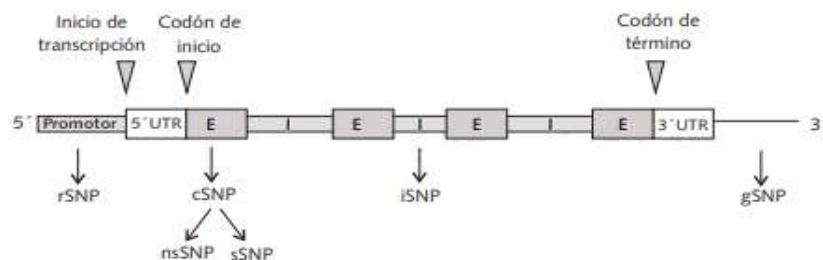


Figura 12. Clasificación de los SNPs de acuerdo con su localización en el genoma. Adaptado de Checa, 2007

Un SNP en regiones codificantes se puede clasificar como variaciones sinónimas (sSNP) y no sinónimas (nsSNP). A diferencia de los sSNP, que no producen un cambio del aminoácido debido al cambio del nucleótido, el nsSNP puede inducir diferencias en la estructura molecular en el ADN al alterar la secuencia de los aminoácidos codificados; lo que afecta no sólo la composición de las proteínas, sino también su función. Las variantes genéticas ubicadas en las regiones reguladoras e intrónicas pueden afectar la expresión, procesamiento y maduración del ARN mensajero (Checa, 2007).

Adicionalmente, hay polimorfismos caracterizados por la supresión de genes completos, que eliminan cualquier actividad enzimática funcional, mientras que otros polimorfismos implican duplicaciones del gen completo, lo que se traduce en niveles más altos de actividad enzimática.

La variabilidad genética se ha relacionado principalmente con los SNPs y estos con la susceptibilidad a padecer enfermedades complejas. La variación individual al daño renal inducido por la exposición al Hg puede explicarse en parte por factores genéticos que influyen en la susceptibilidad humana. En este contexto, la secuencia genómica de una persona con sus diferencias moleculares a nivel del ADN (genotipo) puede crear individualidad (fenotipo) influenciado por factores ambientales (Figura 13) (Andreoli & Sprovieri, 2017)

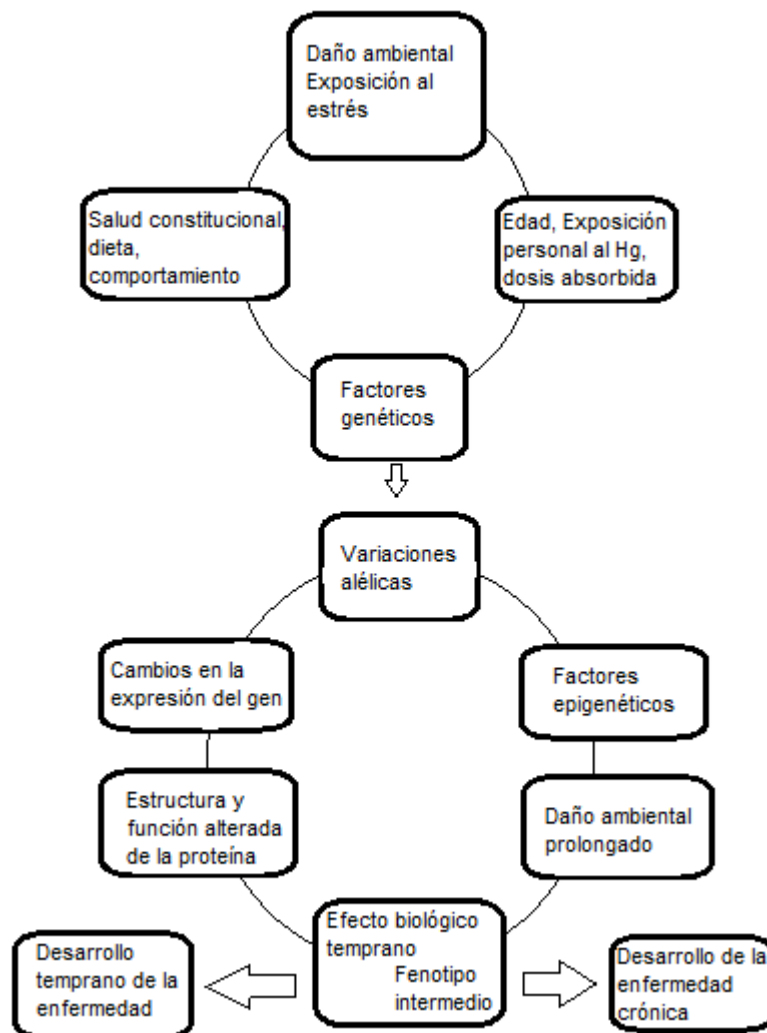


Figura 13. Interacción gen-ambiente. Adaptado de: (Andreoli & Sprovieri, 2017)

Varios estudios han sugerido que la respuesta a la exposición al Hg puede estar influenciada por variantes moleculares en genes reguladores de la vía de detoxificación de glutatión, implicados en la toxicocinética del Hg, como se puede evidenciar en la Tabla 1; los portadores de dichas variantes genéticas pueden tolerar exposiciones más altas de Hg, debido a una eliminación más rápida y/o una mejor capacidad antioxidante (Engström et al., 2011).

Tabla 1.

*Polimorfismos en genes candidatos implicados en la toxicocinética del Hg*

Gen	Función de la proteína	Polimorfismo	Actividad funcional “in vitro”	Interacciones estimadas	Hallazgo	Referencia
<i>GSTM1</i>	Modula la conjugación del Hg con GSH	Delección +/-	Expresión génica nula y actividad catalítica alterada	Niveles de Hg en cabello	Asociación con niveles elevados de Hg en cabello	Gundacker et al., 2007
				Niveles de Hg en sangre de cordón umbilical	Asociación con aumento en los niveles de Hg en sangre de cordón umbilical	Gundacker et al., 2009 (Lee et al., 2010)
				Niveles de Hg en plasma/sangre	Asociación con niveles más altos de Hg en plasma/sangre	De Oliveira et al., 2014
<i>GSTT1</i>	Modula la conjugación del Hg con GSH	Delección +/-	Expresión génica nula y actividad catalítica alterada	Niveles de Hg en orina	Asociación con niveles disminuidos en orina	Goodrich et al., 2011
				Niveles de Hg en cabello	Asociación con niveles elevados de Hg en cabello	Harari et al., 2012 Gundacker et al., 2007
				Niveles de Hg en sangre de cordón umbilical	Asociación con aumento en los niveles de Hg en sangre de cordón umbilical	Gundacker et al., 2009 Lee et al., 2010
				Niveles de Hg en orina	Asociación con niveles	Goodrich et al., 2011

Gen	Función de la proteína	Polimorfismo	Actividad funcional "in vitro"	Interacciones estimadas	Hallazgo	Referencia
<i>GSTP1</i>	Modula la conjugación del Hg con GSH	105 Ile>Val (rs1695)	Disminución de la eficiencia catalítica y la actividad de las proteínas	Niveles de Hg en cabello	disminuidos de Hg en orina.	Goodrich et al., 2011
					Asociación con niveles disminuidos de Hg en cabello	
		114 Ala>Val (rs1138272)		Niveles de Hg en eritrocitos	Asociación con niveles de Hg disminuidos en eritrocitos	Engstrom et al., 2008 Goodrich et al., 2011
					Asociación con niveles aumentados de Hg en eritrocitos	Custodio et al., 2004 Gundacker et al., 2009
<i>GSTAI</i>	Modula la conjugación del Hg con GSH	3'UTR (rs3957356)	Baja activación transcripcional y disminución de la actividad enzimática	Niveles de Hg en sangre	Asociación con niveles de Hg en sangre disminuidos	Gundacker et al., 2009
<i>GSS</i>	Modula la unión de Hg por síntesis de GSH	5'UTR (rs3761144)	Disminución de la expresión génica	Niveles de Hg en cabello	Asociación con niveles elevados de Hg en cabello	Goodrich et al., 2011
<i>GCLC</i>	Modula la unión de Hg por síntesis de GSH	Gen cerca de 5' (rs17883901)	Suprime la inducción de genes y la actividad promotora	Niveles de Hg en orina	Asociación con niveles aumentos de Hg en orina	Custodio et al., 2005
				Niveles de Hg en cabello	Asociación con altos niveles de Hg en cabello	Gundacker et al., 2007
<i>GCLC</i>	Modula la unión de Hg por síntesis de GSH	Gen cerca de 5' (rs17883901)		Niveles de Hg en eritrocitos	Asociación con niveles elevados de Hg en eritrocitos	Custodio et al., 2004
				Niveles de Hg en plasma	Asociación con niveles elevados de Hg en plasma	De Oliveira et al., 2014
		Intron 9 (rs1555903)	Suprime la inducción de genes y la actividad promotora	Niveles de Hg en cordón umbilical	Asociación con niveles elevados de Hg en cordón umbilical	Julvez et al., 2013
				Niveles de Hg en	Asociación con	Harari et al.,

Gen	Función de la proteína	Polimorfismo	Actividad funcional “in vitro”	Interacciones estimadas	Hallazgo	Referencia
<i>GCLM</i>	Modula la unión de Hg por síntesis de GSH	Gen cercano a 5' (rs41303970)	Disminuye la actividad promotora y la expresión génica	orina	los niveles aumentados de Hg en orina	Custodio et al., 2012
				Niveles de Hg en cabello y sangre	Asociación con niveles disminuidos con Hg en sangre y cabello	(Barcelos et al., 2013)
				Niveles de Hg en plasma	Asociación con niveles elevados de Hg en plasma.	Custodio et al., 2005 Harari et al., 2012
				Niveles de Hg en eritrocitos	Asociación con niveles elevados de Hg en eritrocitos	Engstrom et al., 2008
				Niveles de Hg en plasma y sangre total	Asociación con bajos niveles de Hg en sangre total y altos en plasma.	De Oliveira et al., 2014

*Nota:* Adaptado de Goodrich et al., 2011; Andreoli y Sprovieri et al., 2017

## 2.2. Materiales y Métodos

**2.2.1 Tipo de estudio.** Se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transversal, donde se asociaron las variantes genéticas germinales ubicadas en los genes *GCLC*, *GCLM*, *GSS*, *GSTA1* y *GSTP1*; implicados en el metabolismo del glutatión, con las concentraciones de Hg en muestras biológicas y los niveles de biomarcadores de función renal en un grupo de individuos ocupacionalmente expuestos al Hg por minería artesanal de oro, y se realizaron comparaciones con un grupo de individuos no expuestos. Este estudio cumplió con el Código de Ética Médica y se realizó de acuerdo con los estándares éticos de la Declaración de Helsinki de 1964.

**2.2.2 Población de estudio.** Nuestro grupo adelanta una línea de investigación que estudia la toxicología renal debida a la exposición ocupacional al Hg. En una primera fase, desarrollada entre junio del 2011 y julio de 2013 (COLCIENCIAS, proyecto número 1102-519-29272), se recopiló información clínica, epidemiológica, y de laboratorio de 281 participantes: 160 del distrito minero de Vetas-California (grupo expuesto-Hg) y 121 de municipios no mineros (grupo no expuesto: Charta, Mutiscua y Tona). En esta primera fase se determinó la prevalencia de disfunción renal por la exposición ocupacional al Hg en Santander; estudio que reportó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ) en las concentraciones de Hg en sangre y orina al comparar el grupo de personas expuestas con el grupo no expuesto ocupacionalmente al Hg. Sin embargo, y a pesar de las diferencias en las concentraciones de Hg, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos al comparar los niveles de varios biomarcadores de función renal: depuración de creatinina en orina de 24 h, beta-2-microglobulina y albúmina (Sánchez et al., 2016).

Las personas incluidas en el estudio pertenecían a la misma región geográfica en el noreste del país y presentaron características sociodemográficas similares. Todos los municipios se encontraban entre 2000 – 3000 m sobre el nivel del mar y en un rango de temperatura de 6 - 18°C. Adicionalmente, la población de esta región del país (Santander, Colombia) presenta una mezcla homogénea y no se encuentra concentrada en grupos étnicos según los análisis genéticos de estructura poblacional que se han reportado hasta el momento (León et al., 2012; Hincapie et al., 2009).

El muestreo fue no probabilístico, mediante búsqueda poblacional y apoyo con referidos (voz a voz) de personas que cumplieran con criterios de selección y aceptaran participar voluntariamente en el estudio. Los criterios de selección de los participantes del estudio fueron:

Criterios de inclusión para la población ocupacionalmente expuesta:

- Residente del municipio de Vetás o California
- Trabajador(a) en las minas de oro artesanales
- Mayor de 18 años
- Tiempo de trabajo en la minería mayor a 5 años

Criterios de inclusión para población no expuesta:

- Residente de los municipios de Charta, Mutiscua o Tona durante al menos los últimos 5 años previos al estudio.

- Persona que realiza alguna actividad laboral
- Mayor de 18 años
- Sin antecedente de trabajo en minería

Criterios de exclusión

- Personas que no acepten dar su consentimiento informado por escrito de participación en el estudio

- Personas con enfermedad mental o física que les impida responder de manera voluntaria y autónoma una entrevista oral.

- Personas menores de 18 años

La prevalencia de enfermedad renal fue similar en ambos grupos (3.1%,  $P = 0.97$ ) (Sánchez et al., 2016). Teniendo en cuenta el posible efecto confusor de otras variables en la función renal o en la exposición a Hg se tuvieron en cuenta como posibles variables de ajuste el sexo y la edad de las personas, ya que estas variables presentaron las diferencias significativas más altas ( $P = 0.008$  y  $P < 0.0001$ , respectivamente) entre los grupos de estudio (Sánchez et al., 2016)

**2.2.3 Tamaño de la muestra.** En la segunda fase, que estudia el componente genético (COLCIENCIAS, proyecto número 110274455577), se estimó un tamaño de muestra objetiva de al menos 258 individuos usando el software QUANTO, versión 1.2.4 con nivel de significancia de 0.05 y poder de 80%, asumiendo un modelo de herencia log-aditivo. Para el cálculo del tamaño de muestra se tuvo en cuenta una exposición ambiental a Hg de 2.5%, un riesgo poblacional de reducción en tasa de filtración glomerular estimada (eTFG;  $<76.4 \text{ ml/min} \times 1.73 \text{ m}^2$ ) de 25% y un efecto ambiental debido al Hg de 1.3; parámetros determinados con base en la depuración de creatinina en la población expuesta reportada por nuestro grupo (Sánchez et al., 2016). Se asumió una razón de posibilidad (OR, del inglés *Odds Ratio*) del efecto genético de 1.8 bajo un modelo de herencia aditivo y una frecuencia alélica mínima de 0.2 utilizando la información reportada para la población colombiana (CLM) en las bases del Proyecto 1000 Genomas (SIVA, 2008).

**2.2.4 Recolección de muestras biológicas.** Los participantes del estudio fueron entrevistados por profesionales de la salud previamente capacitados en el contexto del proyecto, quienes les explicaron los objetivos del estudio y recopilaron información sociodemográfica, así como otros factores relacionados con la exposición al Hg. Después de recibir la explicación detallada del estudio y sus posibles consecuencias, cada voluntario firmó un consentimiento informado autorizando el uso de las muestras y los datos. Este consentimiento informado fue estudiado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander (Apéndice A).

Se obtuvieron tres muestras de orina: la primera correspondió a orina de 24 horas recolectada en recipiente lavado previamente con  $\text{HNO}_3$  al 10%, la segunda correspondió a la primera orina de la mañana y la tercera correspondió a orina inducida una hora después del consumo de 300

mL de agua, la cual se trató con NaOH para alcalinizar el pH entre 6 – 8 con el fin de estabilizar las proteínas.

La obtención de la muestra sanguínea se realizó bajo condiciones de ayuno utilizando tres clases de tubos: uno seco; sin anticoagulante, y otros dos con EDTA y heparina sódica como anticoagulantes. El tubo sin anticoagulante se utilizó para la determinación de creatinina en suero, el tubo con EDTA para la obtención del ADN y el tubo con heparina sódica para la cuantificación de Hg.

Se tomaron muestras de cabello; aproximadamente 50 a 100 cabellos de la región occipital, se cortaron lo más cerca posible al cuero cabelludo y se fijaron con cinta a una hoja de papel, especificando el segmento próximo a la raíz.

## 2.2.5 Biomarcadores

**2.2.5.1 Biomarcadores de efecto: pruebas de función renal.** La función glomerular fue evaluada mediante la determinación de albúmina y creatinina. Por una parte, la albúmina fue medida en la primera orina de la mañana mediante un ensayo enzimático competitivo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida usando el kit de Albumina Immulite Siemens en el analizador Immulite One (Siemens Healthcare Diagnostics, Alemania). De acuerdo con los valores de referencia establecidos por el laboratorio, aquellos participantes con niveles superiores a 18 µg/mL se consideraron con alta excreción de albúmina urinaria.

Por otra parte, la creatinina se midió en muestras de sangre y orina de 24 horas, ambas mediciones se realizaron por espectrofotometría mediante el método cinético de Jaffé (Jaffé, 1886), usando el kit CREA de Randox en el analizador bioquímico Selectra JR (Vital Scientific,

Francia). La tasa de filtración glomerular estimada (eTFG) fue determinada con la fórmula CKD-EPI basada en creatinina en suero, edad, género y raza:  $TFG \text{ (mL/min/1.73 m}^2\text{)} = K1 \times (\text{creatinina en suero}/K2)^{-1.209} \times 0.993^{\text{edad}}$ ; donde  $K1 = 144$  y  $K2 = 0.7$  si es mujer o  $K1 = 141$  y  $K2 = 0.9$  si es hombre (Levey et al., 2009). Los participantes fueron categorizados como eTFG reducida si sus niveles estaban por debajo del percentil 25 de la distribución de la población total ( $<76,4 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ ).

La función tubular fue evaluada determinando la excreción urinaria de la beta-2-microglobulina ( $\beta$ -2MCG) una hora después de una diuresis inducida y medida mediante ensayo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida usando el kit Siemens Immulite  $\beta$ -2MCG en el analizador Immulite One (Siemens Healthcare Diagnostics, Alemania). Los participantes fueron categorizados como aquellos con alto nivel urinario de  $\beta$ -2MCG si sus niveles eran superiores a 300 ng/mL de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**2.2.5.2 Biomarcadores de exposición: análisis de Hg en cabello, sangre y orina.** Los niveles de Hg en cabello, sangre y orina (24 horas) fueron cuantificados por el grupo de investigación en la primera fase del estudio. Las concentraciones de Hg en sangre y orina fueron medidas usando un espectrómetro de absorción atómica S4 equipado con un sistema de generador de hidruros VP100 (Thermo Electron Co., Cambridge, Reino Unido). Las concentraciones de Hg en cabello se midieron mediante un espectrómetro RA-915+ con corrección de fondo Zeeman y un atomizador catalizador de dos cámaras RP-91C (Lumex, San Petersburgo, Rusia). Los materiales empleados se lavaron previamente con  $\text{HNO}_3$  al 10% y los reactivos utilizados en los procedimientos fueron grado analítico. La exactitud se determinó utilizando materiales de

referencia certificados (IAEA 086, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria; y SRM 955C y 2670A, National Institute of Standards and Technology, Bethesda, MD).

Los límites de detección y cuantificación para la determinación de Hg en sangre y orina fueron calculados promediando las mediciones de 22 blancos fortificados con patrón de concentración conocida de Hg (0.5  $\mu\text{L}$  para sangre y 0.3  $\mu\text{L}$  para orina) y sumando los resultados de 3 a 10 desviaciones estándar (DE). En el caso de Hg en cabello, el límite de detección fue calculado multiplicando la DE de tres réplicas de muestras por el valor del estadístico  $t$  (95%,  $n-1$ ) y el límite de cuantificación fue el doble del límite de detección (Sanchez et al., 2016). Las pruebas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander, acreditado con ISO / IEC 17025: 2005.

## 2.2.6 Genotipificación

**2.2.6.1 Aislamiento y cuantificación de ADN.** Las muestras de sangre anticoaguladas con EDTA fueron tomadas bajo condiciones de esterilidad, y la capa leucocitaria fue separada y almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. El aislamiento del ADN genómico se realizó mediante el método de salting-out (Reira et al., 2010), en el cual se utilizan altas concentraciones de sales para la precipitación de proteínas, permitiendo de esta manera obtener un ADN relativamente puro. Brevemente, la capa leucocitaria se mezcló con 0.8 ml de solución de lisis de eritrocitos (3M de sacarosa, 10 mM de Tris de HCl, pH 7.5, 5mM de  $\text{MgCl}_2$  y 1% de tritón X-100). La mezcla se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y el precipitado se trató con solución de lisis de leucocitos (0.024M de EDTA pH 8.0, 50 mM de NaCl, 10% de SDS y 5M de perclorato de sodio).

Luego se incubó 1h a 65°C, agitando el preparado con vortex cada 10 minutos. Las proteínas se precipitaron en presencia de solución 6M NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> y posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos con el fin de recuperar el sobrenadante, el cual se mezcló con dos volúmenes de Isopropanol al 99% para precipitar el ADN, y nuevamente se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% y se descartó todo el alcohol remanente después de un paso de centrifugación. Finalmente, el ADN precipitado se resuspendió en Tris-EDTA (TE) 1X. Una vez las muestras se resuspendieron, se procedió a la cuantificación en el espectrofotómetro Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, USA) y se ajustó la concentración de ADN a 20 ng/μL con TE 1X.

**2.2.6.2 Determinación de SNPs mediante ensayos TaqMan.** La genotipificación de los SNPs GCLC rs1555903, GCLM rs41303970, GSS rs3761144, GSTA1 rs3957356 y GSTP1 rs4147581 se realizó mediante PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) en tiempo real utilizando los ensayos de discriminación alélica TaqMan (Applied Biosystems, USA). El principio de esta herramienta se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET, del inglés Fluorescence Resonance Energy Transfer) entre 2 fluorocromos adyacentes. Uno de los fluorocromos opera como emisor (del inglés reporter) en el extremo 5' emitiendo fluorescencia y el segundo fluorocromo opera como apagador (del inglés quencher) en el extremo 3' absorbiendo la energía del primero.

Se utilizaron dos sondas fluorogénicas, cada una capaz de hibridar específicamente a uno de los dos alelos del SNP en los productos de PCR. Estas sondas fueron marcadas en el extremo 5' con una molécula espectralmente diferente por alelo (FAM; 6-carboxifluoresceína, o VIC; hexacloro-6-carboxifluoresceína) y en el extremo 3' con una molécula apagadora de

fluorescencia. En el curso de la PCR, la sonda se une a los alelos que se encuentran presentes en la reacción y, durante la extensión de la cadena, la actividad 5' exonucleasa de la enzima polimerasa AmpliTaq Gold provoca la liberación del "reporter" del extremo 5' de la sonda, que al separarse del "quencher" comienza a emitir fluorescencia (Figura 14). La acumulación de los productos de PCR se detecta monitorizando el aumento de fluorescencia, por lo que la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de amplicón generado. En el caso de los homocigotos la fluorescencia proviene de uno de los dos alelos, mientras que en el caso de los heterocigotos esta fluorescencia proviene de ambos alelos (Figura 15). Las sondas que no hibridan perfectamente son desplazadas sin emitir fluorescencia (Vega et al., 2005).

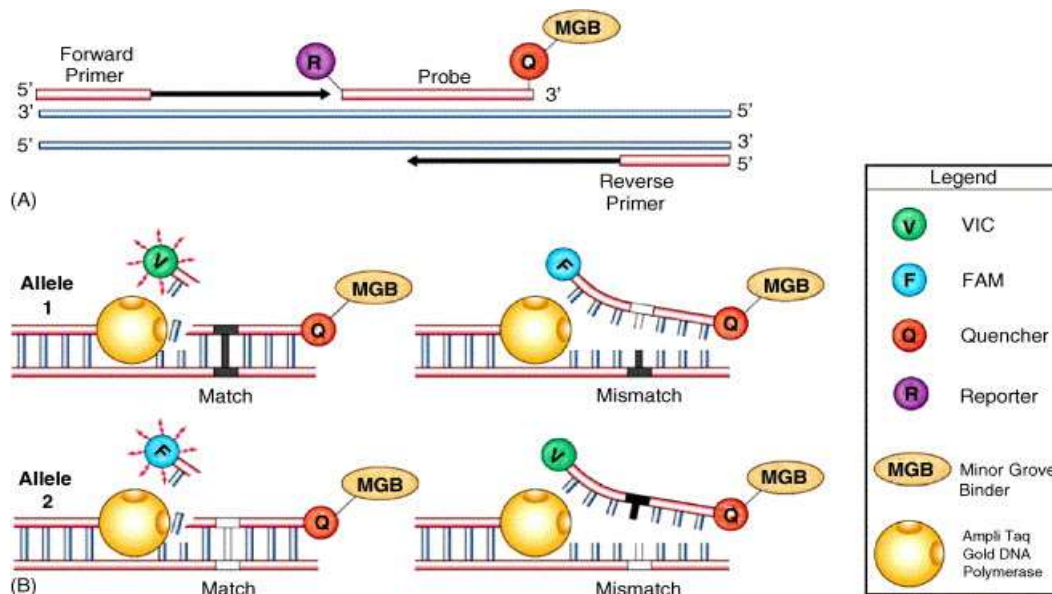


Figura 14. Ensayo de genotipificación TaqMan® SNP. (A) Unión de la sonda y el iniciador en un ensayo de genotipificación TaqMan® SNP. (B) La discriminación alélica ocurre cuando la sonda hibrida con la secuencia que contiene el SNP, emitiendo fluorescencia. Adaptado de: Vega et al., 2005

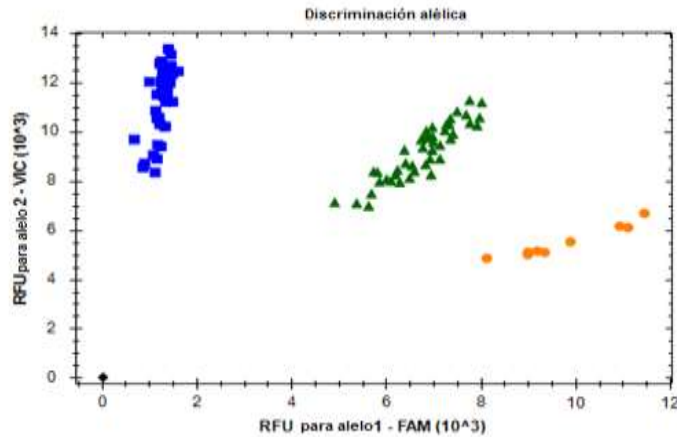


Figura 15. Ejemplo de discriminación alélica por TaqMan para *GSS* C>G. El genotipo C/C se representa en forma de cuadrado azul, el genotipo C/G se observa como un triángulo verde y G/G se muestra de forma redonda color naranja.

La amplificación por PCR y la discriminación alélica se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante utilizando un termociclador para PCR en tiempo real CFX96 Touch™ (Bio-Rad, EEUU).

**2.2.7 Análisis estadístico.** Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron determinadas por el método de recuento de genes. Se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada SNP tanto en el grupo de participantes ocupacionalmente expuestos como de controles y la presencia de estructura genética en la población total mediante análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando el software ARLEQUIN versión 3.5.2.2 (Excoffier et al., 2005). Las diferencias entre las frecuencias genotípicas y alélicas entre los grupos de estudio se compararon mediante  $\chi^2$  (ji-cuadrado) utilizando el software SPSS.

**2.2.8 Las razones de posibilidades (OR)** se establecieron con un intervalo de confianza del 95% (IC95%). Se usó un modelo de regresión lineal generalizado multivariable para evaluar el

efecto del SNP sobre los niveles de Hg en sangre y orina y sobre los biomarcadores de la función renal: eTFG,  $\beta$ -2MCG y albúmina urinaria (24 h) mientras se ajustaban los posibles factores de confusión. Cada SNP se codificó como 0, 1 y 2 de acuerdo con el recuento de su alelo menor. Los valores de P menores de 0.05 ( $P < 0.05$ ) fue considerados estadísticamente significativo. El nivel de significancia nominal se mantuvo cuando se obtuvieron valores de P empíricos significativos mediante 5000 permutaciones aleatorias (Clarke et al., 2011; Knijnenburg et al., 2009).

**2.2.9 Las interacciones entre los SNP** se examinaron mediante regresión logística para analizar sus efectos combinados sobre los niveles de Hg en sangre y orina y los biomarcadores de la función renal. Los términos de interacciones significativas se descompusieron mediante un simple análisis de pendiente. El análisis estadístico se realizó con el lenguaje de programación R, versión 3.5.1.

## 2.3 Resultados

Las características sociodemográficas de la población estudiada, incluyendo los niveles de los biomarcadores de exposición (concentraciones de Hg en sangre, cabello y orina) y de función renal, se presentan en la Tabla 2. Las frecuencias alélicas y genotípicas de los cinco SNPs analizados en esta población se presentan en la Tabla 3. No se evidenció estructura genética en la población estudiada de acuerdo con el análisis de jerarquía entre los grupos de estudio ( $F_{ST} = 0.00521$ ;  $P = 0.10182 \pm 0.00091$ ). No se encontraron desviaciones del equilibrio de Hardy Weinberg en el grupo de individuos no expuestos al Hg para todos los SNPs evaluados, y solo se encontró desviación del equilibrio de Hardy Weinberg para el GSS rs3761144 en el grupo de

individuos expuestos al Hg, así como también cuando el análisis se realizó en la población total para este SNP (Tabla 3).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes *GCLM* rs41303970 y *GSTP1* rs4147581 entre el grupo de personas expuestas y no expuestas ocupacionalmente al Hg: con una mayor frecuencia del genotipo homocigoto TT ( $P = 0.021$ ; OR = 3.48; IC 95% = 1.14 – 10.62) y el alelo T ( $P = 0.0004$ ; OR = 1.97; IC95% = 1.35 – 2.89) del *GCLM* rs41303970 y una menor frecuencia del genotipo homocigoto GG ( $P = 0.007$ ; OR = 0.37; IC 95% = 0.18 – 0.78) y el alelo G ( $P = 0.005$ ; OR = 0.60; IC 95% = 0.43 – 0.86) del *GSTP1* rs4147581 en el grupo expuesto en comparación con el grupo no expuesto (Tabla 3). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las otras variables genéticas analizadas entre los grupos estudiados.

Tabla 2.

*Características sociodemográficas de la población de estudio y biomarcadores.*

Variable	Grupo control	Grupo minero	p-Valor
	N = 127	N = 164	
	n (%) o media (IQR)	n (%) o media (IQR)	
Edad (años) <sup>a</sup>	47 (39–52)	40 (31–46)	0.000
Sexo <sup>b</sup>			
Mujeres	67 (52.7)	61 (37.2)	0.008
Hombres	60 (47.2)	103 (62.8)	
Ocupación <sup>b</sup>			
Actividades de minería de oro	0	74 (45.1)	<0.001
Agricultura y ganadería	23 (18.1)	6 (3.6)	
Obras de construcción	28 (22.1)	18 (10.9)	
Cuidados del hogar	44 (34.6)	44 (26.8)	
Otras	32 (25.2)	22 (13.4)	
Consumo de pescado <sup>b</sup>	117 (92.1)	155 (94.5)	0.414
Estimado de la ingesta de Hg por pescado (mg Hg/kg/día 10 <sup>-5</sup> ) <sup>a</sup>	0.62 (0.1–2.7)	1.5 (0.5–3.7)	<0.001
Amalgamas dentales (numeros) <sup>a</sup>	4 (2–6)	3 (2–6)	0.081
Exposición directa a vapores de Hg el año pasado (min)	0	720 (180–3180)	
Lugar de exposición a vapores de Hg el año pasado			
Casa	0	111 (67.6)	

Variable	Grupo control N = 127		Grupo minero N = 164		p-Valor
	n (%) o media (IQR)		n (%) o media (IQR)		
Mina	0		31 (18.9)		
Río	0		47 (28.6)		
Otros	0		19 (11.6)		
Exposición de por vida (años) a vapores de Hg	0		19.5 (9–25)		
Biomarcadores de exposición a Hg					
Hg en sangre ( $\mu\text{g Hg/L}$ ) <sup>a</sup>	2.5 (1.1–4.8)	2.5	7.0 (3.4–11.0)	6.1	<0.001
Hg en orina ( $\mu\text{g Hg/g}$ de creatinine) <sup>a</sup>	1.5 (0.9–2.8)	1.7	3.9 (1.3–9.6)	4.1	<0.001
Hg en cabello ( $\mu\text{g}$ de Hg/g de cabello) <sup>a</sup>	0.4 (0.2–0.7)	0.4	0.8 (0.5–1.3)	0.8	<0.001
Biomarcadores de función renal					
Creatinina en sangre (mg/dl)	1.0 (0.9–1.1)		1.0 (0.9–1.1)		0.402
Aclaramiento de creatinina ( $\text{mL/min/1.73 m}^2$ ) <sup>a,c</sup>	89.6 (75.9–104.4)		89.3 (75.5–102.9)		0.772
Aclaramiento reducido de creatinina <sup>c,b</sup>	31 (25.0)		57 (35.6)		0.055
eTFG ( $\text{mL/min/1.73 m}^2$ ) <sup>d,e</sup>	81.2 (73.8–89.2)		87.9 (80.1–96.4)		<0.001
eTFG reducido <sup>b,d</sup>	44 (34.6)		29 (17.8)		<0.001
b-2MCG urinaria ( $\text{ng/mL}$ ) <sup>a</sup>	36.6 (20.9–68.8)		41.4 (23.1–66.3)		0.942
Incremento urinario b-2MCG <sup>b</sup>	2 (1.6)		3 (1.9)		0.864
Albúmina urinaria ( $\text{mg/ml}$ ) <sup>a</sup>	4.3 (2.5–7.8)		4.6 (2.9–8.1)		0.457
Incremento de albúmina urinaria <sup>b</sup>	12 (9.7)		15 (9.4)		0.927

Hg: mercurio; IQR: rang intercuantil; b-2MCG: b-2-microglobulina; eTFG: Tasa de filtración glomerular estimada.

<sup>a</sup>Prueba U de Mann-Whitney/ prueba de suma de rangos de Wilcoxon para las diferencias entre los grupos.

<sup>b</sup>Test  $z^2$

<sup>c</sup>Corregido por el área de superficie corporal. Aclaramiento reducido de creatinina definido como  $<85 \text{ mL/min/1.73 m}^2$  en hombres y  $<75 \text{ mL/min/1.73 m}^2$  en mujeres.

<sup>d</sup>eTFG reducido:  $<\text{eTFG}$  de percentil 25:  $76.4 \text{ mL/min/1.73 m}^2$

<sup>e</sup>Prueba- $t$  Student's

Adaptado de: Sánchez et al., 2016

Tabla 3.

*Distribución de las variantes genéticas en genes relacionados con el metabolismo del glutatión en un grupo de personas expuestas ocupacionalmente al Hg y un grupo de personas no expuestas a este metal.*

Gen	SNP	Genotipo/ Alelo	Expuestos		No-expuestos		EHW P-valor	P- valor <sup>d</sup>	OR (IC95%)
			N = 160		N = 121				
			N	(%)	N	(%)			
GCLC	rs1555903	TT	66	(41.3)	48	(39.7)	1.000 <sup>a</sup>		
		TC	73	(45.6)	56	(46.3)	1.000 <sup>b</sup>		
		CC	21	(13.1)	17	(14.0)	0.897 <sup>c</sup>	0.822	0.92 (0.46)

Gen	SNP	Genotipo/ Alelo	Expuestos		No-expuestos		EHW P-valor	P- valor <sup>d</sup>	OR (IC95%)	
			N = 160		N = 121					
			N	(%)	N	(%)				
		T	205	(64.0)	152	(62.8)			- 1.84)	
		C	115	(36.0)	90	(37.2)		0.760	1.05 (0.75 - 1.49)	
<i>GCLM</i>	rs41303970	CC	63	(39.4)	72	(59.5)	0.3037 <sup>a</sup>			
		CT	80	(50.0)	45	(37.2)	0.4335 <sup>b</sup>			
		TT	17	(10.6)	4	(3.3)	0.3196 <sup>c</sup>	<b>0.021</b>	3.48 (1.14- 10.62)	
		C	206	(64.3)	189	(78.0)				
		T	114	(35.7)	53	(22.0)		<b>0.0004</b>	1.97 (1.35 - 2.89)	
<i>GSTAI</i>	rs3957356	CC	71	(44.4)	45	(40.2)	0.5996 <sup>a</sup>			
		CT	69	(43.1)	59	(52.7)	0.0875 <sup>b</sup>			
		TT	20	(12.5)	8	(7.1)	0.4977 <sup>c</sup>	0.152	1.86 (0.78 - 4.38)	
		C	211	(66.0)	149	(66.5)				
		T	109	(34.0)	75	(33.5)		0.888	1.03 (0.71 - 1.47)	
<i>GSTPI</i>	rs4147581	CC	76	(47.5)	43	(35.5)	0.5801 <sup>a</sup>			
		CG	71	(44.4)	55	(45.4)	0.4598 <sup>b</sup>			
		GG	13	(8.1)	23	(19.1)	0.7933 <sup>c</sup>	<b>0.007</b>	0.37 (0.18 - 0.78)	
		C	223	(69.7)	141	(58.3)				
		G	97	(30.3)	101	(41.7)		<b>0.005</b>	0.60 (0.43 - 0.86)	
<i>GSS</i>	rs3761144	CC	64	(40.0)	53	(43.8)	<b>0.0337<sup>a</sup></b>			
		CG	64	(40.0)	51	(42.2)	0.4263 <sup>b</sup>			
		GG	32	(20.0)	17	(14.0)	<b>0.0313<sup>c</sup></b>	0.193	1.53 (0.80 - 2.90)	
		C	192	(60.0)	157	(64.8)				
		G	128	(40.0)	85	(35.2)		0.238	1.23 (0.87 - 1.74)	

Valor de p para el equilibrio de Hardy Weiberg (HWE) en grupo expuesto<sup>a</sup>, no expuesto<sup>b</sup> y toda la población<sup>c</sup>.

<sup>d</sup>Valor de p para asociaciones de alelos y genotipos.

Con el fin de determinar el efecto de los SNPs sobre los niveles de Hg en sangre y orina, se utilizaron modelos lineales generalizados multivariantes en la población total bajo un modelo de herencia aditivo (Tabla 4), ajustados por sexo, edad, estado de exposición (expuesto o no expuesto), eTFG para controlar el efecto fisiológico de la función renal, y concentración de Hg en cabello para eliminar el efecto de la exposición debida al metil-Hg. Los resultados obtenidos mostraron que de los SNPs analizados respecto a los biomarcadores de exposición, el alelo T del *GCLM* rs41303970 se asoció significativamente con niveles altos de Hg en orina ( $\beta = 0.062$ ,  $P = 0.047$ ,  $P \text{ perm} = 0.009$ ) pero no con Hg en sangre ( $\beta = -0.012$ ,  $P = 0.653$ ,  $P \text{ perm} = 0.563$ ) (Tabla 4, Figura 16.A y B).

Tabla 4.

*Asociación de las variantes genéticas en genes relacionados con el metabolismo del glutatión con los niveles de Hg en sangre y orina.*

Gen	SNP	N	Hg en sangre ( $\mu\text{g Hg/L}$ )			Hg en orina ( $\mu\text{g Hg/g creatinina}$ )		
			$\beta$	<i>P</i> - valor <sup>a</sup>	<i>P</i> - valor <sup>b</sup>	$\beta$	<i>P</i> - valor <sup>a</sup>	<i>P</i> - valor <sup>b</sup>
<i>GCLC</i>	rs1555903	281	-0.042	0.074	0.032	-0.008	0.765	0.745
<i>GCLM</i>	rs41303970	281	-0.012	0.653	0.563	<b>0.062</b>	<b>0.047</b>	<b>0.009</b>
<i>GSTAI</i>	rs3957356	272	0.032	0.191	0.745	-0.012	0.677	0.318
<i>GSTPI</i>	rs4147581	281	0.004	0.868	0.882	-0.003	0.923	1
<i>GSS</i>	rs3761144	281	0.014	0.514	0.554	-0.002	0.943	1

Cada SNP fue evaluado mediante modelos lineales generalizados multivariantes ajustados por sexo, edad, estado de exposición (municipio expuesto o no expuesto), TFG y concentración de Hg en cabello como biomarcador de exposición a metil-Hg, bajo un modelo de herencia aditivo.

<sup>a</sup>Valor de *p* correspondiente a los modelos de regresión lineal multivariados.

<sup>b</sup>Valor de *p* empírico en base a 5000 permutaciones del modelo de regresión lineal multivariado.

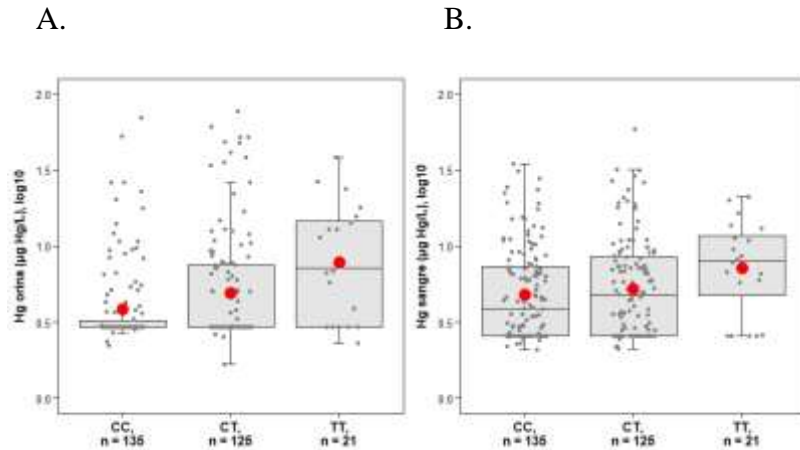


Figura 16. Efecto de *GCLM* rs41303970 sobre Hg en orina (A) y Hg en sangre (B). El gráfico de cajas y bigotes muestra que el alelo T del *GCLM* rs41303970 se asoció significativamente con niveles altos de Hg en orina (A) ( $\beta = 0.062$ ,  $P = 0.047$ ,  $P \text{ perm} = 0.009$ ) pero no con Hg en sangre (B) ( $\beta = -0.012$ ,  $P = 0.653$ ,  $P \text{ perm} = 0.563$ ). Los valores  $\beta$  y  $P$  corresponden a las asociaciones mediante modelos lineales generalizados multivariados bajo un modelo de herencia aditivo, ajustando por sexo, edad, estado de exposición (municipio expuesto o no expuesto), concentración de Hg en cabello como biomarcador de exposición a metil-Hg, y eTFG para controlar el efecto fisiológico de la función renal. El punto rojo indica el promedio de los niveles de Hg en orina y sangre estratificados por genotipos.

Con el fin de determinar el efecto de los SNPs sobre los biomarcadores de función renal se utilizaron modelos lineales generalizados multivariados tanto en la población total (Tabla 5) como por grupos (Tabla 6) bajo un modelo de herencia aditivo, ajustados por sexo, edad, estado de exposición (expuesto o no expuesto, para la población total), y concentración de Hg en cabello para eliminar el efecto de la exposición debida al metil-Hg. Los resultados obtenidos mostraron que de los SNPs analizados respecto a los biomarcadores de función renal en la población total, el alelo C del *GCLC* rs1555903 se asoció significativamente con niveles más bajos de eTFG ( $\beta = -0.01$ ,  $P = 0.011$ ,  $P \text{ perm} = 0.009$ ) y  $\beta$ -2MCG ( $\beta = -11.88$ ,  $P = 0.031$ ,  $P \text{ perm} = 0.023$ ) (Tabla 5, Figura 17A y Figura 18A).

Tabla 5.

Asociación de las variantes genéticas en genes relacionados con el metabolismo del glutatión con los biomarcadores de función renal.

Gen	SNP	N	eTFG (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )			Albúmina urinaria, 24h (mg/mL)			β-2MCG (ng/mL)		
			β	P-valor <sup>a</sup>	P-valor <sup>b</sup>	β	P-valor <sup>a</sup>	P-valor <sup>b</sup>	β	P-valor <sup>a</sup>	P-valor <sup>b</sup>
<i>GCLC</i>	rs1555903	275	<b>-0.01</b>	<b>0.011</b>	<b>0.009</b>	-46.66	0.138	0.047	<b>-11.88</b>	<b>0.031</b>	<b>0.023</b>
<i>GCLM</i>	rs41303970	275	-0.009	0.056	0.029	-54.34	0.160	0.063	1.896	0.766	0.686
<i>GSTAI</i>	rs3957356	266	0.005	0.222	0.198	68.19	0.059	0.087	6.995	0.226	0.207
<i>GSTPI</i>	rs4147581	275	0	0.966	0.823	-36.03	0.298	0.054	-1.88	0.739	0.541
<i>GSS</i>	rs3761144	275	0.001	0.797	0.803	55.95	0.075	0.037	-3.031	0.558	1

Cada SNP fue evaluado mediante modelos lineales generalizados multivariantes ajustados por sexo, edad, estado de exposición (municipio expuesto o no expuesto) y concentración de Hg en cabello como biomarcador de exposición a metil-Hg, bajo un modelo de herencia aditivo.

<sup>a</sup>Valor de p de modelos lineales generalizados.

<sup>b</sup>Valor de p empírico basado en 5000 permutaciones de modelos lineales generalizados.

Cuando este análisis se realizó de manera independiente para el grupo expuesto y el grupo no expuesto, se encontró una asociación estadísticamente significativa respecto al alelo C del *GCLC* rs1555903 con la disminución de la eTFG ( $\beta = -0.017$ ,  $P = 0.014$ ,  $P \text{ perm} = 0.021$ ) en el grupo no expuesto (Tabla 6, Figura 17B) y de la  $\beta$ -2MCG ( $\beta = -20.01$ ,  $P = 0.013$ ,  $P \text{ perm} = 0.026$ ) en el grupo expuesto (Tabla 6, Figura 18C). Adicionalmente, se encontró otra asociación estadísticamente significativa respecto al alelo T de *GCLM* rs41303970 con la disminución de la eTFG en el grupo no expuesto ( $\beta = -0.018$ ,  $P = 0.037$ ,  $P \text{ perm} = 0.049$ ) pero no en el grupo expuesto ( $\beta = -0.005$ ,  $P = 0.33$ ,  $P \text{ perm} = 0.28$ ) (Tabla 6, Figura 19B y 19C). No se evidenciaron asociaciones significativas entre las otras variantes genéticas analizadas y los niveles de albúmina urinaria tanto para el análisis de la población total como para el análisis por grupos (Tabla 5 y 6).

Tabla 6.

Asociación de las variantes genéticas en genes relacionados con el metabolismo del glutatión con los biomarcadores de función renal por grupo de exposición.

Grupo	SNP	N	eTFG (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )			Albúmina urinaria, 24h (mg/mL)			β-2MCG (ng/mL)		
			β	P-valor <sup>a</sup>	P-valor <sup>b</sup>	β	P-valor <sup>a</sup>	P-valor <sup>b</sup>	β	P-valor <sup>a</sup>	P-valor <sup>b</sup>
Expuesto al Hg	<i>GCLC</i> rs1555903	156	-0.005	0.300	0.784	-71.06	0.230	0.131	<b>-20.01</b>	<b>0.013</b>	<b>0.026</b>
	<i>GCLM</i> rs41303970	156	-0.005	0.335	0.280	-70.94	0.269	0.220	1.934	0.826	1
	<i>GSTAI</i> rs3957356	156	0.003	0.516	0.432	108.43	0.066	0.077	9.231	0.250	0.190
	<i>GSTPI</i> rs4147581	156	0.003	0.581	1	-67.79	0.286	0.092	-11.46	0.185	0.206
	<i>GSS</i> rs3761144	156	0	0.915	0.843	82.36	0.123	0.169	-0.924	0.898	0.960
No expuesto al Hg	<i>GCLC</i> rs1555903	119	<b>-0.017</b>	<b>0.014</b>	<b>0.021</b>	-22.22	0.056	0.037	-1.862	0.794	0.764
	<i>GCLM</i> rs41303970	119	<b>-0.018</b>	<b>0.037</b>	<b>0.049</b>	-19.17	0.201	0.458	4.269	0.641	0.581
	<i>GSTAI</i> rs3957356	110	0.011	0.184	0.152	-7.575	0.588	0.980	0.266	0.974	0.921
	<i>GSTPI</i> rs4147581	119	-0.002	0.787	1	-6.072	0.607	0.375	7.591	0.292	0.921
	<i>GSS</i> rs3761144	119	0.002	0.804	0.615	15.83	0.178	0.234	-4.703	0.519	0.340

Cada SNP fue evaluado mediante modelos lineales generalizados multivariados ajustados por sexo, edad, estado de exposición (municipio expuesto o no expuesto) y concentración de Hg en cabello como biomarcador de exposición a metil-Hg, bajo un modelo de herencia aditivo.

<sup>a</sup>Valor de p de modelos lineales generalizados.

<sup>b</sup>Valor de p empírico basado en 5000 permutaciones de modelos lineales generalizados.

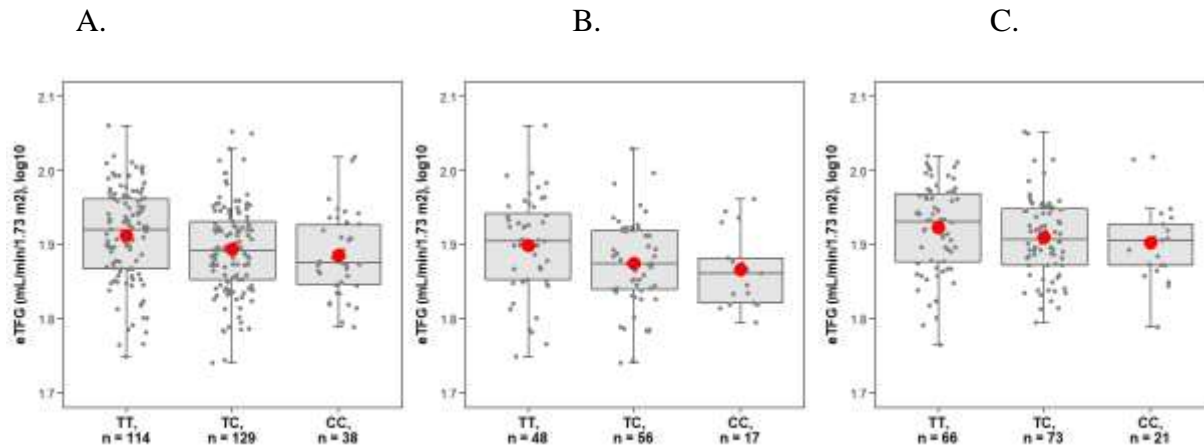


Figura 17. Efecto de *GCLC* rs1555903 sobre eTFG. El gráfico de cajas y bigotes muestra que el alelo C del *GCLC* rs1555903 se asoció significativamente con la disminución de la eTFG en la población total (A) ( $\beta = -0.01$ ,  $P = 0.011$ ,  $P \text{ perm} = 0.009$ ), así como en el grupo no expuesto (B) ( $\beta = -0.017$ ,  $P = 0.014$ ,  $P \text{ perm} = 0.021$ ) pero no en el grupo expuesto (C) ( $\beta = -0.005$ ,  $P = 0.300$ ,  $P \text{ perm} = 0.784$ ). Los valores  $\beta$  y  $P$  corresponden a las asociaciones mediante modelos lineales generalizados multivariados bajo un modelo de herencia aditivo, ajustando por sexo, edad, estado de exposición (municipio expuesto o no expuesto) y concentración de Hg en cabello como biomarcador de exposición a metil-Hg. El punto rojo indica el promedio de la eTFG estratificada por genotipos.

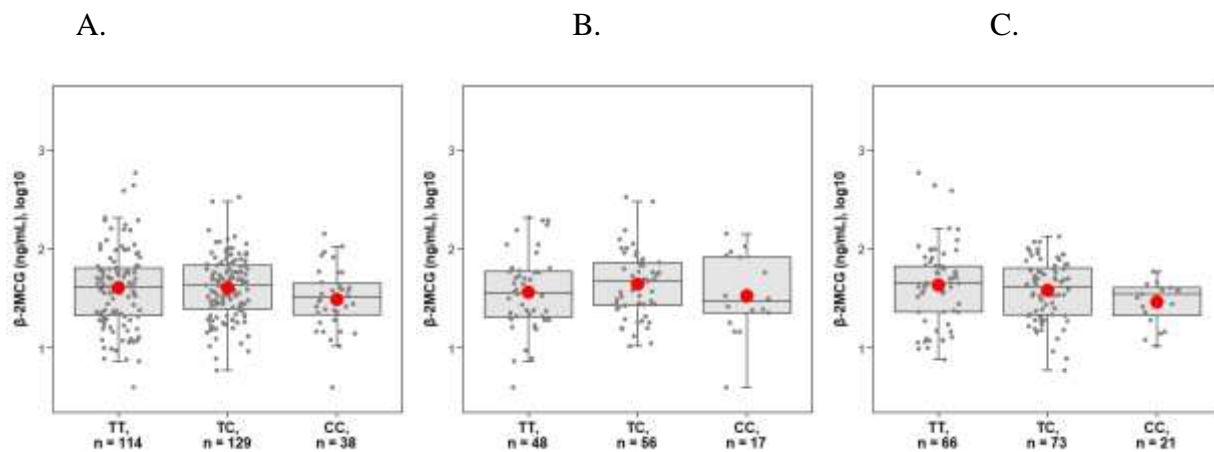


Figura 18. Efecto de *GCLC* rs1555903 en  $\beta$ -2MCG. El gráfico de cajas y bigotes muestra que el alelo C del *GCLC* rs1555903 se asoció significativamente con la disminución de la  $\beta$ -2MCG en la población total (A) ( $\beta = -11.88$ ,  $P = 0.031$ ,  $P \text{ perm} = 0.023$ ), así como en el grupo expuesto (C) ( $\beta = -20.01$ ,  $P = 0.013$ ,  $P \text{ perm} = 0.026$ ) pero no en el grupo no expuesto (B) ( $\beta = -1.862$ ,  $P = 0.794$ ,  $P \text{ perm} = 0.764$ ). Los valores  $\beta$  y  $P$  corresponden a las asociaciones mediante modelos lineales generalizados multivariados bajo un modelo de herencia aditivo, ajustando por sexo, edad, estado de exposición (municipio expuesto o no expuesto) y concentración de Hg en cabello como biomarcador de exposición a metil-Hg. El punto rojo indica el promedio de la  $\beta$ -2MCG estratificada por genotipos.

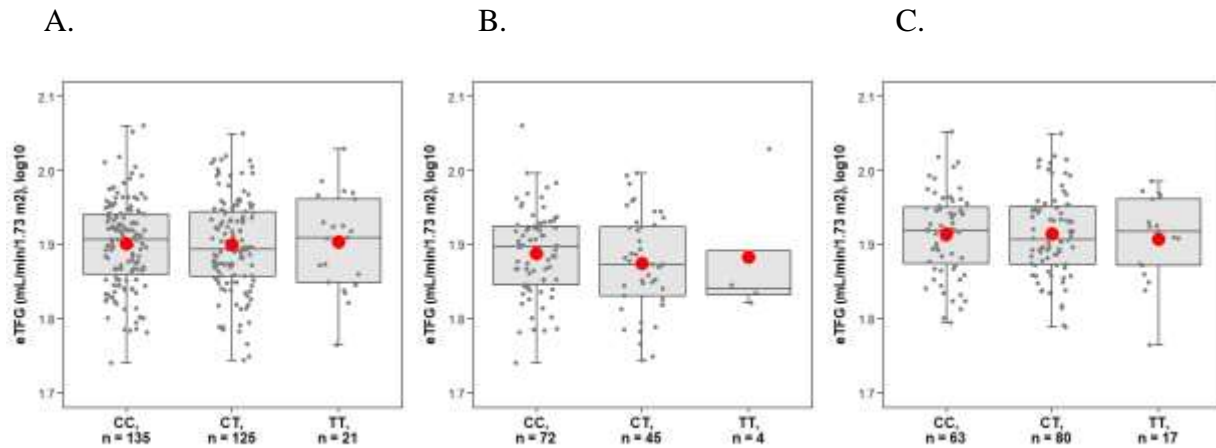


Figura 19. Efecto de *GCLM* rs41303970 sobre eTFG. El gráfico de cajas y bigotes muestra que el alelo T del *GCLM* rs41303970 se asoció significativamente con la disminución de la eTFG en el grupo no expuesto (B) ( $\beta = -0.018$ ,  $P = 0.037$ ,  $P \text{ perm} = 0.049$ ), pero no el grupo expuesto (C) ( $\beta = -0.005$ ,  $P = 0.335$ ,  $P \text{ perm} = 0.280$ ) y la población total (A) ( $\beta = 1.896$ ,  $P = 0.766$ ,  $P \text{ perm} = 0.686$ ). Los valores  $\beta$  y  $P$  corresponden a las asociaciones mediante modelos lineales generalizados multivariados bajo un modelo de herencia aditivo, ajustando por sexo, edad, estado de exposición (municipio expuesto o no expuesto) y concentración de Hg en cabello como biomarcador de exposición a metil-Hg. El punto rojo indica el promedio de la eTFG estratificada por genotipos.

Con el fin de identificar asociaciones marginales que podrían ayudar a arrojar información adicional sobre la toxicogenética de Hg, la interacción entre todos los pares de SNP individuales se probó mediante modelos de regresión lineal generalizados. Se encontró una interacción SNP-SNP estadísticamente significativa entre los SNP *GSS* rs3761144 y *GSTA1* rs3957356 con los niveles de Hg en orina ( $P = 0.015$ ,  $P \text{ perm} = 0.017$ ) (Apéndice B; Figura 20). Un análisis de pendiente simple mostró que el efecto del alelo rs3761144-G sobre un aumento en los niveles de orina-Hg sólo existe cuando los individuos portan el alelo rs3957356-C, aunque fue marginalmente significativo ( $\beta = 0.08$ ,  $P = 0.05$ ) (Figura 21A). Al realizarse el análisis por grupo expuesto y no expuesto ocupacionalmente al Hg, se observó que el aumento en los niveles de Hg en los portadores de los alelos rs3761144-G de *GSS* y rs3957356-C de *GSTA1* se da en el grupo

expuesto al Hg ( $\beta = 0.13$ ,  $P = 0.04$ ) pero no en el grupo no expuesto al Hg ( $\beta = 0.00$ ,  $P = 0.95$ ) (Apéndice D; Figura 21B y C).

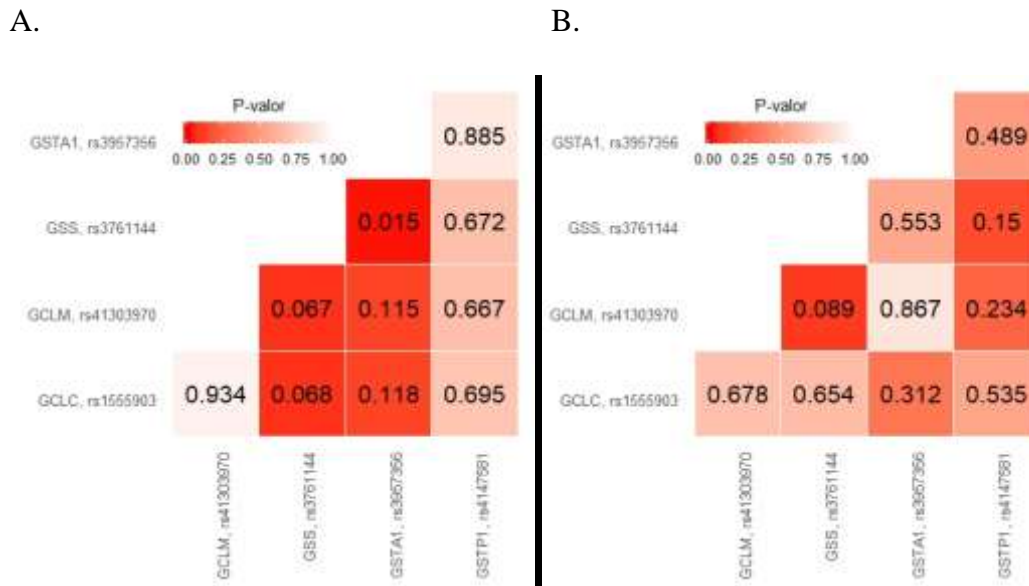


Figura 20. Interacción entre los SNPs sobre los niveles de Hg en orina (A) y en sangre (B) bajo un modelo de herencia aditivo. La matriz de interacción muestra una epistasis significativa entre el alelo *GSS* rs3761144-G y el alelo *GSTA1* rs3957356-C con los niveles de Hg en orina ( $P = 0.015$ ) (A), pero no se observan interacciones significativas entre los SNPs analizados con los niveles de Hg en sangre (B). La intensidad del color rojo aumenta a medida que el valor de  $P$  disminuye ( $P < 0.05$ ).

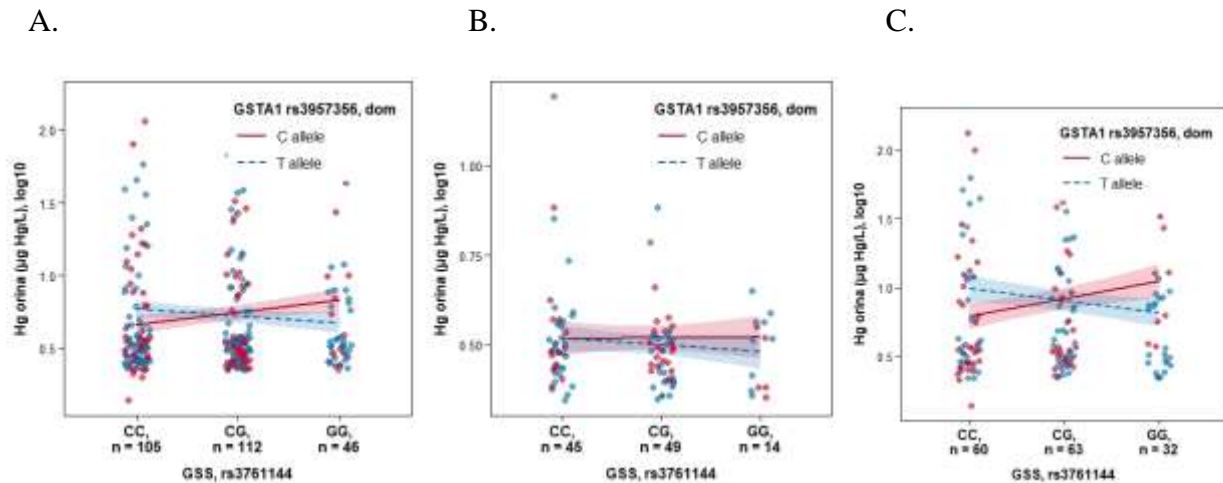


Figura 21. Efecto de los alelos *GSTA1* rs3957356-C y *GSS* rs3761144-G sobre los niveles de Hg en orina. El grafico de pendientes muestra que el efecto del alelo rs3761144-G sobre un aumento en los niveles de orina-Hg solo existe cuando los individuos portan el alelo rs3957356-C. Este efecto es marginal en la población total (A) ( $\beta = 0.08$ ,  $P = 0.05$ ). El análisis por grupos muestra que esta interacción el efecto es significativo en el grupo expuesto (C) ( $\beta = 0.13$ ,  $P = 0.04$ ) pero no en el grupo no expuesto (B) ( $\beta = 0.00$ ,  $P = 0.95$ ).

Con respecto a la evaluación de la función renal, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas para ninguna de las interacciones SNP-SNP con ninguno de los biomarcadores de función renal evaluados (Apéndice C, E, F; Figura 22, 23 y 24).



Figura 22. Interacción entre los SNPs sobre los niveles de eTFG. No se encontraron interacciones significativas entre los SNP analizados con los niveles de eTFG. La intensidad del color rojo aumenta a medida que el valor de P disminuye ( $P < 0.05$ ).



Figura 23. Interacción entre los SNPs sobre los niveles de albúmina urinaria. No se encontraron interacciones significativas entre los SNP analizados con los niveles de albúmina urinaria. La intensidad del color rojo aumenta a medida que el valor de P disminuye ( $P < 0.05$ ).



Figura 24. Interacción entre los SNPs sobre los niveles de  $\beta$ -2MCG. No se encontraron interacciones significativas entre los SNP analizados con los niveles de  $\beta$ -2MCG. La intensidad del color rojo aumenta a medida que el valor de P disminuye ( $P < 0.05$ ).

## 2.4 Discusión

El uso del Hg en la minería no sólo representa una amenaza para el medio ambiente sino también para la salud humana. La exposición a vapores de Hg metálico por MAPE ocurre principalmente durante la combustión de la amalgama (Esdaile & Chalker, 2018); en donde el vapor de Hg es inhalado y una vez en el torrente sanguíneo es distribuido a los diferentes órganos blancos: principalmente los riñones; siendo los túbulos proximales los segmentos de la nefrona más vulnerables a la acumulación de los iones de Hg. Aunque los mecanismos por los cuales el Hg logra ingresar a la célula no están completamente dilucidados, la evidencia experimental sugiere que los iones de Hg parecen ser transportados a las células tubulares proximales por mimetismo molecular a través de mecanismos de transporte presentes en las membranas luminal y basolateral (Bridges et al., 2013; Cannon et al. 2000). Una vez se encuentran en el espacio intracelular, los iones de Hg pueden causar la sobreproducción de ERO induciendo, como

consecuencia, la síntesis de moléculas antioxidantes como el glutatión. Interesantemente, los conjugados de Hg con glutatión no sólo contrarrestan el efecto tóxico de este metal, sino que también contribuyen a la retención de los iones mercúricos; ya que no son fácilmente transportables fuera de la célula, ocasionando desde disfunción tubular hasta necrosis tubular renal (Zalups, 2000).

Sin embargo, en el estudio epidemiológico adelantado por nuestro grupo de investigación, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de varios biomarcadores de función renal al comparar un grupo de personas ocupacionalmente expuestas al Hg con un grupo de personas control, a pesar de encontrarse diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ) en las concentraciones de Hg en sangre y orina entre ambos grupos (Sánchez et al., 2016). Por lo tanto, es importante entender los factores que estarían mitigando el efecto nefrotóxico del Hg en nuestra población de estudio. Dado el papel funcional del glutatión presentado líneas arriba y con el ánimo de abordar el componente genético como uno de los factores que podrían estar influenciando la susceptibilidad/resistencia del individuo expuesto a desarrollar el proceso fisiopatológico. Nosotros analizamos variantes genéticas de tipo SNPs en genes involucrados en el metabolismo del glutatión respecto a los niveles de Hg en sangre y orina y a los biomarcadores de función renal en la misma población de estudio.

De las variantes genéticas analizadas en este trabajo, los polimorfismos en los genes *GCLM* y *GCLC* estarían mitigando el efecto nefrotóxico inducido por Hg. Estos genes codifican las dos subunidades que componen la enzima GCL; considerada la enzima limitante de la velocidad de síntesis de glutatión en tanto que la sobreexpresión de GCL incrementa la síntesis de este tripéptido (Perrine Susan, 2005). Por lo tanto, las variantes genéticas en estos genes estarían

modulando los niveles de biosíntesis de glutatión, lo que podría explicar, al menos en parte, la susceptibilidad/resistencia individual a los efectos tóxicos del Hg.

Respecto al *GCLM* rs41303970, nuestros resultados mostraron que los portadores del alelo T presentaban niveles aumentados de Hg en orina (Tabla 4, Figura 16A). Este resultado está de acuerdo con lo reportado en la literatura, donde se encontró que individuos ocupacionalmente expuestos al Hg elemental mostraron que el alelo T del *GCLM* rs41303970 se asoció significativamente con un aumento en los niveles de Hg en orina (Custodio et al., 2004; Harari et al., 2012). Adicionalmente, en individuos expuestos a metil-Hg por consumo de pescado, este SNP también se asoció significativamente con un aumento de los niveles de Hg en sangre (Engstrom et al., 2008). Interesantemente, cuando exploramos la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del *GCLM* rs41303970 en nuestra población, encontramos un enriquecimiento del genotipo TT y del alelo T de este SNP en el grupo ocupacionalmente expuesto al Hg en comparación con el grupo no expuesto (Tabla 3), lo que podría sugerir una adaptación humana a este metal. En este contexto, existe evidencia epidemiológica que sugiere que estresores ambientales de tipo metal probablemente han impulsado el aumento en las frecuencias de variantes genéticas protectoras en genes relacionados con el metabolismo del metal estresor (Schlebusch et al. 2015).

El SNP rs41303970 se localiza en la región promotora del gen *GCLM*. La sustitución de C por T regula la expresión génica a nivel transcripcional, disminuyendo la producción de la subunidad modificadora *GCLM*; responsable de modular la eficiencia de la catálisis de la enzima GCL, por lo que como consecuencia disminuiría la biosíntesis de glutatión en los portadores del alelo T (Nakamura et al., 2002). En este contexto, al disminuir la biosíntesis de glutatión se forman menos conjugados GSH-Hg, afectando la absorción y acumulación del Hg a nivel renal y

favoreciendo la excreción urinaria del Hg (Custodio et al., 2004). Nosotros sugerimos que este mecanismo podría explicar, al menos en parte, la protección frente a la nefrotoxicidad inducida por Hg ya que mitigaría el riesgo de generar una situación prolongada de estrés oxidativo que podría favorecer el desarrollo del daño renal.

Respecto al *GCLC* rs1555903, nuestros resultados mostraron que los portadores del alelo C presentaban niveles disminuidos de eTFG y  $\beta$ -2MCG (Tabla 5, Figura 17A y 18A). A nuestro entender, no existen publicaciones previas que reporten asociaciones de este polimorfismo con la nefrotoxicidad inducida por Hg o la enfermedad renal en general. Un estudio de cohorte encontró una asociación significativa del alelo C del *GCLC* rs1555903 con retención de metil-Hg en el cordón umbilical (Julvez et al., 2013). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron asociaciones estadísticamente significativas de este SNP con los niveles de Hg en sangre y orina (Tabla 4). En conjunto, esto sugiere que el *GCLC* rs1555903 podría estar favoreciendo la retención del Hg a nivel del tejido renal, posiblemente mediante el aumento de los conjugados GSH-Hg.

El SNP rs1555903 se localiza en el intrón 9 del gen *GCLC*. Hasta el momento no hay evidencia experimental que demuestre el efecto de la sustitución de T por C en la expresión de *GCLC*. Sin embargo, el análisis de la expresión del loci de rasgos cuantitativos (eQTL, del inglés *expression quantitative trait loci*) realizado utilizando la base de datos Genotype-Tissue Expression (GTEx) (CONSORTIUM 2013) reveló que el alelo C de rs1555903 podría estar asociado con la expresión de *GCLC* en muestras de corteza renal ( $n = 73$ ,  $\beta = 0.58$ ,  $P = 0.0047$ ) (Apéndice G), por lo que como consecuencia aumentaría la biosíntesis de glutatión en los portadores del alelo C. En este contexto, al aumentar la biosíntesis de glutatión se forman más conjugados GSH-Hg, los cuales son acumulados a nivel tisular y, como consecuencia, generarían

una situación prolongada de estrés oxidativo que podría favorecer el desarrollo del daño renal, como se muestra con la disminución de los niveles de eTFG observados en este estudio.

Interesantemente, cuando analizamos el efecto de los SNPs sobre los biomarcadores de función renal de manera independiente para el grupo expuesto y no expuesto ocupacionalmente al Hg, encontramos que tanto los portadores del alelo C del *GCLC* rs1555903 como los portadores del alelo T del *GCLM* rs41303970 del grupo no expuesto al Hg presentaron disminución de eTFG (Tabla 6, Figura 17B y 19B). Si bien en nuestra población no se evidenció daño renal, ya que todos los participantes presentaron eTFG  $>76.4$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup> (Tabla 2), nuestros resultados sugieren que pueden existir otros factores que podrían explicar la disminución de la eTFG en este grupo de personas no expuestas ocupacionalmente al Hg. Adicionalmente, nosotros exploramos el efecto epistático de estos dos SNPs sobre los biomarcadores de efecto, pero no encontramos evidencias estadísticamente significativas; posiblemente debido a que los grupos formados por las combinaciones de alelos presentaron una muestra muy pequeña para hacer la inferencia estadística.

Teniendo en cuenta nuestros hallazgos, los resultados apuntan a que los niveles de glutatión, determinados por la actividad de la enzima GCL, estarían determinando la magnitud del efecto tóxico del Hg en la función renal mediante la modificación del balance redox celular. El glutatión es el principal actor del sistema celular de defensa antioxidante, cuya concentración intracelular se incrementa para disminuir las ROS, pasando en el proceso de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) (Zhang et al., 2012). Ya que la biosíntesis de glutatión depende de la enzima GCL, un aumento en la expresión de alguna de sus subunidades: *GCLC* o *GCLM*, conduciría a un aumento en la concentración de GSH (Choi et al., 2000). Si bien un exceso de GSH podría disminuir las ROS en condiciones de estrés oxidativo, esto también podría

conducir a la generación de estrés reductor. En este sentido, se ha reportado evidencia experimental en células embrionarias de riñón humano (HEK293T), en las cuales se sobre-expresaron independientemente los genes *GCLC* o *GCLM* y se observó un cambio en el potencial redox mitocondrial; aumentando el potencial redox reductor y, como consecuencia, se generó oxidación mitocondrial y citotoxicidad (Zhang et al., 2012). Este efecto fisiológico celular se puede explicar debido a que los organelos celulares presentan diferentes potenciales redox: en el citoplasma, la relación GSH/GSSG oscila entre 30:1 y 100:1, con un potencial redox de -290 mV; en el retículo endoplasmático, la relación GSH/GSSG oscila entre 1:1 y 3:1, con un potencial redox entre -170 y -185 mV, siendo más oxidante; y en las mitocondrias, la relación GSH/GSSG oscila entre 20.1 y 40:1, con un potencial redox entre 1250 y -280 mV, siendo más reductor en la matriz y más oxidante en el espacio interno de la membrana (Zhang et al., 2012). Un incremento en los niveles de glutatión puede generar una relocalización de este antioxidante en la matriz mitocondrial, lo que llevaría al aumento de las peroxidasas mitocondriales; generando un potencial redox más reductor que activa las enzimas glutatión reductasa y tiorredoxina reductasa, oxidando el GSH (GSSG) y la tiorredoxina mitocondrial y generando productos citotóxicos como superóxido y peróxido de hidrógeno (Korge et al., 2015).

En el contexto anteriormente descrito podríamos explicar, al menos en parte, nuestros resultados de asociación. Por una parte, la disminución en la eTFG observada en los portadores del alelo C de *GCLC* rs1555903 del grupo no expuesto ocupacionalmente al Hg (Tabla 5), se podría deber a un incremento en los niveles de glutatión que ocasionarían un aumento en el potencial redox reductor, ocasionando oxidación mitocondrial y, como consecuencia, citotoxicidad. Por otra parte, la disminución en los niveles de  $\beta$ -2MCG observada en los portadores del alelo C de *GCLC* rs1555903 del grupo expuesto ocupacionalmente al Hg (Tabla

6), se podría deber a la modulación de la actividad de la enzima GCL sobre la biosíntesis de glutatión por parte de la subunidad GCLM, la cual está disminuida en los portadores del alelo T de *GCLM* rs41303970, permitiendo así la formación de los conjugados GSH-Hg en un balance homeostático entre las fuerzas prooxidantes y las antioxidantes que mitigan el daño a nivel del túbulo proximal. Adicionalmente, nuestros resultados también sugieren que no se estaría favoreciendo la acumulación de los conjugados GSH-Hg en la célula tubular proximal debido a los niveles aumentados de Hg en orina que presentaron los portadores del alelo T de *GCLM* rs41303970; apoyando así la evidencia reportada sobre la importancia de esta subunidad sobre la actividad de GCL. De hecho, se ha reportado que cuando el Hg forma conjugados con moléculas cargadas negativamente, toda la absorción renal de Hg se produce a nivel de la membrana basolateral e impide la absorción de los conjugados de Hg a nivel de la membrana luminal, promoviendo la excreción urinaria de Hg (Jan et al., 2011).

Nuestros resultados también mostraron una sobrerrepresentación del alelo G y del genotipo GG del *GSTP1* rs4147581 en el grupo no expuesto ocupacionalmente al Hg en comparación con el grupo expuesto (Tabla 3). Aunque el efecto de este SNP sobre *GSTP1* sigue sin estar completamente esclarecida, un análisis de eQTL utilizando la base de datos GTEx reveló que el alelo G de rs4147581 podría estar asociado con la expresión de *GSTP1* en muestras de corteza renal ( $n = 73$ ,  $\beta = 0.36$ ,  $P = 0.006$ ). Además, el alelo C de rs4147581 se ha asociado con la metilación del ADN (Breton et al., 2009). Por lo tanto, este SNP puede controlar la expresión de *GSTP1* al influir sobre la metilación del ADN (Liu et al., 2001), y como consecuencia, modular la acumulación de Hg al nivel del riñón mediante la formación de conjugados de Hg con glutatión. Sin embargo, en análisis posteriores no observamos asociaciones significativas con los niveles de Hg en sangre y orina, ni con los biomarcadores de función renal analizados. Por lo que

se necesitaría un tamaño de muestra mayor, lo suficiente como para poder detectar el efecto de este SNP sobre las concentraciones de Hg en las condiciones de nuestro estudio.

El análisis de interacción entre los SNPs estudiados sobre los biomarcadores de exposición mostró un incremento en los niveles de Hg en orina en portadores de los alelos *GSS* rs3761144-G y *GSTAI* rs3957356-C; asociación que fue estadísticamente significativa en el grupo expuesto al Hg pero no en el grupo no expuesto (Figura 21 A y B). Los SNPs rs3761144 y rs3957356 se localizan en la región 5'UTR del gen que los contiene. Las sustituciones de C por G para *GSS* rs3761144 y de T por C para *GSTAI* rs3957356 actúan a nivel transcripcional, regulando negativamente la expresión del gen respectivo (Goodrich et al., 2011; Coles et al., 2001). La disminución de la expresión de estos dos genes conduciría no sólo a la disminución de la biosíntesis de glutatión por parte de la enzima GSS, sino también a la disminución de la conjugación con este tripéptido por parte de la enzima GST (Hayes et al., 2005). De acuerdo con lo anterior, los niveles aumentados de Hg en orina evidenciados en los portadores de los alelos *GSS* rs3761144-G y *GSTAI* rs3957356-C en el grupo expuesto al Hg (Figura 21 B) se pueden explicar, al menos en parte, por una disminución en la biosíntesis de glutatión y la conjugación de Hg con GSH, favoreciendo la excreción urinaria del metal. En apoyo a esta hipótesis, se ha reportado que los portadores del alelo G de rs3761144 *GSS* presentaron niveles elevados de metil-Hg en cabello por consumo de pescado (Goodrich et al., 2011), aunque no se observaron efectos similares para el *GSTAI* rs3957356 con niveles de metil-Hg en eritrocitos (Custodio et al., 2004).

Existen algunas limitaciones en este estudio de asociación. Primero, debido al pequeño tamaño de la muestra, los hallazgos deben interpretarse con precaución hasta que se confirmen en estudios más amplios. En segundo lugar, dado que los SNP en los genes de interés se

seleccionaron en función de su participación en el metabolismo de glutatión, nuestro análisis podría pasar por alto otras variantes genéticas relevantes que podrían estar modulando el metabolismo del Hg. Finalmente, la compleja patogénesis de la toxicidad de Hg sugiere que otros factores genéticos y ambientales pueden estar contribuyendo a las asociaciones encontradas en nuestro estudio y, por lo tanto, deben ser abordadas para esclarecer su función en este contexto.

### 3. Conclusiones

Nuestros resultados sugieren que las variantes genéticas germinales en los genes *GCLM*, *GCLC*, *GSTAI*, *GSTPI*, y *GSS* podrían mitigar el efecto nefrotóxico por Hg mediante la modulación de la biosíntesis del glutatión. Es así como la sobrerrepresentación de los alelos *GCLM* rs41303970-T y *GSTPI* rs4147581-C en el grupo expuesto comparado con el grupo no expuesto, así como las asociaciones encontradas con los niveles aumentados de Hg en orina para los portadores del grupo expuesto de los alelos *GCLM* rs41303970-T, *GSTAI* rs3957356-C y *GSS* 3761144-G sugieren que la disminución en la biosíntesis de glutatión y posterior conjugación con Hg estaría limitando la formación de los conjugados GSH-Hg, lo que impediría su acumulación en la célula tubular proximal y, como consecuencia, favorecería la excreción urinaria del Hg, mitigando el efecto tóxico de este metal a nivel renal como lo sugiere la asociación encontrada entre el alelo *GCLC* rs1555903-C con los niveles disminuidos del biomarcador de daño tubular  $\beta$ -2MCG. Este mecanismo propuesto es consistente con la literatura científica que reporta que a pesar de que el glutatión es el principal antioxidante intracelular, un exceso del mismo debido a la sobreexpresión de alguna de las enzimas involucradas en su biosíntesis puede generar citotoxicidad debido a un efecto prooxidante. En este contexto, nuestra evidencia mostró que los portadores del alelo *GCLC* rs1555903-C presentaron niveles disminuidos de la eTFG en el grupo no expuesto ocupacionalmente al Hg. Finalmente, no se encontraron asociaciones significativas entre los SNPs estudiados con los niveles de albúmina urinaria.

### Referencias Bibliográficas

- Agrawal, S., Flora, G., Bhatnagar, P., & Flora, S. J. S. (2014). Comparative oxidative stress, metallothionein induction and organ toxicity following chronic exposure to arsenic, lead and mercury in rats. *Cellular and Molecular Biology*, 60(2), 13-21. <https://doi.org/10.14715/cmb/2014.60.2.3>
- Andreoli, V., & Sprovieri, F. (2017). Genetic aspects of susceptibility to mercury toxicity: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/ijerph14010093>
- Al Bakheet, S., Attafi, I., Maayah, Z., Abd-Allah, A., Asiri, Y., & Korashy, H. (2013). Effect of long-term human exposure to environmental heavy metals on the expression of detoxification and DNA repair genes. *Environmental Pollution*, 181, 226-232. doi: 10.1016/j.envpol.2013.06.014
- Bahn, A. (2002). Interaction of the Metal Chelator 2,3-Dimercapto-1-propanesulfonate with the Rabbit Multispecific Organic Anion Transporter 1 (rbOAT1). *Molecular Pharmacology*, 62(5), 1128-1136. doi: 10.1124/mol.62.5.1128
- Barabási, A.-L., Gulbahce, N., & Loscalzo, J. (2011). An Integrative Systems Medicine Approach to Mapping Human Metabolic Diseases. *Nat Rev Genet*, 12(1), 56-68. <https://doi.org/10.1038>
- Barcelos, G. R. M., Grotto, D., de Marco, K. C., Valentini, J., Lengert, A. V. H., Oliveira, A. T. S. D., Garcia, S. C., Braga, G. T. L., Schläwicke Engström, K., Cólus, I. M. D. S., Broberg, K., & Barbosa, F. (2013). Polymorphisms in glutathione-related genes modify mercury concentrations and antioxidant status in subjects environmentally exposed to methylmercury. *Science of the Total Environment*, 463-464, 319-325. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.029>

- Berglund, M., Lind, B., Björnberg, K., Palm, B., Einarsson, Ö., & Vahter, M. (2005). Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. *Environmental Health*, 4(1). doi: 10.1186/1476-069x-4-20
- Berlin, M., Zalups, R., & Fowler, B. (2007). *Handbook on the Toxicology of Metals* (3rd ed., p. chapter 33). New York, NY, USA: Elsevier.
- BGS. British Geological Survey (2012). *World mineral production 2006-2010* [Ebook]. Keyworth, Nottingham. Retrieved from <https://www.bgs.ac.uk/downloads/start.cfm?id=2255>
- Bjørklund, G., Aaseth, J., Ajsuvakova, O., Nikonorov, A., Skalny, A., Skalnaya, M., & Tinkov, A. (2017). Molecular interaction between mercury and selenium in neurotoxicity. *Coordination Chemistry Reviews*, 332, 30-37. doi: 10.1016/j.ccr.2016.10.009
- Breton, C. V., Byun, H. M., Wenten, M., Pan, F., Yang, A., & Gilliland, F. D. (2009). Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 180(5), 462-467. <https://doi.org/10.1164/rccm.200901-0135OC>
- Bridges, C. C., Joshee, L., van den Heuvel, J. J. M. W., Russel, F. G. M., & Zalups, R. K. (2013). Glutathione status and the renal elimination of inorganic mercury in the Mrp2(-/-) mouse. *PloS One*, 8(9), e73559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073559>
- Bridges, C., & Zalups, R. (2017). Mechanisms involved in the transport of mercuric ions in target tissues. *Archives Of Toxicology*, 91(1), 63-81. doi: 10.1007/s00204-016-1803-y
- Bridges, C., Joshee, L., & Zalups, R. (2011). MRP2 and the handling of mercuric ions in rats exposed acutely to inorganic and organic species of mercury. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 251(1), 50-58. doi: 10.1016/j.taap.2010.11.015
- Canon, V., Barfuss, D., & Zalups, R. (2000). Molecular Homology and the Luminal Transport of Hg<sup>2+</sup> in the Renal Proximal Tubule. *The American Society Of Nephrology*, 11, 394 - 402. doi: 1046-6673/1103-0394

- Carocci, A., Rovito, N., Sinicropi, M., & Genchi, G. (2013). Mercury Toxicity and Neurodegenerative Effects. *Reviews Of Environmental Contamination And Toxicology*, 1-18. doi: 10.1007/978-3-319-03777-6\_1
- Checa, M. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 20, 213-221.
- Choi, J., Liu, R., Kundu, R., Sangiorgi, F., Wu, W., Maxson, R., & Forman, H. (2000). Molecular Mechanism of Decreased Glutathione Content in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat-transgenic Mice. *Journal Of Biological Chemistry*, 275(5), 3693-3698. doi: 10.1074/jbc.275.5.3693
- Chung, J., Seo, M., Shim, J., & Lee, Y. (2014). Sex differences in the relationship between blood mercury concentration and metabolic syndrome risk. *Journal Of Endocrinological Investigation*, 38(1), 65-71. doi: 10.1007/s40618-014-0132-3
- Clarke, G. M., C. A. Anderson, F. H. Pettersson, L. R. Cardon, A. P. Morris *et al.*, 2011 Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc* 6: 121-133.
- Clarkson, T., & Magos, L. (2006). The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. *Critical Reviews In Toxicology*, 36(8), 609-662. doi: 10.1080/10408440600845619
- Coles, B., Morel, F., Rauch, C., Huber, W., Yang, M., & Teitel, C. et al. (2001). Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenetics*, 11(8), 663-669. doi: 10.1097/00008571-200111000-00004
- Consortium, G. T., 2013 The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet* 45: 580-585
- Cordy, P., Veiga, M., Salih, I., Al-Saadi, S., Console, S., & Garcia, O. et al. (2011). Mercury contamination from artisanal gold mining in Antioquia, Colombia: The world's highest per capita mercury pollution. *Science Of The Total Environment*, 410-411, 154-160. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.09.006

- Crowe, W., Allsopp, P., Watson, G., Magee, P., Strain, J., & Armstrong, D. et al. (2017). Mercury as an environmental stimulus in the development of autoimmunity – A systematic review. *Autoimmunity Reviews*, 16(1), 72-80. doi: 10.1016/j.autrev.2016.09.020
- Custodio, H., Broberg, K., Wennberg, M., Jansson, J., Vessby, B., & Hallmans, G. et al. (2004). Polymorphisms in Glutathione-Related Genes Affect Methylmercury Retention. *Archives Of Environmental Health: An International Journal*, 59(11), 588-595. doi: 10.1080/00039890409603438
- Custodio, H., Harari, R., Gerhardsson, L., Skerfving, S., & Broberg, K. (2005). Genetic Influences on the Retention of Inorganic Mercury. *Archives Of Environmental & Occupational Health*, 60(1), 17-23. doi: 10.3200/aeoh.60.1.17-23
- De Oliveira, A., Souza, M., Lengert, A., de Oliveira, M., Camargo, R., & Braga, G. et al. (2014). Genetic Polymorphisms in Glutathione (GSH-) Related Genes Affect the Plasmatic Hg/Whole Blood Hg Partitioning and the Distribution between Inorganic and Methylmercury Levels in Plasma Collected from a Fish-Eating Population. *Biomed Research International*, 2014, 1-8. doi: 10.1155/2014/940952
- Denzoin V, L., Soraci, A., & Tapia, M. (2013). Homeostasis del glutatión. *Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(3), 529-539.
- Engström, K., Strömberg, U., Lundh, T., Johansson, I., Vessby, B., & Hallmans, G. et al. (2008). Genetic Variation in Glutathione-Related Genes and Body Burden of Methylmercury. *Environmental Health Perspectives*, 116(6), 734-739. doi: 10.1289/ehp.10804
- Engström, K. S., Wennberg, M., Strömberg, U., Bergdahl, I. A., Hallmans, G., Jansson, J.-H., Lundh, T., Norberg, M., Rentschler, G., Vessby, B., Skerfving, S., & Broberg, K. (2011). Evaluation of the impact of genetic polymorphisms in glutathione-related genes on the association between methylmercury or n-3 polyunsaturated long chain fatty acids and risk of myocardial infarction: A case-control study. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1476-069X-10-33>
- Esdaille, L. J., & Chalker, J. M. (2018). The Mercury Problem in Artisanal and Small-Scale Gold Mining. En *Chemistry - A European Journal* (Vol. 24, Número 27, pp. 6905-6916). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/chem.201704840>

- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics, 1*, 117693430500100. doi: 10.1177/117693430500100003
- Goodrich, J., Wang, Y., Gillespie, B., Werner, R., Franzblau, A., & Basu, N. (2011). Glutathione enzyme and selenoprotein polymorphisms associate with mercury biomarker levels in Michigan dental professionals. *Toxicology And Applied Pharmacology, 257*(2), 301-308. doi: 10.1016/j.taap.2011.09.014
- Grimaldos, R. (2016). Impactos ambientales actuales en el Páramo de Santurbán - Monografias.com. From <https://www.monografias.com/trabajos83/impactos-ambientales-actuales-paramo-santurban/impactos-ambientales-actuales-paramo-santurban.shtml>
- Gundacker, C., Komarnicki, G., Jagiello, P., Gencikova, A., Dahmen, N., Wittmann, K., & Gencik, M. (2007). Glutathione-S-transferase polymorphism, metallothionein expression, and mercury levels among students in Austria. *Science Of The Total Environment, 385*(1-3), 37-47. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.07.033
- Gundacker, C., Wittmann, K., Kukuckova, M., Komarnicki, G., Hikkel, I., & Gencik, M. (2009). Genetic background of lead and mercury metabolism in a group of medical students in Austria. *Environmental Research, 109*(6), 786-796. doi: 10.1016/j.envres.2009.05.003
- Harari, R., Harari, F., Gerhardsson, L., Lundh, T., Skerfving, S., Strömberg, U., & Broberg, K. (2012). Exposure and toxic effects of elemental mercury in gold-mining activities in Ecuador. *Toxicology Letters, 213*(1), 75-82. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.09.006
- Hayes, J., Flanagan, J., & Jowsey, I. (2005). Glutathione Transferases. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology, 45*(1), 51-88. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857
- Head, J., Dolinoy, D., & Basu, N. (2012). Epigenetics for ecotoxicologists. *Environmental Toxicology And Chemistry, 31*(2), 221-227. doi: 10.1002/etc.1707
- Hentschel, T., Hruschka, F., & Priester, M. (2002). *The Mining, Minerals and Sustainable Development (MMSD) Project: Global Report on Artisanal & Small-Scale Mining*[Ebook]. London, UK: International Institute for Environment and Development.

- Hincapie, M., Gil, A., Pico, A., Gusmao, L., & Rondon, F. (2009). Análisis de la estructura genética en una muestra poblacional de Bucaramanga, departamento de Santander. *Colomb Med*, 40, 362-373.
- Hughes, W. (1957). A physicochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 65(5), 454-460. doi: 10.1111/j.1749-6632.1956.tb36650.x
- Iniesta, R., Guinó, E., & Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*, 19(4), 333-341. doi: 10.1157/13078029
- Jaffé, M. (1886). Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. *Z Physiol Chem*, 10, 391-400.
- Jan, A. T., Ali, A., & Haq, Q. M. R. (2011). Glutathione as an antioxidant in inorganic mercury induced nephrotoxicity. En *Journal of Postgraduate Medicine* (Vol. 57, Número 1, pp. 72-77). <https://doi.org/10.4103/0022-3859.74298>
- Joshi, D., Mittal, D., Shukla, S., Srivastav, A., & Srivastav, S. (2014). N-acetyl cysteine and selenium protects mercuric chloride-induced oxidative stress and antioxidant defense system in liver and kidney of rats: A histopathological approach. *Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology*, 28(2), 218-226. doi: 10.1016/j.jtemb.2013.12.006
- Julvez, J., Smith, G. D., Golding, J., Ring, S., Pourcain, B. S., Gonzalez, J. R., & Grandjean, P. (2013). Prenatal methylmercury exposure and genetic predisposition to cognitive deficit at age 8 years. *Epidemiology*, 24(5), 643-650. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31829d5c93>
- Kippenberg, J., Wurth, M., & Conde, C. (2015). "What ... if Something Went Wrong?" | Hazardous Child Labor in Small-Scale Gold Mining in the Philippines. Retrieved 10 October 2017, from <https://www.hrw.org/report/2015/09/29/what-if-something-went-wrong/hazardous-child-labor-small-scale-gold-mining>
- Knijnenburg, T. A., L. F. Wessels, M. J. Reinders and I. Shmulevich, 2009 Fewer permutations, more accurate P-values. *Bioinformatics* 25: i161-168.

- Kojima, R., Sekine, T., Kawachi, M., Seok, H. C., Suzuki, Y., & Endou, H. (2002). Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(4), 848-857.
- Korge, P., Calmettes, G., & Weiss, J. N. (2015). Increased reactive oxygen species production during reductive stress: The roles of mitochondrial glutathione and thioredoxin reductases. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1847(6-7), 514-525. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.012>
- Lee, B.-E., Hong, Y.-C., Park, H., Ha, M., Koo, B. S., Chang, N., Roh, Y.-M., Kim, B.-N., Kim, Y.-J., Kim, B.-M., Jo, S.-J., & Ha, E.-H. (2010). Interaction between GSTM1 / GSTT1 Polymorphism and Blood Mercury on Birth Weight . *Environmental Health Perspectives*, 118(3), 437-443. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900731>
- León, F., Rondón, F., Vargas, C., Oróstegui, M., & Bautista, L. (2012). Analysis of population genetic structure from Bucaramanga (Colombia) based on gene polymorphisms associated with regulation of blood ressure. *Colomb Med*, 43, 154-161.
- Levey, A. S., L. A. Stevens, C. H. Schmid, Y. L. Zhang, A. F. Castro, 3rd *et al.*, 2009 A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 150: 604-612.
- Liu, D., Liao, M., Zuo, J., Henner, W., & Fang, F. (2001). *Molecular Biology Reports*, 28(1), 19-25. doi: 10.1023/a:1011993604051
- Marian, A. (2012). Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Translational Research*, 159(2), 64-79. doi: 10.1016/j.trsl.2011.08.001
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*, 16(10), 577-586. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.013
- Ministerio de Minas y Energía. (2012). *Censo Minero Departamental 2010-2011* [Ebook]. Bogotá DC. Retrieved from <https://www.minminas.gov.co/censominero>

- Nakamura, S. (2002). Polymorphism in the 5'-Flanking Region of Human Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit Gene Is Associated With Myocardial Infarction. *Circulation*, *105*(25), 2968-2973. doi: 10.1161/01.cir.0000019739.66514.1e
- Njalsson, R., Norgren, S., Larsson, A., Huang, C., Anderson, M., & Luo, J. (2001). Cooperative Binding of  $\gamma$ -Glutamyl Substrate to Human Glutathione Synthetase. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, *289*(1), 80-84. doi: 10.1006/bbrc.2001.5961
- Olden, K., & Wilson, S. (2000). Environmental health and genomics: visions and implications. *Nature Reviews Genetics*, *1*(2), 149-153. doi: 10.1038/35038586
- Ozuah, P. (2000). Mercury poisoning. *Current Problems In Pediatrics*, *30*(3), 91-99. doi: 10.1067/mps.2000.104054
- Palacín, M., Fernáandez, E., Chillarón, J., & Zorzano, A. (2001). The amino acid transport system bo,+and cystinuria. *Molecular Membrane Biology*, *18*(1), 21-26. doi: 10.1080/09687680010028771
- Palacios-Torres, Y., Caballero-Gallardo, K., & Olivero-Verbel, J. (2017). Mercury pollution by gold mining in a global biodiversity hotspot, the Choco biogeographic region, Colombia. *Chemosphere*, *193*, 421-430. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.160
- Park, J. D., & Zheng, W. (2012). Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, *45*(6), 344-352. <https://doi.org/10.3961/jpmph.2012.45.6.344>
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, *333*(1), 19-39. doi: 10.1016/s0009-8981(03)00200-6
- Perrine Susan. (2005). 基因的改变NIH Public Access. *Bone*, *23*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Reichelt-Brushett, A. J., Stone, J., Howe, P., Thomas, B., Clark, M., Male, Y., Nanlohy, A., & Butcher, P. (2017). Geochemistry and mercury contamination in receiving environments

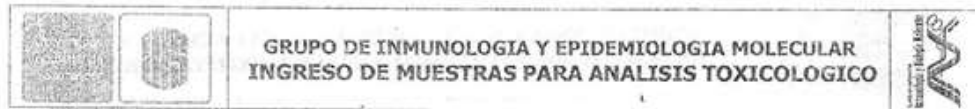
- of artisanal mining wastes and identified concerns for food safety. *Environmental Research*, 152, 407-418. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.07.007>
- Reira, M., Rojas, M., & Zapata, P. (2010). Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Revista De Ciencia Y Tecnología*, 14, 4-7.
- Rothstein, A., & Hayes, A. (1964). The Turnover of Mercury in Rats Exposed Repeatedly to Inhalation of Vapor. *Health Physics*, 10(12), 1099-1113. doi: 10.1097/00004032-196412000-00031
- Sánchez, L., Rodríguez-Villamizar, L., Flórez-Vargas, O., Fiallo, Y., Ordoñez, Á., & Gutiérrez, M. (2016). No effect of mercury exposure on kidney function during ongoing artisanal gold mining activities in Colombia. *Toxicology And Industrial Health*, 33(1), 67-78. doi: 10.1177/0748233716659031
- Schlebusch, C. M., L. M. Gattepaille, K. Engstrom, M. Vahter, M. Jakobsson *et al.*, 2015 Human adaptation to arsenic-rich environments. *Mol Biol Evol* 32: 1544-1555.
- Seccatore, J., Veiga, M., Origliasso, C., Marin, T., & De Tomi, G. (2014). An estimation of the artisanal small-scale production of gold in the world. *Science of the Total Environment*, 496, 662-667. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.003>
- SIMCO. Gold production (2015). Retrieved from [http://www.upme.gov.co/generadorconsultas/Consulta\\_Series.aspx?%20idModulo=4&tipoSerie=116&grupo=357&FechaInicial=01/01/%202004&FechaFinal=31/03/2013](http://www.upme.gov.co/generadorconsultas/Consulta_Series.aspx?%20idModulo=4&tipoSerie=116&grupo=357&FechaInicial=01/01/%202004&FechaFinal=31/03/2013) (2015)
- Siva, N., 2008 1000 Genomes project. *Nat Biotechnol* 26: 256
- Strange, R., Jones, P., & Fryer, A. (2000). Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicology Letters*, 112-113, 357-363. doi: 10.1016/s0378-4274(99)00230-1
- Swain, E., Jakus, P., Rice, G., Lupi, F., Maxson, P., & Pacyna, J. et al. (2007). Socioeconomic Consequences of Mercury Use and Pollution. *AMBIO: A Journal Of The Human Environment*, 36(1), 45-61. doi: 10.1579/0044-7447(2007)36[45:scomua]2.0.co;2

- UNEP 2013. (2013). The UNEP Global Mercury Assessment: Sources, Emissions and Transport. *E3S Web Of Conferences, 1*, 36001. doi: 10.1051/e3sconf/20130136001
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions, 160*(1), 1-40. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009
- Van Bockstael, S. (2014). The persistence of informality: Perspectives on the future of artisanal mining in Liberia. *Futures, 62*, 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.futures.2014.02.004>
- Vega, F., Lazaruk, K., Rhodes, M., & Wenz, M. (2005). Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan® SNP Genotyping Assays and the SNPlex™ Genotyping System. *Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis, 573*(1-2), 111-135. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2005.01.008
- Veiga, M. M., Nunes, D., Klein, B., Shandro, J. A., Velasquez, P. C., & Sousa, R. N. (2009). Mill leaching: a viable substitute for mercury amalgamation in the artisanal gold mining sector? *Journal of Cleaner Production, 17*(15), 1373-1381. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2009.03.012>
- Vieira, R. (2006). Mercury-free gold mining technologies: Possibilities for adoption in the Guianas. *Journal of Cleaner Production, 14*(3-4), 448-454. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.09.007>
- Wu, G., Fang, Y., Yang, S., Lupton, J., & Turner, N. (2004). Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *The Journal Of Nutrition, 134*(3), 489-492. doi: 10.1093/jn/134.3.489
- Xie, Y., Zhou, X., Chen, L., Zhang, Z., Wang, C., & Gu, X. et al. (2015). Cloning and characterization of a novel sigma-like glutathione S-transferase from the giant panda parasitic nematode, *Baylisascaris schroederi*. *Parasites & Vectors, 8*(1), 44. doi: 10.1186/s13071-014-0629-9
- Zalups, R., Cherian, M., & Barfuss, D. (1993). Mercury-metallothionein and the renal accumulation and handling of mercury. *Toxicology, 83*(1-3), 61-78. doi: 10.1016/0300-483x(93)90092-7

- Zalups, R., K. (2000). Molecular Interactions with Mercury in the Kidney. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS*, 52(1), 114-140. doi: 0031-6997/113/5201-0113
- Zalups, R., & Ahmad, S. (2004). Homocysteine and the Renal Epithelial Transport and Toxicity of Inorganic Mercury: Role of Basolateral Transporter Organic Anion Transporter 1. *Journal Of The American Society Of Nephrology*, 15(8), 2023-2031. doi: 10.1097/01.asn.0000135115.63412.a9
- Zalups, R., & Ahmad, S. (2005). Handling of cysteine S-conjugates of methylmercury in MDCK cells expressing human OAT1. *Kidney International*, 68(4), 1684-1699. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00585.x
- Zalups, R., & Koropatnick, J. (2000). Temporal changes in metallothionein gene transcription in rat kidney and liver: relationship to content of mercury and metallothionein protein. *J. Pharmacol. Exp*, 295(1), 74-82.
- Zhang, H., Limphong, P., Pieper, J., Liu, Q., Rodesch, C. K., Christians, E., & Benjamin, I. J. (2012). Glutathione-dependent reductive stress triggers mitochondrial oxidation and cytotoxicity. *FASEB Journal*, 26(4), 1442-1451. <https://doi.org/10.1096/fj.11-199869>

## Apéndices

### Apéndice A: Consentimiento Informado.



#### DECLARATORIA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO TOXICOLOGIA DEL MERCURIO

El grupo de investigación de Inmunología y Epidemiología Molecular de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander realiza una investigación para determinar los efectos tóxicos del mercurio. Para poder determinar estos valores a cada persona se le tomarán muestras de sangre y orina. Se busca determinar las alteraciones inmunológicas y renales en personas expuestas a vapores de mercurio. Los resultados obtenidos son importantes suministrarlos a las autoridades de salud para que los utilicen para hacer campañas preventivas en el uso del mercurio, así como para que los médicos puedan utilizarlos para la realización de un diagnóstico, tratamiento y seguimiento más acucioso de los pacientes intoxicados por este metal.

#### Procedimiento del estudio

Si usted acepta participar en el estudio se le realizará una encuesta con información personal y otros datos generales. También se le hará un examen físico general por parte de un médico y se le tomarán muestras de sangre en 3 tubos de 7ml, orina de 24 horas, primera orina de la mañana y se le coriarán con tijeras unos pocos cabellos (aproximadamente 50) cercanos a la nuca, para conocer los valores de mercurio y evaluar alteraciones renales e inmunológicas.

#### Beneficios

Si usted acepta participar no recibirá ningún beneficio directo de los resultados de este estudio. La información y resultados de sus exámenes le serán entregados y se le dará orientación, si lo requiere, para que la empresa de salud en la que se encuentra afiliado la tenga en cuenta en caso de requerir seguimiento o tratamiento. La información obtenida en este estudio podría ayudarnos en el futuro a mejorar el control y la prevención de las intoxicaciones por mercurio.

#### Riesgos

La toma de muestra de sangre se hará bajo condiciones de bioseguridad para evitar cualquier tipo de infección. En la toma de muestra de sangre usted podría presentar un leve dolor o un pequeño morado en el sitio de la extracción. La cantidad total de sangre que se tomará es similar a la utilizada en cualquier prueba de laboratorio normal y no representa un riesgo importante para su salud. La toma de muestra del cabello se hará lo más cercana al cuero cabelludo y bajo condiciones de bioseguridad para evitar cualquier infección. Este procedimiento de consentimiento informado está ajustado a las normas de ética médica vigentes en Colombia, a la declaración de Helsinki y sus enmiendas, a la guía para buenas prácticas clínicas (ICH E6) y a la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander.

#### Responsabilidades del paciente

Si acepta participar en el estudio usted debe permitir la toma de las muestras de sangre, orina y cabello para la realización de las pruebas de laboratorio, la realización de los exámenes físicos si son requeridos. Usted debe suministrar la información que se le solicite. Usted ayudará mucho si le dice a su médico cualquier molestia que presente durante los procedimientos.

#### Alternativas

Si usted escoge no participar en el estudio se le realizará el examen médico de igual forma que a las otras personas.

#### Confidencialidad




Solo su doctor y sus colaboradores sabrán que usted está participando en este estudio. Guardaremos privacidad acerca de los registros que puedan identificarlo a usted hasta donde nos lo permita la ley. Se utilizará un código del estudio para su identificación. Su nombre no aparecerá en ningún informe, ni publicación de este estudio.

#### Compensación

Usted no incurrirá en ningún gasto por la participación en este estudio. Los exámenes médicos y de laboratorio son completamente gratuitos. En caso de requerir cualquier otro examen se le dará la asesoría y orientación para que sea suministrado por la empresa de salud en la cual se encuentre afiliado.

#### Personas a contactar

Si tiene cualquier pregunta acerca de este estudio o acerca de lo que debe hacer en caso de que sienta alguna molestia durante el estudio, puede comunicarse con la Dra. Luz Helena Sánchez Rodríguez en la Escuela de Bacteriología al teléfono 6348223 o con la Dra. Yolanda Vargas Fiallo del Laboratorio Químico de Consultas Industriales al teléfono 6349009. Si tiene dudas con respecto a los derechos y deberes que

		<p><b>GRUPO DE INMUNOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR</b>  <b>INGRESO DE MUESTRAS PARA ANALISIS TOXICOLOGICO</b></p>	
---	---	---	---

Siene por su participación en este estudio, puede comunicarse con la Dra. Esperanza Cruz, presidente del Comité de Institucional de Ética en Humanos al teléfono 6344000 Ext. 3145.

Su médico responsable de esta investigación estará disponible para responder cualquier pregunta adicional  
 Nombre: Dra. Laura Andrea Rodríguez. Dirección: Carrera 32 No. 29-31, Facultad de Salud, Departamento de Salud Pública Teléfono: 6454726.

Usted entiende que su participación en el estudio es **VOLUNTARIA**. En cualquier momento usted puede retirar su consentimiento a participar en los estudios. Su médico también podrá detener el estudio por razones médicas u otras razones.

**Autorización para guardar sus muestras**  
 Se lo solicita su autorización para que la información y las muestras, incluyendo su material genético, obtenidas en este estudio puedan ser utilizadas en otros estudios relacionados con la toxicología del mercurio, previa aprobación del Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander.

Autorizo \_\_\_\_\_ Firma de autorización \_\_\_\_\_

No autorizo \_\_\_\_\_

**Aceptación**  
 Con fecha \_\_\_\_\_ habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación en la(s) investigación(es) desarrolladas por el grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular.

Datos	Nombre (Letra imprenta)	Lugar y fecha (DD/MM/AA)	Firma o huella	Parentesco con el participante
Nombre del participante				
No. de identificación				
Representante legal <small>(solo cuando el sujeto o sus representantes no estén)</small>				
No. de identificación				
Testigo 1				
No. de identificación				
Testigo 2				
No. de identificación				
Investigador, Médico, Bacteriólogo ó delegado				

Este procedimiento de consentimiento informado está ajustado a las normas de ética médica vigentes en Colombia, a la declaración de Helsinki y sus enmiendas, a la Guía para Buenas prácticas clínicas (ICH E6) y a la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander

**Apéndice B: Interacciones SNP-SNP con biomarcadores de exposición al Hg en población total.**

Interacciones SNP-SNP	Hg en sangre ( $\mu\text{g Hg/L}$ )			Hg en orina ( $\mu\text{g Hg/g creatinina}$ )		
	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>
GSS_rs3761144_add	-	0,553172	0,745098	-0,101	<b>0,014592</b>	<b>0,0172</b>
GSTA1_rs3957356_add	0,021	0,089217	0,606061	0,074	0,067485	0,0106
GCLM_rs41303970_add	-	0,653599	0,622951	0,068	0,068197	0,057229
GSS_rs3761144_add	0,059	0,867221	0,745098	-0,076	0,115045	0,227405
GCLC_rs1555903_add	-	0,311522	0,252525	-0,066	0,117923	0,097849
GSS_rs3761144_add	0,014	0,233639	0,200501	-0,02	0,666612	0,372781
GSTA1_rs3957356_add	-	0,150096	0,331707	-0,016	0,672354	1
GCLM_rs41303970_add	0,007	0,534625	0,363128	0,016	0,694975	0,571429
GSTA1_rs3957356_add	-	0,48923	0,705882	0,006	0,884598	1
GCLC_rs1555903_add	0,036	0,678303	0,594203	0,004	0,933577	1
GCLM_rs41303970_add	0,049					
GSTP1_rs4147581_add	-					
GSS_rs3761144_add	0,047					
GSTP1_rs4147581_add	0,022					
GSTP1_rs4147581_add	-					
GCLC_rs1555903_add	0,026					
GSTA1_rs3957356_add	0,015					
GSTP1_rs4147581_add						
GCLC_rs1555903_add						
GCLM_rs41303970_add						

<sup>a</sup>Valor de p correspondiente a los modelos de regresión lineal multivariados.

<sup>b</sup>Valor de p empírico en base a 5000 permutaciones del modelo de regresión lineal multivariado.

**Apéndice C: Interacciones SNP-SNP con biomarcadores de función renal en población total**

Interacciones SNP-SNP	eTFG (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )			Albúmina urinaria, 24h (mg/mL)		
	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>
GSS_rs3761144_add GSTA1_rs3957356_add	-0,007	0,243376	0,176596	-0,031	0,485915	0,3875
GCLM_rs41303970_add GSS_rs3761144_add	0,001	0,857468	0,615385	-0,027	0,541028	0,413793
GCLC_rs1555903_add GSS_rs3761144_add	-0,005	0,394259	0,901961	0,011	0,791074	1
GSTA1_rs3957356_add GCLM_rs41303970_add	0,006	0,382099	0,960784	-0,049	0,350397	0,200495
GSTA1_rs3957356_add GCLC_rs1555903_add	-0,003	0,667218	0,359116	-0,009	0,843642	0,591549
GCLM_rs41303970_add GSTP1_rs4147581_add	0,001	0,839848	1	-0,032	0,528755	0,745098
GSS_rs3761144_add GSTP1_rs4147581_add	0,003	0,5887	1	0,04	0,335678	0,237654
GSTP1_rs4147581_add GCLC_rs1555903_add	0,004	0,484848	0,547619	0,017	0,70155	0,660377
GSTA1_rs3957356_add GSTP1_rs4147581_add	-0,001	0,875989	0,843137	0,015	0,750776	1
GCLC_rs1555903_add GCLM_rs41303970_add	0,006	0,337233	0,214092	0,011	0,807196	1

<sup>a</sup>Valor de p correspondiente a los modelos de regresión lineal multivariados.

<sup>b</sup>Valor de p empírico en base a 5000 permutaciones del modelo de regresión lineal multivariado.

Interacciones SNP-SNP	$\beta$ -2MCG (ng/mL)		
	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>
GSS_rs3761144_add GSTA1_rs3957356_add	0,051	0,249	0,131148
GCLM_rs41303970_add GSS_rs3761144_add	-0,025	0,571859	0,862745
GCLC_rs1555903_add GSS_rs3761144_add	-0,029	0,47171	1
GSTA1_rs3957356_add GCLM_rs41303970_add	0,009	0,85774	0,564103
GSTA1_rs3957356_add GCLC_rs1555903_add	-0,007	0,868928	0,921569
GCLM_rs41303970_add GSTP1_rs4147581_add	-0,036	0,490744	0,167665
GSS_rs3761144_add GSTP1_rs4147581_add	-0,016	0,693862	0,960784
GSTP1_rs4147581_add GCLC_rs1555903_add	0,018	0,686403	0,481481
GSTA1_rs3957356_add GSTP1_rs4147581_add	-0,027	0,564538	1
GCLC_rs1555903_add GCLM_rs41303970_add	-0,017	0,71477	0,666667

<sup>a</sup>Valor de p correspondiente a los modelos de regresión lineal multivariados.

<sup>b</sup>Valor de p empírico en base a 5000 permutaciones del modelo de regresión lineal multivariado.

### Apéndice D: Interacciones SNP-SNP con biomarcadores de exposición al Hg por grupo de exposición.

Interacciones SNP-SNP Grupo Expuesto	Hg en sangre ( $\mu\text{g Hg/L}$ )			Hg en orina ( $\mu\text{g Hg/g creatinina}$ )		
	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>
GSTA1_rs3957356_add GSS_rs3761144_add	-0,053	0,253329	0,245955	-0,139	<b>0,011609</b>	<b>0,0018</b>
GSTA1_rs3957356_add GCLC_rs1555903_add	-0,035	0,492077	0,389937	-0,114	0,062201	0,051435
GCLM_rs41303970_add GSTA1_rs3957356_add	0,001	0,9909	1	-0,11	0,111458	0,169355
GCLM_rs41303970_add GSS_rs3761144_add	-0,098	0,052297	0,057576	0,081	0,171819	0,121379
GCLC_rs1555903_add GSS_rs3761144_add	-0,008	0,864319	0,980392	0,068	0,230461	0,131619
GCLC_rs1555903_add GSTP1_rs4147581_add	-0,004	0,945102	1	0,059	0,429435	0,42963
GSTP1_rs4147581_add GCLM_rs41303970_add	0,06	0,346825	0,510204	-0,051	0,497962	1
GSS_rs3761144_add GSTP1_rs4147581_add	-0,056	0,309607	1	0,044	0,505378	0,573333
GSTA1_rs3957356_add GSTP1_rs4147581_add	0,014	0,817783	0,784314	0,032	0,656452	1
GCLC_rs1555903_add GCLM_rs41303970_add	0,064	0,228375	0,215259	0,024	0,70946	0,784314

<sup>a</sup>Valor de *p* correspondiente a los modelos de regresión lineal multivariados.

<sup>b</sup>Valor de *p* empírico en base a 5000 permutaciones del modelo de regresión lineal multivariado.

Interacciones SNP-SNP Grupo no expuesto	Hg en sangre ( $\mu\text{g Hg/L}$ )			Hg en orina ( $\mu\text{g Hg/g creatinina}$ )		
	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>
GCLM_rs41303970_add GSTP1_rs4147581_add	0,074	0,119087	0,123944	0,054	0,086509	0,052399
GSTP1_rs4147581_add GSS_rs3761144_add	-0,032	0,377993	0,284585	-0,024	0,319045	0,248366
GSS_rs3761144_add GCLM_rs41303970_add	-0,031	0,543556	0,477477	0,027	0,431346	0,363636
GSTA1_rs3957356_add GCLM_rs41303970_add	-0,085	0,162499	0,151786	-0,032	0,453947	1
GSS_rs3761144_add GCLC_rs1555903_add	-0,054	0,163528	0,158287	-0,017	0,511187	0,421429
GSS_rs3761144_add GSTA1_rs3957356_add	0,042	0,419221	0,372781	-0,022	0,544421	0,622951
GCLM_rs41303970_add GCLC_rs1555903_add	-0,026	0,570651	0,554217	0,017	0,580748	0,309735
GSTA1_rs3957356_add GCLC_rs1555903_add	-0,034	0,435406	0,181223	-0,006	0,83107	1
GSTP1_rs4147581_add GCLC_rs1555903_add	0,02	0,57001	1	-0,002	0,919648	0,573333
GSTA1_rs3957356_add GSTP1_rs4147581_add	-0,06	0,166912	0,27037	-0,003	0,922462	0,823529

<sup>a</sup>Valor de *p* correspondiente a los modelos de regresión lineal multivariados.

<sup>b</sup>Valor de *p* empírico en base a 5000 permutaciones del modelo de regresión lineal multivariado.

**Apendice E: Interacciones SNP-SNP con biomarcadores de función renal en grupo expuesto.**

Interacciones SNP-SNP	eTFG (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )			Albúmina urinaria, 24h (mg/mL)		
	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>
GSTA1_rs3957356_add GSS_rs3761144_add	-0,005	0,507466	0,349206	0	0,993715	1
GSTA1_rs3957356_add GCLC_rs1555903_add	-0,004	0,588045	1	-0,085	0,076443	0,188073
GCLM_rs41303970_add GSTA1_rs3957356_add	0,005	0,526843	0,541176	-0,061	0,257783	0,15035
GCLM_rs41303970_add GSS_rs3761144_add	0,003	0,655929	0,745098	-0,022	0,637189	0,444444
GCLC_rs1555903_add GSS_rs3761144_add	-0,002	0,823413	0,843137	-0,012	0,784452	0,357143
GCLC_rs1555903_add GSTP1_rs4147581_add	-0,009	0,314412	0,764706	0,033	0,571123	0,573333
GSTP1_rs4147581_add GCLM_rs41303970_add	0,002	0,787758	0,980392	-0,053	0,364284	0,642857
GSS_rs3761144_add GSTP1_rs4147581_add	-0,003	0,744437	0,515789	-0,035	0,495422	0,622951
GSTA1_rs3957356_add GSTP1_rs4147581_add	-0,004	0,648753	0,784314	-0,055	0,317168	0,510417
GCLC_rs1555903_add GCLM_rs41303970_add	0,001	0,850396	0,495146	0,014	0,780934	1

<sup>a</sup>Valor de p correspondiente a los modelos de regresión lineal multivariados.

<sup>b</sup>Valor de p empírico en base a 5000 permutaciones del modelo de regresión lineal multivariado.

Interacciones SNP-SNP	$\beta$ -2MCG (ng/mL)		
	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>
GSTA1_rs3957356_add GSS_rs3761144_add	0,089	0,077376	0,063989
GSTA1_rs3957356_add GCLC_rs1555903_add	-0,006	0,910478	0,862745
GCLM_rs41303970_add GSTA1_rs3957356_add	-0,051	0,420326	0,784314
GCLM_rs41303970_add GSS_rs3761144_add	-0,014	0,79482	1
GCLC_rs1555903_add GSS_rs3761144_add	-0,014	0,785941	1
GCLC_rs1555903_add GSTP1_rs4147581_add	0,105	0,121691	0,088547
GSTP1_rs4147581_add GCLM_rs41303970_add	-0,08	0,243931	0,112374
GSS_rs3761144_add GSTP1_rs4147581_add	0,026	0,658961	1
GSTA1_rs3957356_add GSTP1_rs4147581_add	-0,076	0,237594	0,541176
GCLC_rs1555903_add GCLM_rs41303970_add	-0,037	0,538435	0,5

<sup>a</sup>Valor de p correspondiente a los modelos de regresión lineal multivariados.

<sup>b</sup>Valor de p empírico en base a 5000 permutaciones del modelo de regresión lineal multivariado.

**Apendice F: Interacciones SNP-SNP con biomarcadores de función renal en grupo no expuesto.**

Interacciones SNP-SNP	eTFG (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )			Albúmina urinaria, 24h (mg/mL)		
	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>
GCLM_rs41303970_add GSTP1_rs4147581_add	0,004	0,755675	0,606061	-0,015	0,8743	0,960784
GSTP1_rs4147581_add GSS_rs3761144_add	0,011	0,268393	0,171843	0,12	0,095455	0,107656
GSS_rs3761144_add GCLM_rs41303970_add	-0,01	0,469231	1	-0,042	0,686684	1
GSTA1_rs3957356_add GCLM_rs41303970_add	0,011	0,46429	0,803922	-0,001	0,99471	1
GSS_rs3761144_add GCLC_rs1555903_add	-0,013	0,176883	0,183445	0,05	0,510576	0,654545
GSS_rs3761144_add GSTA1_rs3957356_add	-0,016	0,211149	0,510204	-0,116	0,258724	0,23913
GCLM_rs41303970_add GCLC_rs1555903_add	0,014	0,237348	0,261324	-0,003	0,972622	1
GSTA1_rs3957356_add GCLC_rs1555903_add	0	0,98454	1	0,108	0,226904	0,120219
GSTP1_rs4147581_add GCLC_rs1555903_add	0,017	0,056696	0,020736	0,019	0,786223	0,602941
GSTA1_rs3957356_add GSTP1_rs4147581_add	-0,001	0,894197	1	0,113	0,195859	0,170732

<sup>a</sup>Valor de p correspondiente a los modelos de regresión lineal multivariados.

<sup>b</sup>Valor de p empírico en base a 5000 permutaciones del modelo de regresión lineal multivariado.

Interacciones SNP-SNP	$\beta$ -2MCG (ng/mL)		
	$\beta$	<i>P</i> -valor <sup>a</sup>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>
GCLM_rs41303970_add GSTP1_rs4147581_add	0,007	0,928835	1
GSTP1_rs4147581_add GSS_rs3761144_add	-0,065	0,304947	0,130631
GSS_rs3761144_add GCLM_rs41303970_add	-0,042	0,646626	0,666667
GSTA1_rs3957356_add GCLM_rs41303970_add	0,162	0,133719	0,090462
GSS_rs3761144_add GCLC_rs1555903_add	-0,023	0,732052	0,660377
GSS_rs3761144_add GSTA1_rs3957356_add	-0,067	0,455005	0,288
GCLM_rs41303970_add GCLC_rs1555903_add	0,023	0,770227	0,571429
GSTA1_rs3957356_add GCLC_rs1555903_add	0	0,996924	1
GSTP1_rs4147581_add GCLC_rs1555903_add	-0,064	0,29964	0,231454
GSTA1_rs3957356_add GSTP1_rs4147581_add	0,053	0,477503	0,654545

<sup>a</sup>Valor de p correspondiente a los modelos de regresión lineal multivariados.

<sup>b</sup>Valor de p empírico en base a 5000 permutaciones del modelo de regresión lineal multivariado.

Apendice G: Resultado análisis de la expresión del loci de rasgos cuantitativos (eQTL)

